

Aus dem Pathologisch-Bakteriologisch-Serologischen Institut  
der Städtischen Krankenanstalten Karlsruhe  
(Vorstand: Prof. Dr. BÖHMIG)

## Über die Lokalisation der Antikörperbildung nach aerogener Immunisierung

Von

JÜRGEN VAN DE LOO

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. November 1959)

### A. Einleitung

Die Frage nach der Bildungsstätte spezifischer Antikörper hat mehr und mehr zur Vorstellung geführt, daß sich die Synthese der spezifischen Antikörperglobuline im ribonucleinsäure- (RNS-) reichen Zelleib der Plasmazellen (PZ) abspielt.

EHRICH (1955, 1956) hat seine Vorstellungen über die morphologisch-funktionellen Zusammenhänge bei der Antikörperbildung in seiner „Genetischen Theorie“ zusammengefaßt: Das corpusculäre Antigen wird danach von den Zellen des RES durch Phagocytose aufgenommen und hier in seine einzelnen antigen wirksamen Komponenten, die das Aktivator-Antigen darstellen, zerlegt. Diese nun löslichen Stoffe verlassen die Zelle wieder und regen im Mesenchym die Proliferation von PZ aus undifferenzierten Mesenchymzellen an. Im Laufe des Reifungsprozesses vom Plasmoblasten über den Proplasmacyten zur reifen PZ wird im Cytoplasma das spezifische Antikörperglobulin synthetisiert und dann schließlich an den Organismus abgegeben. Auf die Theorien zur Erklärung der biochemischen Dynamik der Antikörperbildung kann hier nicht eingegangen werden.

Zahlreiche Autoren sind in ihren experimentellen Untersuchungen dem Prozeß der Antikörperbildung zwar auf sehr verschiedene Weise nachgegangen, bedienten sich jedoch fast alle der intravenösen oder subcutanen Applikationsart des Antigens. Die morphologischen Reaktionen des Organismus hängen in Lokalisation, Intensität und zeitlicher Entwicklung bis zu einem gewissen Grade von dem Zuführweg des Antigens ab. Zudem stellt z. B. die intravenöse Applikation von Antigenen einen höchst pathologischen Gewalteingriff dar, dem in der normalen Pathologie nur wenige schwere Krankheitsbilder entsprechen, wie z. B. eine eitrige Thrombophlebitis, ein Lungenabsceß oder eine akute bakterielle Endokarditis.

Es ist das Ziel der vorliegenden Untersuchung, die bislang benützten Applikationsarten von Antigenen durch den Weg der Inhalation zu ergänzen und so die morphologischen und humoralen Reaktionen des Organismus kennenzulernen. Es ist uns keine Arbeit bekanntgeworden, in der unsere Fragestellung bislang bearbeitet wurde.

### B. Versuchsanordnung

**Inhalation.** Allen unseren Versuchstieren wurde das Antigen als Aerosol durch Inhalation zugeführt. Die Inhalationsdauer, ihre äußeren Bedingungen und die Menge des Inhalates wurden bei allen Tieren konstant gehalten. Das Aerosol wurde in einem „PARI“-Aerosolgerät, wie es zur klinischen Therapie benutzt wird, hergestellt. Dabei wird durch einen kleinen Kompressor Druckluft erzeugt, die in einer Spezialdüse die entsprechende Flüssigkeit zerstäubt. Die Teilchengröße des Aerosols schwankte bei der von uns verwandten Düse nach

Angaben der Firma zwischen 0,5 und 5  $\mu$  mit einem Häufigkeitsmaximum bei etwa 2  $\mu$ . Durch ein Schlauchsystem wurde das Aerosol in eine 1 Liter fassende Glaskugel geleitet. Diese besaß auf der einen Seite zwei Ansatzstutzen für den Schlauch des Inhalates und für ein kleines Filter zum Druckausgleich. Auf der anderen Seite war eine breite manschettenförmige Öffnung eingelassen, die nun über einen am Tieroperationstisch befestigten Stahlring gestülpt und luftdicht verschlossen wurde. In diesen Stahlring lassen sich Schnauze und Nase des Tieres so einlegen, daß sie über längere Zeit in dieser Stellung fixiert bleiben. Das Tier war in Rückenlage auf dem Tisch festgeschnallt. Die Zerstäubung des Antigens dauerte 20—25 min. Die Tiere blieben jedoch noch etwa 10 min länger an das Inhalationssystem angeschlossen, um die Kugel leer zu atmen.

Aerosole mit einer durchschnittlichen Teilchengröße von etwa 2  $\mu$  gelangen nach FIND-EISEN (1935), STIEVE u. Mitarb. (1953) sowie SCHISSLÉ (1953) nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Versuchstieren bis in die Alveolen. Durch Mikroautoradiographien nach Inhalation von radioaktivem Phosphor bei ähnlicher Versuchsanordnung und gleicher Teilchengröße läßt sich das auch bei Meerschweinchen objektivieren (VAN DE Loo). So kann man voraussetzen, daß das von uns benutzte Aerosol bis in die Alveolen der Kaninchen gelangt ist. — Frühere Untersuchungen mit Meerschweinchen (VAN DE Loo) haben anhaltsweise gezeigt, daß etwa die Hälfte eines Aerosol-Inhalates tatsächlich in den Bronchialbaum und das Lungenparenchym gelangt, 20—30% gehen im zuführenden Schlauchsystem und in der Inhalationskugel verloren, während etwa ebensoviel auf den Schleimhäuten der oberen Luftwege (Nase, Rachen, Kehlkopf und Trachea) niedergeschlagen und sekundär in den Verdauungskanal befördert werden.

**Antigen.** Wir benutzten als Antigen eine Vaccine von abgetöteten Keimen von *Salmonella paratyphi B*. Die Abtötung erfolgte durch Zugabe von 1%igem Formalin zur Kulturflüssigkeit nach 24ständigem Wachstum bei 37° C. Nach dreitägigem Eisschrankaufenthalt wurde abzentrifugiert, zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen und schließlich in 0,5%iger Phenol-Kochsalzlösung aufgeschwemmt. — Zur Inhalation kamen jeweils 5 cm<sup>3</sup> einer 1:2-Verdünnung der Vaccine-Stammlösung. Die Bakterienmenge entsprach in der Stammlösung einem Stickstoffgehalt von 80 mg-% N nach KJELDAHL, in jeder Inhalationsdosis demnach einem Stickstoffwert von etwa 2 mg N. Unter Berücksichtigung der oben dargelegten Verlustrate ist somit eine Vaccine-Dosis in das Bronchopulmonalsystem eingedrungen, die einem N-Wert von etwa 1 mg entspricht.

**Tiermaterial.** Wir benutzten kräftige, gesunde und ausgewachsene Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von etwa 1700 g. Jedem Tier wurde durch zwei Inhalationen im Abstand von 48 Std je die gleiche Menge Antigen zugeführt. Die Überlebenszeit nach der zweiten Inhalation betrug für je 3 Tiere 2, 4, 6, 9 und 12 Tage. Drei Kontrolltiere kamen ohne Inhalation und ohne Berührung mit den immunisierten Tieren zur Untersuchung.

**Serologie<sup>1</sup>.** Die Bestimmung des Antikörpertiters im Blut wurde bei den länger überlebenden Tieren intravital im Abstand von 2 Tagen durchgeführt. Dabei entnahmen wir jeweils arterielles und venöses Blut aus den Ohrgefäßen. Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurde aus den beiden Herzventrikeln arterielles und venöses Blut sowie aus der Vena portae Darm- bzw. Milzblut entnommen. Die Feststellung der Antikörpertiter erfolgte durch Prüfung von Serumverdünnungsreihen auf agglutinierende Antikörper. — Von allen Lungenlappen, von den Hiluslymphknoten, von Leber, Milz und Femur-Knochenmark wurde sodann in frischem Zustand durch Zermörsern mit Quarzsand und Verdünnung in 0,9%igem NaCl mit anschließender scharfer Zentrifugierung ein Gewebeextrakt hergestellt, aus dem ebenfalls der Antikörpertiter gegen *Salmonella paratyphi B* bestimmt wurde.

**Histologie.** Die durch Nackenschlag getöteten Tiere ließen wir zunächst aus den großen Herzgefäßen ausbluten. Danach entnahmen wir die Lungen, die Milz, Leber und einen Zylinder von Femurmark. Fixierung in Alkohol oder in Formol, das Knochenmark in der Lösung nach MAXIMOW. Dabei wurde der Alkohol in das Bronchialsystem instilliert. Die Paraffinschnitte wurden sodann mit Hämatoxylin-Eosin und mit Methylgrün-Thionin nach UNNA-PAPPENHEIM gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung der Lunge konzentrierte sich insbesondere auf eventuelle Plasmazell-Proliferationen in den Alveolarsepten, den Bronchial-

<sup>1</sup> Herrn Dr. med. H. GRAM danken wir für zahlreiche Ratschläge und die Durchführung der serologischen Untersuchungen herzlich.

wänden und in den intrapulmonalen Lymphknoten. Anschließend wurde die durchschnittliche Größe der intrapulmonalen Lymphknoten bestimmt. Die Größe ist in Maßzahlen angegeben, die sich aus der Summe der zwei größten, aufeinander senkrecht stehenden Lymphfollikel-Durchmesser errechnen. Die Maßzahl I entspricht 0,08 mm. Hierzu wurden von jedem Lungenlappen 5 Stufenschnitte durchmustert. Somit geben die Meßwerte den Größendurchschnitt von etwa 15—25 Lymphknoten pro Lappen bzw. der entsprechenden Knotenzahl in einer ganzen Lunge an.

### C. Versuchsergebnisse

**Serologische Untersuchungen.** Die Ergebnisse der Bestimmung des *Antikörpertiters* aller intravital und postmortal entnommenen Serumproben sind in der Streuungskurve der Abb. 1 zusammengefaßt. Die Titerbestimmungen der Kontrolltiere, die nicht inhaliert hatten und auch sicher nicht mit immunisierten

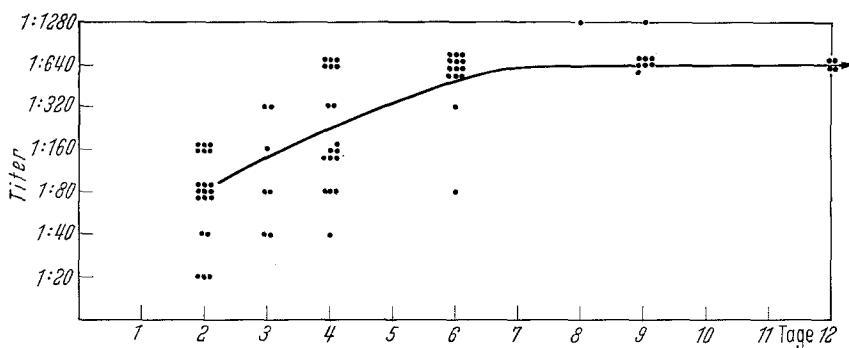


Abb. 1. Aerogene Immunisierung mit Paratyphus-B-Vaccine. Streuungskurve des Antikörpertiters im Serum

Tieren zusammengekommen waren, ergaben Werte um 1:160. Daraus ergab sich die Folgerung, nur höhere Werte als sicher positiv und spezifisch für Paratyphus-B-Antikörper anzusehen. Niedrigere Werte wurden nur dann als eindeutig verwertbar betrachtet, wenn sich zwischen zwei aufeinanderfolgenden Titerbestimmungen eine signifikant ansteigende Tendenz nachweisen ließ, d.h. die Differenz der Werte mindestens zwei Titerstufen betrug. — Unter diesen Voraussetzungen ersieht man aus Abb. 1, daß die Titerhöhen nach 2 Tagen noch im unspezifischen Bereich liegen. Am 4. Tag nach der zweiten Inhalation steigt der Mittelwert der Titerhöhen über 1:160 an, d.h., es werden sicher positive Werte erreicht. Aus der eindeutig ansteigenden Tendenz des Titers zwischen 2. und 4. Tag, die nicht durch zufällige unspezifische Agglutination vorgetäuscht werden kann, muß man jedoch schließen, daß die Antikörperbildung schon kurz vor dem 4. Tag, also etwa am 3. Tag, beginnt. Bis zum 6. Tag wird nun die Streubreite wesentlich enger und bei fast allen Serumtitern der höchste Wert von 1:640 erreicht. Diese Titerhöhe bleibt auch bis zum 12. Tag erhalten. Ein Tier (T. 156) bildet am 8. und 12. Tag einen Antikörpertiter von 1:1280. Da der Unterschied nur eine Titerstufe beträgt und die Mehrzahl der Werte bei 1:640 liegt, kann man daran festhalten, daß mit auffallender Regelmäßigkeit der am 6. Tag erreichte Höchstwert der Antikörperbildung bis zum 12. Tag nach der zweiten Inhalation bestehenbleibt.

Durch die intravitale Blutentnahme aus Ohrarterie und -vene und die postmortale Punktion von linkem und rechtem Herzventrikel sowie der Vena portae

konnten wir die *Titerhöhen* dieser verschiedenen Kreislaufbezirke miteinander vergleichen. Der Wert einer solchen Differenzierung war zwar von vornherein als unsicher zu betrachten, da unsere Antikörperbestimmungen nur im Abstand von 2—3 Tagen durchgeführt wurden. Sinnvoll wäre ein solches Vorgehen dann, wenn man in kurzen Abständen aus linkem Herzen Lungenblut, aus Vena lienalis Milzblut und aus rechtem Herzen venöses Blut der übrigen Peripherie unter gleichzeitigem Ersatz der entnommenen Blutmenge hätte entnehmen können. So konnten wir allenfalls grobe Titerunterschiede, etwa zwischen Vena portae, der das ganze Milzblut zufließt, und linkem Herzen, das Lungenblut enthält, erfassen. — Wie Abb. 2 darstellt, sind die anfänglichen Schwankungen der Titer-

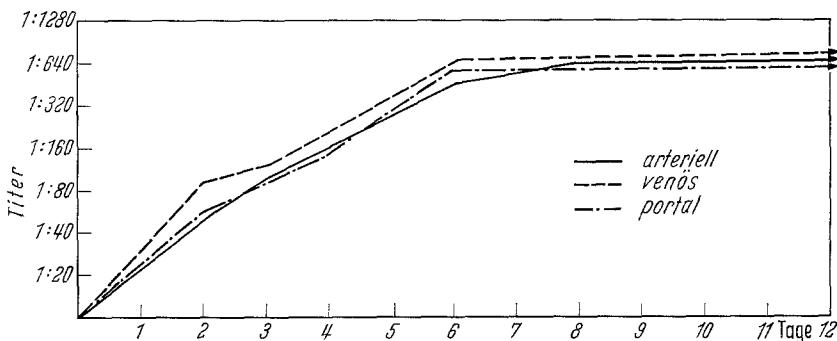


Abb. 2. Aerogene Immunisierung mit Paratyphus-B-Vaccine. Vergleich der Antikörpertiter im arteriellen, venösen und portalen Blut

höhen aber so gering, daß nirgends signifikante Unterschiede festzustellen sind. Abb. 2 ergibt eine Mittelwertskurve, die aus den Titerkurven der Einzeltiere zusammengestellt wurde. Diese zeigen auch einzeln nur eine sehr geringe Streuung, d.h., bei fast allen Einzeltieren verläuft die Kurve im Prinzip gleichsinnig. Wie erwartet, wird also der Antikörpergehalt des Serums gleichmäßig auf alle Kreislaufgebiete verteilt, bzw. es wird kein Organ durch besonders starke Abgabe von Antikörpern ausgezeichnet. Aus diesem Grunde haben wir auch in Abb. 1 alle in den verschiedenen Kreislaufgebieten bestimmten Titerwerte zusammengefaßt.

Die Bestimmung der *Antikörpertiter* in den Organextrakten von Lunge, Bifurkationslymphknoten, Milz und Knochenmark läßt infolge technischer Unzulänglichkeit einzelner Bestimmungen keine feineren Auswertungen zu. Jedoch geht aus ihnen hervor, daß die Titerhöhen von Lunge, Lymphknoten und Milz im allgemeinen dem Serumtitern entsprechen oder aber nur geringfügig darunterliegen. Das Knochenmark enthält regelmäßig signifikant niedrigere Titer. Da man nicht ausschließen kann, daß wir in den Organextrakten der Lunge, vor allem aber der Milz, trotz weitgehender Entblutung, vorwiegend den Titer des Serums und nicht den des Gewebes bestimmt haben, ist es erstaunlich, daß die Hiluslymphknoten meistens gleiche Titerhöhen wie Lunge und Milz aufweisen, wo sie doch von vornherein viel weniger Blut enthalten.

**Histologische Untersuchungen.** Aus jedem Lungenlappen wurden ein oder mehrere Gewebsstücke, die den größten Lappendurchmesser umfaßten, entnommen. Außerdem kamen bei einigen Tieren die großen Stammbronchien und die

größeren Äste im Hilusgebiet gesondert zur Untersuchung. Alle histologischen Präparate wurden grundsätzlich blind, d.h. ohne Kenntnis der Überlebzeit des einzelnen Tieres untersucht. Wir teilen die Besprechung der Lungenbefunde der Übersicht halber nach folgenden Gesichtspunkten auf:

- a) Bronchialsystem,
- b) Respiratorisches Parenchym,
- c) Lymphatisches System,
- d) Gefäßsystem.

a) *Bronchialsystem.* Die Durchmusterung der Schnitte in der H.-E.-Färbung erbrachte keinen Anhalt für irgendwelche pathologischen Veränderungen, ins-

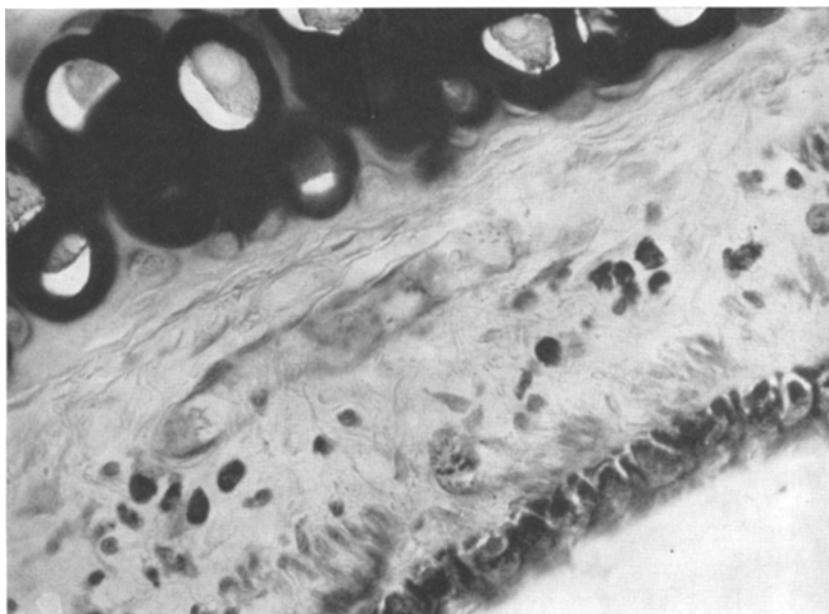


Abb. 3. Segmentbronchus (T. 161), 9 Tage nach aerogener Immunisierung mit Paratyphus-B-Vaccine.  
PZ-Proliferation in der Submucosa. (Methylgrün-Pyronin. 440 ×)

besondere nicht für akut- oder chronisch-entzündliche Prozesse. In keinem Stadium konnten wir segmentkernige Leukocyten oder deren Trümmer, geschwollene Fibroblasten oder vermehrte Histiozyten in der Bronchialwand nachweisen. In der Plasmazellfärbung nach UNNA-PAPPENHEIM ließen sich sowohl bei den Kontrolltieren wie bei den 2-, 4- und 6-Tage-Tieren in der Bronchialwand aller Größenordnungen vereinzelt, vielfach auch zu mehreren nestartig angeordnete PZ nachweisen (Abb. 3). Dieser Befund bestätigte sich mit Regelmäßigkeit in allen untersuchten Lungenabschnitten. Im allgemeinen fanden wir in den mehr distal gelegenen Bronchialabschnitten die PZ häufiger. Diese im ganzen geringfügigen, aber regelmäßig anzutreffenden PZ-Proliferationen lagen fast immer in der Umgebung der subepithelialen Capillaräste der Tunica propria bzw. im Bereich des „bronchialen Venennetzes“ bei den kleineren Bronchien. Ob sie mehr in Anlehnung an das innere Lymphgefäßnetz oder an die kleinen Venen proliferierten, ließ sich nicht mit Sicherheit bestimmen. Auch die Bronchiolen zeigten

entsprechend geringfügige PZ-Proliferation, und zwar meist zwischen oder außerhalb der Muskelbündel. Das übrige „Peribronchium“ (v. HAYEK) ließ nur äußerst selten einzelne in Nachbarschaft der Gefäße gelegene PZ erkennen. Bei den 9- und bei den 12-Tage-Tieren konnten wir gegenüber allen anderen Tiergruppen eine deutlich stärkere PZ-Vermehrung feststellen. Es muß jedoch betont werden, daß es sich nie um massive Befunde handelte. Wenn bei den erstgenannten Tieren in jedem Bronchialquerschnitt mittlerer Größe etwa 2—4 PZ zu finden und weder alle Lappen noch alle Tiere regelmäßig betroffen waren, so enthielten sie bei den 9- und 12-Tage-Tieren etwa das Doppelte. Da dieser Befund aber bei allen Tieren der beiden Gruppen regelmäßig in allen Lappen nachzuweisen war, ist er unseres Erachtens als signifikant zu bezeichnen. Projiziert man die Querschnittsbefunde auf die räumliche Anordnung der ganzen Bronchialwand, gewinnt man eher eine Anschaauung über ihr Ausmaß. Auffallend war dabei, daß sich die vermehrten PZ bei den 12-Tage-Tieren mehr in der Wand großer Bronchien fanden, während sonst die mittleren und kleineren Äste bevorzugt waren. — Als Einzelbefund sahen wir bei einem 6- und einem 9-Tage-Tier PZ-Nester in den basalen Zellschichten des mehrreihigen Flimmerepithels großer Bronchien. Auf die topographische Beziehung dieser Herde zum bronchialen Lymphknotensystem kommen wir im übernächsten Abschnitt zurück.

*Zusammenfassend* ist also festzustellen, daß sich normalerweise in den gefäßführenden Schichten der Bronchialwand einzelne PZ nachweisen lassen. Zwischen 6. und 9. Tag nach Inhalation des Antigens beginnt regelmäßig eine vermehrte PZ-Proliferation, die auch am 12. Tag nach Inhalationsende noch deutlich ist.

b) *Respiratorisches Parenchym*. Wir fanden in den Alveolen der Kontrolltiere sowie der 2-, 4- und 6-Tage-Tiere immer wechselnde Mengen abgelöster Alveolar-epithelzellen (AEZ). Es schien, als ob ihre Menge doch starken individuellen Schwankungen unterworfen war. So fanden wir bei verschiedenen Tieren derselben Inhalationsgruppen sowie in verschiedenen Lappen derselben Tierlunge sehr wechselnde Zahlen. Eindeutig vermehrt erwiesen sich die abgelösten AEZ jedoch bei den Tieren der 9- und 12-Tage-Reihe. Hier fielen sowohl vermehrte Zellen in den Alveolen als auch solche auf, die sich in Bronchioli alveolares zu Zylindern zusammengelagert hatten. Derartige Zylinder aus abgelösten AEZ sind von PETERSEN (1935) und BARGMANN (1936) beschrieben worden. Die Gestalt der Zellen variierte beträchtlich. Die Mehrzahl erschien wesentlich vergrößert gegenüber ihrer Größe *in situ*. Der Zelleib war meist rundlich bis polygonal, die Kerne im allgemeinen rund und von lockerer Kernstruktur. Eigentümlich erschien die wechselnde Färbbarkeit des Cytoplasmas mit Pyronin. Die Mehrzahl der abgelösten AEZ zeigte keine oder nur eben angedeutete Rotfärbung. In wechselndem Ausmaß, jedoch ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit, fanden sich auch eindeutige in den Alveolarlichtungen liegende AEZ mit sehr deutlich pyroninpositivem Plasma. Es fiel auf, daß dieses meist feinschollig oder auch granular war. Wenn in seltenen Fällen zu einer solchen Pyroninophilie auch noch exzentrische Kernlage kam, fiel die Differentialdiagnose zu PZ schwer. Die dichte Kernstruktur der PZ entscheidet dann. — Nur selten ließen sich mit unseren Mitteln phagozytierte Stoffe, wie gelegentlich einzelne Chromatinbröckel von Zellkernen, nachweisen. — In deutlich geringerem Ausmaß lagen die abgelösten AEZ in Bronchiolen und in der Lichtung kleiner und mittlerer Bronchien.

Weder im Lumen der Alveolen noch im bindegewebigen Maschenwerk der Alveolarsepten fanden sich bei irgendeiner Tiergruppe PZ. Im Lumen wurden wir gelegentlich durch abgelöste AEZ getäuscht (s. oben). In den Septen konnte man ganz vereinzelt pericapilläre PZ liegen sehen, jedoch so spärlich, daß man in einem ganzen Schnitt vielleicht drei typische PZ vorfand. Dieser Befund ist also im ganzen kaum erwähnenswert. — Besonders bei den 4- und 6-Tage-Tieren ließen sich im lockeren Interstitium der Septen einzelne noch intakte Granulozyten, meist aber zahlreiche Kerentrümmer nachweisen, die in der Mehrzahl zerfallenen Granulozyten entsprachen. — In den Capillaren der Alveolarsepten fand sich immer wieder, jedoch ohne nachweisbare Regelmäßigkeit, eine Leukostase, die das Lumen gelegentlich ganz verlegte. Irgendwelche speziell-pathologischen Veränderungen, insbesondere entzündliche Veränderungen, im Bereich der Alveolen und ihres Interstitiums konnten wir nicht finden.

*Zusammenfassend* ist festzuhalten, daß bei allen, auch den nichtimmunisierten Tieren wechselnde Mengen abgelöster AEZ in den Alveolen liegen, die sich jedoch nach einem Intervall von mehr als 6 Tagen nach aerogener Immunisierung deutlich vermehren. Weder im Alveolarlumen noch in den -septen traten im Laufe der Immunisierung PZ auf. Bei den 4- und 6-Tage-Tieren fanden wir eine mäßige interstitielle Vermehrung von intakten, meist aber zerfallenen Granulozyten.

c) *Lymphatisches System.* Zunächst wurde versucht, einen Anhalt für die Lymphknotengröße im Laufe der Immunisierung zu gewinnen. Die extrapulmonalen Lymphknoten wurden nur makroskopisch beurteilt. Ihre Größe ließ keinerlei Schwankungen zwischen den verschiedenen Tiergruppen erkennen. Die Größe der intrapulmonalen Lymphfollikel wurde nach dem oben angegebenen Verfahren verglichen. Die Tabelle zeigt, daß die Durchschnittsgrößen bei immunisierten Kaninchen aller Stadien wie bei den nichtimmunisierten nur in ganz geringen Grenzen schwanken. Sie fassen die Einzelwerte von 80—100 Lymphfollikelmessungen pro Tier zusammen und geben so ein zuverlässiges Bild. Es lassen sich also weder bei den extrapulmonalen noch bei den intrapulmonalen Lymphknoten signifikante Größenschwankungen in Abhängigkeit von der aerogenen Immunisierung nachweisen.

Tabelle. *Größenverhältnisse und Struktur der intrapulmonalen Lymphfollikel nach aerogener Immunisierung*

Lebensdauer nach Inhalation	Größe <sup>1</sup>	Keimzentren	Lymphocytenreichtum
Kontrollen	6,2	< 10 %	stark
2 Tage .	6,0	Ø	wechselnd
4 Tage .	6,5	~30 %	meist stark
6 Tage .	6,0	< 10 %	meist stark
9 Tage .	6,3	Ø	meist gering
12 Tage .	5,7	Ø	gering

<sup>1</sup> Siehe Versuchsanordnung, S. 40.

Die wenigsten *intrapulmonalen Lymphfollikel* enthielten Reaktionszentren. Nur bei den Tieren, die 4 Tage nach Inhalationsende getötet wurden, wies etwa ein Drittel der gemessenen Lymphfollikel Reaktionszentren auf. Der Lymphocytenreichtum war im allgemeinen gleichmäßig. Auffallend erschien die Zellverarmung der Follikel bei den Tieren, die länger als 9 Tage gelebt hatten. Auf die feinere cytologische Differenzierung der Lymphknotenzellen konnte in dieser ersten Untersuchung nicht eingegangen werden. Wir haben uns zunächst auf die relativ grobe Methode der Beobachtung reifer PZ im Lymphknotengewebe beschränkt. Dabei zeigte sich, daß auch bei den Kontrolltieren regelmäßig PZ im lymphatischen Gewebe nachzuweisen waren. Sie fanden sich meist zu mehreren, also in einem Schnitt zu 2—4 Zellen in kleineren Nestern zusammengelagert an der Peripherie des Lymphfollikels, fast nie im Innern. Diese wenigen, aber regelmäßig nachweisbaren PZ-Nester der Lymphfollikelperipherie waren in wechselse-

der Regelmäßigkeit auch bei allen Gruppen der immunisierten Tiere vorhanden. Wider Erwarten fand sich aber keine signifikante zahlenmäßige Vermehrung oder Verminderung der PZ im Zusammenhang mit der aerogenen Immunisierung. Da zahlreiche bronchiale Lymphfollikel unmittelbar unter dem Epithel mittlerer und größerer Bronchien liegen, täuschten die auch hier am Follikelrande liegenden PZ-Nester in einzelnen Schnitten intraepitheliale Lagerung vor. Da sich dieser Befund nirgends an Schleimhautabschnitten oder lymphatischem Gewebe wiederholte, ist er sicher nicht Ausdruck intraepithelialer PZ-Proliferation oder gar von Durchwanderung.

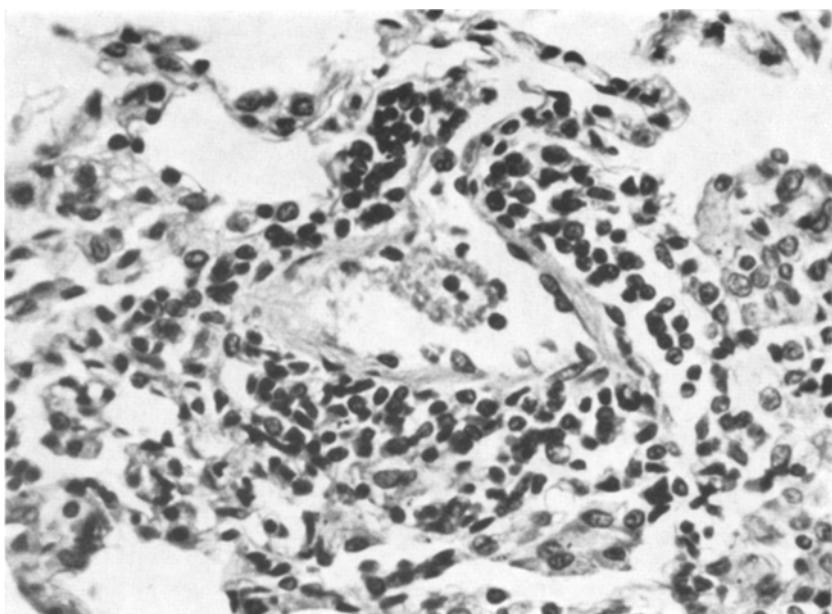


Abb. 4. Kleine Pulmonalarterie (T. 163). Perivasculäre lympho-histiocytäre Zellproliferation (H.-E. 440 ×)

Bei der mikroskopischen Untersuchung der *Lymphgefäß* fielen nun zuerst bei den Tieren der 4-Tage-Gruppe kleine, zunächst lymphocytäre Zellproliferationen im Bereich der periarteriellen und der peribronchialen Lymphgefäß auf. Vorwiegend kleine und mittlere Arterien waren vielfach von einem Zellmantel umscheidet, der aus Lymphocyten bestand und im periadventitiellen Bindegewebe lokalisiert war (Abb. 4). Bei den längere Zeit nach Inhalation überlebenden Tieren, also der 6-, 9- und 12-Tage-Gruppe, waren diese periarteriellen Zellproliferationen in zunehmendem Maße zu erkennen, jedoch bestanden sie jetzt mehr aus lympho-histiocytären Elementen. Wir konnten hier niemals PZ nachweisen. — Im Bereich der peribronchialen Lymphgefäß mittlerer und auch größerer Bronchien fanden sich vielfach, wenn auch nicht mit der Regelmäßigkeit wie periarteriell, entsprechende lympho-histiocytäre Zellproliferationen. Sie wurden erstmals bei den 4-Tage-Tieren, dann immer wieder bei den länger überlebenden Tieren nachgewiesen. Auch in diesen Herden konnten wir keine PZ finden.

*d) Gefäßsystem.* Regelmäßige, in Abhängigkeit von der Immunisierung auftretende Veränderungen an den bronchialen oder pulmonalen Gefäßen ließen sich nicht nachweisen. Als Einzelbefunde sahen wir bei einem Tier der 2-Tage-Reihe (T. 159) eine endangitische Zellproliferation in der Intima einer kleinen Arterie mit beginnender Thrombosierung, bei einem Tier der 6-Tage-Gruppe (T. 154) eine kleine Arteriole mit entzündlicher Infiltration aller Wandschichten. Die perivasculären Zellproliferationen sind unter dem lymphatischen System abgehandelt worden, da sie unseres Erachtens der Ursache nach an das perivasale Lymphgefäßsystem gebunden sind.

Die mikroskopische Untersuchung von *Milz*, *Leber* und *Knochenmark* erbrachte nur in der Milz verwertbare Befunde. Hier ließen sich bei allen Tiergruppen, auch den Kontrollen, immer einzelne PZ am Rand bzw. in der Wand der Sinus der roten Pulpa nachweisen. Bei den 6-Tage-Tieren traten diese mäßig, bei den 9-Tage-Tieren deutlich vermehrt auf. Sie fanden sich jetzt nicht nur in der Sinuswand, sondern vielfach auch im Lumen. Neben diesen PZ-Proliferationen konnten wir keine akut- oder chronisch-entzündlichen Pulpreaktionen erkennen. Die weiße Pulpa zeigte keine mit dem Immunisierungsvorgang in Zusammenhang zu bringende Veränderungen. — In der Leber fand sich bei allen Tieren eine ganz unauffällige Läppchenstruktur ohne jede erkennbare Reaktion des Mesenchyms im Sinne von Wucherung und Schwellung der Sinusendothelien bzw. der v. Kupfferschen Sternzellen. Die periportalen Felder ließen keine Veränderungen erkennen. — Auch das Knochenmark war sowohl in der Methylgrün-Pyronin, wie in der Giemsa-Färbung von unauffälligem Zellaufbau. Der normale PZ-Gehalt zeigte keine Veränderungen im Laufe der Immunisierung.

#### D. Diskussion

**Immunisierung durch Inhalation.** So wie Staub und Farbstoffpartikel gelangen auch corpusculäre Antigene, wie Bakterien, durch Inhalation in das Bronchopulmonalsystem. In unseren Untersuchungen wurde eine solche aerogene Infektion experimentell nachgeahmt. Es hat sich dabei gezeigt, daß die Inhalation von abgetöteten Paratyphus-B-Keimen zu einer spezifischen Antikörperbildung führt. Die Titer-Zeit-Kurve in Abb. 1 macht deutlich, daß das Serum etwa ab 3. Tag nach Inhalation Antikörper enthält und ab 6. Tag sein Maximum erreicht. Da in allen uns zugänglichen Arbeiten entweder mit anderen Applikationsarten experimentiert oder aber nach langer Immunisierung der Effekt einer Reinjektion untersucht wurde, kommt ein Vergleich dieser Werte nicht in Frage. — Inwieweit diese Antikörperbildung ausschließlich Folge der Aufnahme des Antigens in das Bronchopulmonalsystem ist oder der Aufnahme in andere Schleimhautgebiete zugeschrieben werden muß, läßt sich nur annähernd bestimmen. Die Teilchengröße unseres Aerosols garantiert, wie oben angeführt (s. Versuchsanordnung), sein Eindringen bis in die Alveolen. Gut 50% des Inhalates gelangen also sicher in die Lunge und leiten hier die immunologischen Vorgänge ein. 20—30% werden auf den Schleimhäuten von Nase, Pharynx, Larynx und Trachea niedergeschlagen und von dort oral eliminiert oder verschluckt. Es kann also nur eine relativ geringe Menge Bakterien auf diesen Schleimhäuten, einschließlich Magen-Darm-Mucosa, zur Resorption gelangen und so zur Antikörperbildung führen. Gegen-

über der in die Lunge beförderten Bakterienmenge ist dieser Anteil sicher gering. Danach ist der Antikörpertiter in unseren Versuchen wohl ganz wesentlich Folge der Antigenaufnahme im Bronchopulmonalsystem.

**Beteiligung des Bronchialsystems an der Verarbeitung des Antigens.** Die Aerosolpartikelchen des Inhalates gelangen nicht vollständig in das respiratorische Parenchym der Lunge, sondern werden zu einem beträchtlichen Teil auf dem Schleimbeflag der Bronchialmucosa niedergeschlagen.

Die moderne Aerosolforschung erst hat die physiologischen Leistungen der Bronchialschleimhaut im einzelnen untersucht. Entscheidend ist dabei ihre Resorptionsfähigkeit. SEHRWALD (1887) hat als erster die Aufnahme von Gentianaviolett über die Bronchialschleimhaut in das bronchiale Lymphknotensystem nachgewiesen. Nach den grundlegenden Arbeiten von HEUBNER (1920) und seiner Schule fand SCHISSLER (1953) in Experimenten mit Aerosolen, daß die echten und kolloidalen Lösungen durch die Mucosa resorbiert werden, die festen Partikel aber nicht in die Bronchialwand eindringen können. Die Resorption erfolgt durch die interepithelialen Saftspalten ohne Zellpassage. Nur bei einzelnen kolloidalen Lösungen beobachtete er Aufnahme in ortfremde Leukocyten und Durchwanderung des Epithels. Die Bronchialepithelien seien also nicht der Phagocytose fähig. Nach STIEVE (1953) können auch ölige Lösungen die Bronchialwand nicht durchdringen.

Das von uns verwandte Aerosol aus Paratyphus-B-Vaccine ist seiner physikalisch-chemischen Natur nach zwar eine wässrige Lösung, die in ihr aufgeschwemmten Bakterien nehmen aber eine Zwischenstellung zwischen festen Partikeln und kolloidalen Lösungen ein. Ihr Verhalten gegenüber der Bronchialschleimhaut ist daher nicht ohne weiteres aus den bisher bekannten Tatsachen (s. oben) abzuleiten. Nach DRINKER (1945) u.a. können die Bakterien im Schleim festgehalten und durch den Flimmertransport aus der Lunge eliminiert werden. Möglicherweise werden sie von Leukocyten, die im Bronchialschleim wandern, phagocytiert.

Dann findet also keine Resorption in die Bronchialschleimhaut statt. Oder aber Bakterien verhalten sich kolloidalen Lösungen entsprechend und können durch die interzellulären Saftspalten, in freier Form oder in Leukocyten gespeichert (s. SCHISSLER), das Epithel durchdringen. — Wie erklären sich unter diesen Gesichtspunkten unsere histologischen Befunde? Einen direkten Hinweis über das Verhalten und Schicksal der inhalierten Bakterien können wir nicht geben. Die histologischen Schnitte sind für eine bakterioskopische Diagnose nicht beweisend. Die deutliche Vermehrung der PZ in der Submucosa jener Tiere, die länger als 6 Tage nach Inhalation gelebt hatten, spricht aber doch für eine spezifische Antikörperbildung in dieser Schleimhautschicht. Die „Genetische Theorie“ der Antikörperbildung (EHRICH), der wir uns in unseren Untersuchungen als Arbeitshypothese angeschlossen haben, fordert die Einwirkung des Organisator-Antigens auf das Mesenchym am Ort der PZ-Proliferation. So stellt sich die Frage, wie das Organisator-Antigen in die Submucosa der Bronchialschleimhaut, und zwar in unmittelbare Nachbarschaft der Capillaren des inneren Lymphgefäßnetzes und kleiner Venen, gelangt sein könnte. Da diese Gefäße nach RUSZNYÁK, FÖLDI und SZÁBO ausschließlich Lymphe und Blut aus der Schleimhaut abführen, kommt aus funktionell-anatomischen Gründen nur die Schleimhaut bzw. das Bronchiallumen in Frage. Das Organisator-Antigen müßte also von der Mucosa her in die submucösen pericapillären Bindegewebsräume gelangt sein und dort spezifische PZ-Proliferation induziert haben. Wo aber sind dann die Bakterien

aufgespalten worden, damit das Organisator-Antigen entstehen konnte? In welchen Strukturen liegt die erste sog. Auffang- oder Filterstation? Damit sind wir auf die eingangs gestellte Frage nach dem Schicksal der Bakterien zurückgekommen. Vier Möglichkeiten sind zu erwägen:

1. Die Bakterien werden von der Schleimhaut aufgenommen und gelangen durch die interzellulären Saftspalten in die Submucosa, wo sie von Fibroblasten und Histiocyten, wie SCHLESSLÉ bei Trypanblau beobachtete, oder Leukocyten phagocytiert und aufgespalten werden. Wir konnten solche Zellwucherungen trotz besonderer Sorgfalt in keinem Stadium der Immunisierung nachweisen.

2. Die Bakterien werden von den Bronchialepithelzellen phagocytiert und dort aufgespalten. Das widerspricht den bisherigen experimentellen Erfahrungen. Es konnte bislang keine Phagocytose in Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden.

3. Die Bakterien werden nicht in die Bronchialwand, sondern von Leukocyten aufgenommen, die in den Bronchialschleim auswandern. Hier werden sie in aktive Antigenbestandteile zerlegt und in löslichem Zustand in die Bronchialwand aufgenommen. Wir konnten im Schleim weder phagocytierende noch in der Bronchialwand auswandernde Leukocyten finden.

4. Die Organisator-Antigene entstammen Bakterien, die in den Alveolen von AEZ gespeichert und durch den Flimmerstrom in das Bronchialsystem transportiert wurden (POLICARD). Erst hier werden die antigen wirksamen Spaltprodukte der Bakterien frei und gelöst in die Bronchialwand resorbiert.

Keine der vier Möglichkeiten läßt sich mit den vorliegenden Versuchsergebnissen exakt beweisen. Der erste Weg scheint zunächst der wahrscheinlichste zu sein. Es wäre denkbar, daß uns die Zellinfiltrate der Mucosa bei der zeitlichen Aufteilung der Tiergruppen entgangen sind und vielleicht am ersten und dritten Tag nachzuweisen waren. Der vierte Weg rückt durch die unten dargelegte Vorstellung POLICARDS (1952) in den Bereich der Möglichkeiten. Die Antigen-Nachweismethode mit fluoreszierenden Antikörpern nach COONS oder die Verwendung radioaktiv markierter Antigene könnte hier weitere Klärung bringen. — Ein gewisser Teil des in die Submucosa gelangten Organisator-Antigens wird sicher auch in die venösen Capillaren aufgenommen und kann dann in der Milz eine PZ-Proliferation hervorrufen.

Die Tatsache, daß auch bei allen anderen Tiergruppen, einschließlich der nichtimmunisierten Tiere, PZ in geringer Zahl in den submukösen Schichten der Bronchialwände nachgewiesen wurden, läßt sich dadurch erklären, daß hier normalerweise gegen verschiedenartige Erreger, die per inspirationem eingedrungen sind, Antikörper gebildet werden. Jedoch bleibt auch hier der genauere Ablauf des Immunisierungsvorganges dunkel. Schließlich ist zu fragen, ob eine Antikörperförmung im submukösen Bindegewebe überhaupt denkbar ist. Im allgemeinen und auf Grund der zahlreichen experimentellen Untersuchungen mit subcutaner und intravenöser Applikation des Antigens findet Antikörperförmung in Geweben mit lymphoreticulärer Grundstruktur statt. PZ-Proliferation und Antikörperförmung sind aber nicht immer streng an das lymphoreticuläre Gewebe gebunden (OAKLEY, BATTY und WARRACK, BATTY und WARRACK u.a.).

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß nach Inhalation eines Aerosols aus Paratyphus-B-Vaccine in der Submucosa der Bronchialwand eine PZ-Proliferation als Ausdruck lokaler Antikörperförmung stattfindet. Das Organisator-Antigen wird diesen Bindegewebsschichten mit Wahrscheinlichkeit von der Schleimhaut her zugeführt. In welchen Zellen dieses durch Aufspaltung der

Bakterien entsteht und in welchem Zustand es die Bronchialwand passiert, wird diskutiert, kann aber nicht entschieden werden.

**Beteiligung des respiratorischen Parenchyms an der Verarbeitung der Antigene.** Die Aerosolteilchen in unseren Untersuchungen können auf Grund der Teilchengröße von durchschnittlich  $2\text{ }\mu$  bis in die Alveolen vordringen. Direkte Hinweise über das Schicksal der Bakterien in den Alveolen geben unsere Experimente wiederum nicht. Die deutliche Vermehrung der vergrößerten und von der Wand abgelösten AEZ der Tiere, die länger als 6 Tage nach Inhalation gelebt hatten, weisen auf einen Zusammenhang mit der Immunisierung hin. Wir deuten dies als Ausdruck der Speicherung von Aerosolteilchen im Zelleib der AEZ, wenngleich man zunächst schwer versteht, daß eine solche AEZ-Vermehrung im Alveolarlumen erst später als 6 Tage nach der Inhalation auftritt. — Dazu ist einmal festzustellen, daß die AEZ ihre phagocytären Funktionen ausüben, während sie noch im Zellverband der Alveolarwand liegen und nicht vergrößert sind (SEEMANN, v. HAYEK, GUIEYSSE-PELLISSIER). Sie lösen sich erst ab, wenn ihr Speichervermögen weitgehend erschöpft ist. Auch läßt sich gut vorstellen, daß die auffallende Vergrößerung und Abkugelung der Zellen vor ihrer Ablösung von der Wand mit den intracellulären Stoffwechselvorgängen in Zusammenhang steht, durch welche die aufgenommenen Bakterien „verdaut“ werden. Beides sind Vorgänge, die Zeit beanspruchen, und so kann man sich eine gewisse Verzögerung der Wandlösung um einige Tage wohl erklären. Jedoch bleibt der hier gefundene lange Zeitraum von mehr als 6 Tagen nicht genügend begründet. — Die Tatsache der Aufnahme der Bakterien in die AEZ muß man als weitgehend sicher betrachten. Diese bilden somit die erste Schleuse für die in die Alveolen eingetauschten Bakterien und sind für ihre intracelluläre Aufspaltung verantwortlich. Für die Möglichkeit, daß die Bakterien die AEZ umgehen und direkt in die Alveolarwand eindringen, finden wir keinen Anhalt. Man muß diesen Weg jedoch angesichts der bekannten Pathogenese der verschiedenen Pneumokoniosen und der experimentellen Ergebnisse von LÜCHTRATH mit  $\text{FeCl}_3$  und von SCHISSLÉ mit Tusche für gangbar halten. So eingedrungene Partikelchen werden dann in intrapulmonalen Lymphknoten abgefangen.

Was geschieht nun mit den das Antigen speichernden AEZ ? Oder: Wo geben diese das Organisator-Antigen ab ? Zwei Möglichkeiten stehen zur Diskussion:

1. Die löslichen, nun aktiven Antigenbestandteile werden in der Alveole freigesetzt. Sie verhalten sich hier wie wässrige oder kolloidale Lösungen und werden entweder direkt in die Alveolarkapillaren aufgenommen und induzieren vorwiegend in der Milz spezifische PZ-Proliferation. Oder sie gelangen in das Interstitium der Alveolarsepten und können hier theoretisch PZ-Bildung verursachen. Das geschieht aber sicher nicht, wie unsere Versuchsergebnisse gezeigt haben. Schließlich können sie über die „hypothetischen Lymphcapillaren“ dem lymphatischen System zugeführt werden. Die beträchtliche PZ-Proliferation in den Milzsinus der Tiere, die länger als 4 Tage, besonders aber jener, die länger als 6 Tage nach Inhalation gelebt hatten, spricht für ein direktes Eindringen des Organisator-Antigens in die Alveolarkapillaren.

2. Die AEZ gelangen im Rahmen der Selbstreinigungsfunktion der Lunge in das Bronchialsystem (POLICARD u. a), werden von dort durch den Flimmerstrom eliminiert oder geben jetzt das Organisator-Antigen in das Bronchiallumen ab. Von hier kann dies als Lösung unschwer durch das Epithel in das submuköse Bindegewebe gelangen und dort spezifische PZ-Proliferation induzieren. Diesen Weg, der mit POLICARDS Vorstellung über die Resorption in das Lymphsystem grundsätzlich übereinstimmt, halten wir für durchaus gegeben.

Zusammenfassend nehmen wir an, daß in die Alveolen eingedrungene Bakterien ganz vorwiegend in die AEZ aufgenommen und dort in ihre antigen wirksamen Bestandteile zerlegt werden. Treten diese schon in der Alveole aus der Zelle aus, so werden sie zum Teil direkt in die Alveolarcapillaren aufgenommen und rufen in der Milz spezifische PZ-Bildung hervor, zum Teil werden sie in das Lymphsystem abtransportiert. Gelangen die AEZ jedoch in das Bronchialsystem, so werden sie entweder eliminiert, oder das Organisator-Antigen wird erst hier freigesetzt, passiert das Epithel und ruft in der Submucosa eine PZ-Proliferation hervor.

**Beteiligung des lymphatischen Systems.** Die Möglichkeiten der Aufnahme von Bakterien oder Organisator-Antigen in das Lymphsystem und dessen funktionelle Anatomie wurden an mehreren Stellen besprochen. Wider Erwarten ließen sich im Bereich der intrapulmonalen Lymphfollikel und in Abhängigkeit von der Immunisierung keine vermehrten PZ nachweisen. Die bei allen Tiergruppen, einschließlich Kontrollen, vereinzelt vorhandenen PZ-Nester in der Peripherie der kleinen Follikel deuten darauf hin, daß hier normalerweise immunbiologische Vorgänge ablaufen. Es ist eigentlich, daß im Gegensatz zu den Verhältnissen bei subcutaner Antigen-Applikation das lymphatische Gewebe bei unseren Untersuchungen so wenig an der Reaktion beteiligt scheint. — Die lympho-histiozytären Zellproliferationen im Bereich der peribronchialen und periarteriellen Lymphgefäß sind mit den bislang bekannten morphologischen Veränderungen bei Antikörperbildung nicht zu vereinbaren. Bei hoher und intravenöser Immunisierung von Tieren (EHRICH, KLINGE, EHRICH, SEIFTER und FORMAN, GRAM und BÖHMIG) wurden neben anderen Gefäßveränderungen in der Umgebung der periarteriellen Lymphgefäß lokale große lympho-histiocytäre Zellproliferationen nachgewiesen. Diese perivasalen Zellvermehrungen, zusammen mit den dort beträchtlichen Wandveränderungen im Sinne von Endangitis und Panarteriitis gelten als morphologischer Ausdruck der Antigen-Antikörper-Reaktion. Es liegt nahe, auch unsere Befunde in diesem Sinne zu deuten, da die Zellproliferationen erst dann auftreten, wenn im Serum Antikörper nachweisbar sind. Einen Beweis für diese Annahme können auch hier die Fluoreszenzmethode von COONS und biochemische Gewebsanalysen erbringen.

### Zusammenfassung

Kaninchen wurde eine Paratyphus-B-Vaccine als Aerosol appliziert. Diese Antigen-Inhalationen hatten eine spezifische Antikörperbildung zur Folge, die etwa am 3. Tag begann und am 6. Tag nach der Inhalation ihr Maximum erreichte. Nach dem 6. Tag fand sich eine deutliche Plasmazell-Vermehrung in der Submucosa der Bronchialschleimhaut sowie in der Milz, die als Ausdruck spezifischer Antikörperbildung angesehen wird. Im respiratorischen Parenchym werden offenbar keine Antikörper gebildet, auch sind die intrapulmonalen Lymphfollikel auffallend wenig beteiligt. In Anlehnung an EHRICHs „Genetische Theorie“ der Antikörperbildung werden die Möglichkeiten der Aufnahme und Aufspaltung der inhalierten Antigene in Bronchialsystem und respiratorischem Parenchym diskutiert.

### Summary

Aerosol inhalations in rabbits of attenuated paratyphoid B organisms led to a formation of specific antibody, which was first detectable on the 3rd day and maximal on the 6th day after inhalation. A definite increase of plasma cells could be seen in the bronchial submucosa and in the spleen after the 6th day. The increase was interpreted as indicating the formation of a specific antibody. Apparently no antibody was formed in the pulmonary parenchyma; the intra-pulmonary lymphatic tissues participated remarkably little in the reaction. In support of EHRICH's „Genetic theory“ of antibody formation, the various possibilities concerning the uptake and ultimate fate of the inhaled antigens in the bronchial system and pulmonary parenchyma are discussed.

### Literatur

- BARGMANN, W.: Die Lungenalveole. In MÖLLENDORFFS Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. V, 3. 1936. — BATTY, I., and G. H. WARRACK: Local antibody production in mamma, spleen, uterus, vagina and appendix. J. Path. Bact. **70**, 331 (1955). — COONS, A.: Histochemical investigations with labelled antibodies. Int. Rev. Cytol. **5**, 1 (1956). — COONS, A., and M. KAPLAN: Localisation of antigen in tissue cell; improvement in methods for detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med. **91**, 1 (1950). — DRINKER, C. K.: Pulmonary edema and inflammation. Cambridge, Mass.: Harvard University Press 1945. — EHRICH, W. E.: Die Entzündung. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. VII, Teil 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — EHRICH, W. E., J. SEIFTER and C. FORMAN: Experimental serum disease. J. exp. Med. **89**, 23 (1949). — FINDEISEN, B.: Über das Absetzen kleiner, in der Luft suspendierter Teilchen in der menschlichen Lunge bei der Atmung. Pflügers Arch. ges. Physiol. **236**, 367 (1935). — GRAM, H., u. R. BÖHMIG: Experimentelle Untersuchungen mit Fraktionen der Leibessubstanzen der A-Streptokokken. Z. Immun.-Forsch. **158**, (1959). — GUTEYSSE-PELISSIER, G. C.: Acad. Sci. Paris **170**, 1411 (1920). — HAYEK, H. v.: Die menschliche Lunge. Berlin: Springer 1953. — HEUBNER, W.: Über die Inhalation zerstäubter Flüssigkeiten. Z. ges. exp. Med. **10**, 229 (1920). — KLINGE, F.: Der Rheumatismus, pathologisch-anatomische und experimentell-pathologische Tatsachen und ihre Auswertung für das ärztliche Rheumaproblem. Ergeb. allg. Path. path. Anat. **27**, 1 (1933). — LOO, J. VAN DE: Tierexperimentelle Untersuchungen über Aufnahme und Verteilung radioaktiven Phosphors in der Lunge und im übrigen Organismus nach Aerosol-Inhalation. Inaug.-Diss. Freiburg i. Br. 1955. — LÜCHTRATH, H.: Ein Beweis für das Eindringen von Aerosolen in die Lunge. Z. Aerosol.-Forsch. **2**, 279 (1953). — OAKLEY, C. L., I. BATTY and G. H. WARRACK: Local production of antibodies. J. Path. Bact. **63**, 33 (1951). — PETERSEN, H.: Histologie und mikroskopische Anatomie, 2. Aufl. Bd. II. München 1935. — POLICARD, A.: Mechanism of dispersion of coal particles in lungs of miners. Brit. J. industr. Med. **9**, 108 (1952). — RUSZNYÁK, J., M. FÖLDI u. G. SZÁBO: Physiologie und Pathologie des Lymphkreislaufs. Jena: Gustav Fischer 1957. — SCHIESSLE, W.: Über die Vorgänge bei der Inhalation von Aerosolen in der normalen Lunge. Z. Aerosol-Forsch. **2**, 364 (1953). — SEEMANN, G.: Histologie der Lungenalveole. Jena: Gustav Fischer 1931. — SEHRWALD, E.: Über die percutane Injektion von Flüssigkeiten in die Trachea, deren Verbreiterung in der Lunge und Wirkung auf Lunge und Gesamtorganismus. Dtsch. Arch. klin. Med. **39**, 162 (1887). — STIEVE, F. E.: Über die Gewebewirkung öiger Substanzen bei Tiefeninhalation. Z. Aerosol-Forsch. **2**, 378 (1953). — STIEVE, F. E., K. DIRNAGL u. R. NEUBIG: Theoretische Überlegungen und neue experimentelle Methoden zur Verfolgung von Mechanismus, Bilanz und zeitlichem Verlauf der Resorption inhalierter Substanzen in Lunge und Tracheobronchialbaum. Z. Aerosol-Forsch. **2**, 378 (1953).