

point of view (see MONROY and DE NICOLA<sup>2</sup>; GUSTAFSON<sup>6</sup>).

This investigation has been supported by a Grant from Consiglio Nazionale delle Ricerche to the Laboratory of Comparative Anatomy.

C. M. B. RICOTTA

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), July 25, 1957.

Riassunto

I particolari delle uova vergini di riccio di mare possono essere separati, a mezzo della centrifugazione differenziale, in due frazioni, una fortemente ed una scarsamente pigmentata. La prima mostra una attività ATPasica attivata da Mg con un massimo a pH 8.2; il massimo della seconda è invece a pH 6.4. Nelle preparazioni contenenti i due tipi di particolari si ritrovano i due massimi.

<sup>6</sup> T. GUSTAFSON, Int. Rev. Cytol. 3, 277 (1954).

Produktion von leukozytenemigrationsfördernden Stoffen durch grampositive Keime in vitro

Grampositive und gramnegative Bakterien, mit Leukozyten in Kontakt gebracht, bewirken Emigrationsförderung der Leukozyten<sup>1</sup>. Es gelingt, wie wir früher beschrieben haben, aus gramnegativen Bakterien und ihrer Kulturflüssigkeit emigrationsfördernde Lipopolysaccharide zu isolieren. Dieses gelang bisher nicht bei grampositiven auf Bouillon oder synthetischen Nährböden gezüchteten Bakterien, weder isolierte Polysaccharide noch Fraktionen aus Nährflüssigkeit sind wirksam<sup>2</sup>. Andererseits konnte der eine von uns früher zeigen, dass bei Züchtung von Streptokokken auf Plasmanährboden leukozytenemigrationsfördernde sterile Kulturfiltrate gewonnen werden können<sup>3</sup>. Es erschien uns wichtig, nochmals den Versuch zu machen, aus Kulturen von grampositiven Bakterien leukozytenemigrationsfördernde Stoffe zu gewinnen, da die Bakterien selber eine solche Wirkung besitzen und auch bei Infekt im tierischen Organismus eine chemotaktische Wirkung mit Abszessbildung gerade bei diesen Bakterien von besonderer Wichtigkeit ist. Auf Grund der Befunde mit Züchtung von Bakterien auf Plasmanährböden und in Erwägung der im tierischen Organismus vorliegenden Verhältnisse konnte mit der Möglichkeit gerechnet wer-

<sup>1</sup> R. MEIER, Z. ges. exp. Med. 87, 283 (1933).  
<sup>2</sup> R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953).  
<sup>3</sup> R. MEIER, Helv. chim. Acta 24, 134/E/(1941).

den, dass diese Bakterien nur aus tierischem Material leukozytenemigrationsfördernde Stoffe freisetzen oder bilden können. Wir haben deshalb unsere Versuche unter Zusatz verschiedener steriler Organe wiederholt (Knorpel von Huhn und Kaninchen, Herz von Maus und Leber von Kaninchen) und die leukozytenemigrationsfördernde Wirkung der von diesen Kulturen erhaltenen Filtrate quantitativ festgestellt.

**Material.** (Beispiel) Die knorpeligen Teile der Brustbeine ausgewachsener Kaninchen wurden herauspräpariert und in kleine Stückchen von etwa 1 mm Kantenlänge zerschnitten. Diese wurden in eine Glucosebouillon im Verhältnis von etwa 100 mg Knorpel/1 cm<sup>3</sup> Bouillon gebracht. Als Bakterium wurde der *Streptococcus pyogenes haemolyticus* SH (lyophilisiert) verwendet. Das Lyophilisat wurde 24 h in Bouillon bebrütet, die Bouillonverdünnung wurde Mäusen gespritzt. 24 h nach Injektion wurde eine kranke Maus getötet und ihr Herz in Bouillon gebracht. Diese 24 h alte Bouillon wurde zum Versuch verwendet.

**Methode.** 4 Erlenmeyerkolben wurden mit Bouillon-Glucose beschickt. 1 diente als Bouillonkontrolle, 2 wurde mit je 2 Tropfen Streptokokkenbouillon pro cm<sup>3</sup> Bouillon beimpft. 3 wurden die geschnittenen Knorpelstückchen zugegeben im Verhältnis 1:10, 4 enthielt Bouillon, Knorpel (im gleichen Verhältnis wie Röhren 3) und 2 Tropfen/cm<sup>3</sup> Streptokokkenbouillon. Brutschrank 37°C unter leichter Bewegung. Nach 4 bzw. 6 Tagen wurden zur Kulturkontrolle Ausstriche gemacht, der Kolbeninhalt wurde darauf 1 h im Wasserbad erhitzt und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Tyrode verdünnt den Leukozytenkulturen überschichtet (Leukozytenauswanderung: Methode Arch. exp. Path. Pharm. 224, 104 (1955)). Alle Versuche wurden 6mal wiederholt. Pro Bouillonverdünnung wurden je 5 Leukozytenkulturen verwendet.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in untenstehender Tabelle zusammengefasst.

Durch Dialysieren unter sterilen Bedingungen lässt sich die Wirksamkeit der Streptokokken-Knorpel-Kulturbouillon leicht steigern. Eine Wirksamkeit der Kontrollen tritt auch unter diesen Bedingungen nicht auf.

Es ergibt sich somit, dass die Bildung von leukozytenemigrationsfördernden Stoffen durch Streptokokken bei Zusatz von gewissen Organen zur Kulturbouillon erheblich gesteigert werden kann. Auf Grund der vorliegenden Versuche kann somit die Diskrepanz zwischen der Wirksamkeit lebender Bakterien und dem Fehlen der Wirkung bei abgetöteten und in rein synthetischer Nährflüssigkeit gezüchteten dahin aufgeklärt werden, dass grampositive Bakterien nur aus tierischem Material leukozytenemigrationsfördernde Stoffe bilden oder freisetzen. Die wirksamen leukozytenemigrationsfördernden

Wirkung von *Streptococcus-pyogenes-haemolyticus*-Kulturbouillon mit und ohne Zusatz von Knorpelgewebe auf die Leukozytenauswanderung in vitro.

| Verdünnung der Bouillon 1 h 100°C | Bouillon | Bouillon + Knorpel | Bouillon + Streptococc. | Bouillon + Streptococc. + Knorpel |
|-----------------------------------|----------|--------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 1:10 . . . . .                    | Ø        | Ø                  | (+)                     | +++                               |
| 1:100. . . . .                    | Ø        | Ø                  | Ø                       | ++                                |
| 1:500. . . . .                    | Ø        | Ø                  | Ø                       | +                                 |

Ø = keine Auswanderungsförderung      ++ = mässige Auswanderungsförderung  
+ = leichte Auswanderungsförderung      +++ = starke Auswanderungsförderung

Stoffe sind hitzestabil und nicht dialysierbar. Sie dürften für die Entzündungsreaktionen, welche durch gram-positive Bakterien ausgelöst werden, von Bedeutung sein. Es ist weiterhin möglich, dass die Entstehung von organspezifischen Autoantikörpern mit ihrer Bildung in Zusammenhang steht. Abklärung ihrer chemischen Konstitution und ihrer pharmakologischen Wirkung im einzelnen dürfte weitere Aufschlüsse geben.

R. MEIER und B. SCHÄR

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,  
Pharmazeutische Abteilung, Basel, 23. September 1957.

### Summary

*Streptococcus pyogenes haemolyticus* grown in glucose broth is capable of producing or liberating a heat-stable factor of high molecular weight which stimulates the emigration of leucocytes *in vitro*, only if certain animal organs are present.

## The Exudative Diathesis Produced by Torula Yeast\*

The development of exudative diathesis in chicks was first produced by vitamin E deficient diets to which was added an easily oxidizable fat such as cod liver oil<sup>1</sup>. When the vitamin E deficient diet was fat-free, the symptom did not appear<sup>2</sup>.

SCOTT, HILL, NORRIS, DOBSON, and NELSON<sup>3</sup> have described the development of exudative diathesis by means of diets containing about 60% (dry) torula yeast as the only source of protein, and without added fat. Similar results have been reported by BIERI, POLLARD, and BRIGGS<sup>4</sup> using alcohol-extracted torula yeast. These authors were of the opinion that the diets used in their experiments did not contain fat in such a quantity that it could be responsible for the development of the symptom, and therefore held that easily oxidizable fat is not necessary for the occurrence of exudative diathesis.

We have had the opportunity to carry out similar feeding experiments with chicks receiving diets with torula yeasts of the same kinds ('1N' and '3N' from Lake States Yeast Corporation, Rhinelander, Wisconsin) as those used by SCOTT *et al.* We thereby confirmed the observation that exudative diathesis occurs in chicks fed such diets without added fat.

However, we found a considerable content of fat and easily oxidizable fatty acids in the torula yeast. Torula yeast '1N' was found to contain 4.5% total fatty acids, 41.8% of which were dienoic and 5.7% trienoic. The corresponding figures for torula yeast '3N' were 5.3% total fatty acids with 44.7% dienoic and 2.6% trienoic.

The total amount of fatty acids in the yeast was found after alkaline hydrolysis. Extraction after acid hydrolysis alone gave a somewhat lower figure.

Dr. BIERI of the National Institutes of Health, Bethesda, Md., has generously sent us two samples of his torula yeast, one untreated and the other alcohol extracted. We found that the untreated yeast contained 4.8% total fatty acids, whereas the alcohol extracted yeast contained 2.7%. The contents of dienoic fatty acids in the total fatty acids of the two samples were 44.8 and 45.3%, respectively; the contents of trienoic were 4.0% and 3.6%.

In our experiments we have found that diets with as little as 10% of torula yeast may produce exudates, although to a much lesser extent than diets with 60% of this yeast. In certain earlier experiments<sup>5</sup> very pronounced exudates were produced with diets containing 5% lard, whereas the corresponding fat-free diet gave no such symptoms. Although the lard used at that time was not analyzed for individual fatty acids, it is apparent from later analyses of lard, that 5% of lard must have contributed about as much dienoic and trienoic acids as 10% of torula yeast has. 60% of torula yeast will contribute roughly the same amount of dienoic and trienoic acids as will 30% of lard.

We, therefore, do not consider the experiments described by the aforementioned American authors as proof for the assumption that easily oxidizable fat is not necessary for the occurrence of exudative diathesis, although we agree with them with respect to the usefulness of torula yeast in the study of exudative diathesis in chicks.

It may be added that a type of yeast (Fleischmann 50 B) which in our experiments did not produce exudative diathesis contained 3.8% of total fatty acids, but only 0.3% of this amount was dienoic. The presence of tri-, tetra-, penta-, and hexaenoic acids could not be demonstrated with certainty.

The exudative diathesis produced by torula yeast diets without added fat is very pronounced. Exudates occur in fat tissue and in muscles and skin, as is the case when cod liver oil-casein diets are used. The exudates originating from muscles may be even more pronounced with torula yeast diets. Torula yeast diets also produced peroxidation of body fat as previously found with casein diets containing cod liver oil<sup>6</sup> and lard<sup>7</sup>. White striation of breast muscles<sup>8</sup>, and a few cases of encephalomalacia also occurred when exudate-producing torula yeast diets were fed.

During the course of the experiments described here we received a personal communication from Dr. E. L. R. STOKSTAD of The American Cyanamid Company, Research Division, and shortly thereafter one from Dr. K. SCHWARZ, National Institutes of Health, Bethesda, Md., informing us that selenium as selenite prevents the exudative diathesis in chicks, when this element is fed in amounts below the toxic level.

Using 60% torula yeast diets we have confirmed this very important finding, and may add that at the level of 5 ppm Se as pure SeO<sub>2</sub> (7 ppm) did not prevent encephalomalacia, even though the exudative diathesis and

\* We are grateful to Lake States Yeast Corporation, Rhinelander, Wisconsin, for supply of the torula yeast used in these experiments.

<sup>1</sup> H. DAM and J. GLAVIND, *Nature* 142, 1077 (1938).

<sup>2</sup> H. DAM, *Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y.* 52, 285 (1943).

<sup>3</sup> M. L. SCOTT, F. W. HILL, L. C. NORRIS, D. C. DOBSON, and T. S. NELSON, *J. Nutrition* 56, 387 (1956).

<sup>4</sup> J. G. BIERI, C. J. POLLARD, and G. N. BRIGGS, *Fed. Proc.* 16, 381 (1957).

<sup>5</sup> H. DAM, *J. Nutrition* 27, 193 (1944).

<sup>6</sup> H. DAM and H. GRANADOS, *Acta physiol. scand.* 10, 162 (1945).

<sup>7</sup> H. DAM, INGE PRANGE, and E. SØNDERGAARD, *Acta pharmacol. toxicol.* 8, 1 (1952).

<sup>8</sup> H. DAM, INGE PRANGE, and E. SØNDERGAARD, *Acta pathol. microbiol. scand.* 31, 172 (1952).