

13. Heckner, F.: Der myeloische Monocyt bei konventioneller morphologischer Diagnostik. In: Der Monocyt, hrsg. von H. Brücher, S. 27—31. München: J. F. Lehmanns 1969.
14. Hughes, W. L., Bond, V. P., Brecher, G., Cronkite, E. P., Painter, R. B., Quastler, H., Sherman, F. G.: Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with triated thymidine. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 476—483 (1958).
15. Klein, H. O., Lennartz, K. J., Eder, M., Gross, R.: Autoradiographische und hämatologische Untersuchung zur Zellkinetik der Erythroblasten im Kurzzeitversuch nach doppelseitiger Nephrektomie und Ureterligatur bei Mäusen. Blut 19, 449—456 (1969).
16. Lajtha, L. G.: Isotope uptake of individual cells. Technique for stained autoradiographs and microphotographs for grain counting. Exp. Cell Res. 3, 696—698 (1952).
17. — Oliver, R.: Studies of the kinetics of erythropoiesis: a model of erythron. In: Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis, ed. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor, p. 289—324. London: J. & A. Churchill 1960.
18. Leblond, C. P., Kopriva, B., Messier, B.: Radioautography as a histochemical tool. First Intern. Congr. Histochem. Cytochem., p. 1—31. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon-Press 1963.
19. Leder, L. D.: Über die selektive fermentcytochemische Darstellung von neutrophilen myeloischen Zellen und Gewebsmastzellen im Paraffinschnitt. Klin. Wschr. 42, 553 (1964).
20. — Der Blutmonocyt. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
21. Lennert, K.: Bildung und Differenzierung der Blutzellen, insbesondere der Lymphocyten. Verh. dtsh. Ges. Path. 50, 163—215 (1966).
22. Löffler, H.: Cytochemischer Nachweis von unspezifischer Esterase in Ausstrichen. Beiträge zur Technik und Ergebnisse im Blutausschnitt des Menschen. Klin. Wschr. 39, 1220—1227 (1961).
23. Moloney, W. C., McPherson, K., Fliegelman, L.: Esterase activity in leucocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloracetate substrate. J. Histochem. Cytochem. 8, 200—207 (1960).
24. Müller, D.: Die Beziehungen der Monocyten zur Granulopoese. Untersuchungen über die Anfärbarkeit der Kern-DNS nach zeitlich abgestufter Salzsäurehydrolyse. Klin. Wschr. 48, 1064—1066 (1970).
25. Pearse, A. G. E.: Histochemistry. London: J. & A. Churchill Ltd. 1960.
26. Popp, R. A., Gude, W. D., Popp, D. M.: Peroxidase staining combined with autoradiography for study eosinophilic granules. Stain. Technol. 37, 243—247 (1962).
27. Schmalzl, F., Braunsteiner, H.: Zur Cytochemie der Monocytenleukämie. Klin. Wschr. 46, 1185—1195 (1968).
28. Schultze, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. II/5, S. 466—670. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
29. Stobbe, H.: Hämatologischer Atlas. Berlin: Akademie-Verlag 1970.
30. Taugner, R., Wagenmann, U., Hole, H., Grigoleit, G., Droll, R., Gillissen, J.: Serienmäßige Herstellung von Gefrierschnitt-Autoradiogrammen mit optimalem Kontakt. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 234, 336—342 (1958).
31. Volkman, A., Gowans, J. L.: The production of macrophages in the rat. Brit. J. exp. Path. 46, 50—61 (1965).
32. Whitelaw, D. M.: The intravascular lifespan of monocytes. Blood 28, 455—464 (1966).

Dr. M. Oehmichen
 Institut für Hirnforschung
 BRD-7400 Tübingen, Calwerstr. 3
 Deutschland

Die Anwendung der Neutronenaktivierungsanalyse zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung bei Morbus Wilson

G. HENKE, H. MÖLLMANN und W. ALTHOFF

Anatomisches Institut
 (II. Ordinariat: Prof. Dr. H. Knoche)
 Institut für Pharmazeutische Chemie
 (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. K. E. Schulte)
 Kinderklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität
 Münster (Direktor: Prof. Dr. K. D. Bachmann)

Eingegangen am 4. November 1970

On the Use of Neutron Activation Analysis in Diagnosis and Subsequent Control of Morbus Wilson.

Summary. The copper contents of liver punctates from a patient with Morbus Wilson were determined by neutron activation analysis before and after treatment with Penicillamine-D for several years. The results were compared with clinical findings and show, that the determination of copper in liver permits more precise statements regarding both diagnosis and therapeutic success of Morbus Wilson.

Zusammenfassung. Mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse wurde der Kupfergehalt im Leberpunktionsmaterial eines Patienten mit Morbus Wilson vor Behandlungsbeginn und nach mehrjähriger Penicillamin D-Medikation bestimmt. Die Ergebnisse werden mit den klinischen Befunden verglichen und zeigen, daß die Kupferbestimmung in der Leber genauere Aussagen zur Diagnose des Morbus Wilson und über den Therapieerfolg ermöglicht.

Die quantitative Erfassung von Kupfer in geringen Mengen biologischen Materials stellt wegen der niedrigen Gewebskonzentrationen dieses Metalls erhebliche Ansprüche an die analytischen Verfahren. Als besonders geeignete Bestimmungsmethode erwies sich die Neutronen-Aktivierungsanalyse im Falle eines Morbus Wilson zur Diagnostik sowie zur Verlaufsbeobachtung der Kupfer eliminierenden Therapie [8].

Der Wilsonschen Krankheit liegt eine genetisch bedingte autosomal recessiv vererbte Kupferstoffwechsellstörung zugrunde. Klinische Leitsymptome stellen neben den neurologischen Ausfallserscheinungen die Hyperkuperurie und die Hypokuperämie, die mit einer stark herabgesetzten Oxydaseaktivität des Serums einhergeht, dar. Diese chronische Kupferintoxikation führt zu einer vermehrten Speicherung dieses Metalls in verschiedenen Körpergeweben, insbesondere in Leber, Niere, Zentralnervensystem und Augen.

Der Kupfergehalt der Leber wurde in vorliegendem Fall mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse bei einem Patienten mit Morbus Wilson vor Behandlungsbeginn und nach fast 3jähriger Penicillamin D-Medikation bestimmt.

Über die Methode, Untersuchungsergebnisse und klinischen Befunde soll im folgenden berichtet werden.

Kasuistik

Krankenblatt-Nummern: 1236/67, 1344/68, 623/69 und 665/70.

K.-W.H., geb. 3. 11. 57, 2. von 6 Kindern; Familienanamnese ohne Besonderheiten; Eigenanamnese: Seit dem Säuglingsalter zunehmende Strabismus convergenz monolateralis links. Vor der Einschulung Feststellung hochgradiger Sehschwäche insbesondere des linken Auges infolge Opticusatrophie; im 8. Lebensjahr rezidivierende Leibschermerzen nach Genuß fetter Speisen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und häufiges Erbrechen.

Erste Krankenhausaufnahme wegen primärer Enuresis nocturna im Juli 1967; 3 Wochen später Überweisung in die Universitäts-Kinderklinik Münster zur Laparoskopie wegen Hepatomegalie unklarer Genese. Zur Diagnose Morbus Wilson führende Befunde: 1. verminderter Serum-Kupfergehalt (57 µg-%, Normalwerte: 85—145 µg-%); 2. verminderter Serum-Caeruloplasmingehalt: 6,9 mg-% (Normalwerte der 2-Punkt-Methode nach Richterich: 44 mg-% ± 14); 3. erhöhte Kupferausscheidung im Harn: 240 µg/die (Normalwerte für Kinder: 6—17 µg/die); 4. Nachweis eines Kayser-Fleischer-schen Cornealrings. Ende Juli 1967 Einleitung der Behand-

lung mit D-Penicillamin (Metalkaptase, 1200 mg/die), kupferarmer Diät (1–1,5 mg/die) und Kaliumsulfid (4mal 20 g/die)¹.

Leberbiopsie (Histologie)²

Juli 1967: Stark verbreiterte periportale Felder mit ziemlich dichter lymphocytärer und histiocytärer Infiltration und deutlicher Faservermehrung; in breiten periportalen Feldern Gallengangwucherung; herdförmig großtropfige Leberzellverfettung; Lochkernbildung; vereinzelt Leberzellnekrosen.

Diagnose: Fortgeschrittene progrediente Lebercirrhose.

