

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität
Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. O. SCHMIDT).

Über die Gewinnung hochtitriger Anti-0 (Anti-H)-Seren vom Kaninchen nach Immunisierung mit menschlichem Ausscheiderspeichel.

Von

RUDOLF MANZ,
Assistent am Institut.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. März 1950.)

Nachdem SCHIFF 1927 an Hand absorbiert Rinderseren nachgewiesen hatte, daß das Merkmal 0 der LANDSTEINERSchen klassischen Blutgruppen eine agglutinable Eigenschaft und nicht nur „etwas Negatives“ darstelle, sind Anti-0-Seren verschiedenster Herkunft beschrieben worden. Der Weg führte von den natürlichen Tierseren über die Shiga-Immunseren der Ziegen bis zu der modernsten Form der Immunisierung von Versuchstieren mit chemisch isolierter 0-Gruppensubstanz. Entsprechend den wachsenden serologischen Möglichkeiten haben auch die theoretischen Anschauungen über das Wesen der Blutgruppe 0 zahlreiche Wandlungen durchgemacht. RASCH hat neuerdings eine übersichtliche, zusammenfassende Darstellung dieses Fragenkomplexes unter Berücksichtigung des Schrifttums bis 1948 gegeben. Seine kritische Besprechung des heute bereits recht umfangreichen Stoffgebietes setzt sich vor allem mit HIRSFELDS Plejadentheorie im Zusammenhang mit der DAHRSchen Anschauung über die Möglichkeit einer Unterscheidung zwischen art- und gruppenspezifisch wirksamen Antikörperfraktionen auseinander und verwertet hierzu die Ergebnisse von MORGAN und seiner Schule.

Nun haben sich aber neuerdings die Verhältnisse dadurch wieder grundlegend geändert, daß MORGAN durch seine Mitteilung über die Darstellung einer *echten Gruppensubstanz 0* und deren Unterscheidung von einer *ubiquitären* oder *Basissubstanz H* doch — entgegen den zuletzt geäußerten Vermutungen — eine *Trennung der 0-Substanz in 2 Komponenten* nahelegt. Die biochemische Forschung hat uns somit auf dem Gebiet der Blutgruppenchemie zweifellos wieder um einen wesentlichen Fortschritt bereichert. In manchen Arbeiten, gerade über die Frage der Blutgruppe 0 und des Nachweises der Heterozygotie bei A0- und B0-Menschen wird heute vielfach die Meinung vertreten, daß nunmehr grundsätzlich neue Erkenntnisse künftig ausschließlich nur noch durch den Chemiker zu erwarten wären. Diese ausgesprochene Skepsis gegenüber den rein oder vorzugsweise *serologischen* Möglich-

keiten geht aber doch wohl zu weit. Anhaltspunkte für diese Meinung finden wir bereits in den früheren Arbeiten von MORGAN, die auch RASCH in entsprechender Weise hervorhebt: es handelt sich um die Forderung, bei der Gewinnung von Antikörpern durch bestimmte Antigene vom *Individuum* und nicht von *Sammelmaterial* auszugehen. Diese Forderung ist auch ganz verständlich, wenn man berücksichtigt, daß nach HIRSZFIELDS Theorie, wie nach deren neuester Modifikation durch MORGAN, bei allen Menschen 0-Gruppensubstanz oder die Basis-Substanz H in quantitativ unterschiedlicher Weise allein oder neben den Antigenen A und B vorhanden sein muß. Menschen mit *nur* reiner 0- oder H-Substanz sind nach der Theorie möglich. MORGAN ist es nämlich unter anderem gelungen, reine 0-Substanz aus dem Inhalt von Ovarialcysten zu gewinnen, nachdem er früher bereits die jetzt sog. H-Substanz isolierte und damit Immunseren erzeugen konnte.

Der Gedanke lag nahe, zu prüfen, ob ähnliche Immunisierungseffekte, wie sie mit mehr oder weniger gereinigter Gruppensubstanz oder unmittelbar mit dem Inhalt pseudomucinöser Ovarialcysten zu erzielen waren, nicht auch mit anderen Körperflüssigkeiten von Ausscheidern — und zwar ohne chemische oder physikalische Eingriffe und Umsetzungen — zu erreichen wären.

