

Aus der deproteinisierten Lösung erhielt man die Nukleinsäure durch Fällen mit Alkohol und reinigte durch mehrmaliges Umfällen. Die gereinigte Nukleinsäure enthielt 15,95 % N und 6,8 % P und gab eine positive Reaktion auf Desoxypentosen¹. Die Lösung zeigte eine starke Lichtabsorption im Ultraviolett (Max. bei 260 m μ) (Abb. 1).

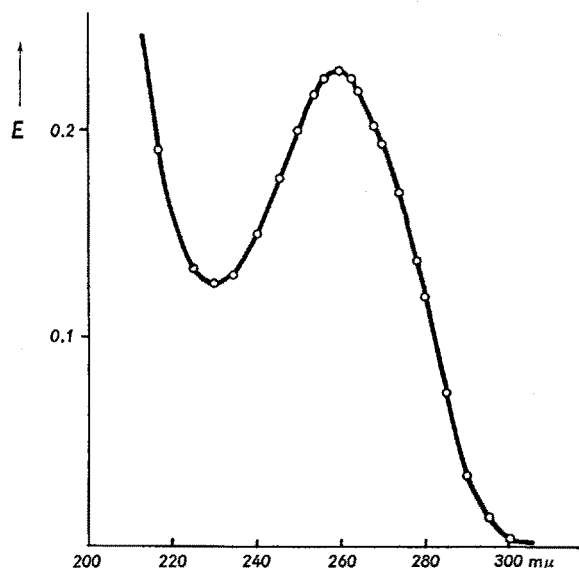


Abb. 1. Ultravioletspektrum der gereinigten Nukleinsäure von *S. ballerup*. Konzentration 1 mg% in destilliertem Wasser bei pH 7.

Immune Sera wurden durch anfangs subkutane und später intravenöse Injektionen von insgesamt 4–8 mg Substanz in 10–12 Dosen an Kaninchen gewonnen. Die Dauer der Immunisierung war auf 3–4 Wochen bemessen. Als Vergleich dienten Sera, die durch Immunisierung von Kaninchen mit azetontrockenen Bakterien erhalten wurden. Die quantitative Bestimmung der Agglutinine wurde nach dem Verfahren von HEIDELBERGER und KABAT² ausgeführt, indem man 1 cm³

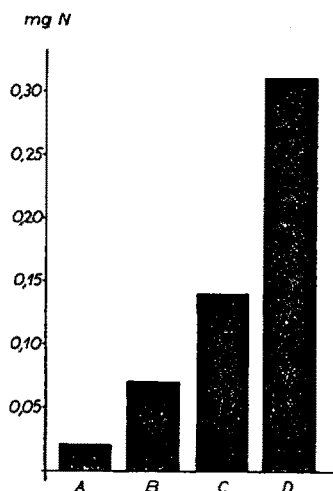


Abb. 2. Antikörperbildung durch verschiedene Proteinfractionen von *S. ballerup* in Milligramm Agglutinin-N ausgedrückt. A Nukleinsäure, B Nukleohiston, C Nukleoprotein, D ganze Bakterien.

Die Werte der Kolonnen sind Mittelwerte von je 4 Versuchen.

¹ Z. DISCHE, Mikrochemie 8, 4 (1930); Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 55, 217 (1944).

² M. HEIDELBERGER und E. A. KABAT, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 31, 595 (1934); J. Exper. Med. 60, 643 (1934).

Serum mit steigenden Mengen einer standardisierten Suspension von *S. ballerup* agglutinierte, bis fast alle Antikörper an die zusammengeballten Bakterien gebunden waren. Der Agglutinin-Stickstoff wurde dann aus der Differenz im Stickstoffgehalte ermittelt. Es zeigte sich hierbei (siehe Abb. 2), dass die Nukleinsäure die schwächste und das intakte Nukleoprotein die stärkste antigene Wirkung unter den Stickstoffverbindungen besitzen. SEVAG und Mitarbeiter¹ erhielten durch Spaltung von Nukleoproteiden aus hämolytischen Streptokokken ebenfalls Nukleinsäuren, die bei der Immunisierung Antikörper erzeugen. Das vom Nukleoprotein abgespaltene Protein besitzt eine mittlere Aktivität. Die antigene Wirkung des Nukleoproteids wird demnach auf einer Zusammenwirkung der Nukleinsäure und der Proteinkomponente beruhen. Das Agglutininbildungsvermögen des Nukleoproteids wird immerhin von der Wirkung der ganzen Bakterien stark übertroffen, was wahrscheinlich eine Folge des anwesenden somatischen Antigens sein könnte. GUREVITCH und EPHRATI² untersuchten quantitativ die Bildung der Agglutinine bei den Kaninchen, die mit dem O-Antigen aus Typhusbakterien immunisiert wurden, fanden aber, dass diese nur 0,15 bis 0,17 mg N auf 1 cm³ Serum betragen.

S. ČMELIK

Zentralhygienisches Institut Zagreb, Jugoslawien, den 9. Mai 1955.

Summary

The author has examined the agglutinogenic property of nucleoprotein and its components, the nucleic acid and proteins from *S. ballerup*. The nucleoprotein was obtained by the extraction of fresh bacteria desintegrated by means of glass powder at pH 8.4 and precipitated with acetic acid at pH 4.6, and its components by splitting the nucleoprotein with 0.5 % sodium carbonate at pH 5.5. The protein component was separated from the nucleic acid by forming a chloroform-proteingel. The protein component was submitted to a further purification by dissolving at pH 7 and precipitating at pH 5.5. Rabbits to whom 4–8 mg of the substance were given in 10–12 doses were used for the immunization. The agglutinins were determined by HEIDELBERGER and KABAT's quantitative method with a *S. ballerup* suspension. The maximum quantity of agglutinin is shown in mg nitrogen per 1 cm³ of serum. In comparison with the results obtained by the immunization with whole germs, it follows that, by means of nitrogen compounds, the nucleoprotein has the most substantial agglutinogenic effect, and the nucleic acid the poorest one.

¹ M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938).

² J. GUREVITCH und E. EPHRATI, J. Immunol. 55, 37 (1947).

Aktive und passive Immunisierung gegen heterologe Tumoren¹

Die Transplantation artfremder Tumoren gelingt nicht mit der üblichen Transplantationstechnik. Nach Vorbehandlung der Empfängertiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison wachsen jedoch heterologe Tumoren während etwa 14 Tagen in beträchtlichem Masse weiter

¹ Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

(MURPHY¹, TOOLAN², BOLLAG und MEYER³ u.a.). Durch Röntgenbestrahlung und Cortison werden also Abwehrkräfte beeinträchtigt. Verschiedene Faktoren können für die Wachstumshemmung und Zerstörung des heterolog transplantierten Tumors verantwortlich sein: Die Verschiedenheit des Terrains mit seinen verschiedenen Nährstoffen, die natürliche Resistenz, die erworbene Immunität, Antikörperbildung und entzündliche, mesenchymale Reaktionen. Für die homologe Transplantation ist seit den klassischen Arbeiten von MEDAWAR und seiner Schule die überragende Bedeutung der erworbenen Immunität gesichert. Eigentliche Antikörper konnten allerdings bisher nicht nachgewiesen werden. (Zusammenfassende Darstellung siehe MEDAWAR⁴.) Hingegen stand es durchaus im Bereich der Möglichkeit, dass bei der heterologen Transplantation andere Faktoren eine zumindest zusätzliche Rolle spielten. Um diese Frage abzuklären, bedienten wir uns der aktiven und passiven Immunisierung gegen heterologe Tumoren, deren Wachstum durch Röntgenstrahlen oder Cortison ermöglicht wird. Diese Versuche sollten auch weitere Aufschlüsse über die Art des Einflusses von Röntgenstrahlen und Cortison auf die Abwehr heterologer Tumoren geben. BILLINGHAM, KROHN und MEDAWAR⁵ zeigten schon früher, dass Cortison die Überlebenszeit von homologen Hauttransplantaten verlängerte. Waren die Tiere jedoch durch eine erste Transplantation schon aktiv immunisiert, so hatte Cortison keinen Einfluss auf die Überlebenszeit des zweiten Transplantates. Cortison verzögerte die Bildung von Immunkörpern. Einmal gebildete Immunkörper übten aber ihre Wirkung trotz Cortison aus. Wir stellten bei der heterologen Tumortransplantation gleiche Verhältnisse fest. Wir erweiterten diese Resultate noch durch Versuche mit passiver Immunisierung bei mit Röntgenstrahlen und Cortison behandelten Tieren. Die passive Immunisierung führten wir nach der Methode von MITCHISON⁶ durch, der durch Implantation von Lymphdrüsen immunisierter Tiere die Transplantationsimmunität gegenüber homologen Tumoren übertragen konnte.

Methodik

A. *Aktive Immunisierung.* 35 g schweren Albino-Ratten wurden 1–2 mm³ grosse Stückchen von Mäuse-Crockersarkom S180 subkutan in die rechte Flanke implantiert. Nach 10 Tagen erfolgte eine zweite Implantation von Mäuse-Crockersarkom S180 in die linke Flanke. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung mit Röntgen-Ganzbestrahlung (2 × 150 r) oder Cortison (4 × 6 mg). Technik siehe BOLLAG und MEYER⁷. Als Kontrollen dienten Ratten, die den gleichen Tumor implantiert erhielten und auf gleiche Weise mit Röntgenstrahlen oder Cortison behandelt, aber 10 Tage vorher nicht mit dem Tumor S180 inokuliert worden waren.

B. *Passive Immunisierung.* 35 g schweren Albino-Ratten wurden in die rechte Flanke 1–2 mm³ grosse Stückchen des Mäuse-Crockersarkoms S180 subkutan inokuliert. Nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet und die axillären und inguinalen Lymphdrüsen der Seite, auf welcher der Tumor implantiert worden war, heraus-

präpariert. Die Lymphdrüsen von je 2 Tieren wurden, nach Zerkleinern mit einem Messer, 50 g schweren Ratten mit einem Troikart in die Bauchhöhle übertragen. Diese Ratten erhielten eine Behandlung mit Röntgen-Ganzbestrahlung (2 × 150 r) oder Cortison (4 × 6 mg). Ferner wurden ihnen am gleichen Tag der Lymphdrüsenübertragung 1–2 mm³ grosse Stückchen des Mäuse-Crockersarkoms S180 in die rechte Flanke subkutan implantiert. Als Kontrollen dienten 50 g schwere Ratten, denen Stückchen des gleichen Tumors übertragen wurden und die ebenfalls mit Röntgenstrahlen oder Cortison behandelt wurden. Einem Teil derselben wurden Lymphdrüsen von Normalratten implantiert. Die Tumoren wurden täglich gemessen. Als Mass der Tumorgrosse diente uns das Produkt aus den beiden grössten Durchmesser des Tumors.

Resultate. Die heterolog transplantierten Tumoren wuchsen nach der Behandlung der Tiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison zu beträchtlicher Grösse (= Kontrollen). Sowohl die aktive wie die passive Immunisierung verhinderten jedoch das Wachstum der heterolog transplantierten Tumoren weitgehend trotz analoger Behandlung mit Röntgenstrahlen bzw. Cortison (s. Tabelle). Die Implantation von Lymphdrüsen von Normaltieren beeinflusste das Tumorwachstum nicht.

Durchschnittliche Tumorgrosse von je 5 auf gleiche Art behandelten Ratten zur Zeit ihres Maximums, das heisst 8–10 Tage nach der heterologen Implantation von Mäuse-Crockersarkom S180 auf Ratten.

	Tumorgrosse in mm ² (Länge × Breite)	
	Vorbehandlung mit Röntgenstrahlen	Vorbehandlung mit Cortison
<i>Aktive Immunisierung.</i> . . .		
Aktiv immunisierte Tiere	14	4
Kontrolltiere	255	105
<i>Passive Immunisierung.</i> . .		
Passiv immunisierte Tiere	28	38
Kontrolltiere	310	183

Die Resultate unserer vorliegenden Immunisierungsversuche lassen den Schluss zu, dass erworbene Immunkörper wahrscheinlich eine ausschlaggebende Rolle bei der Zerstörung von heterolog transplantierten Tumoren spielen. Auch Vorbehandlung der Wirtstiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison vermögen in Anwesenheit von Immunkörpern kein heterologes Tumorwachstum zu gewährleisten. Es ist deshalb anzunehmen, dass die unspezifische entzündliche Reaktion, die Bildung von Granulationsgewebe und die Bindegewebsformation, die ja durch Cortison und Röntgenstrahlen reduziert werden, keine primäre Bedeutung bei der Zerstörung des heterologen Tumors haben. In dieselbe Richtung weisen auch Versuche mit Butazolidin, einem sehr wirksamen Mittel zur Hemmung von Entzündungen. Es gelang uns nicht, damit das heterologe Tumorwachstum zu ermöglichen¹. Ferner ist hervorzuheben, dass bei der heterologen Tumormunität Röntgenstrahlen und Cortison nur auf die *Bildung* von Immunkörpern einen hemmenden Einfluss haben. Bereits bestehende Immunkörper werden jedoch in ihrer *Wirksamkeit* nicht beeinträchtigt. Die natürliche Resistenz scheint, wenigstens bei unserem heterologen Transplantationssystem – Maus-

1 J. B. MURPHY, J. Amer. med. Ass. 62, 1459 (1914).
2 H. W. TOOLAN, Cancer Res. 13, 389 (1953).
3 W. BOLLAG und CL. MEYER, Oncologia 7, 66 (1954).
4 P. B. MEDAWAR, General problems of Immunity in Preservation and Transplantation of Normal Tissues (Churchill Ltd., London 1954).
5 R. E. BILLINGHAM, P. L. KROHN und P. B. MEDAWAR, Brit. med. J. 1, 1157 (1951); 2, 1049 (1951).
6 N. A. MITCHISON, Proc. Roy. Soc. B. 142, 72 (1954).
7 W. BOLLAG und CL. MEYER, Oncologia 7, 66 (1954).

1 W. BOLLAG, unveröffentlichte Versuche.

tumor-Ratte – eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zum Schluss sei noch auf die passive Übertragung der heterologen Tumortransplantationsimmunität hingewiesen, die durch Implantation von Lymphdrüsen immunisierter Tiere erfolgen kann. Nur diejenigen Lymphdrüsen, die im Abzugsgebiet der subkutanen Tumoren liegen, haben einen immunisatorischen Effekt.

W. BOLLAG und H. R. MARTI

Medizinische Universitätsklinik, Zürich, den 29. Januar 1955.

Summary

Heterologous transplantation of tumors is made possible by pretreatment of the recipients with X-rays or Cortisone. Using the transplantation of the mouse Crocker sarcoma S180 on young rats, active or passive immunisations hinder the growth of these tumors even though the hosts were pretreated with Cortisone or X-rays. Acquired immune bodies seem to play a most important role in the destruction of heterologous tumors. Of minor significance are natural resistance, inflammatory reaction, formation of granulation and fibrous tissue. The influence of Cortisone and X-rays on heterologous tumor transplants consists in suppressing immune body formation. Once immune bodies are formed, Cortisone and X-rays have no effect on their action. Passive transfer of transplantation immunity was made by transplanting lymphnodes, draining the tumor implant.

Neurosecretion and Incretory Glands in a Tectibranch Mollusc

The presence of true incretory glands has—so far—been demonstrated clearly only in vertebrates and arthropods. When, in more recent years, the process of neurosecretion was detected, it was found to be closely connected to some of the incretory glands, mostly in such a way that certain brain cells produce the neurosecretory substance which, then, is transported to a special storage organ to which incretory activity is customarily ascribed.

The very close connection between neurosecretion and incretory activity in vertebrates as well as in arthropods makes it reasonable to make a search for some sort of incretory organs in other invertebrate groups, using the modern methods for selective staining of the neurosecretory granula. Already, a number of such investigations have demonstrated the presence of neurosecretory cells in the central ganglia of animals belonging to quite a number of different groups (SCHARRER¹).

During a study of the anatomy and histology of the tectibranch mollusc *Cylichna cylindracea* (Pennant), it became of interest to identify somewhat more precisely the position of the neurosecretory cells which, through the investigations of SCHARRER² and GABE³, have been shown to exist in several of the larger ganglia in tectibranchs. I am much indebted to M. THOMSEN for his valuable help in staining serial sections of two entire specimens of the said mollusc, using the Gomori chrome-haematoxyline-phloxin method.

¹ B. SCHARRER, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 24 (suppl.), 38 (1954).

² B. SCHARRER, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 15, 132 (1935); Naturwiss. 25, 131 (1937).

³ M. GABE, C. r. Acad. Sci. Paris 236, 2166 (1953); L'Année Biologique (3) 30, 44 (1954).

In most of the cells described by SCHARRER and by GABE as probably being neurosecretory, I found surprisingly few of the bluish-black staining granules. Nevertheless, many of these cells could be identified, partly by way of their large nuclei and the abundance of vacuoles in their vicinity, indicating a rich production of some substance, and partly by the strong affinity of the cytoplasm to the phloxin part of the stain. In many of the large nerve cells, and in quite a number of the smaller ones too, this red colour is quite distinct, in the axons as well as around the nuclei.

Later, my attention was drawn towards the peripheral nerves which came to stand out strikingly because of a content of dark-staining granules, arranged in the "pearl-strings" typical of neurosecretory pathways. A very strong contrast appeared between on one side the light colour of most of the ganglia and of the bases of the different nerves arising therefrom, and on the other side the blackish granulation which proved to be so very characteristic of the finer nerves, that it was possible to trace even the most minute branches (figs. 1 and 2). In specimens treated similarly, except that they had been stained in normal haematoxyline-erythrosine, this granulation never appeared.



Fig. 1.—Neurosecretory granula in a tiny branch of the nervus anastomosis running below the prostate gland towards the epithelium of the lateral furrow on the head.

Often, in the stronger nerves, the granules are largely concentrated into a special layer closely inside the neurilemma. In the figure 2, two axons are seen to be given off, one from each of two branches of the nervus infrapallialis. Each of these axons runs to one of the large unicellular glands appearing as dark patches in the figure. Even these axons contain a rich supply of the dark granules. On one of the glands, the axon is seen ending at a cell in which the nucleus is surrounded by still more granules, probably representing an "end organ" transmitting the influence of the nerve to the gland.

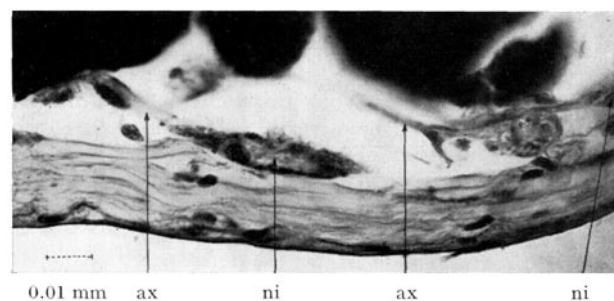


Fig. 2.—Innervation of two large subepithelial unicellular glands through single axons (ax.) arising from two branches of the nervus infrapallialis (ni.). The darker appearance of the periphery of the nerves is due to their content of bluish-black staining neurosecretory granules.