

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

**Ein tierexperimenteller Beitrag
zur Immunopathologie der Speicheldrüsen***

Von

O. HAVERKAMP

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Dezember 1961)

Die tierexperimentellen Untersuchungen über eine Immunosaladenitis wurden aus der Überlegung heraus begonnen, daß es WITEBSKY u. Mitarb. gelungen war, im Tierexperiment eine Immunothyreoiditis zu erzeugen, die sie in Parallele zu der Hashimoto-Struma und den ätiologisch bisher ungeklärten nichteittrigen Entzündungen der Schilddrüse beim Menschen setzten.

Sie behandelten Versuchstiere — meist Kaninchen — längere Zeit mit kleinsten Gaben von wäßrigen Schilddrüsenextrakten — zusammen mit Freundschem Adjuvans — und wiesen zur Zeit der Entstehung einer nichteittrigen Entzündung in der Schilddrüse Antikörper gegen Schilddrüsengewebe bzw. dessen Extrakt serologisch — zumeist mittels der passiven Hämagglutination nach BOYDEN und Präcipitationstesten — im Blute und immunohistologisch in der erkrankten Schilddrüse der betreffenden Tiere nach, wobei sie im Thyreoglobulin — der Speicherform der Schilddrüsenhormone (WEISSBECKER) — den Träger der Antigenität der Thyreoidea und des Schilddrüsenextraktes sahen. Diese Antikörper machten sie für die Entstehung der nichteittrigen Entzündung der Thyreoidea, der „Immunothyreoiditis“ verantwortlich, sprachen ihnen also einen cytotoxischen Effekt zu. TROTTER, BELYAVIN und WADDAMS beschrieben dann weiter noch komplementbindende Antikörper, deren zugehöriges Antigen nach DONIACH und ROITT in der Mikrosomenfraktion der Schilddrüsenzellen gelegen sein soll; HEILMEYER und MÜLLER nehmen für dieses intracelluläre Antigen an, daß es sich dabei um die intracelluläre Vorstufe des Thyreoglobulins handelt.

Es lag nahe, analoge tierexperimentelle Versuche für die Speicheldrüsen anzu stellen (HAVERKAMP, McCABE); zeigen doch — ähnlich der Schilddrüse — diese Organe beim Menschen auch häufig eine beiderseitige nichteittrige Entzündung, ohne daß es immer möglich ist, eine Ursache hierfür zu finden. Darüber hinaus haben japanische Forscher (ITO, OGATA, TAKIZAWA u. a.) kürzlich auch in den Speicheldrüsen einen hormonartigen Wirkstoff beschrieben, das Parotin, von dem es nach KRACHT allerdings noch nicht sicher ist, ob es mit dem hypothetischen Speicheldrüsenhormon identisch ist. So könnte also analog dem Thyreoglobulin bei der Schilddrüse für die Speicheldrüsen dieses Parotin oder dessen Vorstufe als mögliches Antigen zur Verfügung stehen.

Tatsächlich konnte in einer ersten, hier (s. unten) nur kurz aufgeführten Versuchsreihe bei Ratten nach Behandlung mit wäßrigem Rattenspeicheldrüsenextrakt zusammen mit Freundschem Adjuvans eine Schädigung ihrer Speicheldrüsen mit begleitender, nichteitriger Sialadenitis hervorgerufen werden (siehe Abb. 1); außerdem waren Antikörper gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt bei

* Herrn Prof. Dr. P. GRABAR, Paris, danke ich ergebenst für seine Hilfe und für seine wertvollen Ratschläge, die er mir zur Abfassung vorliegender Arbeit zuteil werden ließ.

diesen Tieren im Serum nachzuweisen. Folgt man nun den Überlegungen von WITEBSKY u. Mitarb. bei der Deutung ihrer tierexperimentellen Immunothyreoiditis, so müßte man die Entstehung dieser nichteitrigen Sialadenitis ursächlich auf die Anwesenheit der erwähnten, somit cytotoxischen Antikörper gegen Speichel-drüsenextrakt beziehen. Es galt also, die Bedeutung und etwaige cytotoxische Wirkung dieser Antikörper für die Entstehung der krankhaften Veränderungen

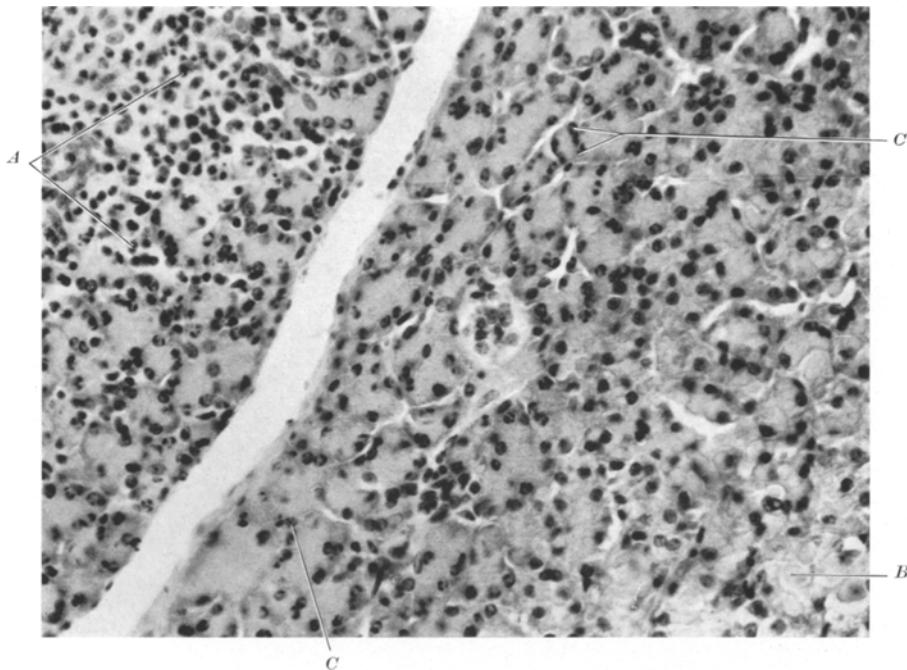


Abb. 1. Immunoparotitis der Ratte (4-Monate nach Versuchsbeginn) nach intramuskulären Gaben von insgesamt 0,45 ml eines etwa 100 mg-%igen wäbrigen Rattenspeichel-drüsenextraktes mit der gleichen Menge Freundschen Adjuvans: Bei A rundzellig-entzündliche Infiltration (Lymphocyten, Plasmazellen); bei B nekrotische Endstücke; auffallend viele Kerne mit Kariorrhexis (z. B. bei C). Hämatoxylin-Eosinfärbung. Vergr. 205 ×

an den Speichel-drüsen der Ratte nachzuweisen. Dabei versprachen die Untersuchungen einen Einblick in das Problem der cytotoxischen Antikörper überhaupt.

Solche Immunkörper, deren Antigen Blut- oder Organzellen sind, reagieren mit ihnen spezifisch im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion; sie können als heterologe Antikörper bei einer artfremden, als homologe bei der gleichen Species durch parenterale Antigen (= Blutzellen oder Organextrakt)-Einverleibung gewonnen sein. Der bekannteste cytotoxische Antikörper ist das Hämolsin (BORDET), das — in Gegenwart von Komplement — rote Blutkörperchen auflöst, also zerstört. Viel unklarer ist jedoch ein echter cytotoxischer Effekt von Antikörpern, wenn nicht Blutzellen, sondern Organzellen oder deren Eiweiß das zugehörige Antigen darstellen, wie es etwa bei der Immunothyreoiditis der Fall ist. Konnten doch DONLACH und ROTT bei Affen durch intravenöse Injektion eines menschlichen Serums mit Antikörpern gegen menschliches Schilddrüseneiweiß (sog. Hashimoto-Serum) keine krankhaften Veränderungen in den Schilddrüsen dieser Tiere nachweisen, obwohl serologisch ein positiver Reaktionsausfall dieses Menschenserums mit Affenschilddrüseneiweiß bestand. Ja selbst bei der Wiederholung der Witebskyschen Versuche konnten SHEPHERD, LIPINSKI und

TAYLOR zwar auch homologe Antikörper gegen Schilddrüsenextrakte bei Kaninchen erzeugen und nachweisen, aber keine wesentlichen krankhaften Veränderungen in den Schilddrüsen dieser Tiere hervorrufen.

Um nun schnell und reichlich hochwertige Antikörper gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt zu erhalten, wurden diese heterolog bei Kaninchen erzeugt und gesunden Ratten intravenös injiziert. Die Versuche gliedern sich in folgende vier Gruppen: I. Gewinnung von Kaninchen-Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen wäßrigen Rattenspeicheldrüsenextrakt, II. Behandlung gesunder Ratten mittels intravenöser Injektion von Kaninchen-Immuno-(β_2 - und γ)-Globulinen mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt und mit immunohistologischem Antikörpernachweis im Gewebe, III. Behandlung gesunder Ratten mittels intravenöser Injektion von Kaninchen-(β_2 - und γ)-Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt und nachfolgender Einverleibung von Rattenspeicheldrüsenextrakt (= Ag), Hühnereiklar oder Fremdserum und IV. Kontrollversuche unter Verwendung von Kaninchen- β_2 - und γ -Globulinen ohne Antikörper gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt.

A. Methodik

Als *Versuchstiere* dienten — als Antikörperspender — männliche Hauskaninchen (zumeist eigener Zucht) im Alter von $1/2$ Jahr und von 2—2,5 kg Gewicht sowie — zur Speicheldrüsenextraktgewinnung und als Antikörperempfänger — $1/2$ Jahr alte Ratten beiderlei Geschlechts. Die Tiere wurden gleichmäßig mit BroVo-Spezialtrockenfutter gefüttert.

I. Gewinnung von Kaninchen-Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen wäßrigen Rattenspeicheldrüsenextrakt

1. Herstellung des wäßrigen Rattenspeicheldrüsenextraktes (Antigen = Ag)

Vorbemerkung. Bei der Extraktherstellung wurde neben der Glandula parotis, submandibularis und sublingualis stets auch die Glandula orbitalis externa mit berücksichtigt, deren sekretorische Funktion bei der Ratte bis heute keineswegs geklärt ist; während sie beim Hund und beim Kaninchen zum Speicheldrüsenkomplex gehört (E. S. G. SCHMIDT), zieht ihr Ausführungsgang bei der Ratte nicht zur Mundhöhle, sondern zum äußeren Augenwinkel, um hier auf der Bindehaut zu enden (E. S. G. SCHMIDT). Allerdings treten nach Exstirpation beider Glandulae orbitales externae keine sichtbaren Veränderungen am Rattenauge auf, die als Ausdruck des Fehlens einer stärkeren exkretorischen Tätigkeit dieses Organes zu werten wären. Darüber hinaus bietet das feingewebliche Bild der Glandula orbitalis externa auch bei der Ratte so große Anklänge an das der Glandula parotis, daß beide Organe histologisch von einem Uneingeweihten leicht verwechselt werden können und auch oft verwechselt werden (KOLOSSOW, MEYER, MECKEL, OWEN). Es läßt sich also so zumindest vermuten, daß bei Ratten die Glandula orbitalis externa, die im übrigen durch ein stark ausgebildetes Ergastoplasm, durch Mitochondrienreichtum und Kernaktivitäten ausgezeichnet ist, zwar nicht eine gleiche exkretorische, jedoch eine gleiche oder ähnliche inkretorische Funktion wie die Glandula parotis ausübt, etwa in Form der Bildung und Produktion von Parotin, also alles Gründe, die eine Hinzuziehung der Glandula orbitalis externa bei der Extraktherstellung zunächst ratsam erscheinen ließen.

Aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung wird im folgenden jedoch zumeist nur die Rede von Speicheldrüsenextrakten sein, womit dann stets das Gemeinschaftsextrakt aus Glandula parotis, submandibularis, sublingualis und orbitalis externa gemeint ist.

Technische Ausführung. Die erwähnten Drüsen müssen weitgehend blutfrei sein, da sich sonst später bei den Kaninchen nicht nur Antikörper gegen spezifisches Drüseneiweiß, sondern auch gegen Rattenblutzellen bilden würden. 100 Ratten beiderlei Geschlechts wurden also durch 0,35 cm³ Nembutal-Lösung (vet.) i.p. narkotisiert, entblutet bzw. mit physiologischer Koch-

salzlösung (pH 7,2 mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer) bis zur weitgehenden Blutfreiheit der Halsorgane — aus einem 10 Liter-Gefäß in $1\frac{1}{2}$ m Höhe — durchspült; folgende Methode hat sich dabei — unter anderem auch durch die Schnelligkeit ihrer Ausführungsmöglichkeit — besonders bewährt: Aus der Bauchaorta wurden mittels einer Rekordspritze (Kaniüle Nr. 1) 8—12 cm³ Blut abgesaugt, wonach öfters schon ein Herzstillstand eintrat. Dann wurde von der Herzspitze aus durch die linke Kammer in die Brustaorta eine Glaskaniüle eingelegt, die mittels Schlauch an das hochstehende 10 Liter-Gefäß mit gepufferter Kochsalzlösung angelassen war. Nach Beginn der Kochsalzdurchspülung gewährte ein Schnitt in die Hohlevene den Abfluß von Blut und Kochsalzlösung. Es wurde so lange durchspült, bis aus der erwähnten Vene nur noch klare Kochsalzlösung herausfloß und die Halsorgane blutfrei schienen. Anschließend wurden bei diesen Tieren auf beiden Seiten die Glandula parotis, Glandula orbitalis externa, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis herauspräpariert, soweit wie möglich vom anhaftenden Bindegewebe befreit, mit einer Schere zerstückelt, unter sterilen Bedingungen zermörsert und — soweit makroskopisch möglich — von etwa noch verbliebenen Resten des Bindegewebes und der Gefäße befreit. Der so gewonnene Speicheldrüsenbrei wurde mit einem Gesamtgewicht von 55,9 g dann mit dem gleichen Gewichtsvolumen physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) — unter Zusatz eines Tropfens 0,25%iger Phenollösung auf etwa 50 cm³ Kochsalzlösung — 24 Std im Eisschrank bei +4°C extrahiert. Danach wurde zentrifugiert (1000 U/min) und anschließend das Supernat durch ein steriles Mülläppchen durchgesieht, um das auf der Oberfläche schwimmende Fett abzufangen. Der Eiweißgehalt des makroskopisch fettfreien Supernats betrug 95,8—103 mg-% nach KJEHLDAL. Nach Aufteilung in kleinere Portionen blieb die — durch das Abschütten vom Sediment (Gewebsbrei) befreite — Extraktflüssigkeit bis zur Verwendung bei —37°C in der Tiefkühltruhe.