Wir haben daher seit längerem begonnen, Kaninchen mit *Ausscheiderspeichel* zu behandeln, um die Möglichkeit der Gewinnung zunächst einmal von Anti-0-Seren *schlechthin* auf diesem Wege zu prüfen. Bisher hat unseres Wissens lediglich LEHRS eine solche Immunisierung — an nur 2 Versuchstieren und mit negativem Ergebnis — durchgeführt. Im folgenden soll über eigene derartige Versuche berichtet werden. Die Bedeutung des bei uns positiven Ergebnisses sehen wir dabei nicht so sehr in der Gewinnung qualitativ hochwertiger Anti-0-Seren, als darin, daß uns mit der gewählten Methode die Möglichkeit gegeben erscheint, von Menschen verschiedenster Genotypen bzw. von Trägern qualitativ verschiedenartiger Gruppensubstanzen unter Einschluß der Gruppe 0 auf individuelle Art Antikörper zu gewinnen.

Technik.

Vier ausgewachsene Kaninchen wurden über 12 Wochen hinweg in Abständen von 4—6 Tagen mit menschlichem Ausscheiderspeichel der Gruppe 0 immunisiert. Der Speichel wurde jeweils frisch gewonnen, lediglich durch kurzes Zentrifugieren von nichtflüssigen Bestandteilen befreit und dann verdünnt mit Kaninchenserum gespritzt. Die Tiere erhielten jeweils 1 cm³ Kaninchenserum, das mit dem Speichel in steigender Menge von $1/10$ — $1/2$ Volumen gut vermischt war. Sicherheitshalber werden wir bei unseren weiteren Versuchen die Speichel-Serumgemische bakterienfrei filtrieren, obwohl wir bisher keine Infektionen bei unseren Versuchstieren sahen.

SCHIFF hatte bei seinen Speichelimmunisierungsversuchen bzw. bei Immunisierung mit gereinigter Gruppensubstanz das Antigen mit Schweineserum zusammengebracht und dann injiziert — wohl in der Meinung, daß die Bildung eines

Anti-Schwein die gegen menschliche Gruppensubstanzen wirksame Agglutination der resultierenden Antiseren nicht stören würde. Das mag an und für sich zutreffen, doch ist zu bedenken, daß meist die Bildung eines starken Antikörpers (hier des Anti-Schwein) die antigene Wirksamkeit schwächerer Antigene — nämlich in unserem Falle des 0-Antigens — völlig unterdrückt. Ähnliches ist ja zu beobachten bei der Immunisierung von Kaninchen mit Blutkörperchen 0M oder 0N, wobei man kaum jemals neben Anti-MN-Antikörpern die Entwicklung eines Anti-0-Agglutinins sieht. Ob das Digerieren des Speichels mit Kaninchenserum überhaupt erforderlich ist, oder ob die Verdünnung mit NaCl-Lösung nicht schon ausreichen würde, muß noch untersucht werden. Erfahrungen mit unvollständig gereinigten Gruppensubstanzen zeigen, daß auch so schon eine antigene Wirksamkeit besteht, wonach dann freilich solche Substanzen nicht reine Haptene im biochemischen Sinne sein können, wie theoretisch angenommen werden müßte.

Ergebnisse.

Von den 4 Versuchstieren verstarb eines nach 5 Wochen im anaphylaktischen Schock mit typischem Organbefund, ohne daß ein gruppenspezifisches Agglutinin nachweisbar gewesen wäre. Das zweite Tier bildete einen starken Immunantikörper mit kräftiger Wirksamkeit gegen 0-Blutkörperchen. Nach der Probeabsorption mit Blutkörperchen A₁B MN (!) wirkte das Serum nicht mehr gegen Blutkörperchen N, wohl aber gegen alle Blutkörperchen M und MN mit einem Titer von 1:8±. Das Tier hatte somit ein Anti-M gebildet! Der Spender des Speichels besitzt in der Tat die Blutformel 0M. Damit bestätigt sich eine unseres Wissens bisher erst einmal von SCHIFF erhobene Feststellung, daß durch Immunisierung mit in Ausscheidungsflüssigkeiten gelösten Gruppensubstanzen die Bildung eines Anti-M-Agglutinins erreicht wurde — im Widerspruch zu der herrschenden Meinung, daß MN-Gruppensubstanzen in Ausscheidungsflüssigkeiten nicht vorkommen. Über diesen bemerkenswerten Antikörper soll hier indes nicht näher berichtet werden; es sei lediglich erwähnt, daß der Antikörper sich auch bei uns, entsprechend den Erfahrungen von SCHIFF als sehr labil und schlecht haltbar erwies.

Das dritte und vierte Versuchstier hatten nach einer Immunisierungsdauer von 6 Wochen mit 10 Einzelinjektionen völlig übereinstimmend einen auch bei 37° C noch kräftig wirksamen Antikörper gegen menschliche 0-Blutkörperchen gebildet, über deren serologische Analyse im folgenden kurz berichtet sei, wobei wir uns auf ein Serum (Tier Nr. 8) beschränken können, da die Seren beider Tiere qualitativ völlig analoge Ergebnisse zeigten.

Analyse des 0-wirksamen Antikörpers.

Das Rohserum 8 wurde zur Ausschaltung der nicht sehr wirksamen hämolytischen Komponente inaktiviert, 1:2 mit NaCl verdünnt und 1 Std bei Zimmertemperatur mit einem Volumen Blutkörperchensediment A₁ B MN P Rh absorbiert. Die Auswertung gegen verschiedene Testblutkörperchen ergab unter anderem Tabelle I.

Die Verdünnung des Serums 1:2 mit NaCl erwies sich als die für die Absorption beste Gebrauchsverdünnung. Die Verwendung von Rohserum oder von geringeren oder höheren Verdünnungen ergab keine besseren Resultate. Die Seren sind sehr leicht zu absorbieren, die

Tabelle 1.

Blutkörperchen	1	2	4	8	16	32	64	128	256
0 (Spender) .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	—
0 stark	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	—
A_2	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
A_2B	++	++	+	±	—	—	—	—	—
A_1A_2	++	+	+	—	—	—	—	—	—
A_10	+++	+++	+	—	—	—	—	—	—
A_0	+	—	—	—	—	—	—	—	—
$B0$	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
A_1B (abs.) . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A_1B	—	—	—	—	—	—	—	—	—

spezifische Titer senkung ist denkbar gering, wie die Titration des unabsorbierten Rohserums zeigt (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Blutkörperchen	2	4	8	16	32	64	128	256	512
A_1B	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
0 (Spender) .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
0 (stark)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—

Dabei kommt der spezifische Immunisierungseffekt deutlich zum Ausdruck. Das Serum verhält sich qualitativ wie ein gutes M-Serum, mit dem einen Unterschied, daß die absolute Höhe der Titer im Rohserum gegenüber den MN-Seren wesentlich geringer ist. Dies läßt sich auch durch Steigerung der Speichelmenge bei der Immunisierung nicht ändern, auch nicht durch die Ausdehnung der Injektionen auf eine längere Zeitdauer. Wir haben nach den oben angeführten Ergebnissen beide Tiere noch mehrere Wochen weitergespritzt, ohne daß dadurch ein weiterer Anstieg des Titers zu erzielen war: im Gegenteil war — in Übereinstimmung mit den Erfahrungen bei der MN-Immunisierung — ein Rückgang zu bemerken, so daß wir schließlich die Tiere entbluteten. Die Seren wurden durch ein Bakterienfilter geschickt und haben sich als Rohseren bis jetzt nahezu 5 Monate unverändert gehalten.

Nach Absättigung mit einem Volumen A_2B -Blutkörperchen traten folgende Reaktionen auf (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Blutkörperchen	2	4	8	16	32	64	128	
A_1B	±	—	—	—	—	—	—	
A_1B	±	—	—	—	—	—	—	
A_2B	—	—	—	—	—	—	—	
A_2	++	++	±	—	—	—	—	
0 (stark)	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	—
0 (Spender)	+++	+++	+++	+++	+++	±	—	—

Nach Absättigung mit einem Volumen 0-Blutkörperchen vom Spender des Speichels (Tabelle 4).

Es zeigte sich, daß nach der Absorption die Abgüsse gelegentlich andere A₁B-Blutkörperchen als die zur Absättigung verwandten in der ersten oder zweiten Verdünnungsstufe agglutinierten. Wurde mit einem Gemisch dieser 2 Arten von A₁B-Blutkörperchen absorbiert, so traten keinerlei Reaktionen mit A₁B mehr auf. A₂B-Blutkörperchen wurden stets — wenn auch im einzelnen in wechselnder Stärke — agglutiniert. So gewonnene Abgüsse

Tabelle 4.

Blutkörperchen	2	4	8
A ₁ B.	+	±	—
A ₂ B.	+	±	—
A ₂	±	—	—
0 (Spender)	—	—	—
0 (stark)	—	—	—

halten sich lange — über viele Wochen — unverändert und unterscheiden sich somit sehr vorteilhaft von anderen, sog. Anti-0-Seren, ja, sogar von MN-Abgüsse.

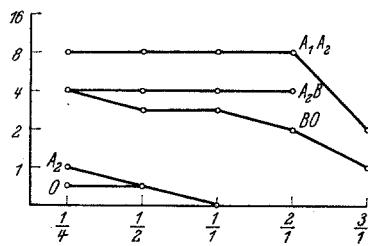


Abb. 1.
Ausgewertet gegen A₂-Blutkörperchen.

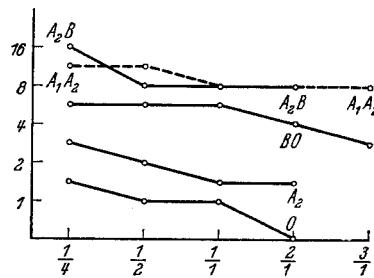


Abb. 2.
Ausgewertet gegen 0-Blutkörperchen.

Die Ergebnisse einiger Absorptionsversuche nach FRIEDENREICH und WORSAE zeigen nachfolgende Abbildungen. Das Anti-0-Agglutinin wurde dabei abgesättigt mit Blutkörperchen der Typen 0, A₂, A₂B, A₁A₂ und B0 unter Auswertung gegen Testblutkörperchen 0 und A₂ (Abb. 1 und 2).

Daraus ist ersichtlich, daß unser Antikörper außer durch 0-Blutkörperchen von keinem anderen Typ in seiner spezifischen Wirksamkeit erschöpft wird, auch nicht, wenn das Verhältnis Blutkörperchen-Serum auf 2/1 bzw. 3/1 gesteigert wird. Bei der Auswertung gegen A₂-Blutkörperchen sei unter anderem auf den auffallenden Unterschied in der Wirksamkeit von A₂B gegenüber den A₂-Blutkörperchen hingewiesen.

In dieser Beziehung verhalten sich übrigens nicht alle Blutkörperchen gleich. Bei ausgedehnten Untersuchungen zur Analyse der beiden hier besprochenen Antikörper ergab sich bald, daß ein kleiner Teil der geprüften 0-Blutkörperchen (ohne Rücksicht auf ihre Zugehörigkeit zu M/N, P oder Rh) grundsätzlich und immer 1—1 $\frac{1}{2}$ Titerstufen höher agglutiniert wurde als die Blutkörperchen des Spenders, welcher den Speichel zur Immunisierung geliefert hatte. 0-Blutkörperchen, die in gleicher Weise konstant schwächer reagierten als die Blutkörperchen

des Spenders, haben wir dagegen bis jetzt noch nicht gefunden. Immerhin kann man mit Hilfe unseres Serums 0-Blutkörperchen „stark“ und „schwach“ an- deutungsweise unterscheiden; erstere erschöpfen auch das Anti-0-Serum eher als letztere.

Zur Durchführung von *Absprengungsversuchen* wurden unsere Seren 1:3 verdünnt und mit einem Volumen A₁B-Blutkörperchen absorbiert. Zu je 3 cm³ des Abgusses wurden 0,4 cm³ dicht zentrifugiertes Sediment zugegeben und 2 Std bei Zimmertemperatur unter mehrfachem Umkippen stehen gelassen. Von dem einmal mit eiskühlter NaCl-Lösung gewaschenen Zentrifugat wurde 10 min bei 56° in 0,5 cm³ NaCl-Lösung abgesprengt. Die Ergebnisse einiger solcher Versuche sind aus folgenden Übersichten mit Auswertung gegen 4 verschiedene Typen von Blutkörperchen zu ersehen (Tabelle 5).

Tabelle 5.

Abgesprengt von Blutkörperchen	Ausgewertet gegen Blutkörperchen	1	2	4	8	16	32	64	128
0	A ₁ B	—							
	A ₂ B	+	+	±	±	—			
	A ₂	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
A ₂	0	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
	A ₁ B	—							
	A ₂ B	+	±	—					
A ₁ A ₂	A ₂	+++	+++	+++	++	++	—		
	0	+++	+++	+++	++	±	—		
	A ₁ B	—							
B0	A ₂ B	+	—						
	A ₂	++	+	±	—				
	0	++	±	—					
A ₁ A ₂	A ₁ B	—							
	A ₂ B	+	±	—					
	A ₂	++	+	±	—				
B0	0	++	±	—					

Die abgesprengten Agglutinine haben also auffallenderweise gleiche oder sogar etwas höhere Wirksamkeit gegen A₂-Blutkörperchen als gegen solche der Gruppe 0 — im Gegensatz zu den Eigenschaften des Ausgangsabgusses!

Im Anschluß sei noch das Ergebnis eines Absättigungsversuches des 1:3 verdünnten absorbierten Serums mit 1/4 Volumen dicht zentrifugierten Sedimentes von *Shiga-Kruse-Bakterien* mitgeteilt (Tabelle 6).

Schließlich seien noch einige weitere Eigenschaften unserer beiden Immunseren im Zusammenhang besprochen:

Die Seren ergeben eine positive Präcipitinreaktion mit menschlichen Serumverdünnungen und menschlichem Speichel, dagegen nicht mit

Tabelle 6.

	1	2	4	8	16	32	64
Anti-0 unabsorbiert . . .	+++	+++	+++	++	+	—	
Absorbiert $+ \frac{1}{4}$ Volumen							
Shiga-Bakterien . . .	+++	+++	++	—			
Anti-B unabsorbiert . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	\pm
Absorbiert $+ \frac{1}{4}$ Volumen							
Shiga-Bakterien . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	\pm

Hämoglobinlösungen. Die Seren sind mit menschlichem A₁B-Ausscheiderspeichel nicht zu reinigen. Zum Nachweis der Ausscheider-eigenschaft bei Personen der Gruppe 0 sind die Seren geeignet, doch kann man dabei nicht mit höheren Speichelverdünnungen als 1:5—1:10 arbeiten.

Ein Beispiel eines solchen Absorptionsversuches sei mitgeteilt (Tabelle 7).

Tabelle 7.

	1	2	4	8	16	32	64
Anti-0 Nr. 8 und 1 Volumen							
NaCl	+++	+++	++	+	+	\pm	—
Speichel B0s 1:5 . . .	+++	+++	++	+	\pm	—	
Speichel A ₁ BS 1:5 . . .	+++	+++	++	+	\pm	—	
Speichel OS 1:5	++	+	\pm	—			
Speichel OS 1:5	+	\pm	—				
Speichel OS 1:5	+	—					
Speichel Os 1:5	+++	+++	++	+	+	—	

Bei serologischen Untersuchungen an einer großen Reihe von Zwillingspaaren wurde das Anti-0-Agglutinin zum Nachweis der Ausscheider-eigenschaft im Speichel ausgewertet. Es ergab sich regelmäßig, wie auch aus obigem Beispiel erkennbar, daß der Antikörper noch wesentlich schwerer mit der gelösten Substanz zu absorbieren ist, als dies schon mit Blutkörperchen der Fall ist. Ausscheiderspeichel von Menschen der heterozygoten Typen A0 und B0 ergeben in keinem Fall solche charakteristische Titer senkung, wie sie z. B. HOLZER unter Verwendung tierischer Anti-0-Seren früher mitgeteilt hat — ist doch eine *Erschöpfung* unserer Seren selbst durch OS-Speichel in der konzentrierten Form von Verdünnungen 1:5 kaum zu erzielen gewesen (vgl. hierzu auch die Absorption mit B0-Blut in Abb. 1).

Hierzu ist noch bemerkenswert, daß sich der bereits erwähnte Unterschied zwischen 0-stark und 0-schwach ebenso wie in der Stärke der Agglutinabilität auch in der Wirkung des Speichels zum Ausdruck kommt. Dies zeigt Tabelle 8 der Ergebnisse von Absorptionsversuchen mit beiden Speichelarten.

Tabelle 8.

	Ausgewertet gegen Blutkörperchen	2	4	8	16	32	64
Serum 8 und 1 Volumen NaCl	A ₂ 0 (stark) 0 (Spender)	+++ +++ +++	+++ +++ +++	++ +++ +++	++ ++ ++	— + ±	— + ±
Serum 8 und 1 Volumen Speichel Spender 1:10	A ₂ 0 stark 0 (Spender)	+	±	—	—	—	—
Serum 8 und 1 Volumen Speichel 0-stark 1:10	A ₂ 0 (stark) 0 (Spender)	— +	±	— —	— —	— —	— —

Diskussion der Ergebnisse.

Die von uns durch Speichelimmunisierung gewonnenen und hier beschriebenen Antiseren sind vorläufig im Sinne MORGANS als Anti-H-Seren zu bezeichnen. Allein anti-H-wirksam sind nach den neuesten Feststellungen des genannten Autors *alle* bisher sog. Anti-0-Seren, unter anderem die tierischen Anti-0 (α_2 -Seren), das Shiga-Serum, die mit der „sog.“ 0-Substanz gewonnenen Immunseren. Kennzeichnend für Anti-H-Seren ist, daß sie nicht *spezifisch* 0-Blutkörperchen agglutinieren, sondern auch A₂-B- und homozygote AA- bzw. BB-Blutkörperchen; ferner daß sie in ihrer Wirksamkeit gegen 0-Blutkörperchen durch Shiga-Bakterien wie auch durch die „sog.“ 0-Substanz — gewonnen aus Schweinemägen bzw. aus menschlicher Magenschleimhaut — zu beeinflussen sind. Die Analyse unserer Seren stimmt in ihren grundsätzlichen Ergebnissen mit der für Anti-H-Seren gegebenen Definition überein. Nach der hier geschilderten Methode ist es somit zumindest möglich, auf einfachstem Wege gute und haltbare Anti-H-Seren zu gewinnen, die für mancherlei Zwecke brauchbar sind. So vor allem für den Nachweis der Ausscheidereigenschaft in frischen Körperflüssigkeiten bei 0-Menschen. Freilich ist hier zu berücksichtigen, daß man mittels solcher Seren, wie hier beschrieben, nach der derzeitigen Anschauung *nur die Ausscheidung der H-Substanz* erfassen kann. Man müßte daher bei Menschen 0, welche auf Grund der Reaktionen mit Anti-H als *Nicht-ausscheider* imponieren, immer noch prüfen, ob die *Blutkörperchen* des betreffenden Individuums das Anti-H beeinflussen. Wäre dies einmal nicht der Fall, dann müßte es sich um den restlos mutierten Typus 0e0c (s. später) handeln, und die Frage S oder s wäre dann nur mit Hilfe eines *echten* Anti-0-Antikörpers zu entscheiden.

Solche echten Anti-0-Seren haben neuerdings MORGAN und WATKINS bei Menschen gefunden, ebenso „echte“ Gruppensubstanz 0 in Ovarialcysten. Um ein echtes Anti-0 handelt es sich vermutlich auch bei dem von DAHR und STÖCKLEIN mitgeteilten Fall. Mit diesem Serum wurde unter anderem auch die Ausscheidereigenschaft bei dem Spender des

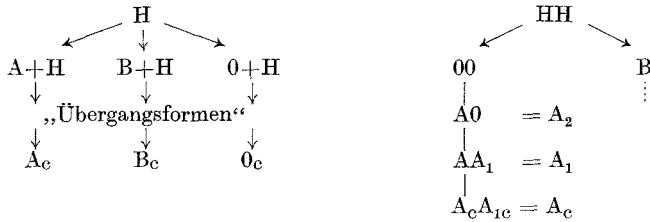
Speichels für unsere hier beschriebenen Versuche festgestellt: dieser Speichel senkte den Titer des Anti-O-Agglutinins spezifisch noch in einer Verdünnung 1:1000. Dies ist einmal insofern bemerkenswert, als es den *grundlegenden Unterschied* zu unseren Anti-H-Seren beweist, die selbst durch die 200fach höhere Konzentration des gleichen Speichels nicht zu erschöpfen waren (daß nicht etwa temporäre Schwankungen des Substanzgehaltes im Speichel für dies Verhalten eine Rolle spielen, wurde durch sehr zahlreiche Untersuchungen nachgewiesen). Wenn es sich bei dem DAHRSchen Antikörper wirklich um ein Anti-O handelt, würden die erwähnten differenten Ergebnisse des weiteren beweisen, daß in dem betreffenden Speichel *O- und H-Substanz nebeneinander vorhanden* sind, und schließlich, daß die echte Gruppensubstanz wohl die bei weitem *höhere Agglutininbindungsfähigkeit* für ihren homologen Antikörper besitzt, aber gegenüber der H-Substanz dafür die *geringere antigene Wirksamkeit*!

Es muß bemerkt werden, daß allerdings ein Argument gegen die Anerkennung des DAHRSchen Serum als Anti-O im *eigentlichen Sinne* MORGANS spricht: das Serum wurde von dem 1:100 verdünntem Speichel eines von MANZ und BUSE beschriebenen A₃B-Falles noch spezifisch beeinflußt. MORGAN berichtet leider nichts über die serologischen Eigentümlichkeiten der von ihm erwähnten natürlichen menschlichen echten Anti-O-Seren. Das DAHRSche Serum wies die für die sog. „irregulären Agglutinine“ bekannten Eigenschaften auf: es handelte sich um ein Kälteagglutinin, war schlecht haltbar und ließ sich nicht trocknen; ferner zeigte es bei zeitlich auseinanderliegenden Entnahmen extreme Titorschwankungen und schließlich verschwand das Agglutinin im Anschluß an eine Erkrankung des Spenders völlig aus dessen Serum.

Die echten Anti-O-Seren müssen im übrigen ungewöhnlich selten sein. Es wäre sonst kaum zu erklären, daß sie nicht bei den gewissenhaften Serumprüfungen anlässlich gerichtlicher Blutgruppenbestimmungen bzw. bei Kreuzproben und serologischen Untersuchungen für Transfusionszwecke schon häufiger gefunden worden wären. Aus dem bisher Besprochenen ergibt sich aber, daß sie gleichwohl für die weitere Klärung der heute immer noch im wesentlichen ungelösten Probleme um das Wesen der Blutgruppe O zur Verfügung stehen müssen. Für die Gewinnung auch eines Immun-Anti-O-Antikörpers scheint uns aber die Speichelimmunisierung einen Weg zu eröffnen.

Vor dessen Besprechung sei kurz auf die neuerliche Modifikation der HIRSFELDSchen Theorie durch MORGAN eingegangen. Eine Korrektur der HIRSFELDSchen Anschauungen erschien deshalb notwendig, weil seine Theorie zweifellos auf Untersuchungen mit einem Anti-H-Serum fußt. Nach MORGAN steht nunmehr am Anfang das Gen H, aus welchem durch Mutation O oder B entstehen kann. Aus O kann durch weitere Mutation A₀ = Genkomplex A₂ hervorgehen und nach weiteren Zwischenformen (z. B. A A₁ = Genkomplex A₁) ständen am Ende der Reihen die „komplett mutierten“ Formen A_c, B_c, O_c. Am besten veranschaulicht diese Vorstellungen folgende Übersicht.

MORGANS Spenderin (Genotyp A₀) eines Anti-H-Serums mußte somit dem Genotyp A_cO_c angehören — die Blutkörperchen und Aus-



scheidungen enthalten dann keine H-Substanz mehr, womit erst die Bildung eines natürlichen Antikörpers Anti-H ermöglicht wird. In diesem Zusammenhange sehen wir nun die weitere und wesentlichere Möglichkeit der Anwendung der Speichelimmunisierung zum Zwecke der Gewinnung echter Anti-0-Immunseren. Nach der derzeitig gültigen Theorie sind ja Individuen des Genotyps 0c0c möglich: deren Blutkörperchen dürften nicht mit Anti-H-Seren reagieren, ebensowenig wie die vom Typus A_c0c oder B_c0c. Durch umfangreiche Reihenuntersuchungen müßten solche Typen aufgefunden werden, und mit deren Speichel könnte dann durch Immunisierungsversuche die Darstellung echter Anti-0-Immunseren gelingen. Dabei soll noch eine weitere theoretische Möglichkeit Erwähnung finden: es wäre denkbar, daß Menschen mit 2 mutierten Genen 0, auch wenn sie noch nicht im eigentlichen Sinne dem Typus 0c zuzurechnen sind, echte 0-Substanz in solcher Menge ausscheiden, daß sie die Bildung von Anti-0 anzuregen vermögen — allein oder nach Art der „komplexen“ Antiseren *neben* der Bildung von Anti-H. Auch zur Untersuchung dieser Frage erscheint uns das Verfahren der Speichelimmunisierung am besten geeignet, wenn man Personen der Gruppe 0 aussucht, die deutlich schwächer mit Anti-H reagieren als die Mehrzahl. Solche Wege aufzuzeigen, war im wesentlichen der Zweck unserer Mitteilung.

