

(Aus dem Institut Robert Koch. — Serologische Abteilung: Geheimrat *R. Otto*  
und Chemische Abteilung: Geheimrat *G. Lockemann*.)

## Zur Kenntnis des Pferdeschuppenallergens<sup>1</sup>.

Von

Dr. Lucie Adelsberger und Dr. Werner Ulrich.

Die Frage nach der Natur der Allergene ist eng verknüpft mit dem Problem der allergischen Krankheiten überhaupt und mit der Frage nach dem Mechanismus, der sich beim Zustandekommen der menschlichen Überempfindlichkeitsreaktionen auswirkt. Auf der einen Seite werden bekanntlich die Überempfindlichkeitszustände beim Menschen in Analogie zur experimentellen Überempfindlichkeit beim Versuchstier gesetzt und gelten als anaphylaktische Reaktionen. Auf der anderen Seite vertritt *Coca* aus Gründen, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen zu werden braucht (siehe *Adelsberger*), den Standpunkt, daß es sich bei der Überempfindlichkeit des Menschen im allgemeinen nicht um Anaphylaxie handele, sondern daß die Atopie, wie er die menschliche Überempfindlichkeit benennt, durch das Vorhandensein von angeborenen Antikörpern bedingt sei. Damit wird im ersteren Falle den Allergenen ein anaphylaktisierendes Vermögen zugeordnet. Es erhebt sich dann die Frage, ob sie in der Tat ein solches Vermögen besitzen und wie die nachgewiesenen Anaphylaktogene echte Eiweißkörper sind<sup>2</sup>. Im anderen Falle ist zu untersuchen, ob sie, der *Cocas* These entsprechend, der anaphylaktisierenden Fähigkeit entbehren bzw. der Eiweißnatur ermangeln können und als Antigene besonderer Art mit den vorgebildeten Antikörpern des atopischen Individuums in Funktion treten.

Die Untersuchungen, die bisher vorliegen, sind annähernd übereinstimmend, soweit sie sich auf die allgemeine Charakterisierung der Allergene beschränken. Sie sind jedoch ganz widersprechend, sobald versucht wird, die der Allergenwirkung zugrunde liegende aktive Substanz näher zu identifizieren.

Was die ersteren Untersuchungen angeht, so hat d. e. von uns (A.) bei der Darstellung des Stauballergens bereits darauf hingewiesen, daß sich die bisher be-

---

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde zum Teil mit Mitteln der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft durchgeführt.

<sup>2</sup> Oder ob sie als Haptene (Kohlehydrate, Lipoide) in Verbindung mit einem Schlepper (Eiweißkörper) den Organismus überempfindlich machen können.

kannten Allergene bei Erwärmung, bei der Dialyse und bezüglich ihrer Löslichkeit untereinander übereinstimmend verhalten. So wurde die geringe Beeinflussung durch Wärme und die mangelnde Dialysierfähigkeit — mit Ausnahme der Beobachtung von *W. Jadassohn* und *Zaruski* — als Eigentümlichkeit ganz verschiedener Allergene festgestellt. Sie werden nämlich durch Erhitzen auf 56° nur sehr wenig und durch kurzdauerndes Kochen nur teilweise abgeschwächt. Sie sind ferner nicht in Alkohol, Äther, Ligroin, Benzol oder Chloroform, wohl aber gut in Wasser und in bestimmten Salzlösungen löslich. Nach Vorbehandlung mit absolutem Alkohol scheint die wirksame Substanz fast völlig im Alkoholrückstand enthalten zu sein. Bestimmte ekzemauslösende Stoffe scheinen allerdings anderen Lösungsbedingungen zu unterliegen: *Br. Bloch* und *Karrer* fanden die wirksame Substanz beim Primelektzem alkohol- und ätherlöslich und konnten sie aus dem Ätherextrakt darstellen; auch die ekzemauslösende Substanz im Hopfen erwies sich als alkohollöslich (*Adelsberger*).

Der weitere Versuch, die wirksame Substanz in bestimmten Allergenen näher zu bestimmen, wurde vornehmlich an zwei verschiedenen Gruppen von Allergenen ausgeführt und zwar erstens an den Pollen von Gräsern und Blüten und zweitens an Tierhaaren.

Eine Analyse des *Pollenallergens* wurde zuerst von *Coca* und *Grove* in Angriff genommen. Sie konnten zeigen, daß Ambrosia-Pollenlösungen, aus welchen durch Trypsinverdauung und durch Dialyse alle nachweisbaren Spuren von Eiweiß entfernt waren, noch ihre volle Wirksamkeit an der menschlichen Haut bewahrt hatten. Und *Walzer* und *Grove* fanden diese trypsinverdauten und dialysierten Extrakte, die einen Stickstoffgehalt von ungefähr 0,4 mg in 1 ccm aufwiesen, im Anaphylaxieversuch, bei Anwendung der Daleschen Uterusmethode, fast ebenso stark wirksam wie die Gesamtpollen. Sie halten dieses Produkt mit dem Atopen bei Ambrosiaheufieber für identisch und lehnen die Eiweißnatur dieser Substanz wegen der Resistenz gegenüber dem Trypsin ab. Daneben sollen allerdings in den Ambrosiapollen noch ein oder mehrere weniger bedeutsame Anaphylaktogene mit Proteincharakter vorhanden sein. *Eadie* und *Cohen* (zit. nach *Caulfield*), die ebenfalls Ambrosiapollen verarbeiteten, konnten mit gewissen Fraktionen aktive und passive Anaphylaxie erzeugen und zwar so, daß die Tiere, die mit einer Fraktion sensibilisiert waren, gegen diese, nicht aber gegen andere Fraktionen überempfindlich waren. Sie konnten ferner, zusammen mit *Caulfield*, vier chemische Fraktionen (Alkoholextrakt, Albuminproteose, Proteose und Glutenin) aus diesen Pollen darstellen, die bei ein und demselben Patienten verschiedene Reaktionen gaben, und auf die mehrere Patienten verschieden stark und ganz individuell ansprachen. Gelegentlich ergaben einzelne Fraktionen positive Resultate, wenn mit den Gesamtpollen negative erzielt wurden. Der Stickstoffgehalt schien nicht maßgebend für die Wirksamkeit. *Osonka*, *Bernton* und *Jones* stellten aus Timothypollen und Orchardgras ebenfalls verschiedene Fraktionen dar und kommen nach den klinischen Befunden bzw. den Hauttesten mit diesen Fraktionen zu der Vermutung, daß die Proteosefraktion das intoxicierende Element bei Heufieberpatienten sei, und daß außerdem die Albuminfraktion bei etwa 50% der Patienten toxisch wirke. Die Bedeutung der Glutelinfraktion sei zu vernachlässigen. Eine nähere Charakterisierung der aktiven Pollensubstanz (und ebenso des wirksamen Prinzips in Gänsefedern) gibt *Farmer Loeb*. Er konnte Meerschweinchen gegen einen wässerigen Extrakt aus Fichtenpollen und gegen die alkoholische Fällung aus diesem Extrakt spezifisch sensibilisieren. Die Alkoholfällungen enthielten nur kolloiddispersen Stickstoff und reduzierende Substanzen in Spuren. Sie gaben mit Sulfosalicylsäure positive, mit Ninhydrin negative Reaktionen, während die Reaktion nach *Molisch* fraglich ausfiel. Eine Sensibilisierung gegen das Filtrat des mit

Alkohol behandelten Extraktes, der nur molekulardispersen Stickstoff enthielt, trat nicht ein. (Die Versuche mit Gänsefedernextrakt verliefen ganz analog.) Angaben über die Wirksamkeit gerade dieser Extrakte beim überempfindlichen Menschen fehlen. Bei Prüfung von überempfindlichen Patienten mit Pollen von Knäuelgras reagierten Heufieberkranke auch auf den Alkoholrückstand aus wässerigem Pollenextrakt positiv, wohingegen das Filtrat der alkoholischen Fällung keine Hautreaktionen erzeugte. Im Gegensatz zu den Befunden von *Coca* und *Grove* trat nach der tryptischen Verdauung des Alkoholniederschlags keine positive Hautreaktion mehr auf, und *Farmer Loeb* nimmt deshalb als wirksames Prinzip des Pollenextraktes einen Eiweißkörper an.

Untersuchungen an *Tierhaaren*, d. h. über die anaphylaktogenen und atopischen Fähigkeiten der einzelnen chemischen Fraktionen, wurden erstmalig von *Wodehouse* aufgenommen, und zwar beschränkte er sich darauf, verschiedene Proteinfractionen in ihrer Wirkung miteinander zu vergleichen. Er stellte aus Katzenhaaren verschiedene Proteine dar und fand neben dem Keratin, das den Hauptbestandteil der tierischen Haare ausmacht, vier verschiedene Proteine, die sich in ihrem chemischen und ihrem anaphylaktischen Verhalten vom reinen Keratin und vom Keratinpepton unterschieden. Beim Testen an der Haut überempfindlicher Patienten gaben einige stark positive, andere kaum nachweisbare Reaktionen. Ähnliche Resultate ergab die Aufschließung von Hundehaaren und von Pferdehaaren. Auch aus letzteren konnte *Wodehouse* vier Proteine darstellen (Alkalimetaprotein, alkohollösliches Protein, durch die Hitze koaguliertes Protein und Haarpepton), die beim Testen deutlich verschiedene Hautreaktionen aufwiesen und auch in der anaphylaktogenen Wirkung voneinander abwichen, und die außerdem im Anaphylaxieversuch von Pferdeserum verschieden schienen. In der Folge konzentrierten sich, wenn von den bereits erwähnten Versuchen mit Gänsefedern (*Farmer Loeb*) abgesehen wird, die Untersuchungen nach dem allergischen Faktor in Tierhaaren darauf, die wirksame Substanz in den Pferdeschuppen darzustellen. *Grove* und *Coca* halten das Atopen der Pferdeschuppen, anders als das der Pollen, für ein Protein, weil die tryptische Verdauung des Pferdeschuppen-eiweißes zu einer Verminderung der atopischen Fähigkeit führe, die in Übereinstimmung mit dem Eiweißverlust stehe. Zu einem ähnlichen Schluß kommen *Longcope*, *O'Brien* und *Perlzweig*. Sie sahen bei Prüfung dreier verschiedener Fraktionen: einer Lipoidfraktion, einer nichtproteinen Fraktion und einer durch Dialysieren des Extraktes gewonnenen Fraktion, diese Fraktionen im Anaphylaxieversuch wirkungslos und nehmen deshalb an, daß die antigene Substanz bzw. die antigenen Substanzen im Pferdeschuppenextrakt anderer Natur und zwar Proteine oder wenigstens eng an diese gebunden seien. Außerdem fanden sie zwei Proteinfractionen, die biologisch spezifisch sind und durch ihr anaphylaktisches Verhalten im Meerschweinchenversuch getrennt werden können. Die Haut einer Patientin mit Pferdeschuppenüberempfindlichkeit war in gleicher Weise wie gegen den Gesamtextrakt auch gegen diese beiden Proteinfractionen überempfindlich, und die passive Übertragung nach *Prausnitz-Küstner* gelang in derselben Weise mit allen drei Fraktionen.

Wir haben für unsere Untersuchungen ebenfalls Pferdeschuppen gewählt und zwar aus folgenden 3 Gründen. *Erstens* war bei den Versuchen, die menschliche Überempfindlichkeit (Atopie) passiv auf das Meerschweinchen zu übertragen, dieser Versuch anscheinend einmal bei einem Patienten mit Pferdeschuppenüberempfindlichkeit positiv ausgefallen (*Adelsberger l. c.*); dadurch gewann diese Überempfind-

lichkeit für uns ein besonderes Interesse. *Zweitens* haben wir unter unseren überempfindlichen Patienten einige beobachtet, die eine sehr starke isolierte Überempfindlichkeit gegen Pferdeschuppen aufwiesen. Gleichzeitige Reaktionen auf Pferdeserum sind bei diesen Patienten nur vereinzelt aufgetreten. (Auf das gelegentliche Übergreifen auf Pferdeschuppen und Graspollen wurde an anderer Stelle hingewiesen.) *Drittens* gelingt es mit dem nach der Methode von *Coca* bereiteten Pferdeschuppenextrakt relativ häufig, Anaphylaxie beim Meerschweinchen zu erzeugen. Es ist deshalb die Möglichkeit gegeben, die Zwischen- und Endprodukte nicht nur auf ihre atopische Eigenschaft für den Menschen zu prüfen, sondern auch gleichzeitig bezüglich ihrer anaphylaktisierenden Fähigkeiten im Tierversuch mit dem Ausgangsmaterial zu vergleichen.

Bei der Verarbeitung der Pferdeschuppen wurde an die Tatsache angeknüpft, daß die wirksame Substanz im Alkoholrückstand enthalten ist. Wir haben uns auf die weitere Verarbeitung dieses Rückstandes aus dreierlei Erwägungen heraus beschränkt. Erstens wegen der Bedeutung des Alkoholrückstandes bei der Bakterienanaphylaxie. Die Methode einer modifizierten Alkoholfällung hat es nämlich ermöglicht, im schließlichen Alkoholrückstand aus Bakterien ein Substrat zu isolieren, das Haptencharakter trägt und im überempfindlichen Organismus shockauslösend wirkt. Es gelang auf diese Weise, aus Bakterien und Kokken, zuerst aus *Bac. lact. aerogenes* (*Tomcsik* und *Kurotchkin*) ein Kohlehydrat darzustellen, das zwar nicht imstande ist, aktiv zu sensibilisieren, das aber beim aktiv mit dem Vollbacterium sensibilisierten bzw. beim passiv überempfindlichen Tier shockauslösend wirkt. Dadurch war für die Bakterienanaphylaxie, die durch die Unregelmäßigkeit ihres Auftretens und die Schwierigkeit ihrer Erzeugung ähnlich wie die Atopie sich dem Gesamtbild der Anaphylaxie nie recht einfügen wollte, eine neue Erklärung geschaffen. *Zweitens* stellt der Alkoholrückstand ein Produkt dar, in dem zwar das aktive Prinzip noch biologisch nachzuweisen ist (s. o.), aus dem aber unwirksame Extraktsubstanzen bereits z. T. entfernt sind. Und in der Tat wird die Identifizierung der wirksamen Substanz nicht dadurch erleichtert, daß aus dem Ausgangsmaterial möglichst viele und verschiedene Fraktionen dargestellt werden, die alle mehr oder weniger von der wirksamen Substanz enthalten, eine Methode, deren sich die meisten amerikanischen Untersucher bedient hatten. Die Isolierung zielt vielmehr darauf hin, aus einer bestimmten Fraktion möglichst alle nicht aktiven Beimengungen zu eliminieren und auf diese Weise den aktiven Stoff anzureichern. *Drittens* bietet gerade die Verarbeitung des Alkoholrückstandes unter Umständen die Aussicht, die stickstoffhaltigen Substanzen auf besondere Weise herauszunehmen.

Wir haben uns für die Versuche der Methode von *Toenniessen* bedient, auf die auch *Tomcsik* und *Kurotchkin* bei ihren Arbeiten verweisen.

*Toenniessen* hatte sie ausgearbeitet, um die Gallerthülle beim Friedländer-Bacillus chemisch zu charakterisieren. Er versetzt die Kulturen mit einer Lösung von Natriumacetat bis zur Endkonzentration von  $\frac{1}{10}$  n, säuert mit Essigsäure schwach an und gibt dann 3 Volumina 96proz. Alkohol zu. Dabei fällt die gesamte Bakteriensubstanz aus, und es bildet sich darüber eine klare Flüssigkeitssäule. Nach Abheben dieser überstehenden Flüssigkeit wird der Niederschlag mehrfach mit Alkohol in steigender Konzentration gewaschen, in absolutem Alkohol fein zerrieben und nach dem Vertreiben des Alkohols zuletzt mit destilliertem Wasser aufgenommen. Nach Zusatz von 10 ccm 10proz. Kalilauge zu 90 ccm Lösung wird 10 Minuten in kochendem Wasserbade erhitzt; die abgekühlte Lösung wird zentrifugiert, wobei sich die ungelösten Bacillenleiber absetzen. Die hiervon durch Abpipettieren getrennte, leicht opalescente Flüssigkeit gibt schwache Biuretreaktion und wird nach Ansäuern mit Essigsäure etwas trüber. Sie wird mit drei Volumina Alkohol von 96% versetzt, wodurch vollständige flockige Fällung und Klärung der Flüssigkeit eintritt. Der abzentrifugierte Niederschlag enthält, wie die Stickstoffbestimmung der Lösung ergibt, keine stickstoffhaltigen Substanzen. Diese Tatsache wird zur Reingewinnung der Gummisubstanz benutzt, indem mit der ersten Gummifällung der oben beschriebene Vorgang drei- bis viermal wiederholt wird. Zum Schluß wird die Gummisubstanz mit Alkohol von steigender Konzentration gewaschen und durch Abdampfen des anhaftenden absoluten Alkohols auf dem Wasserbade als schneeweißes lockeres Pulver, dessen Stickstoffgehalt fast Null ist, erhalten.

Wir haben den Pferdeschuppenextrakt in sinngemäßer Weise verarbeitet, um die stickstoffhaltigen Verbindungen nach Möglichkeit von den stickstofffreien zu trennen. Dabei konnten die Maßnahmen, die zum Aufschließen und Abscheiden der Bakterienleiber dienten, wie Erhitzen mit Kalilauge und Abzentrifugieren, fortgelassen werden. Bei der Bereitung des Extraktes selbst haben wir 2 Modifikationen durchgeführt: Der Extrakt wurde nach der Methode von *Coca* dargestellt und nach Fertigstellung der eine Teil, wie *Coca* vorschreibt, gegen die zur Herstellung verwendete Pufferlösung (Lösung A von *Coca*<sup>1</sup>) dialysiert; wir nennen ihn Pferdeschuppenextrakt A. Der zweite Teil des Extraktes wurde, um die störende Wirkung der in der Pufferlösung enthaltenen Salze herabzumindern, gegen destilliertes Wasser dialysiert: Pferdeschuppenextrakt W. Nach der Dialyse wurde bei beiden Extrakten die weitere Behandlung in vollkommen analoger Weise durchgeführt.

Es sei zunächst die Behandlung des Pferdeschuppenextraktes A näher beschrieben.

100 ccm des Pferdeschuppenextraktes A wurden nach tropfenweisem Zusatz von 1 n-Natriumacetat unter gleichzeitigem Rühren mit Essig-

<sup>1</sup> Die Lösung A nach *Coca* hat folgende Zusammensetzung: NaCl 5,0%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (krist.) 0,36%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (krist.) 1,43%, Phenol 0,4%.

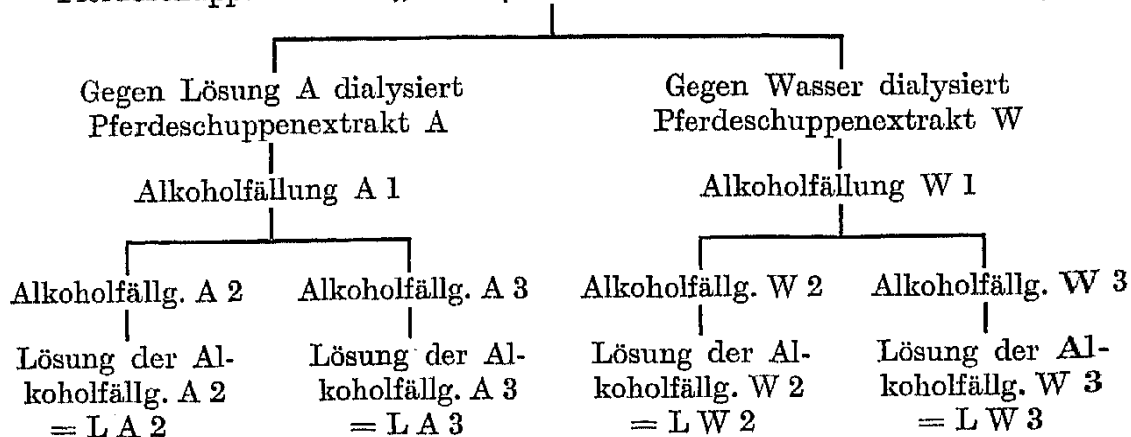
säure schwach angesäuert und mit 300 ccm 96proz. Alkohol versetzt. Beim Stehen schied sich ganz allmählich im Verlauf von mehreren Tagen ein voluminöser Niederschlag ab, der schwach gelbgrau gefärbt war (Alkoholfällung A 1). Die überstehende Flüssigkeit wurde abpipettiert und der Niederschlag 2 Stunden zentrifugiert. Nach Abhebern der Flüssigkeit wurde der Rückstand in 100 ccm Lösung A aufgenommen. Es entstand eine gelblich-weiße trübe Flüssigkeit, in der sich der Niederschlag erst allmählich nach 24 Stunden löste. Beim Zentrifugieren blieb dann kaum mehr ein Rückstand zurück. Die Lösung wurde nunmehr nach Zusatz einiger Tropfen 1 n-Natriumacetat erneut mit Essigsäure schwach angesäuert, wobei bereits eine flockige Ausscheidung entstand, und dann unter Umrühren mit 3 Teilen 96proz. Alkohol versetzt. Die durch weißlich-gelbe Trübung vermehrte Ausfällung ballte sich allmählich zu einem flockigen, voluminösen Niederschlag zusammen. Nach Absetzen dieses Niederschlages wurde die überstehende Flüssigkeit größtenteils abgegossen und der Rest dann 2 Stunden zentrifugiert. Der abgeschleuderte Rückstand (als Alkoholfällung A 2 bezeichnet) wurde nun mit etwa 70 ccm destilliertem Wasser aufgenommen, löste sich aber darin nur zum Teil. Die geklumpten, nicht löslichen Substanzen, die eine gräuliche Farbe und eine klebrigzähe Beschaffenheit aufwiesen, wurden dann abzentrifugiert; durch mehrfaches Verreiben mit kleinen Wassermengen gelang es, den Rückstand größtenteils in Lösung zu bringen. Auf diese Weise gewannen wir schließlich eine trübe, leicht klebrige Flüssigkeit; diese wurde nach der Trennung von ungelöst bleibendem Rückstand mit Lösung A auf 100 ccm aufgefüllt und der *Seitz*-Filtration unterworfen. Die derartig aus Pferdeschuppenextrakt A hergestellte Lösung der Alkoholfällung A 2 wurde mit LA 2 bezeichnet.

Die überstehende wässrige Flüssigkeit, die nach dem Waschen der Alkoholfällung A 2 abgegossen war, wurde ebenfalls mit Essigsäure angesäuert und zunächst mit 3 Teilen absoluten Alkohols versetzt, wobei sich nur eine leichte Opalescenz bis Trübung bildete. Bei Zugabe eines weiteren Volumen absoluten Alkohols entstand ein sehr geringer Niederschlag, der sich nach mehrstündigem Zentrifugieren absetzte (Alkoholfällung A 3). Er löste sich in 100 ccm Lösung A vollkommen auf und ergab die Lösung der Alkoholfällung A 3, bezeichnet mit LA 3. Die Alkoholfällung A 3 stammt also wie A 2 aus der Alkoholfällung A 1 und somit auch die Lösungen LA 3 und LA 2 beide aus A 1.

In derselben Weise wurden aus dem gegen *Wasser* dialysierten Pferdeschuppenextrakt W die entsprechenden Fällungen W 1, W 2, W 3 und die Lösungen LW 2 und LW 3 gewonnen. Der besseren Übersicht halber verweisen wir auf umstehendes Schema.

## Bezeichnungs-Schema.

Pferdeschuppenextrakt „Neu“ (bereitet nach der Methode von Coca).



In der folgenden Tab. 1 sind der Trockenrückstand und der Stickstoffgehalt des Pferdeschuppenextraktes „Alt“ angegeben, mit dem lediglich die vergleichenden Hautprüfungen bei Patienten und Anaphylaxieversuche beim Meerschweinchen angestellt worden waren. Tab. 2 enthält die analytischen Angaben über die aus Pferdeschuppenextrakt „Neu“ (Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen) hergestellten Extrakte und zwar a) Pferdeschuppenextrakt A (gegen Pufferlösung dialysiert) und b) Pferdeschuppenextrakt W (gegen Wasser dialysiert).

Tabelle 1. *Pferdeschuppenextrakt „Alt“ (zum Testen).*

g Trockenrückstand in 100 g Extrakt		Stickstoffgehalt berechnet auf			
		100 g Trockenrückstand		1 cem Extrakt	
		g Stickstoff		mg Stickstoff	
Einzelwerte	Mittelwert	Einzelwerte	Mittelwert	Einzelwerte	Mittelwert
0,96	} 0,97	4,88	} 4,80	0,465	} 0,46
0,98		4,71		0,462	

Das *chemische Verhalten* der Extrakte und Lösungen wurde nur zum Teil untersucht, da die Mengen der erhaltenen Substanzen zu gering waren. Es konnte nur auf den Gehalt an Eiweiß und auf das Vorhandensein von reduzierend wirkenden Substanzen und zwar nur mit einigen charakteristischen Reaktionen geprüft werden. Die Einzelheiten sind aus der Tab. 3 ersichtlich.

Zusammenfassend läßt sich über die hier aufgeführten Ergebnisse folgendes sagen: Die Lösungen der zweiten Fällungen (LA 2 und LW 2), d.h. die Lösungen der im Alkoholrückstand enthaltenen Substanz, besitzen also noch einen ziemlich hohen Stickstoffgehalt (0,31 und 0,14 mg N in 1,0 cem). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Lösungen außer

Tabelle 2.

*Pferdeschuppenextrakt „Neu“ (Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen).*

Art der Probe und Nr.	Trockenrückstand in %		Stickstoffgehalt berechnet auf			
			100 g Trockenrückstand		1 ccm Extrakt od. Lösung	
			g Stickstoff		mg Stickstoff	
	Einzelwerte	Mittelwert	Einzelwerte	Mittelwert	Einzelwerte	Mittelwert

## a) Pferdeschuppenextrakt A (gegen Pufferlösung dialysiert).

Pufferlösung A .	{ 0,62 0,62 }	0,62	{ 0,062 0,082 }	0,072	{ 0,004 0,005 }	0,005
Pferdeschuppen- extrakt A . . .	{ 3,77 3,77 }	3,77	{ 5,41 5,41 }	5,41	{ 1,82 1,82 }	1,82
Lösung der Fäl- lung 2 (L A 2).	{ 0,95 1,02 }	0,99	{ 3,10 3,14 }	3,12	{ 0,32 0,29 }	0,31
Lösung der Fäl- lung 3 (L A 3).	{ 0,80 0,85 }	0,83	{ 0,07 0,14 }	0,11	{ 0,01 0,01 }	0,01

## b) Pferdeschuppenextrakt W (gegen Wasser dialysiert).

Pferdeschuppen- extrakt A . . .	{ 3,77 3,77 }	3,77	{ 5,41 5,41 }	5,41	{ 1,82 1,82 }	1,82
Lösung der Fäl- lung 2 (L W 2)	{ 1,48 1,58 }	1,53	{ 0,95 0,88 }	0,92	{ 0,14 0,14 }	0,14
Lösung der Fäl- lung 3 (L W 3)	{ 0,81 0,90 }	0,86	{ 0,08 0,08 }	0,08	{ 0,007 0,007 }	0,007

Tabelle 3.

Reaktion mit	Bezeichnung der Lösungen (vgl. S. 606)		
	LA 2	LA 3	LW 2
Biuret . . . . .	schwach positiv	negativ	nicht eindeutig, fraglich
Sulfosalicylsäure	stark positiv	negativ	sehr schwache Opal- escens: schwach pos.
Fehling . . . . .	negativ	negativ	nach längerem Stehen schwach rotbrauner Bodensatz: schwach positiv
Nylander . . . . .	zuerst schwach bräun- lich, beim Abkühlen dunkler gefärbt: schwach positiv	negativ	schwach bräunliche Verfärbung: schwach positiv

Bemerkung: Kontrollprüfungen der verwendeten Reagentien mit Toluol, das, wie üblich, den Extrakten als Konservierungsmittel zugesetzt war, und mit der Pufferlösung A waren stets negativ.



der wirksamen Substanz auch noch die Salze der zu ihrer Lösung verwendeten Pufferlösung enthalten. Infolgedessen ist der Stickstoffgehalt der wirksamen Substanz tatsächlich höher als der in der Tab. 2 für den Trockenrückstand berechnete Wert (3,12 und 0,92% N). Der Ausfall der in Tab. 3 angegebenen Eiweißreaktionen (Biuret und Sulfosalicylsäure) entspricht ungefähr den in Tab. 2 aufgeführten Stickstoffwerten; der Ausfall der Proben war am stärksten bei LA 2 (3,12% N) und schwächer bei LW 2 (0,92% N). Wie aus Tab. 3 ersichtlich, sind in beiden Lösungen reduzierend wirkende Substanzen spurenweise nachweisbar.

Die aus der überstehenden Flüssigkeit gewonnenen Lösungen LA 3 und LW 3 enthalten, wie Tab. 2 ergibt, nur Spuren von Stickstoff (0,11 und 0,08% N im Trockenrückstand). Dementsprechend verliefen auch die Reaktionen auf Eiweiß (Tab. 3), die allerdings nur mit LA 3 ausgeführt werden konnten, negativ. Ebenso negativ verliefen die mit LA 3 auf reduzierend wirkende Substanzen angestellten Reaktionen.

Die Untersuchung der erhaltenen Extrakte und zwar sowohl der im Alkoholrückstand enthaltenen Fraktionen (LA 2 und LW 2) wie auch der Restfraktionen (LA 3 und LW 3) auf ihre *biologische* Wirksamkeit wurde erstens durch den Anaphylaxieversuch und zweitens durch die Prüfung an der menschlichen Haut durchgeführt. Es wurde schon an anderer Stelle (*Adelsberger*, l. c.) darauf hingewiesen, daß diese Prüfung in gewissem Sinne willkürlich ist und lediglich dem Mangel an sicheren Methoden zum Nachweis der Allergene entspringt.

Die *Anaphylaxieversuche* beim Meerschweinchen erfolgten sowohl durch Prüfung der sensibilisierten Tiere mittels der intravenösen Reinjektion wie auch durch die Untersuchung am sensibilisierten Darmstück.

Bei den üblichen Anaphylaxieversuchen im Lebendversuch wurde eine einwandfrei anaphylaktisierende, d. h. sensibilisierende und shockauslösende Fähigkeit der dargestellten Lösungen nicht nachgewiesen.

Es wurden 8 Tiere, und zwar je 2, mit den Lösungen LA 2, LA 3, LW 2 und LW 3 vorbehandelt. Bei der Reinjektion mit dem jeweils zur Vorbehandlung verwendeten Extrakt reagierte nur ein mit LA 2 behandeltes und reinjiziertes Tier mit Unruhe, Niesen und Dyspnoe. Die übrigen 7 Tiere zeigten keine anaphylaktischen Symptome. Ein Meerschweinchen (Nr. 541) wurde allerdings sofort nach der Reinjektion von 1,0 ccm LW 2 schwer krank, aber das Symptombild bei diesem Tier schien nicht identisch mit der Anaphylaxie, sondern entsprach vielmehr dem Zustandbild, wie es nach der intravenösen Injektion von Pferdeschuppenextrakt vereinzelt beobachtet und anderweitig beschrieben ist. (Vgl. vorstehende Arbeit.) Eine Sensibilisierung mit dem Original-Pferdeschuppenextrakt und nachfolgende Prüfung der End-

extrakte lediglich auf ihre shockauslösende Wirkung wurde bei dieser Serie, nur einmal, und zwar mit negativem Erfolge, durchgeführt.

Die Untersuchung auf Anaphylaxie durch Prüfung des sensibilisierten Meerschweinchendarmes — auf die Methodik, ihre Brauchbarkeit und ihre Grenzen wird an anderer Stelle noch ausführlich einzugehen sein —, ergab weniger eindeutige Resultate (vgl. Tab. 4). Bei Vorbehandlung mit LA 2 konnte bei 4 Tieren eine Sensibilisierung für diesen Extrakt selbst nicht nachgewiesen werden. Es trat aber bei dem Darm eines derartig vorbehandelten Tieres eine mehr oder weniger starke Reaktion auf den Pferdeschuppenextrakt „Alt“ ein. Bei 2 mit Lösung LW 2 sensibilisierten Tieren konnte aus Mangel an Substanz im Darmversuch nicht mit LW 2 geprüft werden. Bei Zusatz von Pferdeschuppenextrakt „Alt“ reagierte der Darm des einen Tieres nicht nachweisbar, während sämtliche geprüfte Darmabschnitte des zweiten mit LW 2 vorbehandelten Meerschweinchens sehr stark auf Pferdeschuppenextrakt „Alt“ ansprachen. Es handelte sich bei diesem Tier um das bereits oben erwähnte Meerschweinchen (Nr. 541), das bei der intravenösen Zufuhr eine besondere, abweichende Reaktion gezeigt hatte. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß die Eigenschaft des Pferdeschuppenextraktes „Alt“, bei einzelnen Tieren „toxisch“ zu wirken, auch der Lösung LW 2 zukommt (s. o.), oder aber, daß die Lösungen LA 2 und LW 2 den Meerschweinchendarm für Pferdeschuppenextrakt „Alt“ zu sensibilisieren vermögen. Hierfür würden auch die Beobachtungen an den mit Pferdeschuppenextrakt „Alt“ vorbehandelten Tieren sprechen: eines dieser Tiere reagierte im Darmversuch auf LA 2, ein anderes auf LW 2 positiv.

Anders als bei den Anaphylaxieversuchen am lebenden Tier schien es bei den Darmversuchen, als ob der Lösung LW 3 eine sensibilisierende und shockauslösende Wirkung zugestanden werden muß; denn der Zusatz dieses Extraktes bewirkte am Darm von 4 homolog vorbehandelten Meerschweinchen mehrfach eine starke Kontraktion. Pferdeschuppenextrakt „Alt“ und eine Pferdeschuppen-Kochsalzlösung gaben bei derartig vorbehandelten Tieren vereinzelt schwache Reaktionen. (Der Kochsalzextrakt aus Pferdeschuppen gestattete es, die Wirkung der Pufferlösung A auszuschließen.) Von den mit dem Pferdeschuppenextrakt „Alt“ behandelten Tieren reagierte im Darmversuch ein Tier positiv auf Zusatz von LW 3.

Die Prüfung auf die Stärke beim Hauttest wurde bei 2 Patientinnen (Dr. und Vo.) mehrfach, auch in Abständen von mehreren Monaten, ausgeführt und ergab stets die gleichen Resultate. Die eine der Patientinnen (Dr.) hat eine sehr ausgesprochene Überempfindlichkeit gegen Pferdeschuppen und litt an schweren Asthmaanfällen. Die andere Patientin (Vo.) krankt an Heufieber und kann außerdem Pferdegeruch nicht

Tabelle 4.

Tier Nr.	Tag der Sensibilisierung	Vorbehandlung mit	Getötet am	Lösung A
646	17. VIII. 1929	i. p. 1,0 cem Pferdeschuppenextr. „Alt“	4. IX. 1929	—
851	29. VIII. 1929	i. p. 1,0 Pferdeschuppenextr. „Alt“		
252 „Alt“ <sup>1</sup>	25. X. 1929	i. v. 1,0 Pferdeschuppenextr. „Alt“		
18 „Alt“	8. VIII. 1929 10. VIII. 1929	s. c. 1,0 LA 2 s. c. 1,0 LA 2	4. IX. 1929	
72 „Alt“	8. VIII. 1929 10. VIII. 1929	i. p. 1,0 LA 2 i. p. 1,0 LA 2	4. IX. 1929	—
817	9. IX. 1929 11. IX. 1929	i. p. 1,0 LW 3 i. p. 1,0 LW 3	2. X. 1929	
145 „Alt“	8. VIII. 1929 10. VIII. 1929	s. c. 1,0 LW 3 s. c. 1,0 LW 3	5. IX. 1929	—
843	8. VIII. 1929 10. VIII. 1929	i. p. 1,0 LW 3 i. p. 1,0 LW 3	5. IX. 1929	— ±
537	5. III. 1929 7. III. 1929 27. III. 1929	i. p. 0,25 LA 3 i. p. 0,25 LA 3 i. v. 1,0 LA 3	13. VIII. 1929	

<sup>1</sup> Die Bezeichnung „Alt“ bei der Tiernummer besagt, daß das Tier bereits vorher

Tabelle 4.

Pferdeschuppen- extrakt „Alt“	Darm geprüft mit					
	LA 2	LA 3	LW 2	LW 3	Aqua dest.	Pferde- serum
++++ ++++ (in NaCl) ++++ ±	+++		— — —			
± ± — (+)				— — — —	++++ ++++	
++++ +/ +++				+ +/ +++		++++
— — — —	— — — —				+++ ++++ ++	
+/ +/ — —	— — — —				++	
+/ — — —				++ ± ± —		
— +/ +++				— +/ ± +++ ±		
(in NaCl) ± — ±			(+)	+/ +++ — +/ +++		
— — — —		— — — —			++++ ++	±

zu Giftversuchen oder zu Fleckfiebersversuchen verwendet worden war.

Tabelle 4.

Tier Nr.	Tag der Sensibilisierung	Vorbehandlung mit	Getötet am	Lösung A
541	21. III. 1929 23. III. 1929 15. IV. 1929	i. p. 0,1 LW 2 i. p. 0,1 LW 2 i. v. 1,0 LW 2	25. IX. 1929	
542	21. III. 1929 23. III. 1929 15. IV. 1929	i. p. 0,1 LW 2 i. p. 0,1 LW 2 i. v. 1,0 LW 2	26. IX. 1929	
543	21. III. 1929 23. III. 1929 15. IV. 1929	i. p. 0,5 LW 3 i. p. 0,5 LW 3 i. v. 1,0 LW 3	2. X. 1929	
211 „Alt“	17. XII. 1929 19. XII. 1929 21. 12. 1929	s. c. 1,0 LA 2 $\frac{1}{100}$ s. c. 1,0 LA 2 $\frac{1}{100}$ s. c. 1,0 LA 2 $\frac{1}{100}$	24. I. 1930	
280 „Alt“	17. XII. 1929 19. XII. 1929 21. XII. 1929	s. c. 1,0 LA 2 $\frac{1}{100}$ s. c. 1,0 LA 2 $\frac{1}{100}$ s. c. 1,0 LA 2 $\frac{1}{100}$	24. I. 1930	
262 „Alt“	25. X. 1929	i. v. 1,0 Pferdeschuppenextr., „Alt“	28. XI. 1929	
867 „Alt“	1. XI. 1929 1. XI. 1929	i. c. 0,05 Pferdeserum i. c. i. c. 0,05 Menschenserum i. c.	28. XI. 1929	
869 „Alt“	1. XI. 1929 1. XI. 1929	i. c. 0,05 Pferdeserum i. c. i. c. 0,05 Menschenserum i. c.	18. XI. 1929	
942 „Alt“	18. XII. 1929	i. v. 1,0 Pferdeschuppenextr., „Alt“		
279 „Alt“	17. XII. 1929	1,0 Pferdeschuppenextr., „Alt“	25. I. 1930	

Bemerkungen: Der Zusatz des Antigens zum Darmstück erfolgte, sofern nicht

— = keine Kontraktion des Darmes.

± = sehr geringe Kontraktion des Darmes.

+ = deutliche Kontraktion des Darmes, nicht eindeutig positiv.

(Fortsetzung).

Darm geprüft mit						
Pferdeschuppen- extrakt „Alt“	LA 2	LA 3	LW 2	LW 3	Aqua dest.	Pferde- serum
++++ ++++ ++++ +++						1/40 — 1/20 — — —
— ±/+ — —						— —
				++ —		
— — — —	—   — <sup>1/200!</sup>		— ± —		—	— —
— — —	—		— — ±		+++ ++ ++++	—
+ u. +++ (+)			+++ ++			— —
— — +			+++ ±			++++ +/>++
+				—		++++
+			—			±
—			—		+/>++	

ausdrücklich anders vermerkt ist, stets in der Verdünnung 1 : 20.

++ = ausgesprochene Kontraktion des Darmes, positiv.

+++ = starke Kontraktion des Darmes

++++ = sehr starke Kontraktion des Darmes } stark positiv.












vertragen. Es wurden stets Kontrollproben mit einem Test-Pferdeschuppenextrakt (Pferdeschuppenextrakt „Alt“) angestellt, der immer in der Verdünnung 1:1000 zur Anwendung kam. Die Hautprüfung zeigte nun, daß LA 2 und LW 2 sehr ausgesprochene Hautreaktionen gaben, die jedoch an Stärke etwas hinter dem Vergleichsextrakt zurückblieben. Die Reaktionen auf die Verdünnung 1:100 waren ungefähr dieselben wie die Reaktionen auf Pferdeschuppen „Alt“ 1:1000. Mit LA 3 und LW 3 wurden, auch bei Anwendung der konzentrierten Lösungen, Hautreaktionen nicht erzielt.

Bei der passiven Übertragung im *Prausnitz-Küstnerschen* Versuch verhielt sich die Lösung LA 2 ebenso wie der Pferdeschuppentestextrakt „Alt“ (vgl. Tab. 5). Die mit 0,1 ccm Serum von der Patientin Vo. vorbehandelten Stellen reagierten im lokalen Übertragungsversuch auch auf LA 2. Die folgende Skizze zeigt einen Übertragungsversuch, wobei einem nicht überempfindlichen Individuum an 6 Stellen je 0,1 ccm Serum der Patientin Vo. injiziert und mit Pollen- oder Pferdeschuppenextrakt intracutan geprüft wurde. Dabei zeigte sich, daß nach wiederholter lokaler Vorbehandlung mit Pollen eine Reaktion auf Pferdeschuppen nicht mehr auftrat. Nach der Vorbehandlung mit Pferdeschuppenextrakt „Alt“ und ebenso mit LA 2 wurden durch Polleninjektion noch positive Hautreaktionen erzeugt. Pferdeschuppenextrakt „Alt“ und LA 2 sättigten sich gegenseitig im Hautversuch ab<sup>1</sup>.

Es zeigte sich also, daß aus Pferdeschuppenextrakt durch kombinierte Essigsäure-Alkoholfällung eine Substanz (LA 2 bzw. LW 2) gewonnen wird, die sich bei Prüfung mit Sulfosalicylsäure und mit der Biuretreaktion mehr oder weniger stark eiweißhaltig erweist, und die reduzierend wirkende Bestandteile in geringer Menge enthält. Diese Substanz hat sich weder im Lebendversuch noch bei Untersuchung am Meerschweinchendarm als anaphylaktogen gegen sich erwiesen. Bei Prüfung an der Haut von Patienten, die gegen Pferdeschuppen überempfindlich waren, hat sie sich als sehr stark wirksam gezeigt. Dabei war die Lösung LA 2, die einen größeren Eiweißgehalt aufwies und 0,31 mg Stickstoff in 1 ccm hatte, stärker wirksam als die Lösung LW 2 mit 0,14 mg Stickstoff in 1 ccm. Die Hautreaktionen waren bei beiden Extrakten nicht so stark wie bei dem Vergleichsextrakt; dabei muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß die Alkoholfällung vor der Auflösung

<sup>1</sup> *Storm van Leeuwen*, der die Desensibilisierung beim *Prausnitz-Küstnerschen* Versuch meist nicht für spezifisch erachtet, weist mit Recht auf die Notwendigkeit von Kreuzversuchen zur Entscheidung, ob eine Desensibilisierung wirklich spezifisch ist, hin. D. e. von uns (A.) hat bei der passiven Übertragung und der nachfolgenden Absättigung mit Pollen von *Timothy* und *Phalaris arund.* und mit Pferdeschuppen mehrfach dieselbe Beobachtung wie bei dem hier skizzierten Versuch gemacht und möchte ihr deshalb doch einige Gesetzmäßigkeit zusprechen.

Tabelle 5. Blutentnahme am 2. IV. 1929; übertragen am 4. IV; geprüft am:

	9. IV. mit	10. IV. ebenso ebenso wie 9. IV.	12. IV. mit	13. IV. mit
1	Pferdeschuppen LA 2 0,01 	—	Pferdeschuppen „Alt“ 0,001	Dact. glomerat. 0,01 . . . . . 
2	desgl. . . . .	—	desgl. . . . .	Phalaris 0,01 . . . . . 
3	Phalaris . . . . .		Phalaris 0,01 . . . . .	Pferdeschuppen „Alt“ 0,001 —
4	Pferdeschuppen „Alt“ 0,001 		Pferdeschuppen LA 2 0,1	Phalaris 0,01 . . . . . 
5	desgl. . . . .		desgl. . . . .	Dact. glomerat. 0,01 . . . . . 
6	Dact. glomerat. 0,01 . . . . . 		Dact. glomerat. 0,01 . . . . .	Pferdeschuppen „Alt“ 0,001 —



in der Pufferlösung mit destilliertem Wasser gewaschen worden war und daß die allergisch wirksame Substanz im allgemeinen wasserlöslich ist.

Die Substanz, die aus dem Filtrat der Alkoholfällung durch erneute Alkoholsättigung gewonnen war, wurde ebenfalls mit der Pufferlösung extrahiert. In diesen beiden Extrakten (LA 3 und LW 3) ließen sich weder Eiweiß noch Kohlehydrate nachweisen. Der Stickstoffgehalt von LA 3 betrug 0,01 mg und von LW 3 0,007 mg in 1 ccm. Bei der Prüfung an der Haut spezifisch überempfindlicher Patienten erwiesen sich diese Lösungen, auch bei Anwendung in konzentrierter Form, als völlig unwirksam. Bei intravenöser Reinjektion von spezifisch sensibilisierten Meerschweinchen lösten sie keine anaphylaktischen Symptome aus. Bei Prüfung am Darm von Meerschweinchen, die mit LW 3 vorbehandelt waren, traten bei Zusatz der gleichen Lösung mehrfach ausgesprochene Kontraktionen auf.

#### *Zusammenfassung.*

*Die allergisch wirksame Substanz im Pferdeschuppenextrakt ist in der Alkoholfällung nachweisbar und läßt sich nach einem Verfahren, das bei der Darstellung der polysaccharidartigen Bakterienhüllen (Toenniessen) und bei der Isolierung der shockauslösenden Substanzen bei der Bakterienanaphylaxie Anwendung gefunden hat, ebenfalls gewinnen. Sie ist dabei in verhältnismäßig günstiger Ausbeute darzustellen und von bedeutender Wirksamkeit, wie daraus erhellt, daß der Trockenrückstand der Lösung LA 2 0,99% beträgt, von welchem 0,62% für den Gehalt der Pufferlösung A abgezogen werden müssen, so daß also der wirksamen Substanz, die noch in der Verdünnung 1:100 starke Reaktionen auslöste, im Höchsthalle ein Trockenrückstand von 0,37% zukommen kann. Die an der Haut überempfindlicher Menschen wirksame Lösung (LA 2 bzw. LW 2) ist eiweißhaltig und hat einen relativ hohen Stickstoffgehalt. Es bleibt noch übrig, diese Substanz aufzuschließen und vor allem die reduzierend wirkenden Stoffe daraus zu eliminieren, um auch deren Bedeutung für die Überempfindlichkeit beim Menschen zu klären.*

*Der Ausfall der Anaphylaxieversuche ist in doppelter Hinsicht bemerkenswert. Erstens war ein Parallelismus zwischen der Wirksamkeit der einzelnen Extrakte oder Lösungen auf die Haut überempfindlicher Patienten und ihren anaphylaktischen Eigenschaften im Tierversuch nicht wahrzunehmen, was im Gegensatz zu anderen Beobachtungen für die Ansicht Cacas sprechen würde. Zweitens war bei der Lösung LW 3, die, wenn überhaupt, so nur noch außerordentlich wenig eiweißartige Stoffe enthält, eine anaphylaktische Wirkung im Darm-*

versuch im Gegensatz zu den in diesem Falle unwirksamen Lösungen LA 2 und LW 2 mit wesentlich höherem Stickstoffgehalt deutlich festzustellen.

---

#### Literaturverzeichnis.

Bezüglich der *Literatur* sei auf die Zusammenstellung in der vorhergehenden Arbeit verwiesen. Außerdem wurden berücksichtigt:

*Adelsberger*, Z. Hyg. **110**, 278. — *Avery* u. *Goebel*, J. of exper. Med. **50**, 533 (1929). — *Bloch*, *Br.*, u. *Karrer*, Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich **72**, Beibl. Nr 13, S. 1 (1926). — *Caulfield*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **23**, 38 (1925/26). — *Coca* u. *Grove*, J. of Immun. **10**, 445 (1925). — *Csonka*, *Bernton* u. *Jones*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **23**, 14 (1925/26). — *Grove* u. *Coca*, J. of Immun. **10**, 471 (1925). — *Jadassohn*, *W.*, u. *Zaruski*, Zbl. Hautkrkh. **18**, 478 (1926). — *Toenniessen*, Zbl. Bakter. I Orig. **85**, H. 4, 225 (1920). — *Tomcsik* u. *Kurotchkin*, J. exper. Med. **47**, 379. — *Walzer* u. *Grove* **10**, 483 (1925).

---

Das Original lässt leider keine bessere  
Qualität der Reproduktion zu !

Due to bad print quality of the publication, it's  
not possible to provide you with better  
duplication!