

Lymphatisches Gewebe und Antikörperbildung im Langzeitversuch

K. E. SCHENK und U. GROSS*

Institut für Pathologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. W. Maßhoff)

Eingegangen am 13. Mai 1969

The Lymphatic System and Antibody Formation in Chronic Experiments

Summary. We injected mice with human serum once or several times and investigated the morphological changes in the lymphatic system and the formation of antibody for 70 days. As to its cellular composition, the antibody-forming tissue reacted in two phases. The formation of antibody was also biphasic. Microscopically in the first stage the number of small lymphocytes diminished and the number of large lymphocytes, small reticulum cells and lymphatic nodules increased. In the second phase, there was an increase in the number of large reticulum cells, immature plasma cells and mature plasma cells.

The extent of cellular reaction depended on the dose and on the type of substance injected. The time course of the two phases depended on the method of application.

The behaviour of these two phases is discussed. The conclusions reached are that the different clinical pictures of immune responses are derived from one type of cellular reaction in lymphatic tissue.

Zusammenfassung. Die morphologischen Veränderungen des lymphatischen Systems und die Antikörperproduktion wurden bei Mäusen nach ein- und mehrmaliger Antigenzufuhr (Humanserum) über einen Zeitraum von 70 Tagen untersucht.

Das lymphoretikuläre Gewebe reagiert hinsichtlich seiner cellulären Zusammensetzung auf antigene Stoffe biphasisch. Dem entspricht auch eine Antikörperbildung in zwei Phasen. Das gewebliche Bild der ersten Reaktionsphase ist gekennzeichnet durch den Verlust kleiner Lymphocyten bei gleichzeitiger Zunahme großer Lymphocyten und kleiner Retikulumzellen sowie durch eine Vergrößerung und Vermehrung von Sekundärfollikeln. Die zweite Phase ist durch die Zunahme von großen Retikulumzellen, Plasmazellvorstufen und reifen Plasmazellen bestimmt.

Das Ausmaß der cellulären Reaktion ist von Art und Dosis der zugeführten Substanz abhängig, der zeitliche Ablauf beider Phasen jedoch von der Applikationsweise. Es wird das Verhalten dieser beiden Phasen bei verschiedenen immunologischen Reaktionen diskutiert und festgestellt, daß den in ihrem Erscheinungsbild unterschiedlichen Immunantworten ein einheitlicher Reaktionstyp des lymphatischen Systems zugrunde liegt.

Das für die Antikörperbildung wichtige lymphatische System erfährt nach Applikation antigenen Stoffe bestimmte Verschiebungen im Zellbestand, in deren Mittelpunkt die Neubildung retikulärer und plasmacellulärer Elemente stehen (Sprinz, 1961; Congdon, 1962 und 1964; Gusman, 1965; Mahnke und Krug, 1966; Han, 1967; Schenk und Manskopf, 1968). Diese morphologisch erwiesene antigenbedingte Reaktion des lymphoretikulären Gewebes haben wir hinsichtlich ihres Ablaufes und Ausmaßes in einem langfristigen Versuch unter verschiedenen Bedingungen zu erfassen und zugleich die Frage zu überprüfen versucht, welche

* Für die technische Mitarbeit danken wir Frl. B. Hattwig und Herrn G. Heinze.

Beziehungen zwischen den gestaltlichen Veränderungen in Lymphknoten und Milz und der jeweiligen Antikörperbildung bestehen, ferner ob einer unterschiedlichen Immunantwort eine bestimmte Reaktionsweise des lymphatischen Systems entspricht.

Beobachtungsgut und Methode

Mäusen wurde Antigen (Humanserum) einmalig oder fortlaufend subcutan verabfolgt und danach das Verhalten der dem Injektionsort zugehörigen und der übrigen Lymphknoten sowie der Milz über einen Zeitraum von 70 Tagen histologisch kontrolliert. Gleichzeitig wurde die Antikörperbildung und der Verbleib des injizierten Antigens in Serum, Lymphknoten und Milz immunoelektrophoretisch kontrolliert.

Für den Versuch wurden 130 männliche weiße Mäuse verwendet (Stamm NMRI, Gewicht 24–26 g, Alter etwa 9 Wochen; Lieferant Dr. E. Hagemann, Bösingfeld, Lippe). Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen (Raum und Temperatur) gehalten, erhielten Standard-trockenfutter der Firma Latz und Wasser ad lib.

10 Tiere dienten als Kontrollen. Die übrigen Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt. Bei der ersten Gruppe wurde einmalig 1,5 ml Humanserum (Blutgruppe ORh) subcutan in die caudale Rückenpartie injiziert. Bei der zweiten Gruppe wurde vom 1.—15. Versuchstag in gleicher Weise täglich 0,25 ml verabfolgt, vom 16. Tag bis zur Tötung wurden 3 Injektionen pro Woche vorgenommen. Die wöchentliche Gesamtdosis war während des gesamten Versuches gleich groß.

5–8 Tiere jeder Gruppe wurden 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 50 und 70 Tage nach Versuchsbeginn getötet. Vor der Tötung wurde den narkotisierten Tieren nach Thorakotomie für die serologische Untersuchung mit einer paraffinierten Glaskapillare Blut aus dem Herzen entnommen. Die Bauchwand-, axillären und paraaortalen Lymphknoten sowie die Milz wurden sorgfältig präpariert, zum Teil in Susa fixiert und nach Paraffineinbettung histologisch verarbeitet.

Für die immunoelektrophoretische Untersuchung wurden Verdünnungen (auf $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$) von Serum sowie Totalhomogenisaten von Lymphknoten und Milz hergestellt und diese auf einer 9×12 cm großen mit einer 2,5 mm dicken Schicht eines 1,5%igen Agargels (Spezialagar Noble, Difco) bedeckten Glasplatte unter Verwendung von Veronalnatriumacetatpuffer (pH 8,6) unter gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Als Antiserum zum Nachweis des Humanserums in Serum bzw. Organen der Maus diente ein Pferde-Anti-Humanserum (Behring-Werke), zur Charakterisierung der Eiweißfraktionen des Mäuseserums ein Kaninchen-Anti-Mäuseserum (Behring-Werke). Zum Nachweis der von der Maus gegen Humanserum gebildeten Antikörper wurde gepooltes Mäuseserum bzw. homogenisiertes Organgewebe der Tiere dem elektrophoretisch aufgetrennten Humanserum zugesetzt. Die Diffusionszeit der Antiseren betrug jeweils 24 Std bei Zimmertemperatur. Danach 7tägiges Waschen in isotoner NaCl-Lösung, nach Trocknung Färbung mit Amidoschwarz.

Ergebnisse

1. Morphologische Befunde

a) Regionale Lymphknoten nach einmaliger Antigeninjektion. Die regionalen Lymphknoten zeigen bei erhaltener Grundstruktur eine charakteristische celluläre Abwandlung. Schon 24 Std nach Antigenezufuhr sind in der äußeren Rindenzone die kleinen Lymphocyten deutlich an Zahl verringert, gleichzeitig hat eine Vermehrung der kleinen Retikulumzellen und großen Lymphocyten eingesetzt. Nach 48 Std hat auch in den inneren hilusnahen Markbereichen die Zahl von kleinen Lymphocyten abgenommen, große Lymphocyten und kleine Retikulumzellen sind reichlich aufgetreten. Diese Zellbewegung nimmt bis zum 10. Tag ständig zu.

Während dieser Zeit enthält die äußere rindennahe Mark- und die innere Rindenzone mehr Lymphocyten als die übrigen Anteile. Die Follikel lassen markwärts einen halbmondförmigen Lymphocytenkranz erkennen, während die dem

Randsinus zugekehrte Seite nahezu frei von Lymphocyten ist. Vom 15. Tag an sind die kleinen Lymphocyten in Rinde und Mark wieder etwas zahlreicher vertreten, große Lymphocyten und kleine Retikulumzellen dagegen in etwas geringerer Zahl nachweisbar. Die hilusnahe Markzone enthält weiterhin sehr wenig kleine Lymphocyten. Nach dem 50. Tag entspricht die Zahl der kleinen Lymphocyten und der kleinen Reticulumzellen in Mark und Rinde etwa jener der Kontrolltiere, die großen Lymphocyten sind jedoch noch immer vermehrt.

Bei dieser Zellverschiebung findet sich am 10. Tag eine geringe bis zum 30. Tag anhaltende Vermehrung von Übergangszellen, die danach an Zahl wieder abnehmen. Plasmazellen treten um den 15. Tag deutlich hervor, ihre Zahl ist jedoch sehr gering und nach dem 50. Tag rückläufig. Insgesamt bleiben aber die Elemente der plasmacellulären Reihe zahlreicher vertreten als bei den Kontrolltieren. Dem Verhalten der plasmacellulären Elemente geht jenes der großen Retikulumzellen etwa parallel.

Die Follikelzentren erfahren bereits 48 Std nach Antigenzufuhr eine deutliche Akzentuierung. Vom 5. Tag an setzt eine fast sprunghafte Vergrößerung und Neubildung der Sekundärfollikel ein. Diese enthalten vorwiegend kleine und mittelgroße retikuläre Zellen, die in zunehmendem Maße Mitosen aufweisen und auch Kerentrümmer enthalten. Am 15. Tag ist die stärkste Entwicklung der Follikel erreicht, danach setzt langsam eine Rückbildung ein, jedoch sind am Versuchsende noch reichlich Sekundärknötchen nachweisbar (Abb. 1—3).

Bemerkenswert ist das Verhalten der Sinus und postcapillären Venen. Vor allem die Marksinus der Lymphknoten sind bereits nach 24 Std und stärker nach 72 Std weitgestellt und enthalten in etwa der Lymphocytenabnahme im lymphoretikulären Gewebe entsprechend reichlich Lymphocyten. Die postcapillären Venen erscheinen zunächst unverändert, zeigen aber vom 10. Tag an meist ein hohes Endothel. Zwischen den Endothelien und auch im Lumen finden sich besonders zwischen dem 15. und 30. Tag vermehrt Lymphocyten. Etwa zu dieser Zeit setzt bemerkenswerter Weise auch die Repopulation der Lymphknoten mit Lymphocyten ein.

b) Regionale Lymphknoten nach mehrfacher Antigeninjektion. In dieser Versuchsgruppe zeigen die Lymphknoten eine grundsätzlich ähnliche Zellverschiebung wie jene nach einmaliger Antigenzufuhr, jedoch sind Ausmaß und Ablauf der Reaktion anders. Auch bei dieser Gruppe beginnt die Reaktion mit einer zahlenmäßigen Abnahme der kleinen Lymphocyten; die Vermehrung von großen Lymphocyten und kleinen Reticulumzellen sowie die Bildung und Zunahme der Sekundärfollikel sind jedoch viel stärker ausgeprägt. Diese Veränderungen sind erst nach 30 Tagen rückläufig. Die nach einmaliger Antigenstimulierung etwa nach dem 15. Tag zu beobachtende Vermehrung von großen Reticulumzellen, Plasmazellvorstufen und reifen Plasmazellen setzt bei fortlaufender Antigenzufuhr bereits am 5. Tag ein, ist um ein Vielfaches stärker und hält bis zum Versuchsende an. Marksinus und postcapilläre Venen verhalten sich wie bei der ersten Gruppe (Abb. 1—3).

c) Die injektionsfernen Lymphknoten. In den vom Injektionsort entfernten Lymphknoten ist die Reaktion sowohl nach einmaliger als auch fortlaufender Antigenzufuhr ähnlich biphasisch wie in den regionären Lymphknoten. Die Veränderungen setzen jedoch etwas später erst nach 48 Std ein. Während die Zellver-

