

Aus dem Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. R. PRIGGE).

Untersuchungen über die Tuberkulinallergie mit Gewebekulturen.

Von

CARL DITTMAR und JOHANNA SIXEL.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. September 1954.)

Die cytotoxische Wirkung des Tuberkulins auf Gewebekulturen tuberkulöser Tiere soll ähnliche Ursachen haben wie die Hautreaktion, die bei tuberkulösen Tieren nach intrakutaner Injektion von Tuberkulin auftritt. Man nimmt an, daß die tuberkulösen Tiere einige Zeit nach der Infektion allergisch werden, d. h. es sollen dann sensibilisierende Antikörper vorhanden sein, die mit dem Hapten Tuberkulin reagieren, und als Folge dieser Reaktion komme es zur Schädigung der Haut und der Kulturen von Geweben allergischer Tiere. Allerdings war bisher bei den tuberkulösen Tieren im Gegensatz zu den Tieren, die mit artfremdem Serum allergisiert wurden, kein Antikörper im Serum nachweisbar, mit dessen Hilfe die Tuberkulinallergie auf normale Tiere passiv übertragen werden konnte. Auch sonst unterscheidet sich die Tuberkulinallergie wesentlich von der Serumallergie. Die Sensibilisierung erfolgt bei den mit Serum behandelten Tieren sehr rasch, und die Hauterscheinungen treten meistens sofort nach der Reinjektion des Serums auf, während Gewebekulturen von Tieren, die mit Serum sensibilisiert sind, durch das artfremde Serum nicht geschädigt werden. Das hat seine Ursache darin, daß durch die Antigen-Antikörperreaktion bei der Serumallergie im wesentlichen nur die Gefäßendothelien betroffen werden. Im Organismus der mit Tuberkulose infizierten Tiere werden jedoch auch andere Gewebe sensibilisiert, aber diese Veränderung wirkt sich viel später aus („delayed type“), Tuberkulin schädigt dann auch gefäßlose Gewebe wie die Cornea oder Gewebekulturen. Ob dabei eine Antigen-Antikörperreaktion mit im Spiel ist, erscheint fraglich, da, wie schon erwähnt, keine freien Sensibilisine im Serum tuberkulöser Tiere nachweisbar sind; immerhin besteht die Möglichkeit, daß der sensibilisierende Antikörper sehr fest an die tuberkulinempfindlichen Zellen gebunden ist, wofür die passive Übertragbarkeit der Tuberkulinallergie durch Zellen spricht.

Da der Nachweis einer direkten Zellschädigung durch Tuberkulin am besten mit Gewebekulturen erbracht werden kann, wurden zahlreiche Untersuchungen auf diesem Gebiet gemacht^{1, 5, 6, 9, 13}, wobei AT oder PPD zu Gewebekulturen von Milz, Knochenmark oder Leukocyten aus Blut von tuberkulösen Tieren zugesetzt wurde. Es zeigte sich, daß tatsächlich meistens nur Gewebe tuberkulöser Tiere geschädigt oder im Wachstum gehemmt werden, und daß es ohne Bedeutung ist, ob Plasma von tuberkulösen oder normalen Tieren für die Kultur verwandt wird. Allerdings muß betont werden, daß sich die Gewebekulturen tuberkulöser Tiere oft sehr verschiedenartig gegen Tuberkulin verhalten, und daß manche Zellarten durch Tuberkulin sehr wenig oder gar nicht geschädigt werden.

Die meisten bisherigen Arbeiten bestätigen die spezifische Schädigung der Gewebekulturen tuberkulöser Tiere durch Tuberkulin^{1, 5, 6, 9, 13}, nur zwei Arbeiten kommen zu einem anderen Ergebnis: LASFARGUES und Mitarbeiter⁷ nehmen an, daß die Wirkung des Tuberkulins unspezifisch sei, da die Gewebekulturen von tuberkulösen Tieren durch die Infektion in ihrer Vitalität herabgesetzt seien, ein Zusatz von Tuberkulin wirke deshalb schon in höheren Verdünnungen toxisch auf sie als auf Kulturen normaler Tiere. Nach BALDRIDGE und KLIGMAN² soll Tuberkulin das Wachstum von Knochenmarkkulturen auch von tuberkulösen Tieren nicht hemmen.

Wir haben diese Versuche nachgemacht, wobei ebenfalls Knochenmark von Meerschweinchen als Testgewebe verwandt wurde, konnten jedoch bei unserer Tuberkulinkonzentration die Angaben dieser Autoren nicht bestätigen.

Die Kulturen wurden wie bei BALDRIDGE und KLIGMAN in Hühnerplasma und Embryonal-extrakt gezüchtet. Wir setzten dem Medium aber nicht menschliches Serum zu, sondern Serum normaler Meerschweinchen, außerdem in den Versuchsreihen GT Hoechst (Op. Nr. 7 mit 75000 TE/mg) in einer Endverdünnung von 1/5000 gelöst in Ringerlösung*. Die Durchmesser der Kulturen und Stückchen wurden nach 1- und 2tägigem Stehen im Brutschrank mit einem Okularmikrometer bei konstanter Vergrößerung gemessen und daraus nach Abzug der Fläche der Stückchen die Wachstumsfläche der Kulturen berechnet.

Die auf Tabelle 1 und 2 angegebenen Werte bedeuten: R^2 der Kulturen — r^2 der Stückchen (die Radien R und r in großen Teilstriichen des Okularmikrometers gemessen). Da ein großer Teilstrich des Okularmikrometers bei der angewandten Vergrößerung 0,3 mm entsprach, berechnet sich Wachstumsfläche durch Multiplikation mit $0,09 \pi = 0,283$ in mm^2 . Jede Zahl ist der Durchschnitt von 24 Kulturen.