2. Antikörper(Ak.)-Bildung (Sensibilisierung) bei Kaninchen gegen den wässrigen Rattenspeicheldrüsenextrakt

Zur Steigerung der Ak.-Bildung wurden sämtliche Ag.-Injektionen zusammen mit Freundschem Adjuvans (FA) [= 8,5 ml Bayol F (Esso) + 1,5 ml Arlacel A (Atlas) + 30 mg Mycobacterium smegmatis mit anschließender Autoklavierung (1,1 atü, 30 min, 110°C)] im Verhältnis 1 Teil Extrakt zu 1 Teil Adjuvans vorgenommen. Sechs Kaninchen standen im Versuch. Es erhielten im einzelnen je zwei Tiere subcutan über 2 Monate 3mal — in vierwöchigem Abstand — 0,05 ml, 0,1 ml bzw. 0,2 ml Extrakt, gemischt mit der gleichen Menge FA, in die vier Pfoten verteilt injiziert und 4 Wochen nach der letzten subcutanen Injektion alle sechs Kaninchen 0,5 ml Ag. ohne FA intraperitoneal.

Die Gesamtmenge verabreichten Extraktes betrug demnach bei den drei Kaninchenpaaren jeweils 0,6 ml, 0,8 bzw. 1,1 ml einer etwa 100 mg-%igen Eiweißkonzentration, die entsprechende Gesamtmenge also etwa 0,6 mg, 0,8 bzw. 1,1 mg Speicheldrüsenextrakt.

3. Serologischer Antikörpernachweis

Vier Wochen nach der letzten Injektion, d. h. also 4 Monate nach Beginn der Injektionen, wurden die Tiere entblutet, das Blut unter sterilen Bedingungen abgesert und von den Seren eine Komplementbindungsreaktion (a), die passive Hämaggglutination nach BOYDEN (b) und der Agar-Präcipitationstest nach OUCHTERLONY (c) zur Bestimmung von Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt durchgeführt.

a) Die *Komplementbindungsreaktion* wurde mit dem Gedanken vorgenommen, daß eventuell in den betreffenden Kaninchenserien vorhandene spezifische Ak. mit Speicheldrüsenextrakt (Ag.) im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion reagieren müßten, die dann zugeführtes Komplement verbraucht, so daß dieses dem anschließend zugegebenen hämolytischen System [Hammelblutkörperchen und Amboceptor (= in Gegenwart von Komplement Hammelblutkörperchen-lösender Ak.]) nicht mehr zur Verfügung steht. Tritt also bei der nachträglichen Zugabe des hämolytischen Systems keine Hämolysen auf, so ist die Reaktion positiv.

Um Serum bei der Reaktion einzusparen, wurde die Mikromethode verwendet, wie sie HENNESSEN 1955 für die Influenza-Diagnostik beschrieben hat: Bei einer konstanten 20%igen

Verdünnung der inaktivierten Kaninchenserum wurde die Komplementbindungsreaktion mit in geometrischer Reihe fallenden Komplementverdünnungen, also steigenden Komplementmengen durchgeführt, wobei die höchste Komplementmenge festgelegt werden kann, die bei der Antigen-Antikörper-Reaktion noch verbraucht wird.

Ausführung. 1. Zum Auswaschen und für Verdünnungen wurde stets Veronal-Puffer verwandt; 2. das *Ag* (= Speicheldrüsensextrakt) wurde inaktiviert und in einer Verdünnung 1:40 verwendet, wobei es später bei der Reaktion keinen Eigenkomplementverbrauch mehr zeigte; 3. die zu testenden Kaninchenserum wurden ebenfalls für 30 min im Wasserbad bei 56°C inaktiviert und 1:5 verdünnt; 4. als *Komplement* diente konserviertes Meerschweinchenkomplement der Behringwerke, Marburg a. d. Lahn, von dem entsprechend Tabelle 1 eine Verdünnungsreihe angelegt wurde; 5. der hämolytische Amboceptor (Titer 1:4000 für WAR) stammte ebenfalls von den Behringwerken; er wurde vor Gebrauch 1:1000 verdünnt; 6. Hammelblutkörperchen wurden stets frisch von gesunden männlichen oder weiblichen, nicht trächtigen Schafen gewonnen; es wurde aus der Vena jugularis entnommenes Blut in einer Flasche mit geschliffenem Glasstopfen und Glasperlen geschüttelt (defibriniert), dann 10 min bei 3000 U/min die Erythrocyten abzentrifugiert und schließlich dieses Blutkörperchensediment 3mal in Veronal-Puffer gewaschen und jeweils aus der Pufferlösung wieder abzentrifugiert (3000 U/min).

Von dem letzten Erythrocytensediment wurde dann eine 1%ige Lösung hergestellt. Um nun beim hämolytischen System stets eine konstante Erythrocytenzahl zur Verfügung zu haben, wurde in einer Erythrocytenpipette bis zur 0,5-Marke 1%ige Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung aufgezogen und die Pipette dann bis zur 101-Marke mit Puffer aufgefüllt und gut geschüttelt. Ein Tropfen dieser Verdünnung wurde in einer Thoma-Zähldammer auf die Erythrocytenzahl ausgezählt. Befanden sich mehr als 300000 Erythrocyten in einer Kammer, so wurde die 1%ige Erythrocytenlösung entsprechend verdünnt.

Tabelle. *Komplementverdünnungsreihe für Mikro-Komplementbindungsreaktion nach HENNESSEN (gekürzt). Faktor 1,4*

Stufe Nr.	Kom- plement- gehalt in %	Verdünnung	
		Komplement + Puffer	
10	28,9	0,3 + 0,74	
9	20,6	0,2 + 1,15	
8	14,8	0,2 + 1,16	
7	10,5	0,2 + 1,70	
6	7,5	0,1 + 1,23	
5	5,4	0,1 + 1,76	
4	3,8	0,1 + 2,50	
3	2,7	0,1 + 3,54	
2	2,0	0,1 + 5,00	
1	1,4	0,1 + 7,04	

Komplementbindungsreaktion mit von unten nach oben steigenden Komplementmengen. Es wird in aufsteigender Reihenfolge in die Dellen 1—8 je 1 Tropfen von Komplement der entsprechenden Verdünnungsstufen 1—8 der Tabelle, je 1 Tropfen eines 1:5 verdünnten Testserums sowie 1 Tropfen des *Ag*. eingefüllt; die Kunststoffplatte wird dann gut geschüttelt und 12 Std im Eisschrank (+4°C) in einer feuchten Kammer belassen; danach gibt man zwei Tropfen des hämolytischen Systems (50 ml in der Zähldammer kontrollierter Erythrocytenlösung und 50 ml 1:1000 verdünnter Amboceptorlösung im Verhältnis 1:1) in jede Delle und läßt die Platte für 2 Std in der feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C. Danach wird abgelesen und die Komplementstufe aufsteigend bestimmt, bei der gerade eine partielle Hämolys — als Ausdruck eines Komplementüberschusses — vorliegt.

Da sowohl das *Ag*. (= Speicheldrüsensextrakt) als auch die zu testenden Seren etwa einen Eigenkomplementverbrauch zeigen können, der unabhängig von einer Antigen-Antikörper-Reaktion ist, muß dieser in Kontrollen bestimmt werden, d. h. ein Reaktionsablauf mit 1 Tropfen Puffer an Stelle von 1 Tropfen Testserum (sog. *Ag*-Kontrolle) und ein solcher mit Puffer anstatt *Ag*. (sog. Testserumkontrolle) vorgenommen werden. Um etwaige Normalantikörper im Kaninchenserum gegen Rattenspeicheldrüsensextrakt auszuschalten, wurde als sog. Normalserumkontrolle ein Ersatz der Testseren durch Seren nicht gegen Speicheldrüsensextrakt (*Ag*.) immunisierter Kaninchen vorgenommen. Da das *Ag*. jedesmal gleich bleibt,

habe ich die Kontrollen in der Tabelle 1 nicht aufgeführt.

Die eigentliche Durchführung der Reaktion nimmt man in Kunststoffplatten mit jeweils acht senkrecht in mehreren Reihen angeordneten Dellen (Prestware LTD, Southdown Works in Raynes Park, England, Abbildung bei HENNESSEN S. 559) vor, wobei die Dellen mittels Tropfpiptetten aufgefüllt werden. Jede senkrechte Reihe von acht Dellen entspricht einer

genügte — wie bei der Normalserumkontrolle — eine Ag.-Kontrolle; dagegen mußte für die verschiedenen Testseren von den sechs Kaninchen jeweils eine Testserumkontrolle vorgenommen werden.

Die Auswertung geschieht dann durch den Vergleich der höchsten partiell lösenden Komplementdosis des Testserum (Ak.-Ag.-Gemisches mit der höchsten der Ag.-, Testserum- und Normalserumkontrollen, d. h. durch die Bestimmung des

$$\text{Quotienten: } \frac{\text{partiell lösende Komplementsdosis des Testserums}}{\text{höchste partiell lösende Komplementsdosis der Kontrollen}}.$$

b) Bei der *passiven Hämagglutination* — nach GRABAR wahrscheinlich eine der feinsten Reaktionen in der Immunologie — werden mit Tanninsäure gegerbte Erythrocyten (in unserem Falle Kaninchen-Erythrocyten) mit Ag. (hier: Rattenspeicheldrüsenextrakt) beladen; ein gegen das Ag. gerichteter Ak. müßte dann die so mit Ag. beladenen Erythrocyten zur Agglutination bringen; die Methode wurde entsprechend der Originalvorschrift von BOYDEN (1951) durchgeführt, und zwar mit tannierte Kaninchen-Erythrocyten. Wegen der technischen Details und der Auswertung wird auf die Originalarbeit von BOYDEN verwiesen. Um die Spezifität des Verfahrens soweit als möglich zu sichern, kamen drei Kontrollen zur Anwendung: 1. Eine Spontanzusammenballung der antigenbeladenen Erythrocyten ohne Einwirkung von gegen das Ag. gerichteten Ak. wird durch die *Antigen-Kontrolle* ausgeschlossen. Statt des zu testenden Serums gelangt Serum nicht mit Ag. behandelten Kaninchen zur Verwendung; 2. Eine etwa durch Blutgruppen-Unverträglichkeit zwischen den zu testenden Seren und den für die Antigenbeladung benutzten Kaninchen-Erythrocyten vorhandene „echte“ Agglutination, die auch ohne Einwirkung von spezifischen, d. h. hier gegen das auf den Erythrocyten befindliche Ag. gerichteten Ak. auftreten würde, ist durch die *Serum-Kontrolle* auszuschließen, indem „nicht-tannierte und -antigenisierte“ Kaninchenerythrocyten mit den zu testenden Seren zusammengebracht werden. 3. Schließlich gelangten, als Tannin-Kontrolle, tannierte, jedoch nicht antigenisierte Kaninchen-Erythrocyten mit den Testseren in Verbindung, da gelegentlich bei tannierte Erythrocyten in Gegenwart von arteigenem Serum eine Spontan-Aggelutination vorkommt (HOENIG und HOENIGOVÁ). Als Titer wurde die Serumverdünnung angegeben, bei der noch eine sichere Agglutination der Erythrocyten nachweisbar war.