April 1970: Verbreiterte und faservermehrte periportale Felder umschließen rundliche Leberzellkomplexe; in den periportalen Feldern stellenweise eine insgesamt geringe Infiltration aus Lymphocytan und einigen Histiocytan. Die Leberzellen enthalten reichlich Glykogen, sie sind nicht verfettet; Leberzellnekrosen sind nicht zu erkennen.

Diagnose: Gleichmäßige kleinknotige Lebercirrhose bei Morbus Wilson.

Methodik und Ergebnisse

Die Kupferbestimmung durch Neutronenaktivierungsanalyse beruht darauf, daß durch Bestrahlung der Proben im Kernreaktor mit thermischen Neutronen das Cu-Isotop Cu⁶³ in das Radioisotop Cu⁶⁴ umgewandelt wird, das unter Aussendung einer charakteristischen γ -Strahlung (0,51 und 1,34 MeV) mit einer Halbwertszeit von 12,8 Std zerfällt. Das aus dem Cu-Isotop Cu⁶⁵ gebildete Cu⁶⁶ (1,04 MeV) spielt wegen seiner kurzen Halbwertszeit (5,1 m) für die Bestimmung keine Rolle. Nach der chemischen Isolierung des Kupfers bzw. der Abtrennung aller anderen Bestrahlungsprodukte aus der Probe kann mit Hilfe eines γ -Spektrometers die 0,51 MeV-Strahlung gemessen und durch Vergleich mit der Messung eines unter gleichen Bedingungen bestrahlten und chemisch behandelten Cu-Standards die in der Probe enthaltene Kupfermenge bestimmt werden.

Die beiden durch Punktion gewonnenen Leberzylinder (3,4 mg und 4,3 mg Frischgewicht) wurden zusammen mit je einem Cu-Standard (2,4 μ g Cu in Quarzcapillaren) in zwei Quarzampullen (Länge 60 mm, \varnothing 14 mm) eingeschmolzen und im Kernreaktor 24 Std mit einem thermischen Neutronenfluß von $5 \cdot 10^{13}$ n/cm² sec bestrahlt. 2 Tage nach Ende der Bestrahlung wurden die Präparate und die Cu-Standards mit HNO₃ konz. aus den Quarzampullen bzw. Capillaren herausgelöst und in Quarz-Kjeldahlkolben überführt. Nach Zugabe von 1 ml einer Rückhalteträgerlösung³ erfolgte die nasse Veraschung mittels NHO₃ konz. und H₂O₂ (30 %).

Der Veraschungsrückstand wurde in 1 ml HCl (36 %) gelöst und mit insgesamt 4 ml Wasser in einen Scheidetrichter (50 ml, nach Squibb) überführt. Nach Zusatz von 5 ml äthanolischer 0,1%iger Neocuproin®-Lösung wurde die Lösung zweimal mit je 10 ml CHCl₃ extrahiert. Die Chloroformphasen wurden in Meßgefäßen (20 ml) vereinigt, über dem Wasserbad auf 5 ml eingengt und im Vielkanal- γ -Spektrometer⁴ 10 min im Bereich von 0–2 MeV gemessen (0,51 MeV-Peak des Cu⁶⁴, $t_{1/2}$ = 12,8 Std).

Die aus der Messung der Proben und Standards resultierenden Peakhöhen wurden auf das Ende der Bestrahlungszeit, t_0 , umgerechnet. Der Cu-Gehalt der beiden Leberpunktate ergab sich aus der Beziehung

$$\mu\text{g Cu/mg Punktate} = \frac{\mu\text{g Cu (Standard)} \cdot \text{Peakhöhe (Probe, } t_0)}{\text{Peakhöhe (Standard, } t_0) \cdot \text{mg Punktate}}$$

Morbus-Wilson Präparat I (Juli 1967) 0,234 μ g Cu/mg Leber; Morbus-Wilson Präparat II (April 1970) 0,028 μ g Cu/mg Leber; Kontrollpräparat (April 1970) 0,0083 μ g Cu/mg Leber. Diese Werte sind auf Frischgewicht bezogen.

1 Die wichtigsten klinischen und biochemischen Daten vor und während der 3jährigen Behandlungszeit sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

2 Die pathologisch-histologischen Diagnosen verdanken wir Herrn Prof. Dr. med. Giese (Pathologisches Institut der Universität Münster).