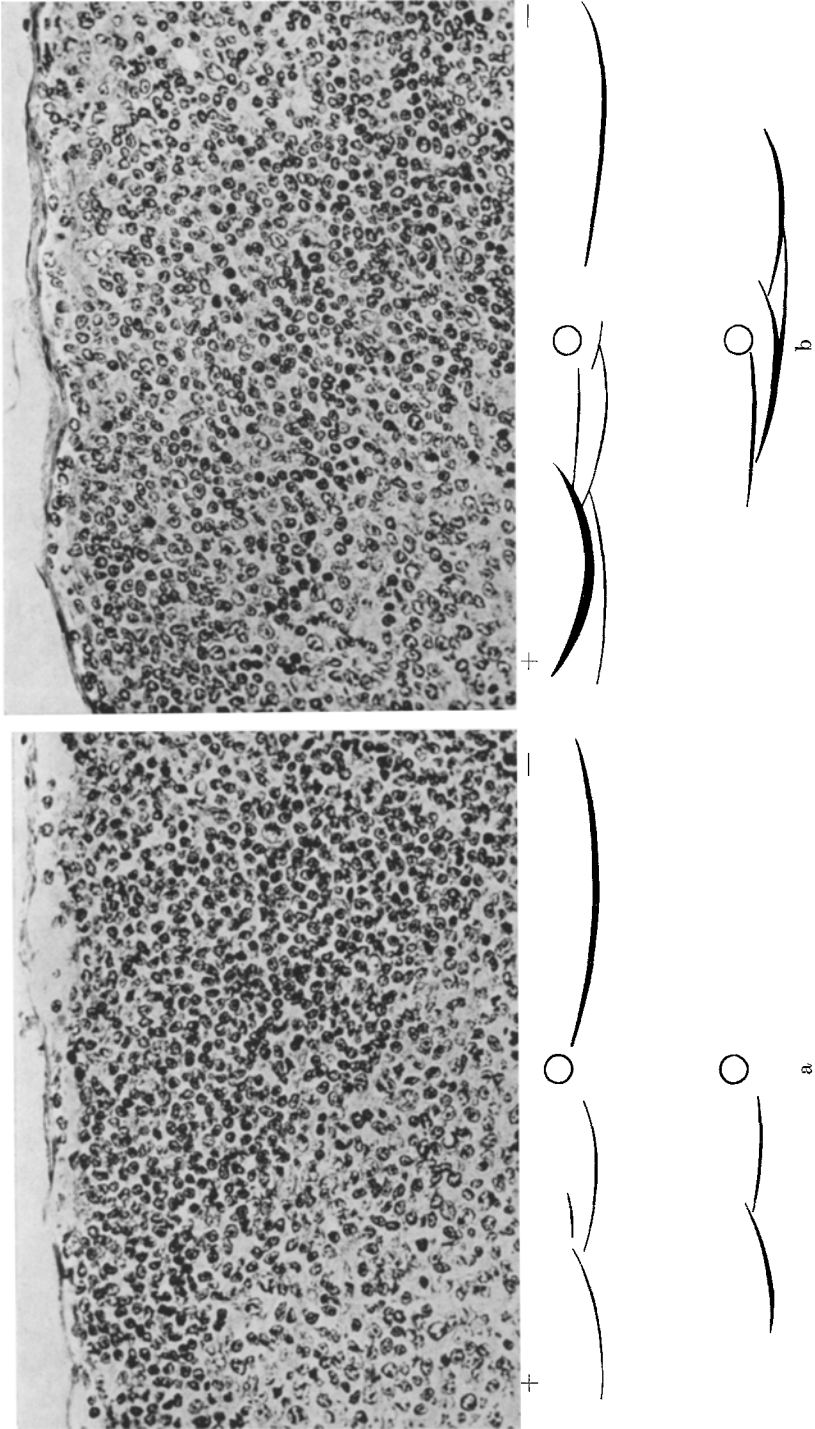


Abb. 1 a u. b. Lymphknoten (HE, Vergr. 400fach) und Immunelektrophorese (Serum) 15 Tage nach einmaliger (a) und fortlaufender (b) Antigeninjektion. Jeweils links unten im Bild Keimzentrum, in der Mitte lymphocytärer Randsaum des Follikels, oben Marginalsinus. — In (a) beginnt bereits die Repopulation mit kleinen Lymphocyten (Rückbildung der ersten Reaktionsphase), in (b) noch deutlich ausgeprägte 1. Phase (wenig kleine Lymphocyten). — Immunelektrophorese: Obere Reihe: Fraktionen des injizierten Humanserums. — untere Reihe: Vom Tier gegen Proteine des Humanserums gebildete Antikörper

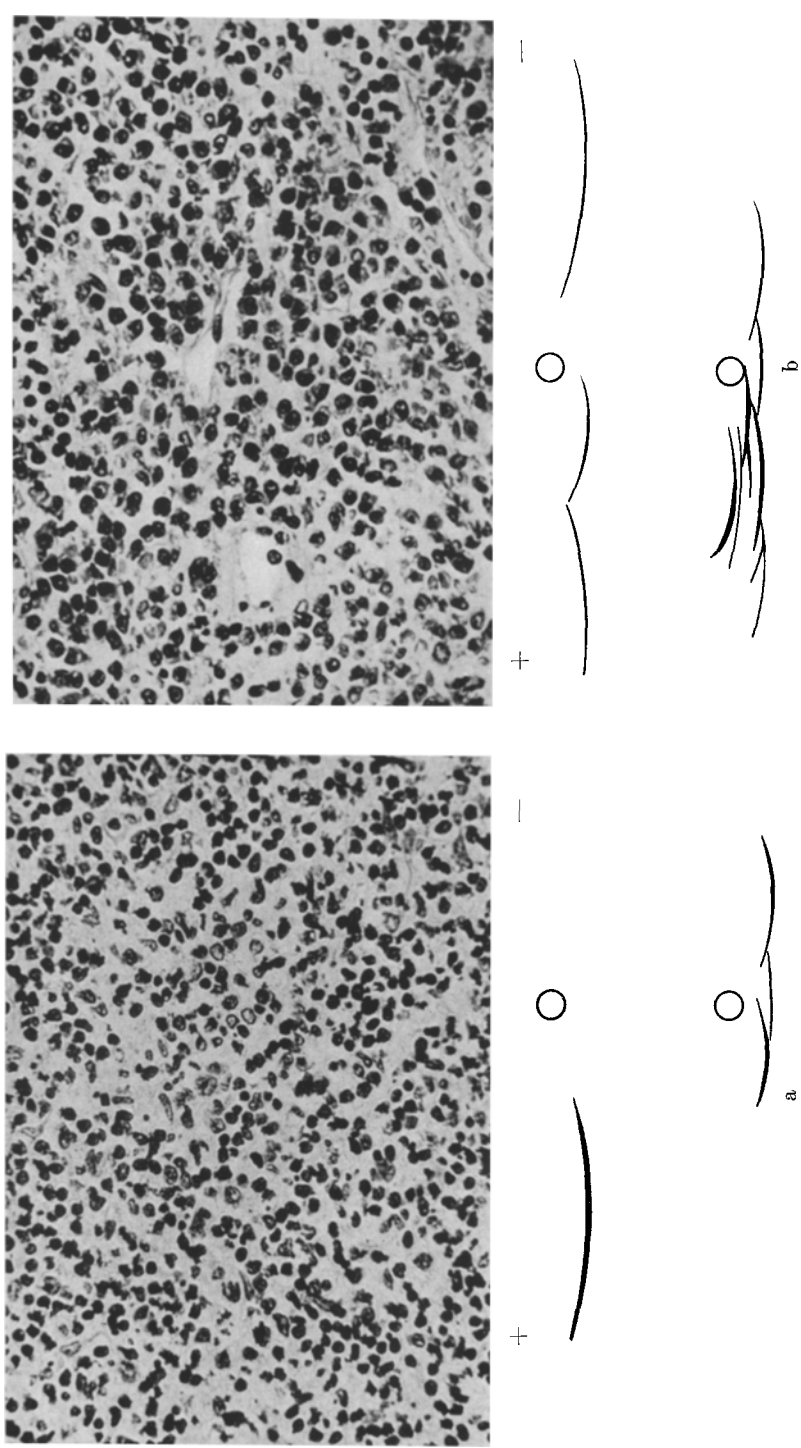
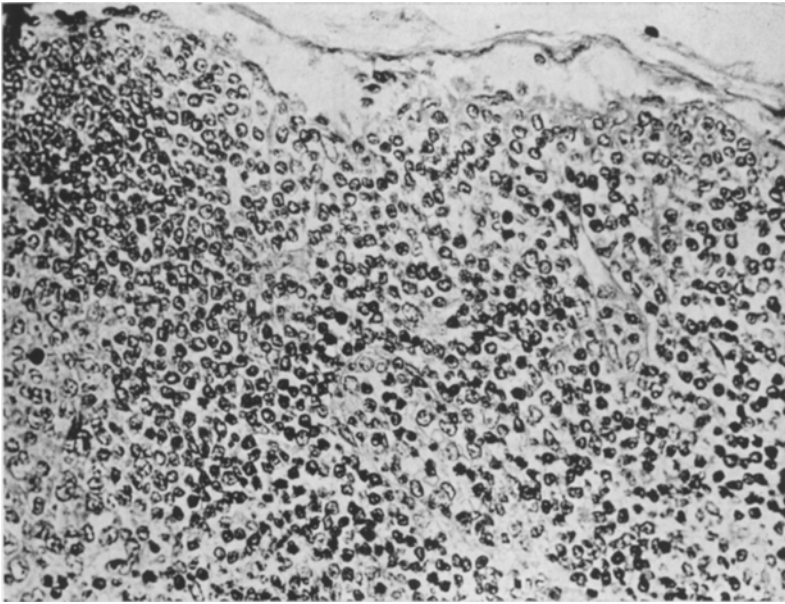
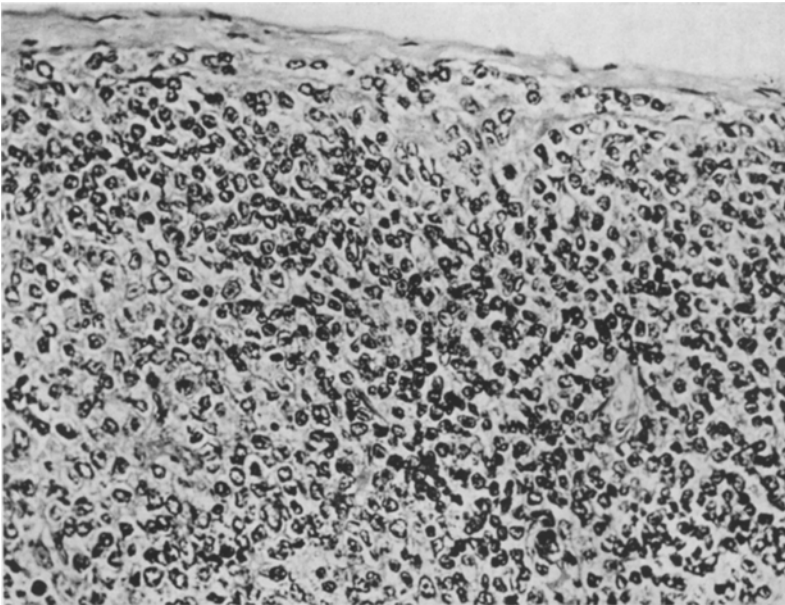


