

Aus dem Institut für Gewebeforschung der Deutschen Forschungshochschule
Berlin-Dahlem (Prof. Dr. med. ELSE KNAKE).

Können in der Gewebekultur Antikörper gebildet werden?

Von

WALTER HÖPKEN.

(Eingegangen am 9. November 1953.)

Nach der heutigen Vorstellung wird die Bildung von Antikörpern dadurch ausgelöst, daß ein Antigen in solche Zellen gelangt, die normalerweise Globuline bilden. Durch Einwirken des Antigens wird die Globulinsynthese modifiziert, und es entstehen Immunglobuline.

Um zu erkennen, welche Zellen Antikörper bilden, hat man zunächst untersucht, welche Körperzellen Antigene aufnehmen. Dazu hat man entweder das Antigen oder die Antikörper so verändert, daß sie optisch verfolgt werden können. Antigene Azoproteine lassen sich dadurch, daß sie gefärbt sind, leicht beobachten. Sie wurden einige Zeit nach der Injektion im Cytoplasma von Makrophagen, Kupfferzellen der Leber und anderen Zellen des RES aufgefunden (SABIN; KRUSE und McMASTER). Fluoreszierende Antikörper ließen die Antigene, durch die sie hervorgerufen worden waren und mit denen sie sich in der Antigen/Antikörper-Reaktion vereinigt hatten, in fast allen Zellen des Organismus und auch in reticulären und kollagenen Fasern erkennen (z. B. COONS, LEDUC und KAPLAN). Bei einem solchen Versuch, die Bildungsstätte der Antikörper aus dem Ort der Antigenablagerung abzulesen, bleibt es aber fraglich, welche von den Zellarten, in die ein Antigen eintritt, tatsächlich auch Antikörper produzieren. Die zum RES gehörenden Makrophagen nehmen beispielsweise Antigen auf, bilden aber keine Antikörper (EHRICH, HARRIS und MERTENS 1946).

Früher hat man die Antikörperbildung in die reticuloendothelialen Zellen verlegt. Von diesen hat schon METSCHNIKOFF nachgewiesen, daß sie Antigen speichern. Diese Ansicht ist heute verlassen. In neuerer Zeit werden besonders die Plasmazellen mit der Antikörperbildung in Verbindung gebracht (BJÖRNEBOE und GORMSEN; FAGRAEUS; EHRICH und Mitarbeiter 1949 u. a.). Auch EHRICH, der in älteren Arbeiten (1942, 1945) die Lymphocyten als Antikörperbildner ansah, verlegt die Entstehung der Antikörper jetzt in die Plasmazellen. Nach H. SCHMIDT bleibt es jedoch noch dahingestellt, ob neben Plasmazellen nicht doch auch andere Zellen, die Antigene aufnehmen, Antikörper bilden können.

Man weiß noch wenig darüber, wie die Antikörperbildung im Organismus gesteuert wird. Die Milz scheint den Vorgang zu fördern, sie ist aber dabei nicht unentbehrlich. Nervöse Einflüsse sind anzunehmen, jedoch

bisher nicht greifbar. Von den Hormonen können ACTH und Cortison bei hoher Dosierung die Bildung von Plasmazellen und Antikörpern vermindern, wenn auch nicht vollkommen unterbinden (unter anderen HEILMEYER). Röntgenstrahlen hemmen die Antikörperbildung, wenn sie gleichzeitig mit der Antigeninjektion oder bald darauf auf den Organismus einwirken.

Nach diesen Befunden sollte man annehmen, daß die Antikörperbildung nicht nur im intakten Organismus mit allen seinen Korrelationen möglich ist. Auch die vom Körperganzen abgetrennten lebenden Gewebsteile sollten dazu imstande sein. Wir haben untersucht, in welchem Maße dies der Fall ist. Dabei haben wir zum Unterschied von früheren Untersuchern desselben Problems neben anderen ein Züchtungsverfahren angewandt, bei dem ein intensiver Kontakt zwischen Gewbezellen und Antigen möglich ist.

Methodik.

1. *Züchtungsbedingungen.* Alle ausgepflanzten Gewebe stammten vom Meerschweinchen. Es waren 1 cm³ große Stückchen aus dem Knochenmark des Femurs, aus der Milz oder aus den Lymphknoten in der Leistenbeuge und am Halse. Sie wurden in Deckelschalen, Carrel-Flaschen oder als Rollkulturen angesetzt.

Die feste Phase des Kulturmediums war Meerschweinchenplasma mit oder ohne Heparin (1:20000); die flüssige Phase enthielt Meerschweinchen Serum und Tyrodelösung.

Als Antigen wurde defibriniertes Ziegenblut oder die entsprechende Menge gewaschene Ziegenerythrocyten zugesetzt, und zwar in Carrel-Flaschen und Deckelschalen zur festen Phase und in Rollkulturen zur flüssigen Phase.

Die Deckelschalen, die die von CARREL für ähnliche Versuche gebrauchten Gabrischewski-Schalen nachahmen sollten, enthielten gewöhnlich 40—50 Gewebestückchen, die Carrel-Flaschen 20—25, die Rollkulturen 20—40.

In den Deckelschalen befanden sich die Explantate nicht auf dem Boden, sondern wie in CARRELS Gabrischewski-Schalen im Deckel des Gefäßes, wo sie durch das geronnene Plasma festgehalten wurden. Bei dieser Anordnung konnte aus dem Medium Synäreticum abtropfen. In den Rollkulturen wurden die Explantate nur durch eine sehr dünne Schicht von geronnenem Plasma am Glase festgehalten. Die Explantatzellen lagen größtenteils ganz oberflächlich und kamen mit dem in der flüssigen Phase enthaltenen Antigen in unmittelbare Berührung.

Außerdem wurden Deckglaskulturen mit einem Stückchen Gewebe in je 0,05 cm³ Plasma und Ringerlösung und 0,005 cm³ Ziegenblut angelegt. An diesen Kulturen wurde die Phagocytose beobachtet.

Die Kulturen wurden 5 oder 6 Tage lang bei 37° C bebrütet.

Bei einem Teil der Experimente wurden die Versuchsbedingungen in folgender Weise verändert:

- a) Die Carrel-Flaschen wurden umgedreht, so daß das Synäreticum aus dem Medium wie in den Deckelschalen abtropfen konnte.
- b) Die Antigenmenge wurde zwischen 0,003 und 0,1 cm³ abgestuft.
- c) Die Anzahl der Gewebestückchen je Versuch variierte zwischen 15 und 80 Stück.
- d) Die Versuchsdauer wurde bis auf 3 Tage verkürzt und bis zu 7 Tagen verlängert.

Insgesamt wurden mit den Organen von 32 Meerschweinchen aus zwei Zuchten 157 Versuche durchgeführt. Das Antigen, Ziegenblut oder Ziegenerythrocyten, stammte von 12 Blutentnahmen aus 5 verschiedenen Ziegen.

Zu jedem Versuch wurden als Kontrollen Kulturen mit dem gleichen Gewebe ohne Antigen, und auch Kulturgefäße mit Nährmedium und Antigen ohne Gewebestückchen angesetzt.

2. *Austestung auf Antikörper.* Die feste Phase des Nährmediums mit den Gewebestückchen wurde mit einer Schere möglichst fein zerschnitten oder mit Seesand zerrieben und zusammen mit dem abgetropften Synäreticum aus den Deckelschalen und Carrel-Flaschen bzw. mit dem flüssigen Nährmedium der Rollkulturen bei -15°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit, die im folgenden kurz als „Extrakt“ bezeichnet wird, auf Hämolysine, Agglutinine und bei 16 Versuchen zusätzlich auf anaphylaktische Antikörper untersucht.

Nur bei den ersten Testen auf *Hämolysine* wurden Verdünnungsreihen des „Extraktes“ von 1:2 bis 1:64 hergestellt und jeweils die gleiche Menge einer 5%igen Aufschwemmung von Ziegenblutkörperchen hinzugefügt. Später wurde zu 2 Teilen unverdünntem „Extrakt“ 1 Teil einer 2%igen Blutkörperchenaufschwemmung hinzugegeben. Die Röhrchen wurden 2 Std lang in den Brutschrank und danach über Nacht in den Kühlraum gestellt. Um einen Komplementmangel auszuschließen, gaben wir zum Schluß frisches Meerschweinchenserum hinzu. — Während bei den ersten Versuchen die *Agglutination* auf dem Objektträger untersucht wurde, wurde sie später in den Hämolyserröhrchen beobachtet.

Außerdem führten wir die Kollodiumpräzipitation nach der Methode von CAVELTI durch.