c) Der *Agar-Präcipitationstest* nach OUCHTERLONY wurde zum Nachweis etwaiger präcipitierender Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt in den Kaninchenserum ausgeführt. Nach einer dankenswerten Beratung durch Herrn Dozent Dr. HRTZIG, Zürich, wurde der Agar-Präcipitationstest als Mikromethode auf Objektträgern (für histologische Zwecke) vorgenommen, um Serum und Ag. einzusparen. Ausführung: Eine 4%ige Lösung von Agar-Agar (in Pulverform) wird kalt mit Aqua dest. angerührt, dann im Dampftopf bei 95—100° etwa 1—1½ Std kochen gelassen. Dieser 4%ige Agar wird — nach Erkalten durch erneutes Aufkochen im Wasserbad — mit heißem Schultze-Puffer [85,2 ml 23,8 g Na₂HPO₄ in 1000 ml 9%iger NaCl-Lösung und 14,8 ml 9,1 g KH₂PO₄ in 1000 ml 9%iger NaCl-Lösung (pH 7,5)] zu einem 1,5%igen Agar verdünnt. 3 ml des heißen, 1,5%igen Agars werden auf einem trockenen, vorher in Ätheralkohol gesäuberten Objektträger bei planer Unterlage gegossen. Nach 25 min im Eisschrank (+4°C) ist der Agar auf dem Objektträger erstarrt, und es können nun zu beiden Enden der Objektträger hin kreisförmig je sechs Löcher von etwa 2,5 mm Durchmesser und ein gleich großes Loch im Zentrum dieser Kreise mit ad hoc hergestellten feinen Stanzen in einem Abstand von 4 mm herausgestochen und der Inhalt dieser so gewonnenen Löcher mittels einer Wasserstrahlpumpe restlos herausgesaugt werden. Mit einer ganz feinen Pipette wird dann in die Löcher ein feiner Bodensatz flüssigen 1,5%igen Agars gegeben. Nach Erstarren dieses Bodensatzes können die Ag.- und Ak.-Lösungen eingetropft werden, wozu wir folgendes Schema verwandten: In das zentrale Loch werden 0,005 ml unverdünnter oder 1:1 mit Pufferlösung verdünnter Ag.-Lösung gegeben, in die kreisförmig angeordneten Löcher meist im Uhrzeigersinn bei 12^h oben beginnend 0,005 ml unverdünnten Testserums und dann weiter das gleiche Serum in die folgenden Löcher in einer Verdünnung von 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 und schließlich in das letzte Loch vor 12^h von 1:10000.

d) *Ergebnis der serologischen Antikörpernachweise*. Bei der *Komplementbindungsreaktion* (a) wiesen diejenigen Tiere den höchsten Titer auf, welche die höhere Ag.-Menge von Speichel-

drüsenextrakt (0,8 bzw. 1,1 mg Eiweiß) erhalten hatten, und hier insbesondere Versuchstier Nr. 6 (1,1 mg Eiweiß) mit einer partiell lösenden Komplementdosis der Stufe 8 (s. Tabelle: Stufe 8 entspricht dem Verbrauch einer 14,8%igen Komplementlösung). Die übrigen Tiere wiesen folgende partiell lösende Komplementdosen auf, Nr. 5 (1,1 mg Eiweiß) sowie Nr. 3 und 4 (0,8 mg Eiweiß) der Stufe 5, Nr. 2 und 1 (0,6 mg Eiweiß) der Stufe 3 bzw. 4. Sämtliche Kontrollen waren negativ, zeigten also keinen Komplementverbrauch. In diesem Falle entfällt die Aufstellung des Bewertungsquotienten, da ein Nenner bei negativen Kontrollen nicht gegeben ist; die absoluten Zahlen der partiell lösenden Komplementdosis der Testseren geben dann den Titer an. So ergeben sich bei den sechs Kaninchenserien (1—6) folgende Titerwerte: Nr. 1 = 3,8, Nr. 2 = 2,7, Nr. 3—5 = 5,4 und Nr. 6 = 14,8.

Bei der *passiven Hämaggulination* (b) fanden sich folgende Titerwerte: Kaninchen Nr. 6 = 1:100000, Nr. 5 = 1:10000, Nr. 4 = 1:10000, Nr. 3 = 1:10000, Nr. 2 = 1:100000 und Nr. 1 = 1:100000. Alle drei Kontrollen waren negativ.

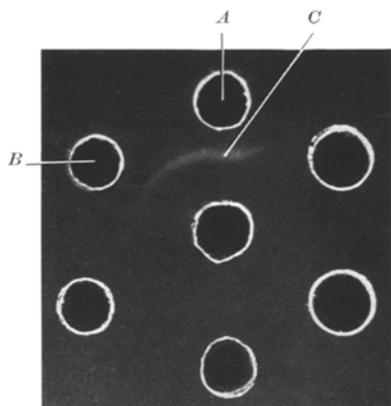


Abb. 2. Agar-Präcipitationstest (OUCHTERLONY). Im zentralen Loch unverdünntes Ag. (Speicheldrüsenextrakt). Im Loch A unverdünntes Testserum (Nr. 4), in B das gleiche Serum mit einer Verdünnung 1:1 mit Pufferlösung. Bei C Präcipitatlinie

heterologe Antikörper gegen einen wäßrigen Extrakt aus Rattenspeicheldrüsengewebe gebildet, deren eventuelle pathogene Wirkung auf lebendes Speicheldrüsengewebe nun geprüft werden kann. Um jedoch in den Versuchen eine störende Einwirkung nicht antikörperhaltiger Serumeiweiße, etwa der Albumine und α -Globuline, möglichst weitgehend auszuschalten, galt es, die antikörperhaltigen Globuline, die sog. Immunoglobuline (HITZIG, HEREMANS) der Kaninchenserien auch möglichst rein darzustellen.

4. Präparative Abtrennung der antikörperhaltigen Immunoglobuline aus den Kaninchenserien mit immunoelektrophoretischer Kontrolle

Nach GRABAR sind — entsprechend immunoelektrophoretischen Untersuchungen — bei Menschenseren die antikörperhaltigen sog. Immunoglobuline in der β_{2A} - β_{2M} - und γ -Globulinfaktion zu suchen. Dem entsprechen in etwa in unseren Kaninchenserien die Ergebnisse mittels freier Elektrophorese, als sich dabei eine Zunahme der γ -Globulinzacke bei den antikörperhaltigen Kaninchenserien fand.

Es galt jedoch die Ak. gegen Speicheldrüsenextrakt in den Kaninchenserien genauer zu lokalisieren; bei diesen Seren wurde daher eine immunoelektrophoretische Untersuchung mit und ohne vorherige Absättigung der Ak. durch das zugehörige Ag. (= Speicheldrüsenextrakt) mit dem Gedanken durchgeführt, daß das mit Ag. abgesättigte Ak.-haltige Globulin sich dem Nachweis durch sein zuständiges Anti-Globulin aus dem immunoelektrophoretischen Anti-

Vergleicht man die Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion mit denen der passiven Hämaggulination, so liegt annähernd eine Übereinstimmung der Titerwerte bei den Tieren Nr. 3—6 vor, also bei denjenigen mit den höheren Mengen einverleibten Eiweißes (Ag.), während die Kaninchen mit der geringeren Menge injizierten Ag. bei der Hämaggulination einen wesentlich höheren Antikörpertiter als bei der Komplementbindungsreaktion und auch als die meisten Kaninchen mit größerer Menge injiziertem Ag. (mit Ausnahme von Kaninchen Nr. 6) aufweisen.

Der Agar-Präcipitationstest (c) zeigt nur bei Kaninchen Nr. 4 und 6 ein Präcipitat (siehe Abb. 2), und zwar bei unverdünntem Ag. oder einer Ag.-Verdünnung von 1:1, 1:10 oder 1:100 und unverdünntem Testserum (Ak.) oder einer Testserumverdünnung von 1:1. Das stärkste Präcipitat fand sich bei unverdünntem Ag. und Testserum, um bei den steigenden Verdünnungen merklich schwächer zu werden.

Nach dem Ergebnis der erwähnten serologischen Reaktionen haben sich also bei den Kaninchen

serum entzieht; das antikörperhaltige Globulin könnte dann durch das Fehlen seiner Präcipitatlinie lokalisiert werden.

a) Immunoelektrophoretische Kontrolle. Die *Absättigung* geschah in Anlehnung an die Absorptionstechnik, wie sie GRABAR und BURTON (s. S. 84) angegeben haben: 1. Das Ag. (= Speicheldrüsenextrakt) wurde lyophilisiert, das Eiweißtrockensubstrat auf einer Mikrowaage gewogen und dann 2. wieder in der kleinstmöglichen Menge gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (s. unten) aufgelöst. 3. Die ad 2. hergestellte Ag.-Lösung wurde so mit den Kaninchentestseren gemischt, daß 1–8 mg Ag.-Substrat auf 1 ml Serum entfielen. Diese Mischung wurde gut geschüttelt und kam dann 4. für 1 Std bei 37° in den Brutschrank, anschließend noch für 24 Std in den Eisschrank (+4°C), um dann 5. bei 2000 U/min einmal abzentrifugiert zu werden. Das klare Supernat wurde verwandt. Das für die Immunoelektrophorese bestimmte, *nicht abgesättigte* Testserum wurde wie das abgesättigte behandelt mit der Ausnahme, daß statt der Ag.-Lösung nur die gleiche Menge Pufferlösung (ohne Ag.) zugegeben

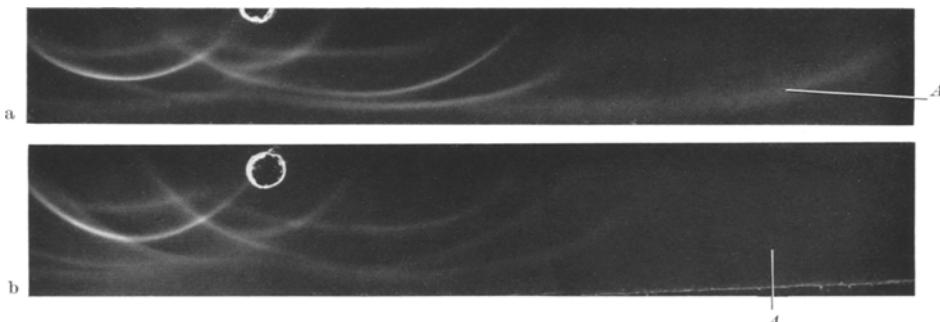


Abb. 3a u. b. Immunoelektrophorese-Diagramme. a Kaninchentestserum (Nr. 6) ohne vorherige Absättigung mit Ag. (= Rattenspeicheldrüsenextrakt). Bei A das Präcipitat des langsam wandernden Anteiles von γ -Globulin deutlich erkennbar. b Das gleiche Testserum wie bei Abb. 3a, jedoch nach Absättigung der Antikörper mit Ag. Deutliche Abschwächung der γ -Globulinpräcipitatlinie, besonders deutlich im Bereich ihres langsam wandernden Anteiles (A)

wurde. Damit wurde bei der Immunoelektrophorese jeweils eine gleiche Serumverdünnung gewahrt.

Die Immunoelektrophorese wurde in der Modifikation nach SCHEIDEGGER (1955: genaue Methodik s. d.) als Mikroelektrophorese auf Objektträgern durchgeführt, und zwar mit dem Agafor-1-Gerät der Firma Egaton-A.G. Bern (Schweiz): 1. Abweichend von der Originalbeschreibung verwandten wir statt Veronal-Puffer Borat-Puffer [(pH 8,6) 24,8 g Acid. boricum werden in 2000 ml Aqua dest. gelöst und 1:1 gemischt mit einer Lösung von 76,2 g Borax in 1000 ml Aqua dest. Diese $2/10$ Mol-Lösung wird vor Gebrauch 1:1 mit Aqua dest. gemischt.] Dieser Puffer erwies sich als besonders günstig für die Darstellung der β_2 - und γ -Globuline (persönliche Auskunft von Herrn Doz. Dr. HITZIG, Zürich). 2. Auf die Objektträger kamen jeweils 2,5 ml mit Puffer gelösten Agars (Herstellung s. a. bei Agar-Präcipitationstest), aus dem nach Erstarren mit dem Schneidegerät eine Rille und zwei Stanzlöcher ausgehoben wurden. 3. Die Stanzlöcher wurden entweder mit etwa 0,002 ml abgesättigten oder mit der gleichen Menge nicht abgesättigten Kaninchentestserums beschickt. 4. Die elektrophoretische Wanderung erfolgte bei einer Spannung von 25 V, 15 mA über eine Zeit von 70 min. 5. Nach der elektrophoretischen Auftrennung dienten die Rinnen der Aufnahme kräftig präcipitierender, am besten unverdünnter Antiseren gegen Kaninchenserum in einer Menge von jeweils 0,04 ml. Obwohl Meerschweinchen schlecht präcipitierende Antikörper liefern sollen (H. SCHMIDT), konnten wir dies für Antiseren gegen Kaninchenserum nicht bestätigen: stellten doch unsere, nach einem besonderen Immunisierungsschema gewonnenen Antiseren gegen Kaninchenserum vom Meerschweinchen im Präcipitat der Immunoelektrophorese die β - und γ -Globuline gut dar. Gleichzeitig verwendeten wir auch uns in dankenswerter Weise überlassene Anti-Kaninchenserum der Ziege von den Behring-Werken mit ebenfalls guten Präcipitatlinien. 6. Das Antiserum in den Rinnen diffundierte gegen die elektrophoretisch auf-

getrennten Kaninchen-Testseren über einen Zeitraum von 48 Std. 7. Es wurde dann bis 48 Std in Pufferlösung gut gespült, um die nicht in den Präcipitaten gebundenen Eiweiße zu eluieren. 8. Gefärbt wurde mit Amidoschwarz nach Vorschrift, dann getrocknet bei 37°C und ein photographischer Abzug in einem Leitz-Vergrößerungsgerät vorgenommen, um die Auswertung der Diagramme zu erleichtern.

Ergebnis. Die Immunoelektrophorese-Diagramme wiesen bei den mit Ag. abgesättigten Kaninchentestseren, etwa ab der Höhe der β_2 -Globuline, zum negativen Pol hin eine deutliche Abschwächung der γ -Globulin-Präcipitatlinien auf, die bei den nicht abgesättigten Seren sehr deutlich sichtbar war (Abb. 3a und b).

b) Präparative elektrophoretische Abtrennung. Nach dem Ergebnis der immunoelektrophoretischen Untersuchung wurden dann die β_2 - und γ -Globuline der gegen Rattenspeichel-drüsenextrakt sensibilisierten Kaninchen nach 48stündiger Dialyse gegen Elektrophoresepuffer nach MICHAELIS (pH 8,6) mittels der von E. WIEDEMANN weiterentwickelten Flüssigkeitselektrophorese¹ unter Verwendung des Spezialzellensatzes für kleinpräparative Versuche (s. E. WIEDEMANN) unter ständiger optischer Kontrolle abgetrennt, anschließend zur Entsalzung gegen Aqua dest. dialysiert und lyophilisiert. Diese so getrockneten, antikörperhaltigen Globuline wurden gemischt und — in kleine Portionen aufgeteilt — in der Tiefkühltruhe bei —37°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Für diese antikörperhaltigen Globuline wird im folgenden — wiederum aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung — zumeist nur die Rede von Immunoglobulinen sein, ungeachtet dessen, daß beim Menschen, allerdings bisher noch nicht beim Kaninchen, unter diesem Begriff die β_{2M^-} , β_{2A^-} und γ -Globuline zusammengefaßt werden, gleichgültig ob sie in einem gegebenen Moment nachweisbare spezifische Antikörper besitzen oder nicht.

II. Behandlung gesunder Ratten mittels intravenöser Injektion von Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeichel-drüsenextrakt und mit immunohistologischem Antikörpernachweis im Gewebe

1. Zur Konstanthaltung der *Versuchsanordnung* wurde von den lyophilisierten Immunoglobulinen eine 1%ige Lösung (Kontrolle durch Eiweißbestimmung nach KJELLDAL) in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und diese dann gesunden Ratten in folgender Weise injiziert: In die Schwanzvene erhielten 2 Ratten 0,3 ml, 6 Tiere 0,6 ml und 2 Tiere 0,9 ml der Immunoglobulinlösung. Die 10 Tiere — sowie 28 gleichaltrige, unbehandelte Ratten — wurden nach 21 Tagen entblutet, seziert und die Speicheldrüsen halbiert; eine Hälfte kam in 4% Formalin zur Fixation für die histologische Bearbeitung (Hämatoxylin-Eosin, van Gieson- und PAS-Färbung), der Rest wurde mit Kohlensäureschnee auf —70°C schnell eingefroren und in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

2. Für den *immunohistologischen Nachweis der Antikörper gegen Rattenspeichel-drüsenextrakt in den Speicheldrüsen und den Glandulae orbitales externae nach der indirekten Methode von COONS und KAPLAN* wurde als Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (RIGGS u. Mitarb.) verwendet, das nach seiner Konjugierung mit einem Ag. dessen serologische Reaktionsfähigkeit überhaupt nicht oder höchstens geringfügig (KLEIN und BURKHOLDER) beeinträchtigt. Im einzelnen lehnte sich die Versuchsanordnung an die von MELLORS, ARIAS-STELLA, SIEGEL und PRESSMAN bei ihren Arbeiten mit heterologen Nierenantikörpern beschriebene Methode an: Die den Ratten injizierten (heterologen) Rattenspeichel-drüsen-Antikörper müßten nach ihrem eventuellen Niederschlag im Gewebe — entsprechend einer Ag.-Ag.-Reaktion — mit einem an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Anti-Kaninchenglobulin, einem sog. Anti-Antikörper in bzw. auf den Drüsen nachzuweisen sein; gehören doch die einverleibten Antikörper der Kaninchenglobulinfraktion an, in der sie ja auch den Ratten injiziert worden waren.

Wir verwendeten zu diesem Zweck als Anti-Antikörper ein an Fluorescein-Isothiocyanat gekoppeltes (markiertes) Anti-Kaninchen-Globulin vom Schaf (Bezugsquelle: Sylvania-Chemical-Company, Orange/New Jersey [USA]), dessen Ag.-Gehalt gegen Kaninchen-

¹ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die großzügige Überlassung der Flüssigkeitselektrophorese-Apparatur.

Globulin vor Gebrauch getestet wurde (Komplementbindungsreaktion und Ouchterlony-Platte); außerdem wurde es mit Gewebspuder (Leber) behandelt, um Reste ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffes abzufangen und eine unspezifische Färbung durch denselben (COCHRANE, C. J. LOUIS) zu vermeiden.

Technische Ausführung

Vorbemerkung. Absättigung des ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffes beim fluorescein-markierten Anti-Kaninchen-Globulin: a) Leberpuder wurde aus frischen und gefrorenen Schweinelebern nach der von COONS und KAPLAN angegebenen Methode mittels Acetonbehandlung hergestellt, b) 1200 mg Leberpuder dann dreimal gewaschen in gepufferter Kochsalzlösung (s. unten) und jeweils wieder abzentrifugiert (2 min bei 15000—18000 U/min). c) 400 mg Leberpuder wurden anschließend mit 2 ml fluorescein-markierter Anti-Kaninchen-Globulin-Lösung der Firma Sylvana Chemical Company gemischt und $\frac{1}{4}$ Std bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Umrühren stehen gelassen, um dann abzentrifugiert zu werden (2 min bei 18000 U/min). d) Das Supernat wurde dann in der gleichen Art wie bei c noch zweimal behandelt, bevor es nach dem letzten Abzentrifugieren zur Verwendung kam.

1. Entnahme der unfixierten Speicheldrüsengewebsanteile der 10 Versuchsratten aus der Tiefkühltruhe und Schneiden am Kryostaten 5—7 μ .
2. Kurze Fixation in 95%igem Methanol oder Aceton (5 min).
3. Schnitte in reichlicher, mit 0,01 M-Phosphatpuffer auf pH 7,0 gehaltener, 0,8%iger Kochsalzlösung für eine halbe Stunde spülen.
4. Herausnehmen der Schnitte aus der Kochsalzlösung und Absaugen der überschüssigen Spülflüssigkeit soweit wie möglich mit Filtrierpapier vom Rande her unter Schonung der Schnitte.
5. Überschichtung der Schnitte mit unverdünntem, markiertem Anti-Kaninchen-Globulin für 30 min in einer feuchten Kammer.
6. Gründlich spülen in zehnmal zu erneuernder gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,0).
7. Eindecken in einem Gemisch von 1 Teil reinstem Glycerin und 9 Teilen der Kochsalzlösung (pH 7,0).
8. Mikroskopieren der Präparate im Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss bei UV-Licht im Dunkelfeld unter Verwendung des Okular-Schutzfilters Wratten Nr. 2B (E. Kodak Co.).

Kontrollen. Da durch das markierte Anti-Kaninchen-Globulin alle Kaninchen-Globuline und nur so (indirekt) die in diesen Globulinen eingeschlossenen Ak. bestimmt werden, sind zur Spezifizierung Kontrollen notwendig, zumal auch die Möglichkeit besteht, daß durch unspezifische Reaktionen etwa zwischen einem Eiweiß des markierenden Globulins und einer Speicheldrüse ein positiver Ausfall der Reaktion im Sinne eines Ag.-Ak.-Geschehens vortäuscht wird. So wurden bei den Rattenspeicheldrüsen der Tiere, die Immunoglobuline mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt erhalten hatten, zwei Kontrollen durchgeführt. Kontrolle 1: Vor der Überschichtung der Gewebschnitte mit fluoreszierendem Anti-Kaninchen-Globulin (5.) wurden diese mit „Antigen“, d. h. Speicheldrüsengewebeextrakt (1:10 mit gepufferter Kochsalzlösung verdünnt) für eine halbe Stunde in der feuchten Kammer überdeckt und dann erst, nach gründlichem Abspülen dieses Extraktes mittels der gepufferten Kochsalzlösung, das Gewebe mit dem fluorescein-markierten Anti-Kaninchen-Globulin behandelt; diese Kontrolle hat den Sinn, durch das Ag. den im Gewebe fixierten, hier gegen Speicheldrüsengewebe bzw. -extrakt gerichteten Ak. so abzusättigen, daß dieser im so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex nicht mehr oder nur noch gering den markierenden Anti-Antikörper binden kann, also letzterer — nach Überschichtung — wegen fehlender Bindung wieder abgespült wird und nicht als fluoreszierendes Substrat die Lage des Ak. markieren kann. Kontrolle 2: Vor Einwirkung des markierenden Anti-Kaninchen-Globulins (5.) wird der Schnitt für 30 min in der feuchten Kammer, statt wie bei der Kontrolle 1 mit Ag., mit nichtfluoreszierendem Anti-Kaninchen-Globulin behandelt und dann gut in der gepufferten Kochsalzlösung gespült. Diese Kontrolle bezweckt, daß das nicht markierte Anti-Kaninchen-Globulin — ähnlich wie bei Kontrolle 1 das Ag. — dem markierenden den Platz nimmt, so daß letzteres beim Überschichten kaum noch Ak., die ja für ihn Ag. darstellen, findet, mit denen es reagieren kann und beim Nachspülen abgeschwemmt wird.

Darüber hinaus wurde die — hier unter ad 1.—8. geschilderte — indirekte Methode des Antikörpernachweises nach COONS und KAPLAN auch für die Speicheldrüsen der unbehandelten Kontrollratten (Kontrolle 3) und derjenigen Tiere angewendet, die nur Kaninchen- β_2 - und γ -Globuline ohne Antikörper gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt (Kontrolle 4), Hühnereiklar (Kontrolle 5) oder Tetanusserum (Kontrolle 6) erhalten hatten (s. Abschnitt IV: Kontrollversuche 1, 3 und 4).

III. Behandlung gesunder Ratten mittels intravenöser Injektion von Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt und nachfolgender Einverleibung von Rattenspeicheldrüsenextrakt (Antigen), Hühnereiklar oder Fremdserum

Nachdem es sich herausgestellt hatte, daß Ratten nach intravenöser Injektion von Immunoglobulinen mit Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt in ihren Speicheldrüsen und der Glandula orbitalis external offenbar nicht mit histologisch nachweisbaren krankhaften Veränderungen reagierten (s. unten Ergebnisse II.), wurden in Ausdehnung des Versuchsganges 22 gesunden Ratten — beiderlei Geschlechts — wiederum die 1%ige antikörperhaltige Immunoglobulinlösung vom Kaninchen, und zwar jeweils 0,9 ml intravenös in die Schwanzvene verabreicht, jedoch 24 Std nach dieser Immunoglobulin-Gabe 10 Tieren — und zwar 5 Ratten i.v. in die Schwanzvene, 5 i.p. — je 0,1 ml der Speicheldrüsenextrakt-Lösung, also des ursprünglichen Ag., 6 Ratten je 0,1 ml steril entnommenen Hühnereiklars und 6 Ratten je 0,1 ml eines Fremdserums (Tetanusserum vom Pferd) — und zwar jeweils 3 Ratten i.p., 3 intravenös in die Schwanzvene — nachinjiziert, die Ratten dann nach 21 Tagen entblutet, seziert und die Speicheldrüsen makro- und mikroskopisch untersucht.

IV. Kontrollversuche.

Aus Kontrollgründen wurden — als Abschluß vorliegender Untersuchungen folgende intravenöse Injektionen vorgenommen: Es erhielten 1. 10 Ratten 0,9 ml einer 1%igen β_2 - und γ -Globulinlösung *nicht* gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt sensibilisierter Kaninchen; 2. 10 Ratten 0,9 ml der gleichen β_2 - und γ -Globulinlösung — *ohne* Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt — und 24 Std später 5 dieser Tiere 0,1 ml Hühnereiklar, die restlichen 5 Tiere 0,1 ml Tetanusserum vom Pferd; 3. 6 Ratten 0,1 ml Hühnereiklar und 4. 6 weitere Ratten als Fremdserum 0,1 ml Tetanusserum vom Pferd intravenös injiziert. Wie bei 28 unbehandelten Ratten wurden von Speicheldrüsen und Glandulae orbitales externae die unfixierten Hälften immunohistologisch (Technik s. Abschnitt A/II./2.), die fixierten Anteile histologisch untersucht.

B. Ergebnisse der Untersuchungen

I.

Entsprechend dem Ergebnis der serologischen Untersuchungsmethoden bilden sich bei Kaninchen — unter Zuhilfenahme von Freundschem Adjuvans — heterologe Antikörper gegen einen wäßrigen Extrakt aus Speicheldrüsen und Glandulae orbitales externae der Ratten. Diese Antikörper können in der β_2 - und γ -Globulinfraktion (Immunoglobuline) der betreffenden Kaninchenserien abgetrennt werden, da elektrophoretische und immunoelktrophoretische Untersuchungen die Anwesenheit der Antikörper im Bereich dieser Globulinfraktionen wahrscheinlich machen.

II.

Bei den Ratten, die intravenös Immunoglobuline mit den heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt erhalten hatten, zeigte sich makroskopisch kein wesentlicher krankhafter Befund an den Speicheldrüsen.

Mikroskopisch ließen sich an diesen Speicheldrüsen ebenfalls keine krankhaften Veränderungen nachweisen, die auf die Einwirkung der Kaninchen-

Immunoglobuline mit Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt zu beziehen gewesen wären; die genannten Organe der so behandelten Ratten sowie diejenigen von 28 unbehandelten Tieren zeigten lediglich den für Ratten charakteristischen Aufbau mit den für diese Tierart in jungen Altersklassen typischen Varianten und „Spontanveränderungen“ (SEIFERT).

Im einzelnen zeigte die *Glandula parotis* (Abb. 4a) — eine seröse Drüse — bei den vorliegenden 10 Ratten und gleichermaßen auch bei 28 nicht im Versuch stehenden Kontrollratten gelegentlich herdförmig das Bild einer Proteodyschylie (BECKER) der Acini in Form von Schwund des Ergastoplasmas, leichter hydro-pischer Umwandlung des Cytoplasmas mit Kernwandhyperchromasien und sehr selten einer Kariorrhaxie, ohne daß jedoch eine Geschlechtsbevorzugung auffällig war. Das hier dann leicht ödematos aufgelockerte Interstitium ließ keine nennenswerte entzündliche Infiltration erkennen, wenn man von hie und da aufscheinenden Mastzellansammlungen absieht.

Diese Parotisveränderungen können also bei den 10 Versuchsratten keinesfalls als Folge der antikörperhaltigen Immunoglobulin-Wirkung aufgefaßt werden, da sie im selben Umfange bei den 28 Kontrolltieren nachweisbar waren; sie entsprechen wohl im kleinen den „Spontanveränderungen“, die SEIFERT bei 377 Ratten häufig recht ausgedehnt in der Rattenparotis fand und am ehesten als Folge einer Coxsacki-B-Virus-Infektion auffaßte. JÄRVI sah sie im übrigen auch bei Vitaminmangelzuständen der Ratten.

Die *Glandula submandibularis* (Abb. 5a) — eine Drüse mit mucoiden Acini und Sexualdimorphismus in bezug auf die sekretorischen Tubuli, die nur beim männlichen Tier nach der Pubertät zur vollen Entwicklung kommen — und die *Glandula sublingualis* — eine muköse Drüse — wiesen bei dem erwähnten Tiergut (Versuchs- und Kontrolltiere), von gelegentlichen Kernwandhyperchromasien der Acinuszellkerne abgesehen, sogar überhaupt keine krankhaften Veränderungen auf.

Dementgegen bot die *Glandula orbitalis externa* (Abb. 6a) ein recht buntes Bild: man erkennt seröse Acini, die sich durch eine fast abenteuerliche Vielgestaltigkeit ihrer Kerne auszeichnen; die Acinuszellen sind polyedrisch und weisen öfters zwei, manchmal sogar drei Kerne auf, die sich im einzelnen in helle und dunkle Formen einteilen lassen. Von diesen beiden Kerntypen sieht man dann sogar jeweils noch zwei Arten: von den helleren solche mit mehreren Nucleolen sowie einer gut ausgeprägten Kernmembran und solche, die im Kerninnern nur sehr feine Körnchen enthalten und deren Kernmembran oftmals in Auflösung begriffen scheint; von den dunkleren solche, die sich mit Hämatoxylin so dunkel färben, daß keine Strukturen sicher bestimmbar sind, und andere, welche sich etwas schwächer mit erwähntem Farbstoff anfärben, 1—3 Nucleolen und ein punktförmig verteiltes Chromatin enthalten. Dabei variiert besonders die letzte Kernart in ihrer Größe bis zu ausgesprochenen Riesenkernen. Während das Zellgut des Gangsystems gleichmäßig und durchaus mit dem der Speicheldrüsen vergleichbar ist, könnte bei Unkenntnis des recht polymorphen Zell- und Kernbildes des Parenchyms der *Glandula orbitalis externa* der irrtümliche Eindruck entstehen, daß eine Schädigung vorläge, zumal hie und da Kernsubstanzaustritte in das Cytoplasma, Kernwandhyperchromasien und — seltener — Kariorrhaxien

nachweisbar sind. Alle diese Veränderungen sind gleichermaßen aber auch bei den 28 Kontrolltieren nachweisbar, bei denen ebenfalls das Interstitium dieser Drüse öfters ödematos aufgelockert und schüttet rundzellig-entzündlich infiltriert ist. Damit kann man also auch in der Glandula orbitalis externa nach Injektion von Kaninchen-Immunoglobulinen mit Ak. gegen Speicheldrüsenextrakt keine Veränderungen verifizieren, die auf die Wirkung dieser Ak. zu beziehen wären.

Nach diesen negativen Befunden hat also die Einverleibung der Kaninchen-Immunoglobuline mit den gegen Speicheldrüsenextrakt gerichteten Ak. morphologisch bei den betreffenden Ratten keine faßbaren Veränderungen an den Speicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa hervorgerufen. Es erhebt sich nun in diesem Zusammenhang die Frage, ob die intravenös verabreichten Immunoglobuline überhaupt die erwähnten Drüsen erreichten, und ob das lebende Gewebe dieser Organe eine antigene Wirkung und damit eine Anziehungskraft auf die in den Immunoglobulinen verborgenen Ak. besitzt. Als Methode der Wahl bot sich hier der *indirekte Ak.-Nachweis mit Fluoreszenzfarbstoffen nach Coons und KAPLAN* an. Bei dieser Methode zeigte sich nun — unter Berücksichtigung der Eigenfluoreszenz des Gewebes und der Pigmente — bei UV-Licht eine — zumeist herdförmig in den Acini auftretende — gelb-grüne Fluoreszenz des markierten Anti-Kaninchen-Globulins auf den Drüsendarmsstückchen der Glandula orbitalis externa (Abb. 6 b) und der Glandula parotis sowie den sekretorischen Tubuli der Glandula submandibularis, jedoch nicht in der Glandula sublingualis und in den Endstücken der Glandula submandibularis; die markierende gelb-grüne Fluoreszenz im Cytoplasma der serösen und mucoiden Drüsendarmsstücke war am stärksten um die Kerne zum Zentrum, am schwächsten zur Peripherie der Endstücke hin ausgesprochen, so daß etwa die Stellen des Ergastoplasmasmaumes, wie auch die Kerne, frei von gelb-grüner Fluoreszenz sind. Bis auf die erwähnten sekretorischen Tubuli waren in den Drüsen die Ausführungsgänge frei von Markierung.

Bei allen Kontrollen fehlte die markierende gelb-grüne Fluoreszenz des Anti-Kaninchen-Globulins auf den Drüsendarmsstückchen der Glandula orbitalis externa und der Glandula parotis sowie den sekretorischen Tubuli der Glandula submandibularis.

Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, daß die Ak. gegen Ratten speicheldrüsenextrakt doch durch die intravenöse Injektion der Immunoglobuline die Speicheldrüsen erreicht haben, ohne jedoch morphologisch sichtbare Veränderungen hervorzurufen. Der Träger der Antigenität scheint dabei vorwiegend im Cytoplasma der Zellen, und zwar dem der Drüsendarmsstücke von Glandula parotis und orbitalis externa sowie dem der sekretorischen Tubuli der Glandula submandibularis zu liegen, da unter anderem auch interstitielles Bindegewebe und Blutgefäße keine markierende Fluoreszenz aufwiesen.

III.

Alle Ratten, die intravenös zuerst Immunoglobuline mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt und dann nachfolgend Rattenspeicheldrüsenextrakt (Ag.), Hühnereiklar oder Fremdserum injiziert erhalten hatten, boten die gleichen Befunde, so daß sie hier zusammen besprochen werden können:

Makroskopisch war bei allen diesen Ratten — mit Ausnahme der Glandula sublingualis — eine leichte, jedoch deutliche ödematöse Schwellung der Speicheldrüsen, besonders jedoch der Glandula orbitalis externa, nachweisbar.

Mikroskopisch ließen sich an diesen Drüsen — wiederum mit Ausnahme der Glandula sublingualis — wesentliche krankhafte Veränderungen nachweisen, die — am stärksten bei der Glandula orbitalis externa — sich deutlich von den „gewohnten“ Erscheinungsbildern der mit antikörperhaltigen Immunoglobulinen behandelten Ratten abheben.

Glandula parotis (Abb. 4 b). Neben einer ödematösen Auflockerung des interstitiellen Bindegewebs ezeichnet sich auffallend herdförmig in den Acini eine Proteodyschylie (BECKER) sämtlicher Grade bis zur Nekrose ab: Der basale Ergastoplasmasaum ist klein oder ganz geschwunden, teilweise mit hydropischer Cytoplasmaaufhellung und basaler Abschmelzung. Herdförmig sind die Endstücke völlig nekrotisch und kernlos, wobei hier das interacinäre Bindegewebe stärker rundzellig-entzündlich mit Lymphocyten und auch Plasmazellen infiltriert ist. Die Kerne der Endstücke lassen daneben alle Grade von regressiven Veränderungen erkennen, und zwar am häufigsten Kernwandhyperchromasien, Kariorrhixen, seltener Kariolysis oder Pyknose, wobei das Cytoplasma noch wohl erhalten sein kann; die PAS-positiven Enzymgranula bleiben oftmals in nekrotischen Zellen noch lange erhalten. Hier und da liegen im Interstitium um nekrotische Endstücke Kerntrümmer in Phagocyten. Da sich am Gangsystem kein wesentlicher krankhafter Befund erheben ließ, entspricht also das Bild einer Schädigung des Parotisparenchyms (Proteodyschylie) mit nichteitriger Entzündung.

Glandula submandibularis (Abb. 5 b). Fast noch auffälliger als in der Parotis ist in der Glandula submandibularis das interstitielle Ödem, welches oftmals die Capillaren regelrecht von dem Drüsenparenchym abdrängt. Begleitet wird es von einer nur herdförmig dichteren plasmacellulären und lymphocytären Infiltration, die am stärksten um sekretorische Tubuli ausgebildet ist, jedoch um große Ausführungsgänge fehlt. Nur diese Tubuli zeigen im wesentlichen krankhafte Veränderungen und nicht die Endstücke; erstere enthalten kaum noch intakte Kerne, sondern meist nur Kerntrümmer bei hochgradiger hydropischer Cytoplasmaquellung bis zur völligen Auflösung des Zelleibes; ihre Granula sind weitgehend geschwunden; man hat regelrecht Mühe, überhaupt einen erhaltenen sekretorischen Tubulus zu finden. Dabei ist es gleichgültig, ob es sich um männliche oder weibliche Tiere, also um welche Form solcher Tubuli mit ihrem Sexualmorphismus, handelt. Große Abschnitte dieser Tubuli sind sogar fast völlig kernlos. An den Ausführungsgängen ist dann wieder kein wesentlicher krankhafter Befund zu erheben. Die Glandula submandibularis zeigt also bei unverehrten Endstücken nur regressive Veränderungen an den sekretorischen Tubuli bei gleichzeitig bestehender nichteitriger Entzündung.

Glandula sublingualis. Eine Besprechung erübrigt sich, da sich keine charakteristischen Veränderungen an dieser Drüse gefunden haben, die auf die vorliegenden Versuchsanordnungen zu beziehen gewesen wären.

Glandula orbitalis externa (Abb. 6 c und d). Diese Drüse weist die stärksten Veränderungen auf. Zwar tritt das interstitielle Ödem gegenüber den bereits

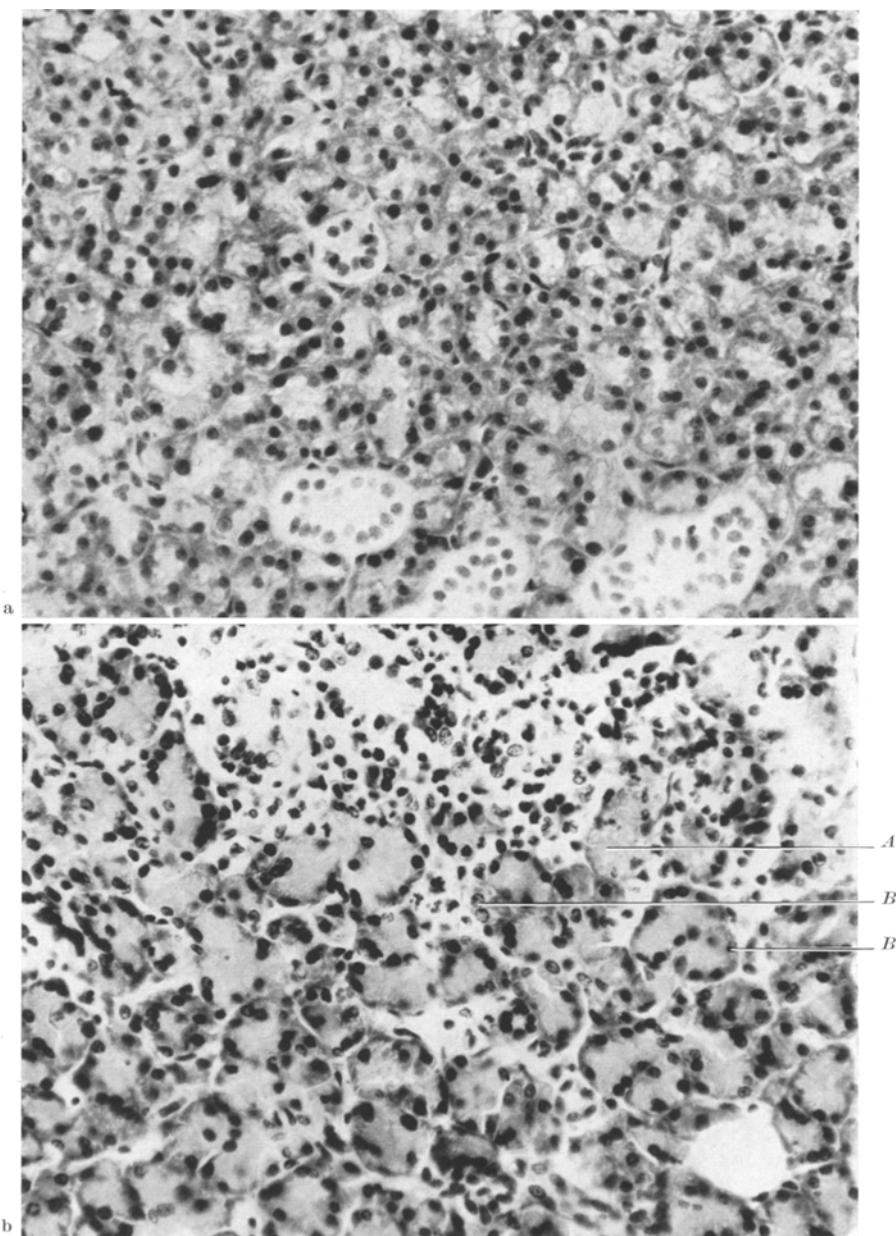


Abb. 4a u. b. Parotis der Ratte. Hämatoxylin-Eosinfärbung. a Keine wesentlichen krankhaften Veränderungen 21 Tage nach intravenöser Injektion von 0,9 ml einer gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt gerichteten 1 %igen Antikörper-Immuno-Globulinslösung vom Kaninchen (in etwa nach dem Modell einer inversen Anaphylaxie). Vergr. 159 \times . — b 21 Tage nach intravenöser Injektion von 0,9 ml der gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt gerichteten 1 %igen Antikörper-Immuno-Globulinslösung vom Kaninchen und 24 Std später nachfolgender intravenöser Injektion von 0,1 ml etwa 100 mg-%iger Speicheldrüsenextraktlösung (Ag.): Rundzellig entzündliche Infiltration (Lymphozyten, Plasmazellen) mit ödematöser Auflockerung und regressiven Zellveränderungen an den Endstückchen bis zur Nekrose (bei A). Bei B Kariorrhexis. Vergr. 205 \times

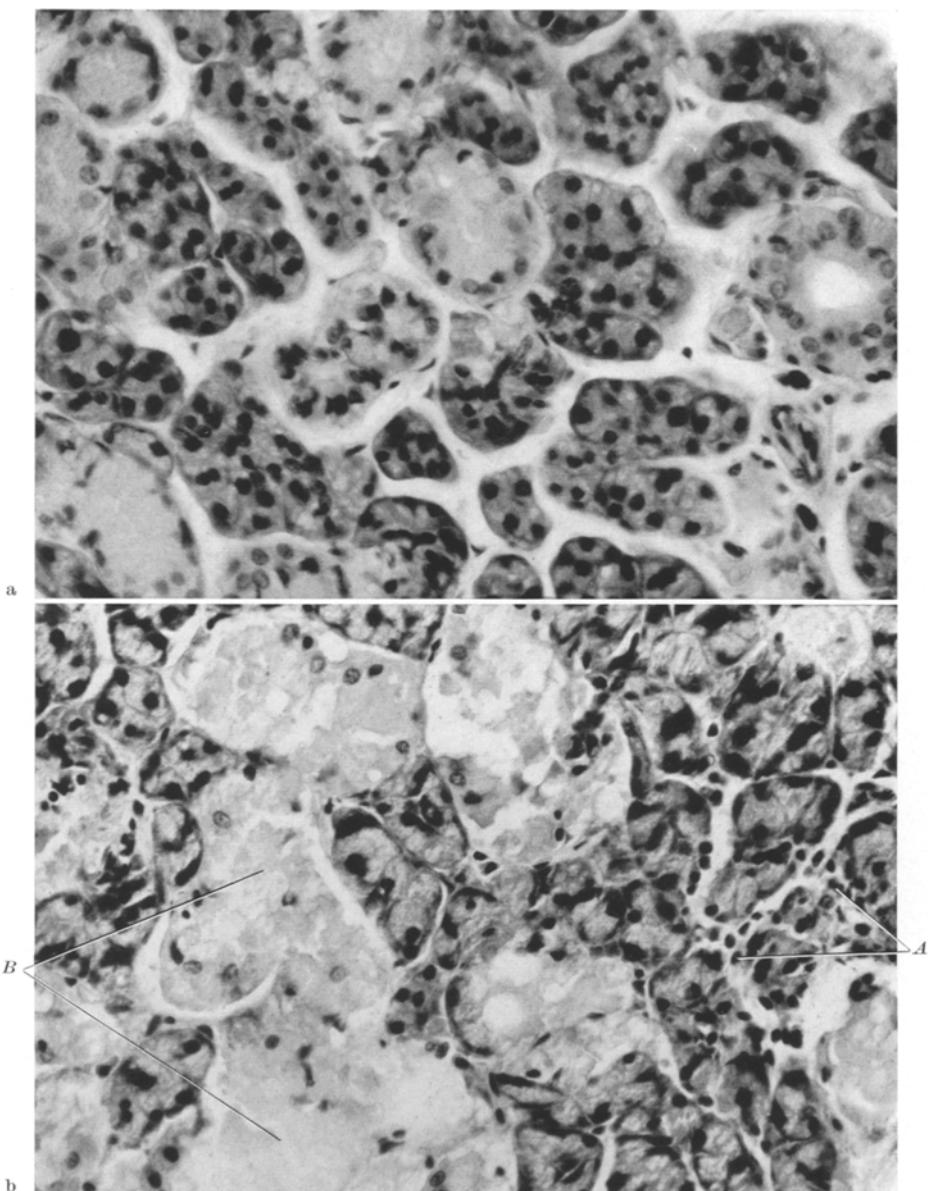


Abb. 5a u. b. Glandula submandibularis der Ratte. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Keine wesentlichen krankhaften Veränderungen bei den gleichen Versuchsbedingungen, wie sie für die Abb. 4a angegeben wurden. Vergr. 400 \times . b Versuchsanordnung wie bei Abb. 4b. Schüttreie rundzellig-entzündliche Infiltration (A) mit Ödem und Nekrobiose der sekretorischen Tubuli (B). Keine wesentlichen krankhaften Veränderungen an den Endstücken. Vergr. 512 \times

erwähnten Speicheldrüsen in den Hintergrund; dafür scheint jedoch eine sehr dichte, rundzellig-entzündliche Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und weniger eosinophilen Leukocyten in den Läppchen und in den

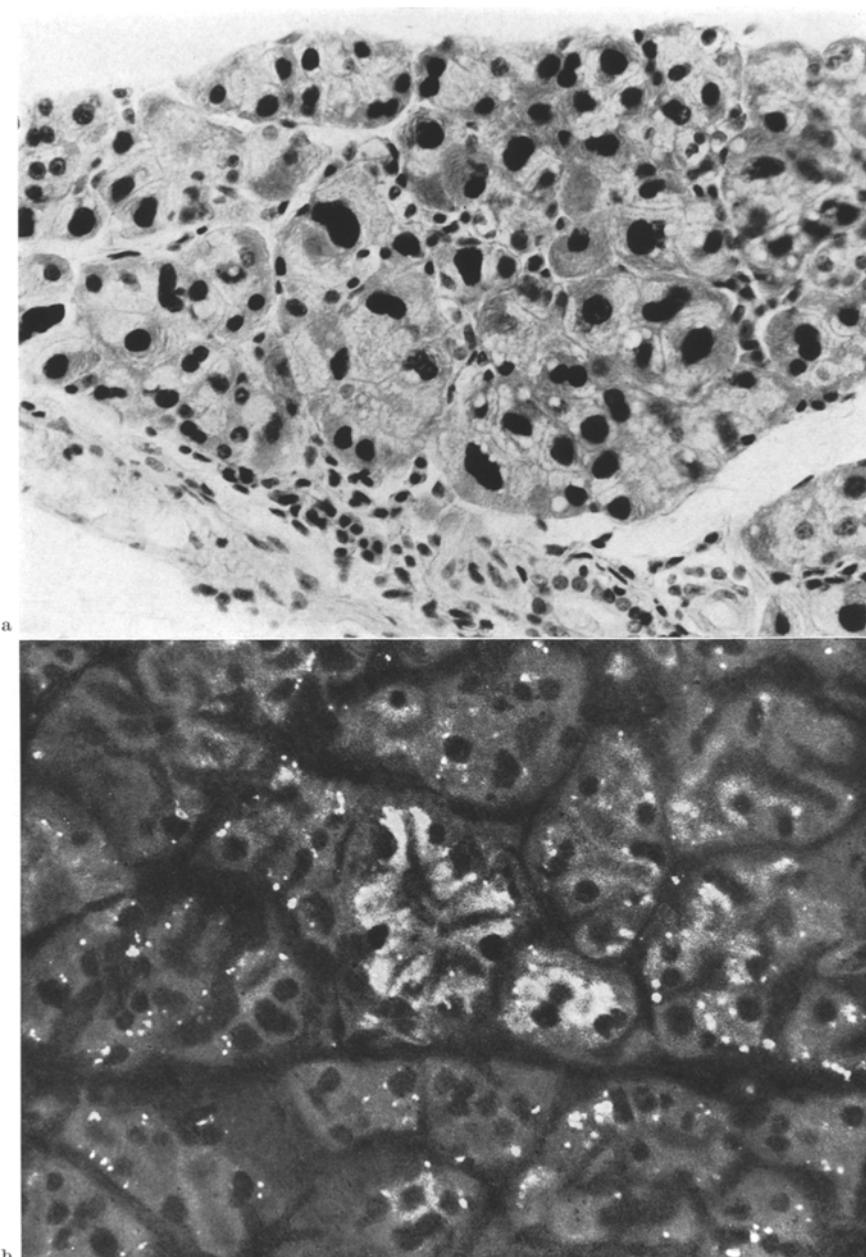
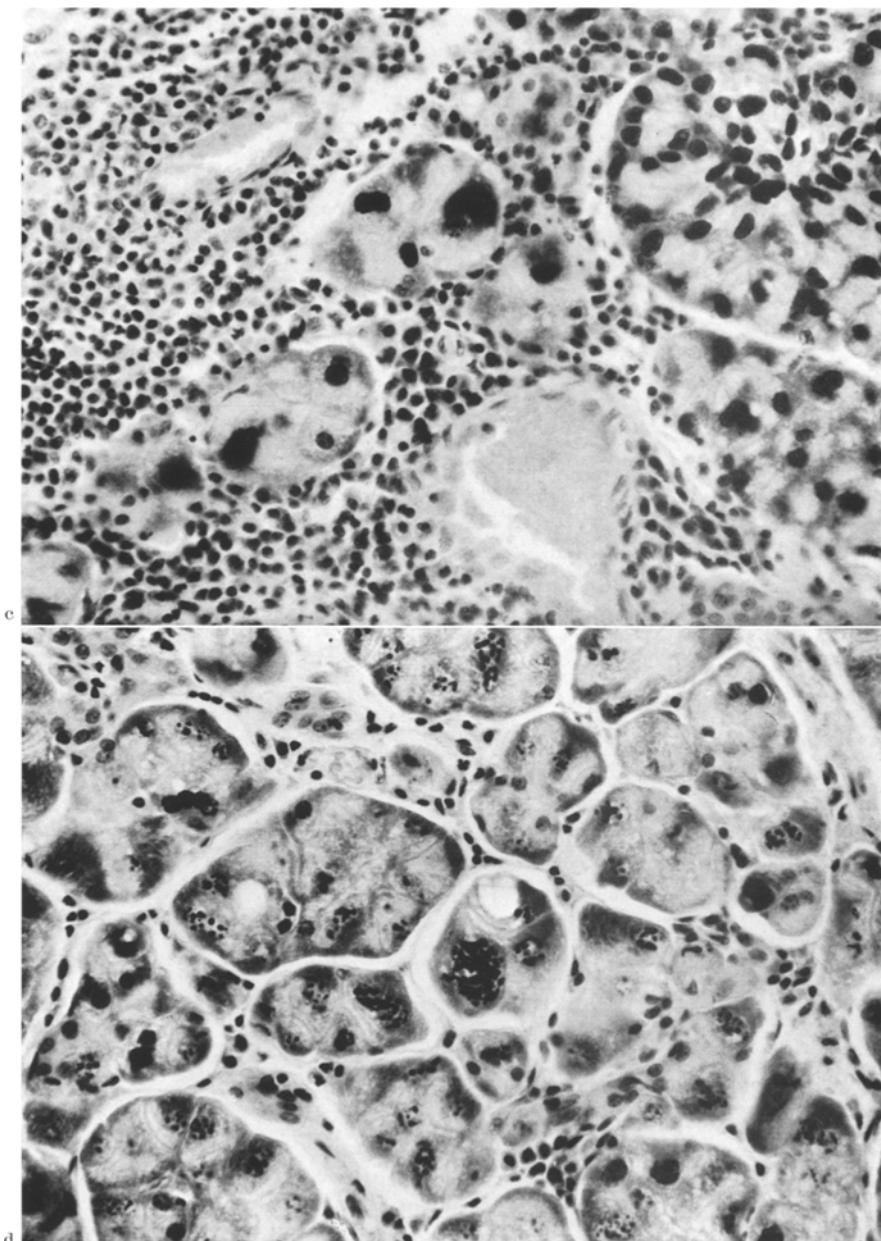


Abb. 6a—d. Glandula orbitalis externa der Ratte. a Keine wesentlichen krankhaften Veränderungen bei der gleichen Versuchsanordnung der Abb. 4a und 5a (alleinige Injektion von Immunoglobulinen mit Antikörpern gegen Drüsenextrakt). Offenbar der Norm entsprechende Vielgestalt der Kerne in den Endstücken und schüttre lymphocytäre Infiltration im Interstitium. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Vergr. 400 \times . b Im Präparat gelb-grün fluoreszierender, in der Wiedergabe weiß gefärbter, an Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelter Anti-Antikörper (= Anti-Kaninchen-Globulin vom Schaf) auf den Drüsenendstücken zur Markierung der intravenös injizierten, vom Kaninchen stammenden Immunoglobulinen mit Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsengewebsextrakt entsprechend der Versuchsanordnung, wie sie für Abb. 4a und 5a angegeben ist. Die intravenös injizierten Immuno-



globuline mit Antikörpern gegen Speicheldrüsenextrakt hatten sich also offenbar auf dem Cytoplasma der Drüsenendstücke niedergeschlagen, jedoch wie Abb. 6a vom gleichen Tier zeigt, keine krankhaften Veränderungen bewirkt. Vergr. 500 \times . c Gleiche Versuchsanordnung wie für Abb. 4b und 5b, also Injektion von Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen Speicheldrüsenextrakt mit nachfolgender Einverleibung von Speicheldrüsenextrakt (Ag.): Starke rundzellig-entzündliche Infiltration im Interstitium bei regressiven Kernveränderungen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Vergr. 512 \times . d Gleiche Versuchsanordnung wie bei Abb. 6a. Stärkste regressive Zell- und besonders Kernveränderungen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Vergr. 512 \times

bindegewebigen Septen auf, die jedoch keinesfalls um Ausführungsgänge verstärkt ist. Schon bei schwacher Vergrößerung fällt eine sehr starke Zellschädigung der Drüsengangstücke ins Auge. So finden sich fast diffus in der ganzen Drüse neben Verklumpungen des Kernchromatins absonderlichster Gestaltung Kariorrhesis mit plumpen Chromatinhaufen, daneben auch bei basaler Cytoplasmaabschmelzung Pyknose und Kariolysis sowie gelegentlich sogar völlig kernlos nekrotische Zellen. Diesen so eindrucksvollen Veränderungen am Drüsengangsystem gegenüber. Es liegt also auch hier das Bild schwerster regressiver Zell- und Kernveränderungen des Parenchyms und einer starken nichteitrigen interstitiellen Entzündung vor.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß bei Ratten nach intravenöser Injektion von Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt und nachfolgender Einverleibung von Rattenspeicheldrüsenextrakt (Ag.), Hühnereiklar oder Fremdserum — mit Ausnahme der Glandula sublingualis — die Speicheldrüsen und die Glandula orbitalis externa die gleichen krankhaften Veränderungen aufweisen: regressive Parenchymenschäden bis zur Nekrose und eine nichteitrige Entzündung. Nur sind die Parenchymenschäden nicht immer gleich lokalisiert: an der Glandula parotis und der Glandula orbitalis externa sind sie an den Drüsengangstücken, in der Glandula submandibularis an den sekretorischen Tubuli zu finden.

IV.

Bei den *Kontrollversuchen* zeigten sich histologisch keine wesentlichen krankhaften Veränderungen, die auf die intravenöse Injektion von Kaninchen- β_2 - und γ -Globulinen (ohne Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt) mit und ohne nachfolgender Fremdeiweiß-(Hühnereiklar- oder Tetanusserum-) Einverleibung (Kontrollversuche 1 und 2), von Hühnereiklar (Kontrollversuch 3) oder Fremdserum (Tetanusserum vom Pferd) (Kontrollversuch 4) bezogen werden konnten. Das histologische Bild unterschied sich nicht wesentlich von dem der 28 nicht behandelten Tiere und dem der Ratten, die allein Immunoglobuline mit heterologen Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt erhalten hatten. Bei den Kontrollversuchen (1, 3 und 4) konnte — wie bereits betont — keine markierende Fluorescenz bei Verwendung der indirekten Methode nach COONS und KAPLAN in den Speicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa der Ratten gefunden werden.

C. Besprechung

Nach den vorliegenden Untersuchungen scheint also tatsächlich Gewebe der Rattenspeicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa der Ratten für Kaninchen antigen zu sein. Lassen sich doch beim Kaninchen Ak. gegen einen wäßrigen Extrakt dieser Organe erzeugen und mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN, der Komplementbindungsreaktion nach HENNESSEN und mit dem Agar-Präcipitationstest nach OUCHTERLONY auch nachweisen. Nach den immuno-histologischen Befunden mittels der Methode nach COONS und KAPLAN sind dabei offenbar die Träger der Antigenität im Cytoplasma zu suchen, und zwar hier im einzelnen bei Glandula orbitalis externa und Parotis im Gebiet um die Kerne

zum Zentrum der Drüsenendstücke hin, in der Glandula submandibularis in den sekretorischen Tubuli. Welche Substrate sich in den einzelnen Drüsen hinter diesen Ag.-Trägern verbergen, bleibt offen und war auch nicht durch vorliegende Untersuchungen zu klären. Diese bezogen sich vielmehr auf die Frage, inwieweit Immunoglobuline mit heterologen Ak. gegen Gewebeextrakte aus Speicheldrüsengewebe und der Glandula orbitalis externa bei der Ratte krankheitsauslösend wirken könnten. Zu diesem Zweck wurden präparativ in der Flüssigkeitselektrophorese abgetrennte Kaninchen- β_2 - und γ -Globuline (Immunoglobuline) mit Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt benutzt, ähnlich wie MASUGI zur Erzeugung einer sog. nephrotoxischen Nephritis heterologe Ak.-haltige Seren gegen Nierengewebe verwendet hatte. Diese heterologe Versuchsanordnung hat den Vorteil, daß dabei genügende Mengen von Ak.-enthaltenden Immunoglobulinen erzielt werden können; muß man doch bei der präparativen Abtrennung in der Flüssigkeitselektrophorese mit einem etwa 60%igen Verlust an Immunoglobulinen und damit an Ak. rechnen. Dem steht aber ein hoher Bedarf an solchen Ak. entgegen, wie schon MASUGI für die genannte Nephritis betonte, der bei einem kleinen Tier, also z. B. bei der Ratte, geringer anzusetzen ist, als wenn man ein größeres Tier mit größerem Blutvolumen und hierdurch bedingter stärkerer Verdünnung der injizierten antikörperhaltigen Immunoglobuline verwendet. Aus diesen Gründen wurde also ein reichlich antikörperhaltiges Serum spendendes größeres Tier, das Kaninchen, und ein empfangendes kleineres Versuchstier, die Ratte, gewählt.

Injiziert man nun solche Immunoglobuline mit heterologen, gegen Gewebeextrakt aus den Speicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa der Ratte gerichteten Ak. in 0,3—0,9 ml einer 1%igen Lösung, die in etwa der Immunoglobulkonzentration der von MASUGI verwendeten Seren mit Ak. gegen Nierengewebe entspricht, Ratten intravenös, so findet sich bis zum 21. Tag, an dem die Tiere getötet wurden, kein wesentlicher krankhafter Befund in genannten Drüsen, der auf die Einwirkung dieser antikörperhaltigen Kaninchenglobuline zu beziehen gewesen wäre. Dennoch macht die Methode nach COONS und KAPLAN es wahrscheinlich, daß mit den Immunoglobulinen diese Ak. ihr Ziel, d. h. also die Glandula parotis, submandibularis und orbitalis externa erreicht haben mit der Bedeutung, daß sich kein stichhaltiger Beweis für einen Ak.-Niederschlag in der Glandula sublingualis vorfand. Es sieht also so aus, als würden die Immunoglobuline mit Ak. gegen Speicheldrüsenextrakt („Extraktantigen“) bloß an das Drüsengewebe („Gewebsantigen“) gebunden, ohne jedoch pathologisch sichtbare Veränderungen an diesen Drüsen hervorzurufen.

Ein annähernd gleiches Ergebnis erzielten — wie eingangs schon erwähnt — für die Immunothyreoiditis DONTACH und ROTT, die durch Übertragung von Menschenserum mit humoralen Ak. gegen Schilddrüsengewebe (sog. Hashimoto-Serum) auf den Affen keine Schilddrüsenveränderungen bei diesen Tieren hervorrufen konnten, obwohl serologisch Affenschilddrüsengewebe mit den Antikörpern der Hashimoto-Seren reagierte. Auch für die sog. experimentelle Polyneuritis, die auf die Anwesenheit von Ak. gegen Nervengewebe zurückgeführt wird, lehnen KERSTING und PETTE die Möglichkeit einer passiven Übertragung dieser Krankheit — durch die betreffenden Ak. — ab. Selbst für die Masugi-Nephritis ist es nach den Parabioseversuchen an Ratten von PFEIFFER, DITSCHUNEIT, FEDERLIN, MOSLER, OHEB-SHALON und SANDRITTER nicht sicher, ob der „nephrotoxische“ Ak. allein die Nierenschädigungen hervorrufen kann, da die primär injizierten Ak. an der Übertragung einer Nephrotoxin-

Nephritis auf einen Parabionten offenbar nicht beteiligt sind. Für die Entstehung einer Immunothyreoiditis nehmen daher HEILMEYER und MÜLLER nach kritischer Durchsicht der Literatur und an Hand der Beobachtung zweier Fälle solcher Schilddrüsenerkrankungen beim Menschen an, daß die Ak. gegen Schilddrüsengewebe (Thyreoglobulin) — in ihrem Falle Autoantikörper — nur dann pathogenetisch wirksam würden, wenn sie aus irgendeinem Grunde mit Thyreoglobulin oder der Vorstufe dieses Eiweißes (Ag.) im Interstitium der Schilddrüse zur Reaktion gelangten.

Für die Speicheldrüsen und die Glandula orbitalis externa ergaben dann die vorliegenden Untersuchungen weiter, daß erst das 24 Std nach einer Kaninchen-Immunoglobulininjektion — mit Ak. gegen genannte Organe bzw. deren Extrakte — nachgespritzte Extraktantigen (= Gewebeextrakt aus Rattenspeicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa der Ratte), aber auch nachinjiziertes Fremdeiweiß, wie Hühnereiklar und Fremdserum, in einer jeweiligen Dosis von 0,1 ml beiderseits in den genannten Organen krankhafte Veränderungen, mit Ausnahme in der Glandula sublingualis, hervorruft: regressive Parenchymsschäden bis zur Nekrose mit einer nichteittrigen Entzündung.

Diese Veränderungen sind jedoch in keiner Weise kennzeichnend für die Entstehung. Die gefundenen regressiven Veränderungen an den Drüsenendstücken der Glandula parotis und Glandula orbitalis externa sowie den sekretorischen Tubuli der Glandula submandibularis mit der in diesen Organen nachweisbaren interstitiellen, nichteittrigen Entzündung gleichen noch am ehesten denjenigen krankhaften Erscheinungsformen, die man nach Vitaminmangelzuständen und Virusinfektionen in diesen Rattenorganen zu sehen gewohnt ist. Auffallend bleibt nur, daß die regressiven Parenchymsschäden bloß an den Drüsenanteilen nachweisbar waren, an denen die Methode nach COONS und KAPLAN die Antikörper lokalisierte: den Drüsenendstücken der Glandula parotis und der Glandula orbitalis externa sowie den sekretorischen Tubuli der Glandula submandibularis.

Während das Auftreten einer Speicheldrüsenschädigung durch das nach der Ak.-Injektion nachgespritzte Extraktantigen noch als Folge einer zweiten Antigen-Antikörper-Reaktion — zwischen dem auf dem Blutwege in die Speicheldrüse gelangten Extraktantigen und den bereits vorher zellständig gewordenen Ak. — aufgefaßt werden kann, bleibt der Wirkungsmechanismus eines nach der antikörperhaltigen Immunoglobulin-Gabe nachinjizierten Fremdeiweißes (Hühnereiklar, Fremdserum) unklar; dieser dürfte wohl nicht übereinstimmen mit der „Infektablenkung“, wie sie etwa von VORLAENDER, VORLAENDER und LÜCHTRATH 1956 für die Begünstigung der Entstehung einer Nierentuberkulose der Ratte nach Verabreichung heterologer und homologer Anti-Rattennierenserum beschrieben wurde. Weiter muß betont werden, daß — an Hand vorliegenden Untersuchungsmaterials — Hühnereiklar oder Fremdserum nicht allein, aber auch nicht nach vorhergehender Kaninchen- β_2 - und γ -Globulininjektion — ohne Ak. gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt — in der Lage sind, charakteristische Schäden an den Speicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa der Ratten hervorzurufen, vergleichbar etwa mit der Entstehung einer diffusen Glomerulonephritis der Kaninchen nach Injektion nur von γ -Globulin aus Rinderserum (MORE und WAUGH).

Es ist verfrüht, an Hand vorliegenden Untersuchungsmaterials Beziehungen zu der menschlichen Pathologie der Speicheldrüse aufzustellen, und hier besonders

mit den Speicheldrüsenerkrankungen im Rahmen des Sjögren-Syndroms und der Mikulicz-Krankheit; werden doch einmal die hier ausführlich besprochenen krankhaften Veränderungen auf der Basis von — allerdings weitgehend präparativ rein dargestellten — Immunoglobulinen mit heterologen Ak. gewonnenen, für die BOHLE, KRECKE, KLEINMAIER und GOERGEN im nephrotoxischen Vollserum der Masugi-Nephritis mit Recht betonen, daß sie nicht geeignet sind, die menschliche Glomerulonephritis in ihrer Entstehung restlos zu klären (s. a. LETTERER 1953). Zweitens liegen keine eindeutigen Übereinstimmungen der histologischen Befunde zwischen unserer tierexperimentell erzeugten „Immunosialadenitis“ und den von SEIFERT und GEILER und auch RAUCH kürzlich im einzelnen beschriebenen Veränderungen der menschlichen Speicheldrüsen beim Sjögren-Syndrom und der Mikulicz-Krankheit vor, vielleicht infolge zu kurzer Dauer unserer Experimente (21 Tage). Für die Annahme einer solchen Beziehung könnte nur sprechen, daß unter anderem JONES 1958 — präcipitierende — Ak. gegen Tränen- und Speicheldrüsen beim Sjögren-Syndrom nachgewiesen hat.

Nicht verfrüht erscheint jedoch für das Tierexperiment die abschließende Stellungnahme, daß den Antikörpern gegen Rattenspeicheldrüsenextrakt wohl eine pathogenetische Bedeutung für Rattenspeicheldrüsenerkrankungen zu kommen kann. Nur sind diese Ak. offenbar allein nicht cytotoxisch, d. h. in der Lage, die Speicheldrüsenzellen sichtbar zu schädigen, sondern sie benötigen offenbar hierzu noch die Hilfe entweder ihres zuständigen „Extraktantigens“ oder aber eines Fremdeiweißes. Diese Fremdeiweiße sind aber — wie Kontrolluntersuchungen ergeben — allein ohne Hilfe dieser Ak. für eine krankhafte Schädigung der Speicheldrüsen — ebenfalls ungeeignet. Damit müßte man also in diesen so indirekt nur cytotoxisch wirkenden Ak. gewissermaßen den Wegbereiter für einen cytotoxischen Effekt von Fremdeiweißen sehen.

Zusammenfassung

Bei Kaninchen wurden Antikörper gegen Extrakte aus Speicheldrüsen und Glandulae orbitales externae der Ratte gewonnen und serologisch nachgewiesen (passive Hämagglytination, Komplementbindungsreaktion, Agar-Präcipitations- test, Immunoelektrophorese); diese Antikörper wurden — nach ihrer elektrophoretischen Abtrennung — in der β_2 - und γ -Globulinfraktion (Immunoglobulinfraktion) der betreffenden Kaninchenserien gesunden Ratten intravenös injiziert; diese Ratten zeigten bis zum 21. Tag nach der Injektion keine krankhaften Veränderungen an den Speicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa. Dennoch machte die immunohistologische Methode nach COONS und KAPLAN es wahrscheinlich, daß diese Immunoglobuline die Glandula parotis, orbitalis externa und submandibularis erreicht hatten. Erst nach einer solchen Immunoglobulininjektion — intravenös oder intraperitoneal — nachgespritztes „Extraktantigen“ (= Extrakt aus Rattenspeicheldrüsen und der Glandula orbitalis externa der Ratte), aber auch — ebenfalls intravenös oder intraperitoneal — nachinjiziertes Fremdeiweiß, wie Hühnereiklar und Fremdserum, rufen in der Glandula parotis, Glandula submandibularis und in der Glandula orbitalis externa, jedoch nicht in der Glandula sublingualis, krankhafte Veränderungen in Form von regressiven Parenchym- schäden bis zur Nekrose mit nichteitriger Entzündung hervor. Die Parenchym-

schäden waren allerdings nur dort nachweisbar, wo die Methode nach COONS und KAPLAN die antikörperhaltigen Immunoglobuline lokalisierte: den Drüseneindstückchen der Glandula orbitalis externa und der Glandula parotis sowie den sekretorischen Tubuli der Glandula submandibularis. Diese Veränderungen zeigen histologisch kein für ihre Entstehung charakteristisches Bild. Nur die experimentelle Art ihrer Erzeugung gestattet am vorliegenden Material die Diagnose „Immunosialadenitis“ bzw. „Immunosialose“.

Summary

Rabbit antibodies were obtained against extracts of the rat salivary and lachrymal glands and were measured serologically by passive hemagglutination, complement fixation, agar precipitation, and immunoelectrophoretic methods. After these rabbit antibodies were separated electrophoretically into the β_2 - and γ -globulin fractions (immune globulin fractions), they were injected intravenously into healthy rats. No pathologic changes became evident in the salivary or external lachrymal glands of these rats up to the 21 day after the i.v. injection. Nevertheless, studies with the immunohistologic method of COONS and KAPLAN strongly suggested, that these immune globulins had been deposited in the parotid, lachrymal, and submandibular glands. Only after a subsequent i.v. or i.p. injection of "antigen extract", or foreign protein similarly administered (chicken egg albumin, foreign serum) were pathologic changes induced in the parotid, submandibular, and external lachrymal glands. None were produced in the sublingual gland, however. The changes varied from regressive, parenchymatous damage to necrosis without suppuration. The glandular destruction occurred only where the antibody-containing immune globulins were demonstrated with the method of COONS and KAPLAN; namely, at the glandular end pieces of the lachrymal and parotid glands, and at the secretory tubules of the submandibular gland. The changes histologically revealed nothing characteristic for their pathogenesis. Only the experimental method of their induction in the animals studied permits the term "immunosialadenitis" ("immunosialosis").

Literatur

- BEUTNER, E. H.: Immunofluorescent staining: The fluorescent antibody method. *Bact. Rev.* **25**, 49—76 (1961).
- BOHLE, A., H.-J. KRECKE, H. KLEINMAIER u. K. GOERGEN: Über die tierexperimentelle Glomerulonephritis unter besonderer Berücksichtigung der sog. Cavelti-Nephritis. *Arch. Kreisl.-Forsch.* **21**, 245—295 (1954).
- BOYDEN, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.* **93**, 107—120 (1951).
- COCHRANE, CH. G.: La technique des anticorps fluorescents. Applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus. *Ann. Inst. Pasteur* **99**, 329—349 (1960).
- COONS, A. H.: Antibodies and antigens labelled with fluorescein. *Schweiz. Z. Path.* **22**, 693—697 (1959).
- FREUND, J.: Sensitization with organ specific antigens and the mechanism of enhancement of the immune responses. *J. Allergy* **28**, 18—29 (1957).
- GRABAR, P.: In: *Immunopathologie in Klinik und Forschung* von P. MIESCHER u. K. O. VORLAENDER, 2. Aufl., S. 1—61. Stuttgart: Georg Thieme 1961.
- , et P. BURTIN: Analyse immuno-électrophorétique. Paris: Masson & Cie. 1960.

- HAFERKAMP, O.: Die Immunoparotitis im Tierexperiment. *Verh. Dtsch. Ges. Innere Med.* **67**. Tagg, 722—726 (1962).
- HEILMEYER, L. u. W. MÜLLER: Die autoantikörperbedingte Thyreoiditis. *Dtsch. med. Wschr.* **85**, 701—706 (1960).
- HERRMANS, J.: Les globulines sériques du système gamma. Paris: Masson & Cie. 1960.
- HITZIG, W. H.: Praktische und theoretische Ergebnisse neuerer Bluteiweißuntersuchungen. *Schweiz. med. Wschr.* **90**, 4449 (1960).
- HOENIG, V., et J. HOENIGOVA: Hémagglutination des hématies tannées. *Presse méd.* **1956**, 1639.
- ITO, Y.: Biochemical studies on salivary gland hormone. *Endocr. jap.* **1**, 1—50 (1954).
- JÄRVI, O.: Über die Einwirkung verschiedener Vitaminmangelzustände auf die Speichel-drüsen des Meerschweinchens und der Ratte und auf die Glandula orbitalis externa der Ratte sowie Beobachtungen über den normalen Bau dieser Drüsen. *Ann. Acad. Sci. fenn. A* **49**, Nr 3, 1—87 (1938).
- JONES, B. R.: Lacrimal and salivary precipitating antibodies in Sjögren's syndrome. *Lancet* **1958 I**, 773—776.
- KERSTING, G., u. E. PETTE: Die experimentelle Polyneuritis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **179**, 333—352 (1959).
- KLEIN, P., u. P. BURKHOLDER: Ein Verfahren zur fluoreszenzoptischen Darstellung der Komplementbindung und seine Anwendung zur histo-immunologischen Untersuchung der experimentellen Nierenanaphylaxie. *Dtsch. med. Wschr.* **45**, 2001—2004, 2009 (1959).
- KRACHT, J.: Speicheldrüsenatrophie durch Parotin. *Frankfurt. Z. Path.* **70**, 507—512 (1960).
- LETTERER, E.: Zur Deutung der Masugi-Nephritis als allergisch-hyperergisches Phänomen. *Dtsch. med. Wschr.* **78**, 512—514 (1953).
- Das pathologisch-anatomische Bild allergischer Vorgänge. *Regensburg. Jb. ärztl. Fortbild.* **8**, 353—359 (1960).
- LOUIS, C. J.: The significance of the cell type in the fluorescein-globulin staining of tissues. *Brit. J. Cancer* **12**, 537—546 (1958).
- MASUGI, M.: Über das Wesen der spezifischen Veränderungen der Niere und der Leber durch das Nephrotoxin bzw. das Hepatotoxin. *Beitr. path. Anat.* **91**, 82—112 (1933).
- MCCABE, B. F.: The evidence for an auto-immune mechanism in MIKULICZ's disease. *Laryngoscope (St. Louis)* **71**, 396—403 (1961).
- MELLORS, R. C., J. ARIAS-STELLA, M. SIEGEL and D. PRESSMAN: Analytical Pathology. II. Histopathologic demonstration of glomerular localizing antibodies in experimental glomerulonephritis. *Amer. J. Path.* **31**, 687—715 (1955).
- MORE, H. R., u. D. WAUGH: Diffuse glomerulonephritis product in rabbits by massive injections of bovine serum γ -globulin. *J. exp. Med.* **89**, 541—553 (1949).
- OGATA, T.: The internal secretion of salivary gland. *Endocr. jap.* **2**, 1—44 (1955).
- PFEIFFER, E. F., H. DITSCHUNEIT, K. FEDERLIN, J. MOSLER, R. OHEBSCHALON u. W. SAND-RITTER: Immuno-elektrophoretische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an der durch Parabiose übertragenen experimentellen Glomerulonephritis der Ratte. *Klin. Wschr.* **38**, 611—613 (1960).
- RAUCH, S.: Die Speicheldrüsen des Menschen. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- RIGGS, J. L., R. J. SEIWALD, J. H. BURCKHALTER, C. M. DOWNS and T. G. METCALF: Iso-thiocyanat compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Amer. J. Path.* **34**, 1081—1097 (1958).
- ROITT, M. H., and D. DONIACH: Thyroid auto-immunity. *Brit. med. Bull.* **16**, 152—158 (1960) (Lit.).
- SCHMIDT, E. S. G.: Funktionelle Histologie der Glandula orbitalis externa. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **65**, 377—396 (1959).
- SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie, 2. Aufl. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1955.
- SEIFERT, G., u. G. GEILER: Vergleichende Untersuchungen der Kopfspeichel- und Tränen-drüsen zur Pathogenese des Sjögren-Syndroms und der Mikulicz-Krankheit. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 401—424 (1957).
- SEIFERT, G.: Über Spontanveränderungen der großen Kopfspeicheldrüsen bei Laboratoriumstieren. *Beitr. path. Anat.* **123**, 299—332 (1960).

- SHEPHERD, W. E., E. LIPINSKI and H. E. TAYLOR: Experimental thyroiditis. *Lancet* **1960**, 739—741.
- TAKIZAWA, N.: A pathological research on the internal secretion of the salivary glands. *Acta path. jap.* **4**, 129—166 (1954).
- TERPLAN, K. L., E. WITEBSKY, N. R. ROSE, J. R. PAIN and R. W. EGAN: Experimental thyreoiditis in rabbits, guinea pigs and dogs, following immunization with thyroid extracts of their own and of heterologous species. *Amer. J. Path.* **36**, 213—239 (1960) (Lit.).
- TROTTER, W. R., W. BELYAVIN and A. WADDAMS: Precipitating and complement-fixing antibodies in HASHIMOTO's disease. *Proc. royal Soc. Med.* **50**, 961—970 (1957).
- VORLAENDER, S., u. K. O., u. H. LÜCHTRATH: Versuche zur künstlichen Lokalisation eines tuberkulösen Infektes auf die Ratteniere. *Klin. Wschr.* **34**, 1069—1070 (1956).
- WIEDEMANN, E.: Neue Zellensätze für Elektrophoresemessungen und kleinpräparative Elektrophoresevereuche. *Helv. chem. Acta* **31**, 2044—2045 (1948).

Priv.-Doz. Dr. O. HAVERKAMP,
Oberassistent des Pathologischen Instituts der Universität Bonn, Bonn-Venusberg