



# Untersuchungen über die Immunität des Frosches gegen Milzbrand.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doctorwürde

der medicinischen Facultät zu Königsberg i. Pr.

vorgelegt und am 7. Juli 1888 nebst den beigefügten Thesen

öffentlich verteidigt

von

**Johannes Petruschky,**

pract. Arzt.

Opponenten:

Dr. Gustav Hildebrandt, pract. Arzt,

Eugen Czaplewsky, cand. med.



Jena,

Gustav Fischer.

1888



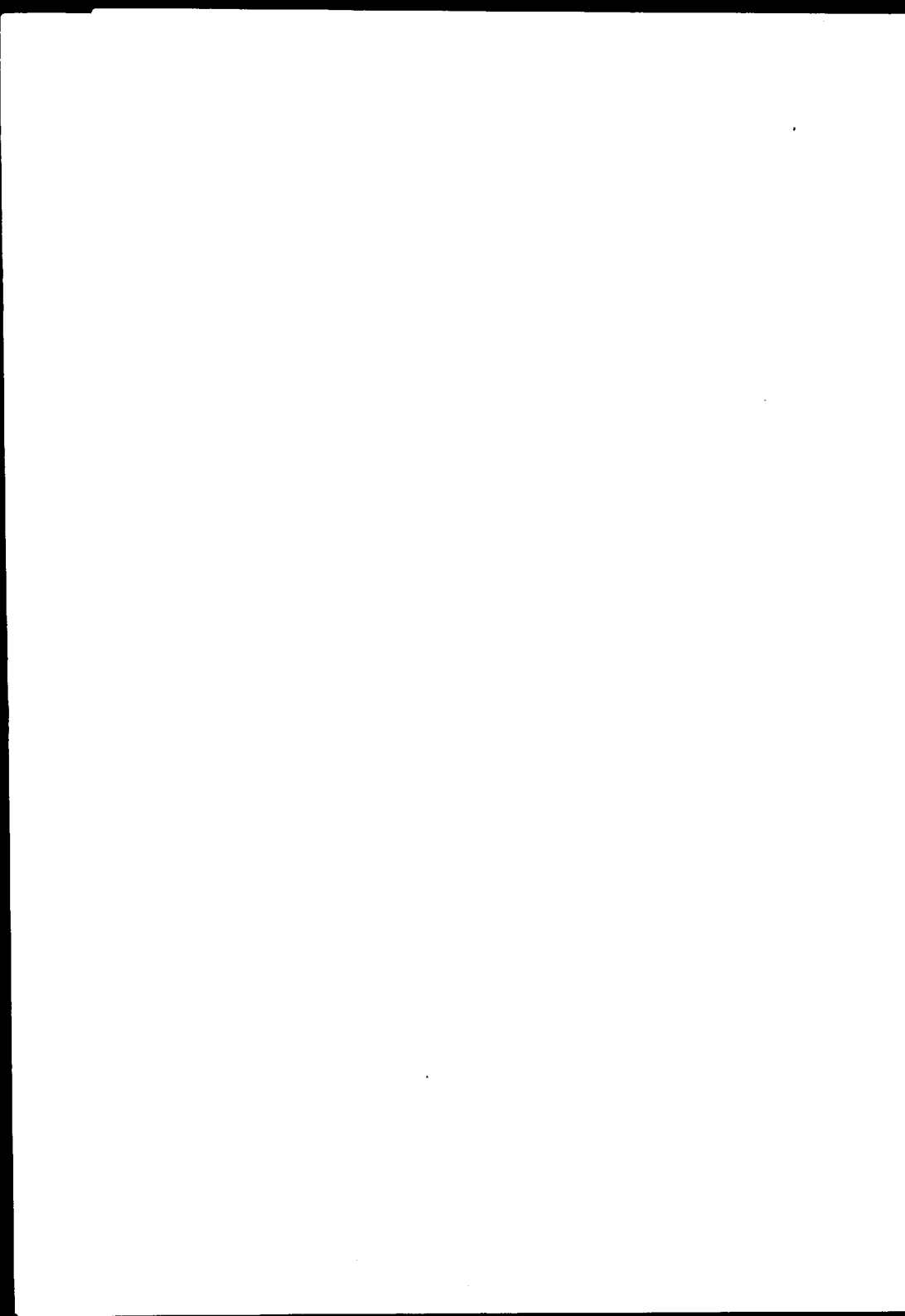
Seinem verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. Baumgarten

in Dankbarkeit zugeeignet

vom

Verfasser.



Die Frage nach den Ursachen der Immunität gewisser Thiergattungen gegenüber bestimmten Mikroorganismen, welche für andere Thiergattungen pathogen sind, ist neuerdings Gegenstand mannigfacher Forschungen und lebhafter Discussionen gewesen. METSCHNIKOFF (Odessa) hat, gestützt auf Beobachtungen bei einer Daphnien-Krankheit, sowie bei Milzbrandimpfungen am Frosch u. s. w., eine Theorie aufgestellt<sup>1)</sup>, nach welcher die Leukocyten als Vertheidiger des Organismus gegen eingedrungene Bakterien betrachtet werden. Die weissen Blutkörperchen, meint METSCHNIKOFF, haben vermöge ihrer Verwandtschaft mit den freien Amöben, welche sich u. a. in den „amöboiden Bewegungen“ kundgiebt, die Fähigkeit, eingedrungene Bakterien „aufzufressen“ und dadurch eben den Organismus vor der Schädigung durch dieselben zu bewahren, falls es ihnen gelingt, „im Kampfe“ mit den Bakterien die Oberhand zu behalten. Diejenigen Thiere seien nun immun gegen einen bestimmten Mikroorganismus, deren Leukocyten ihn zu besiegen und zu „fressen“ vermöchten; diejenigen Thiere aber seien empfänglich für ihn, deren Leukocyten die Bakterien nicht zu fressen vermöchten. Diese Theorie, welche bei ihrer Einfachheit und ihrer Analogie mit dem grossen Kampf ums Dasein in der Thierwelt viel Bestechendes hat, gewann auf der einen Seite zahlreiche Anhänger, während auf der andern Seite — am entschiedensten von BAUMGARTEN — Widerspruch gegen dieselbe erhoben wurde.

BAUMGARTEN<sup>2)</sup> hält wegen anderweitiger Erfahrungen die Leukocyten nicht für fähig, den Kampf mit einem bei genügender Nahrung so überaus wachsthumskräftigen und widerstandsfähigen Organismus, wie ihn die Bakterien darbieten, zu bestehen. BAUMGARTEN führt vielmehr die Immunität bestimmter Thiere gegen bestimmte Bakterien darauf zurück, dass die betreffende Bakterienart in dem betreffenden Thierkörper nicht den ihr entsprechenden Nährboden —

1) VIRCHOW's Archiv, Band 96 und 97.

2) BAUMGARTEN, Pathologische Mykologie, Band I und II.

worunter die Gesamtheit der Ernährungsbedingungen zu verstehen ist — findet. METSCHNIKOFF's Beobachtungen spricht er die Beweiskraft im Sinne der „Phagocytenlehre“ ab.

Die bei immunen Thieren factisch zu beobachtende Aufnahme von Bacillen durch Leukocyten erklärt BAUMGARTEN nicht für die Ursache, sondern für die Folge der Immunität: „Nicht weil die Bacillen von den Leukocyten gefressen werden, wachsen sie nicht im Thierkörper, sondern erst, weil sie nicht wachsen können, werden sie von den Leukocyten aufgenommen, wie auch andere — unbelebte — Corpuscula, Kohlenstäubchen, Zinnoberkörnchen u. s. w. von den Leukocyten aufgenommen werden. Diese Auffassung BAUMGARTEN's wurde nun wieder von anderer Seite angegriffen und (von HUEPPE<sup>1)</sup> namentlich) auf METSCHNIKOFF's Milzbrandversuche am Frosche als „experimentum crucis“ hingewiesen, welches angeblich die Richtigkeit der Theorie METSCHNIKOFF's darthun soll. Da der Gegensatz der Meinungen zur Zeit noch besteht, so erschien es nicht unangemessen, den Versuch zu machen, durch Erweiterung, resp. modificirte Wiederholung der Versuche METSCHNIKOFF's am Frosche mehr Licht auf die in Rede stehende Frage zu werfen.

Im Interesse der Resultate scheint es nun gut, die zu lösenden Fragen vorher genau zu präcisiren.

Die Hauptfragen lauten:

I. Unter welchen Umständen ist der Frosch immun gegen Milzbrand, unter welchen eventuell nicht?

II. Ist im ersteren Falle die „Fressthätigkeit“ der Leukocyten die eigentliche Todesursache der Bacillen oder nicht?

III. Sind Anzeichen zu finden, welche auf eine andere Todesursache, als die Leukocyten, hinweisen?

Eine Lösung dieser Hauptfragen soll angestrebt werden durch Beantwortung folgender Specialfragen:

1) Innerhalb welcher Zeit werden eingeführte Milzbrandbacillen von den Leukocyten des Froschlymphsackes incorporirt?

2) Werden sämmtliche eingeführte Milzbrandbacillen aufgenommen?

3) Werden vorzugsweise virulente Bacillen aufgenommen?

4) Werden auch unbelebte, mit den Bacillen zugleich injicirte Corpuscula aufgenommen?

5) Welche Schicksale haben die aufgenommenen Bacillen?

6) Welche Schicksale haben die etwa frei bleibenden Bacillen?

7) Innerhalb welcher Zeit bleiben die Milzbrandbacillen, welche im Froschkörper verweilt haben, noch wachsthumsfähig?

8) Innerhalb welcher Zeit bleiben dieselben noch virulent?

---

1) „Fortschritte der Medicin“, No. 5. — 1. März 1888. (Besprechung von BAUMGARTEN's Werk: Pathologische Mykologie II.)

Zur Beantwortung dieser Fragen unternahm ich nun die folgenden Untersuchungen auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. Dr. BAUMGARTEN, welchem ich für seine überaus gütige Unterstützung meinen aufrichtigsten und verbindlichsten Dank ausspreche.

### Erste Versuchsreihe.

In den Rückenlymphsack von Fröschen, die bei einer Zimmertemperatur von etwa 20° C gehalten wurden, spritzte ich virulente Reinculturen von Milzbrandbacillen ein, und zwar theils den verflüssigten Theil von Gelatine-Culturen, theils den in destillirtem Wasser vertheilten Belag von Agar-Culturen, theils Gemische von beiden (wobei sich Verschiedenheiten in der Wirkung nicht ergaben). Organstücke von an Milzbrand verstorbenen Thieren einzuführen, schien weniger rathsam, weil die in ihnen enthaltenen Bacillen der Lymphflüssigkeit sowohl, als den Leukocyten sehr ungleichmässig zugänglich sind, wodurch naturgemäss auch die Gleichmässigkeit und Klarheit der Resultate gestört werden muss. Zur Injection wurden verhältnissmässig grosse Mengen der Culturflüssigkeit (0,5—2,0 ccm) benutzt, damit der ganze Rückenlymphsack des Frosches von Milzbrandbacillen erfüllt werde und die Fortschwemmung eines Theils derselben nicht in Betracht komme. In einigen Fällen wurde eine Mischung der Culturflüssigkeit mit feinvertheilten Kohle- resp. Zinnoberpartikelchen injicirt. In einigen anderen Fällen wurde eine stark sporenhaltige, auf der Kartoffel im Wärmeschrank gewonnene Kultur injicirt, deren Bacillen mit Ausnahme der Sporen selbst durch zweistündiges Erhitzen auf 62° C getödtet waren. Die Injectionswunde wurde meist mit einem Collodium-Häutchen überzogen, wiewohl dieselbe auch ohne dieses schnell zu heilen pflegte. Eine offen bleibende Wunde schafft indessen Complicationen, welche die Deutung der Resultate zu erschweren geeignet sind.

Die reichlichen Injectionen wurden von sämtlichen 12 bei Zimmertemperatur gehaltenen Fröschen, die keine offene Wunde hatten, ohne Eintritt einer Milzbranderkrankung ertragen, wiewohl die maximale Virulenz der benutzten Culturen an Mäusen erwiesen war.

Bei den geimpften Fröschen bildete sich innerhalb der ersten zwölf Stunden ein mehr oder weniger bedeutendes Exsudat aus, welches oft eine pralle Spannung des Rückenlymphsackes bewirkte. Vom dritten Tage nach der Impfung ab begann dasselbe sich wieder zurückzubilden. Das Exsudat enthielt ausser der serösen Flüssigkeit reichliche Leukocyten. In den mit Kohle oder Zinnober geimpften Fällen trat eine reichliche Hämorrhagie hinzu; auch war das Exsudat hier massiger und andauernder; zuletzt bildete sich durch Verwachsungen eine Absackung

desselben im Steisstheil des Rückenlymphsackes, während in den nur mit Culturflüssigkeit geimpften Fällen das Exsudat schliesslich ganz verschwand. Die Vorgänge, die sich im Lymphsack des Frosches abspielten, wurden in der Weise beobachtet, dass von Zeit zu Zeit (4 Stunden bis 14 Tage nach der Impfung) mittelst Einstichs in die Haut und Einführung eines Lymphröhrchens Tropfen der den Lymphsack erfüllenden Flüssigkeit entnommen wurden, welche theils frisch auf hohlgeschliffenen Objectträgern untersucht, theils eingetrocknet und gefärbt wurden; ein Theil der gewonnenen Tropfen wurde durch Vaseline-Verschluss auf hohlgeschliffenen Objectträgern vor dem Trocknen geschützt und tagelang aufbewahrt, um das etwaige Auswachsen der Bacillen zu beobachten. Ferner wurden bei Gelegenheit der meisten Entnahmen Culturen auf Gelatine mit der entnommenen Flüssigkeit angelegt, sowie zahlreiche Impfversuche an Mäusen und einigen Kaninchen ausgeführt.

### Mikroskopische Erscheinungen.

Die beobachteten Erscheinungen zeigten in allen Versuchen eine ausserordentliche Uebereinstimmung und Klarheit.

In den ersten (4 bis 8) Stunden nach der Impfung zeigen sich in den entnommenen Tropfen netzartig durcheinander liegende lange und kurze Milzbrandfäden, an denen sich zum Theil bereits Gruppen von Leukocyten festgesetzt haben. Theilweise sieht man die Bacillen nur an den Leukocyten liegen, theilweise aber auch deutlich durch das Innere derselben ziehen. Sehr häufig stecken kleine Bacillenfäden mit dem einen Ende in einem Leukocyten und ragen mit dem andern Ende frei heraus.

In denjenigen Fällen, in welchen der Impfflüssigkeit Kohle oder Zinnober beigemischt war, sah man indessen auch viele kleine Theilchen dieser Massen in Leukocyten liegen; manche Leukocyten hatten sogar Milzbrandbacillen und Kohletheilchen zugleich in sich aufgenommen. Ebenso wurden abgetödtete Milzbrandbacillen, sowie Milzbrandsporen reichlich von Leukocyten aufgenommen. Die noch frei liegenden Leukocyten zeigten die charakteristische Vielgestaltigkeit, welche sie durch die Aussendung der Pseudopodien erhalten; doch war auch bei anhaltendster Beobachtung einer bestimmten Stelle eines hängenden Tropfens eine sichtliche Gestaltveränderung eines einzelnen Leukocyten nicht direct zu constatiren.

Die Leukocyten werden durch die langsame Strömung, welche im hängenden Tropfen vor der Gerinnung der Lymphe herrscht, an den Milzbrandfäden dicht vorbeigeführt, wobei einige an denselben haften bleiben, andere nicht.

Der Vorgang des Einschlusses scheint der zu sein, dass die Leukocyten vermöge ihrer klebrigen Beschaffenheit an einzelnen Bacillenfäden

haften bleiben, auf welche sie durch die Lymphströmung oder durch ihre sehr langsame Eigenbewegung hingeführt werden, und welche sie dann vermöge ihrer amöboiden Bewegungen umschliessen. Dass gerade die Leukocyten — und auch die Bacillen — ein bedeutendes Klebvermögen besitzen müssen, zeigt auch folgender Versuch: Wenn man ein lufttrocken gewordenes Deckglas-Präparat von Frosch- oder Säugethierblut (oder einer Mischung von Lymphe und Blut) auf einer wässrigen Flüssigkeit 3–5 Minuten schwimmen lässt, so fallen die rothen Blutkörper fast sämmtlich heraus, die Leukocyten dagegen und die etwa darin enthaltenen Bacillen bleiben regelmässig am Deckglase haften.

Die in den ersten 4–8 Stunden nach der Impfung gewonnenen Lymph-Präparate bieten bereits in der einfachen Färbung mit Gentianaviolett oder Bismarckbraun ein klares und übersichtliches Bild. Die in den Leukocyten liegenden Theile der Bacillen-Fäden treten jedoch besser hervor bei der Färbung nach GRAM oder noch schöner bei der Doppelfärbung nach GRAM-GÜNTHER<sup>1)</sup>, welche die Leukocyten röthlich, die Milzbrandfäden dunkelblau erscheinen lässt. Die Bacillen zeigen in diesen ersten Stunden noch fast durchweg ein glattes, gleichmässiges, gesundes Aussehen. Nur hier und da erscheint ein frei liegender kurzer Faden ungleichmässig contourirt oder theilweise in bröckligem Zerfall begriffen, eine Erscheinung, welche im Verlaufe der folgenden Zeit immer deutlicher zu Tage tritt. Es sind dies wahrscheinlich Bacillen, welche bereits in der Cultur weniger lebenskräftig waren. Denn es ist anzunehmen, wie auch aus den folgenden Beobachtungen hervorgeht, dass in jeder Milzbrandcultur ausser den ganz frischen, voll wachsthumskräftigen Bacillen sich auch verschiedene Stufen von weniger lebensfrischen [wahrscheinlich älteren] Bacillen befinden, die vielleicht dann, wenn sie auf einen sehr günstigen Nährboden (Mäusekörper etc.) gelangen, noch proliferationsfähig sind, in einem direct ungünstigen Medium jedoch schnell dem Absterben anheimfallen, während lebenskräftigere Bacillen derselben Cultur sich noch längere Zeit vegetationsfähig zu erhalten vermögen. In den Culturen selbst sind diese verschiedenen Stufen durch Färbung meist nicht hinlänglich zu unterscheiden; bei denjenigen Versuchen aber, welche eine progressive Vernichtung von Bacillen bewirken (so auch bei BRÄHM's gleichzeitig im hiesigen Laboratorium angestellten Untersuchungen über die Degenerationserscheinungen pathogener Bakterien in destillirtem Wasser) tritt dieser Unterschied dadurch hervor, dass nicht sämmtliche Bacillen gleichmässig dem Untergange anheimfallen, sondern die einen früher, die andern später, bis schliesslich auch die letzten wachsthumskräftigen Bacillen abgetödtet sind. Im Froschkörper nun scheint die Abtödtung der Milzbrandbacillen mit gewissen Degenerationserschei-

1) Deutsche med. Wochenschr. 1887, No. 22: Ueber die mikroskopische Färbung der wichtigsten pathogenen Bakterien mit Anilinfarbstoffen.

nungen verbunden zu sein, welche bereits METSCHNIKOFF an den in Leukocyten eingeschlossenen Bacillen mehrere Tage nach der Impfung beobachtet hat. Mir fielen diese Erscheinungen zunächst, und zwar schon 8—12 Stunden nach der Impfung an einigen frei liegenden, kurzen Bacillenfäden auf, von denen ich annehmen muss, dass sie bereits in der Cultur nicht mehr im Besitz ihrer vollen Lebensfähigkeit waren und deshalb jetzt rasch der Zerbröckelung anheimfallen mussten. Im Verlaufe der folgenden Zeit aber — 12—24—48 Stunden nach der Impfung — treten diese Degenerationserscheinungen an einer immer grösseren Zahl der frei gebliebenen Bacillen auf. Das vorhin beschriebene mikroskopische Bild eines Lymphtropfens hat sich am Beginn des zweiten Tages nach der Impfung folgendermaassen verändert:

Am augenfälligsten ist die gewaltige Zunahme des „Phagocytismus“. In fast jedem Gesichtsfelde sieht man eine Anzahl von Leukocyten, die reich mit Bacillenfäden durchsetzt sind. Die Doppelfärbung nach GRAM-GÜNTHER giebt ein sehr anschauliches Bild:

Während kurze Bacillenfäden in mannigfacher Zusammenkrümmung ganz im Innern der Leukocyten liegen oder nach Art einer Haarlocke oder eines Kranzes geringelt sich der Peripherie derselben angelegt haben, ziehen vielfach längere Fäden (wie eine Insectennadel durch den Leib eines Käfers) durch das Innere eines Leukocyten hindurch oder stecken mit dem einen Ende im Leukocyten, während das andere Ende in einer Länge von vielen Leukocyten-Breiten aus demselben frei hervorragt. Auch ragt vielfach eine ganze Anzahl kürzerer Bacillen aus der Peripherie eines Leukocyten hervor und giebt diesem dadurch das Aussehen einer unregelmässigen Sternfigur. Ausser diesen sehr charakteristischen Bildern findet man aber auch um diese Zeit noch in jedem Lymphtropfen eine beträchtliche Anzahl absolut frei liegender Bacillenfäden. An diesen nun hauptsächlich zeigt sich bereits in ungefärbtem Zustande statt des homogenen, glashellen Aussehens eine mehr trübe, opake, oft feinkörnig erscheinende Beschaffenheit. Färbt man einen am Deckglas festgetrockneten <sup>1)</sup> Lymphtropfen nach GRAM, so zeigen die frei liegenden Bacillenfäden stellenweise ein ganz glattes, homogen gefärbtes Aussehen; an andern Stellen aber — meist am einen Ende eines Fadens, hin und wieder auch im ganzen Verlaufe — scheinen dieselben in einzelne Bröckel zerfallen zu sein. Zunächst scheinen die einzelnen Bacillen-Individua, welche normaler Weise annähernd Rechtecke darstellen, sich abzurunden, so dass der ganze Faden eine entfernte Aehnlichkeit mit einer Kokkenkette erhält. Dann sieht man einzelne der

---

1) Die Erhitzung der Präparate wurde meist durch folgendes Verfahren ganz vermieden: die völlig lufttrocken gewordenen Deckglaspräparate wurden 10—20 Minuten lang in Alcohol gelegt und dann wiederum an der Luft getrocknet.

abgerundeten Glieder, welche eine kugelige, ovoide, birnförmige oder ganz unregelmässige, meist auch unscharf begrenzte Gestalt annehmen, sich einzeln abheben; diese Partikel erscheinen anfangs zuweilen wie angeschwollen im Vergleich zu dem gesunden Theil des Bacillenfadens, mit der Zeit werden sie jedoch immer schwächer und durchsichtiger. Oft erscheint das eine Ende des Bacillenfadens wie zugespitzt. Schliesslich zeigt oft nur ein bröcklicher Detritus die Richtung an, in welcher der Faden sich ursprünglich fortsetzte. Diese bröcklige Masse ist bei der Färbung nach GRAM<sup>1)</sup> stets noch deutlich blau gefärbt. Ausreichend deutliche Bilder erhält man auch durch die einfache Färbung mit verdünnter Gentianaviolett-Lösung, sowie mit concentrirter wässriger Vesuvium-Lösung; namentlich giebt letztere recht saubere und klare Bilder und zeigt auch die Degenerationserscheinung mit hinreichender Deutlichkeit.

Eine Differenzirung der Leukocyten von den Bacillen ist am besten durch die GÜNTHER'sche Modification der GRAM'schen Färbung zu erzielen<sup>2)</sup>.

Die in Leukocyten eingeschlossenen Bacillen bieten seltsamerweise innerhalb des ersten und meist auch noch innerhalb des zweiten Tages nach der Impfung keinerlei Degenerationserscheinungen dar. Sie erscheinen vielmehr bei Anwendung der GRAM-GÜNTHER'schen Färbungsmethode ganz glatt und gleichmässig blau gefärbt innerhalb der durch die Vorfärbung mit Pikrocarmin röthlich erscheinenden Leukocyten. Erst etwa 48 Stunden nach der Impfung beginnen sich auch an ihnen dieselben Zerbröckelungserscheinungen nach und nach zu zeigen, die bereits früher an den frei liegenden Bacillen zu bemerken sind. Aber auch die Leukocyten selbst fallen offenbar zahlreich dem Untergange anheim. Etwa vom fünften oder sechsten Tage nach der Impfung sah ich häufig kleine Bacillenhäufen in einer Anordnung und Zusammen-

---

1) Die GRAM'sche Färbung bewirkt bekanntlich auch an manchen Präparaten von ganz normalen Milzbrandbacillen unvermuthet statt des homogenen ein körniges Aussehen der gefärbten Bacillen. Dieses ist von den (ganz regelmässig zu beobachtenden) beschriebenen Degenerationserscheinungen wohl zu unterscheiden. In einzelnen Fällen habe ich Beides combinirt gesehen. Es zeigten sich dann die sonst homogen gefärbten Bacillen wie aus einzelnen feinen Körnchen bestehend und die ovoiden und unregelmässigen Bröckel zeigten neben ihrer Missgestaltung die Körnung ebenfalls. — Diese Eigenschaft der GRAM'schen Methode wird dem Einflusse des Jod zugeschrieben; doch gelang es mir bei frischen Culturbacillen niemals (selbst durch übermässig lange Jodeinwirkung nicht), ein körniges Aussehen derselben zu erzielen. Auch bei den dem Frosch entnommenen Präparaten trat diese Missfärbung nur bei den im hängenden Tropfen sehr langsam eingetrockneten Bacillen zuweilen ein.

2) Dieselbe wurde an Deckglaspräparaten stets unter Weglassung des salzsauren Alcohol ausgeführt.

krümmung liegen (oft auch in jener oben beschriebenen Kranzform), wie sie nur die von Leukocyten aufgenommenen Bacillen anzunehmen pflegen; die Leukocyten selbst aber, in denen diese Bacillen gelegen haben mussten, waren verschwunden. Zu dieser Zeit gelingt es fast niemals mehr, an ungefärbten Präparaten mit Sicherheit Bacillen herauszufinden. Bei Anwendung der GRAM'schen Färbung aber sah ich in einem Falle, bei einem Winterfrosche bis zum 10. Tage nach der Impfung, noch in jedem Lymphtropfen einige frei liegende und ausserdem eine ganze Stufenfolge in Degeneration begriffener Bacillenhäuflein, die theils noch in sichtbaren Leukocyten, theils frei lagen, aber von einem auf diese Bilder einmal eingeübten Auge stets als Bacillenreste erkannt werden konnten. Erst am 17. Tage nach der Impfung waren ziemlich alle Spuren von Bacillen aus der Lymphe verschwunden. — Ein Auswachsen der in den Lymphsack des bei Zimmertemperatur gehaltenen Frosches eingespritzten Bacillen konnte in keinem Falle, weder an den in Zellen eingeschlossenen, noch an den frei liegenden Bacillen mit irgendwelcher Sicherheit beobachtet werden. Ebensovienig wuchsen die in den Lymphsack des kalten Frosches injicirten Milzbrandsporen. Im Blute, welches während des Lebens öfters durch Abtragung einer Zehenspitze gewonnen wurde, zeigten sich bei den Fröschen der ersten Versuchsreihe niemals Milzbrandbacillen.

Die Versuche, das Leben, resp. Abgestorbensein der im Froschkörper gewesenen Bacillen durch die von METSCHNIKOFF angegebene Reaction <sup>1)</sup> derselben auf Vesuvín-Färbung zu prüfen, misslangen. Denn bereits innerhalb des ersten Tages nach der Impfung, an welchem sich die Bacillen bei den nachher zu besprechenden Cultur- und Impfversuchen noch als wachsthumsfähig und relativ virulent erwiesen, ergab sich folgendes Bild bei Zusatz eines Tropfens concentr. wässriger Vesuvín-Lösung zu einem Tropfen entnommener Lymphe: Zuerst färbten sich die Leukocyten, deren Kerne intensiv braun wurden (desgleichen die Kerne der etwa beigemischten rothen Blutkörper). Sodann erschienen in den Bacillenfäden einzelne verstreute gelbe Punkte, bis endlich alle vorhandenen Bacillen durchweg gelbbraun erschienen. Nach METSCHNIKOFF hätten die noch lebenden Bacillen ungefärbt bleiben müssen.

### Impfversuche.

Zunächst wurden zahlreiche Impfversuche an Mäusen mit den im Froschkörper gewesenen Milzbrandbacillen vorgenommen, und zwar nach 5-, 20-, 24-, 26-, 36-, 40-, 44stündigem, ferner nach 2-, 2 $\frac{1}{2}$ -, 3-, 4-

1) Annales de l'Institut Pasteur 1887, No. 1: Sur l'atténuation des bactériidies charbonneuses dans le sang des moutons refractaires.

und 5tägigem Aufenthalte der Bacillen im Frochkörper; viele dieser Versuche wurden mehrfach vorgenommen. In den mit kleinen Quantitäten der Culturflüssigkeit (0,2—0,3 ccm) geimpften Fröschen hatten die Bacillen schon nach 24 Stunden die Virulenz verloren. Die Resultate bei den mit grossen Quantitäten (0,5—2,0) angestellten Versuchen waren erst vom dritten Tage ab constant negativ, doch war bereits nach den innerhalb des ersten und zweiten Tages vorgenommenen Impfungen eine erhebliche Verspätung des Todes der Mäuse zu constatiren. Während nämlich die zur Prüfung der Virulenz der benutzten Culturen geimpften Mäuse bereits 24 Stunden nach erfolgter Impfung starben, lebten die mit 5-, 24- und 26stündigem Frostmilzbrand geimpften Mäuse 2½ Tage, eine mit 20stündigem Frostmilzbrand geimpfte Maus sogar 3 Tage. — Die mit 44- und die verschiedenen mit 48stündigem Frostmilzbrand geimpften Mäuse, denen zum Theil 0,3 ccm der Froshlymphe unter die Haut gespritzt wurde, starben theils nach 3½ resp. 4 Tagen, theils blieben sie überhaupt leben. Von dem am dritten Tage dem Frosche entnommenen Material starb überhaupt nur noch eine Maus (nach 4 Tagen), die übrigen blieben leben. Von den späteren Tagen (4, 5) ist kein positives Infectionsresultat mehr zu verzeichnen, wiewohl in allen Fällen fast noch in jedem Lymphtropfen sowohl freie, als zahlreiche in Zellen eingeschlossene, dabei grösstentheils noch homogen erscheinende Bacillen enthalten waren. In einem Falle, bei einem Winterfrosche, der am fünften Tage nach seiner Impfung zum Infectionsversuch benutzt wurde (welcher negativ ausfiel), konnten noch bis zum zehnten Tage freie Milzbrandbacillen in jedem Tropfen seiner Lymphhe mittelst der GRAM'schen Färbung nachgewiesen werden.

Weitere Infectionsversuche wurden an kleinen weissen Kaninchen vorgenommen mit 48stündiger Milzbrand-Froshlymphe. Wiewohl jedesmal eine volle PRAYAZ'sche Spritze injicirt wurde, fand eine Infection nicht statt. Ein mit einer vollen Spritze 24stündiger Frostmilzbrand-Lymphhe geimpftes Kaninchen starb nach 4 Tagen.

#### Culturversuche.

Es wurden Culturversuche erstens durch einfache Aufbewahrung geronnener Lymphtropfen auf hohlem Objectträger unter Vaselineverschluss, zweitens durch Anlegung zahlreicher (etwa 40) Gelatineculturen vorgenommen. In den aufbewahrten Lymphtropfen aus verschiedenen Stunden des ersten Tages trat (falls dieselben nicht bei Gelegenheit der Herausnahme und des Einschlusses stark mit schnellwachsenden Saprophyten besiedelt waren) fast immer ein Auswachsen einzelner Bacillenfäden ein: nach wenigen Tagen zeigten sich unter dem Mikroskop grosse Massen sehr langer, schlangenartig gewundener Fäden in oft parallel laufender, oft auch nach Art eines verwirrten Garnbündels durcheinanderlaufender Anordnung. — In der bereits wenige Stunden nach

der Impfung entnommenen Lymphe trat dieses Wachstum schnell und sehr reichlich ein; später viel spärlicher. Mit Sicherheit habe ich es immer noch beobachtet in Lymphe, welche 40 und 44 Stunden nach der Injection entnommen war. In den Tropfen vom zweiten, dritten und den folgenden Tagen stellte sich nie mehr Wachstum der Bacillen ein. Die Versuche mit Gelatine-Culturen gaben ein ganz entsprechendes Resultat. Es waren meist keine Reinculturen von Milzbrand, da die schwer zu umgehende Berührung der Froshhaut bei der Entnahme leicht eine Verunreinigung bedingt. Doch waren in den zu verschiedenen Stunden des ersten Tages angelegten Culturen stets reichlich Milzbrandbacillen vorhanden; in den Culturen, die 36, 40 und 44 Stunden nach der Impfung angelegt waren, fanden sich nur noch spärliche Milzbrandfäden, in den später angelegten Gelatine-Culturen liessen sich gar keine mehr nachweisen. Nur mittelst des Plattenculturverfahrens gewann ich noch von 4tägiger Milzbrandfroschlymphe aus dem Inhalt zweier Lymphröhrchen im ganzen 6 herdförmige Milzbrandculturen, welche nach zweitägigem Wachstum auf der Agar-Platte (im Wärmeschrank) eine Maus in drei Tagen tödteten; während, wie oben mitgetheilt, bei directer Ueberimpfung 4tägiger Lymphe vom Frosch auf die Maus eine Infection niemals mehr stattgefunden hatte.

Die Gewinnung abgeschwächter Culturen wurde jedoch nicht fortgesetzt, um die Arbeit nicht von den vorgeschriebenen Bahnen abzulenken.

### Deutung der Versuche.

Fassen wir nun ins Auge, welche Deutung den Resultaten der ersten Versuchsreihe hinsichtlich der Theorie METSCHNIKOFF's zu geben ist.

Zunächst ist die interessante Beobachtung METSCHNIKOFF's, dass die in den kalten Froshkörper eingeführten Milzbrandbacillen in grosser Zahl von den Leukocyten der Froshlymphe incorporirt werden, in keiner Weise zu bestreiten. Auch ist als völlig sicher anzusehen, dass dies bei den vorliegenden Versuchen lediglich durch die Activität der Leukocyten geschieht, nicht durch ein Hineinwachsen der Milzbrandbacillen. Dies geht schon daraus hervor, dass die Aufnahme der Bacillen bereits wenige Stunden nach deren Einführung beginnt und dass ein Auswachsen im kalten Froshkörper überhaupt weder an den Bacillen, noch an den eingeführten Sporen constatirt werden konnte.

Von grosser Wichtigkeit ist nun aber die Frage, ob diese Thätigkeit der Leukocyten als ein wirklicher „Kampf“, und zwar als ein Vernichtungskampf, welchen die Leukocyten als Hüter des bedrohten Froshkörpers gegen die eingedrungenen Parasiten der Milzbrandkrankheit siegreich durchführen, anzusehen ist. Es musste zu

diesem Zwecke nachgeforscht werden, ob sich die Leukocyten mit Vorliebe auf virulente und lebenskräftige Bacillen stürzen, oder ob sie auch oder vorzugsweise oder ausschliesslich todte Bacillen in sich aufnehmen, und wie sie sich gegenüber anderen, mit den Bacillen zugleich injicirten Fremdkörpern verhalten. — Was zunächst den letzten Punkt betrifft, so konnte festgestellt werden, dass die Leukocyten auch andere, und zwar unbelebte Körperchen (Kohle- und Zinnoberstäubchen), mit denen ein „Kampf“ gar nicht zu leisten ist, ebensowohl in sich aufnehmen, wie die Milzbrandfäden, trotzdem dass diese Körper z. Th. doch weit grösser, ferner sämmtlich starrer und wohl auch weniger leicht anhaftend sind als die relativ feinen, weichen, schmiegsamen Milzbrandfäden, von denen natürlich aus diesen Gründen eine grössere Anzahl in den Leukocyten Aufnahme finden kann. Ferner wiesen verschiedene Beobachtungen darauf hin, dass das erste Anhaften der Leukocyten an allen diesen Körperchen wahrscheinlich nur durch deren bedeutendes Klebevermögen bedingt ist, nicht durch eine geheimnissvolle Tendenz zum „Angriff“ auf die Feinde ihres Mutterorganismus. Spricht METSCHNIKOFF also von einem „Angriff“ oder einer „Jagd“ der Leukocyten auf die Milzbrandbacillen, so wird man sich doch bewusst bleiben müssen, dass dies nur als eine bildliche Ausdrucksweise gelten kann, durch welche Anschauungen, die aus dem höheren Thierleben genommen sind, in eine doch weit andersartige Sphäre erst hineingetragen werden.

Die weitere Frage, ob die Leukocyten überhaupt virulente, in der vollen Lebensthätigkeit begriffene Bacillen in sich aufzunehmen vermögen, ist an der Hand der ersten Versuchsreihe allein schwer zu entscheiden. Es stehen sich hier die Beobachtungen gegenüber, dass einerseits ein wirkliches Auswachsen der Bacillen im kalten Froschkörper selbst nicht stattfindet, dass andererseits aber ein Theil der injicirten Bacillen etwa 48 Stunden lang auf Gelatine wachsthumsfähig und für Mäuse virulent bleibt, während innerhalb derselben Zeit im Froschkörper bereits grosse Mengen der eingeführten Bacillen von Leukocyten aufgenommen werden. Da nun, wie wir sahen, schon von vornherein nicht alle Bacillen in gleichem Maasse lebenskräftig sind, und da ausserdem jeder Milzbrandfaden eine ganze Gruppe von Einzelbacillen repräsentirt, so ist es zunächst schon sehr schwer zu entscheiden, ob diejenigen Bacillen, an denen die Leukocyten haften bleiben, um sie nachher einzuschliessen, noch im Vollbesitz ihrer Lebensfunctionen waren oder nicht. Da indessen bereits wenige Stunden nach der Injection die Leukocyten an ganz langen, homogen aussehenden Bacillenfäden sich festsetzen, so schien es mir (nach Maassgabe der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe allein) wahrscheinlich, dass die Leukocyten sämmtliche in den Lymphsack eingeführten Körper von genügender Kleinheit: Kohle- und Zinnoberstäubchen, todte und lebende Milz-

brandbakterien ohne Unterschied in sich aufnehmen. Dennoch möchte ich hier bereits auf die noch offen bleibende Möglichkeit hinweisen, dass sämtliche eingeführten Bacillen, solange sie sich im kalten Froschkörper befinden, wo möglich nicht im Besitze ihrer normalen Lebensfunctionen, d. h. des ihnen eigenthümlichen Stoffwechsels sind und nur theilweis noch eine Weile conservirt werden; ein Gedanke, der bereits METSCHNIKOFF vorgeschwebt zu haben scheint, wenn er die Meinung ausspricht<sup>1)</sup>, dass die Bacillen im kalten Froschkörper nicht jenes hypothetische Gift absondern, welches dieselben im Säugethierkörper und im erwärmten Frosche zur Lähmung der Leukocyten absondern sollen, und welches also offenbar als ein bei normaler Lebens-thätigkeit erzeugtes Stoffwechselproduct der Milzbrandbacillen gelten soll. Eine genauere Besprechung dieser Frage wird erst bei der dritten Versuchsreihe möglich sein.

Die Frage, ob die Bacillen innerhalb der Leukocyten ihr Leben verlieren, hängt also aufs engste mit jener andern zusammen: ob sie es nicht schon vorher verloren haben. Die Bacillenhäuflein, welche schliesslich im Innern der Leukocyten liegen, scheinen in der That endgültig todt zu sein. Wenigstens vermochte ich weder ein Auswachsen derselben im geronnenen Lymph-tropfen festzustellen, noch wurden Mäuse durch die am 4. bis 6. Tage entnommene Lymphe, welche sehr reichlich eingeschlossene Bacillen (daneben auch freie) enthielt, inficirt. Für die eigenthümliche Thatsache, dass die in Zellen eingeschlossenen Bacillen erst später Zerbröckelungs-erscheinungen zeigen als die freien, ist es schwer, einen sicheren Grund zu finden. Die Erscheinung ist vielleicht lediglich eine Folge der mechanischen Einhüllung in die elastische Protoplasmamasse.

Wir kommen nun auf die weitere Frage, ob sich Anzeichen vorfinden, welche noch auf eine andere Todesursache der Bacillen schliessen lässt, die etwa unabhängig von den Leukocyten und noch früher als diese auf die Bacillen wirkt.

Schon der Umstand, dass im kalten Frosche ein Wachsthum der Bacillen (welches an der zunehmenden Menge und eigenartigen Gruppierung der Bacillen unschwer zu erkennen wäre<sup>2)</sup>), nicht stattfindet, sondern vielmehr eine beständige Abnahme der Bacillen von Stunde zu Stunde, legt die Vermuthung nahe, dass noch andere Momente als die Leukocyten mitwirken müssen, um die Daseinsbedingungen für die Bacillen im lebenden kalten Froschkörper ungünstig zu gestalten. Man könnte nun vermuthen, dass etwa die Froschlymphe nicht die nöthigen Nährstoffe für Milzbrandbacillen enthält. Dem steht jedoch entgegen, dass die Milzbrandbacillen in der dem Froschkörper entnommenen,

1) VIRCHOW's Archiv, Bd. 97.

2) cf. Versuchsreihe III.

totden und geronnenen oder durch Kochen zum Culturnedium gemachten Froschlymphe sehr gut gedeihen und kräftig wachsen. Dies Argument ist auch von METSCHNIKOFF benutzt worden, um beweisen zu wollen, dass die Lymphflüssigkeit nach Ausschaltung der Phagocytenhätigkeit kein bacillenfeindliches Medium sei. Hiergegen muss jedoch entschieden geltend gemacht werden, dass die geronnene oder gar gekochte Lymphe doch nicht a priori als identisch betrachtet werden kann mit der im lebenden Körper circulirenden, mit den lebendigen Gewebszellen in steter Berührung stehenden und deren Stoffwechselproducte in sich aufnehmenden Lymphflüssigkeit. Es könnte also andererseits scheinen, als ob die eigenartige Constitution der lebenden Gewebe und der von ihnen beeinflussten Körperflüssigkeiten, welche auch durch die nur mit toten Substanzen arbeitende chemische Analyse nicht direct zu erforschen ist, eine für die Ernährung der Bacillen nicht günstige sei. Das scheint ja für die nicht pathogenen Bakterien (Saprophyten) auch fast allseitig angenommen zu werden. Der Milzbrandbacillus aber vermag gerade (bei den empfänglichen Säugethieren wenigstens) in den lebenden Körpergeweben seine Nahrung zu finden. Nun ist es allerdings sehr wohl denkbar, dass der eigenthümliche Lebensprocess des Kaltblüters es mit sich bringt, dass die Körpersubstanzen desselben von den Bacillen — in der Kälte wenigstens — nicht assimiliert werden können. Dann würde das Absterben der Bacillen im Froschkörper lediglich durch Nahrungsmangel bedingt sein. Doch muss nach Maassgabe der bisherigen Versuche auch die andere Möglichkeit bereits ins Auge gefasst werden, dass nicht das Fehlen der geeigneten Nahrung, sondern eventuell das Vorhandensein bacillenfeindlicher Agentia irgend welcher Art den Froschkörper zu einem ungünstigen Boden für das Gedeihen der Milzbrandbacillen mache. Natürlich muss es das Streben der Wissenschaft sein, diese möglichen Agentia näher zu erforschen, und es wäre ja nun ein sehr erfreuliches Resultat, wenn sich die Leukocyten als die bacillenfeindlichen Agentien mit aller Sicherheit erweisen liessen. Aber selbst den Beweis per exclusionem für diese Annahme machen folgende drei, bei jedem Versuch mit Leichtigkeit festzustellende That-sachen unmöglich:

- 1) dass überhaupt nicht sämtliche eingeführten Bacillen von Leukocyten aufgenommen werden,
- 2) dass gerade an den frei bleibenden sich zuerst Degenerationserscheinungen zeigen,
- 3) dass die Froschlymphe zu einer Zeit, in welcher noch freie Bacillen sich in ihr vorfinden, bereits Mäuse nicht mehr inficirt, dass sie noch früher für Kaninchen indifferent wird und Mäuse langsamer als bei normaler Virulenz tödtet.

Diese That-sachen sind entschieden nicht mit METSCHNIKOFF's



Theorie zu vereinigen; sie weisen vielmehr auf ein Agens hin, welches mit dem Phagocytismus gar nichts zu thun hat. Man könnte erstlich an ein dem Amphibienkörper eigenthümliches chemisches Agens denken, welches eventuell schon bei der Gerinnung der Lymphe zerstört oder gebunden wird; andererseits (wenn man die bacillenwidrige Wirkung durchaus einem directen Zelleneinfluss zuschreiben will) könnte man hier einen ähnlichen, seinem Wesen nach noch unerforschten Einfluss der Lymphsackwandungen annehmen, wie man ihn den intacten Zellen der Gefässwandungen gegenüber dem Blute behufs Flüssigerhaltung desselben zuschreibt. Um nun den Zelleneinfluss möglichst auszuschalten, wurde folgende neue Versuchsreihe angestellt.

### **Zweite Versuchsreihe.**

In dem Bestreben, den Einfluss der lebenden Lymphflüssigkeit auf die Milzbrandbacillen möglichst isolirt zu studiren, fasste ich den Gedanken, Milzbrandbacillen innerhalb des Froschkörpers noch in eine diffusible Membran einzuschliessen, wodurch die Berührung der Bacillen mit den fixen Gewebszellen resp. Lymphsack-Endothelien mit Sicherheit ausgeschlossen, die Annäherung der Leukocyten wenigstens behindert wird, wiewohl eine gewisse Anzahl derselben vermöge der amöboiden Bewegungen doch auch durch Membranen hindurchzudringen vermag.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt: Der einem getödteten Frosche entnommene Darm wurde mittels Durchspülens von Wasser gereinigt und für einige Tage in Alcohol gelegt. Dann wurde derselbe an einem Ende zugebunden, mittels einer Pravaz'schen Spritze mit Luft prall gefüllt und auch am andern Ende geschlossen. (Das Vorhandensein eines Loches konnte auf diese Weise bemerkt, resp. ausgeschlossen werden.) Durch verschiedene weitere Umschnürungen wurde der Darm dann in Segmente von 1—2 cm Länge getheilt und so zunächst in einer „trockenen Kammer“ einige Tage lang dem völligen Austrocknen überlassen. Eigentliche Desinficientia wurden absichtlich nicht in Anwendung gezogen, um dem Einwurfe zu begegnen, dass Reste derselben nachher noch auf die Milzbrandbacillen einwirken könnten. — Diese getrockneten Darmsegmente wurden dann mit Culturflüssigkeit gefüllt, sorgfältig wieder durch Zubinden geschlossen und durch eine nicht allzugrosse Wunde unter die Rückenhaut von Fröschen gebracht. Die Wunde wurde alsdann vernäht und mit Collodium überzogen. — Nach Zeiträumen von 24 Stunden bis 6 Tagen wurden dann solche Darmsegmente wieder vorsichtig aus dem Froschkörper entfernt, mit destillirtem Wasser abgespült, in den Raum zwischen zwei Uhrschildchen gebracht, geöffnet und untersucht, sowie zur Anlage von Culturen und zur Ausführung von Impfungen benutzt.

Die Resultate waren in dieser Versuchsreihe bei den nach gleichen

Zeiträumen aus dem Froschkörper entfernten Darmsegmenten nicht immer genau gleiche. Dies ist wohl aus einer verschiedenen Durchlässigkeit verschiedener Darmabschnitte zu erklären, welche Verschiedenheiten im Flüssigkeits-Ausgleich, namentlich Verschiedenheiten in der Schnelligkeit der Exosmose der den Bakterien mitgegebenen Culturflüssigkeit bedingen muss. Nur in zwei der entnommenen Darmsegmente war eine völlige Abwesenheit von Leukocyten zu constatiren. Dieselben waren am dritten und vierten Tage nach der Einführung entnommen worden und enthielten ein sehr dichtes Netzwerk von Bacillenfäden, von denen ein Theil bereits in ganzer Länge Zerbröckelungserscheinungen aufwies (die auch in der Vesuvín-Färbung deutlich hervortraten), die Mehrzahl aber doch noch ein homogenes, gesundes Aussehen darbot. Beim Impfversuche tödtete der Inhalt des nach drei Tagen entnommenen Darms eine Maus innerhalb von weniger als 48 Stunden, der des nach vier Tagen entnommenen Darmstückes schon etwa 30 Stunden nach der Impfung, woraus zu schliessen ist, dass in letzterem Darmsegment wenigstens ein Theil der Bacillen noch seine fast maximale Virulenz behalten hatte, während ein anderer, nicht unbeträchtlicher Theil schon in der Degeneration begriffen war. Die Erhaltung der Virulenz ist ohne Zwang zu erklären durch die Unvollständigkeit der Exosmose der gelatinösen Culturflüssigkeit aus diesen offenbar schwer durchgängigen Darmsegmenten; die Degeneration bei vorhandenem Nahrungsmaterial ist jedoch überraschend und weist wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit auf eine durch die Lymphflüssigkeit verbreitete, positiv bacillenwidrige (chemische) Substanz des Froschkörpers hin, welche ihre Wirkung auf den schwächeren Theil der Bacillen bereits geäussert hatte. — Doch möchte ich es vermeiden, aus den erwähnten zwei Versuchen zu weitgehende Schlüsse zu ziehen; es muss auch hier die Möglichkeit unzureichender Ernährung zugelassen werden, da ja eine Vermischung des adäquaten Nährmaterials der Gelatine mit dem präsumptiv inadäquaten Nährmaterial der Froschlymphe in dem Darmsäckchen stattfinden musste. Die Phagocytose und der Einfluss der fixen Gewebszellen waren aber jedenfalls ausgeschlossen.

Bei sämmtlichen übrigen Versuchen der zweiten Versuchsreihe zeigte sich im Innern des eingeführten Darmsegments auch stets eine grössere oder geringere Anzahl von Leukocyten und ein dem entsprechenden Phagocytismus. Doch war die Anzahl der ausserhalb von Leukocyten ganz frei liegenden Bacillen stets eine weitaus beträchtlichere als in den Fällen der ersten Versuchsreihe. Es zeigten daher diese Versuche mit mässig durchlässigen Darmsegmenten alle Erscheinungen, die bei Einführung von Milzbrandbacillen in den Froschkörper zu beobachten sind, am typischsten: die Aufnahme in Leukocyten mit den charakteristischen morphologischen Erscheinungen, die Zerbröckelung

frei liegender Bacillen in grossem Maassstabe, die später folgende Degeneration der in Leukocyten liegenden Häuflein, sowie besonders auch den Untergang zahlreicher Leukocyten, da diese nach Durchwanderung der Membran schneller zu Grunde zu gehen scheinen als sonst.

Die Infections-Versuche ergaben bei den am ersten und zweiten Tage entnommenen Darmsegmenten eine nicht bei allen Versuchen gleichmässige Abschwächung der Virulenz (die Mäuse starben 2—3 Tage nach der Impfung). Die Bacillen aus den am dritten Tage entnommenen Darmstücken hatten schon in mehreren Fällen die Virulenz völlig eingebüsst; doch ergaben andere Versuche vom dritten und auch noch vom vierten Tage positive Infectionserfolge. Vom fünften Tage ab wurde jedoch keine Infection mehr beobachtet.

Die Deutung dieser Versuche ergibt zunächst eine vollkommene Bestätigung des in der ersten Versuchsreihe gefundenen negativen Resultates, dass das „Gefressenwerden“ durch Leukocyten zum Untergange der Milzbrandbacillen im Froschkörper nicht erforderlich ist, sowie ferner den Ausschluss eines Einflusses der fixen Gewebszellen der Lymphsackwandungen auf den Untergang der Bacillen. Auch wird durch die grössere Menge der frei bleibenden Bacillen der bei der ersten Versuchsreihe immerhin mögliche (wenn auch wenig plausible) Einwand, dass die frei vorgefundenen Bacillen erst durch die Präparation<sup>1)</sup> aus den Leukocyten wieder hinausgebracht sein könnten, entkräftet.

Ein „indirecter“ Einfluss der Leukocyten, wie ihn LUBARSCH<sup>2)</sup> anzunehmen scheint, und der doch nur als ein chemischer, durch die Flüssigkeit vermittelter gelten könnte, ist natürlich durch diese Versuche ebensowenig ausgeschlossen, wie durch die Resultate der ersten Versuchsreihe. Ein solcher indirecter, fernwirkender Einfluss ist aber natürlich etwas gänzlich anderes als das von METSCHNIKOFF angenommene „Gefressenwerden“ der Bacillen durch Leukocyten.

Da nun diese zweite Versuchsreihe es sehr nahe legt, dass der Grund des Unterganges der Milzbrandbacillen im Frosche in der Beschaffenheit der Lymphflüssigkeit des Frosches liege, so würde eine Deutung dieser Versuche in vollem Umfange erst möglich werden durch die genaue chemische Analyse sowohl der freien Lymphe, als auch der aus ihr in das Innere der Darmsegmente diffundirten Bestandtheile, was natürlich für sich eine beträchtliche Arbeit repräsentiren würde. Die rein bakteriologische Untersuchung muss sich zunächst

---

1) In unsern Versuchen war die einzige mit der Froschlymphe vorgenommene Manipulation das Aufsaugen mittels eines Lymphröhrchens und das Herausblasen aus demselben auf das Deckglas. Ein Verreiben der Lymphe zwischen zwei Deckgläsern wurde niemals vorgenommen.

2) LUBARSCH, Abschwächung der Milzbrandbacillen im Froschkörper, Fortschr. d. Med. 1888, Nr. 4, Orig.-Mitth.

mit den erwähnten negativen Resultaten begnügen und kann positive Erklärungsversuche nur hypothetisch zulassen, um dadurch den Weg zu weiteren Untersuchungen zu bezeichnen.

### Dritte Versuchsreihe.

Die bereits mehrfach erwähnte Möglichkeit, die bisherigen Versuche in der Weise zu erklären, dass die Milzbrandbacillen die Körpersubstanzen des lebenden Frosches nicht zu assimiliren vermöchten und so lediglich an Nahrungsmangel zu Grunde gingen, nöthigte zum Eingehen auf die weitere Frage, ob denn in keinem Falle die Milzbrandbacillen im lebenden Froschkörper zu wachsen vermöchten. Diese Frage ist bereits durch METSCHNIKOFF, C. FRÄNKEL<sup>1)</sup> u. A. einmüthig in dem Sinne entschieden worden, dass bei den im Wärmeschrank bei Temperaturen von über 30° C gehaltenen Fröschen ein Wachsthum der Bacillen thatsächlich stattfindet. Uneinigkeit herrschte jedoch hinsichtlich der Frage, wie sich in diesen Fällen die Leukocyten verhalten. Während METSCHNIKOFF für den Wärmefrosch überhaupt jeden Phagocytismus in Abrede stellte, gab FRÄNKEL an, dass gerade hier die Aufnahme der Bacillen durch Leukocyten sehr gut zu beobachten sei. Dieser Widerstreit machte eine Wiederholung jener Versuche wünschenswerth.

Es wurden Frösche, denen eine Quantiät Milzbrandbacillen in den Rückenlymphsack injicirt worden war, in einem gut mit Wasser versorgten Glase sofort nach der Injection in den Wärmeschrank gesetzt und dort bei Temperaturen von 30—25° C aufbewahrt. Die ersten Frösche gingen — wahrscheinlich wegen ungenügender Luftzufuhr — schon innerhalb der ersten 12 Stunden zu Grunde; auch kam es vor, dass Frösche erstickten, weil sie im Wasser auf den Rücken gefallen waren und offenbar nicht mehr vermocht hatten, sich aufzurichten. Denn die mit Milzbrand besickten Frösche zeigten im Wärmeschrank eine gewisse Mattigkeit, während die gar nicht oder nur mit todttem Material geimpften Frösche gerade im Wärmeschrank grössere Lebhaftigkeit und Kraft an den Tag legten als bei Zimmertemperatur. Es trat nun bei allen nicht vorzeitig zu Grunde gegangenen Fröschen im Wärmeschrank constant eine Milzbranderkrankung ein. 24 Stunden nach der Impfung waren Milzbrandfäden im Blute nachzuweisen<sup>2)</sup>, und nach 36—48 Stunden starben die Frösche. Eine Vermehrung der Bacillen ist im Lymphsack in den ersten 6 Stunden noch nicht mit Sicherheit, später aber mit

1) FRÄNKEL, Grundriss der Bakterienkunde, Berlin 1888, Hirschwald.

2) Dies geschieht am lebenden Frosche ohne wesentliche Schädigung desselben durch Amputation einer Zehenspitze mittelst eines Scheerenschlages und nachfolgendem Verschluss der Wunde mit Collodium.

Leichtigkeit und in schneller Progression zu constatiren, zumal wenn man den im kalten Frosche stattfindenden stetigen Rückgang oft beobachtet hat. Es finden sich einzelne sehr lange, durchweg homogen erscheinende, in Schlangenlinien verlaufende oder mannigfach gekrümmte und in einander verschlungene oder auch seilartig um einander gedrehte Fäden („Spirulinen“), wie solche im kalten Frosche nie zu beobachten sind. Im Blute finden sich die Bacillen nicht in solcher Massenhaftigkeit, wie im Lymphsacke, auch nicht in so mannigfachen Formen; doch wies jedes Gesichtsfeld eines dem Herzblute entnommenen Präparates eine erhebliche Anzahl kürzerer und längerer Bacillenfäden auf. Die inneren Organe scheinen sich sehr verschieden zu verhalten. Der gesuchteste Ort für die Festsetzung der Milzbrandbacillen scheinen beim Frosche die Lungen zu sein. Diese erschienen meistens wie vollgestopft von bedeutenden Bacillennengen. Die Nieren und die Leber enthielten in vielen Fällen nur geringe Bacillennengen; in anderen Fällen waren auch sie von Bacillen reichlich durchsetzt. Von grossem Interesse war wegen der oben erwähnten widerstreitenden Angaben die Frage nach dem Verhalten des Phagocytismus im künstlich erwärmten Froschkörper. In unsern Versuchen war mit Regelmässigkeit Folgendes zu beobachten: Im Blute der Frösche war bei schnellem Durchsuchen der Präparate in der That nichts von Phagocytismus zu entdecken<sup>1)</sup>, während freie Bacillen und auch ledige Leukocyten gleich ins Auge fielen. — Die Lymphe dagegen enthielt in jedem Tropfen eine Anzahl leicht zu findender Leukocyten, die ganz in der bei der ersten Versuchsreihe beobachteten Weise mit Bacillen beladen waren. Evident ist aber, dass die Zahl der freien Bacillen im erwärmten Frosche die der eingeschlossenen um ein Vielfaches überwiegt, und dass auch immer noch zahlreiche ledige Leukocyten neben den massenhaften freien Bacillen sich vorfinden, ohne diese in sich aufzunehmen.

#### Deutung der Erscheinungen.

Es bietet sich hier — wenn wir zunächst das Verhalten des Phagocytismus ins Auge fassen — die Schwierigkeit, dass wir sowohl das Freibleiben der Mehrzahl der Bacillen erklären müssen, als auch wiederum den Einschluss eines Theils derselben in Leukocyten.

METSCHNIKOFF stellt zur Erklärung der ersteren Thatsache seine Gift-Hypothese auf, welche genau genommen aus drei Hypothesen besteht. Derselbe nimmt nämlich an:

- 1) dass die Milzbrandbacillen ein Gift absondern,

---

1) Bei genauerem Durchforschen einer Reihe von Blutpräparaten fand ich doch zwei Leukocyten, welche unzweifelhaft kurze Bacillen im Innern enthielten.

2) dass dies nur im erwärmten Frosche geschieht, im kalten nicht,

3) dass dieses Gift die Eigenschaft hat, die amöboiden Bewegungen der Leukocyten zu lähmen.

Die erste Annahme, dass durch den Stoffwechselprocess der Bacillen Substanzen erzeugt werden, welche gewisse giftige Eigenschaften besitzen, darf sich darauf stützen, dass namentlich durch BRIEGER eine Giftproduction in den Cultursubstraten gewisser Bakterien erwiesen ist und durch HOFFA solches speciell auch für die Milzbrandbacillen auf Grund eigener Versuche direct behauptet wird. Die erwähnte Annahme ist daher in gewissem Sinne begründet, wenn auch zur Zeit der Nachweis fehlt, dass auch im lebenden Thierkörper eine Giftproduction seitens der Milzbrandbacillen stattfindet.

Willkürlicher ist die weitere Annahme, dass die Absonderung dieses Giftes nur in der Wärme geschehen soll. Wenigstens vermag doch der Lebensprocess, mithin also der Stoffwechsel der Milzbrandbacillen auf den verschiedensten Nährböden auch bei relativ geringen Temperaturgraden sich zu vollziehen, und wenn dies im Froschkörper nicht der Fall ist, so wird doch der Grund dafür nicht in den Bacillen und der Temperatur, sondern eben im Frosch zu suchen sein. Selbst wenn die Annahme ad hoc gemacht werden sollte, dass der Stoffwechsel der Milzbrandbacillen im kalten Frosch zwar nicht aufhöre, aber andere (ungiftige) Producte liefere, so müsste doch auch hierfür wieder ein Grund im Frosche gesucht werden. — So enthält also schon METSCHNIKOFF's Gifthypothese selbst implicite die Nöthigung zur Annahme von Einflüssen, welche sich im Frosche bereits vor dem Angriff der Leukocyten auf die Bacillen geltend machen.

Die dritte Annahme, dass im erwärmten Frosche jenes hypothetische Gift der Milzbrandbacillen die Leukocyten lähme und sie so an der Ausübung ihrer Fressthätigkeit verhindere, ist der directen Bearbeitung durch die mikroskopische Untersuchung zugänglich. METSCHNIKOFF gründete diese Annahme bekanntlich darauf, dass er bei seinen Versuchen mit Verimpfung milzbrandbacillenhaltiger Organstücke im erwärmten Frosche keinen Phagocytismus beobachtet hat; und in der That müssten sämtliche Leukocyten gelähmt werden, falls das von den Milzbrandbacillen ausgeschiedene Gift eben jene lähmenden Eigenschaften besässe, da doch eine gleichmässige Vertheilung der von den massenhaften Bacillen gelieferten Stoffwechselproducte durch die Lymphflüssigkeit anzunehmen ist. — Dem steht jedoch entgegen, dass in unsern Versuchen mit Gelatine-Culturen doch ein nicht unbeträchtlicher Phagocytismus in der Lymphe zu constatiren war, und zwar trotz des baldigen Todes der Frösche nicht bloss die ersten Stadien der Aufnahme (Anschmiegung der Bacillen an die Peripherie der Leukocyten), sondern auch das Vorhandensein von Bacillenhäuflein ganz im Innern von Leu-

kocyten. Das Freibleiben des grössten Theils der Bacillen muss also anders erklärt werden als durch die Lähmung der Leukocyten.

Dies kann nun in Analogie mit den sonstigen Erfahrungen einfach durch die Annahme geschehen, dass die Leukocyten lebende Zellen, sei es Körperzellen oder Bakterienzellen, überhaupt nicht angreifen. Während nämlich die Leukocyten, wie wir sahen, sämtliche todtten Partikel (Kohle- und Zinnoberstäubchen) in sich aufnehmen, ist es nie beobachtet worden, dass die Leukocyten etwa lebende Zellen des normalen Körpers, oder auch nur die so zu sagen parasitirenden Zellen maligner Geschwülste „gefressen“ hätten; ein Umstand, der von BAUMGARTEN stets betont und hervorgehoben worden ist. Was also für die pathogenen Bakterien nach Maassgabe der bisherigen Beobachtungen positiv erwiesen ist: dass sie sich von lebenden Körpersubstanzen zu ernähren vermögen, ist für die Leukocyten nicht nur nicht erwiesen, sondern auch in Anbetracht der sonstigen Thatsachen sehr unwahrscheinlich. Und so kann die Thatsache, dass die Mehrzahl der Bacillen im erwärmten Frosche frei bleibt, ohne Zwang dadurch erklärt werden, dass die Milzbrandbacillen im erwärmten Frosche eben lebende Zellen sind und als solche von den Leukocyten gar nicht angegriffen werden. — Woher nun aber doch der partielle Phagocytismus? Derselbe ist unschwer auf die bereits oben erwähnte Annahme zurückzuführen, dass in jeder Reincultur mehrere Stufenfolgen verschieden lebenskräftiger und widerstandsfähiger Bacillen vorhanden seien. Es leuchtet nun ein, dass für die am wenigsten widerstandsfähigen Bacillen schon der Wechsel des Nährbodens hinreichen kann, um ihr völliges Absterben herbeizuführen; dass also ein Theil der Bacillen so zu sagen „beim Umpflanzen nicht angeht“. Diese werden dann natürlich als todtte Körper bald von den Leukocyten incorporirt. Die ausserordentliche Spärlichkeit des Phagocytismus im Blute ist leicht dadurch zu erklären, dass in dasselbe wohl grösstentheils nur ausgewachsene, und daher lebenskräftige Bacillen gelangen.

Dies stimmt dann auch mit der für die Versuchsreihen I und II gemachten Annahme überein, dass im kalten Frosche die Bacillen nur deshalb von den Leukocyten aufgenommen werden, weil sie bereits vorher durch die Lymphflüssigkeit in ihren Lebensfunctionen beeinträchtigt sind. Der Unterschied der Vorgänge im kalten und im erwärmten Frosche würde dann einfach so aufzufassen sein, dass im erwärmten Frosche nur ein Theil, im kalten Frosche aber sämtliche Bacillen nach der Umpflanzung nicht angehen. Die eventuell anzunehmenden Ursachen dieser Erscheinungen (nach Ausschluss der Phagocytose) sind bereits oben erörtert worden. Die durch die dritte Versuchsreihe neu geschaffene Schwierigkeit besteht in der Erklärung des Unterschiedes zwischen dem Verhalten der Bacillen im kalten und im erwärmten Frosche.

Dass der Frosch durch die Erwärmung als solche geschädigt werde, dass die ungewöhnliche Höhe der Temperatur also gewissermaassen als „Trauma“ auf ihn wirke, ist nicht wohl anzunehmen, da (wie schon oben bemerkt) die nicht geimpften Frösche sich in der Wärme von 25 bis 30° C ganz wohl zu befinden scheinen und eine merklich grössere Agilität und Energie entwickeln als in der Kälte. Dagegen ist es nicht unmöglich, dass durch die Erwärmung eventuelle Modificationen des Stoffwechsels im Frosche bedingt werden, welche die Ernährungsbedingungen für die Bacillen günstiger gestalten. Indessen ist eine solche Annahme nicht einmal erforderlich, wenn man den bedeutenden Unterschied berücksichtigt, der sich in der Kälte einerseits und in der Wärme andererseits in der Wachstums-Energie der Bacillen selbst geltend macht. Die Grösse der durch die Wärme bedingten Erhöhung der Proliferationsenergie der Milzbrandbacillen lässt sich ungefähr schätzen durch die Vergleichung des aus bestimmten Bacillennengen auf gleichen Nährböden innerhalb gleicher Zeiten, aber bei verschiedenen Temperaturen hervorgegangenen Nachwuchses. Durch annähernde Zählung der ursprünglich vorhandenen und der nachgewachsenen Bacillen würde sich diese Grösse auch mathematisch ausdrücken lassen. Dass sie jedenfalls kein unbeträchtlicher Factor ist, geht schon aus der grossen Bedeutung des Wärmeschanks für die Bakteriologie hervor. Nun ist es einerseits sehr wohl denkbar und durch mannigfache Analogien aus den Erfahrungen über Bakterienwachstum auf künstlichen Nährböden zu stützen, dass die Unverdaulichkeit der lebenden Körpersubstanzen des kalten Frosches für die Milzbrandbacillen in der Wärme einer Verdaulichkeit dieser Substanzen durch die genannten Bacillen Platz macht, wobei noch zu berücksichtigen ist, dass mit der in der Wärme sich geltend machenden erhöhten Proliferationsenergie der Bacillen auch deren Verdauungsenergie überhaupt gesteigert werden kann. Andererseits ist es aber ebensowohl annehmbar, dass ein spezifisches Stoffwechselproduct des Froschkörpers, welches in dem Verdünnungsgrade, in welchem es im Froschkörper vorhanden ist, den Lebensprocess der Bacillen nur mit Unterstützung einer relativ niedrigen Temperatur gerade zu hemmen vermag, für die bei hoher Temperatur befindlichen und deshalb energischer proliferirenden Bacillen eine ganz andere „Schwelle“ der beginnenden Wirksamkeit hat, die etwa erst bei einer stärkeren Concentration dieses Stoffes erreicht wäre.

Um zu zeigen, dass derselbe Unterschied, wie er uns hier zwischen kaltem und warmem Froschkörper vor Augen tritt, auch bei Culturen auf todtten Nährböden zu beobachten ist, sei hier nur an die von Koch <sup>1)</sup> festgestellte Thatsache erinnert, dass der Kommabacillus der asiatischen

1) I. Berliner Cholera-Conferenz, Berl. klin. Wochenschr. 1883.

Cholera auf der Kartoffel zwar nicht bei Zimmertemperatur, wohl aber im Wärmeschrank wächst. Koch selbst erklärt dies durch die Annahme eines geringen Gehalts der Kartoffel an Apfelsäure, deren feindliche Wirkung die Bacillen jedoch in der Wärme zu überwinden vermögen; es wäre jedoch ebenfalls denkbar, dass die für die Cholerabacillen relativ unverdauliche Kartoffelmasse unter dem Einfluss der Wärme für die Cholerabacillen, deren Verdauungsenergie dabei überhaupt erhöht wird, verdaulich gemacht wird.

Die Impfversuche mit den im Wärmefrosch ausgewachsenen Bacillen ergaben eine etwas geringere Virulenz derselben gegenüber den empfänglichen Thieren, als sie die Culturbacillen besitzen. Mäuse, die mit 0,3 ccm der dicht mit Bacillen durchsetzten Froschlymphe geimpft wurden, starben nach zwei Tagen. Ein mit 0,6 ccm geimpftes Kaninchen nach vier Tagen. Diese, wenn auch an sich geringe, Abschwächung der wachsenden Bacillen ist bemerkenswerth, weil hier der Einfluss des Phagocytismus sicher ausgeschlossen ist.

Einen weiteren Beitrag zur Stütze unserer Erklärungsversuche gegenüber der Phagocytenlehre liefert das in der folgenden Versuchsreihe studirte eigenthümliche Verhalten der Milzbrand-Sporen im erwärmten Frosche, Beobachtungen, welche bisher meines Wissens von anderer Seite noch nicht angestellt worden sind.

#### Vierte Versuchsreihe.

Sporenreiche Kartoffelculturen von Milzbrand wurden in etwas sterilisirtem Wasser vertheilt und alsdann 2 Stunden lang einer Temperatur von 62° C ausgesetzt, wodurch die vorhandenen Bacillen abgetödtet, die Sporen jedoch keimfähig erhalten wurden. Es wurden nun — immer gleichzeitig von demselben Material — beschickt:

1) ein Gelatineröhrchen und ein Frosch, die beide bei Zimmertemperatur belassen wurden;

2) ein Gelatineröhrchen und ein Frosch für den Wärmeschrank.

In dem in den Wärmeschrank gesetzten Gelatineröhrchen wuchsen die Sporen bereits innerhalb des ersten Tages zu langen Fäden aus; in dem bei Zimmertemperatur bewahrten Röhrchen war dies erst nach 2—3 Tagen zu constatiren.

Beim Frosch trat, wie schon oben erwähnt, in der Zimmertemperatur überhaupt kein Wachsthum ein. Die kurzen, todtten Bacillen wurden von den Leukocyten sammt den darin enthaltenen Sporen — desgleichen freie Sporen — bald incorporirt. Die Frösche blieben natürlich am Leben und zeigten keinerlei Beschwerden; nicht einmal ein Exsudat stellte sich ein.

Die ersten der im Wärmeschrank bei 28—30° C gehaltenen Frösche untersuchte ich in den nächsten 4 Tagen nicht, um zuvörderst

an einigen den erwarteten Tod ohne Complication eintreten zu lassen. Die Frösche starben jedoch nicht nur nicht, sie waren vielmehr ebenso lebhaft und kräftig, wie gar nicht geimpfte, und zeigten auch nur ein unerhebliches Exsudat in der Steisgegegend. Bei der Untersuchung am fünften Tage nach der Impfung war in ihrem Rückenlymphsack nichts von der injicirten Masse mehr nachzuweisen. Dass die Sporen nicht vorher abgetödtet gewesen waren, bewies der reichliche Nachwuchs desselben Materials in den Gelatineröhrchen.

Bei den später in derselben Weise behandelten Fröschen wurde Lymphe und Blut wie früher untersucht: im Blute waren Bacillen nicht nachzuweisen. Im Lymphsack fand man nach Verlauf von 6 Stunden neben zahlreichen kurzen, offenbar noch von der Kartoffelcultur stammenden (also abgetödteten) Bacillen auch längere, wellig gewundene Fäden, die nach aller Wahrscheinlichkeit von ausgewachsenen Sporen herrührten. Nach 24 Stunden schien der grösste Theil der kurzen Bacillen verschwunden. Eine Anzahl der noch sichtbaren kurzen Stäbchen war von Leukocyten incorporirt; andere lagen frei. Die Gesamtzahl aber war erheblich geringer als nach 6 Stunden. — Ausser dieser geringen Anzahl kurzer Bacillen fand sich nun aber eine reiche Zahl langer, vielfach gewundener, zu den schönsten Spirulinenformen verschlungener Fäden, die nur von gekeimten Sporen stammen konnten. Alle diese Fäden fielen durch ihre erhebliche Breite auf, und ein Theil derselben zeigte bereits in der Vesuvinfärbung die unregelmässigen Contouren, welche den Beginn der Degeneration charakterisiren.

Am zweiten Tage war der Befund noch im ganzen der gleiche; am dritten Tage waren so lange Fäden wie vorher nicht mehr zu bemerken, wohl aber eine nach ungefährrer Schätzung gleiche Menge kürzerer Fäden. Eine ausgesprochene Vermehrung hatte jedenfalls nicht mehr stattgefunden. Tags darauf hatte die Zahl der Bacillen bereits sehr beträchtlich abgenommen, und zwar ohne wesentliche Bethätigung der Leukocyten. 5–6 Tage nach der Injection waren alle Bacillen aus der Flüssigkeit verschwunden<sup>1)</sup>.

Die Impfung eines Frosches mit Material von Kartoffelculturen, in welchem die Bacillen nicht abgetödtet waren, hatte schon bei 28–30° C den Tod des Frosches unter den in der dritten Versuchsreihe beschriebenen Erscheinungen zur Folge.

Desgleichen starben einige Frösche, die mit isolirtem Sporenmaterial geimpft waren, bei Temperaturen von 35–37° C unter Zunahme

---

1) Bei einigen dieser Frösche stellte sich im Steisstheil des Rückenlymphsackes ein abgekapseltes, serös-fibrinöses Exsudat ein, in welchem sich noch nach 8–12 Tagen Milzbrandbacillen fanden. Genauer wurde diese Complication indessen nicht verfolgt.

der Bacillen in Lymphe und Blut. Es musste hier also doch ein Weiterwachsen wenigstens eines Theils der Sporenkeimlinge stattgefunden haben.

Die Erscheinungen der vierten Versuchsreihe treten also nur bei Temperaturen von  $28-30^{\circ}\text{C}$  ein<sup>1)</sup> und stellten gewissermaassen eine Zwischenstufe zwischen den Erscheinungen der ersten und denen der dritten Versuchsreihe dar, und zwar ohne in Betracht kommende Bethätigung der Leukocyten.

#### Deutung der vierten Versuchsreihe.

Dass die Milzbrandsporen zwar nicht im kalten, wohl aber im erwärmten Frosche auskeimen, kann in Anbetracht der früheren Versuche nicht befremden. Auffallend ist erst die weitere Erscheinung, dass die Keimlinge bei  $28-30^{\circ}\text{C}$  (einer für das Wachstum auf guten Nährböden sehr günstigen Temperatur) im Froschkörper nicht weiter proliferiren, sondern in kleinere Stücke zerfallen, um allmählich ganz zu verschwinden. Ein wesentlicher Einfluss des Phagocytismus ist hierbei mit Sicherheit auszuschliessen, da derselbe überhaupt sehr spärlich ist, nur am ersten Tage (an welchem die Keimlinge gerade noch wachsen) in die Augen fällt und sich daher hauptsächlich auf die durch Erhitzen abgetödteten Culturbacillen bezieht.

[Auffallend ist es übrigens, dass die degenerirenden Keimlinge in diesen Versuchen grösstentheils nicht von Leukocyten aufgenommen werden, wiewohl dieselben in den Präparaten oft dicht neben ihnen gefunden werden. Hier scheint die bei der dritten Versuchsreihe für das Freibleiben der — lebenden — Bacillen gegebene Erklärung nicht hinzureichen. Auch ist ein anderer, völlig zureichender Grund schwer aufzufinden.]

Der Rückgang der aus den Sporen hervorgekeimten Bacillenfäden wird hier jedenfalls sicher durch andere Einflüsse bedingt als durch das „Fressen“ der Leukocyten.

Zunächst kann nun auch hier wieder angenommen werden, dass selbst im mässig erwärmten Frosche ( $28-30^{\circ}\text{C}$ ) die Ernährungsbedingungen für die Bacillen noch immer relativ ungünstig sind, so dass die Keime zwar „angehen“, aber nicht weiter fortzukommen vermögen. Es könnte eingewendet werden, dass schon zum Auskeimen der Sporen relativ gute Ernährungsbedingungen vorhanden sein müssen und dass daher das folgende Eingehen der einmal gewachsenen Keimlinge befremden muss. Doch können viele Analogieen sowohl aus dem Pflanzenleben als auch aus dem Verhalten künstlicher Pilz- und Bakterienkulturen

---

1) In einigen später angestellten Versuchen, in welchen die Frösche sich bei einer Temperatur von  $25-28^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank befanden, trat gar kein Auswachsen der Sporen ein, während dieselben in Gelatine bei derselben Temperatur wuchsen.

beigebracht werden, in denen auf ungeeignetem Boden das anfängliche Auskeimen von baldigem Untergange gefolgt ist.

Sehr gut lassen sich die Erscheinungen dieser Versuchsreihe aber auch mit der Gift-Hypothese vereinigen, wenn man annimmt, dass die vermuthete antibacilläre Substanz des Froschkörpers nur einen solchen Concentrationsgrad in demselben besitzt, dass sie zwar Sporen nicht zu tödten und ihr Keimen in genügender Wärme nicht zu hindern, die jungen Keimlinge aber intensiver zu schädigen vermag als die in der dritten Versuchsreihe verwendeten ausgewachsenen Cultur-bacillen. Dass die frischen Keimlinge der Sporen besonders empfindlich gegen schädigende Einflüsse sind, wird auch durch andere Erfahrungen bestätigt.

### Zusammenfassung der Resultate.

Fassen wir nun noch einmal diejenigen Resultate unserer Untersuchungen zusammen, welche eine Abweichung der Gesamtdeutung von den bisherigen Annahmen bedingten.

A) Bei Injection von Milzbrand-Culturen in den Rückenlymphsack des bei Zimmertemperatur gehaltenen Frosches sind folgende Ergebnisse bemerkenswerth:

1) Ein Wachsthum der eingeführten Bacillen resp. Sporen ist in keinem Falle zu constatiren.

2) Ein selbständiger Uebergang der in den Lymphsack injicirten Bacillen ins Blut findet nicht statt.

3) Die Leukocyten nehmen den grössten Theil, bei Injection grösserer Mengen aber niemals sämtliche Bacillen in sich auf. Trotzdem übersteht der Frosch stets die Infection.

4) An den extracellulären Bacillen sind zuerst Degenerations-Erscheinungen zu beobachten.

5) Milzbrandfroschlymphe, in welcher sich noch bis zum 5.—6. Tage freie Bacillen in jedem Tropfen vorfinden, ist bereits am zweiten Tage für Kaninchen invirulent, für Mäuse ein abgeschwächtes Virus und vom dritten Tage ab fast stets auch gegen Mäuse unwirksam.

6) Von den unzählig vielen eingeführten Milzbrandbacillen ist bereits nach 24 Stunden nur noch ein kleiner Theil, nach 4 Tagen nur noch einzelne Bacillen auf Agar im Wärmeschrank wachsthumsfähig.

B) Bei Einführung von Bacillen in den Lymphsack innerhalb einer diffusibeln Membran sind

1) die unter „A“ angegebenen Erscheinungen ebenfalls zu beobachten (die Degeneration freier Bacillen ist noch typischer);

2) scheint bereits vor vollständiger Exsmose der miteingeführten Nährflüssigkeit Degeneration eines Theiles der Bacillen einzutreten.

C) Bei Injection von Milzbrandculturen in einen bei 25—30° C gehaltenen Frosch findet

1) ein bedeutendes Auswachsen der Bacillen unter Bildung von Spirulinen-Formen und ein spontaner Uebergang der Bacillen ins Blut und die Organe (namentlich Lungen) statt;

2) Phagocytismus ist im Blute ausserordentlich spärlich, in der Lymphe reichlicher, aber sparsamer als in der Lymphe des kalten Frosches zu finden;

3) die im Frosche ausgewachsenen Bacillen tödten Mäuse erst in zwei Tagen.

D) Bei Injection von sporenhaltigen Culturen nach Abtödtung der darin befindlichen Bacillen in einem bei 28—30° C gehaltenen Frosch ist Folgendes zu beobachten:

1) die abgetödteten Bacillen werden durch Leukocyten incorporirt;

2) die Sporen keimen aus (unter Bildung von Spirulinen-Formen);

3) die Keimlinge der Sporen gehen unter Degenerationserscheinungen bald wieder zu Grunde<sup>1)</sup>, grösstentheils ohne durch Leukocyten incorporirt zu werden.

Diese Thatsachen sind, wie bereits im Einzelnen ausgeführt wurde, mit METSCHNIKOFF's Phagocyten-Theorie nicht vereinbar; dieselben enthalten vielmehr Anzeichen, dass die Abschwächung und das Absterben der Milzbrandbacillen im Froschkörper durch Ursachen bedingt sind, welche von dem Phagocytismus ganz unabhängig sind. Die unzweifelhafte Thätigkeit der Leukocyten des Frosches würde nach Maassgabe dieser Untersuchungen nur die Bedeutung haben, welche ihr schon früher zugemessen wurde: die Ausübung der Fixation und Forträumung unlebter, resp. lebensunfähiger Partikelchen aus den Körperflüssigkeiten<sup>2)</sup>.

Unsere Versuche sprechen daher durchweg für den von BAUMGARTEN gegenüber der Phagocytenlehre eingenommenen Standpunkt, d. h. für die Anschauung, dass die Bacillen nicht deshalb absterben, weil sie von Leukocyten aufgenommen werden, sondern dass sie erst deshalb von Leukocyten aufgenommen werden, weil sie im Froschkörper (resp. im Körper anderer gegen Milzbrand u. s. w. immuner Thier-species) nicht zu leben vermögen.

Ein positiver Nachweis der Ursachen der Immunität des Frosches gegen Milzbrand, d. h. der Gründe, welche den Froschkörper zu einem ungünstigen Boden für das Gedeihen der Milzbrandbacillen machen, hat durch unsere rein bakteriologischen Untersuchungen nicht geliefert werden können. Doch konnten nach Ausschluss anderer Erklärungsversuche zwei Deutungen der beobachteten Erscheinungen

1) Vgl. Anm. auf pag. 23.

2) SIEBEL beobachtete Auswanderung zinnoberhaltiger Leukocyten durch die Schleimhäute der Athmungswege; HESS eine Auswanderung bacillenhaltiger Leukocyten auf demselben Wege.

wenigstens hypothetisch aufgestellt und ihre Anwendbarkeit auf alle Einzelercheinungen geprüft werden. Diese Deutungsversuche waren:

1) Die Assimilations-Theorie, nach welcher die lebenden Körpersubstanzen des Frosches von den Milzbrandbacillen und Sporen erst bei Temperaturen von 28—30 ° C, von den Keimlingen der Sporen erst bei 35—37 ° C; bei Zimmertemperatur jedoch weder von Bacillen noch von Sporen assimiliert werden können.

2) Die Gifttheorie, welche im lebenden Körper des Frosches eine antibacilläre chemische Verbindung (resp. deren mehrere) als Stoffwechselproduct des Frosches annimmt, die bei Zimmertemperatur noch das Wachsthum sämtlicher Bacillen und Sporen zu unterdrücken, ihre Virulenz abzuschwächen und den grössten Theil derselben schnell, die widerstandskräftigsten in etwa drei Tagen zu tödten, bei 28—30 ° C das Weiterwachsen der Sporenkeimlinge zu hemmen vermag; welche indessen bei 25—30 ° C das Wachsthum der Bacillen, bei 35—37 ° C auch das der Sporenkeimlinge nicht mehr hindern kann.

In dem einen Falle würde der Mangel geeigneten Nahrungsmaterials, im andern das Vorhandensein bacillenfeindlicher Substanzen Todesursache der Bacillen sein. Beide Annahmen waren auf sämtliche Erscheinungen anwendbar; es ist daher auch ein Zusammenwirken beider Factoren, sowie eine Combination mit noch weiteren Factoren denkbar.

Nach Beendigung meiner hauptsächlichsten Untersuchungen wurden mir durch die Güte des Herrn Professor BAUMGARTEN noch die Arbeiten von C. HESS<sup>1)</sup> und von EMMERICH und DI MATTEI<sup>2)</sup> zugänglich. Die Arbeit von HESS überhebt mich der Untersuchungen mittels Injection von Bacillen in die Blutbahn des Frosches; denn sämtliche von Hess angeführten Thatsachen (auch die an immunen Säugethieren und Vögeln beobachteten), welche der Verfasser im Sinne der Phagocytenlehre deutet, sind auch durch die auf unsere Versuche angewendeten Deutungen erklärbar, während unsere Versuche durch die Phagocyten-Theorie nicht deutbar sind. Dass in beiden Fällen die Reichlichkeit des Phagocytismus bei vielen Thieren als ein gewisser Maassstab für ihre Immunität, d. h. für das Absterben bestimmter Bacillen in ihnen, gelten kann, ist von selbst ersichtlich.

Bemerkenswerth erscheint ferner, dass EMMERICH und DI MATTEI auf Grund ganz andersartiger Untersuchungen (Erzeugung künstlicher Immunität) gleichfalls auf die auch von uns in Betracht gezogene Annahme kommen, dass auch die natürliche Immunität

---

1) Untersuchungen zur Phagocytenlehre, VIRCHOW's Archiv, Bd. CIX.

2) Vernichtung von Milzbrandbacillen im Organismus, Fortschr. d. Med. 1887, Nr. 20.

durch Stoffwechselproducte der betreffenden Thiere zu erklären sei, welche durch ihre chemischen Eigenschaften giftig auf bestimmte Bakterienarten wirken. Demgegenüber darf nicht unausgesprochen bleiben, dass auch gewichtige Einwände gegen die Gift-Hypothese gemacht werden können, namentlich darauf sich gründend, dass bereits in der geronnenen Lymphe sich kein antibacillärer Einfluss mehr geltend macht.

Indessen weist EMMERICH mit Recht auf die nahe Verwandtschaft giftiger und ungiftiger organischer Verbindungen und ihre gegenseitige Ueberführbarkeit hin; auch entzieht es sich von vornherein der Beurtheilung, ob die eventuell in immunen Thieren wirksamen Verbindungen überhaupt auf derselben Stufe mit den sonst bekannten „thierischen Giften“ stehen. Aufgestellt wurde die Gifthyothese hier nur auf Grund des in der zweiten Versuchsreihe hervortretenden Einflusses der Lymph-Flüssigkeit (resp. ihrer durch Membranen diffundirenden Bestandteile), sowie auf Grund der Schnelligkeit des Umsichgreifens der Degeneration der Bacillen, welche in ganz indifferenten Flüssigkeiten (Kochsalzlösung) nicht so schnell, bei immunen Warmblütern übrigens nach Maassgabe aller Untersuchungen noch ungleich schneller erfolgt als im Froschkörper.

Doch dürfen wir hierbei wiederum nicht vergessen, dass wir in dem lebenden thierischen Körper einen Apparat vor uns haben, welcher aller Erfahrung nach mit einem mächtigen Lösungs- und Resorptionsvermögen für allerhand in ihn eingedrungene und nicht mit eigenem Leben begabte (resp. ein solches in ihm nicht bethätigende) soluble Fremdkörper ausgestattet ist, welche allgemeine Lösungs- und Resorptionskraft wohl schwerlich mit irgend welcher Giftwirkung identificirt werden kann. Die grössere Schnelligkeit des Verschwindens der Bacillen in immunen Thierkörpern gegenüber demjenigen in todtten, nahrungsfähigen Substraten kann mithin nicht als ein Beweis für die Gift-Hypothese gegenüber der Assimilationstheorie angesehen werden. Ein derartiger Beweis kann überhaupt nur, wie schon erwähnt, von der chemischen Untersuchung, nicht von der bakteriologischen und histologischen erwartet werden.

Für den Kernpunkt unserer Untersuchungen ist übrigens die Entscheidung darüber, ob Gift- oder Assimilations-Theorie, oder beide zugleich, so interessant sie an und für sich auch zweifellos ist, von keinem Belang. Das Wesentliche bleibt, dass unsere Untersuchungen erwiesen haben, dass der Untergang der Milzbrandbacillen im lebenden Froschkörper nicht durch die phagocytäre Thätigkeit der Froschzellen zu Stande kommt und dass die Erklärung der Immunität des Frosches gegen Milzbrand nicht auf cellular-morphologischem, sondern auf biochemischem Boden zu suchen ist.

## Lebenslauf.

Ich, JOHANNES PETRUSCHIKY, Sohn des Generalarztes a. D. Professor Dr. PETRUSCHIKY, bin geboren am 23. Juni 1863 zu Königsberg i. Pr. Die Schulbildung erhielt ich zuerst am Kgl. Friedrichs-Collegium, später am Kgl. Wilhelmsgymnasium meiner Vaterstadt. Am 6. September 1882 erhielt ich das Zeugniß der Reife und widmete mich alsdann dem Studium der Medicin an der Albertina zu Königsberg. Das Tentamen physicum bestand ich am 10. Juli 1884, die medicinische Staatsprüfung am 1. März 1888, das Examen rigorosum am 5. Juli 1888. Während meiner Studienzeit hörte ich Vorlesungen der Herren Professoren und Docenten: BAUMGARTEN, R. CASPARY †, C. CASPARY, CHUN, DOHRN, HERMANN, HERTWIG, JACOBSON, JAFFÉ, LANGENDORF, LOSSEN, MERKEL, MIKULICZ, NAUNYN, NEUMANN, PAPE, PETRUSCHIKY, SCHÖNBORN, SCHREIBER, SCHWALBE, SEYDEL, STETTER, STIEDA, TIELE, VOSSIUS, WALTER, v. WITTICH †, ZANDER.

Allen diesen meinen verehrten Lehrern sage ich meinen herzlichsten Dank.

## Thesen:

1. Bei der Extraction des nachfolgenden Kopfes sind die Handgriffe der Zange unbedingt vorzuziehen.
2. Die Phänomene der Empfindung und des Gedächtnisses sind aus rein materiellen Mechanismen nicht erklärbar.



15626

15626