3 1 ml enthält je 1 mg folgender Ionen in 3 n HCl-Lösung: Ag⁺, Au³⁺, Br⁻, Cd²⁺, Co²⁺, Cr²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, La³⁺, Sb³⁺, Sr²⁺, Zn²⁺, Sn⁴⁺.

4 NaJ-Detektor 3'' \times 3'', Typ 12S12, der Firma Harshaw van der Hoorn, Utrecht. Spektrometer: Typ ND 161 F 12, ND 181 M und ND 181 R der Firma Nuclear Data, Palatine (Illinois).

Diskussion

Eine effektive Dekorporation von Kupfer bei Morbus Wilson ist seit der Einführung von Komplexbildnern in die Therapie durch Cumings [2], Denny-Brown und Porter [3] und Walshe [11] möglich [12, 10, 6, 1].

Durch diese Behandlung kann der normale Kupferspiegel im Urin je nach Dosierung auf ein Mehrfaches erhöht werden. Bei Dauermedikation konnten sogar charakteristische Zeichen eines Kupfermangelsyndroms (Hypogeusia) ausgelöst werden [5]. Die Kupfergehaltsbestimmung im Lebergewebe stellt daher für die Diagnostik des Morbus Wilson sowie insbesondere für die Kontrolle des Behandlungserfolges einen wertvollen Parameter dar.

Wie die oben angeführten Ergebnisse zeigen, sind im vorliegenden Falle die Kupferkonzentrationen der Leber nach einer 3jährigen, einschlägigen Behandlung von 0,234 μ g Cu/mg auf 0,028 μ g Cu/mg zurückgegangen; der zuletzt gefundene Wert liegt noch etwa 3,3mal höher als im Kontrollpräparat. Der gefundene Normalwert (0,0083 μ g Cu/mg) steht in Übereinstimmung mit den von Tipton [9] angegebenen Cu-Konzentrationen von gesunden Lebern; 80% der Werte liegen zwischen 320 und 1300 μ g Cu/mg Asche, entsprechend 0,0042 und 0,017 μ g Cu/mg Frischgewicht Leber (Mittelwert: 510 μ g Cu/mg Asche entsprechend 0,0066 μ g Cu/mg Frischgewicht Leber).

Die besondere Eignung der Neutronenaktivierungsanalyse für den Kupfernachweis in biopsisch gewonnenem Punktionsmaterial in diesem Konzentrationsbereich ergibt sich aus der folgenden Tabelle, in der die Nachweisgrenzen (μ g) verschiedener Bestimmungsmethoden für Kupfer aufgeführt sind:

Bei verschiedenen Bestimmungsmethoden ergaben sich folgende Nachweisgrenzen für Cu (μ g): Amperometrische

Tabelle. Zusammenstellung der im Behandlungszeitraum erhobenen klinischen Befunde

	Vor Therapiebeginn (stat.)	Nach 3 Mon. (ambl.)	Nach 1 Jahr (stat.)	Nach 2 J. (stat.)	Nach 3 J. (stat.)
BKS n. W.	14/30	18/40	8/20	8/22	5/16
GOT (mU)	42,5	8	9	10	15
GPT (mU)	19,0	3	3	3	8
alkalische Phosphatase (mMol/E ^a (215,0 mU/ml))	12,9	—	11 AE ^b	7 AE	110 mU/ml
Gesamteiweiß (g-%)	6,19	6,79	6,5	8,6	6,2
γ -Globulin (rel. %)	24,0	22,5	12,6	16,5	11,0
Kupfer-Serum (μ g-%)	57	65	31	55	43
Kupfer-Harn (μ g/die)	240	—	1470	2119	1120
Caeruloplasm (mg-%)	6,9 ^c	—	—	—	8,4 ^d
Kayser-Fleischerscher Corneal-Ring	++	++	++	+	(+)
Ataxie	+	(+)	---	---	---
Dysdiadochokinese	+	(+)	---	---	---
Hepatomegalie (Querfinger unter Rippenbogen)	2–3	1–2	1	---	---

^a Nach Bessey-Lowry: Umrechnungsfaktor 16,6.

^b Nach King-Armstrong: Umrechnungsfaktor 7,1.

^c 2-Punkt-Methode nach Richterich.

^d Partigenimmundiffusionsmethode.

Titration 250 μg (Meinke [7]), Funkenspektroskopie 5 μg (Meinke [7]), Flammenphotometrie 2,5 μg (Meinke [7]), Kolorimetrie 0,75 μg (Meinke [7]), Atomabsorption 0,02 μg (Perkin-Elmer)⁵, Neutronenaktivierungsanalyse 0,00005 μg (Girardi⁶ [4]).

Die während des fast 3jährigen Behandlungszeitraumes erhobenen klinischen Befunde (Tabelle) liefern zwar im allgemeinen für die Verlaufsbeobachtung und Therapieüberwachung wertvolle Hinweise, gestatten jedoch keine exakte Aussage über die insgesamt erfolgte Kupferdekorporation aus den Geweben. So zeigten nach einjähriger Penicillamin-D-Dauermedikation die Leberwerte eine deutliche Tendenz zur Normalisierung. Ebenso waren die neurologischen Symptome sowie die Hepatomegalie vollständig abgeklungen, und nach einem weiteren Jahr auch der zuvor sehr deutlich ausgeprägte Kayser-Fleischersche Corneal-Ring nur noch am Limbus conjunctivae streifenförmig sichtbar. Bei täglicher Applikation von 1200 mg Penicillamin-D/die wurde bei stationären Kontrollen eine Harnkupferausscheidung von durchschnittlich 1000–2000 μg Cu/die ermittelt, während jedoch bei zwischenzeitlich ambulant durchgeführten Kontrollen die Kupferausscheidung im Urin unter 300 μg Cu/die lag. Diese großen Differenzen in der Kupferausscheidung im Harn, die verschiedene Ursachen haben können (u. a. unregelmäßige häusliche Medikamenteneinnahme oder weitgehende Dekorporation der pathologischen Kupferspeicher), erlauben somit keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Therapieerfolg.

Zur sicheren Beurteilung des Behandlungsergebnisses und auch der gezielten Therapieeinstellung ist daher letztlich die direkte Bestimmung des Kupfergehaltes aus dem Körpergewebe anzustreben. Diese diagnostische Maßnahme läßt sich in der Regel besonders günstig mit der Gewebensentnahme für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen kombinieren, da nur ein geringer Teil des biotisch gewonnenen Gewebeszylinders für die aktivierungsanalytische Kupfergehaltsbestimmung benötigt wird, während der Rest histologisch ausgewertet werden kann.

Literatur

1. Buechl, H., Klumas, M.: Pathologie des Kupferstoffwechsels. *Ther. d. Gegenw.* **108**, 707 (1969).
2. Cumings, J. N.: The effect of B.A.L. in hepatolenticular degeneration. *Brain* **74**, 10 (1951).
3. Denny-Brown, D., Porter, H.: The effect of B.A.L. (2;3 dimercaptopropanol) on hepato centicular degeneration (Wilson's disease). *New. Engl. J. Med.* **245**, 917 (1951).
4. Girardi, F., Guzzi, G., Pauly, I.: Data handbook for sensitivity calculations in neutron activation analysis. *Euratom-Report EUR. 1898e* (1965).
5. Keiser, H. R., Henkin, R. J., Barter, F. C., Sjoerdsma, A.: Loss of taste during therapy with penicillamine. *J. Amer. med. Ass.* **203**, 381 (1968).
6. Lange, J.: Die Langzeitbehandlung des Morbus Wilson mit D-Penicillamin. *Dtsch. med. Wschr.* **92**, 1657 (1967).
7. Meinke, W. W.: Trace-element sensitivity: Comparison of activation analysis with other methods. *Science* **121**, 177 (1955).
8. Möllmann, H., Henke, G., Alfes, H.: Aktivierungsanalytische Cu-Bestimmung im Leberpunktat bei Morbus Wilson. *Z. klin. Chem.* **7**, 647 (1969).
9. Tipton, I. H., Cook, M. J.: Trace elements in human tissue, part II. Adult subjects from the United States. *Hlth Phys.* **9**, 103 (1963).
10. Wallauer, P., Harbauer, H.: Zum Verlauf und zur Therapie eines jugendlichen Morbus Wilson. *Dtsch. med. Wschr.* **92**, 1187 (1967).
11. Walshe, J. M.: Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Amer. J. Med.* **21**, 487 (1956).
12. Werner, T., Weimann, H. M.: Zehn Jahre Penicillamin. *Med. Klin.* **61**, 1827 (1966).

⁵ Angabe der Fa. Perkin-Elmer für Atomabsorptionsspektrometer Modell 303.

⁶ Gilt für folgende Bedingungen: Neutronenfluß $2 \cdot 10^{13}$ n/cm² s, Bestrahlungszeit 10 Std, Abklingzeit 24 Std.

Dr. G. Henke
Dr. H. Möllmann
Dr. W. Althoff
BRD-4400 Münster, Vorländer Weg 57
Deutschland

Isolation of the Lymphoagglutinating Fractions of Phytohaemagglutinin (PHA) from *Phaseolus vulgaris* and Characterization of Their Biological Properties*

K. SCHUMACHER, H. OERKERMANN, G. UHLENBRUCK,
G. ALZER, W. D. HIRSCHMANN, and R. GROSS
Medizinische Universitätsklinik Köln-Lindenburg

Received August 4, 1970

Summary. Phytohaemagglutinin (PHA-P) was separated by ion exchange chromatography, absorption procedures, and isoelectric focusing. Two active fractions were obtained. One of them was homogenous by physico-chemical characterization. Both fractions showed lymphoagglutinating, mitogenic, and cytoaggression-inducing activity. In spite of varying isoelectric points, the biological properties were qualitatively identical. It was not possible to associate single properties to different fractions. In our preparation, the biological activity was related to protein and to the protein content of the fractions. From other experimental data, we think that the binding sites of the active molecule are represented by carbohydrates.

Zusammenfassung. PHA-P wurde durch Ionenaustauschchromatographie, Absorption der Fraktionen an Schweineerythrocyten und isoelektrische Focussierung fraktioniert. Es fanden sich 2 aktive Fraktionen. Beide Fraktionen hatten lymphagglutinierende, mitogene und Cytoaggression induzierende Aktivität. Trotz verschiedener isoelektrischer Punkte waren die biologischen Eigenschaften der beiden Fraktionen qualitativ gleich. Es war nicht möglich, einzelne der an Lymphocyten auslösbaren Reaktionen verschiedenen Fraktionen zuzuordnen. In unserer Präparation stand die biologische Aktivität quantitativ in Relation zum Proteingehalt der Fraktionen. Auch war die biologische Wirkung an Protein geknüpft. Allerdings fehlen bisher Versuche, die biologische Aktivität vom Protein zu trennen. Wir sind aufgrund anderer Versuche davon überzeugt, daß die Bindungsstellen des aktiven Moleküls mehr durch Kohlenhydrate als durch Proteine repräsentiert werden.

The stimulation of lymphocytes by phytohaemagglutinin (PHA) is a well proved model for studying the cell-bound immunoreactions caused by lymphocytes [1]. In spite of numerous investigations the different steps of the lymphocyte reaction is not yet understood in detail. In our study we asked the question whether the different reactions of lymphocytes after stimulation with PHA are caused by only one or more stimulating substances?

To answer this question it was necessary to separate the PHA and to isolate the active fractions, although until now a lot of attempts were made, with more or less effect, to obtain pure fractions of PHA [2–12].

Methods

As starting material for the separation the purified PHA (PHA-P, Difco Comp.) was used. The fractionation of PHA-P was carried out in several steps. First PHA-P was separated by cation exchange chromatography on SE-Sephadex C 50 with stepwise elution with buffers of different pH-values, according to the method described by Weber [9, 10]. Those fractions which showed lymphoagglutinating activity, were exhaustively (7 times) absorbed with the double volume of packed porcine red blood cells, until nov erythroagglutinating activity was detectable in the supernatant. The absorption procedure was followed by further separation by isoelectric focusing in an ampholine column, using a density gradient of sucrose for stabilizing the solution [13–18]. The pH range was 3–6, the concentration of ampholine 1–2%, the anode was at the bottom of the column. The separation was done with constant voltage of about 380 V within 36 hours. After elution of the column and determination of protein content and pH-values, all fractions were tested for erythroagglutinating, lymphoagglutinating, mitogenic, and cytoaggression inducing activity.

Lymphoagglutination was carried out with human lymphocytes, purified from the peripheral blood according to the method of Rabinowitz [19]. Testing of the mitogenic activity

* Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft.