theorie[24, 25], die Analogie von Teilungsspindelkontraktion und Muskelkontraktion[26,27], Angriffspunkte an verschiedenen Fermenten[28] sowie die These, daß durch Stoffe mit zwei chemisch aktiven Zentren Chromosomen aneinander gekettet und so die Kernteilung gestört werden soll[29]. Zur Stütze dieser Ansicht können auch andere Befunde herangezogen werden[30].

Am einfachsten ließe sich die Teilungsstörung aus einer Schädigung der Zellplasmakolloide bzw. deren Grenzflächen erklären[31]. So wurde bereits mehrfach hingewiesen auf die Notwendigkeit einer vorwiegenden Lipoidlöslichkeit des wirksamen Agens für das Zustandekommen einer Mitosehemmung[32, 33]. In Analogie zu der Narkosetheorie von Meyer-Overton soll auch für die cytostatische Wirkung nur die *Zahl* der in den Lipoiden gelösten (oder, nach Warburg, an deren Grenzflächen adsorbierten) Moleküle, nicht aber deren Struktur, maßgeblich sein. Die Größe dieser Zahl ist abhängig vom Verhältnis der Löslichkeit in den Phasen Wasser und Lipoid.

Da die untersuchten Substanzen durchweg besser in organischen Lösungsmitteln als in Wasser löslich sind und auch die wirksame Dosis ziemlich hoch liegt, könnte diese Hypothese auch zur Erklärung der beschriebenen Wirkungen herangezogen werden. Ein Beweis hierfür ist aus den vorliegenden Befunden jedoch ebensowenig zu erbringen wie für die übrigen Erklärungsversuche. Interessant ist aber in diesem Zusammenhang, daß die Substanz 20 außer ihrer cytostatischen eine narkotische Wirkung aufweist, welche die des Urethans übertrifft.

[24] U. Köhler, Ärztl. Forschg. **5**, 449 [1951].
[25] H. Oßwald, Z. Krebsforschg. **58**, 65 [1951].
[26] J. Brachet, Embryologie chimique, Paris 1947.
[27] H. Lettre u. Mitarbb., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **271**, 200 [1941]; **278**, 201 [1943]; Naturwiss. **37**, 378 [1950]; **38**, 70 [1951]; Klin. Wschr. **29**, 555 [1951]; Angew. Chem. **63**, 421 [1951]; Scientia pharmac. **20**, 75 [1952].
[28] K. Hardebeck, Naunyn-Schmieuebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **211**, 57 [1950]; A. K. Powell, Brit. J. Cancer **5**, 264 [1951]; s. a. K. Lang, G. Siebert u. S. Lucius, Experientia [Basel] **8**, 229 [1952].
[29] E. Boyland, Endeavour **11/42**, 87 [1952].
[30] J. A. Hendry, F. L. Rose u. A. L. Walpole, Nature [London] **165**, 993 [1950]; Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **6**, 357 [1951]; J. chem. Soc. [London] **1952**, 328; L. Heilmeyer, Schweiz. Med. Wschr. **79**, 539 [1949]; Klin. Wschr. **30**, 537 [1952]; J. A. Karnofsky u. Mitarbb., Arch. Int. Med. **87/IV**, 477 [1951].
[31] R. Danneel, Vortrag Düsseldorf 12. 7. 1952; K. Voit u. H. J. Hodeige, Ärztl. Forschg. **3**, 387 [1949]; F. Meythaler u. F. Händel, Ärztl. Forschg. **3**, 497 [1949]; P. Michaelis u. R. W. Kaplan, Naturwiss. **37**, 494, 546 [1950].
[32] H. Druckrey u. H. Hamperl, Klin. Wschr **28**, 289 [1950].
[33] Oestergreen, n. Lettré, Scientia pharmac. **20**, 75 [1952].

Über bakterielle Reizstoffe
I. Mitt.: Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogens aus *Bacterium coli*

Von Otto Westphal, Otto Lüderitz, Erwin Eichenberger und Walter Keiderling
Aus den Dr. A. Wander-Laboratorien Säckingen (Baden) und Bern (Schweiz)
und der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer)

(Z. Naturforschg. **7b**, 536—548 [1952]; eingegangen am 31. August 1952)

Herrn Professor Dr. Hans Schmidt (Marburg) zum 70. Geburtstag, am 31. August 1952, gewidmet

Aus Colibakterien (Stamm Kröger 0-Gruppe 8) wurde ein hochwirksames Pyrogen dargestellt. Die Bakterien wurden mit Phenol/Wasser extrahiert (Verfahren nach Westphal, Lüderitz u. Bister), die erhaltene wäßrige Lösung der Polysaccharid/Nucleinsäure-Fraktion wurde zur Entfernung der Nucleinsäure mehrfach mit Äthanol fraktioniert; aus der so gewonnenen angereicherten Polysaccharid-Fraktion konnte durch Ultrazentrifugation das reine Pyrogen in einer Ausbeute von 1—2% der bakteriellen Trockensubstanz als Sediment abgetrennt werden. Es handelt sich um ein hochmolekulares, wasserlösliches *Lipopolysaccharid*, welches zu ~ 75% aus einer phosphorylierten (6—7% organisch gebundenes Phosphat) Polysaccharid-Komponente und zu 12—13% (Minimalwert) aus einer lipoidalen Komponente aufgebaut ist. Das Material ist frei von Protein-, Peptid- oder Aminosäure-Anteilen sowie von Nucleinsäure. Die pyrogene Grenzdosis nach intravenöser Injektion beim Kaninchen beträgt 0,002 μg/kg, beim Menschen 0,001 μg/kg. Es handelt sich um das bislang wirksamste Pyrogen, welches aus gramnegativen Bakterien isoliert werden konnte.

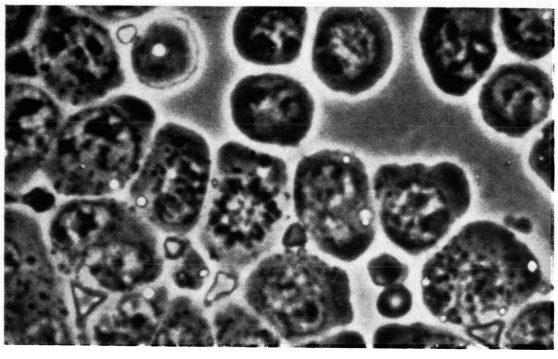

Abb. 1. Lebende Asciteszellen.

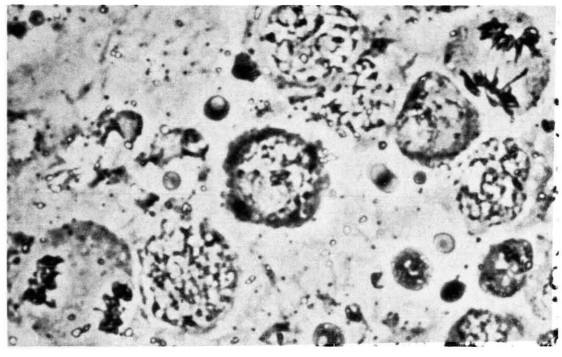

Abb. 2. Carminessigsäurepräparat. Übergänge zur Brükkenbildung (unbehandeltes Tier).

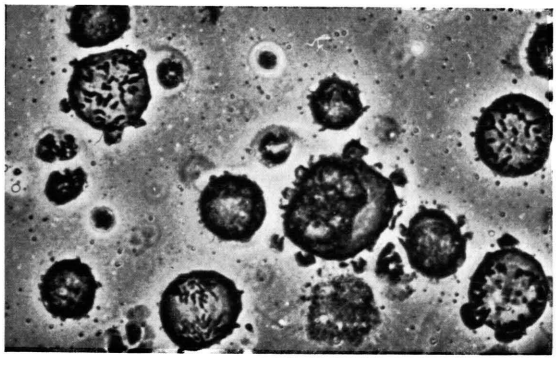

Abb. 3. 4 Stdn. nach 4 mg Isonicotinsäure-hydrazid.

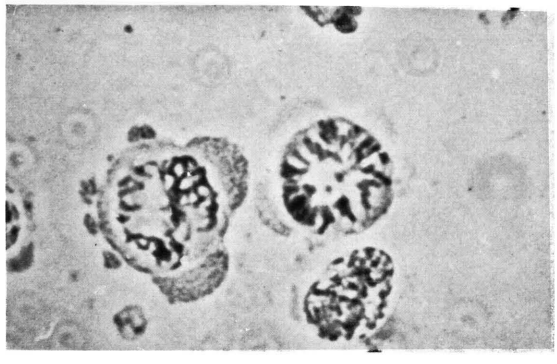

Abb. 4. 7 Stdn. nach 0,2 mg Derivat 16.

In ähnlicher Weise fanden sich auch nach anderen Präparaten zersplitterte Metaphasen, Brückenbildung in der Anaphase und Plasmaaustritte.

Sämtliche Bilder Phasenkontrast 1000 : 1.

Das erhaltene Lipopolysaccharid wurde mit anderen Bakterien-Reizstoffen, insbesondere mit dem sehr ähnlich aufgebauten tumor-nekrotisierenden Polysaccharid-Symplex aus *B. prodigiosus* (von M. J. Shear), verglichen. — Das beschriebene Aufarbeitungsverfahren ist allgemeiner zur Gewinnung der Polysaccharid-Pyrogene gramnegativer Bakterien geeignet.

Es ist seit langem bekannt, daß zahlreiche gramnegative Bakterien fiebererzeugende Stoffe bilden, und viele Versuche sind unternommen worden, derartige Pyrogene anzureichern und zu charakterisieren.

Co Tui und seine Mitarbeiter [1] isolierten aus Typhusbakterien ein Pyrogen, welches sich im wesentlichen als hochmolekulares Polysaccharid erwies und dessen pyrogene Grenzdosis [2] bei intravenöser Injektion am Kaninchen 0,06 μg/kg, am Menschen 0,02 μg/kg betrug. Im gleichen Jahr (1944) stellten Robinson u. Flusser [3] Pyrogene aus *S. typhi, Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus vulgaris* dar. Die hochgereinigten Substanzen ergaben negative Teste für Stickstoff, waren also proteinfrei, und zeigten die typischen Eigenschaften von Polysacchariden. Das so dargestellte Polysaccharid-Pyrogen aus Typhusbakterien verhielt sich in der Ultrazentrifuge homogen und hatte ein Molekulargewicht von 62000. Die pyrogene Grenzdosis für Kaninchen lag jedoch mit 0,2—1,0 μg/kg wesentlich höher als bei dem Präparat von Co Tui [1]; das Typhus-Pyrogen von Robinson und Flusser war somit wesentlich schwächer wirksam.

Häufig hat man Inhaltsstoffe oder Substanzen aus dem Kulturmedium von Bakterien bearbeitet, bei denen sich im Laufe der Untersuchung oder nachträglich ergab, daß sie stark pyrogene Eigenschaften besitzen.

So zeigen viele antigene Endotoxine gramnegativer Bakterien pyrogene Wirkungen am Tier und Menschen. H. R. Morgan [4] hat z. B. gezeigt, daß ein von ihm isoliertes und angereichertes antigenes Endotoxin aus Typhusbakterien für Kaninchen und den Menschen ein starkes Pyrogen ist, dessen Grenzdosis am Menschen in der Größenordnung von 0,01 μg/kg lag. Derartige Endotoxine sind in genuinem Zustande hochmolekulare Symplexe, welche hauptsächlich aus einer Polysaccharid-, Protein- und Lipoid-Komponente aufgebaut sind, wie W. T. J. Morgan und Partridge [5] am Beispiel des 0-Endotoxins von Shiga-Ruhr- und Typhusbakterien und Goebel [6] an Flexner-Ruhrbakterien gezeigt haben.

Bei der Untersuchung der tumor-nekrotisierenden Wirkung von Bakterienprodukten isolierten Shear und seine Mitarbeiter komplexe Polysaccharide aus den Kulturfiltraten von *B. coli* [7] und *B. prodigiosus (Serratia marcescens)* [8]. Das tumor-nekrotisierende *Serratia-marcescens*-Polysaccharid, welches proteinfrei war und nach Messungen in der Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht von etwa 8 Millionen besitzt [9], erwies sich als ein hochwirksames Pyrogen [10], dessen pyrogene Grenzdosis am Kaninchen 0,005 μg/kg betrug.

Unsere heutigen Kenntnisse über die chemische Natur und die biologischen Eigenschaften von Bakterienpyrogenen gründen sich daher nicht nur auf die spezielle Erforschung der Pyrogenität bakterieller Produkte. Sie wurden mittelbar wesentlich gefördert durch Untersuchungen über antigene, toxische, tumornekrotisierende u. a. Wirkungen von Substanzen, die sich früher oder später als starke Pyrogene erwiesen haben. Über den derzeitigen Stand der Erforschung bakterieller Pyrogene und ihrer biologischen Wirkungen haben kürzlich Bennett und Beeson [11] zusammenfassend berichtet.

Bekanntlich haben fiebererzeugende Stoffe und besonders bakterielle Pyrogene großes praktisches Interesse: einerseits werden sie in Form von Vaccinen oder angereicherten Extrakten seit langem und neuerdings wieder zunehmend zur künstlichen Erzeugung von Fieber bei der sogenannten unspezifischen Reiztherapie in der Klinik angewandt [12]; andererseits ist die sichere Verhinderung des unerwünschten Auftretens pyrogener Stoffe in Injektionslösungen ein bis

[1] Co Tui, D. Hope, M. H. Schrift u. J. Powers, J. Lab. clin. Med. **29**, 58 [1944]; vgl. auch J. Amer. pharmac. Assoc. **5**, 60 [1944].

[2] Definition: Subcommittee No. 3 (Biological Assays) of the Comm. of Rev. of the U.S. Pharmacopoeia; vgl. W. T. McClosky et al., J. Amer. pharmac. Assoc. **32**, 69 [1943].

[3] E. S. Robinson u. B. A. Flusser, J. biol. Chemistry **153**, 529 [1944].

[4] H. R. Morgan, J. Immunology **41**, 161 [1941]; J. Lab. clin. Med. **27**, 706 [1948]; G. O. Favorite u. H. R. Morgan, J. clin. Invest. **21**, 589 [1942]; J. Lab. clin. Med. **31**, 672 [1946].

[5] W. T. J. Morgan u. S. M. Partridge, Biochem. J. **34**, 169 [1940]; **35**, 1140 [1941]; Brit. J. exp. Pathol. **23**, 151 [1942].

[6] W. F. Goebel, F. Binkley u. E. Perlman, J. exp. Med. **81**, 315, 331, 349 [1945].

[7] M. J. Shear et al., Proc. Soc. exp. Biol. Med. **34**, 323, 325 [1936].

[8] M. J. Shear u. F. C. Turner, J. Natl. Cancer Inst. **4**, 81 [1943]; J. L. Hartwell u. M. J. Shear, daselbst **4**, 107 [1943].

[9] H. Kahler, M. J. Shear u. J. L. Hartwell, J. nat. Cancer Inst. **4**, 123 [1943].

[10] L. V. Beck u. M. Fisher, Cancer Res. **6**, 416 [1946].

[11] J. L. Bennett u. P. B. Beeson, Medicine **29**, 365—400 [1950], mit 246 Literaturzitaten. Siehe auch: L. J. de Merre u. T. F. Probey, Les Pyrogènes, Actualitées Med.-Chir. VIII, Belg.-Am. Educ. Found. Inc., Brüssel [1945].

[12] Vgl. [11]), ferner: Ann. intern. Med. **34**, 816 [1951].

heute noch nicht befriedigend gelöstes Problem[13]. Obwohl daher eine große Zahl von Untersuchungen in der einen oder anderen Richtung durchgeführt wurde, ist über die Reindarstellung und chemische Natur von Bakterien-Pyrogenen bisher wenig bekannt geworden. Die meisten beschriebenen Präparate wurden nicht mit genügender Reinheit dargestellt, um verwertbare analytische Daten zu liefern.

Zweifellos ist das bisher reinste und zugleich wirksamste Pyrogen das *Serratia-marcescens*-Polysaccharid von Shear[8, 10]. Die sehr reinen Polysaccharid-Präparate von Robinson und Flusser[3] sind demgegenüber wenigstens um 2 Zehnerpotenzen schwächer wirksam. Weger[14] hat neuerdings aus verschiedenen gramnegativen Bakterien (*Typhus, Coli, Abortus equi)* hochwirksame Fieberstoffe dargestellt und kurz beschrieben, welche sich beim Kaninchen, Pferd und Menschen in Grenzdosen von 0,002 bis 0,004 μg/kg als pyrogen wirksam erwiesen. Die derart hergestellten Stoffe waren komplexe Polysaccharide[15] (N 1,8—2,2%).

Die Mehrzahl der Autoren stimmen darin überein, daß die pyrogenen Eigenschaften der gramnegativen Bakterien vornehmlich an komplexe Polysaccharide gebunden sind. Ob chemisch reine Polysaccharide selbst die Träger der Pyrogenität sind oder ob zur Entfaltung pyrogener Wirksamkeit noch besondere Wirkgruppen an den Polysacharid*träger* gebunden sein müssen, ist bisher nicht entschieden.

Um daher über die chemischen und biologischen Eigenschaften von Bakterien-Pyrogenen weiteren Aufschluß zu erhalten, haben wir entsprechende Polysaccharide einer Reihe gramnegativer Bakterien hoch gereinigt und weitgehend analysiert. Wir beschreiben nachstehend unsere Untersuchungen an einem Polysaccharid-Pyrogen aus Colibakterien.

Material und Methoden

Bakterien. — Zur Gewinnung des nachstehend beschriebenen Pyrogens diente uns ein von E. Kröger (Medizinal-Untersuchungsamt am Hygiene-Institut Göttingen) von einem gesunden Menschen isolierter Colikeim. Die Typenzuordnung verdanken wir Dr. J. Ørskov (Staatl. Serum-Institut Kopenhagen). Es handelt sich um einen glattwachsenden Colistamm mit komplettem 0-Antigen der 0-Gruppe 8 (Kauffmann[16]), von uns als „Coli - Kröger 0 - Gruppe 8" bezeichnet. Fermentative Besonderheiten: Schwefelwasserstoffbildung und positive Ammoniumcitrat-Reaktion. Dieser Stamm hat innerhalb der letzten 4 Jahre konstante Eigenschaften gezeigt und jeweils gleichbleibende Resultate geliefert, sowohl was die Ausbeute an Pyrogen als auch dessen chemische Analyse anlangt. Die Züchtung der Bakterien erfolgte unter Leitung von E. Kröger in 24—36-stdg. dauerbelüfteten[17] Traubenzucker-Bouillon-Kulturen. Die Keime wurden durch Zentrifugation abgetrennt, mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen und durch Zusatz von Aceton abgetötet. Es wurde mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Wir erhielten so ein grau gefärbtes Trockenpulver der Bakterien, welches jeweils für die weitere Aufarbeitung verwendet wurde.

Bestimmung der Pyrogenität. — Hierzu verwendeten wir, wie üblich, Kaninchen beiderlei Geschlechts im Gewicht von 2—3 kg. Die Rectaltemperatur, morgens nüchtern gemessen, soll zwischen 38,2 und 39,2° liegen. Zur Temperaturmessung diente uns eine Anlage mit Widerstandsthermometern der Fa. Hartmann & Braun (Frankfurt a. M.), welche automatisch und gleichzeitig 6 Tiere registriert und die Temperaturkurven direkt mit Sechsfarben-Linienschreibern auf geeichtem Papier wiedergibt. Für jedes Tier wird alle 3 Min. ein Meßpunkt registriert.

Ausführung: Die Kaninchen wurden in geeigneten, angepaßten Kistchen (Modell von Food & Drug, USA.) immobilisiert. Die mit einem Desinfiziens (Bradosol, Fortasept) gut gereinigten Widerstandsthermometer wurden durch einen 0,5 cm langen Hautschnitt unter die Rückenhaut geschoben und mit einer großen Michelklammer festgehalten. Zur Wärmeisolierung wurde über den Rücken ein Schwammgummikissen gelegt und mit einer Gurte befestigt. Die Außentemperatur wurde mit Hilfe eines Thermostaten auf 27° C gehalten. — Nach einer Vorbeobachtung von 1—2 Stdn. wurde die zu untersuchende Substanz, jeweils in 1 ccm gelöst, in passender Konzentration in sterilen Gefäßen bereitet und mit steriler Spritze in die Ohrvene injiziert. Die Beobachtungszeit dauerte in der Regel 8 Stunden. Für 1 Dosis wurden 3—6 Tiere verwendet. Während des Versuchs blieben die Tiere ohne Nahrung.

Die subcutane Messung hat nach unseren Erfahrungen erhebliche Vorteile gegenüber der rectalen: absolut sicherer Sitz des Thermometers, keine Verletzungen bei Bewegungen der Tiere; die erhaltenen Temperaturkurven sind viel ausgeglichener und sehr gut reproduzierbar. Bei guter Isolierung ist die gemessene Temperatur absolut nur wenige Zehntelgrade unterhalb der Rectaltemperatur des betreffenden Tiers. Bei Fieber fanden wir weitgehend parallele Kurvenverläufe bei subcutaner und gleichzeitiger rectaler Messung.

[13] M. A. German, Ann. pharmac. franç. **6**, 464 [1948]; T. F. Probey u. M. Pittmann, J. Bacteriol. **50**, 397 [1948]; R. Ardry, Ann. biol. clin. **7**, 189 [1949]; Co Tui et al., Annals Surg. **116**, 412 [1942].

[14] P. Weger, Naturwiss. **34**, 59 [1947].

[15] Siehe H. Schmidt, Fortschritte der Serologie, 2. Aufl., Verlag D. Steinkopff, Darmstadt [1950/52], S. 134.

[16] F. Kauffmann, J. Immunology **57**, 71 [1947]; vgl. H. Schmidt, Fortschritte der Serologie, zit. (15), S. 145 ff.

[17] Vgl. R. S. Roberts, J. comparat. Pathol. Therapeut. **59**, 286 [1949]; Nature [London] **165**, 494 [1950].

Experimenteller Teil

Zur Extraktion der pyrogenen Fraktion aus den Bakterien eignet sich besonders das kürzlich publizierte Phenol/Wasser-Verfahren [18], welches auch Weger nach unseren Angaben schon 1947 zur Gewinnung seiner Pyrogen-Präparate anwandte [14]. Die wirksamsten Präparate werden durch Extraktion der Bakterien mit homogenen Phenol/Wasser-Mischungen in der Wärme (Verfahren B, l. c. [18], S. 152) erhalten. Aus der wäßrigen Phase erhält man die *proteinfreie Polysaccharid/Nucleinsäure-Fraktion* (mit 50—60% Nucleinsäure und 40—50% Polysaccharid), welche den Hauptteil des bakteriellen Pyrogen-Materials enthält. Zunächst mußte weiter entschieden werden, an welchen Anteil dieser Fraktion die Pyrogenität gebunden ist. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Vorversuche durchgeführt.

Vorversuche

Es wurde versucht, aus der Polysaccharid/Nucleinsäure-Fraktion reines Polysaccharid einerseits, reine Nucleinsäure andererseits abzutrennen.

Auf den Gehalt der erhaltenen Fraktionen an Nucleinsäure schlossen wir durch laufende Bestimmungen der N- und P-Werte sowie durch Absorptionsmessungen bei 258—260 mμ im Beckman-Spektrophotometer.

Wir gingen wie folgt vor:

3,6 g Coli-Rohpyrogen (Polysaccharid / Nucleinsäure-Frakt.; N 6,9, P 4,0; Absorptionsspektrum, Abb. 1, Kurve III) wurden in 80 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 2-*n*. Essigsäure auf p_H 4,5 eingestellt. Hinzu gaben wir 0,2 ccm 2-*n*. Salzsäure (p_H 4,0); der geringe ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Auf Zusatz von weiteren 1,0 ccm 2-*n*. Salzsäure fiel ein dicker, käsig-weißer Niederschlag aus, welcher abzentrifugiert, mit *n*/100-Salzsäure gewaschen, in 30 ccm Wasser resuspendiert und mit *n*/10-Natronlauge in Lösung gebracht wurde. Die Säurefällung wurde wiederholt. Schließlich wurde die Lösung der Nucleinsäure-Fällung auf p_H 7 eingestellt, gegen dest. Wasser dialysiert, im Vakuum bei 35° C eingeengt und lyophil-getrocknet. Wir erhielten 900 mg *Nucleinsäure-Fraktion Co-NS* (N 12,7, P 7,2).

Die überstehende Lösung der ersten Säurefällung gab auf Zusatz weiterer 2-*n*. Salzsäure keinen Niederschlag mehr. Es wurde mit 1-*n*. Natronlauge neutralisiert und gegen dest. Wasser dialysiert. Nach dem Einengen im Vakuum bei 35° C auf ein Volumen von 35 ccm wurde mit Äthanol fraktioniert. Wir erhielten zwischen 70 und 85% Äthanol den Hauptteil der *Polysaccharid-Fraktion*. Die Fraktionierung wurde ohne Rücksicht auf die Ausbeute wiederholt und ergab 400 mg *Co-P* (N 1,9, P 1,6), mit einem Gehalt von 3,6% Nucleinsäure auf Grund des Absorptionsspektrums.

Sowohl Co-NS als auch Co-P erwiesen sich im Pyrogentest am Kaninchen mit $< 0{,}1$ μg/kg als wirksam. Die weitere Reinigung wurde mit Hilfe der präparativen *Elektrophorese* durchgeführt. Zur Gewinnung reiner Nucleinsäure verwendeten wir das Präparat Co-NS; zur Herstellung nucleinsäure-freien Polysaccharids diente das Präparat Co-P.

A) Elektrophorese von Co-P. — 110 mg Co-P wurden in 11 ccm *m*/50 Natriumbicarbonat (p_H 8,2) gelöst und 1½ Stdn. bei einem Spannungsgefälle von 10 Volt/cm im Tiselius-Apparat getrennt. Es ergab sich, daß die Substanz aus *zwei anodisch wandernden Komponenten* besteht; einer schnell wandernden (Nucleinsäure), welche sich bei längerer Elektrophoresedauer in 2 Komponenten (S_1 und S_2) aufspaltete, und einer langsam wandernden (L; Polysaccharid). Es wurde nach 1½ Stdn. in 5 Fraktionen aufgetrennt: 2 anodische Kammern (A_1 und A_2), Mittelstück (M) und 2 kathodische Kammern (K_2 und K_1) zu je etwa 3 ccm.

A_1 enthielt *nur* S_1 *und* S_2 (Nucleinsäure, *Co-PA*$_1$),
A_2 „ haupts. S_1 und S_2 und Spuren L,
M „ ein Gemisch aus S_1, S_2 und L,
K_2 „ haupts. L und Spuren S_1 und S_2,
K_1 „ *nur* L (Polysaccharid, *Co-PK*$_1$).

Während die Lösungen, welche nur S_1 und S_2 enthielten, vollständig klar waren, zeigten jene mit L Opaleszenz, welche mit der L-Komponente wanderte. — Die getrennten Lösungen wurden in der Kälte gegen dest. Wasser dialysiert und die jeweils enthaltene Substanz lyophil-getrocknet. Aus A_1 erhielten wir 1,5 mg Co-PA$_1$, aus A_2 5 mg. Aus M und K_2 wurden erwartungsgemäß Mischungen isoliert. Aus K_1 erhielten wir 18 mg reines *Polysaccharid Co-PK*$_1$. Das Präparat zeigte keinerlei Absorptionsmaximum bei 258—260 mμ (Abb. 1, Kurve I). Die Analyse ergab 1,05% N.

B) Elektrophorese von Co-NS. — 118 mg Co-NS wurden in 50 ccm *m*/50-Natriumbicarbonat wie unter A) elektrophoretisch getrennt. Es zeigte sich, daß die Substanz aus *zwei Komponenten* bestand: die Hauptmenge wanderte schnell (S; Nucleinsäure), die geringere Menge wanderte langsam (L) und zeigte Opaleszenz (Polysaccharid). Wieder wurden 5 Fraktionen isoliert.

A_1 enthielt *nur* S (Nucleinsäure, *Co-NSA*$_1$),
A_2 „ hauptsächlich S und Spuren L,
M „ ein Gemisch von S und L,
K_2 „ hauptsächlich L und wenig S,
K_1 „ *nur L* (Polysaccharid, *Co-NSK*$_1$).

Die Aufarbeitung erfolgte wie unter A. Wir erhielten aus A_1 7 mg *Nucleinsäure Co-NSA*$_1$ und aus K_1 2 mg nucleinsäure-freies Polysaccharid Co-NSK$_1$, das bei 258 bis 260 mμ keinerlei Absorptionsmaximum zeigte. Es ergab sich, daß die L-Komponente aus den Versuchen A und B (Co-PK$_1$ und Co-NSK$_1$) elektrophoretisch identisch waren.

[18] O. Westphal, O. Lüderitz u. F. Bister, Z. Naturforschg. **7 b**, 148 [1952].

Abb. 1 zeigt die Absorptionskurven der beiden Präparate Co-PK_1 (nucleinsäurefreies Polysaccharid, Kurve I) und Co-NSA_1 (Nucleinsäure, Kurve IV).

Im Pyrogentest am Kaninchen ergab sich eindeutig, daß die Pyrogenität an das Polysaccharid gebunden ist. So war das elektrophoretisch langsam wandernde Präparat Co-PK_1, ebenso wie Co-NSK_1,

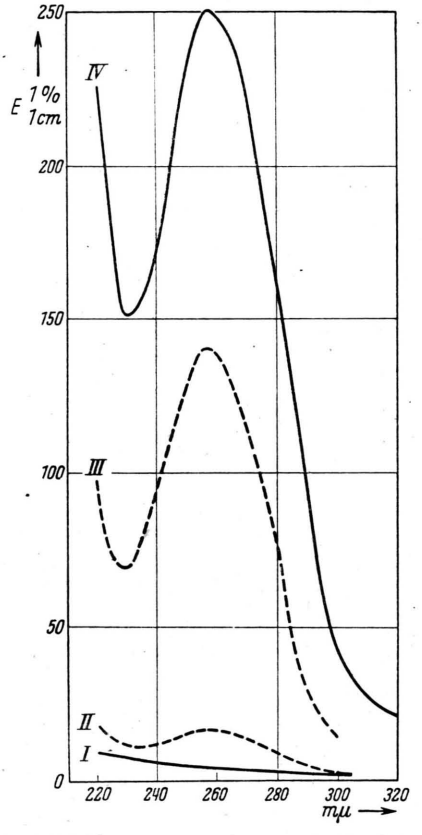

Abb. 1. UV-Absorptionsspektren. I. Nucleinsäurefreies Polysaccharid Co-PK_1, bzw. IV F 77 S, II. Fraktion I/F 65—80 (mit 4,8% Nucleinsäure), III. Polysaccharid/Nucleinsäure-Rohfraktion (mit 56% Nucleinsäure), IV. Nucleinsäure Co-NS A_1.

noch mit 0,01 μg/kg nach intravenöser Injektion stark pyrogen und zeigte bereits bei 10 μg/kg *toxische* Wirkungen (Temperaturabfälle, Durchfall, massive Leukopenien). Dagegen zeigte die reine Nucleinsäure Co-NSA_1, wie auch Co-PA_1, erst bei 10 μg/kg eine geringe pyrogene Wirksamkeit. *Das Polysaccharid Co-PK_1 war demnach mehr als 1000-fach pyrogenaktiver als die Nucleinsäure Co-NSA_1.* Die mittleren Fraktionen A_2, M und K_2 ergaben entsprechende Zwischenwerte.

Aus diesen Vorversuchen ergaben sich zweierlei Aufgaben der weiteren präparativen Aufarbeitung: 1. Quantitative Entfernung der Nucleinsäure, 2. Gewinnung eines einheitlichen Polysaccharid-Präparates.

Reinigung der pyrogenen Polysaccharid-Fraktion

Tal und Goebel[19] haben am 0-endotoxischen Polysaccharid von *Shigella paradysenteriae* gezeigt, daß es schwierig ist, das Polysaccharid vollständig von Nucleinsäure zu befreien, obwohl diese Autoren schließlich nachweisen konnten, daß das reine Toxin keine Nucleinsäure enthält. Sie konnten die bei 258—260 mμ absorbierende Komponente ohne Verlust der Toxizität durch enzymatischen Abbau mit alkalischer Phosphatase entfernen.

Wir haben versucht, bei unseren Präparaten die Nucleinsäure durch Behandlung mit kristallisierter Ribonuclease (Worthington Biochemical Lab., Freehold, New Jersey, USA.) und anschließende Dialyse und Austauschadsorption zu entfernen, nachdem sich erwiesen hatte, daß in unseren Produkten aus Colibakterien keinerlei Desoxyribo-, sondern nur Ribonucleinsäure enthalten war. Diese Versuche waren bislang nicht erfolgreich.

Eine Anreicherung von Polysaccharid bzw. Nucleinsäure erreichten wir durch Formamid-Behandlung. Von der Polysaccharid/Nucleinsäure-Fraktion (300 mg, N 6,9%) geht in Formamid hauptsächlich Polysaccharid in Lösung, während sich Nucleinsäure im unlöslichen Anteil (120 mg, N 13,0%) anreichert. Aus der klaren Formamidlösung erhält man durch Fraktionierung mit Äthanol angereichertes, aber nicht vollständig nucleinsäurefreies Polysaccharid (100 mg, N 3,9). — Versuche, die Nucleinsäure durch Fällungen mit Schwermetallsalz oder Schwermetallacetat/Methanol vom Polysaccharid zu trennen, waren nicht erfolgreich.

Eine vollständige Abtrennung der Nucleinsäure vom Polysaccharid gelingt, wenn man die Substanz acetyliert. Hierbei bildet das Polysaccharid ein chloroformlösliches Acetylderivat, während die Nucleinsäure ungelöst bleibt. Das Acetylpolysaccharid kann anschließend entacetyliert werden. Über unsere diesbezüglichen Untersuchungen berichten wir gesondert.

Äthanol-Fraktionierung. — Die Fraktionierung mit organischen Solvenzien wurde von uns bevorzugt, nachdem wir fanden, daß die Polysaccharid-Fraktion gegen Säuren relativ empfindlich ist. Mit *n*/100- oder *n*/10-Mineralsäure tritt auch in der Kälte bereits langsam eine Abspaltung organisch gebundener Phosphorsäure ein; bei längerer Einwirkung beobachtet man auch eine Abnahme der pyrogenen Aktivität.

Wir haben versucht, durch mehrfach wiederholte fraktionierte alkoholische Fällung aus neutraler wässeriger Lösung (mit und ohne Zusatz von Elektrolyten, wie Natriumacetat) eine Auftrennung der Sub-

[19] C. Tal u. W. F. Goebel, J. exp. Med. **92**, 25 [1950]; vgl. auch G. Rodney u. M. Welcke, J. Bacteriol. **50**, 129 [1949].

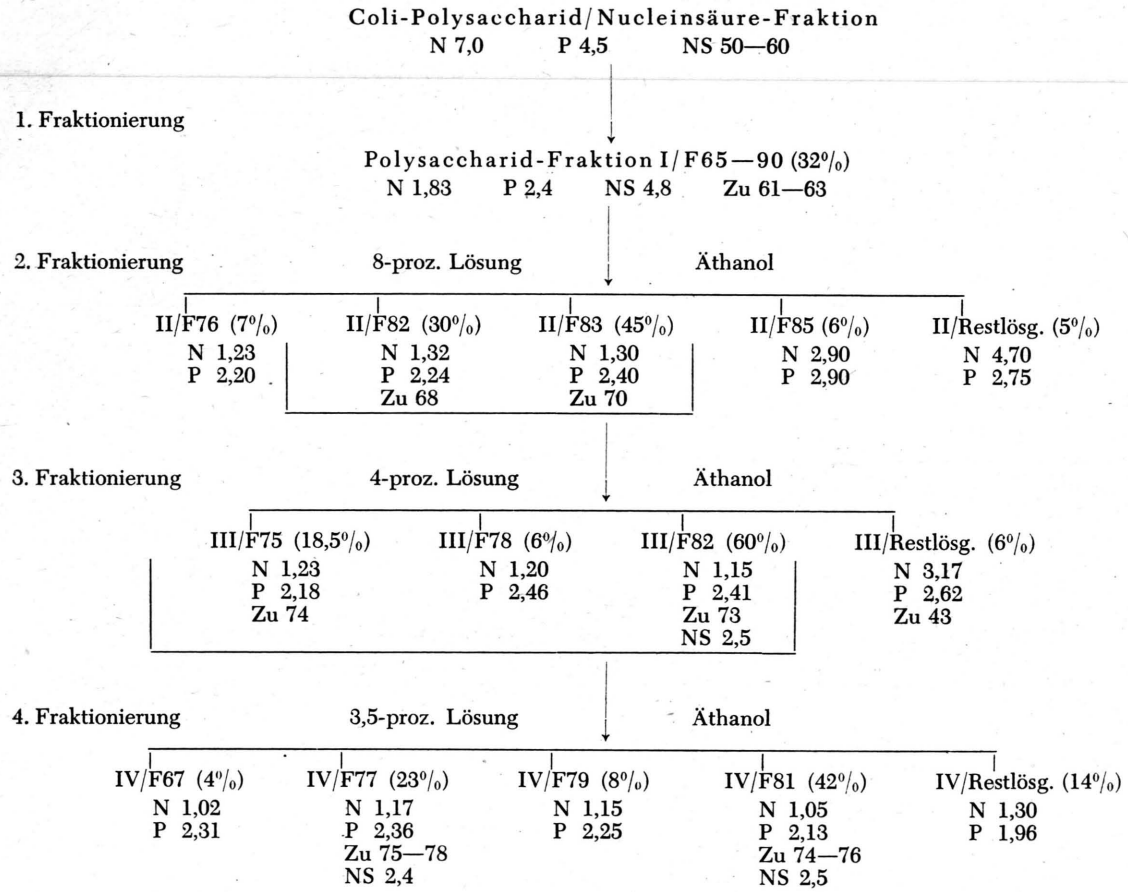

Abb. 2. Schema einer alkoholischen Fraktionierung.

stanz zu erreichen. Das Schema in Abb. 2 gibt einen Überblick über ein typisches Experiment.

Die Fraktionierung wurde entsprechend den Angaben von Westphal, Lüderitz und Bister[18] durchgeführt und ergab das Präparat I/F 65—90 mit 1,83% N, 2,4% P und 4,8% Nucleinsäure (Absorptionskurve Abb. 1, Kurve II). Dieses Präparat wurde entsprechend dem Schema in Abb. 2 dreimal weiterfraktioniert, wobei für die jeweils folgende Fraktionierung nur diejenigen Präparate eingesetzt wurden, welche analytisch genügend übereinstimmten. Für sämtliche Fraktionen wurden N- und P-Analysen und von einigen Präparaten Zuckerbestimmungen (nach Hagedorn-Jensen) und Nucleinsäure-Analysen auf Grund der Absorption bei 258 mμ (Vergleichsstandard: Nucleinsäure Co-NSA$_1$, Abb. 1, Kurve IV) durchgeführt. Die als „/Restlösung" bezeichneten Fraktionen wurden aus den alkoholischen Mutterlaugen durch Einengen im Vakuum, Fällung und Lyophiltrocknung erhalten. Die Ausbeuten, bezogen auf das jeweils zur Fraktionierung gelangende Ausgangsmaterial, sind in Klammern in % angegeben. Aus 40 g eingesetztem Rohmaterial erhielten wir 12,9 g I/F 65—90. Nach der 4. Fraktionierung wurden 5 Fraktionen gewonnen, von denen 4 analytisch und im Pyrogentest weitgehend übereinstimmten (IV/F 67, 77, 79 und 81). Die Ausbeute an diesen 4 Fraktionen betrug (nach Einrechnung der jeweils einbehaltenen Anteile) 6,1 g, d. i. ~ 2% der bakteriellen Trockensubstanz, 15,3% des Rohpyrogens oder 47,3% der Polysaccharid-Fraktion I/F 65—90.

Wie aus dem Schema Abb. 2 ersichtlich, erfolgte durch diese Fraktionierung zunächst eine Abtrennung stickstoffreicherer und zuckerärmerer Anteile (Restlösungen II/ und III/). Ein Teil der Nucleinsäure wurde ebenfalls entfernt, aber auch nach der 4. Fraktionierung verblieben in allen Präparaten noch rund 2,5%. Es gelang auf diese Weise also nicht, die Nucleinsäure vollständig zu entfernen. Diese 2,5% wurden auch bei weiterer Fraktionierung nicht abgetrennt, wobei die analytische Zusammensetzung der Fraktionen praktisch konstant blieb.

Zur Hochreinigung des Pyrogens erwies sich schließlich die *präparative Ultrazentrifugierung* als geeignet.

Ultrazentrifugation. — Aus der Tatsache,

daß die sicher proteinfreien Polysaccharid-Präparate, auch nach wiederholter Fraktionierung oder elektrophoretischer Reinigung, opaleszente, also lichtstreuende Lösungen bilden, konnte man auf ein hohes Molekulargewicht der gelösten Teilchen schließen. In der Tat ergab ein Versuch auf der präparativen Ultrazentrifuge (Phywe), daß das Polysaccharid bei höheren Touren rasch sedimentierte, während Nucleinsäure vollständig im klaren Überstand verblieb. Die Ultrazentrifugierung hat sich dann als die *beste Methode zur Reindarstellung* des Colipyrogens und entsprechender Substanzen aus andern gramnegativen Bakterien erwiesen. Nachstehend beschreiben wir einen Ansatz:

175 mg IV/F 77 (siehe Schema Abb. 2) wurden in 20 ccm dest. Wasser gelöst und 1 Stde. bei 30000 T/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgegossen, das Sediment in 8 ccm Wasser aufgenommen und lyophilgetrocknet. Wir erhielten 135 mg reinweißes Material (IV/F 77 S), dessen absorptionsspektrographische Analyse die gleiche Kurve wie Co-PK_1 lieferte, also die *völlige Abwesenheit von Nucleinsäure* ergab (Abb. 1, Kurve I). Die überstehende, schwach hellgelb gefärbte Lösung ergab nach Lyophil-Trocknung 25 mg schwachbräunlich gefärbter, hygroskopischer Substanz. Das Material gab aus konz. Lösung mit 2-*n*. Salzsäure eine geringe Fällung (Nucleinsäure), es enthielt außerdem noch relativ niedrigmolekulare, teilweise polysaccharidische Anteile von geringer Pyrogenität, welche bisher nicht näher untersucht wurden.

Das nach dieser Methode dargestellte protein- und nucleinsäurefreie Material (IV/F 77 S) stellt das wirksamste Pyrogen dar, welches wir bislang aus Colibakterien (oder anderen Keimen) isolieren konnten. Das Präparat bildet in Wasser opaleszierende Lösungen, in Formamid erfolgt klare Lösung; es ist in reinem Pyridin wenig, in Pyridin mit etwas Wasser leicht löslich. — Aus der Fraktion IV/F 81 konnten wir nach derselben Methode ein Präparat IV/F 81 S mit den gleichen Eigenschaften herstellen.

Analyse des Colipyrogens

Wir erhielten folgende Werte der Elementaranalyse: C 48,4, H 6,8, N 0,97, P 2,08, Asche (Phosphat) 7,06. Das Präparat enthält 1,8% Acetyl[20].

Säurehydrolyse. — Bei der Hydrolyse des Pyrogens IV/F 77 S mit Mineralsäure tritt relativ rasch Inaktivierung der pyrogenen Wirksamkeit ein. Gleichzeitig werden reduzierende Zucker und anorganisches Phosphat in Freiheit gesetzt. Abb. 3 zeigt die nach Hydrolyse mit 1-*n*. Schwefelsäure erhaltenen Reduktionswerte (Hagedorn-Jensen-Methode). Hiernach werden 76% reduzierende Zucker (als Glucose), entsprechend 68—69% Anhydrozucker, in Freiheit gesetzt. Unter diesen befindet sich Hexosamin. Mit Hilfe der Methode von Elson und Morgan wurden 5,2—5,3% Anhydrohexosamin gefunden. Von den 0,97% N entfallen demnach 0,46% auf Hexosamin. Diesem Wert sind die gefundenen 1,8% Acetyl (Theorie 1,4%) nahezu äquivalent. Durch Acetylierung und O-Entacetylierung des Pyrogens konnten wir nachweisen, daß diese 1,8% Acetyl als *N*-Acetyl vorliegen, vermutlich also als *N*-Acetylhexosamin.

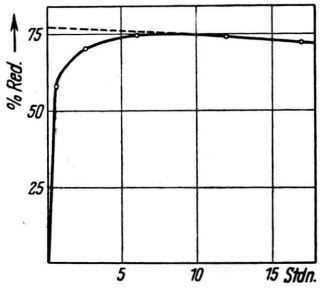

Abb. 3. Reduktionswerte (n. Hagedorn-Jensen, als Glucose) nach Hydrolyse von IV/F 77 S mit *n*-H_2SO_4, 100°, 0,1-proz. Lösung.

Über die qualitative Analyse der übrigen Zuckerbausteine brachten wir kürzlich eine Notiz[21]; danach findet man als Produkte der Hydrolyse außer Hexosamin: Rhamnose, Xylose, Glucose und (wenig) Galaktose. Über die quantitative Zusammensetzung des Polysaccharidanteils berichten wir in der II. Mitteilung[22]. Protein-, Peptid- oder Aminosäureanteile lassen sich nicht feststellen (vgl. [22]).

Bei der Säurehydrolyse des Pyrogens beobachtet man das Auftreten eines unlöslichen Niederschlags. Dieser Niederschlag tritt in geringer Menge schon beim Erhitzen mit 1—2-proz. Essigsäure auf 98° (Verfahren nach Morgan und Partridge[5]) auf, in größerer Menge mit 2,5-*n*. Essigsäure oder 0,5- bis 1-*n*. Mineralsäure.

Hydrolyse mit 2,5-*n*. Essigsäure. — 650 mg des Präparates IV/F 77 S wurden in 72 ccm 15-proz. Essigsäure (2,5-*n*.) im Wasserbad auf 98° gehalten. Nach 2 Stdn. begann die Ausflockung eines Niederschlags; die überstehende, anfänglich opaleszierende Lösung wurde jedoch erst nach 6—8 Stdn. ganz klar. Der Niederschlag

[20] Nach E. Husemann u. H. Bartl; s. H. Bartl, Diss. Freiburg i. Br. [1952].

[21] O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforschg. **7 b**, 136 [1952].

[22] O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforschg. **7 b**, 548 [1952] (nachstehende Mitteilung).

wurde durch Zentrifugation bei 5000 T/min abgetrennt, mehrfach mit dest. Wasser gewaschen und lyophil-getrocknet. Wir erhielten 80 mg (12,5%). Das Material ist in Wasser, Methanol, Äthanol, Aceton und Äther praktisch unlöslich, klar löslich dagegen in Chloroform und Pyridin, wenig löslich in Tetrachlorkohlenstoff.

Die Analyse ergab die folgenden Werte: C 61,1, H 9,4, N 1,92 und P 2,29. Es handelt sich offenbar um *lipoidartiges Material*, dessen nähere Untersuchung im Gange ist. Bei der alkalischen Hydrolyse treten Fettsäuren auf. Ob bei der 8-stdg. Behandlung mit 2,5-*n*. Essigsäure ein Teil des lipoidalen Pyrogenanteils bereits verändert wurde, konnte noch nicht entschieden werden. Wir sind damit beschäftigt, andere Isolierungsverfahren für die Lipoid-Komponente auszuarbeiten.

Behandelt man das Pyrogen IV/F 77 S mit 1—2-proz. Essigsäure, so kann man aus der Lösung durch Fraktionierung ein *lipoidfreies Restpolysaccharid* in etwa 65 bis 70% Ausbeute (N = 0,53%) isolieren, welches praktisch unpyrogen ist (etwa $^1/_{1000}$ der Aktivität des Ausgangsmaterials). Eine Analyse in der Ultrazentrifuge ergab als Sedimentationskonstante s_{20} den Wert 1,0 S, woraus sich ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 10 000 ergibt. Es findet demnach während der Hydrolyse mit 1—2-proz. Essigsäure ein Abbau des ursprünglichen Symplexes statt, dessen Molekulargewicht [23] in der Größenordnung von einigen Millionen liegt.

Aus den mitgeteilten Daten geht hervor, daß in dem hier beschriebenen Colipyrogen die folgenden Anteile am Aufbau beteiligt sind:

68—69%	Gesamtzucker (ber. als Anhydroglucose)
12—13%	lipoidartige Komponente (Minimalwert)
7%	organisch gebundenes Phosphat
2%	Acetyl
89—91%	

Es handelt sich demnach um ein Lipopolysaccharid.

Biologische Wirkungen des Coli-Pyrogens (Pyrogenität)

Zur Charakterisierung des beschriebenen pyrogenen Lipo-polysaccharid-Symplexes aus Colibakterien bringen wir nachstehend einige Ergebnisse unserer Untersuchungen am Kaninchen und am Menschen.

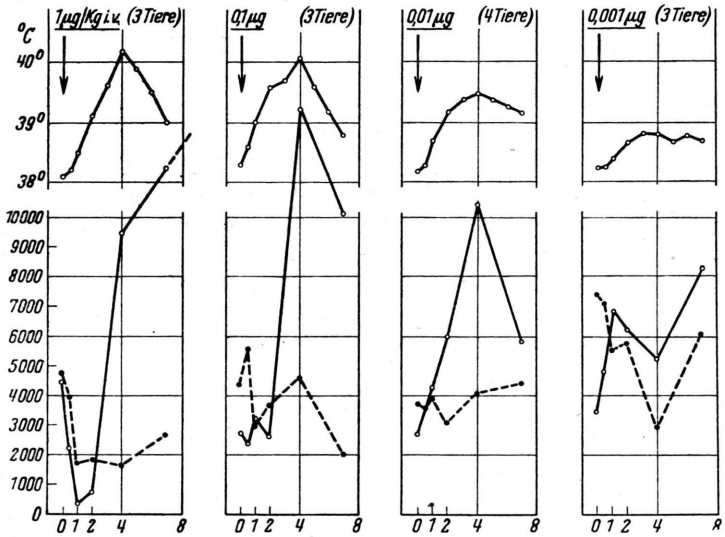

Abb. 4. Abhängigkeit der Wirkung (Mittelwerte), von der Dosis intravenöser Injektionen des Colipyrogens, IV/F77S beim Kaninchen. Untere ausgezogene Kurve: Gesamt-Leukocyten (außer Lymphocyten), gestrichelte Kurve: Lymphocyten.

A) Kaninchen. — Kaninchen erhielten intravenöse Injektionen von Lösungen des Pyrogens IV/F 77 S. Es wurden laufend subcutane Temperaturmessungen vorgenommen. Gleichzeitig wurden die Schwankungen im weißen Blutbild durch Zählung der Gesamtleukocyten und der Lymphocyten ermittelt. Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis (0,001—1,0 µg/kg). Maximale Fieberwirkungen beobachtet man bei intravenösen Dosen zwischen 0,1 und 1 µg/kg. Es werden im allgemeinen Temperaturspitzen zwischen 2 und 2,5° C, gelegentlich bis zu 3° C gemessen. Der Fieberanstieg beginnt etwa 1 Stde. nach der Injektion, die Fieberspitze wird meist nach ~ 3—4 Stdn. erreicht. Trägt man die

[23] G. Schramm, O. Westphal u. O. Lüderitz, Z. Naturforschg. **7b** [1952], erscheint demnächst.

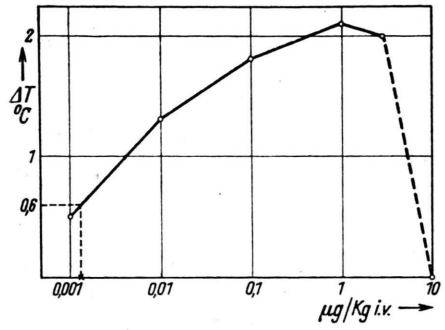

Abb. 5. Temperaturanstieg nach intravenöser Injektion von Colipyrogen IV/F 77 S (Kaninchen).

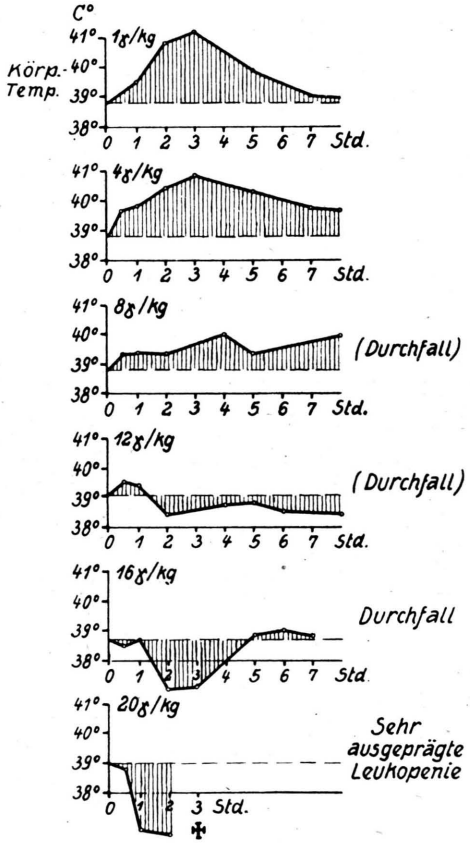

Abb. 6. Wirkung hoher intravenöser Dosen des Colipyrogens IV/F 77 S auf die Körpertemperatur des Kaninchens.

maximalen Temperaturänderungen in Abhängigkeit vom Logarithmus der Dosis auf (Abb. 5), so ergibt sich für die *pyrogene Grenzdosis*, d. i. diejenige i.v.-Dosis, welche beim Durchschnitt der Tiere eine Temperaturerhöhung von 0,6° C erzeugt[2], ein Wert von 0,002 µg/kg. (Die Injektion steriler, pyrogenfreier Kochsalzlösung als Kontrolle darf höchstens Temperaturschwankungen von ± 0,3° C auslösen.)

Aus Abb. 4 ist ferner zu ersehen, daß bei niedrigen Dosen in der Größenordnung von 0,01 µg/kg nur Leukocytosen beobachtet werden. Bei erhöhten Dosen erfolgen in den ersten 1—2 Stdn. zunehmend starke Leukopenien und Lymphopenien, denen anschließend Leukocytosen folgen, welche nach 1 µg/kg über längere Zeit anhalten.

Geht man mit der Dosis noch höher (1—20 µg/kg), so werden die Fieberkurven flacher und protrahierter, bis schließlich keine Temperaturerhöhung, sondern -abfall eintritt (Abb. 6). Man beobachtet dann toxische Symptome, wie Durchfall und Lähmungserscheinungen. Dosen von > 20 µg/kg führen bei massiven Leukopenien innerhalb von wenigen Stunden zu Lungenödem und Tod, vermutlich infolge Kreislaufversagens.

Die mittlere letale Dosis ($D\,1_{50}$) des Präparates an der weißen *Maus* und der *Ratte* nach intravenöser Injektion beträgt 0,15—0,2 mg/kg. Die Sektion zeigt Blutungen an der Leberoberfläche, in der Bauchhöhle, am Magendarmkanal, der Niere, den Lungen, an Hirnbasis und Hirnventrikel; Hyperämie der Nieren und Nebennieren; Hirnödem.

Es ergibt sich also, daß das Colipyrogen IV/F 77 S eine Substanz von hoher Toxizität ist. Beim Kaninchen liegt die tödliche Dosis (20—50 µg/kg) 4 Zehnerpotenzen über der pyrogenen Grenzdosis (0,002 µg/kg).

B) Mensch. — Wir haben in Selbstversuchen und an gesunden männlichen Freiwilligen im Alter zwischen 19 und 51 Jahren die pyrogene Grenzdosis für den Menschen ermittelt. Gruppen zu je 3 Versuchspersonen erhielten am gleichen Tag morgens nach 1—2-stdg. Vorbeobachtung die folgenden Dosen des Pyrogen-Präparates IV/F 77 S intravenös: Gruppe I 0,02 µg (~ 0,0003 µg/kg); Gruppe II 0,045 µg (~ 0,00065 µg/kg) und Gruppe III 0,10 µg (0,0012 bis 0,0015 µg/kg). Während der folgenden 7 bis 10 Stdn. verhielten sich die Versuchspersonen ruhig (sitzend oder liegend). Die Messungen erfolgten axillar, sorgfältig bis zur Temperaturkonstanz. Die maximalen Temperaturerhöhungen ersieht man aus der folgenden Tabelle:

	Dosis i.v.	Temperaturerhöhung	ΔT	Mittel
Gruppe I	0,0003 µg/kg	36,6—37,3°	0,7	+ 0,7°
		36,7—37,3°	0,6	
		36,8—37,6°	0,8	
Gruppe II	0,00065 µg/kg	36,5—37,4°	0,9	+ 1,0°
		36,3—37,4°	1,1	
		36,7—37,6°	0,9	
GruppeIII	0,0012 µg/kg	36,2—38,2°	2,0	+ 1,4°
		37,0—37,9°	0,9	
		36,8—38,2°	1,4	

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß bei der Dosierung von 0,0003 μg/kg kein Fieber auftrat, denn die Temperaturerhöhung von 0,7° liegt beim Menschen noch innerhalb der möglichen Tagesschwankungen. Mit der doppelten Dosis von 0,00065 μg/kg ist der pyrogene Effekt eben angedeutet. Bei der Injektion von 0,0012 μg/kg traten jedoch deutlich Fiebererscheinungen auf. Abb. 7 gibt 2 Temperaturkurven aus dieser Gruppe (III) wieder. *Die pyrogene Grenzdosis beim gesunden erwachsenen Mann liegt also in der Größenordnung von* $^1/_{1000}$ *μg/kg!*

Zu den beobachteten Fieberwirkungen passen auch die gemessenen Schwankungen im weißen Blutbild der Versuchspersonen. Bei je 2 Personen jeder Gruppe wurde das weiße Differential-Blutbild laufend kontrolliert. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Durchschnittswerte der Gesamtleukocyten, Lymphocyten und eosinophilen Zellen (alle Zahlen verstehen sich pro cmm Blut):

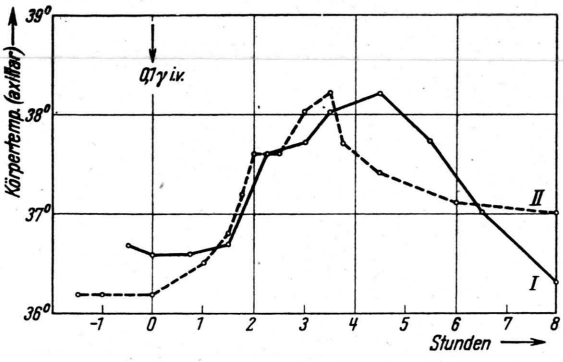

Abb. 7. Wirkung einer intravenösen Injektion von 0,1 μg Colipyrogen IV/F 77 S, beim gesunden Menschen. I: S. J. (0,00125 μg/kg, ♂ 51 J. II: W. O. (0,0015 μg/kg), ♂ 39 J.

Blutprobe nach		0 Stdn.	2 Stdn.	4 Stdn.	8 Stdn.	24 Stdn.
Gruppe I	Leukocyten	4900	—	10100	5950	6150
0,0003 μg/kg	Lymphocyten	1540	—	1270 (83%)	2140	2820
	Eosinophile	213	—	66 (31%)	176	192
Gruppe III	Leukocyten	4800	2250	8300	9600	4750
0,0012 μg/kg	Lymphocyten	1920	—	580 (30%)	1150	1900
	Eosinophile	143	—	18 (13%)	46	122

Schon bei der geringsten Dosierung in Gruppe I wird eine deutliche Leukocytose nach 4 Stdn. gefunden. Bei Gruppe III hält die Leukocytose (nach anfänglicher Leukopenie) länger an. Während bei Gruppe I die absolute Zahl der Lymphocyten keine Schwankungen aufweist, beobachtet man bei Gruppe III einen kräftigen Abfall nach 4 Stdn. auf 30% des Ausgangswertes. Charakteristisch ist auch das Verhalten der eosinophilen Zellen, welche bei Gruppe I nach 4 Stdn. auf 31%, bei Gruppe III bis auf 13% abgefallen sind. Die entsprechenden Zahlen der Gruppe II liegen zwischen jenen der Gruppen I und III. Sämtliche Reizwirkungen sind 24 Stdn. nach der Injektion wieder abgeklungen.

Die Versuchspersonen in Gruppe I berichteten über keinerlei *subjektive Beschwerden.* Auch in Gruppe II wurden lediglich kurzanhaltende, leichte Kopfschmerzen 1—2 Stdn. nach der Injektion empfunden. In Gruppe III wurden mäßige Kopfschmerzen während des Fieberanstiegs, leichtes Krankheitsgefühl und leichte Übelkeit empfunden. Die Beschwerden wurden am besten im Liegen ertragen. Alle subjektiven Erscheinungen verschwanden im allgemeinen schlagartig nach Erreichen der Fieberspitze.

Über unsere Untersuchungen mit anderen Pyrogen-Präparaten berichten wir ausführlich a. a. O. Einige vorläufige Mitteilungen siehe [24, 25, 26].

Es ergibt sich also, daß das beschriebene hochgereinigte Pyrogen aus Colibakterien bereits mit der sehr kleinen intravenösen Dosis von 0,001 μg/kg beim Menschen wirksam ist.

Diskussion

Mit Hilfe des in dem Schema in Abb. 8 angegebenen Aufarbeitungsganges konnten wir ein hochwirksames Pyrogen aus Colibakterien (Stamm Kröger 0-Gruppe 8) darstellen, dessen pyrogene Grenzdosis beim Kaninchen und Menschen 0,002 bzw. 0,001 μg/kg beträgt. Die Substanz ist auf Grund der Analyse ein hochmolekulares proteinfreies *Lipopolysaccharid,* welches aus einer phosphorylierten

[24] W. Keiderling u. O. Westphal, Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. **57**, 66 [1951]; vgl. auch: O. Westphal, O. Lüderitz u. W. Keiderling, Z. Naturforschg. **6b**, 310 [1951]; Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. **8**, 100 [1952].

[25] O. Westphal, Chimia **6**, 115 [1952]; Angew. Chem. **64**, 314 [1952]; Arch. Pharmaz. **22**, 57 [1952]; O. Westphal, O. Lüderitz u. W. Keiderling, Zbl. Bakteriol. Abt. I. Orig. **158**, 152 [1952].

[26] W. Keiderling, F. Wöhler u. O. Westphal, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. [1952], im Druck.

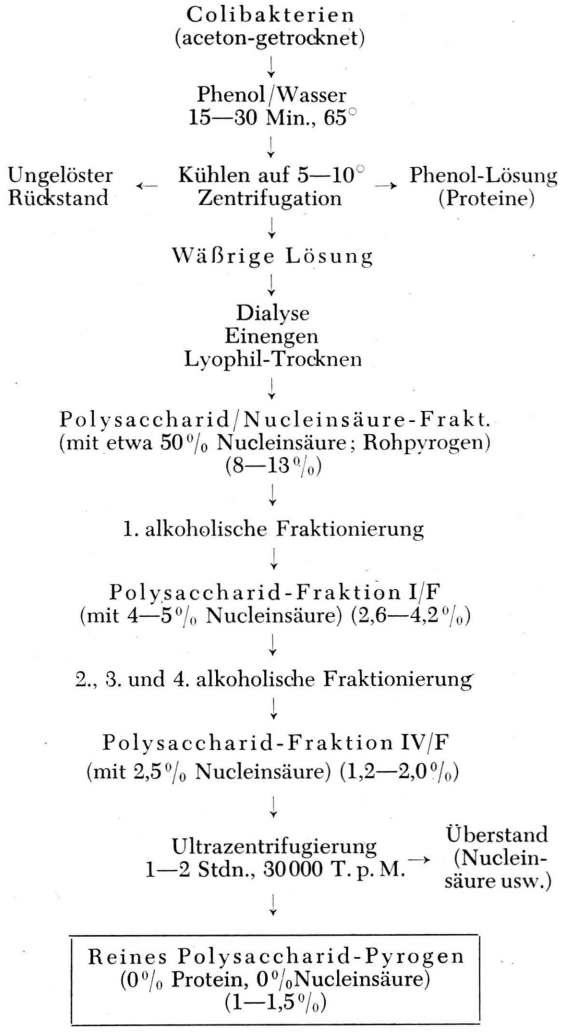

Abb. 8. Schema der Darstellung eines hochwirksamen Pyrogens aus Colibakterien.

Polysaccharid-Komponente (etwa 75%) und einer lipoidartigen Komponente (Minimalwert 12—13%) aufgebaut ist. Das in Abb. 8 angegebene Aufarbeitungsverfahren ist allgemeiner zur Darstellung hochwirksamer Pyrogene aus gramnegativen Bakterien anwendbar. Wir konnten aus verschiedenen Bakterienarten (vgl. z. B. [18]) entsprechende Polysaccharid-Symplexe mit ähnlichen Pyrogen-Eigenschaften isolieren.

Das beschriebene Colipyrogen stellt gleichzeitig eine Substanz von hoher Toxizität dar; die mittlere letale Dosis beträgt für Kaninchen ~ 20 μg/kg i.v., für Ratten und Mäuse 150 μg/kg. Nach Untersuchungen von Kröger[27] zeigt die Substanz die serologische Spezifität des somatischen 0-Antigens. Es handelt sich also bei diesem Pyrogen um das 0-Endotoxin des betreffenden Colistamms.

Derartige 0-Endotoxine sind wesentlich beteiligt am Aufbau der bakteriellen Oberflächenmembran. Neuerdings konnten Salton und Horne[28] die Zellmembran von Colibakterien isolieren und elektronenoptisch sichtbar machen. Das von diesen Autoren isolierte Material enthält wenig Protein und Nucleinsäure. Die Pyrogenität von Coli-*Vaccine* beruht im wesentlichen darauf, daß ein großer Teil des pyrogenen Lipopolysaccharids an der bakteriellen Oberfläche verankert und an ihrem Aufbau wesentlich beteiligt ist.

Immunologische Untersuchungen zur Bestimmung der antigenen Eigenschaften des Materials sind zur Zeit im Gange. Es wurde gefunden[18], daß derartige hochmolekulare, proteinfreie Lipopolysaccharide antigen (auch für Kaninchen) sind. Ob die Pyrogenität einerseits, die antigene Potenz andererseits durch Kupplung an Proteine wesentlich gesteigert werden kann, haben wir noch nicht untersucht.

Die nach dem angegebenen Verfahren (Abb. 8) darstellbaren Polysaccharid-Symplexe gramnegativer Bakterien sind den „undegraded polysaccharides" im Sinne von Morgan und Partridge[5] sehr ähnlich. In den komplex gebauten 0-Antigenen von Ruhr- und Typhusbakterien, welche Morgan und Partridge beschrieben haben, konnten diese Autoren 3 Komponenten nachweisen: ein Protein, ein Polysaccharid und ein Phospholipoid. Das Phospholipoid wird vom ternären Symplex relativ leicht abgespalten, z. B. durch Lösen in Formamid oder 90-proz. Phenol, *ohne* dessen antigene oder toxische Eigenschaften wesentlich zu beeinflussen. *Dieses* Phospholipoid ist daher offenbar nicht identisch mit der fester gebundenen (von Morgan und Partridge nicht beschriebenen) lipoidalen Komponente im undegradierten Polysaccharid. Auch Hartwell und Shear[9] fanden, daß der Phospholipoidanteil ihres pyrogenen Polysaccharids aus *B. prodigiosus* (siehe unten) unter Formamideinwirkung *nicht* abdissoziiert. Wir halten es für möglich, daß in Morgans „undegraded polysaccharide" aus dem 0-Antigen von *B. typhosum*, welches kein Hexosamin, aber 0,57% schwer abtrennbaren Stickstoff enthielt (l. c. [5] [1942], S. 159, 160), sich noch eine lipoidale Komponente befindet. Der Übergang des undegradierten in das „simple polysaccharide" mit verd. Essigsäure in der Wärme dürfte darin bestehen, daß eine lipoidartige Komponente nach und nach abgespalten wird, wobei gleichzeitig weitgehender Abbau des hochmolekularen Polysaccharid-Symplexes eintritt. Die von den englischen Autoren mitgeteilten Befunde[5] wären mit dieser Auffassung vereinbar.

Große Ähnlichkeit zeigt das von uns dargestellte Colipyrogen mit dem tumor-nekrotisierenden Polysaccharid-Symplex aus *B. prodigiosus (Serratia marcescens)* von Shear[8, 9, 10]. Letzteres enthält etwas mehr Stickstoff und weniger Phosphor:

[27] E. Kröger, unveröffentlicht.
[28] M. R. J. Salton u. R. W. Horne, Biochim. Biophys. Acta 7, 19, 177 [1951].

	C	H	N	P	Acetyl	Red. Zucker nach Hydrolyse	Phospholipoid	Pyrogene Grenzdosis (Kaninchen)	Dosis letalis i.v. (Kaninchen)
Colipyrogen	48,4	6,8	0,97	2,08	1,8	76	12—13	0,002 μg/kg	20—50 μg/kg
Serr. marc.	47,5	7,1	2,2	1,1	2,2	65—70	ca. 16	0,005 μg/kg	20—100 μg/kg
Polys. (Shear)									l.c.[10]

Es scheint, daß die lipoidähnliche Komponente für die besonderen Reizstoffeigenschaften des Lipopolysaccharids von Bedeutung ist. Alle Operationen, welche zur Abspaltung dieser Komponente führen, ergeben gleichzeitig Verlust an Pyrogenität und Toxizität. Shear und Turner[9] fanden analog, daß die Abspaltung des Lipoids aus dem Polysaccharid-Symplex von *B. prodigiosus* zum Verlust der hämorrhagie-auslösenden Eigenschaften führt. Wir konnten andererseits nachweisen, daß ein weitgehender Abbau des Coli-Lipopolysaccharids, soweit er *ohne* Verlust der Lipoid-Komponente vor sich geht, Präparate mit voll erhaltener (z. Tl. gesteigerter) Pyrogenität und hoher Toxizität liefert[25]. Führt man nämlich den Abbau unter Vermeidung hydrolytischer Spaltungen oxydativ (mit verd. H_2O_2 und Katalysatoren) durch, so wird lediglich der Polysaccharidanteil angegriffen, während das am Polysaccharid gebundene Lipoid intakt bleibt. Man erhält hochwirksame, niedrigmolekulare Bruchstücke, welche teilweise dialysabel sind. Die Pyrogenität (und Toxizität) des Lipopolysaccharids aus *B. coli* scheint demnach nicht notwendig an ein hohes Molekulargewicht gebunden, sondern durch die *besondere Kombination eines Polysaccharidträgers mit einer lipoidalen Komponente* bedingt zu sein. Dabei handelt es sich offenbar um ein bei gramnegativen Bakterien weit *verbreitetes Prinzip*.

In Analogie hierzu stehen Befunde von Tal und Goebel[19] über die „toxische Komponente" des 0-Endotoxins von *Shigella paradysenteriae*. Auch hier handelt es sich um eine lipoidartige Komponente, welche an das 0-spezifische Polysaccharid gebunden ist. Die Spaltung mit verd. Essigsäure[19] führt zur Ausflockung einer wasserunlöslichen Substanz, welche analytisch der Lipoid-Komponente aus dem Coli-Pyrogen ähnlich ist:

	C	H	N	P
Lipoid aus Coli-Pyrogen	61,1	9,4	1,9	2,3
Lipoid aus *Shig. paradys.* (Tal und Goebel [19])	63,3	9,5	2,7	3,3
Lipoid aus *Ab. equi*-Pyrogen (Westphal u. Lüderitz[29])	63,0	9,4	2,0	2,0

Auch aus dem Polysaccharid-Pyrogen von *Abortus equi* konnten wir mit verd. Essigsäure ein Lipoid (15%) isolieren[29], dessen Analyse wir in der obigen Tabelle zum Vergleich mit anführen. Hartwell und Shear[8] fanden für N 1,9% bei dem aus ihrem Polysaccharid-Symplex von *B. prodigiosus* mit 2-*n*. Salzsäure (1,5 Stdn., 80° C) abgespaltenen Lipoidmaterial.

Von den 0,97% Gesamtstickstoff des Pyrogens entfallen 0,46% auf den Hexosaminanteil; von den übrigen 0,5% sind durch die Analyse der 12—13% Lipoid-Komponente (mit 1,9% N) 0,25% N erklärt, die restlichen 0,26% sind bisher nicht erfaßt worden.

Wir halten es für sehr wahrscheinlich, daß die lipoidale Komponente, welche nach unseren bisherigen Untersuchungen in vielen Polysaccharid-Pyrogenen (und 0-Endotoxinen) gramnegativer Bakterien enthalten ist, eng mit der „toxischen Komponente" im Sinne Goebels[19] verbunden ist. Ihre Anwesenheit scheint auch Voraussetzung für die Pyrogenität der Polysaccharide gramnegativer Bakterien zu sein. — Man kennt zahlreiche spezifische Oberflächen-Polysaccharide *grampositiver* Bakterien, wie die Kapselpolysaccharide der Pneumococcen-Typen, deren eingehende chemische und serologische Analyse wir vor allem Goebel und Avery[30] verdanken. Diese sind bekanntlich proteinfreie, hochmolekulare Polysaccharide, welche keinen Lipoidanteil enthalten. Sie sind nicht toxisch und nicht pyrogen; das höhere Tier verträgt intravenöse Injektionen von > 100 mg, d. i. die vielfach tödliche Dosis entsprechender Polysaccharide aus *gramnegativen* Bakterien.

Robinson und Flusser[3] haben Polysaccharid-Pyrogene aus gramnegativen Bakterien dargestellt, welche angeblich völlig frei von Stickstoff sind. Unter Zugrundelegung der Angaben dieser Autoren über die pyrogene Wirksamkeit ihrer Präparate am Kaninchen ergibt sich indessen, daß sie gegenüber dem von uns beschriebenen Colipyrogen 100—500-mal schwächer wirksam waren. Es ist daher möglich, daß sie nur sehr wenig genuines Bakterienpyrogen, z. B. nur 1% oder weniger, enthielten, so daß der N-Wert unter die Grenze der analytischen Erfaßbarkeit abgesunken war. Diese sehr hochgereinigten Präparate sind also vergleichsweise sehr schwache Pyrogene.

[29] O. Westphal u. O. Lüderitz, unveröffentlicht.

[30] Vgl. z. B. O. Westphal, Angew. Chem. 57, 57 [1944] (Übersichtsbericht).

Ob es in den Glattformen von Coli-Bakterien nur je ein einziges pyrogenes Prinzip in Form des beschriebenen Lipopolysaccharids gibt, oder ob verschiedene pyrogene Prinzipien von vergleichbarer Wirksamkeit in diesen Mikroorganismen vorhanden sind, können wir bislang nicht mit Sicherheit beantworten.

Zur Frage, ob in dem isolierten Lipopolysaccharid aus Coli-Bakterien ein „reines Pyrogen" vorliegt, ist zu sagen, daß es einheitliche höhere Symplexe gibt, die ebenfalls hochpyrogen sind und die das von uns isolierte Lipopolysaccharid an Protein gebunden enthalten. Hinsichtlich der pyrogenen Eigenschaften scheint indessen das bakterielle Substrat in Form des beschriebenen Lipopolysaccharids auf ein Minimum an *genuinen* Komponenten zurückgeführt zu sein. Dem Problem reiner Wirkstoffe aus Bakterien (Antigene, Toxine usw.) haben Boivin und Delaunay[31] eine Abhandlung gewidmet, deren Schlußfolgerungen wir uns in bezug auf Bakterien-Pyrogene anschließen möchten.

Über weitere Pyrogene anderer Bakterienspecies berichten wir in folgenden Publikationen.

Wir sind Dr. E. Kröger (Göttingen) für die Züchtung großer Mengen Colibakterien und deren bakteriologisch-serologische Kontrolle zu großem Dank verpflichtet. Dr. H. Sanz (Bern/Schweiz) danken wir für die Aufnahme und Auswertung zahlreicher Absorptionsspektren unserer Präparate. Besonderen Dank schulden wir Doz. Dr. G. Schramm (Tübingen) für Rat und Hilfe bei der Durchführung von elektrophoretischen und ultrazentrifugalen Untersuchungen an seinem Institut.

Frau G. Kickhöfen und Fräulein Dr. I. Fromme haben uns bei der technischen Durchführung der Versuche wesentlich unterstützt, wofür wir ihnen bestens danken.

[31] A. Boivin u. A. Delaunay, Bull. Acad. Med. **128**, 357 [1944].

Über bakterielle Reizstoffe. II. Mitt.: Qualitative und quantitative papierchromatographische Bestimmung der Zuckerbausteine eines hochgereinigten Polysaccharid-Pyrogens aus Colibakterien

Von Otto Lüderitz und Otto Westphal

Aus den Dr. A. Wander-Laboratorien Säckingen (Baden) und Bern (Schweiz)

(Z. Naturforschg. **7b**, 548—554 [1952]; eingegangen am 31. August 1952)

Ein hochmolekulares pyrogenes Lipopolysaccharid aus Colibakterien (Stamm Kröger 0-Gruppe 8) wurde hinsichtlich seiner Zuckerbausteine vorwiegend mit Hilfe papierchromatographischer Methoden qualitativ und quantitativ analysiert. Zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung einzelner Zucker im Pyrogen-Hydrolysat diente die Reaktion mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC). Das Colipyrogen besteht aus Rhamnose (38,6 ± 3,1%), Xylose (9,8 ± 0,7%), Glucose (9,6 ± 0,2%), Galaktose (2,5 ± 0,7%) (Mittelwerte aus 5 Bestimmungen), *N*-Acetylhexosamin (7,1%) und Esterphosphat (~ 6,0%), zusammen 73,6 ± 4,7%. Die quantitativen Daten beziehen sich auf Anhydrozucker. Der Rhamnose-Wert konnte unabhängig durch C-Methyl-Bestimmung gesichert werden und ergab 39,8 und 40,7%. — Von den übrigen 26% des Colipyrogens wurden 12—13% als Lipoid isoliert. Die bisher nicht erfaßten ~ 13% Restanteil zeigen an Hand der analytischen Daten die gleiche (berechnete) Zusammensetzung in bezug auf C-, H- und N-Werte wie das in Substanz isolierte Lipoid. — Demnach besteht das pyrogene Lipopolysaccharid zu 74% aus einer phosphorylierten Polysaccharid-Komponente und zu ~ 26% aus einer lipoidalen Komponente (von der bislang jedoch nur die Hälfte in Substanz erfaßt wurde). Das Pyrogen ist völlig frei von Protein-, Peptid- oder Aminosäureanteilen.

In unserer I. Mitteilung über bakterielle Reizstoffe[1] haben wir gezeigt, daß es mit Hilfe geeigneter Aufarbeitungsverfahren möglich ist, aus Colibakterien ein sehr wirksames Pyrogen zu isolieren. Die Analyse ergab, daß es sich um ein hochmolekulares[2] *Lipopolysaccharid* handelt, welches zu ~ 75% aus einer phosphorylierten Polysaccharid-Komponente und zu (wenigstens) 12—13% aus einer lipoidalen Komponente aufgebaut ist. Über die qualitative

[1] O. Westphal, O. Lüderitz, E. Eichenberger u. W. Keiderling, Z. Naturforschg. **7b**, 536 [1952], voranstehend.

[2] G. Schramm, O. Westphal u. O. Lüderitz, Z. Naturforschg. **7b** [1952], erscheint demnächst.