

Über die Adsorptionsfähigkeit von Kaolin gegenüber Typhusteilagglutininen.

Von

Yoshio AOKI (青木義勇) und **Reisui CHIN** (陳麗水).

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Taikyū Medizinischen Fachschule
(Vorstand: Prof. Dr. Y. AOKI) und aus dem Bakteriologischen Institut der
Medizinischen Fakultät zu Nagasaki (Vorstand: Prof. Dr. T. NAITO).

(Eingegangen am 17. Dezember 1940.)

Unsere Anschauung über die Rezeptorzusammensetzung der Typhusbazillen ist neuerdings durch den Umstand erheblich kompliziert worden, dass man ausser dem bekannten thermolabilen L (gleichbedeutend mit d nach KAUFFMANN) den thermostabilen Antigenteil der Typhusbazillen in noch mehrere Faktoren teilen kann. Nach den früheren Untersuchungen von K. AOKI und ANJU sowie von uns (Y. AOKI; NAITO, Y. AOKI und TSUDA) gibt es bei den thermostabilen Antigenen zwei Arten, nämlich X und S, deren Differenzierung durch die Agglutinationsbeschaffenheit und die Paratyphusgruppenagglutinabilität ermöglicht wird. Das letztere, S entspricht dem Antigenkomplex IX-XII nach KAUFFMANN, das erstere, X findet sich nicht in dem sog. KAUFFMANN-WHITE-Schema. Bezüglich des X-Antigens haben sich Y. AOKI, ANN und R. AOKI weiter genau bemüht, und wir haben heute den Eindruck, dass bei der Agglutination mit gekochtem Typhus-LX-Stamm nach der Art der Serumherstellung (lebendes oder gekochtes Verhalten des Immunogens) und nach der Lebendigkeit bzw. Erhitzbarkeit der Bakterienkultur als Adsorbens wir den thermostabilen Antigenfaktor dieses Stammes noch eingehender analysieren können, in folgender Weise:

TABELLE I.

Antiserum	Adsorbens	Agglutinogen	Spezifität der Adsorbenswirkung	Benennung nach AOKI, ANN u. AOKI
mit lebender Kultur hergestellt	lebend od. 30 M. lang erhitzt	2 Std. lang erhitzt	spezifisch	X ₁
"	1 bis 2 Std. lang erhitzt	"	spezifisch	X ₁
mit gekochter Kultur hergestellt	lebend od. 30 M. lang erhitzt	"	spezifisch	X ₁
"	1 bis 2 Std. lang erhitzt	"	unspezifisch	X ₂

Ausserdem tritt, falls man die gekochte LX-Kultur mit dem mit dem lebenden LX gewonnenen Serum mittels der sog. 52°C-Methode agglutinieren lässt, noch eine vergleichend unterwertige grob-körnige Reaktion ein. Diese

Reaktion entsteht nur unter Verwendung von LX- oder X-Typus der Typhusbazillen sowohl als glatte Kolonien als auch rauhe Kolonien; ohne Beziehung zu den Stammarten in den Rauh-Varianten; demnach haben wir den Eindruck, dass eines von den R-Variant-Antigenen bei X-tragender Kultur sonderbarer Weise sich an die Oberfläche gedrängt hat.

Jedenfalls sind gegenwärtig im Typhus-LX-Stamm zwei *thermolabile* (d und vi) und drei *thermostabile* (x, x₁ und x₂) Teilagglutinogene nachweisbar, und im Typhus-LS ein labiles, allen normalen Typhusstämmen gemeinsames (d) und zwei *stabile* (ix und xii). Es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass das d, vi, und ix-xii-Komplex in den obigen sich ganz selbständig verhält, und dass die Frage nach der Selbständigkeit der von uns neu vorgeschlagenen x₁ und x₂ auch aufgeworfen werden muss, nachdem heute die Verteilung der beiden letzteren von AOKI, ANN und AOKI erkannt wurde und R. AOKI speziell für zahlreiche Typhusstämme eine eingehende Rezeptoranalyse nach unserer Meinung gelungen ist. Nur bezüglich des x₁-Faktors aber, trotz unserer Untersuchungen, möchten wir diese Frage nicht als endgültig gelöst erklären, da beim vi und x₁-Nachweis ein gleichlaufendes Verhalten der Antigenverteilung in den Typhuskulturen sich immer erwies.

Auch anderwärts ist eine Reihe von Untersuchungen mittels Komplementbindung von unseren Mitarbeitern durchgeführt worden; z. B. findet sich die Arbeit von OBI, in welcher vermittels dieser Reaktionsmethodik es dem Verf. gelang, L, vi, ix-xii-Komplex und x von den Teilantigenen nachzuweisen und die von AOKI und ZEN, in welcher Arbeit uns die Feststellung der eigenartigen Beeinflussbarkeit durch Medium-pH bei der Extraktion der einzelnen Antigen-substanzen gelungen ist. Diese Ergebnisse verstärkten alles in allem den Eindruck, dass wir neue Unterlagen für die Frage nach der Identifizierung dieser chemisch wesentlichen Substanzen erhalten hätten. Das weiteren müssen wir aufmerksam machen, einerseits auf einige frühere Mitteilungen bezüglich der Wesensverschiedenheit der beiden den Stamm LX bzw. LS charakterisierenden Antigen-substanzen, obgleich der diesbezügliche Versuch auf der früheren Ansicht der Rezeptoranalyse begründet ist (AOKI, OBI und TANAKA sowie KAWAZOE), und auf die Angabe von ANJU andererseits, dass das X-Antigen mit Kollodium-Membran filtrierbar ist.

Bei der Immunisierung mit Antigenen verschiedener chemischer Zusammensetzung oder verschiedener physiko-chemischer Zustände, liegt es natürlich nahe zu vermuten, dass die damit entsprechenden Antikörper im Serum sich durch Entstehung, Zustand, Lokalisation u. a. voneinander unterscheiden. Kachin ist das sonst unspezifisch wirkende Antikörperadsorbens; es scheint aber — der Literatur zufolge —, dass das Mittel gegenüber abnorm entstehenden oder speziellen Antikörpern bis zu einem gewissen Grade als aktiv anzusehen ist. z. B. durch die Untersuchung von FRANKEL und OLITZKI konnte der Nachweis geliefert werden, dass es möglich ist, durch Adsorption an Kachin und nachfolgende Elution mit verschiedenen Glykollösungen Eluate von Typhus-H-Agglutinin zu gewinnen, welche sich den Eiweisreaktionen mit chemischen Reagentien gegenüber negativ verhielten. Nach OLITZKI war diese Methode

gegenüber dem O-Agglutinin schwer anwendbar, nur bei Verwendung von Silarsale als Adsorbens wurden befriedigende Ergebnisse erzielt. Der Versuch von TAKEUCHI in Japan hat insofern Interesse, als das Ergebnis praktisch anwendbar ist. Vom Verf. wurde auf die Erscheinung hingewiesen, dass die Typhusagglutinoide leichter als die Vollagglutinine mit Kaolin adsorbierbar sind.

Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, verschiedene Agglutinine der Typhusbazillen im Lichte unserer Rezeptoranalyse mit Kaolin im einzelnen vorzubehandeln, und auf ihre Eignung für die Adsorption vergleichend zu prüfen. Wir erkennen freilich, dass der hierbei absehbare Unterschied nach den Agglutinarten nichts anderes als eine Manifestation der Eigenschaften der Antikörper ist, aber wir sind wahrscheinlich berechtigt, daraus die Folgerung zu ziehen, dass wir die Erscheinung zur Wesensidentifizierung eines Stoffes als Immunglobulin bei der Serumherstellung benutzen können, gleichzeitig mit dem als Reaktinogen beim Agglutinnachweis verwendeten Teilantigen.

- Trennungs- und Nachweismethode der bezweckten Agglutinine.
Trennungs- und Nachweismethode der bezweckten Agglutinine.
1. d-Agglutinin. Das mit lebender LS-287-Kultur hergestellte Serum wurde mit der erhitzten gleichnamigen Kulturaufschwemmung abgesättigt. Zum Nachweis dieses Agglutinins unter Benutzung der lebenden Kultur wurde das Bakterien-Serum-Gemisch 12 Std. lang im Frigolo stehen gelassen, dann die Bakterienausflockung mittels Agglutinioskop beobachtet.
 2. VI-Agglutinin. Es wurde durch die adsorptorische Entfernung des d- und gleichzeitig des IX-XII-Faktors im Watson-Vollbakteriens Serum gewonnen, wobei als Adsorbens die lebende LS-287-Kultur angewandt worden war. Agglutination mit der lebenden Watsonkultur unter den gewöhnlichen Reaktionsbedingungen.
 3. X-Agglutinin. Das mit durch Immunisierung mit der lebenden LX-138-III gewonnene Serum und die 2 Std. lang gekochte gleichnamige Kultur wurden verwendet. Man lässt das Gemisch 4-6 Std. lang auf 52°C stehen, und beobachtet nach weiterem übernachtigen Aufenthalt in Zimmertemperatur keine körnige Reaktion.
 4. XI-Agglutinin. Wie oben, ausser der Verwendung von 30 Min. lang erhitztem Agglutino-gen.
 5. X₂-Agglutinin. Das mit der gekochten LX-138-III hergestellte Serum und das 2 Std. lang gekochte gleichnamige Agglutino-gen wurden verwendet. Reaktionsmethodik wie oben.
 6. IX-Agglutinin. Das mit der gekochten LS gewonnene Serum wurde mit der gekochten Para-B-Kultur abgesättigt. Nachagglutination mit der gekochten LS-Kultur.
 7. XII-Agglutinin. Das Para-B Serum und die gekochte LS-Kultur wurden verwendet. Agglutinationsiter der Faktorensereen (Vorversuche).

TABELLE II.

Agglutinine Agglutinine	Verdünnungsgrad der Seren									Kontrolle
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	
d	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-
VI	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
X	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
X ₁	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
X ₂	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
IX	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
XII	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle II veranschaulicht die Agglutinationstiter der Faktorensereen. d trägt den höchsten Titer und zwar 12800. Darauf folgen I X und Vi: 800. X und X₂: 400. X₁ und XII: 200. Alle entsprechen annähernd den Titern, wie sie schon in Erfahrung gebracht worden sind. Unstreitig zeigen alle Agglutinationsreihen auch jede für sich eigenartige Ausflockungsbeschaffenheit.

Methode der Agglutininadsorption mit Kaolin.

Wir sind der Meinung, dass wir die Verwendung von Kaolin versuchen wollen, nicht nur um eine Adsorptionsfähigkeit auszuschliessen, sondern auch — soweit möglich — um die Eigentümlichkeit in den einzelnen Adsorptionsreihen vergleichend zu ermitteln. Um dies zu klären, müssen wir zum mindesten entweder die Menge von Agglutinin als Adsorptiv oder die von Kaolin als Adsorbens abwechseln lassen, und die Konzentration der noch in der Lösung befindlichen Agglutinine von Fall zu Fall bestimmen. In unserem Versuch wurde die Kaolinmenge nach geometrischer Reihe variiert (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 und 0.32 g), und die einzelnen Mengen mit den Agglutininen zur Reaktion gebracht, indem wir die Kaolinmenge jede für sich pro 1 cc Serummedium in gleichkonzentrierter Wirkungsstärke brauchten. Es fragt sich nun, ob man *einerseits* aus Serum mit ungleichmässigem Agglutinationstiter *Agglutininlösung mit gleichmässiger Wirkungsstärke* gewinnen kann, und *andererseits*, ob sich *eine Methode zur möglich ausführlichen Bestimmung der Restagglutininmenge* nach der Adsorption finden lässt. Es ist uns in dieser Mitteilung nur provisorisch gelungen, diese Fragen wie folgt zu klären, während wir mit dieser Beantwortung uns selbst noch nicht zufrieden geben.

Festgestellt werden zuerst die Agglutinationstiter der einzelnen Faktorensereen mittels der gewöhnlichen 2-fach-Verdünnungsmethode. Die einzelnen Lösungen, welche auf die gewünschten Endtiter gebracht werden, enthalten also die geringste, aber gerade noch reaktionsfähige Agglutininmenge (vorläufig *minimale Agglutininmenge* genannt) in einer bestimmten Mengeneinheit der Flüssigkeit. Wird die Konzentration solcher Lösungen genau auf 1:20 des ursprünglichen Zahlenwertes (z. B. Serum mit 1600-fachem Titer auf 80-, mit 400-fachem Titer auf 20-fachen Titer u. dgl. m.) gesteigert, so wird jede einzelne minimale Agglutininmenge auf das 20-fache konzentriert. Wir heissen solche Lösungen *Standard-Agglutininlösungen*, und dabei ist es selbstverständlich, dass man sie alle einheitlich ebenso wie die Faktorensereen mit Titer 1:20 behandeln kann. Um eine wirksame Menge von Agglutinin in Erscheinung zu bringen, müssen wir mit den Standard-Agglutininlösungen Verdünnungsprogressionen von 1 (unverdünnt) bis 20-fach im letzten Glase ansetzen, und dann die Bakterienemulsion in die einzelnen Röhrchen beifügen. Es springt in die Augen in diesem Fall, dass man die Agglutininwirksamkeit ausführlicher ablesen kann durch Ansetzen einer mit geometrischer Progression fortlaufenden Verdünnung — wie in dieser Arbeit — als einer *mit arithmetischer Progression*. In einer Reihe von Röhrchen fügt man je 1.0 cc Lösungen mit naturgesetzlich zunehmender Konzentration (1, 2, 3 20), dazu kommt je 1 Tropfen lebender oder gekochter Bakterienaufschwemmung; man lässt die Röhrchen unter den für die Darstellung des bezweckten Agglutinins besonders günstigen thermischen und zeitlichen Bedingungen stehen, und beobachtet sie mit Hilfe des Agglutinoskops.

Der obige Versuch mit den Standard-Agglutininlösungen entspricht dem Vorversuch bei der Kaolin-Adsorption. Beim Hauptversuch werden in 1 cc von Standard-Lösung der einzelnen getrennten Typhusagglutinine die schon genannten 5 variierten Mengen von Kaolin zugesetzt, 2 Stunden lang im Brutschrank stehen gelassen (4 Mal stündlich gut geschüttelt), mit 3000 Mal Minutendrehungsschnelligkeit 30 Minuten lang zentrifugiert, der klare Flüssigkeitsteil aufgesogen und wie oben die Agglutininwirkung ermittelt.

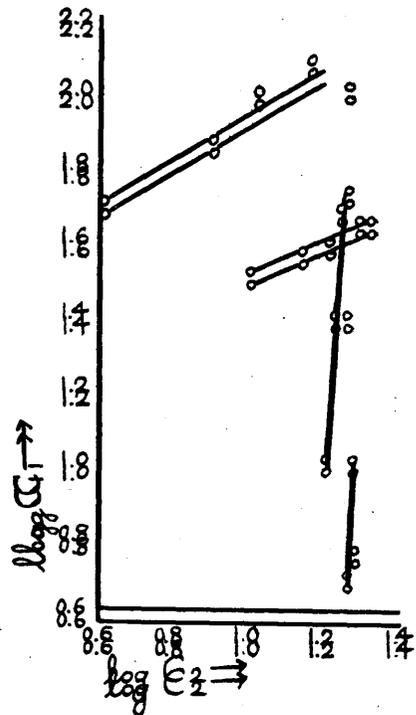
Die Ergebnisse der Kaolinvorbehandlungen einschliesslich der Reaktion mit nichtvorbehandelter Serumlösung sind der Übersichtlichkeit wegen in einer Tabelle (Tabelle III) zusammengestellt. Daraus ersieht man, dass die Agglutininadsorptionswirkung des Kaolins nach der Art des Agglutinins deutliche Unterschiede aufwies. Man kann dieselbe in zwei Teile teilen, nämlich d und Vi einerseits und die anderen drei andererseits. Im allgemeinen wird mit 0.02 g Kaolin keine nennenswerte Adsorption verursacht, aber durch Verwendung von 0.04 g Kaolin und darüber besonders nur bei d- und Vi-Agglutinin kommt gemäss der Kaolinmenge eine merkliche Herabsetzung der Nachagglutination vor, während die anderen so geringfügig beeinflusst werden, dass

entsprechenden Werte von E_1 und E_2 erreichen, dieselben logarithmieren und sie in ein Koordinatensystem eintragen.

Aus unserer methodologischen Vorbemerkung ergibt sich bereits, dass die Standard-Agglutininlösung 20 Einheiten der minimalen Agglutininmenge enthält. Bleiben wir also bei dem Beispiel von 0.08 g Kaolinmenge, wobei die minimale, aber doch noch ablesbare Agglutination in dem XII. Röhrchen der Verdünnungsreihe stattfindet, so betrifft es sich leicht, dass einerseits E_1 (d. h. die adsorbierte Agglutininmenge an Kaolin von bestimmter Menge) $8/0.08 \equiv 100$ Einheiten, und andererseits E_2 (Restagglutinin in der Lösung) 12 Einheiten ist. So können auf Grund der Endtitel in der Tabelle III die E_1 - und E_2 -Werte erfasst werden. Sie sind hier der Übersicht wegen noch einmal in einem Diagramm dargestellt. Darin bedeuten die Zahlen auf der Ordinate $\log E_1$, auf der Abszisse $\log E_2$. Die Zahlen von X_1 , X_2 , IX und XII verlaufen prinzipiell fast in der gleichen Richtung, sodass wir hier als Beispiel nur Diagramm XII anführen wollen.

Aus der graphischen Darstellung der Koordinaten haben wir die Erkenntnis gewonnen, dass die Bestimmung der Agglutininmenge noch nicht recht gelingen will, trotzdem wir dazu die grössten Anstrengungen gemacht hatten. Wir bedauerten jetzt erst, dass wir nicht die progressive Verdünnung mit konstanter Differenz von 0.5 verwendet hatten (obwohl wir aus einer gewissen Seite dieser Frage an die Möglichkeit dachten, dass die Bestimmung der minimalen Agglutininmenge desto schwieriger ist, je kleiner die konstante Differenz wird). Die Kurve ist wegen obiger methodologischer Schwierigkeiten als nur sehr approximativ und höckerig aussehend zu betrachten, scheint uns aber ein Beweis dafür zu sein, dass (1) die Koordinaten der α -Agglutinine unter Benutzung von Kaolin über 0.08 g pro cc oder die der VI unter Benutzung von Kaolin über 0.04 g eine fast gerade Linie darstellen und (2), dass die Koordinaten der X sowie der XII (ebenso wie X_1 , X_2 und IX) von der Ordinateachse im allgemeinen gleichmässig entfernt sind.

Eine genaue Ausrechnung von m und k kann in unseren Versuchen kaum gelingen, wenn wir hierzu nicht viel zahlreichere und genauere Koordinatenpunkte hinzu eintragen. Doch hatten wir den Eindruck, dass bei dem α bzw. VI-Agglutinin die gegebenen Punkte gerade Linien darstellen; mit anderen



Worten möchten wir die dabei hervorgerufene Agglutinin-Adsorption *auf ihre Wesensgleichheit mit der Adsorption in physiko-chemischem Sinne* zurückführen. Die Reaktion von X, XII u. a. gehört dagegen vielleicht in eine andere Kategorie. Wenn man dabei die Punkte zahlreicher und genauer ausrechnen würde, könnte man mit denselben in Fällen *von negativer Adsorption* ein Diagramm aufstellen, das eine von der Längsachse ziemlich entfernt liegende, ihr fast parallel laufende Gerade ergeben würde. Ausserdem fällt es auf den ersten Blick als merkwürdig auf, dass die Kurve des d-Agglutinins hinsichtlich der Neigungswinkel und der Kreuzpunkte gegenüber den beiden Achsen nicht derselben Art ist wie die des Vi-Agglutinins. Wir möchten diesbezüglich annehmen, *dass die m- und k- Werte im Laufe beider Reaktionen sich ungleich verhalten haben*. Wegen der Unangemessenheit unserer Methodik zu scharfer Trennung muss diese Frage, deren endgültige Beantwortung unser Ziel sein müsste, leider noch weiterem Studium vorbehalten werden.

Wie Schon im einleitenden Teil dieser Arbeit erwähnt, stellen wir uns jetzt die Aufgabe, die als Agglutinin aktiven Substanzen der Typhusbazillen auf der einen Seite immunologisch, auf der anderen Seite chemisch oder physiko-chemisch vom analytischen Standpunkt aus zu charakterisieren, und die bisherigen Versuche von AOKI, OBI und TANAKA, KAWAZOE, OBI, sowie AOKI und ZEN sind dabei teilweise als unserem Zweck dienlich zu betrachten. Wir haben uns unter Verwendung von Kaolin als unspezifisches Adsorbens auf dasselbe Ziel hingewandt, und konnten hier *zum mindesten zwischen dem Vi- und X₁- Agglutinin tiefliegende Unterschiede* aufdecken. Selbstverständlich ist aber diese letztere Vorstellung nur dann zulässig, wenn die Annahme stimmt, dass im allgemeinen die Eigenschaften der Antikörper diejenigen der Antigene widerspiegeln.

Zusammenfassung.

Nach dem jetzigen Stand unserer Antigenanalyse sind in den Typhus-Antisera 7 Teilagglutinine nachweisbar, nämlich d, Vi, X, X₁, X₂, IX und XII. d und Vi in den Teilagglutininen werden durch die Behandlung mit Kaolin eigenartig beeinflusst, und zwar in vorzüglicher Verfassung für die Entstehung der FREUNDLICHschen Adsorptionsisotheme.

Schrifttum.

- 1) AOKI, R.: Taikyū Isen Z., Bd. 1, S. 36, 1939.
- 2) AOKI, Y.: Tokyo-Iji-Shinshi, S. 3389, 1935.
- 3) AOKI, Y., ANN, CH. und AOKI, R.: Nagasaki Igk. Z., Bd. 17, S. 1093, 1939.
- 4) AOKI, Y., OBI, K. und TANAKA, S.: Z. Immun. forschg, Bd. 90, S. 162, 1937.
- 5) AOKI, Y. und ZEN, T.: Jap. J. of Med. Sci. Bacter., Vol. 1, p. 159, 1940. Taikyū Isen Z., Bd. 1, S. 128, 1940.
- 6) FRÄNKEL, M. und OLITZKI, L.: zit. nach Olitzki.
- 7) KAWAZOE, Y.: Nagasaki Igk. Z., Bd. 15, S. 827, 1937.
- 8) NAITO, T., AOKI, Y. und TSUDA, T.: Z. Hyg., Bd. 118, S. 666, 1936.
- 9) OBI, K.: Jap. J. of Med. Sci. Bacter., Vol. 1, p. 107, 1939.
- 10) OLITZKI, L.: Z. Immun. forschg, Bd. 72, S. 498, 1931, Bd. 75, S. 43, 1932.