schiedliches Verhalten bei der Austestung erwarten können. Die Frage, ob die Flavanone als solche die Wachstumshemmung ergeben, oder ob eine Überführung in die Chalkone stattfindet, muß vorläufig noch offen bleiben. Im Gang befindliche Versuche über die Konstitutions-Spezifität der Chalkone werden sicherlich auch in dieser Richtung nähere Aufschlüsse geben können.

Wirkungsmechanismus der Chalkone

Man kann wohl annehmen, daß es sich bei der Hemmwirkung der untersuchten Chalkone nicht nur um eine phenolische Wirkung handelt; vielmehr wird auch die Struktur des ungesättigten Ketons, wie aus dem relativ guten Hemmwert des Chalkons gefolgert werden kann, für den bakteriostatischen Effekt dieser Verbindungen verantwortlich sein.

Durch Serumzusatz wird der Einfluß der Chalkone auf das Wachstum der Bakterien bedeutend geschmälert. Setzt man der Bouillon 1% Serum zu,

so muß z. B. bei Verbindung III die Konzentration von 1:320 000 auf 1:80 000 erhöht werden, um völlige Wachstumshemmung zu erzielen. Bei 10-proz. Serumzusatz ist bei der Verdünnung 1:20 000 keine Bakteriostase mehr zu beobachten. Da der antagonistische Einfluß des Cysteins bei einigen ungesättigten Ketonen und Lactonen bereits bekannt ist, sollte festgestellt werden, ob die Abschwächung der Wirkung durch Serum auf die Anwesenheit der SH-Gruppen zurückgeführt werden kann. Entsprechende Versuche ergaben jedoch, daß selbst 100 Mole Cystein-hydrochlorid auf 1 Mol 2.2'-Dioxy-5-brom-chalkon (III) keine Herabsetzung des Hemmungsvermögens bewirken. Die Wirkungsbeeinträchtigung durch Serum muß daher anderer Natur sein.

Weitere Versuche sollen dieses Problem eingehender behandeln.

Für weitgehendste Unterstützung und wertvolle Ratschläge sind wir Hrn. Doz. Dr. R. Pflieger, Erlangen, in dessen Laboratorium diese Arbeit ausgeführt wurde, zu großem Dank verpflichtet.

Fleckfieber-Klarimpfstoff

Kolloidbiologischer Beitrag zur Antigen-Gewinnung aus Viren

VON FERDINAND JOSEF LAUER

Aus dem Institut für Kolloidkunde und dem Medizinisch-Biologischen Laboratorium
Poppenhausen a. d. Wasserkuppe

(Z. Naturforschg. **3b**, 171—177 [1948]; eingegangen am 11. Februar 1948)

Durch die Verfahren der Ultradispersierung, der Ultrafiltration und des Adsorptions-Dekantierens werden die wirksamen Antigen-Komponenten des Fleckfieber-Impfstoffes von Ballast-Eiweißen und Fremdstoffen getrennt und in möglichst großem Reinheitsgrad gewonnen.

Es zeigt sich, daß sich die beim Immunisieren wirkenden Antigen-Komponenten AJ und AT gemeinsam im Klarimpfstoff gewinnen lassen. Weiterhin kann durch Ultrafiltration die Komponente AJ, die hauptsächlich für die Schutzwirkung gegen Fleckfieber-Infektion Bedeutung hat, von der Komponente AT getrennt werden.

Während die Komponente AJ mechanischen, chemischen und adsorbierenden Kräften gegenüber beständig ist, besitzt die Komponente AT eine sehr labile chemische Natur; sie ist leicht adsorbierbar durch geeignete organische Kolloide und schwer adsorbierbar durch anorganische Kolloide.

Die Klarimpfstoffe enthalten keine intakten Rickettsien oder sensibilisierenden Ballaststoffe. Die Haltbarkeit des Klarimpfstoffes wird wahrscheinlich durch das Fehlen leicht zersetzlicher Fremdstoffe wesentlich erhöht.

Es ergeben sich durch die Verwendung von Klarimpfstoff folgende Tatbestände: Die Immunisierung gegen Fleckfieber ist nicht an die Impfung mit intakten Rickettsien gebunden. Die Antigene sind nach Trennung der groben Eiweiß-Ballaststoffe ungehemmt wirksam und monatelang haltbar.

Die vorliegende Arbeit ging aus einer Arbeitsplanung hervor, die sich die Reindarstellung des Fleckfieber-Erregers oder damit zusammenhängender Wirkstoffe zum Ziel setzte.

Da für eine wirksame Bekämpfung des Fleckfiebers grundlegende Pionierarbeit durch Ricketts und Prowazek, Cox, Otto und andere geleistet und der Erreger als solcher bekannt

war, interessierte hauptsächlich die möglichste Reindarstellung der Wirkstoffe zur Bekämpfung des Fleckfiebers. Die von Ballaststoffen befreiten Impfstoffe werden Klarimpfstoffe genannt. Sie sind wasserklar und können verschiedene wirksame Antigene enthalten, die gerade gewünscht werden.

1. Die Fleckfieber-Impfstoffe der Gegenwart

Die Erfahrungen der letzten Jahrzehnte, insbesondere die des ersten und zweiten Weltkrieges, haben gelehrt, daß eine wirksame Bekämpfung des Fleckfiebers einerseits durch Vernichtung der Rickettsien-Überträger und andererseits durch Impfung der von einer Infektion bedrohten Person erreicht wird¹. Der Impfstoff zeigt je nach Herstellung und Herkunft mehr oder weniger starke Reaktionen beim Impfung. Herstellung und Herkunft bedingen neben den Wirkstoffen einen größeren oder kleineren Gehalt an Fremdeiweißen und an für den Impfvorgang nicht erforderlichen Stoffen. Am meisten erprobt ist der Impfstoff aus Läusedärmen nach Weigl². Die Weiglsche Impfung bringt außer den Rickettsien auch Gewebstrümmer der Läusedärme sowie Zellelemente artfremden Eiweißes in den Körper des Impflings. Der Gehalt an Wirkstoffen für die Impfung ist relativ klein im Verhältnis zu den Fremdstoffen, die mit der Impfung nichts zu tun haben und den Körper heftigen oder schwachen Reaktionen mit unnützem Energieverbrauch aussetzen. Dem schwer zu beschaffenden Läuse-Impfstoff stehen bezüglich der Fremdstoffanteile die anderen, aus Organzerreibungen bereiteten flüssigen oder festen Impfstoffe in nichts nach, selbst wenn sie nach der Gewebszerreibung durch mehrfaches Zentrifugieren mehrmals von größeren Gewebsteilen gereinigt werden. Genannt seien einfache Trockenimpfstoffe, Lungengewebs-Impfstoffe und Versuchsimpfstoffe des Peritoneums aus röntgengeschädigten Mäusen oder Ratten sowie die Impfstoffe, die aus der Chorioallantois des Hühnerembryos gewonnen werden.

2. Das mikroskopische und elektronenoptische Bild der Fleckfieverviren und die sich daraus ergebenden nachteiligen Eigenschaften der Fleckfieber-Impfstoffe

Betrachtet man makroskopisch einen handelsüblichen Fleckfieber-Impfstoff, der nach Otto und Wohlrab aus Dottersackmaterial des Hühnerembryos gewonnen wird, so sieht man eine stark milchige, trübe Emulsion mit groben Partikeln. Im mikroskopischen Bild erkennt man

außer einer relativ geringen Masse von Rickettsien große Anteile von Gewebstrümmern, Dottersackmaterial, insbesondere Eiweiße (Abb. 1*).

Das übermikroskopische Bild³ zeigt neben außerordentlich groß erscheinenden Fremdstoffen die Fleckfieber-Rickettsien als organisierte Viruskörper von zellartigem Aufbau (Abb. 2) mit einem Exoplasten (1) und einem Bipol-Protoplasten (2), an dessen Polen mikrosomenartige Körnchenanhäufungen (3, 4) liegen, die durch das Centropasma (5) verbunden sind. Der relativ starke Exoplast schließt den Innenkörper ein. Gelegentlich beobachtete Loslösung des Exoplasten vom

Abb. 2. Rickettsien, nach dem elektronenoptischen Bild³ gezeichnet.

Endoplasten (Abb. 2c) kann auf elektronenoptische Einflüsse zurückgeführt werden oder durch Vitalprozesse hervorgerufen sein.

Von den kokkenförmigen Rickettsien kolloider Größenordnung abgesehen, schwanken die Zellabmessungen des hier elektronenmikroskopisch betrachteten Fleckfieber-Virus zwischen den einzelnen Virus-Individuen. In der Längsachse werden Exoplastenlängen von $0,68\mu$ — $1,12\mu$ gemessen. Der bipolare Endoplast weist Längen von $0,52\mu$ — $0,72\mu$ auf und die gekörnten Mikrosomenflächen besitzen Längenwerte von $0,20\mu$ — $0,24\mu$.

Elektronenmikroskopisch sind organisierte Einzelteile des Viruskörpers nachweisbar. Durch bestimmte „Einzelteile“ ist die Antigenwirkung zu erwarten. Alle anderen Virusteile sind genau so als Fremdstoffe für die Impfung anzusehen, wie die makroskopischen Eiweißreste des Dottersackes der Chorioallantois im Eier-Impfstoff.

Wenn bei der Injektion eines unreinen Impfmateri als gelegentlich starke Reaktionen bei den

* Abb. 1 s. Tafel, S. 196a.

³ H. Sikora, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 124, 250 [1944]; H. Eyer u. H. Ruska, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 125, 483 [1944].

¹ W. Hagen, Klinik u. Praxis 1, 228 [1946].

² Kolle-Hetsch, Bakteriologie u. Infektionskrankheiten, 1942.

Impflingen auftreten, so kann man die Schuld dem großen Fremdstoffgehalt einschließlich der unwirksamen Rickettsienteile zuschreiben. Die Reinigung der Impfstoffe durch Zentrifugieren führt nicht zu dem notwendigen Reinheitsgrad.

Zur Vermeidung einer Sensibilisierung ist die Herstellung reiner Impfstoffe wünschenswert.

3. Neue Wege zur Erfassung von Antigenen

Die bisher beschrittenen Wege zur Herstellung der Antigene bei Impfstoffen beschränken sich auf eine Erfassung der Erreger in toter oder lebender Form (oft durch Tierpassagen oder anderswie in ihrer Virulenz abgeschwächt), die in Aufschwemmungen isotonischer Lösungen dem Impfling zugeführt werden.

Aus den Viruskörpern (z. B. Rickettsien) lassen sich nun die Antigene für Impfstoffe isolieren. Die Wirksamkeit der Impfstoffe ist nicht an die Anwesenheit der unversehrten Rickettsienkörper gebunden. Durch die Verfahren zur Herstellung der Klarimpfstoffe lassen sich die bisher in den Impfstoffen vorgelegenen Verunreinigungen völlig beseitigen und wirksame Exo- und Endo-Antigene sowie ihre Trümmer gewinnen. Ausgehend von dem Fleckfieber-Impfstoff aus Dottersäcken, kann ein Klarimpfstoff erhalten werden, der 1. einen höchsten Reinheitsgrad aufweist, 2. als Impfstoff hochwirksam ist und 3. für diagnostische Zwecke vielleicht neue Möglichkeiten erschließt. Die serodiagnostische Verwendung der Klarimpfstoffe muß noch erprobt werden.

Zur Erfassung der Antigene von Fleckfieber-Impfstoff führen drei Hauptwege, die ihrerseits die Antigene jeweils in Komponenten getrennt oder ungetrennt gewinnen lassen. Es können zwei Gruppen von Antigenen erfaßt werden, die bei einer aktiven Immunisierung nach den Ausführungen von Siegert⁴ zwei Immunitätsfaktoren auslösen, eine „antiinfektiöse“ und eine „antitoxische“ Komponente, die sich unabhängig voneinander ausbilden und einen verschiedenen hohen Grad ihrer Wirksamkeit erreichen können.

Je nach dem beabsichtigten Endzweck dienen drei kolloidchemische Arbeitsgänge zur Trennung der Antigene von den Ballaststoffen im Fleckfieber-Impfstoff: 1. Die *Ultradispersierung*, 2. die *fraktionierte Ultrafiltration*, 3. das *Adsorptions-Dekan-*

tieren. Diesem hat eine Ultradispersierung voranzugehen. Die 3 Arbeitsgänge werden im folgenden erläutert.

4. Die Ultradispersierung von Viren

Als Ultradispersierung wird eine Feinstzerteilung von an sich schon kolloiden Teilchen bezeichnet, die in den Größenbereich hochmolekularer Systeme führt.

Die Ultradispersierung erfolgt mit einem Dispersierungsmittel, das als Schleifmittel wirkt. Es hat eine Korngröße, die im Bereich der Größenordnung der Rickettsien liegt.

Ausgangsmaterial für die Antigen-Gewinnung des Fleckfiebers durch Ultradispersierung war der aus Dottersäcken gewonnene Eier-Impfstoff⁵. Wird der Eier-Impfstoff in einen Mörtel gebracht und lange Zeit mit dem Pistill gestoßen oder zerrieben, so verändert er sich nicht. Gibt man aber ein dispersierendes Mittel hinzu, so werden die Viren angegriffen. Dabei werden die Exoplasten der Viruskörper gesprengt und die Endoplasten zertrümmert. Ihre frei gemachten Endo-Antigene gehen in Lösung.

5. Die fraktionierte Ultrafiltration der Antigene

Es wurde sowohl unbehandelter als auch ultradispersierter Eier-Impfstoff der fraktionierten Ultrafiltration unterworfen.

Als Filter wurden selbsthergestellte und auch technische Ultrafeinfilter sowie Ultrafeinfilter mit Einschwemmschichten benutzt. Zur Beurteilung der Teilchengrößen des Filtrats und des Rückstandes sind die Filterdaten zu Beginn und am Ende der Ultrafiltration von besonderer Bedeutung. Über Konzentrationsänderungen der Wirkstoffe des Ausgangsimpfstoffes und des Klarimpfstoffes infolge der Siebwirkung bei kontinuierlicher Ultrafiltration soll später berichtet werden.

Die Filtrationsgeschwindigkeit verringert sich stark mit der Filtrationszeit und Aufgußmenge, da die großen Ballast-Eiweißmengen des Eier-Impfstoffes mit der Zeit die Filterporen verstopfen. Adsorptionswirkungen scheinen im besondern vorzuliegen, da auch das Rühren des Aufgusses keine Änderungen der Filtrationszeit bringt. Die großen Adsorptionswirkungen bei den feinen Porenradialen im angewandten Filterbereich werden schon von Elford⁶ besonders

⁵ Der Eier-Impfstoff wurde zuerst vom Sächs. Serumwerk durch Hrn. Dr. Budde und für systematische Untersuchungen vom Staatsinst. f. exp. Therapie, Prof. Dr. R. Otto und Dr. R. Siegert, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

⁶ W. J. Elford, J. Pathol. Bacteriology 34 [1931].

⁴ R. Siegert, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 127, 512—520 [1947].

	Filter- dicke d_g in cm	Hohl- raum- volu- men W in cm ³	Mittl. Poren- radius r_3 in $\mu\mu$	Bezeichng. für	
				Rück- stand R	Filtrat F
1. Vorfiltration Papierfilter . . .	0,016	0,670	1700	R_0	F_0
2. Grob-Stufe Ultrafeinfilter grob	0,015	0,816	34	R_1	F_1
3. Mittel-Stufe Ultrafeinfilter mittel	0,152	0,817	22	R_2	F_2
4. Fein-Stufe Ultrafeinfilter fein	0,009	0,657	5	R_3	F_3

Tab. 1. Filtrationsschema.

hervorgehoben. Außerdem sind Siebwirkungen der Filter und Einschwemmfilter bei den vorliegenden Ultrafiltrationen beteiligt.

Im obigen Filtrationsschema (Tab. 1) werden für eine fraktionierte Ultrafiltration die Filterdaten, insbesondere die mittleren Porenradien, angegeben, die der Impfstoff zu passieren hatte. Das Schema wurde je nach Versuchslage abgewandelt benutzt oder völlig abgewandelt bei Benutzung von Einschwemmfiltern.

Mikroskopisch und ultramikroskopisch lassen sich die Fraktionen auf anwesende Rickettsien überprüfen.

Zum Tierversuch gelangten sowohl die Filtrerrückstände R als auch die Filtrate F. Sie wurden qualitativ und quantitativ auf ihren Gehalt an Antigen-Komponenten untersucht.

Die zeitraubende und mühevoll fraktionierte Ultrafiltration durch verschiedene Filterstufen kann durch Verwendung eines einfachen Filters oder eines groben Ultrafeinfilters mit Hilfe einer Einschwemm-schicht vereinfacht werden. Im Laufe des Filtrationsvorganges formiert sich diese Einschwemm-schicht aus Ballast-Eiweiß und Zusatzmaterial. Der mittlere Porenradius dieser Schicht wird mit fortschreitender Filtration stetig kleiner. Es können so zu verschiedenen Filtrationszeiten verschiedene Fraktionen des Aufgusses erhalten werden.

Ein einziges Einschwemmfilter kann für eine bestimmte Menge Impfstoff erfahrungsgemäß benutzt werden, ohne daß die Porengröße einen unteren kritischen Wert erreicht, bei dem die wirksamen Antigene das Filter nicht mehr passieren. Der untere kritische Wert liegt noch oberhalb der Kongorot-Durchlässigkeit der Filter. Das deutet darauf hin, daß einzelne Eiweißmoleküle das Filter passieren, die Antigene somit Proteine sein können. Mit den normalen analytischen chemischen Mitteln sind diese Proteine bisher makrochemisch nicht nachweisbar gewesen.

Die Membrandaten der Einschwemmfilter sind den Messungen nur relativ zugänglich. Ein einmal formiertes Filter, das eine gewünschte Filtereigenschaft

besitzt, kann zur Vergleichsmessung benutzt werden, d. h. es kann mit einem Ultrafeinfilter verglichen werden, das eine ähnliche Durchlaufzeit, Wasserdurchlässigkeit oder einen ähnlichen mittleren Porenradius besitzt wie das Einschwemmfilter. Dieses besteht aus verschiedenen inhomogenen Schichten. Auf dem Ultrafeinfilter lagert eine feine Schicht, die sich aus feinsten organischen und anorganischen Kolloiden zusammensetzt und noch in den Porenhohlraum des homogenen Ultrafeinfilters hineinragt. Diese feine Schicht ist die eigentlich wirksame Filtrationsschicht, die als Filtersieb wirkt. Ihre annähernde Dicke wird anschließend ermittelt. Über der Feinschicht liegen Schichten aus größeren Kolloiden, deren Porengrößen für den Ultrafiltrationsvorgang unwirksam sind.

Für hier benutzte Einschwemmfilter ergaben sich nach der Ultrafiltration von 50 cm³ Eier-Impfstoff E131 folgende Membrandaten:

1. Meßflüssigkeit: aqua dest. mit Viskosität $\eta = 1,0046 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ bei 20° C.
2. Gemessene Dicke des nassen Filters: $d_g = 0,3866 \text{ cm}$.
3. Naßgewicht: $G_n = 10,4458 \text{ g}$.
4. Trockengewicht: $G_t = 3,7245 \text{ g}$.
5. $G_n - G_t = 6,7213 \text{ g}$.
6. Filtrerradius: $r_f = 1,965 \text{ cm}$.
7. Filterfläche: $F = 12,125 \text{ cm}^2$.
8. Das Einschwemmfilter verhält sich wie ein homogenes Ultrafeinfilter mit einem mittleren Porenradius $r_3 = 34 \mu\mu$ (s. weiter unten!). Es ist zu berücksichtigen, daß der Porenradius mehrfach größer sein muß als die filtrierte Antigen-Komponenten⁷.
9. Wasserdurchlässigkeit:
 $D = 26,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{g}/\text{cm}^2$.

Das Einschwemmfilter kann als Ultrafeinfilter aufgefaßt werden, dessen wirksame Siebdicke aus einer quasi-homogenen Schicht besteht mit einer Dicke d , die sich aus vorstehenden Werten nach folgendem Ansatz angenähert berechnen läßt⁸:

$$r_3 = \sqrt{24 D d \eta / W},$$

wo r_3 = mittlerer Porenradius in cm bei unorientierter Porenstruktur, D = Wasserdurchlässigkeit in $\text{cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{g}/\text{cm}^2$, η = H₂O-Viskosität in $\text{g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ bei 20° C bedeuten.

Unbekannt sind: d = Membrandicke = Wirkdicke der Siebschicht des Einschwemmfilters und W = Hohlraumvolumen.

Es ist $r_3^2 = 24 D d \eta / W$; $W r_3^2 = 24 D d \eta$.

Das Hohlraumvolumen ist⁹

$$W = \frac{G_n - G_t}{F d}.$$

⁷ H. Bechhold, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. **112**, 413 [1931]; Kolloid-Z. **55**, 197 [1931].

⁸ E. Manegold u. K. Kalauch, Kolloid-Z. **86**, 96 [1939].

⁹ N. Bjerrum u. E. Manegold, Kolloid-Z. **42**, 103 [1927].

Nach Einsetzen von W folgt:

$$\frac{G_n - G_t}{F d} r_3^2 = 24 D d \eta; \quad (G_n - G_t) r_3^2 = 24 D d^2 F \eta;$$

$$d = \sqrt{\frac{(G_n - G_t) r_3^2}{24 D F \eta}}.$$

Werden die gemessenen Werte eingesetzt, so ergibt sich für das Einschwemmfilter die Dicke d der wirksamen Siebschicht mit einem Porenradius von 34μ zu

$$d = 100,1 \mu = 100,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm.}$$

Aus einem Vergleich zur gemessenen Dicke d_g des Einschwemmfilters geht hervor, daß nur eine feine Schicht des Einschwemmfilters für die Ultrafiltration verantwortlich ist. Sie besteht aus einer leicht deformierbaren Schicht von Gewebeiweiß der Impfstofflösung.

Maximale Porenradien lassen sich bei Einschwemmfiltern nicht einwandfrei bestimmen, da die feine Filterschicht zu leicht zerstört wird. Das Hohlraumvolumen der wirksamen Siebschicht ist nicht bestimmbar, da ihre Naß- und Trockengewichte nicht meßbar sind.

Das Hohlraumvolumen des ganzen Einschwemmfilters ist nach der normalen Formel nicht exakt definiert, da das Filter inhomogen ist. Der Wert für die Dicke der Siebschicht ist deshalb nur ein Näherungswert, der die ungefähre Größenordnung angibt.

Der Vergleichswert, der den Porenradius $r_3 = 34 \mu$ liefert, hat für die Beurteilung der filtrierten Impfstoff-Komponenten dieselbe Bedeutung wie der Meßwert der Porenradien der Ultrafilter. Aus der fraktionierten Ultrafiltration und der Ultrafiltration mit Einschwemmfilter folgt, daß den wirksamen Antigenen mehrere Teilchengrößen zuzuordnen sind:

1. Antigen-Komponenten AJ, die die antiinfektiöse Immunität des Fleckfiebers auslösen: Sie passieren Porenradien bis 34μ . Über die Passage kleinerer Porenradien zwischen 34μ und 5μ kann erst später berichtet werden. Porenradien $r_3 = 5 \mu$ halten die Antigen-Komponenten AJ zurück. Die Antigen-Komponenten AJ sind unempfindlich gegen Adsorption durch organische und anorganische Ultrafeinfilter.

2. Antigen-Komponenten AT, die die antitoxische Immunität des Fleckfiebers auslösen: Sie werden durch Porenradien $r_3 = 34 \mu$ zurückgehalten. Die Antigen-Komponenten AT sind sehr empfindlich und werden leicht durch organische Ultrafeinfilter, aber wenig durch anorganische Kolloide adsorbiert. Sie können in Klarimpfstoffen durch „Adsorptions-Dekantieren“ erhalten werden.

Allgemein kann schon jetzt gesagt werden, daß die Antigen-Komponenten AJ eine Größe haben, die kleiner ist als die der Bakteriophagen und größer als die des Oxyhämoglobins. Die Größenordnung der Antigen-Komponenten AT scheint zunächst im Bereich der Bakteriophagengröße zu liegen, da die Ultrafeinfilter mit Porenradien $r_3 = 34 \mu$ nicht passiert werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß die Antigen-Komponenten AT infolge ihrer geringen Größe, die im Bereich der Enzym-Größen $4-10 \mu$ liegen kann, äußerst leicht bei Ultrafiltrationsprozessen adsorbiert werden.

Die folgende Tab. 2 gibt eine Übersicht der hier interessierenden Größenklassen:

Papierfilter-Porenradius	6000 — 50 μ
Membranfilter-Porenradius	3000 — 20 „
Ultrafeinfilter-Porenradius	100 — 1 „
Einschwemmfilter-Porenradius	100 — 0,1 „
<i>Rickettsia prowazeki</i> stabförmig	1120 — 680 „
<i>Rickettsia prowazeki</i> kokkenförmig	680 — 200 „
<i>Bact. prodigiosum</i>	> 750 „
Bakteriophagen	> 65 „
Antigen-Komponenten AJ des Fleckfiebers	< 34 > 5 „
Oxyhämoglobin (Pferd)	> 10 „
Antigen-Komponenten AT des Fleckfiebers	?
Enzyme	4 — 10 „

Tab. 2. Übersicht der Größenklassen.

Die Wirksamkeit der Antigen-Komponenten der Fleckfieber-Impfstoffe wurde durch Siegert⁴ erprobt; die Ergebnisse sind z. Tl. veröffentlicht. Die Antigen-Komponente AJ des Fleckfieber-Impfstoffes wurde in Infektionsversuchen nach vorangegangener Immunisierung an Meerschweinchen, die Antigen-Komponente AT mit dem Henderson-Test¹⁰, einer Toxin-Antitoxin-Neutralisation, an weißen Mäusen geprüft.

Die Antigen-Komponenten AT, die bisher mittels der Ultrafiltrationen für Klarimpfstoffe nicht faßbar sind, lassen sich trotzdem im Klarimpfstoff anreichern, der durch „Adsorptions-Dekantieren“ mit vorausgegangener Ultradispersierung gewonnen wird.

6. Das Adsorptions-Dekantieren

Aus den Darstellungsweisen zur Reingewinnung von Vitaminen, Enzymen, Fermenten und

¹⁰ R. Henderson, Nat. Inst. Health, Bull. 33, 183 [1945].

kolloiden Eiweißkomplexen sind die Adsorptionsverfahren an festen Adsorbentien bekannt (chromatographische Analyse). Dabei werden die Nutzstoffe durch Adsorption angereichert und die Ballaststoffe abgeschieden.

Als „Adsorptions-Dekantieren“ wird ein umgekehrtes Verfahren bezeichnet, bei dem Ballaststoffe, durch feinste kolloide Schwebstoffe adsorbiert, sich absetzen und die Nutzstoffe sich durch Dekantieren der überstehenden Lösung gewinnen lassen. Die kolloiden Schwebstoffe müssen nur im Ausgangssol durch Ultradispersierung erzeugt oder eingebracht werden und aus einem Material relativ hoher Dichte bestehen.

Als Ausgangsstoff diente der Eier-Impfstoff E 131. Er wurde 24 Stdn. unter Zusatz von Dispersierungsmittel ultradispersiert. Es bildete sich ein kolloider adsorbierender Schwebstoff, der im Laufe einiger Tage sedimentierte und die Ballaststoffe aus dem Sol entfernte.

Über dem Sediment steht der Klarimpfstoff, der die gewünschten Antigen-Komponenten AJ und AT enthält, ohne daß die fraktionierte Ultrafiltration zur Anwendung kommt. Wenn der Herstellungsgang so geleitet wird, daß Ausgangsmenge und Endmenge gleich sind, so erhält man Klarimpfstoffe, die ausreichend antiinfektiös sind und antitoxische Eigenschaften bei der Immunisierung auslösen. Es lassen sich auch Anreicherungen, Konzentrate, gewinnen, über die später berichtet wird.

7. Die neuen Klarimpfstoffe

Siegert⁴ hat dargelegt, daß die Fleckfieberimmunität nach aktiver Immunisierung sowohl aus einer „antiinfektiösen“ als auch einer „antitoxischen“ Komponente besteht. Beide Schutzreaktionen können sich je nach der antigenen Zusammensetzung des Impfstoffes unabhängig voneinander und in verschiedener Stärke ausbilden. Die Fleckfieberimmunität beruht im wesentlichen auf dem Gehalt des Organismus an „antiinfektiösen“ Antikörpern, die gegen den Erreger selbst gerichtet sind und damit das Angehen einer Infektion verhüten. Die „antitoxischen“ Schutzstoffe dagegen werden erst nach etwaiger Durchbrechung des „antiinfektiösen“ Impfschutzes wirksam, wenn der Erreger sich im Organismus vermehrt und Toxine bildet. Die dann ermöglichte Giftneutralisation führt zu einer Abschwächung der Krankheitserscheinungen. Hieraus ergibt sich die Forde-

rung, daß jeder Impfstoff beide Antigenkomponenten in optimaler Menge enthalten soll. Die Prüfung dieser Komponenten erfolgt im „Infektionsversuch“ an immunisierten Meerschweinchen und im „Neutralisationstest“ nach Henderson, wobei die neutralisierende Wirkung von Meerschweinchen-Immunseren gegenüber einer ganz bestimmten Giftmenge einer Rickettsienemulsion an weißen Mäusen ausgewertet wird¹¹.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden die Klarimpfstoffe auf ihre antigene Wirkung geprüft. Sie wiesen, wie in Tab. 3 zusammenfassend dargestellt ist, verschiedene Immunisierungsergebnisse auf, je nach ihrer Herstellungsweise. Alle durch fraktionierte Ultrafiltration aus gelblich dickflüssigen Dottersackimpfstoffen gewonnenen Klarimpfstoffe erzielten eine gleich wirksame „antiinfektiöse“ Immunität bei Meerschweinchen wie die Ausgangsimpfstoffe, während sich — im Gegensatz zu dem unbehandelten Ausgangsmaterial — keine „antitoxische“ Schutzkraft entwickelte. Während also im Klarimpfstoff die eine wirksame „antiinfektiöse“ Immunität auslösende Antigen-Komponente AJ erhalten blieb, war die die „antitoxische“ Immunität bewirkende Antigen-Komponente AT durch den Filtrationsprozeß verlorengegangen. Somit erfüllte der auf diese Weise erzielte Klarimpfstoff nicht die an ihn zu stellenden Anforderungen. Dagegen gelang es, durch Adsorptions-Dekantieren einen Klarimpfstoff herzustellen, der beide gewünschten Antigen-Komponenten in ähnlicher Stärke aufwies wie das Ausgangsmaterial. Er ist in Tab. 3 als Klarimpfstoff L 106 D 1 bezeichnet.

In der folgenden Tab. 3 sind aus einer großen Versuchsreihe zur Herstellung von Klarimpfstoffen vier derselben angeführt. Die Tabelle läßt die angewandten Arbeitsgänge und die Eigenschaften der Klarimpfstoffe erkennen.

Bei allen Impfstoffen liegt eine Komponente AJ vor, die die antiinfektiöse Komponente bei der Immunisierung auslöst. Danach ist die Komponente AJ sehr stabil gegenüber mechanischen Beanspruchungen bei der Ultradispersierung, sie wird weder bei der Ultrafiltration noch beim Adsorptions-Dekantieren adsorbiert. Weiter ist sie bis 60° C hitzebeständig und gegenüber Phenol resistent.

Die Komponente AT, die die antitoxische Kom-

¹¹ R. Otto u. R. Siegert, Arb. Staatsinst. exp. Therap. Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a.M. 1947.

Ausgangs-Impfstoff: E 131	Klarimpfstoffe:				
	L 79/80	L 84/86	L 85	L 106 D ₁	L 106 R ₀ (Sed.)
Ultradispersiert (Zeit in Std.) . .	24	24	0	24	24
Ultrafiltriert	ja	ja	ja	nein	nein
Adsorptions-dekantiert	nein	nein	nein	ja	ja
Hitzesterilisiert bei 60° C	3 × 1 Stde.	0	0	0	0
AJ-Komponente-auslösend +	+	++	+	+	+
AT-Komponente-auslösend +	0	0	0	+	+
AT-Komponente-nicht-auslösend 0 }					
Antitoxintiter n. Henderson . . .				1:16	1:2

Tab. 3. Herstellung und Wirkung einiger neuer Klarimpfstoffe. Diese wurden mit 0,5% Phenol versetzt.

ponente bei der Immunisierung auslöst, kommt nur in Klarimpfstoffen vor, die nach dem Verfahren des Adsorptions-Dekantierens hergestellt sind. Die Komponente AT ist unempfindlich gegenüber der Ultradispersierung. Sie ist sehr empfindlich gegenüber Ultrafiltrationen, bei denen sie organischen Adsorbentien ausgesetzt ist. Dagegen verhält sie sich neutral gegenüber den anorganischen Adsorbentien, die beim Adsorptions-Dekantieren zur Anwendung kommen. Diese Tatsache wird unterstrichen durch einen negativen Ausfall des Henderson-Testes ab Antitoxintiter $> 1:2$, der mit dem Sediment L 106 R₀ des Adsorptions-Dekantierens gewonnen wird. Nach früheren Versuchen ist die Komponente AT wärmeempfindlich und wird nach Messungen von Siegert schon bei Temperaturen von $> 48^{\circ}\text{C}$ zerstört. Die Komponente AT ist phenol-resistent.

Über die Natur der Komponenten kann bisher gesagt werden, daß es sich um Proteine verschiedener Größen handelt, die im Abschnitt über die Ultrafiltration der Antigene gekennzeichnet sind.

Die neuen Klarimpfstoffe haben ein wasserklares Aussehen. Im Tyndall-Kegel ist eine äußerst schwache Lichtstreuung wahrnehmbar. Eine 10-proz. wäßrige Sulfosalicylsäurelösung gibt eine nur im Tyndall-Kegel sichtbare schwache Trübung, die auf einen bestimmten Gehalt an Proteinen hinweist. Über das kolloidchemische Verhalten und die physikalisch-chemische Natur der Klarimpfstoffe soll später berichtet werden. Die Haltbarkeit der Klarimpfstoffe ist hinreichend erwiesen. Sie sind im Gegensatz zu den normalen Eier-Impfstoffen des Fleckfiebers kaum temperatur- und kälteempfindlich. Sie eignen sich zum Gebrauch in allen Klimaten, ohne daß besondere Lagerbedingungen eingehalten werden müssen.

Nach einer Lagerzeit von 1 Jahr bei den jahreszeitlichen Schwankungen in einem ungeheizten Raum waren sie voll wirksam. Die Zukunft wird erweisen, ob Klarimpfstoffe ohne die leicht zersetzlichen Ballasteiweiße und Fremdstoffe normaler Fleckfieber-Impfstoffe noch an ein bestimmtes Verwendbarkeitsdatum gebunden sind. Die Verimpfung der Klarimpfstoffe beim Menschen soll in den üblichen Dosen von 0,5, 0,5 und 1,0 cm³ erfolgen. Über die Dosierung beim Impfen mit Konzentraten erfolgt besondere Mitteilung.

Die Erfahrung beim Impfen am Menschen wird lehren, inwieweit durch die Verwendung des Klarimpfstoffes eine bisherige, auf Fremdstoffen beruhende Belastung des Körpers vermieden wird. Außer der Vermeidung sensibilisierender Eigenschaften hat ein Klarimpfstoff auf den Impfling keine abstoßende, ekelerregende Wirkung wie ein gelblich-dickflüssiger Eier-Impfstoff. Weiterhin darf man annehmen, daß der Klarimpfstoff eine Anaphylaxie vermeidet, deren Fehlen für weitere Impfungen von Bedeutung ist.

Diese Arbeit wurde 1944 begonnen im ehemaligen Kolloidchemischen Institut der Techn. Hochschule Dresden, in Zusammenarbeit mit dem ehemaligen Hygienischen Institut Dresden. Nach dem Brande von Dresden wurden die Arbeiten im Med.-Biol. Laboratorium Poppenhausen a. d. Wasserkuppe beendet, in Zusammenarbeit mit dem Paul-Ehrlich-Institut und Georg-Speyer-Haus zu Frankfurt a. M., wo die immunbiologische Auswertung der Impfstoffe von Hrn. Dr. R. Siegert in dankenswerter Weise durchgeführt wurde.

Hrn. Geh. Med.-Rat Prof. R. Otto sei für die immunbiologische Mitarbeit, Hrn. Prof. E. Manegold für die kolloidchemischen Anregungen bestens gedankt.

Für die sorgfältige Durchführung der langwierigen Versuchsreihen danke ich meiner med.-techn. Assistentin, Frl. Gundel Barkhausen.