Abb. 2 a u. b. Lymphknoten (HE, Vergr. 500fach, Markausschnitt) und Immunelektrophorese (Serum) 50 Tage nach einmaliger (a) und fortlaufender (b) Antigenezufuhr. — In (b) bestimmt die von Plasmazellen getragene zweite Reaktionsphase das Bild; in (a) bereits weitgehende Rückbildung der 2. Phase. — Immunelektrophorese obere Reihe: Fraktionen des injizierten Humanserums; untere Reihe: Von der Maus gegen Proteine des Humanserums gebildete Antikörper



a



b

Abb. 3 a u. b. Lymphknoten (HE, Vergr. 400fach) 70 Tage nach einmaliger (a) und fortlaufender (b) Antigenzufuhr. Jeweils links unten im Bild Keimzentrum, in der Mitte lymphocytärer Randsaum des Follikels, oben Marginalsinus. Noch deutliche Aktivierung des Lymphknotens in (a), stärkere in (b). — Das Elektrophoresebild des Serums am 70. Tag ist ähnlich dem nach 50 Tagen (vgl. Abb. 2)

schiebung in den regionalen Lymphknoten bevorzugt die Rinde betrifft, ist in den injektionsfernen die Mark- und innere Rindenzone stärker in die celluläre Reaktion einbezogen. Das Ausmaß der durch Lymphocytenverlust und Reticulumzellvermehrung gekennzeichneten ersten Phase ist nach ein- und mehrmaliger Reizung geringer, dagegen die zweite am 50. Tag ihr Maximum erreichende und durch plasmacelluläre Elemente ausgezeichnete Phase etwas stärker als in den regionalen Lymphknoten.

d) Milz nach einmaliger Antigeninjektion. Auch die Milz zeigt einen zweiphasischen Reaktionsablauf, der sich jedoch im Vergleich zu jenem der Lymphknoten etwas anders verhält. Nach einmaliger Reizung beginnt die erste Phase in der Milz erst nach etwa 48 Std mit einem in den folgenden Tagen zunehmenden Schwund kleiner Lymphocyten in den Follikeln bei gleichzeitiger Vermehrung von großen Lymphocyten und kleinen Reticulumzellen. Am 5. Tag setzt eine fast sprunghafte Vergrößerung der Follikelzentren ein. Gleichzeitig ist die im normalen Organ helle und wenig zellhaltige perifollikuläre Zone nicht mehr scharf abgegrenzt, da offenbar vom Follikel ausgehend nach allen Richtungen Lymphocyten in die Nachbarschaft auszuwandern scheinen. Außerdem fällt in den Pulpasträngen der hohe Gehalt an großen Lymphocyten und verschieden großen Reticulumzellen auf. Diese Reaktion ist nach 30 Tagen deutlich, nach 50 Tagen völlig zurückgebildet. Lediglich zwischen dem 15. bis 30. Tag sind die Übergangszellen gering vermehrt, im Übrigen treten die für die zweite Phase in den Lymphknoten charakteristischen Zellen kaum hervor.

e) Milz nach mehrfacher Antigeninjektion. Unter diesen Bedingungen sind die Zellverschiebungen in der Milz während der ersten Phase besonders deutlich. Die zellige Reaktion der zweiten Phase setzt bereits nach 5 Tagen ein, verläuft allerdings langsamer als in den Lymphknoten, erreicht nach 50 Tagen ihr Maximum und ist offenbar erst am Ende des Versuches rückläufig.

Die für die Mäusmilz charakteristischen Riesenzellen beteiligen sich erwartungsgemäß nicht an der Reaktion.

Aus der systematischen Untersuchung ergibt sich ein charakteristisches auf eine biphasische Reaktion hinweisendes Verhalten des lymphoretikulären Gewebes. Nach ein- oder mehrmaliger Antigeninjektion erfolgt mit quantitativer Abstufung in der ersten Phase eine zahlenmäßige Verminderung der kleinen Lymphocyten bei gleichzeitiger Zunahme von großen Lymphocyten, kleinen Reticulumzellen und einer Vergrößerung und Vermehrung der Follikel. Die zweite Phase ist durch eine Zunahme von großen Reticulumzellen, Plasmazellvorstufen und reifen Plasmazellen gekennzeichnet. Nach einmaliger Antigenezufuhr laufen beide Phasen im wesentlichen nacheinander ab, bei fortlaufender Stimulierung überschneiden sie sich breit infolge eines früheren Einsetzens der zweiten Phase.

2. Immunelektrophoretische Befunde

a) Antikörperbildung nach mehrfacher Antigeninjektion. Nach fortlaufender Zufuhr von Humanserum lassen sich im Mäuseserum am 10. Tag Antikörper gegen 4 Fraktionen des Humanserums aus dem Alpha- Beta- und Gammabereich nachweisen. Soweit die semiquantitative Methode diese Aussage erlaubt, nehmen die Antikörper bis zum 15. Tag zu und fallen nach dem 30. Tag wieder ab. Nach 30 Tagen werden aber weitere Antikörper nachweisbar, so daß zwischen dem 50. bis

70. Tag Antikörper gegen 8 Proteine aller Fraktionsbereiche des Humanserums vorliegen (Abb. 1—2). Ein ähnliches Verhalten zeigen auch Milz, regionale und injektionsferne Lymphknoten, wenn auch mit einer gewissen zeitlichen Verschiebung. In den Organen ist die Zahl der nachweisbaren Antikörper allerdings geringer als im Serum. Die Milz weist bereits am 5. Tag einen Antikörper gegen eine Fraktion, bis zum 30. Tag solche gegen drei, nach 50 Tagen gegen 5 Fraktionen des Humanserums aus dem Albumin-, Alpha- und Betaglobulinbereich auf. Am Versuchsende lassen sich jedoch nur noch Antikörper gegen eine Serumfraktion feststellen.

In den regionalen Lymphknoten befinden sich am 10. Tag Antikörper gegen 3, am 15. Tag gegen 2 Proteine des Humanserums und am 30. Tag nur noch gegen ein einziges. Vier Antikörper verschiedener Spezifität treten jedoch nach 50 Tagen auf. Insgesamt sind nie mehr als vier verschiedene Antikörper gegen Fraktionen aus dem Alpha-, Beta- und Gammabereich des applizierten Humanserums zu ermitteln. Nach 70 Tagen ist nur noch ein Antikörper gegen ein Alpha-Globulin feststellbar.

In den injektionsfernen Lymphknoten sind die Verhältnisse gleichartig. Auch hier sind insgesamt vier verschiedene Antikörper gegen Fraktionen des Humanserums nachweisbar. Im Gegensatz zu den regionalen Lymphknoten lassen sich am Versuchsende jedoch noch drei verschiedene Antikörper feststellen.

b) *Antikörperbildung nach einmaliger Antigeninjektion.* Nach einmaliger Injektion von Humanserum ist der Antikörpergehalt in Serum und Organen der Tiere viel geringer als bei der vorgenannten Versuchsgruppe. Bei einem Vergleich tritt der Ablauf der Antikörperproduktion viel weniger deutlich zutage.

So ist am 5. Tag im Serum ein Antikörper gegen eine Alphafraktion des Humanserums aufgetreten. Im weiteren Verlauf sind bis zum 70. Tag Antikörper gegen drei weitere Serumfraktionen entstanden, und zwar in den ersten 2 Wochen gegen ein Protein im Albuminbereich und ein Alphaglobulin, später gegen jeweils ein Protein des Beta- und Gammabereiches (Abb. 1—2).

Die regionalen Lymphknoten enthalten einzelne Antikörper zwischen dem 10. und 30. Tag, die injektionsfernen und die Milz zwischen dem 15. und 70. Tag.

c) *Nachweis des applizierten Humanserum.* Von dem injizierten Humanserum sind bei beiden Tiergruppen nur 5 Fraktionen aus allen Bereichen in Serum, Lymphknoten und Milz zu identifizieren. Bis zum 15. Tag hat die Menge der injizierten Proteine stark abgenommen, während danach der Abbau offenbar langsamer verläuft. Nach 70 Tagen lassen sich bei den Tieren beider Versuchsgruppen noch Humanalbumin und Gammaglobulin in Serum und Milz nachweisen (Abb. 1—2).

Im Serum beider Versuchsgruppen treten zum Zeitpunkt der stärksten Antikörperproduktion in dem Beta- und Gammabereich einzelne Proteinfractionen zusätzlich oder verstärkt in Erscheinung.

Besprechung

Wenn man die Veränderungen des lymphatischen Systems nach einmaliger Antigenezufuhr als einfache und die nach wiederholter Antigenstimulierung als gesteigerte immunologische Reaktion auffaßt, so kann nach unseren Befunden durchaus ein gesetzmäßig erscheinendes Verhalten des lymphoretikulären Gewebes an-

genommen werden. Der Reaktionsablauf läßt hierbei zwei Phasen erkennen. Die erste Phase ist durch Abnahme der kleinen Lymphocyten, Vermehrung von großen Lymphocyten und kleinen Reticulumzellen sowie durch Vergrößerung und Vermehrung von Follikeln, die zweite Phase durch eine Zunahme von großen Reticulumzellen, Plasmazellvorstufen und typischen Plasmazellen gekennzeichnet. Nach einmaliger Antigeninjektion steht die Zellverschiebung der ersten Phase im Vordergrund, während die etwa am 15. Tag nach Versuchsbeginn einsetzende 2. Phase nur gering hervortritt. Dagegen wird das Bild bei fortlaufender Antigeninjektion durch eine besonders starke und bereits frühzeitig einsetzende Plasmazellneubildung der zweiten Phase bestimmt.

In den injektionsfernen Lymphknoten setzt die celluläre Reaktion später ein als in den regionalen Lymphknoten. Die Zellverschiebung beginnt in den injektionsfernen Lymphknoten im Mark, im Gegensatz dazu in den regionalen frühzeitig in der randsinusnahen Rinde. Dieser Unterschied könnte durch die unterschiedliche Anflutung des Antigens bedingt sein, das in dem einen Fall auf dem Blutweg, in dem anderen auf dem Lymphweg herangeführt wird. Bemerkenswert ist das deutlich stärkere Hervortreten der zweiten Phase. Alle Reifungsstadien der Plasmazellen sind besonders bei fortlaufender Antigenzufuhr bis über den 70. Tag hinaus zahlreicher vertreten als in den regionalen Lymphknoten. Ähnliches hat auch Cottier (1963) beobachtet.

Auch in der Milz setzt die Reaktion verlangsamt ein. Die Follikel verhalten sich analog den Lymphknoten, gleichzeitig proliferieren die Reticulumzellen in der roten Pulpa ziemlich stark. Nach ein- und mehrmaliger Antigengabe ist die zweite plasmacelluläre Phase in der Milz geringer als in den Lymphknoten, was auch den Befunden von Gusman (1965) entspricht.

Diese Reaktionsweise des lymphatischen Systems ist nun keineswegs für eine Stimulierung durch Serumeiweiß charakteristisch, vielmehr können ganz verschiedene Substanzen, z. B. reine Proteine und Zellen, gleichartige Veränderungen auslösen.

So hat Congdon (1962 und 1964) bereits 6 Std nach Injektion von Schaferythrocyten in den Milzfollikeln einen Lymphocytenschwund mit nachfolgender Proliferation von Reticulumzellen und eine Vergrößerung der Reaktionszentren beobachtet. Die in den folgenden Tagen zunächst zunehmende Zellverschiebung hat sich einige Wochen später zurückgebildet. Weitergehend entsprechende Ergebnisse sind nach Applikation von Milzzellen (Howard, 1961), von Diphtherie-, Keuchhusten-, Polio- oder Milzbrandvaccinen bzw. verschiedenen Bakterien (Nossal, 1959; Sprinz, 1961; Gusman, 1965), von Typhusvaccinen (Mahnke und Krug, 1966), Serum (Masshoff u. Mitarb., 1954—1967), Gammaglobulin (Johnson, 1967) aber auch Corticotropin (Congdon, 1964) oder von Paraffinöl in Form des kompletten und inkompletten Freundschens Adjuvans (Schenk und Manskopf 1968) erzielt worden.

Da die Beobachtungszeit bei den vorgenannten Experimenten gewöhnlich nur wenige Tage bis Wochen betragen hat, ist in erster Linie der Ablauf der ersten Phase mit dem Schwund kleiner Lymphocyten und der Proliferation von Reticulumzellen erfaßt worden. Jedoch weisen die unter verschiedenen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse bereits darauf hin, daß sich im lymphatischen Gewebe im Prinzip ein einheitlicher Reaktionsmechanismus vollzieht.

Von besonderer Bedeutung erscheint die Verminderung der kleinen Lymphocyten in Lymphknoten und Milz zu Beginn der ersten Phase, die Congdon (1964) bereits 6 Std, wir 24 Std nach Antigenapplikation beobachtet haben.

Als Ursache für diesen Lymphocytenverlust kommen ein Untergang, eine Umwandlung oder das Auswandern von Zellen aus dem lymphatischen Gewebe in Betracht. Hinweise für einen auffälligen Zellzerfall haben wir während der Beobachtungszeit nicht gefunden.

Die Möglichkeit der Umwandlung von kleinen Lymphocyten in große Lymphocyten und auch in retikuläre Elemente muß auf Grund zahlreicher neuerer Beobachtungen vor allem in Lymphocytenkulturen unter Zusatz von Phytohämagglutinin oder von verschiedenen Antigenen durchaus für möglich gehalten werden (Bach, 1963; Elves, 1963; Elrod, 1965; Gough, 1965; Sell et al., 1965; Fischer und Gropp, 1966; Gropp und Fischer, 1966; Boll, 1968; Ling, 1968).

Aus unseren Versuchen geht eindeutig hervor, daß dem Schwund kleiner Lymphocyten in Lymphknoten und Milz regelmäßig eine Vermehrung von großen Lymphocyten und kleinen Reticulumzellen parallel geht. Diese Zellen können durch Neubildung aus den Stammzellen oder aber auch durch Umwandlung aus kleinen Lymphocyten entstanden sein.

Die beachtliche Füllung der Intermediär- und Marksinus in den Lymphknoten mit Lymphocyten zur Zeit der stärksten Lymphocytenverarmung und der vermehrte Lymphocytengehalt in den postcapillären Venen während der Repopulation des lymphatischen Gewebes mit kleinen Lymphocyten erscheint bemerkenswert. Da sich im Blut eine Vermehrung von Lymphocyten einige Tage nach Antigenapplikation feststellen läßt (Han, 1967; Schirop, 1968), ist wohl der Schluß berechtigt, daß im Verlauf der Reaktion Lymphocyten aus dem lymphoretikulären Gewebe in das Blut ausgeschwemmt werden, ferner daß die Rezirkulation für die Wiederbesiedlung der Lymphknoten mit Lymphocyten eine Rolle spielen kann.

Von diesen Beobachtungen ausgehend, ist die Frage zu erörtern, ob die aus Lymphknoten und Milz auswandernden Zellen etwa für die Entwicklung der von lymphoiden und monocytären Zellen getragenen Immunreaktion vom Spättyp von Bedeutung sind.

Bekanntlich kann die verzögerte Immunantwort durch kleine Dosen der Mehrzahl der antigen wirkenden Stoffe ausgelöst werden. Man darf hierbei davon ausgehen, daß unterschiedlich große Mengen eines stimulierenden Stoffes in Lymphknoten und Milz grundsätzlich gleiche, nur quantitativ abgestufte celluläre Veränderungen hervorrufen (Schenk und Manskopf, 1968). Kleinste Antigenmengen bewirken bereits deutliche morphologische Veränderungen im lymphoreticulären Gewebe, ohne daß ein meßbarer Antikörpertiter im Serum auftritt (Rowley, 1964 und 1965). Jedoch ermöglicht die Injektion solcher minimaler Dosen (z. B. 0,5 µg Ovalbumin) nach einigen Tagen die Auslösung der Spätreaktion. Nach Dosiserhöhung (auf 1—3 µg) wird zusätzlich ein Antikörpertiter im Blut meßbar. Bei weiterer Dosissteigerung wird die Spätreaktion übersprungen, es treten sofort zirkulierende Antikörper auf, d. h. Phänomene vom Typ der Sofortreaktion werden auslösbar (Salvin, 1960; Steffen, 1968). Offensichtlich gibt es fließende Übergänge zwischen beiden immunologischen Typen.

Ein subcutan appliziertes Antigen läßt sich bereits wenige Stunden später in Macrophagen und auch in Lymphocyten der regionalen Lymphknoten nachweisen (Miller und Nossal, 1964; Han, 1967). Es ist daher die Annahme berechtigt, daß die nach einer antigenen Stimulierung in den ersten Stunden und Tagen aus den Lymphknoten ausgeschwemmten Lymphocyten bereits mit dem Antigen Kontakt

und somit eine Prägung zu Immun- bzw. antikörperbildenden Zellen erfahren haben könnten. Da die Zellmarkierung mit radioaktiven Substanzen gezeigt hat, daß der überwiegende Teil der an der Spätreaktion beteiligten lymphocytären Zellen aus dem Blut stammt (Steffen, 1968), ist anzunehmen, daß die nach einer zum Spättyp führenden Antigeninjektion aus Lymphknoten und Milz ausgeschwemmten Zellen wenigstens teilweise die Träger dieser Reaktion sind.

Geht man von einem diphasischen Reaktionsablauf des lymphatischen Systems als Antwort auf die Zufuhr antigener Stoffe aus, so ließe sich damit eine Beziehung der Immunreaktion vom verzögerten Typ zu der ersten mit einer Lymphocytenausschwemmung einhergehenden Phase herstellen.

Es sei hervorgehoben, daß trotz fortlaufender Antigenezufuhr (zweite Versuchsgruppe) in Lymphknoten und Milz die morphologischen Veränderungen der ersten Phase nach 4—5 Wochen rückläufig sind. Da verhältnismäßig geringe Eiweißmengen injiziert wurden, können die nach sehr großen Antigenmengen auftretende Insuffizienz des RES (Benacerraf, 1959) oder ein hypothetischer feed-back Mechanismus bei hohem Antikörpertiter (Neiders, 1962; Rowley, 1965; Dubiski, 1966; Steffen, 1968) nicht als alleinige Ursache angesehen werden. Vielmehr kann es sich hierbei um einen für das lymphatische Gewebe typischen Reaktionsablauf handeln, zumal mit dem Rückgang der ersten Phase ein besonders starkes Hervortreten der zweiten Phase und eine gleichzeitig vermehrte Antikörperbildung zu beobachten sind; eine Limitierung der Zellproliferation bzw. der Antikörperbildungen liegt also keineswegs vor.

Betrachtet man die Antikörperbildung während des diphasischen Reaktionsablaufes im lymphatischen System, so werden in unseren Versuchen bei fortlaufender Antigenezufuhr bis zum 15. Tag Antikörper gegen vier verschiedene Fraktionen des injizierten Humanserums gebildet, die quantitativ vom 30. Tag an zurückgehen. Zu diesem Zeitpunkt treten andere Antikörper gegen weitere Serumproteine auf, so daß nach 70 Tagen Antikörper gegen acht Fraktionen aus dem Albumin-, Alpha-, Beta- und Gammaglobulinbereich nachzuweisen sind. Zu den während der ersten Reaktionsphase aufgetretenen Antikörpern gegen vier Eiweißfraktionen sind somit während der zweiten Phase mit zunehmender Ausbildung von Plasmazellen weitere in ihrer Spezifität anders geartete Antikörper hinzugekommen. Eine gleichartige schubweise erfolgende Produktion von Antikörpern ist von Benedict, 1963; Graves, 1964; Thorbecke, 1967 u. a. beschrieben worden. Wahrscheinlich gehören die frühzeitig auftretenden Antikörper der IgM-Klasse an, während die später erscheinenden vornehmlich der IgG- oder anderen Klassen zuzuordnen sein dürften (Uhr, 1963; Svehay, 1964; Steffen, 1968). Somit werden wahrscheinlich die Antikörper der ersten Phase (IgM-Antikörper) in Lymphocyten oder Reticulumzellen, die der zweiten Phase vornehmlich in Plasmazellen oder ihren Vorstufen gebildet. Diese Annahme deckt sich mit jener von Schoenberg (1965). Zeitlich gesehen geht die Antikörperbildung den cellulären Veränderungen im lymphatischen System parallel, d.h., einem Gipfel der Antikörperbildung entspricht jeweils ein Maximum der Zellreaktion der entsprechenden Phase.

Die biphasische Antikörperproduktion bei fortlaufender Antigenezufuhr ist nach einmaliger Antigengabe nicht ganz so deutlich. Es ist jedoch wichtig, daß auch nach einmaliger Antigeninjektion mehrere Antikörper aber auch noch Eiweißfraktionen des injizierten Humanserums aus dem Albumin- und Gammaglobulin-

bereich nach 70 Tagen in Serum und Milz der Mäuse nachweisbar sind. Die Lymphknoten dieser Tiere sind zu dieser Zeit noch deutlich aktiviert. Über ähnliche Befunde haben McMasters (1954), Garvey und Campbell (1957), Gilden (1963) und Richter (1965) berichtet. Diesen Autoren ist der Antikörper- bzw. Antigennachweis nach Applikation verschiedener Eiweiß- und Bakterienantigene noch nach vielen Monaten gelungen. Die langfristig im Organismus verbleibenden Antigene können also offenbar kontinuierlich eine Antikörperproduktion bzw. spezifische Prägung immunkompetenter Zellen induzieren.

Abschließend ist festzuhalten, daß das lymphoretikuläre Gewebe auf antigene aber auch auf nicht antigene Stoffe wie z. B. Tusche, Trypanblau, Wasser (Masshoff, 1954) oder Paraffinöl (Schenk und Manskopf, 1968) weitgehend gleichartig biphasisch reagiert. Dabei ist die erste Phase durch einen Verlust kleiner Lymphocyten, eine Zunahme großer Lymphocyten und kleiner Reticulumzellen und die Vermehrung und Vergrößerung von Sekundärfollikeln gekennzeichnet, während in der zweiten Phase große Reticulumzellen, Plasmazellvorstufen und reife Plasmazellen gebildet werden. Das Ausmaß dieser cellulären Reaktion ist von Art und Dosis der zugeführten Substanz abhängig, der zeitliche Ablauf der beiden Phasen jedoch von der Applikationsweise.

Bei parenteraler Zufuhr wahrscheinlich nicht antigenen Stoffe (z. B. Paraffinöl) bestimmen Zellveränderungen der ersten Phase das Bild, Plasmazellen treten nicht besonders hervor. Nach einmaliger Antigengabe führt die mit einem meßbaren Antikörpertiter einhergehende Immunreaktion zu einem starken Hervortreten der ersten Phase, während die zweite Phase geringer ausgebildet ist. Beide Phasen überschneiden sich nur wenig, laufen also vornehmlich nacheinander ab. Im Gegensatz hierzu ist bei mehrmaliger Antigenstimulierung die zweite Phase besonders stark ausgebildet und überlappt sich breit mit der ersten. Es wurde bereits angedeutet, daß sich zwischen der ersten Phase der Zellreaktion in Lymphknoten und Milz und dem Auftreten der Immunantwort vom verzögerten Reaktionstyp eine Beziehung herstellen läßt. Dieser Reaktionstyp stellt also wahrscheinlich nur eine bestimmte Form der Auseinandersetzung des lymphoretikulären Gewebes mit einem Antigen dar.

In ihrem Erscheinungsbild unterschiedlichen Immunantworten liegt also ein einheitlicher Reaktionstyp des lymphatischen Systems zugrunde, wobei dem biphasischen Reaktionsmechanismus bei ein- und mehrmaliger Antigengabe, also unter den Bedingungen der Primär- und Hyperimmunantwort, eine gleichfalls in zwei Phasen ablaufende Bewegung der Antikörperproduktion entspricht.

Literatur

- Bach, F., Hirschhorn, K.: Gammaglobulin production by human lymphocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* **32**, 592—595 (1963).
- Benacerraf, B., Sebestyen, M., Schlossman, S.: A quantitative study of the kinetics of blood clearance of P 32 labelled escherichia coli and staphylococci by reticulo-endothelial system. *J. exp. Med.* **110**, 27—48 (1959).
- Benedict, A. A., Brown, J., Hersh, R. T.: The temporal synthesis and some chromatographic and ultracentrifugal characteristics of chicken antibody. *J. Immunol.* **90**, 399—411 (1963).
- Boll, I.: Filmbericht über die Lymphocytenumwandlung. *Europ. Allergiekongr.*, Berlin 1968.

- Congdon, C. C.: Effect of injection of foreign bone marrow on the lymphatic tissue of normal mice. *J. nat. Cancer Inst.* **28**, 305—329 (1962).
- The early histologic effects of antigenic stimulation *Arch. Path.* **78**, 83—96 (1964).
- Makinodan, T.: Splenic white pulpa alteration after antigen injection. Relation to time of serum antibody production. *Amer. J. Path.* **39**, 697—709 (1962).
- Cottier, H.: In: Hitzig, W. H., *Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin*, S. 75 u. S. 141. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.
- Dubiski, S., Fradette, K.: The feed-back mechanism in Immunglobulinsynthesis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **122**, 126—130 (1966).
- Elrod, L. M., Schrek, R.: Production of lymphoblastoid cells from rat and human lymphocytes by rabbit serum and by phytohemagglutinin. *Exp. Cell Res.* **38**, 418—423 (1965).
- Elves, M. W., Roath, S., Taylor, G., Israels, M. C. G.: The in vitro production of antibody. *Lancet* **1963I**, 1292—1293.
- Fischer, R., Gropp, A.: Cytochemie des Lymphocyten in vitro. *Klin. Wschr.* **44**, 733—738 (1966).
- Garvey, J. S., Campbell, D. H.: The retention of S 35 labelled bovine serum albumin in normal and immunized rabbit liver. *J. exp. Med.* **105**, 361—372 (1957).
- Gilden, R. V., Rosenquist, G. L.: Duration of antibody response to soluble antigen: Incorporation of S 35 methionine into normal and antibody globulin. *Nature (Lond.)* **200**, 1116—1117 (1963).
- Gough, J., Elves, M. W., Israels, M. C. G.: The formation of macrophages from lymphocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* **38**, 476—482 (1965).
- Graves, J. H., Kowan, K. M., Trautman, R.: Characterization of antibodies produced by guinea pigs inoculated with inactivated foot — and mouth disease antigen. *J. Immunol.* **92**, 501—506 (1964).
- Gropp, A., Fischer, R.: Ergebnisse der Züchtung von Lymphocyten in vitro. *Klin. Wschr.* **44**, 665—671 (1966).
- Gusman, B. S.: Zur Frage der Morphologie der Vaccine-Immunogenese im Tierversuch. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **108**, 209—214 (1965).
- Han, S. S., Han, I. H., Johnson, A. G.: Quantitative studies of lymphocyte mobilisation. In: *Germinal centers in immune responses*, p. 199. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1967.
- Howard, J. G.: Changes in the activity of reticulo-endothelial system following the injection of parenteral spleen cells into F I hybrid mice. *Brit. J. exp. Path.* **42**, 72—82 (1961).
- Johnson, A. G., Jacobs, A., Abrams, G., Merrit, K.: Comparative changes in mouse spleen during immuno stimulation or immunosuppression. In: *Germinal centers in immune response*, p. 234. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1967.
- Ling, N. R.: *Lymphocyte stimulation*. Amsterdam: North Holland Publ. Co. 1968.
- Mahnke, P.-F., Krug, H.: Zur Histotopographie der Antikörperbildung beim Kaninchen. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **109**, 402—410 (1966).
- Masshoff, W.: Vergleichende Cyto- und Histologie des leistungsgesteigerten Lymphknoten. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **37**, 190—191 (1954).
- Über die Reaktionen des lymphatischen Gewebes. *Med. Welt* **26**, 1393—1403 (1960).
- Frosch, B.: Untersuchungen über den Reaktionsablauf im Lymphknoten. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 666—695 (1958).
- Rieckert, P.: Vergleichende Cyto- und Histologie am leistungsgesteigerten Lymphknoten. *Frankfurt. Z. Path.* **65**, 43—61 (1954).
- Vogel, A.: Zur Ortho- und Pathologie der Lymphknoten. *Sandorama (Sandoz)*, **1**, 4—7 (1967).
- McMasters, Ph. D., Kruse, H., Sturm, E., Edwards, I. L.: The persistence of bovine gamma-globulin injected as an antigen into rabbits. *J. exp. Med.* **100**, 341—362 (1954).
- Miller, J. J., Nossal, J. V.: Antigens in Immunity. *J. exp. Med.* **120**, 1075—1086 (1964).
- Neiders, M. E., Rowley, D. A., Fitch, F. W.: The sustained suppression of hemolysin response in passively immunized rats. *J. Immunol.* **88**, 718—724 (1962).
- Nossal, G. J. V.: Antibody production by single cells. *Brith. J. exp. Path.* **40**, 301—311 (1959).
- Richter, M., Zimmermann, S., Haurowitz, F.: Relation of antibody titer to persistence of antigen. *J. Immunol.* **94**, 938—941 (1965).

- Rowley, D. A., Fitch, F. W.: Homeostasis of antibody formation in the adult rat. *J. exp. Med.* **120**, 987—1005 (1964).
- — The mechanism of tolerance produced in rats to sheep erythrocytes. *J. exp. Med.* **121**, 683—695 (1965).
- Salvin, S., Smith, R.: Zit. nach Steffen, C., Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, S. 344. Stuttgart: Thieme 1968.
- Schenk, K. E., Manskopf, G.: Freundesches Adjuvans und lymphatisches System. *Beitr. path. Anat.* **137**, 391—402 (1968).
- Schirop, Th.: Inaug.-Diss. Berlin 1968.
- Schoenberg, M., Mumar, R., Moore, R., Weissberger, A.: Zit. nach Steffen, C., Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, S. 82. Stuttgart: Thieme 1968.
- Sell, S., Rowe, D. S., Gell, P. G. H.: Studies on rabbits lymphocytes in vitro. *J. exp. Med.* **122**, 823—839 (1965).
- Sprinz, H., Kundell, D. W., Dammin, G. J., Horowitz, R. E., Schneider, H., Formal, S. B.: The response of germ-free guinea pig to oral bacterial challenge with *esch. coli* and *shigella flexneri*. *Amer. J. Path.* **39**, 681—695 (1961).
- Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie. Stuttgart: Thieme 1968.
- Svehag, S. E., Mandel, B.: The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody. *J. exp. Med.* **119**, 21—39 (1964).
- Thorbecke, G. J., Cohen, M. W., Jacobsen, E. B., Wakefield, J. D.: The production of memory cells by the white pulp of the spleen in rabbits. In: Germinal centers in immune response, p. 259. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1967.
- Uhr, J. W., Finkelstein, M. S.: Antibody formation. *J. exp. Med.* **117**, 457—477 (1963).

Dr. K. E. Schenk
Pathologisches Institut im Klinikum
Steglitz der FU Berlin
1000 Berlin, 45
Hindenburgdamm 30