Daß Anti-H-Seren zum Nachweis eines recessiven 0 beim Menschen der Genotypen A₀ oder B₀ — zumindest allein für sich — nicht geeignet sein können, braucht nicht unterstrichen zu werden. Die Lösung dieser Frage erscheint an sich nach den derzeitigen Anschauungen wieder mehr in die Ferne gerückt. Man kann nämlich augenblicklich von einem recessiven 0 neben A oder B *schlechthin* gar nicht mehr sprechen. Denn dieses verdeckte 0 kann ja hinsichtlich der Substanzen H und 0 quantitativ ganz verschieden und sogar extrem zusammengesetzt sein: wenn also die Lösung des erwähnten Problems überhaupt möglich ist, dann nach dem derzeitigen Stande der Erkenntnisse nur unter *gleichzeitiger Verwendung von Anti-0- und Anti-H-Seren*, möglicherweise unter Einbeziehung der quantitativen chemischen Analyse.

Zusammenfassung.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem 0-Ausscheiderspeichel gelingt die Gewinnung hochwertiger, gegen menschliche Blutkörperchen der Gruppe 0 wirksamer Antiseren. Seren der

hier beschriebenen Art — bis vor kurzem als Anti-0 schlechthin bezeichnet — müssen nach neueren Ergebnissen MORGANS und einem Vorschlag dieses Autors zufolge vorläufig als Anti-H-Seren bezeichnet werden.

Die beschriebenen Kaninchen-Immun-Anti-H-Seren können wie hochtitrige Anti-M- oder Anti-N-Seren Verwendung finden, sie sind sehr leicht zu absorbieren, die Abgüsse sind außerordentlich stabil und bewahren ihre Spezifität über viele Wochen.

Nach den derzeitigen theoretischen Vorstellungen über „sog.“ und „echte“ Anti-0-Agglutinine und über das Wesen der Gruppensubstanz 0 sind solche Anti-H-Seren *allein* für den Nachweis der Heterozygotie bei Menschen der Blutgruppe A und B nicht geeignet, möglicherweise jedoch im Vergleich mit der Anwendung echter Anti-0-Antikörper. Doch ergeben sich aus der beschriebenen Methode andere Möglichkeiten verschiedener Art, auch auf rein serologischem Wege der Lösung bisher noch ungeklärter Fragen im Zusammenhang mit der Blutkörpercheneigenschaft 0 näherzukommen:

1. Durch die beschriebene Methode sind auf einfachem Wege, ohne die Notwendigkeit vorheriger chemischer Reindarstellung von Substanzen, Anti-H-Seren zu gewinnen, die sich gegenüber den ähnlich wirksamen tierischen, sog. Anti-0-Seren durch die Konstanz ihrer Wirksamkeit neben anderen Vorteilen auszeichnen.

2. Durch Immunisierungsversuche mit Ausscheiderspeichel von Menschen der Gruppe 0 besteht Aussicht das Vorkommen qualitativ verschiedener 0-Gruppensubstanzen durch die Gewinnung von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität zu erbringen.

3. Menschen der Blutgruppe 0, deren Blutkörperchen nicht mit Anti-H-Serum reagieren, müßten, falls sie Ausscheider sind, die reine 0-Substanz in ihrem Speichel ausscheiden. Immunisierungsversuche mit solchem Speichel könnten die Bildung echter Anti-0-Immun-Antikörper anregen.

4. Ausscheiderspeichel von Menschen, deren Blutkörperchen mit Anti-H nur schwach reagieren, könnte unter Umständen zur Bildung komplexer Anti-Seren (Anti-H + Anti-0) Veranlassung geben.

Literatur.

DAHR: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 846. — Klin. Wschr. **1947**, 791. — DAHR u. STÖCKLEIN: Klin. Wschr. **1948**, 540. — HIRSZFELD: J. of Immun. **55**, 141 (1946). — HOLZER: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **28**, 234 (1937). — LEHRS: Z. Immun.forschg **66**, 175 (1930). — MANZ u. BUSE: Z. Immun.forschg **106**, 263 (1949). — MORGAN and WADDELL: Brit. J. exper. Path. **26**, 387 (1945). — MORGAN and WATKINS: Brit. J. exper. Path. **29**, 159 (1948). — RASCH: Z. Immun.forschg **106**, 313 (1949). — SCHIFF: Über die gruppenspezifische Substanz des menschlichen Körpers. Jena: Gustav Fischer 1931.

Prof. Dr. RUDOLF MANZ, (20b) Göttingen,
Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität.