Immunologische Untersuchungen der organspezifischen und zytotoxischen Eigenschaften des Antiserums der Leukozyten des Kaninchens.

Von

Dr. med. Hiroyuki Yamamoto.

(山 本 弘 行)

(Aus der Gerichtlich-medizinischen Institut der Kaiserlichen Tohoku-Universität. Direktor: Prof. Dr. med. Tetsuro Ishikawa.)

I. Über die Organspezifität der einzelnen Leukozyten.

Dass das Hämoglobin (Klein,¹⁾ Lerrs,²⁾ Higashi,^{3,4)} Hektoen und Schulhof⁵⁾), und die Leukozyten (Salus,⁶⁾ Iida⁷⁾), der Säugetiere Art- und Organspezifität besitzen, ist eine wohlbekannte Tatsache. Leschke⁸⁾ berichtete zum erstenmal über die Artspezifität der Leukozyten, doch wurden seine Ergebnisse von Spät⁹⁾ bestritten. Es dürfte sich aber meines Erachtens bei den Leukozyten nicht nur Organspezifität, sondern auch ziemlich strenge immunologische Differenz zwischen den einzelnen Leukozytenarten zeigen. In vorliegender Mitteilung soll das Ergebnis meines Experiments wiedergegeben werden.

1. Antigen und Antiserum.

Polynukleären Leukocyten von Kaninchen habe ich nach dem Verfahren von Spät als Antigen gesammelt, obschon es dafür noch ver-

-
- 1) Klein, A., Wien. klin. Wochenschr., 1903, **16**, 117.
 - 2) Leers, O., Centralbl. f. Bakteriöl. (I. Abt.), 1910, **54**, 1.
 - 3) Higashi, S., Journ. of Biochem. (Kakiuchi), 1923, **2**, 315.
 - 4) Higashi, S., Kokkaigakkai-Zasshi, 1921, 539.
 - 5) Hektoen u. Schulhof, Journ. of Infect. Diseas. 1923, **33**, 224.
 - 6) Salus, G., Biochem. Zeitschr., 1914, **60**, 1.
 - 7) Iida, E., Tokio Igakukwai Zasshi, 1924, **38**, 1121.
 - 8) Leschke, E., Zeitschr. f. Immunitätsf., 1913, **16**, 627.
 - 9) Spät, W., Zeitschr. f. Immunitätsf., 1914, **21**, 565.

schiedene andere Methode gibt (Neumann,¹⁰⁾ Fleming,¹¹⁾ Hirsch¹²⁾). Ungefähr 100 ccm Rindfleischbouillon wurde einem Kaninchen unter sterilen Kautelen danach die Höhle mit physiologischer Kochsalzlösung einige Male ausgespült und dann von dieser Spülflüssigkeit die bezüglichen Zellen durch Zentrifugieren getrennt. Nachdem der gewonnene Zellbrei (1,5–2,0 g) zur Entfernung der beigemischten Bouillon mehrere Male mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen worden war, liess er in 5–10 ccm physiologischer Kochsalzlösung wieder gleichmässig teilen. Diese Suspension wurde als Antigen in die Flügelvenen einer Hausente über zwanzig Male mit vier- oder fünftägigem Intervall injiziert. Das Verhältnis der in dieser Suspension vorhandenen Leukozyten war, wie mikroskopisch nachgewiesen wurde, folgendes: Polynukleäre 89,%, Mononukleäre 9,3%, und Eosinophile 0,8%. Wie man hieraus ersieht, besteht das Antigen hauptsächlich aus polynukleären Leukozyten, deshalb betrachte ich es als polynukleäres Leukozyten-Antigen und das ihm entsprechende Immunserum als polynukleäres Leukozyten-Antiserum oder Leukotoxin.

2. Über die Organspezifität der Leukozyten, insbesondere der polynukleären.

Um zu entscheiden, ob das auf die oben geschilderte Weise dargestellte polynukleäre Leukozyten-Antiserum, wie erwartet, strenge Organspezifität besitzt, d. h. nur gegen polynukleäre Leukozyten immunologisch reagiert oder nicht, suchte ich durch Präzipitinreaktion mit den Wassereextrakten polynukleärer, mononukleärer und eosinophiler Leukozyten und einiger anderer Organe die einzelnen Leukozytenarten zu identifizieren. Solche Wasserauszüge wurden mit physiologischer Kochsalzlösung aus den genannten, im Mörser zerstoßenen Zellen und Geweben hergestellt und die brauchbare Oberschicht durch Zentrifugieren von dem unlöslichen Sediment getrennt. Die drei Arten der Leukozyten und der Zellbrei einiger Organe wurden auf folgende Weise dargestellt.

(a) Polynukleäre Leukozyten. Wie oben erwähnt, wurden sie nach dem Verfahren von Spät aus einem Kaninchen genommen. Es sei noch hinzugefügt, dass die in diesem Falle zur Leukozytengewinnung verwendete Bouillon einerseits aus Rind-, andererseits aus Hundefleisch bereitet wurde,

10) Neumann, Alf., Wien. klin. Wochenschr., 1926, **39**, 773.

11) Fleming, Al., Brit. Journ. of Exper. Pathol., 1926, **7**, 281.

12) Hirsch, R., Pflügers Arch., 1927, **216**, 506.

um eine durch Präzipitinreaktion infolge des beigemischten Bouillon-eiweisses mögliche Verwicklung des Versuchsergebnisses zu vermeiden.

(b) Mononukleäre Leukozyten. Zur reinen Darstellung dieser Leukozyten wurde einem Kaninchen anstatt Bouillon nach dem Spätschen Verfahren 40 ccm einer 0,003 %igen wässrigen Pilokarpinlösung in die Peritonealhöhle eingeführt (Besrdkas Verfahren) und nach 24 Stunden die Höhle mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals ausgespült. Die Spülflüssigkeit wurde wie bei (1) weiter behandelt. Auf diese Weise kann man einen Leukozytenbrei bekommen, der wie mikroskopisch nachgewiesen wurde, fast ausschliesslich aus Mononukleären besteht.

(c) Eosinophile Leukozyten. In diesem Falle wurde an Stelle von Bouillon nach dem oben geschilderten Spätschen Verfahren ca. 100 ccm Wasserextrakt von *Ascaris lumbricoides*, das aus zerriebenen Würmern mit 10 fachem Volumen physiologischer Kochsalzlösung ausgezogen war, in die Bauchhöhle eines Kaninchens gebracht. Nach 24 Stunden wurde es wieder wie bei (1) aus der Bauchhöhle gespült. Man konnte unter dem Mikroskope erkennen, dass die auf diese Weise gewonnenen Leukozyten hauptsächlich Eosinophilen waren.

(d) Organe und Gewebe. Muskeln, Leber, Niere, Milz und Darm wurden einem aus der Karotis verbluteten Kaninchen entnommen, dessen sämtliche Organe dadurch blutfrei gemacht wurden, dass man kurz vor dem Tode des Tiers physiologische Kochsalzlösung durch die Aorta thoracalis hindurchströmen liess.

Tabelle

Organe \ Verdünnung	N mg	10	20	50	100	200	400	600
Polynukleäre Leukozyten	0,03	+	+	+	+	+	+	+
Eosinophile Leukozyten	„	+	+	+	+	+	+	+
Mononukleäre Leukozyten	„	+	+	+	+	+	+	+
Polynukleäre Leukozyten	„	+	+	+	+	+	+	+
Muskel	„	—	—	—	—	—	—	—
Leber	„	—	—	—	—	—	—	—
Niere	„	—	—	—	—	—	—	—
Milz	„	—	—	—	—	—	—	—
Darm	„	—	—	—	—	—	—	—
Knochenmark	„	+	±	—	—	—	—	—
Lymphdrüse	„	+	±	—	—	—	—	—
Linse	„	—	—	—	—	—	—	—
Glaskörper	„	—	—	—	—	—	—	—

Anmerkung: N=Stickstoffgehalt (mg %) der Stammlösung (Antigen)

den könnten, müsste ganz reines Antigen geschaffen werden. Also möchte ich hieraus schliessen, dass die Leukozyten des Kaninchens höchstwahrscheinlich strenge Organspezifität besitzen.

II. Über die spezifisch toxische Wirkung des Leukozytenimmunserums.

Leschke und Spät¹³⁾ meinten auf Grund ihrer Experimente, dass es sich bei den nach Injektion von Leukozytenimmunserum auftretenden Symptomen um die Auflösung von Leukozyten handelt, ähnlich wie sich bei der Hämolyse Erythrozyten verhalten, während Maurine, P. et J. Galiacy¹⁴⁾ sie auf die Leukozytenfragilität zurückführten. Um die toxische Wirkung des polynukleären Leukotoxins festzustellen, injizierte ich das Serum einem Kaninchen intravenös, dessen Blutspiegel dann zu gewissen Fristen unter dem Mikroskope genau betrachtet wurde. Zuerst wurde zur Kontrolle der Blutspiegel eines Kaninchens verfolgt, dem etwas normales Hausentenserum intravenös eingeführt wurde und dann Hauptversuch an demselben Kaninchen ausgeführt. Das Resultat ist folgendes.

Tabelle II (1).

Kleine Dose.

Arten d. L. Zeit	Weisse Blutkörp.	Rote Blutkörp.	Grosse Monozyten, Übergangsf.	Lympho- zyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten
15. XII.	11 450	674,5	0,17%	80,93%	—	0,66%	18,24%
16.	11 400	676,0	0,14	67,85	—	0,71	31,30
19.	12 500	—	—	77,33	—	—	22,67
19.	0,5 ccm	zytotoxisches Serum pro kg Körpergewicht injiziert					
10 Min. n. d. Injekt.	—	—	1,30%	95,41%	—	—	3,29%
30 " " " " "	—	—	—	98,22	—	—	1,78
1 Stunde n. d. Injekt.	—	—	0,88	99,12	—	—	—
2 Stunden n. d. Injekt.	7 800	468,0	—	99,13	—	0,87	—
3 " " " "	—	—	—	99,65	—	0,35	—
4 " " " "	8 200	269,0	—	100,00	—	—	—
5 " " " "	—	—	0,81	99,19	—	—	—
7 " " " "	10 950	115,0	—	96,89	—	0,28	2,82
8 " " " "	—	—	—	90,17	—	—	9,83
9 " " " "	—	—	—	80,13	0,17	0,63	19,24
10 " " " "	13 000	111,0	—	56,40	—	—	43,43
11 " " " "	—	—	0,19	64,17	—	—	35,64
12 " " " "	—	—	—	76,50	—	—	23,50
20 ¹ / ₂ " " " "	—	—	—	76,34	—	0,17	23,49
22 " " " "	—	—	—	72,77	—	—	27,23
24 " " " "	—	—	—	62,50	—	—	37,50
26 " " " "	—	—	0,17	83,89	—	0,34	12,62

13) Spät, W. und Hoder, F., Zeitschr. f. Immunitätsf., 1927, **49**, 382.14) Maurine, P. et Galiacy, Cpt. Rend. Soc. Biol., 1923, **89**, 1163.

Tabelle II (2).
Kleine Dose (Kontrolle).

Zeit	Arten d. L.	Weisse Blutk ^o r ^p .	Rote Blutk ^o r ^p .	Grosse Monozyten, Übergangsf.	Lympho-zyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten
16. I.		8150	712,5	0,28%	53,48%	0,28%	0,42%	45,53%
17.		—	—	0,45	33,23	—	0,45	65,87
		0,5 ccm	Normal-Hausentensersum pro kg Körpergewicht injiziert					
10 Min. n. d. Injekt.		5 850	696,0	—	75,00%	—	—	25,00%
30 " " " "		—	—	—	67,65	—	—	32,35
1 Stunde n. d. Injekt.		5 700	—	—	67,19	—	0,45	31,91
2 Stunden n. d. Injekt.		—	—	—	19,35	—	0,49	80,16
3 " " " "		5 750	—	—	30,47	—	—	69,53
4 " " " "		—	—	—	36,00	—	0,22	53,78
5 " " " "		7 400	738,5	—	—	—	—	—
6 " " " "		—	—	0,28	19,38	—	—	80,34
7 " " " "		7 600	—	—	31,84	—	0,45	67,72
9 " " " "		—	—	0,21	11,42	—	0,42	87,95
11 " " " "		—	—	—	15,50	—	0,26	84,24
12 " " " "		—	—	0,36	67,38	—	0,36	31,15
21 " " " "		—	—	0,27	11,16	—	—	88,57
27 " " " "		13 030	743,5	0,31	48,30	—	—	51,39
35 " " " "		—	—	—	57,89	—	0,24	41,87

Tabelle II (3).
Mittlere Dose.

Arten d. L.	Weisse Blutkorp.	Rote Blutkorp.	Mononukl. Leukozyten	Übergangsf.	Lympho-zyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten
Zeit								
2. XII.	11 575	673,0	0,18%	70,55%	0,18%	0,36%	29,84%	
10. XII.	1,5 ccm	Leukozytenantiserum pro injiziert						
10 Min. n. d. Injekt.	8 900	668,0	0,68%	90,97%	—	—	8,35%	
30 " " " "	—	—	0,64	91,90	—	—	7,46	
1 Stunde n. d. Injekt.	—	—	0,32	99,35	—	0,32	—	
2 Stunden n. d. Injekt.	—	—	—	100,00	—	—	—	
3 " " " "	7 375	160,0	0,32	99,77	—	—	—	
4 " " " "	7 750	96,0	—	100,00	—	—	—	
6 " " " "	10 600	—	—	96,57	—	0,61	2,83	
8 " " " "	16 550	50,0	—	96,26	0,36	0,71	2,67	
9 " " " "	—	—	—	58,17	—	1,00	40,84	

9½ Stunden nach d. Injektion gestorben.

Tabelle II (4).
Mittlere Dose (Kontrolle)

Arten d. L.		mittlere Dose (Herkunft)						
		Weisse Blutk ^o rper.	Rote Blutk ^o rper.	Mononukl. Leukozyten Übergangsf.	Lymphozyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten
Zeit								
1. XII.		13 300	638,7	0,13%	46,21%	0,13%	0,26%	53,27%
9. XII.		1,5 ccm Normal-Haustenserum pro kg injiziert						

Arten d. L. Zeit	Weisse Blutkörper.	Rote Blutkörper.	Mononukl. Leukozyten Übergangsf.	Lympho- zyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten
30 Min. n. d. Injekt.	—	—	0,29%	82,56%	0,29%	1,16%	15,70%
1 Stunde n. d. Injekt.	—	—	—	90,97	—	—	9,21
2 Stunden n. d. Injekt.	—	—	—	45,71	—	—	54,99
3 " " " "	—	—	0,13	38,45	—	0,53	60,90
4 " " " "	—	—	0,15	39,18	—	0,15	60,52
6 " " " "	9 000	679,0	0,20	51,51	—	—	48,29
12 " " " "	—	—	0,40	37,82	—	—	61,78
24 " " " "	—	—	0,33	40,18	0,17	—	59,34
48 " " " "	9 300	608,0	0,18	72,66	—	0,18	26,98
72 " " " "	1 775	652,0	0,20	83,37	—	0,40	16,03
96 " " " "	1 742,5	668,0	0,22	85,05	0,22	0,44	14,07
120 " " " "	18 100	668,0	0,41	65,94	—	0,14	33,52

Tabelle II (5).

Grosse Dose.

Arten d. L. Zeit	Weisse Blutkörper.	Rote Blutkörper.	Mononukl. Leukozyten Übergangsf.	Lympho- zyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten	Jugendform
15. XI.	6 800	663,4	1,22%	85,13%	0,81%	0,61%	12,22%	—
17. XI.	4 ccm	Leukozytenantiserum pro kg injiziert						
10 Min. n. d. Injekt.	6 850	—	1,42%	94,32%	0,53%	0,71%	2,19%	0,89%
30 " " " "	9 900	—	0,55	94,73	0,73	1,27	—	2,73
1 Stunde n. d. Injekt.	12 900	—	0,19	98,26	0,19	0,78	—	0,58
2 Stunden n. d. Injekt.	13 600	152,6	0,57	96,57	0,57	1,43	—	0,86
4 " " " "	10 050	59,5	0,20	82,93	0,40	0,90	15,46	0,20
7 " " " "	14 950	18,0	0,39	69,42	—	0,26	29,92	—
12 " " " "	17 000	—	—	—	—	—	—	—

17 Stunden nach d. Injektion von toxischem Serum gestorben.

Tabelle II (6).

Grosse Dose (Kontrolle)

Arten d. L. Zeit	Weisse Blutkörper.	Rote Blutkörper.	Grosse Monozyten Übergangsf.	Lympho- zyten	Basophile Leukozyten	Eosinophile Leukozyten	Neutrophile Leukozyten
15. X.	8 000	641,6	1,02%	69,12%	2,03%	3,14%	24,79%
8. XI.	4 ccm	Normal-Hauserntenserum pro kg injiziert					
2 Min. n. d. Injekt.	5 752	—	1,01%	69,63%	2,68%	3,02%	23,66%
10 " " " "	5 525	—	0,66	69,34	2,32	2,48	24,70
30 " " " "	7 050	—	0,69	69,51	1,39	0,92	27,48
1 Stunde n. d. Injekt.	6 275	—	0,58	61,00	4,63	5,02	31,19
2 Stunden n. d. Injekt.	7 675	605,7	0,66	72,00	1,17	6,00	20,17
4 " " " "	7 850	—	0,45	85,00	1,11	2,27	11,14
7 " " " "	11 550	612,9	0,22	64,27	0,22	5,40	29,89
12 " " " "	11 300	—	0,48	66,77	0,16	2,42	30,00
24 " " " "	11 200	614,4	0,35	72,06	0,70	2,11	24,78
48 " " " "	8 875	570,6	1,11	82,78	0,56	0,28	15,23
72 " " " "	6 500	595,5	1,45	86,91	1,09	1,45	9,09
96 " " " "	6 950	—	0,18	85,15	—	0,54	14,13

Fig. I.

Prozent der Lymphozyten und der polynukleären Leukozyten
bei kleiner Dose.

Fig. II.

Prozent der Lymphozyten und der polynukleären Leukozyten
bei mittlerer Dose.

Fig. III.

Prozent der Lymphozyten und der polynukleären Leukozyten bei grosserer Dose.

Wie obige Tabelle zeigt, können wir bei Injektion normalen Hausentensers als Kontrolle allgemeine Vermehrung der Leukozytenzahl erkennen, während das Verhältnis aller Leukozytenarten zu einander keine erhebliche Änderung zeigt. Injiziert man eine kleine Dose des genannten

Immunserums, so bietet der Blutspiegel nichts Besonderes dar, während bei einer mittleren oder grossen Menge die Versuchstiere in einigen Tagen zugrunde gehen. Eine Stunde nach der Injektion waren die polynukleären Leukozyten fast ganz aus der Blutbahn verschwunden, traten aber im Verlauf von 4 bis 7 Stunden wieder darin auf. Diese sehr interessante Erscheinung bedeutet eine elektive Einwirkung des Immunserums auf die polynukleären Leukozyten und ist ein Hinweis darauf anzusehen, das Leukotoxin eine ziemlich starke zytotoxische Eigenschaft besitzt.

Zusammenfassung.

1. Die Leukozyten des Kaninchens haben strenge Organspezifität, so dass sich jede Leukozytenart immunologisch identifizieren lässt.
2. Das polynukleäre Leukotoxin scheint auf die polynukleären Leukozyten eigentümlich schädigend zu wirken.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. T. Ishikawa, unter dessen Leitung die Ausführung der Versuche stattfand, meinen ergebensten Dank aussprechen.