Die meisten Kulturen der tuberkulösen Tiere werden durch Tuberkulin im Wachstum gehemmt (Tabelle 1 und 2 Spalte 3), die Kulturen der normalen Tiere im allgemeinen aber von Tuberkulin nicht wesentlich beeinflusst. In einigen Versuchsreihen konnten wir jedoch bei Normaltieren neben statistisch gesicherten Wachstumshemmungen auch Wachstumssteigerungen beobachten. Der Durchschnitt der Gesamtheit der Kulturen der normalen Tiere ergab aber eine nur unwesentlich von 0 verschiedene Wachstumshemmung (Tabelle 1, Spalte 6). Im allgemeinen wird die zellschädigende Wirkung einer Substanz durch den cytotoxischen Index ausgedrückt, d. h. den Quotienten des Wachstums von Kulturen unter Zusatz der schädigenden Substanz/Wachstum ohne diese Substanz. Für je 13 tuberkulöse und normale Meerschweinchen haben wir den cytotoxischen Index für Tuberkulin bildlich dargestellt (Abb. 1). Man sieht daraus, daß dieser bei den tuberkulösen Tieren ausnahmslos unter 1 liegt, bei den normalen Tieren dagegen teils über, teils unter 1. Auf dieses Verhalten des C. I. werden wir später noch zurückkommen.

Die Differenz zwischen den Unterschieden des Wachstums der Kulturen mit und ohne Tuberkulin bei den tuberkulösen und nichttuberkulösen Tieren ist statistisch sehr gut gesichert: Der Mittelwert \bar{x}_3 der Werte für die tuberkulösen Tiere (Tabelle 1, Spalte 3) beträgt $-16,3 \pm 3,21$, der entsprechende Mittelwert \bar{x}_6 für normale Tiere (Spalte 6) $-1,1 \pm 3,31$. Die Differenz beider Mittelwerte mit ihrem mittleren Fehler ist dann:

$$\bar{x}_3 - \bar{x}_6 = -15,2 \pm 4,61.$$

* Diese Lösung enthält 15000 TE/cm^3 und entspricht einer AT-Verdünnung von 1:6,67. Hiervon wurden etwa $0,066 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ TE}$ jeder Kultur zugesetzt.

Daraus ergibt sich als Maß für die statistische Sicherheit dieser Differenz:

$$t_{42} = -15,2/4,61 \\ = -3,3 \text{ mit } 0,001 \\ < P < 0,01.$$

Im folgenden soll der Mittelwertvergleich kurz erläutert werden. Die Differenz der Mittelwerte zweier voneinander unabhängigen Meßreihen Diff. $(j, k) = \bar{x}_j - \bar{x}_k$ wird mit ihrem mittleren Fehler $s_{\text{Diff.}}(j, k)$ gemessen:

$$s_{\text{Diff.}}^2(j, k) = s_{\bar{x}_j}^2 + s_{\bar{x}_k}^2$$

wobei unter $s_{\bar{x}}^2$ folgender Ausdruck zu verstehen ist:

$$s_{\bar{x}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}.$$

Damit erhält man den Quotienten $t = \text{Diff.}(j, k) / s_{\text{Diff.}}(j, k)$.

Jedem auf diese Weise errechneten Wert für t entspricht ein Wert für die „Überschreitungswahrscheinlichkeit“ P , der außerdem noch von der Anzahl der Freiheitsgrade (in unserem Fall der um 2 verminderten Gesamtzahl der Einzelwerte in beiden Meßreihen) abhängt. Den Wert für P findet man in der Tabelle für die t -Verteilung (Tabelle 3 in FISHER und YATES: „Statistical tables for biological, agricultural and medical research“). P gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß bei der Gültigkeit der Hypothese, die Differenz der Mittelwerte der beiden als Stichproben aufzufassenden Meßreihen zugrunde liegenden Grundgesamtheiten sei gleich Null und die berechnete Differenz der beiden Stichprobenmittelwerte

Tabelle 1. Wachstum von Knochenmarkkulturen tuberkulöser und nichttuberkulöser Meerschweinchen nach 48 Std mit und ohne Tuberkulinzusatz.

Tuberkulöse Tiere			Normale Tiere		
mit Tuberkulin	ohne Tuberkulin	Unterschied	mit Tuberkulin	ohne Tuberkulin	Unterschied
4,3	3,7	+ 0,6	72,0	46,0	+ 26,0
13,0	14,0	— 1,0	32,0	18,0	+ 14,0
10,0	12,0	— 2,0	46,7	35,6	+ 11,1
6,9	9,1	— 2,2	64,0	56,0	+ 8,0
17,0	21,0	— 4,0	21,2	15,2	+ 6,0
7,4	12,0	— 4,6	18,0	13,0	+ 5,0
10,0	15,0	— 5,0	12,4	10,0	+ 2,4
13,0	19,0	— 6,0	11,3	9,9	+ 1,4
6,2	12,8	— 6,6	6,0	6,0	0
5,2	13,0	— 7,8	31,9	32,3	— 0,4
8,8	16,6	— 7,8	19,7	20,3	— 0,6
13,9	22,0	— 8,1	13,2	14,0	— 0,8
16,4	29,4	— 13,0	3,0	4,0	— 1,0
15,5	28,6	— 13,1	12,8	14,2	— 1,4
17,3	31,8	— 14,5	16,0	19,0	— 3,0
6,0	21,0	— 15,0	8,0	16,0	— 8,0
22,3	41,0	— 18,7	21,3	33,1	— 11,8
13,0	34,0	— 21,0	30,1	53,8	— 23,7
24,0	47,0	— 23,0	52,2	97,0	— 44,8
20,0	45,6	— 25,6			
11,0	42,0	— 31,0			
4,6	37,4	— 32,8			
23,3	58,6	— 35,3			
15,7	57,3	— 41,6			
14,8	83,2	— 68,4			
12,8	29,1	— 16,3	25,9	27,0	— 1,1

Jede Zahl ist der Durchschnittswert von 24 Kulturen.

Tabelle 2. Wachstum von Knochenmarkkulturen normaler und tuberkulöser Meerschweinchen nach 2 Tagen mit und ohne Tuberkulin.

Tuberkulöse Tiere			Normale Tiere			tub.-no.
mit Tuberkulin	ohne Tuberkulin	Unterschied	mit Tuberkulin	ohne Tuberkulin	Unterschied	
4,6	37,4	— 32,8	8,0	16,0	— 8,0	— 24,8
6,2	12,8	— 6,6	3,0	4,0	— 1,0	— 5,6
5,2	13,0	— 7,8	12,4	10,0	+ 2,4	— 10,2
24,0	47,0	— 23,0	32,0	18,0	+ 14,0	— 37,0
17,0	21,0	— 4,0	18,0	13,0	+ 5,0	— 9,0
10,0	12,0	— 2,0	6,0	6,0	0	— 2,0
7,4	12,0	— 4,6	16,0	19,0	— 3,0	— 1,6
8,8	16,6	— 7,8	64,0	56,0	+ 8,0	— 15,8
17,3	31,8	— 14,5	72,0	46,0	+ 26,0	— 40,5
6,9	9,1	— 2,2	11,3	9,9	+ 1,4	— 3,6
23,3	58,6	— 35,3	46,7	35,6	+ 11,1	— 46,4
16,4	29,4	— 13,0	13,2	14,0	— 0,8	— 12,2
15,5	28,6	— 13,1	19,7	20,3	— 0,6	— 12,5
12,5	25,3	— 12,8	24,8	20,6	+ 4,2	— 17,0

Versuchs- und Kontrollkulturen der in jeder Zeile aufgeführten beiden Tiere wurden gleichzeitig angelegt.

lediglich eine Zufallsabweichung von dem „wahren“ Wert Null, der für t berechnete oder ein noch größerer Wert zu erwarten ist. Je größer t ist, desto kleiner wird P . Wird t zu groß und damit P so klein, daß wir für das Auftreten eines so großen t -Wertes den Zufall nicht mehr glauben verantwortlich machen zu können, so werden wir uns dazu entschließen, die Hypothese, die wahre Mittelwertdifferenz sei gleich Null, zurückzuweisen. Soweit geht der statistische Test. Der Versuchsansteller darf aus diesem Testergebnis den Schluß ziehen: „Zwischen den Mittelwerten der Grundgesamtheiten, denen die beiden verglichenen Stichproben (j und k) entnommen sind, besteht ein wesentlicher Unterschied.“ Je geringer die Wahrscheinlichkeit P dafür ist, daß die in den Stichproben beobachteten Mittelwerte \bar{x}_j und \bar{x}_k nur Zufallsabweichungen desselben „wahren“ Mittelwertes in den beiden Grundgesamtheiten sind, um so größer ist die Berechtigung, den eben ausgesprochenen Schluß zu ziehen.

Unter unseren Versuchen sind 13 Versuchspaare, die jeweils gleichzeitig und unter vergleichbaren Bedingungen ausgeführt wurden (Tabelle 2), und zwar je ein Versuch mit einem

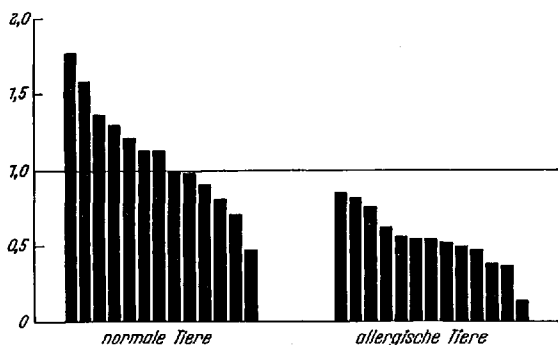


Abb. 1. Cytotoxischer Index für je 13 normale und allergische Tiere.

tuberkulösen und einem normalen Tier. Das Verfahren, die Variationen der Versuchsbedingungen durch Bildung der Einzeldifferenzen $D_i = \bar{x}_{3i} - \bar{x}_{6i}$ ($i = 1, 2 \dots 13$) auszuschalten und den Test auf deren Mittelwert und den mittleren Fehler anzuwenden, verspricht in diesem Fall keinen Vorteil, da diese Variation sich als unwesentlich ergibt.

Eine gewisse Bestätigung des Ergebnisses des für die Spalten 3 und 6 der Tabelle 1 durchgeführten Mittelwertvergleich erhält man, wenn man in beiden Versuchsreihen die Fälle zählt, bei denen Tuberkulin eine Hemmung des Wachstums bewirkt

hat. Hemmungen wurden beobachtet bei 24 von 25 (96%) tuberkulösen und 10 von 19 (52,6%) normalen Tieren. Der Vergleich dieser Häufigkeiten mit Hilfe der v. SCHELLING'schen T -Probe ergibt:

$$T = 3,36 \text{ mit } P < 0,001,$$

also eine statistisch hoch gesicherte Differenz.

Eine unter Berücksichtigung der relativ starken Streuung der bei den einzelnen Kulturen erzielten Ergebnisse mit einer Grenzwahrscheinlichkeit von 0,05 ermittelte statistische Sicherung der Wachstumshemmung konnte bei 19 von 25 tuberkulösen (76%) und 4 von 19 normalen Tieren (21,1%) festgestellt werden. Der Vergleich dieser Häufigkeiten ergab: $T = 3,6$ mit $P < 0,001$.

Wie oben erwähnt, soll nach LASFARGUES und Mitarbeitern⁷ die Vitalität der Gewebe tuberkulöser Tiere vermindert sein. Wir konnten jedoch diese Beobachtung nicht bestätigen. Knochenmarkkulturen tuberkulöser Meerschweinchen wuchsen zum mindesten ebensogut wie solche nichttuberkulöser Tiere. Wir fanden sogar im Durchschnitt bei den tuberkulösen Tieren etwas höhere Werte als bei nichttuberkulösen, eine Beobachtung, die auch WAKSMAN¹⁵ machte. Der Unterschied war aber bei uns nur gering und ließ sich statistisch nicht sicherstellen (Tabelle 1 und 2 Spalte 2 und 5).

Eigenartig ist aber das Verhalten der Knochenmarkkulturen der nichttuberkulösen Tiere gegen Tuberkulin. Ein Vergleich der paarweise einander zugeordneten Einzelwerte der Spalten 4 und 5 der Tabelle 1 und 2 zeigt, daß diese Kulturen durch Tuberkulin im Vergleich zu Kulturen, denen kein Tuberkulin zugesetzt wurde, bei einigen Versuchsreihen in ihrem Wachstum angeregt, bei einigen gehemmt wurden. Im Durchschnitt verschwand aber dieser Gegensatz. Denn der Durchschnitt der Werte der Spalte 6 ist kleiner als ihr mittlerer Fehler,

der mittlere Unterschied der Werte der Spalten 4 und 5 also unwesentlich von 0 verschieden. Sind die beobachteten Unterschiede nur auf die große Streuung der den 19 Mittelwerten \bar{y}_k ($k = 1, 2 \dots 19$) der Spalte 5 zugrunde liegenden Kultureinzelwerte \bar{y}_{ik} ($i = 1, 2 \dots n$) zurückzuführen oder haben sie überzufälligen Charakter? Einen Beitrag zur Lösung dieser Frage können wir den Werten entnehmen, die wir für die ohne Tuberkulin gewachsenen Kulturen normaler Tiere gefunden haben. Nehmen wir an, wir hätten von jedem der 19 Tiere unter genau den gleichen Versuchsbedingungen eine 2. Gruppe ohne Tuberkulin mit der gleichen Anzahl von Stückchen wachsen lassen, so hätten wir wahrscheinlich einen von $\bar{y}_k^{(1)}$ (1. Gruppe) abweichenden Mittelwert $\bar{y}_k^{(2)}$ erhalten. Der Unterschied $\bar{y}_k^{(1)} - \bar{y}_k^{(2)}$ folgt einer Normalverteilung mit dem Mittelwert 0 und der Standardabweichung $s_{\bar{y}} \cdot \sqrt{2}$, wenn wir der Einfachheit halber annehmen, daß der mittlere Fehler des Mittelwertes

$$s_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n(n-1)}}$$

in beiden Gruppen der gleiche ist. Fallen die Unterschiede zwischen den paarweise zugeordneten Werten der Spalten 4 und 5 in dem tatsächlich durchgeführten Versuch (also die Werte der Spalte 6 der Tabelle 1) so aus, daß sie nur als Zufallsabweichungen der Größen $\bar{y}_k^{(1)} - \bar{y}_k^{(2)}$ von dem Erwartungswert 0 aufgefaßt werden können, so bliebe die Frage, ob die auffallend hohen positiven bzw. negativen Unterschiede (Tabelle 1, Spalte 6) und das wechselnde Vorzeichen dieser Werte lediglich auf den Zufall zurückzuführen sind, zunächst noch unentschieden. Nun übertrifft aber der Unterschied zwischen den Werten der Spalten 4 und 5 dem Betrage nach in 3 von 19 Fällen das positive 2fach und in 4 von

19 Fällen das negative 2fache des entsprechenden Wertes für $s_{\bar{y}} \cdot \sqrt{2}$ (s. Tabelle 3). In einem Fall übertrifft dieser Unterschied dem Betrage nach das positive 4fache, in 2 Fällen sogar das negative 5fache des mittleren Fehlers. Für solche Abweichungen kann man den Zufall nicht mehr verantwortlich machen. Unter den 19 untersuchten Fällen kommen also hochgesicherte Wachstumshemmungen, aber auch hochgesicherte Wachstumsförderungen vor. Weitere Untersuchungen sollen dieses Verhalten der Kulturen nichttuberkulöser Tiere gegen Tuberkulin klären*.

Tuberkulin ruft bei Kulturen tuberkulöser Meerschweinchen charakteristische Veränderungen hervor: Milzkulturen wachsen nur spärlich aus, und die auswachsenden Zellen gehen bald zugrunde, auch die Makrophagen werden davon betroffen (wie aus Abb. 2 und 3 ersichtlich). In Abb. 2 sieht man Makrophagen einer 4 Tage alten Milzkultur eines tuberkulösen Meerschweinchens ohne Tuberkulinzusatz; die Zellen sind gut erhalten. Abb. 3 zeigt Makrophagen des gleichen Tieres nach Tuberkulinzugabe. Die Zellen sind durch das Tuberkulin zum größten Teil zerfallen, man findet nur noch vereinzelt, stark geschädigte Makrophagen, außerdem pyknotische Kerne und Zelltrümmer.

* Für die mathematische Auswertung unserer Versuchsergebnisse sind wir Herrn Diplommathematiker SCHULZ sehr zu Dank verpflichtet.

Tabelle 3.

Tier Nr.	\bar{y} (Wachstum ohne Tuberkulin)	$s_{\bar{y}} \cdot \sqrt{2}$	Differenz = Wachstumsunterschied mit und ohne Tuberkulin	$t = \frac{\text{Diff.}}{s_{\bar{y}} \cdot \sqrt{2}}$
1	46,0	6,17	26,0	4,22
2	18,0	5,87	14,0	2,39
3	35,6	6,74	11,1	1,65
4	56,0	4,81	8,0	1,66
5	15,2	2,35	6,0	2,56
6	13,0	2,77	5,0	1,80
7	10,0	2,19	2,4	1,10
8	9,9	1,48	1,4	0,95
9	6,0	2,16	0,0	0,00
10	32,3	4,63	— 0,4	— 0,09
11	20,3	1,77	— 0,6	— 0,34
12	14,0	1,91	— 0,8	— 0,42
13	4,0	1,17	— 1,0	— 0,85
14	14,2	1,97	— 1,4	— 0,71
15	19,0	3,95	— 3,0	— 0,76
16	16,0	3,92	— 8,0	— 2,03
17	33,1	4,29	— 11,8	— 2,75
18	53,8	4,49	— 23,7	— 5,28
19	97,0	77,7	— 44,8	— 5,78

Knochenmarkkulturen von Meerschweinchen, bei denen die Zellen im Gegensatz zu Milzkulturen im allgemeinen schneller auswandern, geben ein anderes Bild: schon nach 24 Std bildet sich um das Stückchen herum meistens ein Wachstumshof, der sich aber bei tuberkulösen Tieren nach Tuberkulinzusatz deutlich von dem nichttuberkulöser Tiere unterscheidet. Bei letzteren entwickelt sich in dem Wachstumshof ein feiner ausgedehnter Zellschleier, in dem die Zellen

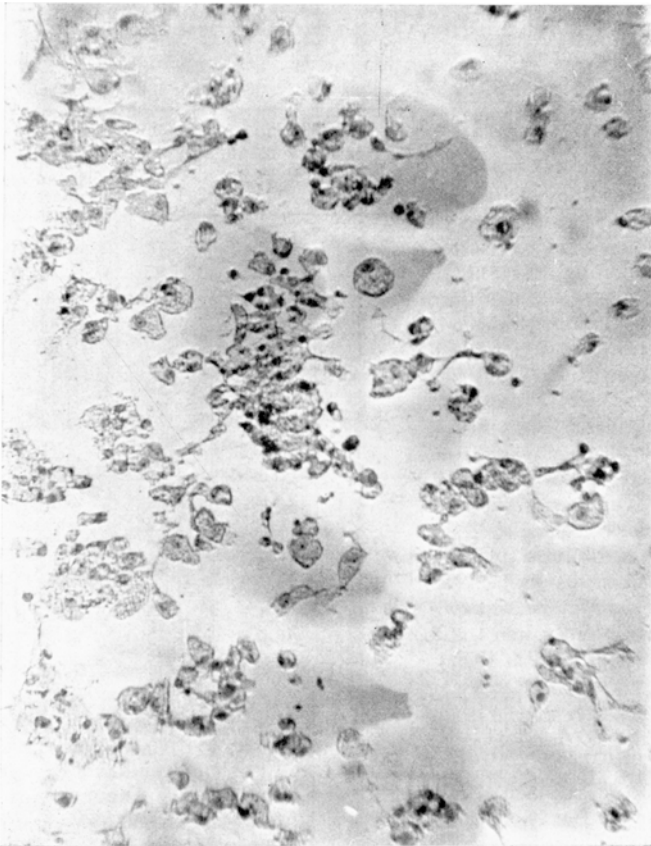


Abb. 2. Makrophagen einer Milzkultur eines tuberkulösen Meerschweinchens ohne Tuberkulin.
Vergr. 1:100.

ziemlich gleichmäßig verteilt sind, ihre Dichte nimmt nach dem Rand der Kultur zu allmählich ab (Abb. 4). Übereinstimmende Bilder erhält man unter normalen Verhältnissen, also ohne Tuberkulinzusatz von Knochenmarkkulturen nicht-tuberkulöser und tuberkulöser Tiere. Bei tuberkulösen Tieren verändert sich durch das Tuberkulin der Wachstumshof, er ist dichter und nicht so ausgedehnt. Die Zellen lagern sich zu Aggregaten zusammen, oft ist die Grenze zwischen Stückchen und Wachstumshof kaum mehr zu erkennen (Abb. 5). Häufig kann man beobachten, daß sich kein gleichmäßiger Wachstumshof bildet, sondern daß direkt aus dem Stückchen Zellstränge ausstrahlen (Abb. 6). Diese bestehen aus runden Zellen, die sich radiär angeordnet haben und teilweise in Haufen zu-

sammen liegen. Die Zellen sind gequollen und stark granuliert, jedenfalls irgendwie geschädigt. Solche Kulturen wachsen meistens nicht mehr weiter aus. Nur in einzelnen Fällen kann man beobachten, daß sich um die primär geschädigten Kulturen ein neuer Wachstumshof bildet. Tuberkulin hemmte in diesem Fall vermutlich nur vorübergehend das Wachstum dieser Kulturen. Tuberkulin kann also sehr verschiedenartig auf Gewebekulturen tuberkulöser Tiere wirken.

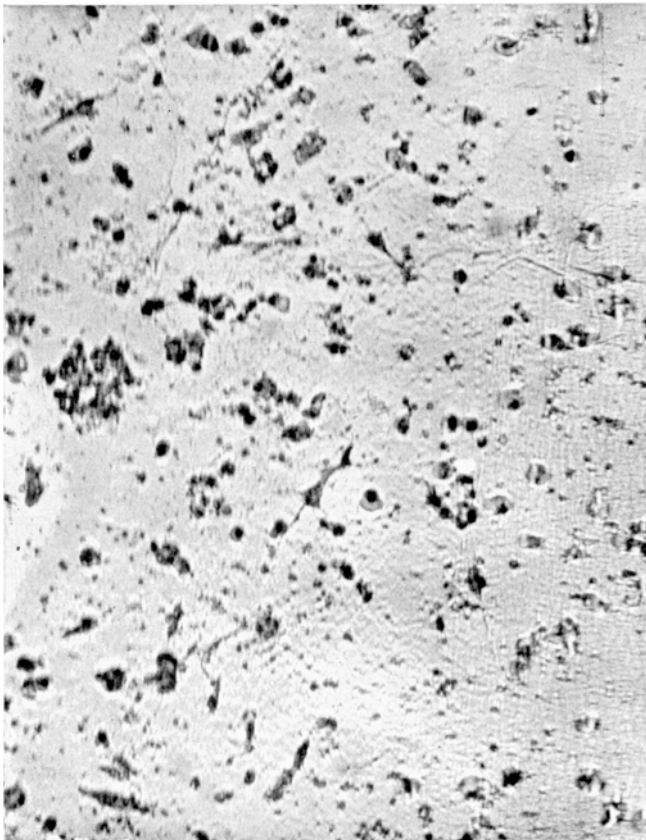


Abb. 3. Makrophagen einer Milzkultur eines tuberkulösen Meerschweinchens mit Tuberkulin.
Vergr. 1:100.

Ähnliche Beobachtungen wie wir machte auch FABRIZIO³ bei der Züchtung von Blutleukocyten aus Exsudaten tuberkulöser Meerschweinchen und Kaninchen unter Zusatz verschiedener Tuberkulinpräparate. Neben AT verwandte sie auch PPDS, das in seiner Wirkung dem GT Höchst entspricht, und außerdem 3 Fraktionen aus Tuberkulin-Muttersubstanz, die SEIBERT aus nicht erhitzten Kulturfiltraten von Tuberkelbakterien gewonnen hatte. Von diesen Fraktionen waren nach FABRIZIO nur die Fraktion A und C spezifisch stark wirksam, während die B-Fraktion nur unspezifisch auf die Gewebekulturen wirkte. Auch die A- und C-Fraktionen sollen sich verschiedenartig verhalten. A soll bei tuberkulösen Meerschweinchen eine stärkere Hautreaktion geben als C, während C bei der

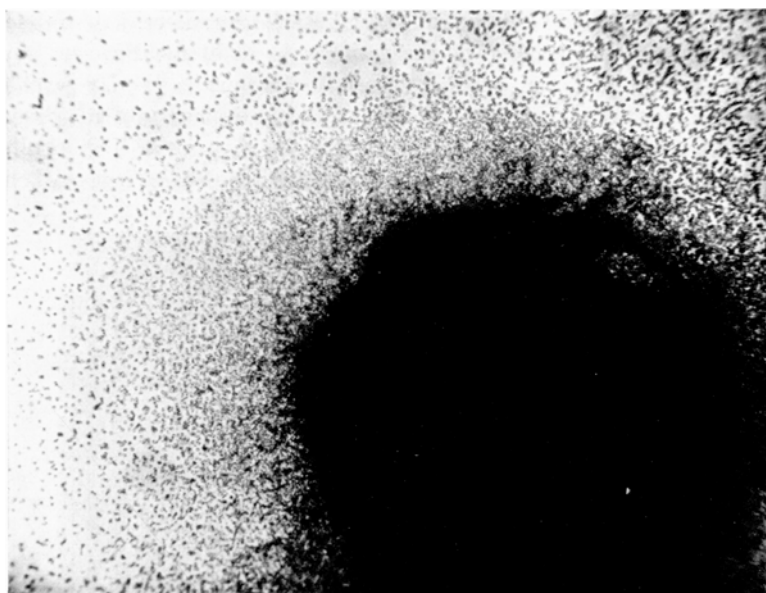


Abb. 4. Zellschleier um ein Knochenmarkstückchen eines normalen Meerschweinchens.

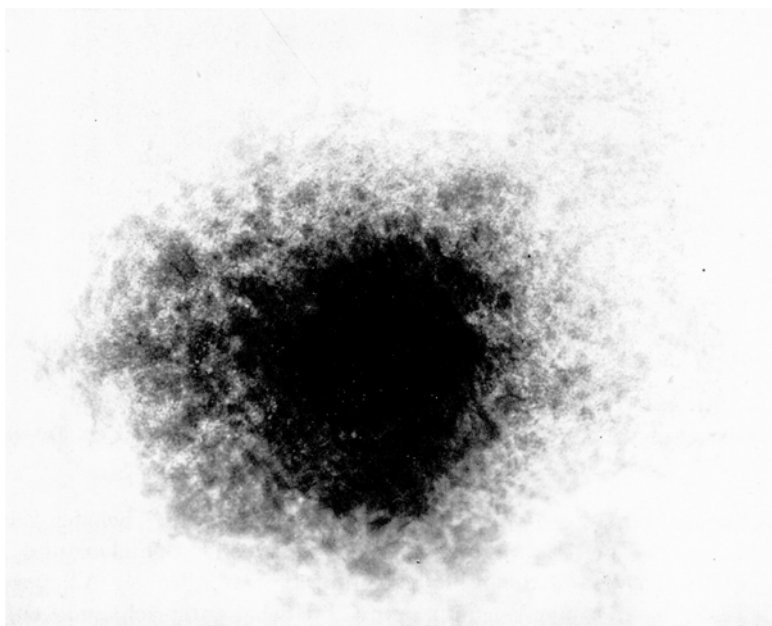


Abb. 5. Einwirkung von Tuberkulin auf eine Knochenmarkkultur eines tuberkulösen Meerschweinchens.

Komplementbindung als Antigen wirksamer sein soll. Bei Gewebekulturen ist nach FABRIZIO ihre cytotoxische Wirkung quantitativ nicht sehr verschieden voneinander, beide sollen noch in einer Verdünnung von 1/10000 toxisch auf

Gewebekulturen tuberkulöser Tiere wirken. Qualitativ soll aber ihr Einfluß auf die Gewebekulturen verschieden sein. C soll die Zusammenballung der Zellen im Wachstumshof, A das strahlenförmige Auswandern der Zellen verursachen. Da wir bei unseren Kulturen beide Wachstumsformen beobachten konnten, ist anzunehmen, daß Abkömmlinge beider Fraktionen in unserem GT enthalten waren.

Die oft geringe spezifische Wirkung des AT und des gereinigten Tuberkulins führt FABRIZIO auf die noch ungenügende Reinheit des AT und des PPDS zu-

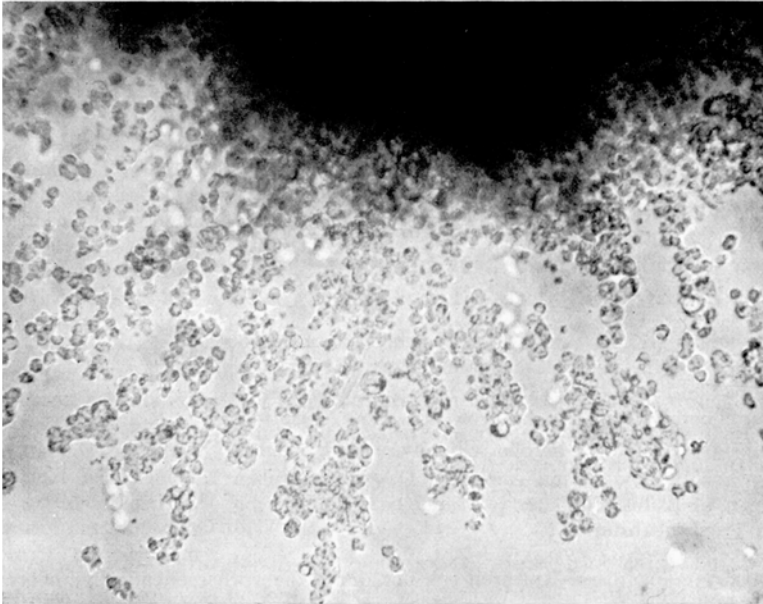


Abb. 6. Einwirkung von Tuberkulin auf Zellen einer Knochenmarkkultur eines tuberkulösen Meerschweinchens.

rück, aber die beiden reinen TMS-Fractionen wirkten auch nicht immer zufriedenstellend. Gewebekulturen von tuberkulösen Kaninchen reagierten im Gegensatz zu solchen von Meerschweinchen auf die meisten Tuberkulinpräparate überhaupt nicht. Die ungleiche Wirkung des Tuberkulins auf Gewebekulturen tuberkulöser Tiere muß demnach noch andere Ursachen haben: Die Sensibilisierung der Kulturen gegen Tuberkulin, die nicht immer parallel geht mit der Hautreaktion der Tiere, von denen das Gewebe stammt, kann verschieden stark sein; nicht alle Zellen der Gewebekulturen tuberkulöser Tiere sind gegen Tuberkulin gleich empfindlich; auch das Medium, in dem das Gewebe wächst, kann von Bedeutung sein.

Dafür sprechen vor allem die Untersuchungen von FAVOUR^{4, 10, 11, 12}; nach diesen soll durch eine Lyse von Lymphocyten tuberkulöser Tiere ein Antikörper frei werden, der auch an Neutrophile gebunden werde und dann mit Tuberkulin reagieren soll, was eine Lyse weiterer Zellen zur Folge habe. Voraussetzung für diese Reaktion sei eine Affinität der Lymphocyten und Neutrophilen des betreffenden Tiers für Tuberkulin.

Wenn diese Affinität nicht vorhanden sei wie bei der Maus, so komme es auch zu keiner Reaktion. FAVOUR glaubt, damit die fehlende Allergie der Maus gegen Tuberkulin erklären zu können. Da die Cytolyse hier offenbar die Folge einer Antigen-Antikörperreaktion ist, soll dazu auch Komplement notwendig sein, denn in erhitztem Serum war eine Cytolyse nicht möglich bzw. erst dann, wenn frisches Meerschweinchenserum zugefügt wurde, in dem alle Komponenten des Komplements vorkommen.

FAVOUR untersuchte Zellsuspensionen zu verschiedenen Zeiten mit und ohne Tuberkulinzusatz und zählte die Leukocyten vor und nach der Tuberkulinzugabe aus, er arbeitete also nicht mit Gewebekulturen; auch war die Versuchszeit viel kürzer als bei Gewebekulturen. Trotzdem könnte die cytotoxische Wirkung des Tuberkulins auf Makrophagen von Milz- und Knochenmarkkulturen tuberkulöser Meerschweinchen auch auf einer Antigen-Anti-

Tabelle 3. *Atmung und Glykolyse von Knochenmark.*

(Jeder Wert errechnet sich aus Versuchen
in 3 Warburg-Gefäßen.)

	K. M. normal	K. M. normal + Tbn.	K. M. tb.	K. M. tb. + Tbn.
Q_{O_2}	-2,4 -2,8	-3,0 -3,1	-3,4 -3,2	-3,9 -3,6
$Q_{CO_2}^O$	+1,7 +1,2 +1,2	+2,7 +2,4 +2,1	+2,1 +2,4 +3,2	+3,2 +3,5 +3,4

Knochenmark (K. M.) normaler und tuberkulöser Meerschweinchen (tb.) in Ringerlösung und nach Zusatz von Tuberkulin (Tbn.) 1/4000 in Ringer. Q_{O_2} = O_2 -Verbrauch in Kubikmillimeter je Stunde bezogen auf 1 mg entfettete Trockensubstanz. $Q_{CO_2}^O$ = aerobe Glykolyse d. h. durch Milchsäure aus Bicarbonat frei gemachtes CO_2 unter aeroben Bedingungen in Kubikmillimeter je Stunde bezogen auf 1 mg entfettete Trockensubstanz.

Wachstumshemmung dieser Kulturen sei, der durch die vorhergehende Lympholyse durch Tuberkulin hervorgerufen werden kann.

Wir fanden jedoch, daß nach Zugabe von Tuberkulin zu einer Aufschwemmung von Knochenmarkzellen in frischem Meerschweinchenserum kein Komplement verbraucht wurde. Die anticytotoxische Wirkung von frischem Meerschweinchenserum dürfte also nicht auf seinen Komplementgehalt zurückzuführen sein. Unsere Beobachtungen stehen scheinbar im Widerspruch zu denen von FAVOUR. WAKSMAN¹⁵ aber erbrachte den Nachweis, daß die Lympholyse durch Tuberkulin meistens nur kurze Zeit nach der Impfung der Tiere mit Tuberkelbakterien vorkommt, später, wenn die Hautreaktion positiv wird, nur sehr selten. Da unsere Versuche mit Knochenmark allergischer Tiere gemacht wurden, ist das negative Ergebnis verständlich.

Man kann nun die Frage stellen, ob die cytotoxische Wirkung des Tuberkulins überhaupt durch eine Antigen-Antikörperreaktion bedingt sei. Könnten nicht andere Faktoren (vielleicht enzymatischer Natur) die Ursache dafür sein? Dies kann bisher nicht eindeutig geklärt werden. Für eine Antigen-Antikörperreaktion spricht die passive Übertragbarkeit der Tuberkulinallergie durch Gewebezellen, wobei allerdings der Antikörper relativ fest an diese Zellen gebunden sein müßte; denn durch das Serum der allergischen Tiere läßt sich die Allergie nicht übertragen. Auch die Tatsache, daß Komplement für die Wachstumshemmung der Kulturen entbehrlich ist, spricht nicht gegen die Vorstellung, daß die Wachstumshemmung durch eine Antigen-Antikörperreaktion verursacht wird, da die Bindung zwischen Antigen und Antikörper vielfach ohne Mitwirkung von Komplement verläuft.

Da die Tuberkulinallergie aber in einigen Punkten wesentlich von anderen Arten der Allergie abweicht („delayed type“) und Tuberkulin auch auf Gewebekulturen tuberkulöser Tiere oft nur allmählich hemmend einwirkt (vielfach, wie

körperreaktion beruhen, bei der Komplement verbraucht wird. Wir fanden bei unseren Versuchen allerdings, daß kein Komplement dafür erforderlich ist. Unsere Knochenmarkkulturen von tuberkulösen Meerschweinchen wuchsen in frischem Meerschweinchenserum sogar besser als in erhitztem, und sie wurden in frischem Serum durch Tuberkulin auch weniger geschädigt als in erhitztem. Komplement konnte also nicht die Schädigung dieser Kulturen mitbedingen, sondern eher das Fehlen des Komplements. Es lag daher der Gedanke nahe, daß ein Komplementmangel die Ursache der

wir beobachten konnten, erst nach 48 Std) und die Hemmung bei manchen Kulturen sehr gering ist, könnte die cytotoxische Wirkung des Tuberkulins auch durch andere Vorgänge bedingt sein.

Wir beobachteten bei Stoffwechselmessungen mit dem Warburg-Apparat, wobei wir Knochenmarksuspensionen tuberkulöser und nichttuberkulöser Meerschweinchen verwandten, eine Erhöhung der Atmung und Glykolyse durch Tuberkulin schon bei Knochenmark normaler Tiere und noch ausgesprochener von tuberkulösen Tieren, deren Knochenmark an sich eine erhöhte Atmung und Glykolyse hatte (Tabelle 3). Dies könnte eine Parallele zu Angaben von MAUER⁸ sein, nach denen die Glykolyse tuberkulösen Gewebes über die Norm gesteigert wird. MAUER bringt damit den Zerfall des tuberkulösen Gewebes in Zusammenhang und konnte nachweisen, daß die erhöhte Glykolyse durch enzymatische Vorgänge bedingt ist, die durch Zerfalls- und Stoffwechselprodukte von Tuberkelbakterien angeregt werden.

Es besteht die Möglichkeit, daß auch die cytotoxische Wirkung des Tuberkulins auf einem ähnlichen Prinzip beruht, wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß das Gewebe von tuberkulösen Tieren an sich schon einen erhöhten Stoffwechsel hat und darum auch gegen das den Stoffwechsel steigernde Tuberkulin empfindlicher ist als das Gewebe nichttuberkulöser Tiere.

Zusammenfassung.

Die cytotoxische Wirkung von Tuberkulin auf Gewebekulturen tuberkulöser und normaler Meerschweinchen wurde untersucht. Aus einem großen Versuchsmaterial (über 2000 Kulturen) ergab sich, daß Knochenmarkkulturen tuberkulöser Tiere gegenüber solchen nichttuberkulöser Tiere durch Tuberkulin im Wachstum gehemmt werden.

Es werden die Veränderungen besprochen, die Tuberkulin bei Milz- und Knochenmarkkulturen tuberkulöser Tiere hervorruft. Auffällig ist, daß diese Veränderungen und Schädigungen nicht bei allen Kulturen gleich groß waren. Dies kann mit dem Grad der Allergie der untersuchten Tiere gegenüber den verschiedenen Komponenten des verwandten GT-Präparates, mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der in der Milz und im Knochenmark vorkommenden Zelltypen gegen Tuberkulin und mit dem Einfluß des Züchtungsmediums zusammenhängen.

Versuche von FAVOUR zeigten, daß Lymphocyten tuberkulöser Tiere durch Tuberkulin cytolysiert werden unter Freiwerden eines „Plasmafaktors“, der nach Bindung an andere Leukocyten nach Art eines Antikörpers mit Tuberkulin reagiert, was einen Zerfall weiterer Zellen zur Folge habe; dabei werde Komplement verbraucht.

Die Lympholyse von FAVOUR ist aber nur kurz nach der Tuberkuloseinfektion nachweisbar, während die positive Hautreaktion und die Empfindlichkeit von Gewebekulturen gegen Tuberkulin erst viel später eintritt. Es ist deshalb fraglich, ob die Wachstumshemmung von Milz- und Knochenmarkkulturen tuberkulöser Tiere durch Tuberkulin, von der in der Hauptsache Makrophagen betroffen werden, auch die Folge einer Antigen-Antikörperbindung ist, zumal es nicht zu einer plötzlichen Lyse der Zellen kommt.

Da Knochenmarkszellen tuberkulöser Tiere einen gesteigerten Stoffwechsel haben, wobei sowohl die Atmung wie die Glykolyse erhöht ist, und außerdem Tuberkulin die Glykolyse dieser Zellen stark anregt, wie aus Versuchen mit dem Warburg-Apparat hervorging, wird diskutiert, ob die cytotoxische Wirkung des Tuberkulins auf Zellen tuberkulöser Tiere die Folge von übersteigerten glykolytischen Vorgängen sein könnte, die dann zur Schädigung und zum Zerfall von Zellen führen. Es wird auf Untersuchungen von MAUER hingewiesen, der eine Aktivierung bestimmter phosphorylierender Fermente durch Tuberkelbakterien und ihre Stoffwechselprodukte nachweisen konnte. Diese Fermente sind für die Schnelligkeit des Verlaufs der Glykolyse von großer Bedeutung. Nach MAUER ist der Zerfall des tuberkulösen Gewebes in vivo ebenfalls als eine Folge von gesteigerten glykolytischen Vorgängen in den Zellen anzusehen.

Literatur.

- ¹ ARONSON, A. R.: J. of Exper. Med. **54**, 387 (1931). — J. of Immun. **25**, 387 (1931). — ² BALDRIDGE, G. D., and A. M. KLIGMAN: Amer. Rev. Tbc. **63**, 677 (1951). — ³ FABRIZIO, A. M.: Amer. Rev. Tbc. **65**, 250 (1952). — ⁴ FAVOUR, C. B.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **65**, 269 (1947); **70**, 369 (1949). — ⁵ HEILMAN, D. N., W. H. FELDMAN and F. C. MANN: Amer. Rev. Tbc. **50**, 344 (1944). — ⁶ HEILMAN, D. N., and F. B. SEIBERT: Amer. Rev. Tbc. **53**, 71 (1946). — ⁷ LASFARGUES, E., P. ROQUET et A. DELAUNAY: Ann. Inst. Pasteur **73**, 169 (1947). — ⁸ MAUER, H.: Naturwiss. **39**, 502 (1952). — ⁹ MOEN, I. K. and H. F. SWIFT: J. of exper. Med. **64**, 339 (1936). — ¹⁰ MILLER, I. M., C. B. FAVOUR, B. A. WILSON and M. A. UMBARGER: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **70**, 738 (1949); **71**, 287 (1949). — ¹¹ MILLER, I. M. and C. B. FAVOUR: J. of Exper. Med. **93**, 1 (1951). — ¹² MILLER, I. M., I. H. VAUGHAN and C. B. FAVOUR: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 592 (1949). — ¹³ RICH, A. R., and M. R. LEWIS: Bull. Johns Hopkins Hosp. **1932**, 115. — ¹⁴ SEIBERT, F. B.: Ann. Rev. Microbiol. **4**, 35 (1950). — ¹⁵ WAKSMAN, B. H.: Amer. Rev. Tbc. **68**, 746 (1953).

Dr. CARL DITTMAR, Frankfurt a. M., Georg-Speyer-Haus,
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut.