

[Aus dem Institut für Infectionskrankheiten zu Berlin.]

## Beiträge zur Kenntniss der Milch immunisirter Thiere.<sup>1</sup>

Von

Prof. Dr. Brieger und Prof. Dr. Ehrlich.

Nachdem Ehrlich die Thatsache gefunden hatte, dass die Immunität durch Säugung von der Mutter auf das Kind übertragen wird, haben wir uns gemeinschaftlich damit beschäftigt, die biologische Bedeutung der Milch immunisirter Thiere näher zu studiren. Ueber die ersten Ergebnisse unserer gemeinsamen Arbeit haben wir bereits in Kürze berichtet.<sup>2</sup> Für derartige Versuche boten sich, soweit die Verhältnisse eines Laboratoriums in Betracht kommen, Ziegen als das geeignetste Material dar, das sich in der That bei unseren Untersuchungen und denen unserer Nachfolger auf das Beste bewährt hat. Wir haben unsere Versuche zunächst mit Tetanus begonnen, da von allen Infectionskrankheiten gerade bei diesen der rein toxische Charakter der Erkrankung am schärfsten zu Tage tritt und dementsprechend auch die Immunität auf eine rein antitoxische Function des Organismus zurückzuführen ist. Erleichtert wurde unser Vorhaben dadurch, dass die Ziegen sehr empfindlich gegen das Tetanusgift sind, da nach unseren Versuchen schon 0,25<sup>cem</sup> einer vollvirulenten Cultur ausreichen, um den Tod eines ausgewachsenen Thieres binnen wenigen Tagen zu bewirken. In unserer ersten Mittheilung über die Resultate der Immunisirung haben wir bereits nachgewiesen, dass die Milch der immunisirten Ziege schon nach 41 Tagen Antikörper in immerhin beträchtlichen Mengen enthielt. Es war nun unsere Aufgabe weiter zu untersuchen

<sup>1</sup> Eingeliefert am 15. December 1892.

<sup>2</sup> *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 1892. Nr. 18.

1. ob die Ausscheidung des Antikörpers während der ganzen Lactationsperiode erfolge und

2. ob, wenn dies der Fall, mit dem Steigen der Immunität der Gehalt der Milch an Antistoffen einen entsprechenden Zuwachs erführe.

Bei der Verfolgung dieser Aufgabe mussten wir zunächst die Immunität der Ziege steigern. Wir haben bei diesen Untersuchungen Beobachtungen gemacht, welche auf den Verlauf des Immunisirungsganges einiges Licht werfen, und die es gestatten, die Technik der Immunisirung nach rationellen Gesichtspunkten zu verbessern. Ueber diese Erfahrungen werden wir zuerst berichten, um alsdann an zweiter Stelle Untersuchungen mitzutheilen, welche darauf hinzielten, die schützenden Substanzen aus der Milch in möglichst concentrirter Form zu gewinnen.

### I. Ueber den Verlauf der Immunisirung.

In unserer ersten Arbeit haben wir mitgetheilt, dass wir eine Ziege noch am Ende der Trächtigkeitsperiode immunisirten und dass schon am vierten Tage die Milch des Thieres einen relativ hohen Schutzwert besass, den wir als mindestens 1600 bezeichneten. Es besagt dies, dass ein Cubikcentimeter Milch 1600<sup>grm</sup> Körpergewicht (Maus) gegen eine einfache Infection zu schützen im Stande ist oder mit anderen Worten, dass durch jenes Quantum Milch 80 Mäuse à 20<sup>grm</sup> gegen die gerade tödtliche Dosis geschützt werden. Seit dieser Zeit, etwa von Mitte April ab, haben wir die Ziege mit vollvirulenten Culturen behandelt und zunächst *experimenti causa* häufig, aber relativ kleine Dosen gereicht. Es zeigte sich unserer Erwartung entsprechend, dass dieses Verfahren zwar nicht die mindesten Gefahren, aber auch keinerlei Vortheile bot, indem die Immunität bei einem so überaus vorsichtigen Vorgehen nur sehr langsam steigt. Wir gingen nun dazu über, durch vereinzelte, dafür aber stärkere und schnell gesteigerte Einspritzungen, welche in längeren Zwischenräumen erfolgten, eine lebhafte Reaction des Organismus hervorzurufen<sup>1</sup>. Schon bei den

<sup>1</sup> Behring (*Blutserumtherapie I*) reclamirt das Princip der Immunitätssteigerung durch immer grösser werdende Injectionen vollgiftiger Culturflüssigkeiten mir gegenüber als sein geistiges Eigenthum. Ich muss diesen Anspruch als einen nicht berechtigten zurückweisen. In den ersten Arbeiten von Behring, sowie in denen seines Mitarbeiters Kitasato ist an keiner Stelle zu ersehen, dass Behring das Princip der Steigerung der Immunität erkannt habe. Im Gegentheil weisen Aeusserungen (*Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1890, S. 1147 und *diese Zeitschrift*, 1891, Bd. X, S. 299), nach denen durch die Injection vollvirulenter Culturen bei Diphtherie und Tetanus Immunität verschwindet, gerade auf eine entgegengesetzte Richtung hin. In meiner Arbeit über Ricin und Abrin habe ich, wie ich als bekannt

ersten derartigen Versuchen fiel es uns auf, dass nach jeder Injection die Schutzkraft der Milch in auffälligem Maasse schwankte. Es erinnerten diese Versuche an einige Wahrnehmungen, die Ehrlich Jahre lang vorher an mit Ricin behandelten Kaninchen gemacht hatte. Von der Anschauung ausgehend, dass die erste Wirkung der Injection in einer Verminderung des im Blute der immunisirten Thiere befindlichen Antikörpers, des Antiricins, bestehen müsste, hatte Ehrlich das Blut vor und nach der Injection einer vergleichenden Prüfung unterzogen und dabei in der That ein Absinken des Werthes nachweisen können. Jedoch war es damals aus äusseren Gründen nicht möglich, den Thieren oft genug Blut zu entziehen, um den Verlauf der Vorgänge genauer beobachten zu können. Als wir schon nach der ersten stärkeren Injection an der Milch ähnliche Beobachtungen machten, entschlossen wir uns, an diesem so leicht zugänglichen Material jene Vorgänge eingehend zu verfolgen. Dementsprechend haben wir, indem wir alle 2 Tage, gelegentlich auch täglich, den Schutzwert der Milch bestimmten, eine Curve construirt, welche den Verlauf und die Schwankungen der Immunisirung auf's Klarste erkennen lässt. Derartige curvenmässige Darstellungen, wie sie zum ersten Male von Ehrlich beim Ricin angewendet wurden, sind für das Verständniss dieser Fragen von hohem Werth, da man mit ihrer Hülfe den gesetzmässigen Ablauf der Immunisirungsvorgänge am besten erkennen kann.

Bevor wir nun zur Darlegung unserer Resultate übergehen, müssen wir zuvor die Methoden, die bei den Prüfungen angewandt wurden, des Eingehenden schildern, da sonst ein Vergleich der Zahlen, die von verschiedenen Beobachtern gegeben sind, nicht möglich ist. Bei einer Versuchsreihe, die sich wie die unsrige auf fast ein halbes Jahr erstreckte, ist es das erste Erforderniss, nach einem einheitlichen Plane zu arbeiten. Nur auf diese Weise kann man es ermöglichen, dass die einzelnen Theile der Curve mit einander vergleichbar sind. Wir haben dies dadurch zu erreichen gesucht, dass wir stets ein möglichst gleichmässig ausgewähltes Thiermaterial benutzten und die Prüfungen nach ein und derselben Me-

---

voraussetzen darf, als erster eine genaue zahlenmässige Untersuchung über Immunität und Immunitätssteigerung vorgenommen. Diese meine Arbeit ist nachher wiederholt von anderer Seite als Ausgangspunkt von Immunitätssteigerung ganz in dem Sinne, wie sie jetzt Behring als sein Eigenthum anspricht, benutzt worden. Auch bei der Immunitätssteigerung bei Tetanus kommt es, wie neuerdings gezeigt worden ist, nicht auf die Zufuhr lebender Bakterien an, sondern auf die Einverleibung eines höchst giftigen Materials, auch wenn dies keimfrei ist.

Ich hätte also weit eher die Berechtigung, Herrn Behring gegenüber Reclamation zu erheben.

Ehrlich.

thode vornahmen. Das Grundprincip, welches bei der Prüfung der immunisirenden Kraft der Milch benutzt wurde, beruhte auf der Methode der Multipla, welche zuerst von Ehrlich in systematischer Weise beim Ricin und Abrin angewandt worden ist. Man sucht die Höhe der Immunität durch das Multiplum der einfach tödtlichen Dosis zu bestimmen, welches nach Einverleibung einer bestimmten Menge Milch von dem Versuchsthier ertragen wird. Eine andere Prüfungsart beruht darauf, dass man das Minimum der immunisirenden Substanz festzustellen sucht, das vor der einfach tödtlichen Dosis schützt. Bei der ersten Methode variiert die Menge des zugeführten Giftes, bei der zweiten die Menge des Antikörpers. Es besteht kein principieller Unterschied zwischen beiden Prüfungsmethoden. Voraussetzung aller Prüfungen ist die Verwendung eines constanten Giftmaterials. Wir benutzen hierzu noch immer eine Mischung gleicher Theile Tetanusbouillon und Glycerin. Dieses Gemisch erfährt in den ersten Zeiten nach der Darstellung eine Abschwächung, erreicht aber bald einen Endwerth, der sich, wie wir uns durch fortlaufende Untersuchungen überzeugt haben, Monate hindurch unverändert erhält. Dieses günstige Resultat verdanken wir wohl dem Umstande, dass wir das Gemisch von dem Beginn der Untersuchung ab vor Wärme, Licht und Sauerstoff schützten. Zu diesem Zwecke füllten wir es in kleine, fast genau bis zum Stopfen gefüllte Fläschchen, die ausserdem durch Paraffin oder Collodium möglichst gedichtet wurden<sup>1</sup>.

Da wir den vollen Schutzwert der Milch feststellen wollten, haben wir nie Milch und Gift gleichzeitig injicirt, sondern stets erst die Milch eingeführt und erst später, um eine vollkommene Resorption abzuwarten, das Gift einverleibt. In der ersten Zeit der Untersuchung haben wir die Einverleibung des Giftes etwa nach 4 bis 6 Stunden vorgenommen, später aber der vollkommenen Gleichmässigkeit halber 24 Stunden gewartet. Im Interesse der Homogenität haben wir den Versuchsthieren stets das gleiche Quantum Milch, 0.2<sup>ccm</sup> injicirt. Ausserdem haben wir stets für einen einheitlichen Infectionsmodus gesorgt, indem wir immer dicht rechts von der Schwanzwurzel das Tetanusgemisch injicirten und zwar durchschnittlich in Quantitäten von 0.2 bis 0.4<sup>ccm</sup>. Unmöglich dagegen war es, bei einer viele Hundert Mäuse umfassenden Versuchsreihe, immer gleichmässige Mäuse zu verwenden. Thiere unter 13<sup>grm</sup> haben wir principiell nicht zur Verwendung gebracht. Thiere von 16 bis 18<sup>grm</sup> wurden bevorzugt. Doch schwankte das Gewicht häufig von 14, 15 bis 20<sup>grm</sup> und

<sup>1</sup> In einigen Fällen haben wir auch — im Mai dieses Jahres — dem Gemisch stark reducirende Körper, die besonders der Reihe der photographischen Entwickler entnommen waren, zugesetzt und uns in der That überzeugt, dass diese Bouillon einen etwas höheren Wirkungswerth behielt als die Controlbouillon.

darüber. Es ist nun in praxi, wenn man z. B. einer Reihe Mäuse von verschiedenem Gewicht das 1-, 2-, 3-fache der tödtlichen Dosis injiciren will, ausserordentlich umständlich, für jedes Gewicht eine bestimmte Lösung herzustellen. Durch einen einfachen rechnerischen Kunstgriff gelingt es, diese Schwierigkeit zu umgehen, indem man sich dadurch von dem Körpergewicht unabhängig macht, dass man den Mäusen stets die auf 20 <sup>grm</sup> berechnete Menge giebt<sup>1</sup>. Auf diesem Wege gestaltet sich die Ausführung und Berechnung der Injectionen ausserordentlich einfach, indem wir alle Zahlen auf eine Normalmaus von 20 <sup>grm</sup> beziehen können, natürlich nur unter der Voraussetzung, dass die absoluten Mengen der zugeführten Milch bei allen Mäusen gleich sind. Ein einfaches Beispiel mag die Richtigkeit des Gesagten beweisen. Wenn 0.2 <sup>ccm</sup> Milch eine Maus von 20 <sup>grm</sup> gegen die 10fach tödtliche Dosis schützen, so würde ein Cubikcentimeter eine Maus von 20 <sup>grm</sup> gegen die 50fach tödtliche Dosis schützen oder 1 <sup>ccm</sup> 1 <sup>grm</sup> Maus gegen die 1000fach tödtliche Dosis. Der Immunisirungseffect wäre mithin 1000. Nehmen wir aber das thatsächliche Gewicht der Maus, der wir die Injection gemacht haben nicht gleich 20 <sup>grm</sup>, sondern der Einfachheit halber = 10 <sup>grm</sup> an, so ist die Rechnung folgende. Die 10 <sup>grm</sup> Maus hat 0.2 <sup>ccm</sup> Milch erhalten und die für eine Maus von 20 <sup>grm</sup> zehnfach tödtliche Dosis. Dieses Quantum ist eben für die halb so schwere Maus das doppelte, d. h. das 20fache. Es stellt sich dann die Berechnung, wie folgt:

0.2 <sup>ccm</sup>	Milch	schützen	10 <sup>grm</sup>	Maus	gegen die	20fach	tödtl. Dosis,	folglich
1.0 <sup>ccm</sup>	"	"	10 <sup>grm</sup>	"	"	100fach	"	also
1.0 <sup>ccm</sup>	"	"	1 <sup>grm</sup>	"	"	1000fach	"	"

Man sieht demnach, dass unter diesen Umständen vollkommen identische Werthe erhalten werden. Die Werthe stimmen und müssen auch absolut übereinstimmen. So viel über die von uns angewandte Methodik, welche Fehlerquellen, soweit sie vermeidbar sind, ausschliesst. Der beste Beweis hierfür ist es wohl, dass wir wochenlang bei der täglichen Prüfung stets untereinander völlig übereinstimmende Werthe erhalten haben. Allerdings ist ein solches Resultat nur möglich, wenn man über ein gleichmässiges Durchschnittsmaterial von Thieren verfügt. Ist man dagegen nicht in der Lage, sich die Thiere auswählen zu können, so beeinflusst die Individualität der Mäuse das Resultat in der erheblichsten Weise. So sind z. B. gewisse Varietäten der Mäuse, besonders solche,

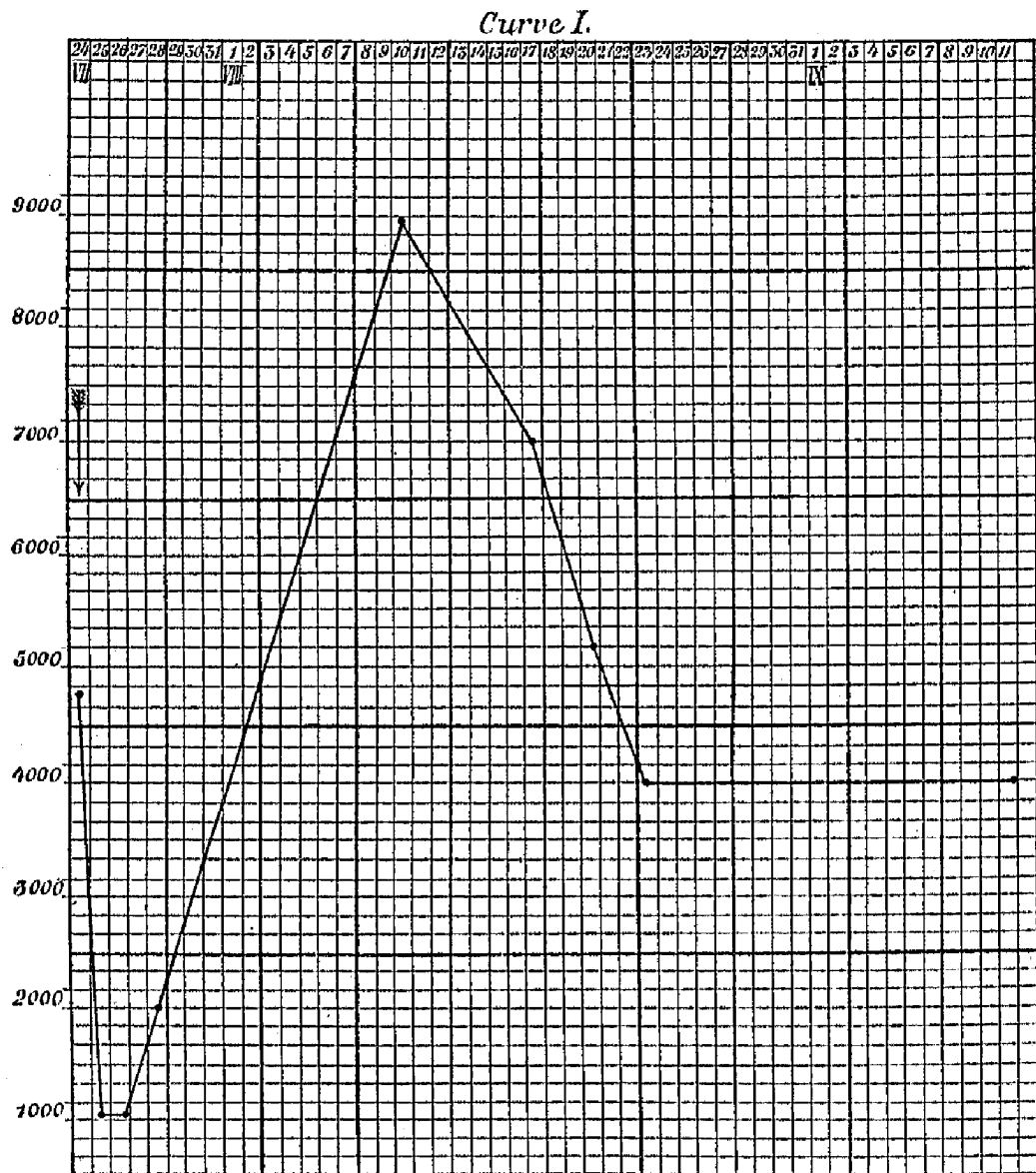
<sup>1</sup> Von der letzten von uns verwandten Prüfungsmischung stellte 0.1 der 28fachen Verdünnung die zehnfach tödtliche Dosis dar. Als Normallösung zu weiteren Verdünnungen diente uns daher eine Lösung von 1:14, von der 0.1 die 20fach tödtliche Dosis darstellt.

die sich durch einen schlechten Ernährungszustand charakterisiren, zumal kleine Thiere, sehr empfindlich gegen Tetanus, während manche Rassen, die sich durch ausserordentliche Wildheit, kräftigen Körperbau und stark hervorquellende Augen auszeichnen (sogen. Springer) bis doppelt so resistent gegen Tetanus sein können. Ist man durch Thiermangel gezwungen, derartig ungleichmässiges Material zu den Versuchsreihen heranzuziehen, so gelingt es niemals, wie wir es während drei Wochen erfahren haben, übereinstimmende Werthe zu erhalten.

Auf einen wellenförmigen Verlauf des Immunisirungsvorganges wurden wir durch eine Injection aufmerksam, die wir am 27./VI. vornahmen. Wir fanden damals nach einer Injection von 75 <sup>ccm</sup> vollvirulenter Bouillon, dass der Wirkungswerth, welcher vor der Injection 4000 betrug, am folgenden Tage schnell herabging, um dann wieder zu 7000 anzusteigen und darauf abzufallen. Wenn es auch bei dem ersten Versuche nicht gelang, die Grenzwerte scharf zu fassen, so war doch so viel ersichtlich, dass die Injection grosse wellenförmige Schwankungen der Curve erzeugte. Bei einem zweiten Versuch gelang es uns besser, den eigenthümlichen Verlauf zu skizziren und so einen Einblick in die Wirkung der Injection zu gewinnen. Da es bei unserem Versuch an erster Stelle darauf ankam, über den Verlauf der Erscheinung klar zu werden, so haben wir mit der folgenden Injection so lange gewartet, bis der Wirkungswerth der Milch Wochen hindurch constant geworden war. Für die Zwecke der Erhöhung der Immunität war ein derartiges Vorgehen nicht empfehlenswerth, für die Aufhellung der vorliegenden Fragen war es aber unerlässlich. Wir lassen zunächst die nebenstehende Curve folgen, in welcher der Tag der Injection durch eine Marke gekennzeichnet ist.

Man ersieht, dass die erste Wirkung der Injection darin besteht, dass schon am Tage nach der Injection der Werth der Milch, der etwa 4000 betragen haben konnte, sofort auf 1000 herabsank. Auf dieser niederen Stufe erhielt er sich auch am folgenden Tage, um vom 5. Tage an allmählich aufzusteigen, so dass am 17. Tage ein Maximum von 9000 erreicht war. Von da ab fiel der Werth sofort gleichmässig herab, um am 29. Tage post injectionem einen Endwerth von 4000 zu erreichen, der nun Wochen hindurch unverändert blieb und dann durch spätere Injectionen in die Höhe getrieben wurde. Auf jeden Fall deutet eine derartige Curve auf complicirte biologische Verhältnisse hin. Das erste Wellenthal, das sich unmittelbar an die Injection anschliesst, erklärt sich am ungezwungensten dadurch, dass das eingeführte Tetanusgift eine bestimmte Menge des im immunisirten Körper befindlichen Antistoffes direct bindet oder anderweitig vernichtet, und dass dem derart verringerten Bestande des Körpers eine geringere Ausscheidung durch die Milch ent-

spricht. Die zweite Phase ist durch ein hohes Ansteigen gekennzeichnet, das in diesem Falle zu dem doppelten, in anderen Fällen aber zu einem weit höheren Multiplum des Ausgangswerthes führen kann. Dieser Wellenberg verdankt seine Entstehung einer Reaction des Organismus, die durch eine Ueberproduction von Antikörpern den Ausfall zu decken sucht. Analogon Verhältnissen begegnen wir in der Biologie ausserordentlich häufig.



Wenn wir sehen, dass starke brüske Temperaturerniedrigungen, wie sie Kairin und Thallin bei Fiebern hervorrufen, so häufig von einem hyperpyretischen Anstieg gefolgt sind, wenn wir sehen, dass jede ausgiebige Vernichtung von weissen Blutkörperchen — Leukolyse — schnell von einer hochgradigen Vermehrung der Blutkörperchen gefolgt ist — Leukocytose —, so erkennen wir aus diesen Thatsachen, die wir leicht ver-

mehren könnten, dass der Organismus das Bestreben zeigt, jeden Ausfall einer Function sofort nicht nur zu decken, sondern überzucompensiren. Der Gipfel des Wellenberges unserer Curve entspricht der maximalen Arbeitsleistung des Organismus. Eine solche ist aber stets nur eine vorübergehende. Ebenso wie, um bei den obigen Beispielen zu verweilen, die Hyperpyrese schwindet, ebenso wie die secundäre Leukocytose nicht Stand hat, so verhält sich's auch mit dem Wellenberg unserer Curve. Wir kommen hier zur dritten Phase, zu dem Abfall des Wellenberges und der Einstellung auf einen bestimmten dauernden Endwerth. Wie das secundäre Ansteigen beträchtliche Zeit in Anspruch nimmt, so ist auch die Periode des Absinkens eine relativ langsame, indem sie bei unserem Versuch ca. 2 Wochen erforderte. Von da ab wurde ein constanter Endwerth erreicht, und damit kommen wir zu dem vierten Theil der Curven, welcher parallel der Abscissenlinie verläuft, d. h. zu einer constanten Einstellung. Die Kenntniss dieser complicirten Schwankungen ist eine ausserordentlich wichtige, und zwar besonders nach zwei Richtungen hin. Zuerst betrifft dies die Beurtheilung der erreichten Immunitätshöhe.

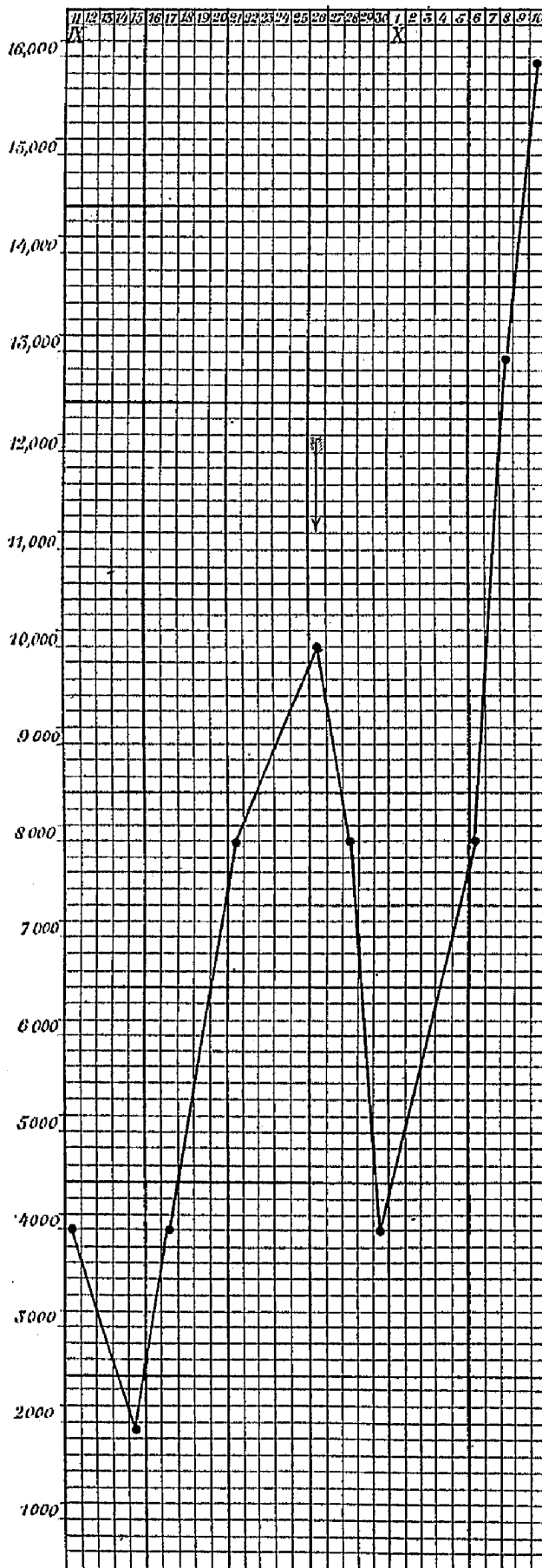
Wie ein Blick auf die Curve zeigt, bietet die Immunitätshöhe nach der Injection solche Schwankungen, dass ein Erkennen des wirklich erreichten Werthes durch eine zu früh ausgeführte einmalige Prüfung unmöglich ist. Nimmt man nämlich die Prüfung in den ersten Tagen nach der Injection vor, so erhält man viel zu niedrige Werthe, während man in der zweiten Periode in den entgegengesetzten Fehler verfällt. Wartet man dagegen 4 bis 5 Wochen nach der Injection, so ist es möglich, die wirkliche, constante Immunitätshöhe zu bestimmen<sup>1</sup>.

In zweiter Linie beanspruchen unsere Beobachtungen auch eine gewisse Bedeutung für die beste Art der Hinauftreibung der Immunität. Im Allgemeinen muss man die Immunitätserhöhung durch Injicirung möglichst rasch gesteigerter Dosen erreichen können. Nun zeigt sich aber, wenn man die Curve unbefangen beobachtet, dass der Zeitpunkt, an dem die Injection erfolgen muss, kein willkürlicher ist, sondern dass er ein zeitlich beschränkter und auf den Raum von wenigen Tagen be-

<sup>1</sup> In seiner kürzlich erschienenen Monographie: *Die Blutserumtherapie* II. berichtet Behring, dass er in Gemeinschaft mit Caspar mit dem Urin seiner gegen Tetanus immunisirten Pferde ähnliche Versuche angestellt hat wie wir mit der Milch. Jedenfalls hat Behring die beiden ersten Phasen der Curve, das Absinken und das reactive Steigen beobachtet, nicht aber die dritte und die vierte Periode des Absinkens und der gleichmässigen Einstellung. Das Datum unserer Versuche beweist, dass wir uns schon lange vor Behring's Publication mit diesem Gegenstande beschäftigten. Uebrigens hatten wir schon geraume Zeit vor dem Erscheinen der Monographie Gelegenheit, Hrn. Geheimrath Koch den eigenthümlichen Verlauf der Curve zu demonstrieren.



Curve II.



grenzter ist. Wir glauben, dass in der ersten Periode des Absinkens die Injektionen grösserer Quantitäten mit gewissen Gefahren für die Versuchsthiere verbunden sind, während im Gegentheil, sobald der Gipfel der Reaction erreicht ist, zur Zeit also, wo die meisten Antikörper vorhanden sind, ungestraft ausserordentlich grosse Mengen virulenter Culturen injicirt werden können. Es ist daher von Wichtigkeit, den richtigen Zeitpunkt für die Injektionen zu wählen, welcher für die Ziege auf den 17. bis 18. Tag nach der vorangegangenen Einspritzung fällt.

Wir haben in Folge dessen einen derartigen Versuch angestellt. Nebstehende Curve illustriert den steilen Abfall und die ausserordentliche Steigung der Curve.

Für den Augenblick begnügen wir uns auf den wellenförmigen Charakter der Immunisirungscurven und deren Bedeutung für die Praxis des Immunisirens hingewiesen zu haben.

## II. Ueber die Concentrirung der Antikörper.

In der ersten Mittheilung hatten wir erwähnt, dass es durchaus nothwendig ist, die Antikörper aus der Milch zu concentriren. Wir bemerkten damals schon, dass nach Abscheidung des Caseins die Molke die ursprüngliche Schutzkraft wie die Milch besitzt, und dass durch Eindampfen dieser Molke die Wirkungskraft entsprechend erhöht wird.

Wir haben nun gefunden, dass man im Stande ist, mit einem Schlage Substanzen von sehr beträchtlichem Schutzwerthe aus der Milch und auch aus anderen eiweissreichen Flüssigkeiten darzustellen.

Unsere Untersuchung wurde in der Weise angestellt, dass wir bei jeder chemischen Procedur immer mindestens durch zwei quantitative Versuchsreihen zu je 6 Mäusen prüften, wieviel Antikörper in die Fällung übergegangen und wieviel in der Molke zurückgeblieben waren.

Auf diese Weise haben wir eine grössere Reihe von in der Chemie gebräuchlichen Fällungsmitteln wie Essigsäure, Tannin, Oxalsäure, Weinsäure, Essigsäure und Chlornatrium, Essigsäure und Ferrocyankalium, Alkohol,<sup>1</sup> Metallsalze, Chlornatrium, phosphorsauren Kalk, Magnesiumhydroxyd, Aluminiumhydroxyd u. s. w. untersucht, und schliesslich in dem auch sonst so bewährten Ammoniumsulfat das am meisten für unsere Zwecke geeignete Fällungsmittel gefunden. Ausser dem Ammoniumsulfat erwies sich für unsere Zwecke noch das Magnesiumsulfat als besonders brauchbar, weniger geeignet hingegen das Natriumsulfat.

Wir haben ermittelt, dass die Antikörper mit dem ersten Antheil der Fällung, die durch 27 bis 30 Procent Ammoniumsulfat erreicht wird, niedergeschlagen werden, während das Filtrat, in welchem sich noch sehr viel Eiweiss befindet, nur noch unbedeutende Reste dieses Antikörpers enthält.<sup>2</sup> Von diesem Princip der fractionirten Fällung ausgehend haben wir den zuerst gewonnenen Niederschlag in Wasser gelöst, im strömenden Wasser dialysirt, dann filtrirt und schliesslich in flachen Schalen bei 35° C. im Vacuum eingedunstet.

Ein Liter Milch ergab alsdann ca. 1<sup>gmm</sup> einer gelblich weissen, transparenten Substanz, die 14 Procent Ammoniumsulfat enthielt, sauer reagirte und leicht in Wasser, noch leichter in Natronlauge oder Soda

<sup>1</sup> Alkohol, der besonders von Tizzoni zur Ausfällung der Antikörper empfohlen wird, hat bei allen unseren Versuchen stets unbefriedigende Resultate ergeben.

<sup>2</sup> Ueber die chemische Natur der Antikörper giebt diese Fällungsmethode keinen Aufschluss. Insbesondere lässt sich daraus kein Schluss ziehen, ob hier wirkliche Eiweisskörper vorliegen oder nicht, da möglicherweise durch die Fällung der Eiweisskörper die Antikörper mechanisch mitgerissen werden.

sich löst. Das trockene Pulver büsst bei höheren Temperaturen seine Wirksamkeit ein.

Mit dem Ansteigen des Schutzwertes der Milch ging natürlich auch die Erhöhung des Immunitätswertes des daraus dargestellten Pulvers Hand in Hand. So besass z. B. bei einem Schutzwert der Milch von 2000 bzw. 6500 das Milchpulver eine Immunisierungskraft von 900 000 bzw. 4 000 000.

Aus unseren Untersuchungen geht also hervor, dass es mit einem Schlage und mit Hilfe einfacher, durchsichtiger Reactionen gelingt, eine pulverförmige Substanz zu erhalten, die 400—600mal so stark wirkt als die Milch. Selbstverständlich haben wir noch weitere Concentration des Antikörpers aus diesem Pulver versucht und zur zweiten Reinigung besonders Magnesiumsulfat erprobt gefunden.<sup>1</sup>

Ausdrücklich wollen wir hervorheben, dass unsere bisherigen Versuche nur zur Orientirung dienen sollten. Wir haben vorläufig nur die Vorfragen erledigt, dass der Antikörper in genügender Menge in die Milch übergeht und dass mit der Steigerung der Immunitätshöhe auch der Gehalt der Milch an Antikörpern wächst. Nachdem es uns auch noch gelungen ist, die Schutzsubstanzen aus der Milch in concentrirter Form zu isoliren, wird es unsere weitere Aufgabe sein, durch in grösserem Maassstabe angelegte Versuche auch grössere Mengen von Antikörpern darzustellen.

---

<sup>1</sup> Nach diesen Principien gelingt es auch, aus dem Blutserum wirksame Stoffe auszufällen. Jedoch liefert dieses Verfahren beim Blute, wahrscheinlich durch Mitfällung anderer Eiweissstoffe, bei weitem nicht die Concentration, wie wir sie bei der Milch erreicht haben.