Bei 16 Versuchen wurden 2–4 cm³ „Extrakt“, der aus mehreren Versuchsgläsern gesammelt wurde, zur Untersuchung auf *anaphylaktische Antikörper* einem Meerschweinchen i. p. injiziert. 48 Std später erhielt das Tier als Erfolgsinjektion 1 cm³ Ziegenblut intrakardial oder in die A. carotis.

Ergebnis.

In 3 von 49 Versuchsreihen bzw. 4 von 157 Kulturgefäßen konnten im „Extrakt“ Hämolysine nachgewiesen werden. Es waren dies Kulturen aus Knochenmark und Lymphknotengewebe in Deckelschalen oder Carrel-Flaschen. Die „Extrakte“ aus den Kontrollkulturen ohne Antigen oder ohne Gewebe waren ebenso wie die NaCl- und Komplementkontrollen negativ.

Agglutinine konnten in keinem Versuch nachgewiesen werden.

Die Kollodiumpräzipitation nach der Methode von CAVELTI war negativ.

Auch die Untersuchungen auf anaphylaktische Antikörper waren erfolglos. Durch Kontrollen an passiv immunisierten Tieren überzeugten wir uns von der Richtigkeit der Versuchsmethode und stellten dabei fest, daß die Hämolysen *in vitro* empfindlicher ist als der passiv anaphylaktische Schock am Meerschweinchen.

An Deckglaskulturen konnten wir die Beobachtungen CARRELS bestätigen, daß die artfremden Erythrocyten am 3. und 4. Tag in großen Mengen von den Makrophagen, aber nicht von Fibroblasten phagocytiert werden.

Bei der Beobachtung der Versuchs- und Kontrollkulturen ergaben sich regelmäßig folgende Befunde:

Aus den Knochenmarkstückchen wanderten schon nach wenigen Stunden lebhaft bewegliche Zellen aus; sie hatten nach 24 Std das ganze Plasma dicht besetzt. Um das Lymphknoten- oder Milzgewebe bildeten sich erst in einem oder zwei Tagen Höfe aus Rundzellen. Wachstumszonen aus Fibroblasten wurden nicht bei allen Gewebestückchen und nie vor dem 3. Tag der Kultivierung beobachtet. Nach Ablauf der Versuchsdauer von 5 oder 6 Tagen wurden immer noch gut erhaltene, lebende Gewebezellen gefunden. — Häufig waren Teile des Plasma verflüssigt und abgetropft.

In einem Teil der Versuche wurden die Ziegenerythrocyten innerhalb der ersten 3 Tage durch „Normal-Hämolsine“ des Meerschweinserums in den Versuchsgefäßen und denjenigen Kontrollgefäßen, die außer Meerschweinplasma oder Meerschweinserum auch Ziegenerythrocyten, aber kein Meerschweingewebe enthielten, gleichmäßig komplett oder inkomplett hämolysiert.

Derartige gegen artfremde Erythrocyten gerichtete Lysine kommen in den Seren vieler Tierarten spontan, ohne experimentelle Vorbehandlung, vor. Der Titer dieser „Normal-Antikörper“ ist meist niedrig.

Bei der serologischen Auswertung der „Extrakte“ nach 5tägiger Bebrütung der Explantate machten sich diese Normal-Hämolsine nicht mehr bemerkbar. Die „Extrakte“ der Kontrollgefäße, bestehend aus Meerschweingewebe und Meerschweinplasma ohne Erythrocyten, gaben bei der serologischen Austestung gegen Ziegenerythrocyten keine Hämolyse. Offenbar waren die Normal-Hämolsine gegen Ziegenerythrocyten, die ursprünglich in dem Meerschweinplasma vorhanden gewesen waren, während der 5tägigen Versuchsdauer bei einer Temperatur von 37° C zerstört worden. — Wenn eine Hämolyse bei der serologischen Austestung nach Versuchsabschluß bei uns eintrat, so geschah dies nur in den Versuchsgefäßen. Es kann daraus geschlossen werden, daß sie durch Hämolsine, die in vitro als Antwort auf das zugesetzte Antigen neu gebildet worden waren, entstand.

Die positiven Versuche verliefen folgendermaßen: Versuch 563. 80 Explantate von Meerschweinchenknochenmark und Lymphknotengewebe wurden in einer Deckelschale mit 0,1 cm³ Ziegenblutkörperchen und 1,0 cm³ Meerschweinplasma angesetzt. Eine Kontrollkultur gleicher Zusammensetzung enthielt keine Blutkörperchen. Eine 2. Kontrolle bestand nur aus Meerschweinplasma und Ziegenblut. Nach 3 Tagen waren im Versuchs- und Kontrollgefäß die Erythrocyten hämolysiert. Die Gewebezellen sahen noch am 5. Tag gesund aus. Teile des Plasma waren verflüssigt und als Synäreticum abgetropft. Explantate und festes Medium wurden nach 5 Tagen fein zerschnitten, eingefroren, wieder aufgetaut und zentrifugiert. Der „Extrakt“ wurde gegen Ziegenblutkörperchen ausgetestet. 0,5 cm³ „Extrakt“ mit 0,25 cm³ Blutkörperchenaufschwemmung kamen in den Brutschrank und zeigten nach 10 min eine nicht vollständige, aber deutliche Hämolyse, die sich durch Kältebindung und Komplementzusatz nicht mehr verstärkte. In den Kontrollen trat keine Hämolyse ein.

Versuch 566 war mit Gewebe desselben Meerschweinchens und dem gleichen Medium in Deckelschalen angesetzt wie Nr. 563, enthielt aber nur Lymphknoten-explantate. Auch hier wurde nach 3 Tagen gleichmäßige Lyse im Versuchs- und Kontrollgefäß beobachtet.

Der „Extrakt“ dieser Versuchskultur zeigte im Test ebenfalls nach 10 min eine schwache Hämolyse. Durch Komplementzusatz nach 2 Std wurde die Hämolyse komplett. In den „Extrakten“ aus den Kontrollgefäßen trat keine Hämolyse ein.

Versuch 594. 80 Stückchen Meerschweinchenknochenmark und Lymphknotengewebe wurden mit 1 cm³ Meerschweinplasma und 0,1 cm³ Ziegenblutkörperchen in einer Deckelschale angesetzt. Ferner lief eine Kontrolle aus dem gleichen Gewebe nur mit Plasma und eine 2. Kontrolle mit Plasma und Ziegenblut ohne Gewebe. Nach 3 Tagen waren in beiden Gefäßen die Erythrocyten aufgelöst. Nach 6 Tagen waren die Gewebezellen noch in gutem Zustand. Gewebe und Medium wurden zerschnitten, gefroren, aufgetaut und zentrifugiert. Der „Extrakt“ des Versuchsgefäßes zeigte nach Zusatz von Komplement und Antigen und nach Kältebindung komplette Hämolyse. Die Kontrollen blieben negativ.

Versuch 826. Etwa 30 Stückchen Knochenmark und Lymphknotengewebe wurden mit 0,05 cm³ Ziegenerythrocyten und 0,5 cm³ Plasma in Carrel-Flaschen angesetzt. In der Kultur wurde eine Lyse der Erythrocyten nicht sicher beobachtet. Der nach 5 Tagen aus der Versuchskultur gewonnene „Extrakt“ mit Antigenzusatz zeigte nach 2 Std Aufenthalt im Brutschrank komplette Hämolyse. Die Kontrollen ohne Gewebe bzw. ohne Antigen blieben negativ.

Tabelle 1. *Verteilung der Versuche auf die Züchtungsmethoden.*

Die mit + bezeichneten Versuchsgruppen enthielten die positiven Versuche.

	Carrel- Flaschen	Deckel- schalen	Roll- kulturen
Lymphknoten und Knochenmark . . .	58+	8++	14
Nur Lymphknoten . .	15	1+	3
Nur Knochenmark . .	15	5	2
Milz	19	2	14
Niere	2	—	—
Lunge	1	—	—
Zusammen	110	16	33

Tabelle 2a—c. *Verteilung der Versuche auf die unterschiedliche Versuchsdauer, Menge des Gewebes und Menge des Antigens.*

Die mit + bezeichneten Versuchsgruppen enthielten die positiven Versuche.

a		b		c	
Versuchs- dauer in Tagen	Anzahl der Versuche	Antigenmenge	Anzahl der Versuche	Gewebestücke je Kultur	Anzahl der Versuche
3	4	0,003—0,006	12	15—40+	27
4	28	0,012	11	40—50	121
5+++	105	0,025	26	50—80+++	9
6+	15	0,05+	87		
7	5	0,1++++	21		

Diskussion.

Unsere Ergebnisse unterscheiden sich nicht deutlich von denen anderer Untersucher.

In 3 von unseren 49 Versuchen waren in der Gewebekultur entstandene Hämolsine nachweisbar, dabei in einem Versuch in 2 verschiedenen Ansätzen.

CARREL und INGEBRIGTSEN setzten zu ihren Kulturen aus Meerschweinchen-gewebe als Antigen Ziegenblutkörperchen. Die Bildung von Hämolsinen konnten sie in 4 von 17 Versuchen nachweisen.

LÜDKE benutzte ebenfalls Meerschweinchenorgane und Ziegenblut. Hämolsine wurden 1mal gefunden. Die Gesamtzahl der Versuche wird nicht angegeben.

In Versuchen mit Kaninchenmilz und Typhusbakterien versuchte PRZYGOŁE, die Bildung von Agglutininen zu erreichen. Er hatte 4mal Erfolg, die Zahl seiner Experimente nennt er nicht.

Über die besten Ergebnisse konnte SCHILF berichten. In 10 von 13 Versuchen mit Meerschweinchen- oder Kaninchenmilz und Choleravibrionen wurde die Bildung von Lysinen durch den PFEIFFERSchen Versuch nachgewiesen. Leider fehlen hier die Kontrollen durch Kulturen, die ohne Antigen gezüchtet wurden.

KUCZINSKY und Mitarbeiter berichten über zwei negativ verlaufene Versuche.

Wir hatten gehofft, durch Abänderung der Züchtungsbedingungen regelmäßiger positive Ergebnisse zu bekommen als frühere Untersucher. Diese Erwartung wurde aber nicht erfüllt.

So gebrauchten wir Rollkulturen mit dem Ziel, das Antigen in möglichst enge Berührung mit den Zellen des Explantats zu bringen. Bei dieser Methode werden die Gewebstückchen nur mit einer dünnen Plasmaschicht am Glase fixiert. Eine flüssige Phase aus Serum und Tyrodelösung, die außerdem das Antigen enthält, streicht 8mal in der Stunde darüber hinweg. Die Explantate kommen dabei innerhalb 24 Std etwa 4 Std lang mit dem Antigen in unmittelbare Berührung. Das ist ein Zeitraum, der im Tierkörper sicherlich zur Aufnahme großer Antigenmengen ausreichen würde.

Im Organismus werden Antigene sehr schnell und vollkommen von den Zellen aufgenommen. Pferdeserumazotoxyl konnte von HAUROWITZ und BREINL schon 6 Std nach der Applikation nicht mehr im Blut von Kaninchen nachgewiesen werden.

KRUSE und McMASTER fanden bereits 3—5 min nach der Injektion Echtsäureblau-B-Azoproteine im Cytoplasma der KUPFFERSchen Sternzellen der Leber und in anderen reticulo-endothelialen Zellen von Mäusen.

In unseren Experimenten lagen ebenso wie bei CARREL und INGEBRIGTSEN die Zellen der Meerschweinchengewebsexplantate und die als Antigen gedachten Ziegenerythrocyten tagelang reaktionslos nebeneinander. Erst nach 3—4 Tagen kam es in einem Teil unserer Kulturen zu einer lebhaften Phagocytose. Es ist möglich, daß die Zellen zu dieser Zeit schon durch Stoffwechselprodukte oder auf andere Weise geschädigt waren und nicht mehr Antikörper bilden konnten, obwohl sie noch gesund aussahen. Möglicherweise waren auch die Ziegenerythrocyten zu diesem Zeitpunkt so verändert, daß sie ihre sonstigen Eigenschaften verloren hatten.

Es ist aber auch vorstellbar, daß Antikörper in vitro häufiger entstanden sind als wir sie nachweisen konnten. Denn im Kulturmedium

bleibt Antigen liegen und bindet wahrscheinlich freiwerdende Antikörper bis zur Absättigung. Nur darüber hinaus entstehende Antikörper dürften serologisch nachweisbar sein. Diese Verhältnisse in der Kultur sind mit denen im Organismus vergleichbar. Auch dort sind Antikörper erst zu erfassen, wenn im Serum nicht mehr freies Antigen vorhanden ist.

Wahrscheinlicher erscheint uns aber, daß die Antikörperbildung im Tierkörper tatsächlich leichter abläuft als in den isolierten Zellen *in vitro*. Dafür spricht, daß alle Experimente anderer Untersucher ohne Ausnahme positiv verlaufen sind, wenn das Antigen schon in das intakte Tier injiziert wurde und die Explantation des Milz- oder Lymphknotengewebes erst danach erfolgte (LÜDKE, PRZYGODE, FAGRAEUS, REN KIMURA u. a.). MEYER und LOEWENTHAL kürzten den Zeitraum zwischen der Antigeninjektion und der Explantation des lymphatischen Gewebes auf 1 Std ab und erhielten auch dann noch regelmäßig Antikörper in der Gewebekultur.

Die Antikörperbildung wird also wohl schon in äußerst kurzer Zeit *in vivo* eingeleitet und soweit gesichert, daß sie nunmehr regelmäßig *in vitro* vollendet werden kann. Wir halten es nach allem für möglich, daß die vollzogene Antigenaufnahme in die Zellen dabei der entscheidende Vorgang ist.

Zusammenfassung.

Lymphknoten und Knochenmark von Meerschweinchen wurden im Explantat auf verschiedene Weise mit Ziegenerythrocyten als Antigen zusammengebracht. In 3 von 49 Versuchen waren *in vitro* gebildete Hämolsine nachweisbar, darunter in einem Versuch in 2 Ansätzen. Vom Körper abgetrennte Zellen sind also zur Antikörperbildung fähig. Die Bedingungen, unter denen Antikörperbildung *in vitro* regelmäßig oder zumindest häufig erfolgt, haben wir nicht aufgefunden. Ein Züchtungsverfahren, bei dem wir Explantatzellen und Antigen in unmittelbaren Kontakt miteinander bringen konnten, führte nicht zu den erwarteten positiven Ergebnissen. — Möglicherweise entstehen Antikörper *in vitro* häufiger als sie nachweisbar sind. — Wir halten es für wahrscheinlich, daß der Vorgang der Antikörperbildung *in vitro* zwar ablaufen *kann*, daß dies aber tatsächlich nur selten geschieht, weil das Antigen in ungenügendem Maße oder zu spät von den Zellen *in vitro* aufgenommen wird.

Literatur.

BJÖRNEBOE, M. u. H. GORMSEN: *Acta. path. scand.* (Københ.) **20**, 649 (1943). — CARREL, A. and R. INGEBRIGTSEN: *J. of Exper. Med.* **15**, 287 (1912). — CAVELTI, P. A.: *J. of Immun.* **57**, 141 (1947). — COONS, A. H., LEDUC and M. H. KAPLAN: *J. of Exper. Med.* **93**, 173 (1951). — EHRRICH, W. E., D. L. DRABKIN and C. FORMAN: *J. of Exper. Med.* **90**, 157 (1949). — EHRRICH, W. E. and T. N. HARRIS: *J. of Exper. Med.* **76**, 335 (1942). — EHRRICH, W. E., T. N. HARRIS and E. MERTENS: *J. of Exper.*

Med. **83**, 373 (1946). — FAGRAEUS, A.: J. of Immun. **58**, 1 (1948). — HARRIS, T. N., E. GRIMM, E. MERTENS and W. E. EHRLICH: J. of Exper. Med. **81**, 73 (1945). — HAUROWITZ, F. u. F. BREINL: Z. physiol. Chem. **205**, 259 (1932). — HEILMEYER, L.: Klin. Wschr. **1952**, 865. — KAPLAN, M. H., A. H. COONS and H. W. DEANE: J. of Exper. Med. **91**, 15 (1950). — KRUSE, H., and P. D. McMASTER: J. of Exper. Med. **90**, 425 (1949). — KUCZINSKY, M. H., E. TENNEBAUM u. A. WERTEMANN: Virchows Arch. **258**, 686 (1925). — LÜDKE, H.: Berl. klin. Wschr. **1912**, 1034. — METSCHNIKOFF: Zit. nach HANS SCHMIDT. — MEYER, K. u. H. LOEWENTHAL: Z. Immun.forsch. **54**, 409 (1928). — PRZYGOŁE, P.: Wien. klin. Wschr. **1913**, 841; **1914**, 201. — REN KIMURA: Literatur siehe bei T. MASUDA, Arch. exper. Zellforsch. **15**, 446 (1934). — SABIN, FL. R.: J. of Exper. Med. **70**, 67 (1939). — SCHLE, F.: Zbl. Bakter. I Orig. **97**, 269 (1926). — SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie. Darmstadt 1951.

Dr. med. WALTER HÖPKEN, Assistent am Institut für Gewebeforschung
der Deutschen Forschungshochschule Berlin-Dahlem.