

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin
[Direktor: Prof. Dr. R. Rössle].)

Experimentelle und morphologische Untersuchungen über Impfgeschwülste.

I. Über die sog. „Virulenz“ der Geschwulstzellen¹.

Von

Dr. Alexander Symeonidis (Athen).

Die Transplantationsgeschwulst und das dabei geimpfte Tier stellen ein künstliches, experimentell erzeugtes System dar, welches in der Natur nicht vorkommt. Das Zustandekommen des *Systems „Geschwulstzellen-Wirt“* ist prinzipiell eine Transplantationsfrage. Darüber hinaus aber wird es von zwei Hauptfaktoren bedingt: Einerseits von den parasitären Eigenschaften der verimpften Geschwulstzellen, andererseits vom Verhalten des Wirtsorganismus gegenüber dem Eindringling. Das Schicksal des Systems wird von den Eigenschaften beider Bezugskomponenten bestimmt.

Wenn die Gesetze, die für die Übertragung von Körperzellen überhaupt gültig sind, auch bei den verwendeten Impfgeschwülsten erfüllt werden, dann gilt der Transplantationsfaktor als etwas gegebenes. Untrennbar sind die zwei übrigen Hauptfaktoren, die das System „Geschwulstzellen-Wirt“ bestimmen, nämlich die „Virulenz“ der Geschwulstzellen und die Resistenz oder Empfänglichkeit des Wirtsorganismus, zwischen denen eine Relativität, eine Wechselbeziehung besteht. Bei gut ausgewähltem Material und günstigen Umständen kann man aber jede Komponente getrennt für sich, freilich unter ständiger Berücksichtigung der anderen Komponente erproben.

Gelegentlich anderer Versuche und durch zufällig sehr günstige Verhältnisse ergab sich die Möglichkeit, die Frage der „Virulenz“ der Geschwulstzellen der Impftumoren zu prüfen.

Der Begriff „Geschwulstvirulenz“ taucht um die Wende des Jahrhunderts zusammen mit den ersten Versuchen der Tumorentransplantationen auf. *Ehrlich* hat den Terminus „Virulenz“ aus der Bakteriologie als ein Analogon des Begriffes „Bakterienvirulenz“ in die Geschwulstlehre überführt, und zwar auf die Impftumoren angewandt. Er bezeichnete die Erscheinung des auffallend besseren Angangs und rascheren Wachstums bei den fortgesetzten Transplantationen eines einmal angegangenen Spontantumors als „Virulenzsteigerung“ und verglich diese

¹ Die Arbeit wurde mit Mitteln des Deutschen Zentralausschusses für die Krebsbekämpfung ausgeführt.

Erscheinung mit der Steigerung der Bakterienvirulenz durch Tierpassagen.

Bekanntlich bleibt die Transplantation von Spontantumoren zuerst größtenteils erfolglos, oder es wird ein Erfolg nur nach der Übertragung des Tumors auf eine sehr große Anzahl von Tieren erreicht. Z. B. haben *Bashford*, *Murray* und *Haaland* einen Plattenepithelkrebs der Maus auf über 200 Mäuse transplantieren müssen, um einen einzigen Angang auf einer Maus zu erzielen. Dagegen erzielten bei anderen Spontantumoren die genannten englischen Forscher eine Impfausbeute bis zur 30 %. *Ehrlich* hat sogar bei seinem berühmten *Chondrom* der Maus gleich bei der ersten Tierpassageserie eine Ausbeute von 90 % erzielt. Meistens werden als Angangs-ziffern von Spontantumorentransplantationen Durchschnittszahlen angegeben, die irreführend sein können, weil sie den Eindruck erwecken, daß diese Durchschnitts-zahlen für jeden Spontan- oder Experimentaltumor gelten. *Bashford* und seine Mitarbeiter haben bei der Verimpfung von 84 Mäusespontantumoren auf normale Mäuse einen Angang auf nur 518 Tiere beobachtet, was einem durchschnittlichen Hundertsatz von 11 % entsprach. *Ehrlich* hat 94 Spontantumoren auf 1504 Mäuse überpflanzt mit einem Erfolg von nur 41 Mäusen, also 2,8 %. In Wirklichkeit aber beträgt der erzielte Erfolg auf die 41 Mäuse nur 14 Spontantumoren, die sich als transplantabel erwiesen. Die übrigen 80 Tumoren waren unübertragbar. Ich erwähne diese Tatsache, weil sie eine besondere Bedeutung für die in dieser Arbeit behandelte Frage hat.

Ehrlich bezeichnet die Tumvorvirulenz als einen Begriff, der zwei nicht immer voneinander abhängige Qualitäten umfaßt. Erstens die *Übertragbarkeit*, gemessen an der Impfausbeute, und zweitens die *Proliferationsenergie* der Geschwulstzellen, gemessen an der Wachstumsschnelligkeit. Diese Bestimmung des Virulenzbegriffes der Impfgeschwülste gilt heute noch. Meistens aber wird nur die eine Komponente gleich der „Virulenz“ gestellt und am häufigsten die Übertragbarkeit. *Caspari*, welcher einer der wenigen ist, die an der *Ehrlichschen* Definition festhalten, benützt noch meistens die Bezeichnung „Virulenz“ als Synonym der Übertragbarkeit. So bezeichnet er das *Ehrlichsche Chondrom* als „hochvirulent“, weil es eine hundert-prozentige Übertragbarkeit aufweist, dabei aber eine verhältnismäßig geringe Proliferationsenergie. Ebenso meint *Caspari*, daß die immunisierende Wirkung eines Tumors nur im Zusammenhang mit seiner Wuchsenergie, aber nicht mit seiner „Virulenz“, wie *Uhlenhuth* und *Seiffert* behaupten, steht. Also auch in diesem Falle erkennt *Caspari* nur die Übertragbarkeit als „Virulenz“ an. Nach *Teutschländer* ist Virulenz gleich „Transplantabilität“. Andere dagegen, wie *Lewin*, bezeichnen als „Virulenz“ die Wachstumsschnelligkeit eines Tumors. Besonders verwirrend wirken Gleichstellungen des Begriffes „Virulenz“ mit weiteren allgemeinen und unbestimmten Bezeichnungen. *Uhlenhuth* und *Seiffert* benutzen abwechselnd im gleichen Sinne die Bezeichnungen „Virulenz“ und „Vitalität“ der Geschwulstzellen. Im allgemeinen werden die „Malignität“ und die „Virulenz“ als gleiche Begriffe angesehen. Darauf werde ich aber später ausführlich zurückkommen.

Im folgenden wird der Begriff „Virulenz“ im Sinne *Ehrlichs* gebraucht. Was nun die zweite Bezugskomponente im System „Geschwulstzellen-Wirt“, nämlich den Wirtsorganismus in der Frage der Geschwulstvirulenz anbetrifft, so steht — auch hier wie bei den Infektionskrankheiten — die „Virulenz“ in einem direkten Bezugsverhältnis zu der Disposition oder Resistenz des Wirtes. Eine der ersten Feststellungen am Anfang der Erforschung der Transplantationstumoren war die Beobachtung, daß die Impftumoren auf Versuchstieren eines Landes auf solchen eines

anderen Landes schlecht oder gar nicht angingen (*Bashford* und *Murray*, *Michaelis*, v. *Giercke* u. a.). Dies wurde auf eine verschiedene, rassisches bedingte Disposition zurückgeführt. Die Versuche von *Strong* und *Little*, *Bittner*, *Selbie* u. a. mit rein gezüchteten Versuchstierstämmen sprechen für eine Erbanlage für Geschwulstempfänglichkeit. *Roffo* stellte fest, daß die Spontantumoren eines Rattenstammes bei der Verimpfung auf Tiere desselben Stammes mit einer großen Prozentualität angingen, während bei einem fremden Stamm die Impfausbeute sehr gering war.

Ebenso hat *Konsuloff* beobachtet, daß Tierstämme, die eine Disposition zur spontanen Geschwulstbildung aufweisen, auch empfänglich für Transplantations-tumoren sind. Nach *Caspari* beruht die Empfänglichkeit mindestens zum Teil auf einer hereditären Disposition. Er meint, daß, „wenn wir überhaupt zu Tumoren gelangen, die auf den gewöhnlichen Laboratoriumsmäusen zu 80—100% angehen, so liegt dies im wesentlichen an einer familiären Steigerung der Anpassung, da die Mäuse ein und derselben Zucht immer mehr oder weniger blutsverwandt sind“. Andererseits besagt die Erfahrung, die schon *Ehrlich* seinerzeit gemacht hat, daß bei hochvirulenten Impftumoren diese Empfänglichkeitsunterschiede in den Hintergrund rücken. Dies lehrt auch die Feststellung *Albert Fischers*, daß ein jahrelang von ihm *in vitro* gezüchtetes *Ehrlich-Carcinom* seine 100%ige Angangsfähigkeit nicht verloren hat, und ging mit derselben Prozentualität nicht nur auf Mäuse seines Laboratoriums, sondern auch auf Versuchstiere in Amerika, Rußland, Schweden, Dänemark, England und Italien, wo die Krebsgewebekulturen weiter gezüchtet wurden, an.

Uns interessiert hier insofern diese Frage, als bei der Virulenzbestimmung von Impfgeschwülsten eine Labilität der Versuchstiere in Hinsicht ihrer Disposition ein großer Störungsfaktor sein würde.

Wir verfügen über keinen eigenen Mäusestamm und infolgedessen auch über keinen reinen Tierstamm, auf dessen konstante Disposition wir rechnen können. In der Praxis aber hat sich dieser Mangel als belanglos bewiesen. Unsere beiden Tumorstämme gehen bei gesunden Mäusen stets 100%ig an und zeigen ein ziemlich konstantes Wachstum, abgesehen von den üblichen periodischen und jahreszeitlich bedingten Wachstumsschwankungen. Schwankungen sowohl in Hinsicht des Anfangs als auch des Wachstums habe ich nur bei nicht gesunden Tieren, die man mit einer gewissen Erfahrung schon „klinisch“ erkennen kann, beobachtet. Solche Tiere wurden möglichst aus den Versuchsserien ausgeschlossen. Somit können wir den Faktor „Wirtsdisposition“ in meinen Versuchen für etwas konstant gegebenes halten. Trotzdem wird in den weiteren Ausführungen die Bezugskomponente „Wirt“ stets im Auge behalten. Es sei noch erwähnt, daß neben den üblichen Maßnahmen, um möglichst alle Störungsfaktoren für den Angang und das Wachstum des Impftumors zu beseitigen, nur junge männliche Mäuse benutzt wurden.

Bevor ich weiter zu dem Ergebnis der eigenen Versuche übergehe, werde ich in Kürze die morphologischen und biologischen Eigenschaften unserer beiden Mäusetumoren beschreiben.

I. Stamm „Ca“ (Ehrlich-Carcinom): Angang 100%. Mäßig rasches Wachstum. Der Tumor erreicht in 10 Tagen nach der Transplantation durchschnittlich die Größe einer großen Bohne bis Haselnuß (die Tumoren werden *in vivo* 2mal wöchentlich gemessen). Die Mäuse sterben durchschnittlich 5—6 Wochen nach der Transplantation. Die Geschwülste werden subcutan an der Rückenseite der Mäus verimpft (Stückchenimpfung), der Tumor wächst infiltrierend, und zwar meistens nach der Bauchhöhle zu, wo sich größere Tumorausbuchtungen bilden. Die Organe werden verlagert, das Peritoneum aber wird meistens nicht durchbrochen. Bei einem solchen Fall entwickelt sich eine Bauchfellcarcinose mit Ascites. *Keine Metastasen.*

Makroskopisch besteht der gewachsene Tumor größtenteils und besonders in den zentralen Abschnitten aus gelbweißlichen, undurchsichtigen, käsigen, nekrotischen Massen und an der Peripherie aus glasig, durchscheinend, grauweißlich ausssehendem, lebendem Krebsgewebe.

Mikroskopisch. Die Geschwulst besteht aus runden, zylindrischen oder polygonalen Epithelen mit einem runden feingekörnten Kern und etwas acidophilem hellerem Protoplasma. Die Zellen sind in Zügen, Zapfen und Drüsiformen angeordnet, die zwischendurch von nekrotischen Massen und Zelltrümmern unterbrochen werden. In diesen Massen sind gut erhaltene Zellen nur um die Gefäße zu finden.

II. Stamm „Sa“ (sog. Ehrlich-Sarkom). Angang 100%; rasches Wachstum. Der Tumor erreicht in 10 Tagen durchschnittlich eine Größe von Haselnuß- bis Kirschgröße. Die Mäuse sterben durchschnittlich 3—4 Wochen nach der Transplantation. Die Geschwulst wächst infiltrierend besonders nach der Haut und ulceriert rasch. *Metastasen sind selten zu finden.*

Makroskopisch hat dieser Tumor einen hämorrhagischen Charakter. Er enthält auch ausgedehnte Nekrosen, die mehr bröckelig sind und graurötlich aussehen. Die am Rande gut erhaltene Zone hat, wie bei vorherigem Tumorstamm, eine glasige, durchsichtige Beschaffenheit.

Mikroskopisch besteht die Geschwulst aus überwiegend runden, mäßig großen Zellen mit einem runden, ziemlich chromatinreichen Kern und aus ovalen und langgestreckten Zellen. Das etwas basophile Protoplasma ist nicht so reichlich wie beim vorherigen Tumor. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Tumoren besteht hauptsächlich in der Anordnung der Geschwulstzellen. Hier liegen die Zellen dicht nebeneinander, ohne sich in einer bestimmten Form, wie beim Carcinom, einzurichten. Diese Geschwulst gibt mehr den Eindruck einer flächenhaften Gewebekulturmembrane, die vielleicht auch eine Epithelienkultur sein könnte. Diese Formlosigkeit in der Anordnung der Geschwulstzellen und ihr entdifferenzierter Charakter ist der Grund, warum dieser Tumor als Sarkom angesehen wird. Meines Erachtens handelt es sich hier nicht um ein bösartiges Bindegewebsblastom, sondern um eine entdifferenzierte Geschwulst, wahrscheinlich epithelialen Ursprungs, also im Sinne Fischer-Wasels um ein *Meristom* oder *Cytoblastom*. Dies beweist auch die Tatsache, wie weiter unten berichtet wird, daß diese Geschwulst im Zusammenhang mit einer Virulenzzunahme sich morphologisch weiter entdifferenziert hat.

Zusammenfassend unsere beiden Geschwulststämme „Ca“ (sog. Ehrlich-Carcinom) und „Sa“ (sog. Ehrlich-Sarkom) haben denselben 100%igen Angang und unterscheiden sich in der Wachstumsschnelligkeit der Tumoren. Dieser Virulenzgrad und das Virulenzverhältnis zwischen beiden Geschwülsten blieb während anderthalbjähriger Züchtung *in vivo* in unserem Institut, abgesehen von den üblichen Schwankungen, stets gleich. Plötzlich fing der Tumorstamm „Sa“ an, eine ungewöhnlich starke Virulenzerhöhung in dem unten gekennzeichneten Sinne zu zeigen,

die in den Transplantationsserien vom 8. 10. 36 ihren Höhepunkt erreichte und 10 Transplantationsserien lang, also ungefähr 3 Monate lang, beibehalten wurde. Von da an fing die Virulenz wieder allmählich an zu sinken bis zu ihrem früheren Werte. Diese starke Virulenzsteigerung äußerte sich in einer Beschleunigung des schon raschen Wachstums mit ständiger Metastasierung, und in knapp 3 Wochen Tötung der meisten Tiere. Die Metastasierung erfolgte schon 5—7 Tage nach der Transplantation, und zwar in erster Linie in den regionären Lymphknoten, die bis zum Tode der Maus, also ungefähr binnen 2 Wochen, eine erhebliche Größe (Haselnuß!) erreichten. Meistens waren auch an den Fernlymphknoten Metastasen zu sehen. Seltener waren Organmetastasen, und diese ausschließlich in den Lungen, zu finden.

Auf die Ursache dieser ungewöhnlich starken Virulenzsteigerung werde ich nicht eingehen, da diese Frage weitergeprüft werden muß. Es sei nur erwähnt, daß sie sicher nicht exogen bedingt war. Unser Stamm „Ca“, welcher in gleicher Zeit unter absolut gleichen Bedingungen und unter Benutzung der gleichen Mäuselieferung weiter gezüchtet wurde, zeigte keine Virulenzänderung. Die einzige Ursache, die vielleicht im Zusammenhang mit der Virulenzsteigerung des Stammes „Sa“ stehen könnte, ist die Tatsache, daß diese Virulenzerhöhung besteht, seitdem ein besonders gut wachsender Tumor, der *intracutan* verimpft wurde, für weitere Transplantationen benutzt wurde. Ob tatsächlich die Ursache der Virulenzerhöhung durch die intracutane Verimpfung bedingt war, bin ich noch nicht imstande, mit Sicherheit zu beantworten.

Jedenfalls interessiert uns in dieser Arbeit hauptsächlich die selten im solchen Ausmaße vorkommende Virulenzsteigerung. Diese gab mir die Gelegenheit, unter anderem auch die Virulenzfrage der Impfgeschwülste zu studieren. Meine Beobachtungen, die sich auf einen Zufallsbefund stützten, erlaubten mir wie ich glaube, einen tieferen Blick in das Wesen des Begriffes Virulenz zu werfen, ein feines Maß der Virulenzbestimmung anzuwenden und einigen wichtigen Fragen der Transplantationstumoren näherzukommen.

Wie einführend erwähnt wurde, ist nach *Ehrlich* der Virulenzbegriff der Geschwülste in doppeltem Sinne zu verstehen; erstens als Übertragbarkeit und zweitens als Wachstumsenergie der Geschwülste. Die Übertragbarkeit der Geschwülste wird an der Impfausbeute gemessen. Mit dem Erreichen eines 100%igen Angangs erreicht eine Geschwulst, wie *Ehrlich* sagt, die „natürliche Grenze“, die an die Übertragbarkeitskomponente der Virulenz gesetzt ist. Insofern haben also unsere beiden Tumorstämmen mit ihrem 100%igen Angang die „natürliche Grenze“ der Übertragbarkeit erreicht. In dieser Hinsicht mußte man sie also als gleich virulent bezeichnen. Der Virulenzunterschied, der nach der Virulenzsteigerung des Stammes „Sa“ zwischen den beiden Tumorstämmen bedeutend größer geworden war, äußerte sich in der Differenz

der Proliferationsenergie bzw. der Wachstumsgeschwindigkeit beider Tumoren. Obwohl die Metastasierung gewöhnlich nicht zur Virulenz gerechnet wird, sprachen doch die ausgedehnten Metastasen, die der Stamm „Sa“ in kürzester Zeit ansetzte, dafür, daß die Geschwulstzellen dieses Stammes hochvirulent sein mußten. Man konnte „ahnen“, daß auch hinsichtlich der Übertragbarkeit zwischen den beiden Tumoren ein großer Virulenzunterschied bestehen müßte.

Aber das gegebene Maß, gerade für die Hauptqualität der Geschwulstvirulenz, erwies sich als zu grob. Die Übertragbarkeit, gemessen an der Impfausbeute, bestimmt die Virulenz einer unbestimmten Masse von Geschwulstzellen, aber nicht die Virulenz von einer bestimmten Anzahl oder von einzelnen Geschwulstzellen, die vor allem beim System „Geschwulstzellen-Wirt“ als „einzelige Parasiten“ (*Fischer-Wasels*) sich erweisen. Durch folgende Beobachtung habe ich feststellen können, daß die Virulenz der Geschwulstzellen genau so wie die Virulenz der Mikroben bestimmt werden kann, nämlich durch die *Bestimmung der geringsten Zahl der zum Ansatz und Wachstum eines Impftumors nötigen Zellen*. Somit ergibt sich ein viel empfindlicheres Virulenzmaß, dessen „natürliche Grenze“ fast bis zum endlosen sich ausdehnt.

Zwecks Immunisierung habe ich mit Geschwulstextrakten, die nach dem Verfahren von *Domagk* und *Hackmann* hergestellt wurden, gearbeitet. Dabei wird der Extrakt bei tieferen Temperaturen, zur Schonung des anscheinend sehr temperaturempfindlichen wirksamen Faktors, hergestellt. Zu Vergleichszwecken habe ich einen Teil meiner Versuche mit Extrakt, der folgendermaßen hergestellt wurde, ausgeführt. Diese Methode stellt eine Modifikation der von *Domagk* und *Hackmann* gegebenen dar. Ein Tumorbrei von einem Teil Geschwulstgewebe und 5 Teilen *Ringersche* Lösung wird $\frac{1}{2}$ —1 Stunde geschüttelt, nach Aufbewahrung im Eisschrank von 24 Stunden $\frac{1}{2}$ Stunde mit 3000 Touren zentrifugiert. Ein Teil der überstehenden Flüssigkeit wurde durch den *Seitz-Filter* filtriert. Das gewonnene wasserklare Filtrat ist *zellfrei* (Extrakt I). Der übrige Teil der überstehenden Flüssigkeit wurde bloß durch ein hartes Filtrerpapier filtriert. Das durch diese Weise gewonnene Filtrat war sehr klar, aber nicht *zellfrei* (Extrakt II). Sämtliche Extraktbehandlungen wurden stets unter Kühlung vorgenommen. Auf diese Weise wurden Extrakte von unseren beiden Tumorstämmen hergestellt.

Die Mäuseimpfung blieb mit dem Extrakt I beider Tumorstämmen, auch bei starken Dosen (2 ccm) negativ. Negativ verliefen auch die Verimpfungen mit Extrakt II, was bei der sehr geringen Zellanzahl, die diese Filtrate enthalten, zu erwarten war. Desto größer war die Überraschung, als die zur Zeit der höchsten Virulenz des Stammes „Sa“ vorgenommene Verimpfung mit Extrakt II schon mit kleinen Extraktmengen (0,2 ccm) Tumoren erzeugte. Diese Beobachtung hat mich veranlaßt, auf dies unerwartete Resultat etwas näher einzugehen. Es sei aber vorher er-

wähnt, daß erstens der gleichzeitig hergestellte Extrakt I des Geschwulststammes „*Sa*“ kein positives Tumorergebnis gab und zweitens, daß die Mäuseimpfung mit dem zur gleichen Zeit hergestellten Extrakt II des Tumorstammes „*Ca*“ auch mit großen Extraktmengen (2 ccm) stets negativ blieb.

Ich habe zunächst in der *Thoma-Zeisschen* Kammer die Zellzahl festgestellt, die in einer solchen Extraktflüssigkeit (Extrakt II) enthalten ist. Es fanden sich nach mehrmalig wiederholtem Zählen in 0,1 ccm Extrakt II 2500—3000 Zellen. Weiter habe ich eine Serie von Mäusen mit verschiedenen Flüssigkeitsmengen des Extraktes II verimpft. Folgende Tabelle zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

Schon 3000 Zellen des Tumorstammes „*Sa*“ waren imstande, einen Impftumor zu setzen und eine Zahl von über 10000 Zellen ergaben ein sicheres Resultat mit einem raschen Tumorwachstum. Die Metastasierung war stets ausgedehnt. Diese Ergebnisse werfen ein neues Licht auf die Frage der Impftumorenerzeugung mit ausgezähltem Tumorzellmaterial.

Versuche mit ausgezählten Geschwulstzellen wurden schon früher vorgenommen. Die älteren Arbeiten, wie die von *Koenigsfeld* und *Praussnitz*, *Schwarz* u. a. sind nicht systematisch ausgeführt worden. Schon damals aber hat sich erwiesen, daß für einen sicheren positiven Impferfolg eine große Anzahl von Zellen nötig war. *Koenigsfeld* und *Praussnitz* erzielten schon mit 40000 Zellen eines *Ehrlich-Carcinoms* eine erfolgreiche Verimpfung. Die Angaben von *Schwarz*, daß er mit 9000 Zellen nach 8 Monaten an der Mamma einer weiblichen Maus einen Tumor erzielt hat, ist sehr kritisch zu betrachten. *Fränkel* fand für das Angehen von Hühnersarkomen die Verimpfung von mehreren Millionen Zellen als notwendig. Erst in den letzten Jahren wurden bei Mäusetumoren solche Versuche systematisch vorgenommen. *Costa* arbeitete mit *Ehrlich-Sarkom* und *Carcinom*. Er erzielte durch eine Zellsuspension von 40000 Zellen seines Sarkomstammes eine positive Verimpfung. Allerdings ging der erzeugte Tumor wieder zurück. Für einen Erfolg mit dem *Ehrlich-Carcinom* waren über 100000 Zellen nötig. *Witte* fand, daß bei Verimpfung von weniger als 1 Million Zellen seines *Ehrlich-Carcinomstammes* das Impfresultat völlig unsicher war. Die Grenzen der optimalen Ausbeute lagen um die 12000000 Zellen. Auch *de Gaëtani* und *Blothner*, deren Versuche auf breiterer Basis gelegt wurden, fanden für einen sicheren Tumorangang ungefähr die gleichen Zahlen wie *Witte*. Mit über 1 Million Zellen ihres *Ehrlich-Carcinomstammes* erhielten sie eine sichere Tumorausbeute. Mit der Abnahme der Zellzahlen nahm auch die Ausbeutezahl, sowie das Wachstumstempo der Tumoren ab. Schon bei 200000 Zellen haben sie einen Angang zu bezeichnen, aber mit Rückgang des Tumors. Eine auffallende Ausnahme machte ihre Serie mit 300000 Zellen, bei der beide geimpften Mäuse gut wachsende Tumoren aufwiesen. Diese Erscheinung führen *de Gaëtani* und *Blothner* auf den im Zellbrei reichhaltigen Detritus zurück.

Im allgemeinen kann als festgestellt gelten, daß für den sicheren Angang einer Impfgeschwulst mit einer durchschnittlichen „Virulenz“, wie die des *Ehrlich-Carcinoms*, eine sehr große Menge von Zellen notwendig ist, was scheinbar nicht im Einklang mit den theoretischen Angaben steht, daß einige wenige Zellen, wenn nicht eine einzige Zelle, für den Angang eines Tumors genügen würden. Nur aber, wie gesagt, scheinbar,

Verimpfungen von Tumorextrakt II

Maus Nr.	Ver- impfte Extrakt- mengen ccm	Zell- anzahl	Messung der Tumoren nach der Verimpfung		
			7 Tage	15 Tage	21 Tage
V-E II. 1	0,1	3 000	—	—	—
V-E II. 2	0,1	3 000	—	—	—
V-E II. 3	0,1	3 000	—	Erbse	Große Bohne
V-E II. 4	0,2	6 000	—	—	Erbse
V-E II. 5	0,2	6 000	—	—	Bohne
V-E II. 6	0,2	6 000	—	—	—
V-E II. 7	0,3	9 000	—	—	—
V-E II. 8	0,3	9 000	—	—	—
V-E II. 9	0,3	9 000	Linse	Bohne	Haselnuß
V-E II. 10	0,5	15 000	Kirschkern	Kirsch	† nach 20 Tagen
V-E II. 11	0,5	15 000	—	Erbse	Haselnuß
V-E II. 12	0,5	15 000	Linse	Erbse	Erbse
V-E II. 13	0,7	21 000	Große Erbse	Kl. Kirsch	3,8 × 3,2 cm
V-E II. 14	0,7	21 000	2mal Erbse	Haselnuß und Kirsch	†
V-E II. 15	0,7	21 000	Kirschkern	Haselnuß	4,0 × 3,2 cm
V-E II. 16	1,0	30 000	Große Bohne	Kirsch und Haselnuß	5,2 × 3,8 cm
V-E II. 17	1,0	30 000	Erbse und Bohne	2mal Kirsch	†
V-E II. 18	1,0	30 000	Kleine Haselnuß	4,8 × 2,7 cm	† nach 19 Tagen

weil in der Tatsache diese theoretische Annahme bestätigt wird. Rössle stellte bei seinen Untersuchungen „Über die Anfänge der krebsigen Neubildung bei Impfgeschwülsten“ fest, daß bei der Stückchenimpfung nur einige spärliche Geschwulstzellen an Randteilen des Transplantates überleben, die den Ausgang des späteren Impftumors bilden. Rössle sieht diese Beobachtung als eine Bestätigung der theoretischen Vorstellung über das Geschwulstwachstum an, daß nämlich eine einzige Zelle der Ausgangspunkt der bösartigen Neubildung sein kann. Diese mikroskopische Feststellung Rössles wird experimentell auch durch meine Versuche bestätigt. Witte, sowie de Gaetani und Blothner sind auch der Meinung, daß nur eine kleine Anzahl von der großen Menge, die für den Angang eines Impftumors nötigen Zellen den Ausgang der neuen Geschwulst bilden. Warum ist aber doch für den Angang eines Impftumors eine so große Zellmenge nötig? Nach Rössle „es ist nötig, so viel Material zu verwenden, um sicher zu gehen, daß darin einige wenige Zellen in ganz bestimmt gearteter Situation den Massentod ihrer Schwestern überleben“. Außerdem sei nicht nur der zahlenmäßige Gehalt an überlebensfähigen Zellen ein sehr geringer, sondern in zu kleinen Stücken oder bei Verwendung von Tumorbrei in zu großer Verdünnung sind die Zellen zu stark den individualfremden heterologen Säften des neuen Trägers ausgesetzt. Witte sieht den Vorgang der Geschwulstimpfung in einem

(zellhaltig) des Geschwulststammes „Sa“.

wöchentlich und Tod (†) der Tiere			Bemerkungen
28 Tage	35 Tage		
—	—	—	
Kleine Haselnuß Bohne Haselnuß	3,8 × 2,7 Haselnuß † nach 34 Tagen	† nach 42 Tagen † nach 37 Tagen	Zahlreiche Metastasen Zahlreiche Metastasen Metastasen
—	—	—	
—	—	† nach 42 Tagen	Leberparasiten Metastasen Metastasen Metastasen
† nach 27 Tagen			
3,9 × 3,2 Linse	† nach 32 Tagen Linse	† nach 40 Tagen	„Klinisch“: Kränklich. Sektion: Lebergranulome, Megalosplenie Metastasen Metastasen
† nach 23 Tagen			
† nach 25 Tagen			Metastasen
† nach 22 Tagen			Geringe Metastasierung
			Geringe Metastasierung Metastasen

Kampf zwischen Tumorzellen und Gegenkräften des Tierorganismus, dessen Ausgang im wesentlichen von der Menge der verimpften Tumorzellen abhängt. Die große Masse der verimpften Zellen dient nach Witte dazu, um mit ihrem Untergang die Abwehrleistung des Organismus zu brechen und den wenigen am Leben erhaltenen Zellen die Möglichkeit zu geben, sich durchzusetzen, weiterzuwachsen und einen Tumor zu bilden. Es versteht sich daher von selbst, daß je mehr Zellen verimpft werden, um so größer die Aussicht für ein positives Impfergebnis ist. Eine ähnliche Auffassung vertreten auch de Gaétani und Blothner, die aber ganz auf der „Nekrohormonen“ Theorie Casparis eingestellt ist. Sie meinen, daß die große Masse der Geschwulstzellen durch ihren Zerfall den notwendigen Lokalreiz auf das Wirtsgewebe ausübt, welcher Reiz die Stromareaktion und damit das Haften und das Wachstum der Geschwulstzellen begünstigt. Sie fanden, daß der Zusatz von nekrotischem Material in der Tumorzellsuspension einen Tumorangang mit bedeutend weniger Zellen (100 000 Zellen) ermöglicht. Je nach der Qualität des zugesetzten Materials (Organbrei, Tumordetritus, artfremdes Tumormaterial usw.) glückt auch eher der Angang mit einer kleineren als normal nötigen Zellanzahl. Auf Grund ihrer interessanten Versuche, aber auch des einseitigen Gesichtspunktes, von dem sie ihre Versuche vorgenommen haben, führen de Gaétani und Blothner den Schwerpunkt des Angangs

und des Wachstums einer Impfgeschwulst auf die Qualität und Quantität des *abgestorbenen* oder *absterbenden* verimpften Materials zurück. Sie meinen auch, daß das unerwartete Angehen einer Impfung mit geringer Zellanzahl dem Vorhandensein von besonders stark wirkenden „Nekrohormonen“ zu verdanken ist. Obwohl sie die „Virulenz“ der Geschwulstzellen als eine Bedingung für das Angehen von Tumortransplantationen flüchtig erwähnen, berücksichtigen sie doch in ihren Schlußfolgerungen nur die Qualität des *nekrotischen* Materials und nicht die Qualitäten der *lebenden* Zellen.

Kehren wir aber zu den eigenen Befunden zurück. Unser Tumorstamm „*Sa*“ war zur Zeit seiner höchsten Virulenz imstande, schon mit nur 3000 Zellen langsam wachsende Tumoren und mit über 10000 Zellen rasch wachsende Geschwülste zu setzen. Diese Resultate unterscheiden sich sehr von den bisher bekannten Ergebnissen der Versuche mit ausgezähltem Tumorbrei. Zunächst erhebt sich hier ein wichtiger Einwand, daß nämlich bei meinen Versuchen keine gewöhnliche Zellaufschwemmung verwendet wurde, sondern ein zellhaltiger Extrakt. Man kann mit Recht einwenden, daß bei der Verimpfung von 3000 und mehr Zellen, wobei 0,1 und mehr Tumorextrakt verimpft wurde, eine „Sensibilisierung“ des Versuchstieres hervorgerufen wurde. Jeder, der mit Geschwulstextrakten gearbeitet hat, weiß, daß unter bestimmten Umständen der Extrakt, statt zu immunisieren, sensibilisiert. Wenn die Dosis von 0,1 ccm für eine solche Wirkung zu klein ist, so wäre doch 0,5 ccm oder 1,0 ccm Extrakt vielleicht imstande, die „Empfänglichkeit“ des Tieres zu fördern. Damit könnte man den Impferfolg meiner Beobachtung der mitverimpften Extraktmenge zuschreiben. Die Tatsache, daß bei den gleichen Versuchen mit gleicher Weise gewonnenen Extraktmengen des Tumorstammes „*Ca*“ und bei der Verimpfung von viel höheren Mengen von Extrakt und Zellen dieser Geschwulst das Resultat stets negativ blieb, spricht gegen eine solche Annahme. Es könnte aber weiter der Einwand erhoben werden, daß die Qualität des Extraktes des Stammes „*Sa*“ eine andere ist als die des Stammes „*Ca*“, und zwar in diesem Falle eine stark sensibilisierende. Um diese Frage zu prüfen, ist folgender Versuch angesetzt worden.

Eine Serie von 10 Mäusen wurde mit 0,1—1,0 ccm Extrakt I (zellfrei) des Tumorstammes „*Sa*“ gespritzt und gleichzeitig wurde denselben Mäusen an einer anderen Stelle dieselben Mengen von Extrakt II (zellhaltig) des Tumorstammes „*Ca*“ injiziert. Das Resultat war bei sämtlichen Tieren negativ. Dies besagt, daß wenn auch der Extrakt des Tumorstammes „*Sa*“ eine gewisse lähmende Wirkung auf die Abwehrkräfte des Tierorganismus besitzt, doch die Zellen des Geschwulststammes „*Ca*“ in einer kleinen Anzahl keinen Tumor erzeugen können. Infolgedessen ohne die wichtige Rolle, die wahrscheinlich bei meinen Versuchen der mitgespritzte Extrakt gehabt hat, übersehen zu wollen, ist man hier

berechtigt, den Tumorangang schon mit 3000 Zellen des Stammes „Sa“ hauptsächlich der Qualität bzw. dem Virulenzgrad dieser Zellen zuzuschreiben. Es fragt sich nun, ob der Virulenzgrad dieser Geschwulstzellen der Virulenz sämtlicher Tumorzellen des Stammes „Sa“ entspricht. Man könnte behaupten, daß bei der Behandlung des Tumors zur Extraktgewinnung die weniger widerstandsfähigen Zellen zugrunde gehen und nur diejenigen Zellen am Leben erhalten bleiben, die resistent sind. Es würde also hier eine Art von Auslese der widerstandsfähigeren Zellen vorliegen. Obwohl wieder in diesem Falle der Vergleich zwischen unseren beiden Geschwulststämmen und ihrer gleichartig gewonnenen Extraktflüssigkeit gegen eine solche Annahme spricht, halte ich eine solche „Selektion“ der Geschwulstzellen in vitro für möglich. Ausschlaggebend ist, daß eine kleine Anzahl von Geschwulstzellen, gleichgültig ob sie durch eine „Selektion“ in vitro übrigblieb oder nicht, durch ihre Angangsfähigkeit und Wachstumsenergie, mit einem Wort durch ihre „Virulenz“, Impftumoren setzen kann. Dagegen bleibt die Verimpfung einer viel größeren Zellanzahl eines anderen Impftumors bei gleichen Bedingungen erfolglos, da die Zellen dieses Geschwulststammes nicht vom gleichen Virulenzgrad wie die Zellen des obigen Impftumors sind. *Damit kommt deutlich die Hauptrolle zum Vorschein, die der Virulenzgrad der Zellen einer Impfgeschwulst für Angang und Wachstum eines Impftumors spielt. Die Zellanzahl, die für die erfolgreiche Impfung eines Transplantationstumors nötig ist, steht im direkten Verhältnis zum Durchschnittsvirulenzgrad dieser Geschwulstzellen.* Die Bestimmung des Virulenzgrades bei Benutzung von Tieren einer möglichst bekannten „Disposition“, und zwar nur von lebendem Geschwulstgewebe, wird durch zwei Zahlen ausgedrückt; erstens durch die „absolut minimale“, wirksame Zellzahl, die überhaupt einen Erfolg geben kann, und zweitens durch die „optimal minimale“ Zellanzahl, die ständig einen sicheren Angang und ein konstantes Wachstum des angegangenen Tumors gibt¹.

Nun kommen wir zur Frage des Wesens der „Geschwulstvirulenz“. *Ehrlich* hat versucht, die Virulenzsteigerung bei der fortgesetzten Geschwulstransplantation durch seine *athreptische Theorie* zu erklären. Er sah das Wesen der Virulenz in einer durch künstliche Auslese erzeugten Erhöhung ad maximum der Avidität des Receptorenapparates der Geschwulstzellen gegenüber den Nährstoffen der Versuchstiere. Die englische Schule unter *Bashford* erklärt die Virulenzsteigerung als eine vollkommene *Anpassung* der Geschwulstzellen an die in normalen Tieren vorhandenen Wachstumsbedingungen. Dasselbe versteht *Wogloom* unter der Definition der Virulenz als *Adaption*. Er meint, daß das Angehen

¹ Zur Zeit der durchschnittlichen Virulenz unseres Stammes „Sa“ war seine „absolut minimale“, wirksame Dosis ungefähr 50000 Zellen, die „optimal minimale“ ungefähr 400000 Zellen. Bei dem Stamm „Ca“ war die erste ungefähr 400000 Zellen, die zweite über eine $1\frac{1}{2}$ Millionen Zellen.

oder Nichtangetreten des Tumors auf einen neuen Wirt von dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Adaptionsfähigkeit der Spontangeschwulst abhängt. Hinzu kommt nach *Wogloom* als zweiter Faktor die Wachstumsenergie der Geschwulstzellen.

Die heute allgemein herrschende Auffassung über das Wesen der Virulenzsteigerung der Geschwülste durch Tierpassagen ist die Anpassungstheorie. Nach *Caspari* handelt es sich bei der Virulenzsteigerung der Impfgeschwülste um eine Adaption der Geschwulstzellen an das Milieu, in dem sie sich in einem bestimmten Tier, einer bestimmten Familie, Tierspezies und Tierrasse befinden. Nach *Albert Fischer* besteht die Virulenzsteigerung der Tumoren in einer durch Tierpassagen hervorgerufenen Selektion, durch die eine Zellrasse entstanden ist, die anspruchslös ist und sich allen individuellen Eigenschaften einer bestimmten Tierspezies angepaßt hat.

Der Terminus „Anpassung“ ist ein zu allgemeiner Begriff; es wird damit nicht definiert, an was sich die Geschwulstzellen im Wirtsorganismus bei der Virulenzsteigerung angepaßt haben. Mit dem Ausdruck „Milieu“ oder „individuelle Eigentümlichkeiten“ wird dies nicht bestimmt. Das Milieu kann sehr gut das Nährmilieu bedeuten, und in dieser Hinsicht stellt letzten Endes auch die Nutriceptorentheorie *Ehrlichs* für die Virulenzklärung einen Anpassungsprozeß dar. Die athreptische Theorie *Ehrlichs*, die seinerzeit eine vielerörterte Streitfrage war, gilt heute im allgemeinen als endgültig widerlegt (siehe näheres darüber bei *Uhlenhuth* und *Seiffert*). Was die Virulenzfrage anbetrifft, so hat uns die Züchtung der Geschwülste *in vitro* eindeutig gezeigt, daß die Virulenzeigenschaft der Geschwulstzellen nicht durch eine Anpassung an das individualfremde Nährmilieu des Wirtstieres erklärt werden kann. Wie *A. Fischer* gezeigt hat, lassen sich die Geschwulstzellen ohne irgendwelche Änderung ihrer Virulenzeigenschaften jahrelang in vollkommen fremden Milieu und Nährboden züchten. Der Anpassungsprozeß also, wenn wir überhaupt an der Anpassungstheorie festhalten wollen, muß etwas anderes als das Nährmilieu betreffen.

Wie bei den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit auseinandergesetzt wurde, wird das Angehen eines Impftumors einerseits von der Angangs-fähigkeit bzw. der Virulenz der Geschwulstzellen und andererseits von den Abwehrkräften des Wirtsorganismus bedingt. Zwischen beiden Faktoren besteht eine spezifische Beziehung. Die Wirkungskraft der Abwehrkräfte des Wirtes kommt am deutlichsten bei den Speicherungs-versuchen zum Vorschein. Dadurch wird die Resistenz des Tierorganismus lahmgelegt. *Fischer-Wasels* und *Büngeler* haben durch Vital-speicherung das reticulo-endotheliale System von Mäusen bloquiert und dann den „bloquierten“ Mäusen ein mit Chloroform stark geschädigtes Geschwulstmaterial eingeimpft. Dadurch erreichten sie bei diesen Tieren rasch wachsende und metastasierende Tumoren, die mit hochvirulenten

Geschwülsten zu vergleichen waren. Die Verimpfung desselben Materials an unvorbehandelte Kontrolltiere blieb ganz erfolglos. Andererseits überwinden bei hochvirulenten Geschwülsten die Geschwulstzellen, und zwar schon wenige Zellen, die Abwehrkräfte des Organismus; oder besser gesagt sind die Geschwulstzellen gegenüber diesen Abwehrkräften unempfindlich oder indifferent, und können gewissermaßen ungestört einen Impftumor setzen. Zwischen diesen beiden Extremen liegen die Impftumoren von einer Durchschnittsvirulenz, bei denen eine große Menge von Zellen verimpft werden muß, um einen Erfolg zu erzielen. Durch die große Zellmenge wird einerseits ein lokaler Reiz und eine allgemeine Wirkung auf die Abwehrkräfte des Organismus ausgeübt, welche das Haften und das Wachstum von einigen am Leben erhaltenen Zellen begünstigen oder überhaupt ermöglichen. Andererseits geht man durch diese Weise sicher, daß in der großen Zellmenge die nötige Anzahl von „widerstandsfähigeren“ Zellen sich befindet, aus denen der Impftumor seinen Ausgang nehmen wird.

Nach dem Gesagten besteht das Angehen eines Impftumors darin, daß die Geschwulstzellen erfolgreich sich gegenüber den Abwehrkräften des Organismus, gleich welcher Art sie sein mögen, lokal oder allgemein, humoraler oder cellulärer Natur, durchsetzen. Je mehr quantitativ und qualitativ die Zellen einer Geschwulst diese Fähigkeit besitzen, desto weniger Zellen sichern den Angang eines Tumors. Diese Fähigkeit der Geschwulstzellen, die sich als Resistenz oder Unempfindlichkeit gegenüber den Abwehrkräften des Organismus äußert, macht einen wesentlichen Teil ihrer „Virulenz“ aus. Insofern besteht die Virulenzsteigerung einer Spontangeschwulst im Verlaufe der Tierpassage in einer wahrscheinlich durch Auslese bedingten Erhöhung der Resistenz und Unempfindlichkeit der Geschwulstzellen ad maximum; wenn überhaupt dieser Tumor übertragbar ist, also Zellen besitzt, die gegen die Abwehrkräfte von Tieren des gleichen Spezies, der gleichen Rasse und Zucht resistent sind. Man kann sich diesen Prozeß auch als eine Anpassung vorstellen, daß nämlich die Zellen der hochvirulenten Tumoren an die Abwehrkräfte einer Tierspezie sich angepaßt haben, so daß die Abwehrkräfte des Wirtes für sie nicht mehr schädlich sind. Man konnte sogar annehmen, daß die virulenten Geschwulstzellen sich in einem ähnlichen Zustand befinden, wie momentan einige Zellen am Rande eines Transplantates, besonders von normalen Geweben (Leber). Rössle meint, daß es bei einem solchen Fall denkbar wäre, daß die wenigen, am Rande des Transplantates überlebenden Zellen sich im Augenblick des Eindringens der heterolytischen Stoffe des Wirtes in einer Phase minimalsten Stoffwechsels, gewissermaßen ruhend oder schlafend sich befinden und infolgedessen das Gift nicht in einer das Zelleben gefährdenden Menge, sondern nur in einer Reizdosis aufnehmen. Insofern kann man einen ähnlichen aber dauernden Zustand für die virulenten Tumorzellen annehmen, weil bekanntlich die Geschwulstzellen eine Verminderung

der biochemischen Empfindlichkeit aufweisen, die vermutlich bei hochvirulenten Tumoren noch weiter vermindert wird.

Diese Unempfindlichkeit bzw. Virulenz betrifft meistens spezifisch die Abwehrkräfte einer bestimmten Rasse oder Zucht eines Tierspezies, erweitert sich aber auf die anderen Rassen desselben Tierspezies und kann sogar auf die Abwehrkräfte einer anderen Spezies sich ausdehnen. So sind meines Erachtens manche gelungenen heterologen Geschwulsttransplantationen, bei denen keine künstliche Empfänglichkeit des Wirtes vorliegt, zu erklären.

Daß das Wesen der Virulenz der Geschwulstzellen in einer Resistenz oder Unempfindlichkeit gegenüber den Abwehrkräften des Wirtsorganismus besteht, beweist auch der auffällige Unterschied in der Übertragbarkeit zwischen den verschiedenen spontan oder künstlich erzeugten Geschwülsten. Größtenteils sind die Spontantumoren unübertragbar. Ihre Zellen verfügen also nach *Wogloom* über keine Adaptivität an den neuen Wirt. Eher verfügen sie aber über keine unempfindlichen oder resistenten Zellen gegenüber den Abwehrkräften des Wirtes. Von den übertragbaren Spontantumoren gehen manche bei der ersten Überimpfung mit einer minimalen Ausbeute, andere mit einer sehr weit höheren, wie 30 und sogar 50% an. Noch deutlicher kommt dieses zum Vorschein beim *Ehrlich*-Chondrom, welches gleich bei der ersten Übertragungsreihe einen 90%igen Angang gab. *Ehrlich* selbst führte diese ungewöhnliche Erscheinung nicht mehr auf eine nährstoffliche Anpassung des Chondroms an den neuen Nährboden zurück, sondern, wie er sagt, „diese leichte Übertragbarkeit des Chondroms beruht offenbar auf einer auch sonst nachweisbaren hohen Resistenz seiner Zellen“. Er erklärt dies durch den angeblich embryonalen Charakter des Chondroms, welches offenbar ein einseitig entwickeltes „Embryom“ war. *Caspari* erklärt diese hohe Resistenz bzw. Virulenz des Chondroms dadurch, daß die Chondromzellen „stets in größeren Verbänden bleiben und durch die reichliche hyaline Zwischenschicht, in der sie eingekapselt liegen, der Gegenwirkung des Organismus Widerstand leisten“. Wenn auch hier der Resistenz der Geschwulstzellen ein mehr stofflicher und mechanischer Charakter zugeschrieben wird, sieht man doch, daß die hohe Virulenz des Chondroms aus der Resistenz seiner Zellen zu erklären ist. *Ob also das Wesen des Begriffes Virulenz in einer Indifferenz oder Unempfindlichkeit der Geschwulstzellen durch Anpassung an die Abwehrkräfte des Wirtsorganismus, welches am ehesten für die Virulenzsteigerung anzunehmen ist, liegt, oder ob dieses Wesen in einer angeborenen oder erworbenen Resistenz der Geschwulstzellen besteht, das Resultat ist immer das gleiche, nämlich daß diese Zellen die Eigenschaft besitzen, unversehrt von den Gegenkräften des Wirtsorganismus zu bleiben.*

Der Grad der Resistenz oder Unempfindlichkeit der Geschwulstzellen bestimmt ihren Virulenzgrad. Auf die Wirkung, die die Tumor-

zellen entsprechend ihrer Virulenz auf den Wirtsorganismus ausüben, soll hier nicht eingegangen werden. Jedenfalls ist auch diese Eigenschaft in der Geschwulstzellenvirulenz mitzuberechnen.

Die Resistenz im Sinne des Begriffes „Virulenz“ der Geschwulstzellen soll als eine Eigenschaft aufgefaßt werden, die spezifisch den Transplantationsvorgang betrifft. Es scheint aber, daß die Zellen einer hochvirulenten Geschwulst nicht nur übertragungsfest sind, sondern auch gegen äußerliche Schädigungen sich resistenter erweisen. So hat Rössle beobachtet, daß bei der Transplantation von in flüssigem Stickstoff auf mehrere Minuten gefrorene ($-195,70^{\circ}$) Geschwulststückchen, bei virulenterem Ehrlich-Sarkom mehr Zellen am Leben erhalten bleiben als beim Ehrlich-Carcinom. Noch wichtiger ist die Tatsache, daß, wie mir meine Immunitätsversuche gezeigt haben, die Geschwulstzellen unseres hochvirulenten Stammes „Sa“ nicht nur an die Abwehrkräfte einer normalen Maus vollkommen „angepaßt“ sind, sondern auch gegen die immunitatorischen Kräfte von Mäusen, die gegen das Ehrlich-Carcinom hochimmunisiert waren, sich als stark resistent erweisen.

Die „Virulenz“ läßt sich bei der Züchtung der Geschwulstzellen in vitro weder fördernd noch mindernd beeinflussen. Damit zeigt sich die „Virulenz“ als eine irreversible Eigenschaft der Tumorzelle. An und für sich aber ist die Geschwulstvirulenz keine konstante Größe. Sie wird durch exogene Schädigungen, wie mechanische, thermische, chemische, aktinische usw. stark beeinflußt. Außerdem wird die Virulenz durch endogenen, durch den Wirt selbst bedingte Faktoren beeinflußt. Die periodischen, jahreszeitlichen und vielleicht auch meterologisch bedingten Virulenzschwankungen der Impftumoren sind mindestens zum Teil mittelbar durch den Wirt selbst bedingt. Die hormonale Beeinflussung (Schwangerschaft!), die Kostwirkung usw. auf die Virulenz einer Impfgeschwulst sind bekannt. Bemerkenswert ist die Beeinflussung der Geschwulstvirulenz sowohl in Hinsicht des Angehens, als auch des Wachstums, durch den Gesundheitszustand des Wirtstieres. Beides ist bei kranken Tieren stark gehemmt. In dieser Beziehung weichen die Geschwulstzellen, wie auch Schöne bei Vergiftung der Wirtstiere beobachtet hat, von den Parasiten ab, mit denen sie in anderen Beziehungen große Analogien aufweisen, die besonders beim System „Geschwulstzellen-Wirt“ zur Geltung kommen. Noch besonders zu erwähnen sind die plötzlich explosiv auftretenden Virulenzsteigerungen, die aber wieder, wie bei meinem Fall, zu ihren früheren Werten zurückfallen. Dies alles zeigt die Labilität des Virulenzfaktors bei den Tierversuchen.

Was die zweite Virulenzkomponente, die Proliferationsenergie oder Wachstumsgeschwindigkeit (Ottensooser) der Geschwulstzellen anbetrifft, pflegt sie meistens Hand in Hand mit der Übertragbarkeit zu gehen. Dies ist auch bei unseren Tumorstämmen zu sehen. Als eine markante und seltene Ausnahme gilt das Ehrlich-Chondrom, welches 100% angeht,

aber eine verhältnismäßig geringe Wuchsenergie aufweist. Doch sind auch in diesem Falle beide Virulenzkomponenten nicht absolut und scharf zu trennen, weil, wie *Ehrlich* erwähnt, die Schnelligkeit des Chondromwachstums infolge der Tierpassagen eine außerordentliche Steigerung erfahren hat. Der enge Zusammenhang beider Virulenzkomponenten wird auch dadurch bewiesen, daß beide in derselben Weise von den Abwehrkräften des Organismus beeinflußt werden. Wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist, wachsen die Tumoren, die durch kleinste Zellzahl gesetzt wurden, bedeutend langsamer als diejenigen, die durch Verimpfung von größeren Zellzahlen erzielt wurden. Dasselbe hat *Witte* festgestellt, nämlich daß das Wachstumstempo der Tumoren der Zahl der verimpften Zellen etwa proportional ist, bis zur Verimpfung einer bestimmten hohen Zellanzahl, mit der ein Grenzwert erreicht wird. *Witte* hat versucht, diesem Phänomen durch die Bestimmung der inhärenten Wachstumsenergie in der Gewebekultur näher zu kommen. Er stellte fest, daß die Zellen der durch kleine Zellzahlen erzeugten Tumoren bedeutend langsamer wachsen als die Zellen derjenigen Tumoren, die mit größeren Zellzahlen erzielt wurden. *Witte* führt diese Änderung der Wachstumsenergie der Geschwulstzellen, die er als Änderung des biologischen Charakters der Geschwulstzellen betrachtet, auf Einflüsse des Abwehrapparates des Wirtsorganismus zurück. Der Organismus ist imstande, bei der Verimpfung von relativ geringen Zellmengen entweder das Angehen des Tumors unmöglich zu machen, oder nur in kleinstem Umfang zuzulassen.

Wie schon erwähnt wurde, ging mit der Virulenzsteigerung unseres Stammes „Sa“ eine weitere Entdifferenzierung der Geschwulstzellen desselben einher. In dieser Beziehung geht die Verulenzsteigerung der Regel der Malignitätszunahme der Geschwülste parallel. Damit kommen wir zur *Frage des Verhältnisses zwischen den Begriffen „Geschwulstvirulenz“ und „Geschwulstmalignität“*.

Sehr oft wird der Begriff „Malignität“ gleich dem Begriff „Virulenz“ gesetzt. So sagt z. B. *Lewin*: „Die Malignität eines Tumors setzt sich aus 4 Faktoren zusammen: Angangsziffer bei der Überimpfung, Proliferationskraft, Wachstumsschnelligkeit und Metastasenbildung“. Damit verwechselt *Lewin* die Begriffe „Malignität“ und „Virulenz“ der Geschwülste.

Der Terminus „Virulenz“ findet seine Anwendungsberechtigung nur beim Transplantationsvorgang, und die Virulenz ist als Eigenschaft der Geschwulstzellen nur während des parasitären Lebens dieser Zellen auf einem fremden Organismus verständlich. Daher kann man nicht von der Virulenz eines Spontantumors sprechen, solange der Tumor nicht auf ein anderes Tier übertragen wurde. Aber auch aus anderen Gründen kann man nicht die Malignität und Virulenz gleichsetzen.

Die Malignität einer Geschwulst setzt nicht ihre Übertragbarkeit voraus bzw. umgekehrt. Viele klinisch und morphologisch bösartigen Geschwülste

lassen sich überhaupt nicht übertragen. Dagegen sind nicht selten gutartige Geschwülste übertragbar. Es sei nur auf die Arbeiten von *Loeb*, *Lubarsch*, *Robinson*, *Grauer*, *Picco* und neuerdings die von *Oberling* und *Guerin* hingewiesen. Die meisten der genannten Forscher haben benigne Fibroadenome der Mamma von Ratten erfolgreich in mehreren Passagen homolog transplantieren können. Auch das „hochvirulente“ *Ehrlich-Chondrom* wird im Vergleich mit anderen weniger virulenten, aber bedeutend bösartigeren Impfgeschwülsten als relativ gutartig betrachtet. *Meistens aber wird eine Virulenzsteigerung der Transplantationstumoren von einer Erhöhung der Malignität begleitet.* In manchen Fällen zeigen sogar, wie bei unserem Tumorstamm „*Sa*“ diese hochvirulenten Impfgeschwülsten durch ihr überaus rasch infiltratives Wachstum, die zahlreichen großen Metastasen und den Untergang der Tiere in kürzester Zeit, eine hochgradige Malignität, die bei Spontantumoren der Maus kaum vorkommen. *Obwohl also, wie meistens, bei den virulenten Impftumoren, beide Begriffe Hand in Hand gehen, sind sie stets auseinander zu halten.*

Die Frage des Zusammenhangs zwischen der Virulenz der Geschwulstzellen und den Metastasen werde ich hier nur kurz streifen, da diese Frage ausführlicher in einer anderen Arbeit über die Metastasenfrage erörtert werden soll. Die Beziehung zwischen der Geschwulstvirulenz und dem Vermögen der Geschwulstzellen Tochtertumoren anzusetzen, offenbart sich sehr deutlich bei unserem Tumorstamm „*Sa*“. Zur Zeit seiner höchsten Virulenz setzte dieser Tumor in kürzester Zeit nach der Transplantation (5—7 Tage) zahlreiche Metastasen. Abgesehen von der allgemeinen Wirkung des Tumors, die die Entwicklung dieser Metastasen wahrscheinlich begünstigt hat, *ist in diesem Falle das Kolonisationsvermögen der Geschwulstzellen dieses Tumors hauptsächlich auf die Virulenz seiner Zellen zurückzuführen.* Es ist leicht denkbar, daß, wenn so wenige Zellen dieser Impfgeschwulst imstande waren, überhaupt einen Tumor anzusetzen, auch die wenigen in die Organe übergesiedelten Zellen die Fähigkeit hatten, die Organresistenz zu brechen und eine Tochtergeschwulst zustande zu bringen.

Zum Schluß seien einige Worte über die zellfreie Übertragung von Säugetertumoren gesagt. Auch meine Versuche haben wieder gezeigt, daß Verimpfung von zellfreiem Geschwulstextrakt, in der Weise, wie wir die Extrakte hergestellt haben, bei sehr langer Beobachtung der Tiere stets *erfolglos* geblieben sind. Dies wurde auch bei dem hochvirulenten Tumor „*Sa*“ bestätigt, bei dem sonst nur wenige Zellen imstande waren, einen Impftumor anzusetzen. Auch Verimpfung von getrocknetem Geschwulstgewebe des Stammes „*Sa*“ (2 Wochen lang in Zimmertemperatur) blieben bei 6 Monaten langer Beobachtung erfolglos.

Als ein wichtiger Beweis für die Existenz eines Krebsvirus bei den Säugetiergeschwülsten wird bekanntlich unter anderen auch die Tatsache ausgeführt, daß durch die *Verimpfung von metastasenfreien und angeblich*

tumorzelligen Organen, sowie von Blut impftumorentragenden Tieren positive Ergebnisse erzielt wurden (Blumenthal, Auler u. a.). Zu anderen Zwecken habe auch ich solche Organtransplantationen vorgenommen. Ausführlich werde ich über die Ergebnisse dieser Versuchsserien in den folgenden Arbeiten berichten. Hier sei nur erwähnt, daß die Transplantationen der Organe, von Mäusen mit Tumoren unserer beiden Geschwulststämme durchschnittlich folgende Zahlen von erfolgreichen Impfungen ergaben. Beim Stamm „Ca“, wurde durch die Lymphknotenverimpfung ungefähr ein Erfolg von 50% erzielt, durch die Lungentransplantation 10%; die Leber-, Milz- und Nierentransplantationen blieben stets erfolglos. Beim Stamm „Sa“, und zwar zur Zeit seiner höchsten Virulenz wurde bei sämtlichen vorgenommenen Organverimpfungen (Lymphknoten, Lungen, Leber, Milz, Nieren) fast ein 100%iger Erfolg erzielt. Diese Zahlen beziehen sich hauptsächlich auf Transplantationen von makroskopisch metastasenfreien Organen. Mikroskopisch wurden nicht selten sehr kleine Metastasen oder Tumorembolien in den Lymphgefäßen der Lungen gefunden. Um mit einer gewissen Sicherheit ausschließen zu können, daß bei diesen Organen auch mikroskopische Metastasen vorhanden sind, muß man das ganze Organ in ununterbrochenen Serienschnitten untersuchen. Wenn aber auch keine Metastasen gefunden werden, so ist das Vorhandensein von einzelnen, zerstreuten, im Organparenchym gelegenen Geschwulstzellen keineswegs auszuschließen. In einem solchem Fall ist es unmöglich, mit Bestimmtheit die zwischen den Organzellen frei liegenden Tumorzenlen zu erkennen und dies besonders bei der Milz, mit der die obenerwähnten Forscher ihre Versuche vorgenommen haben. Die Behauptung, daß in diesem Fall die Geschwulstzellen wegen ihrer geringen Anzahl nicht imstande sind, Impftumoren zu erzeugen, wird von meinen Befunden widerlegt. Es wurde gezeigt, daß hochvirulente Geschwulstzellen in bisher unerwartet geringer Anzahl Impftumoren ansetzen können. Gerade aber diese in den Organen einzelnen und zerstreut liegenden „schlummernden“ Geschwulstzellen, wenn sie auch aus mäßig virulenten Tumoren stammen, sind meines Erachtens besonders stark virulent. Diese Zellen sind viel stärker den Abwehrkräften des Organismus ausgesetzt gewesen. Hinzu kommt die Organresistenz und die Eigentümlichkeit der dort herrschenden Verhältnisse, sowie die „simultane“ Immunität (Bashford) des Wirtstieres, die das Leben dieser alleinliegenden Zellen noch stärker gefährdet. Wenn daher solche Geschwulstzellen überhaupt am Leben erhalten bleiben, muß man annehmen, daß sie eine außergewöhnliche Resistenz besitzen oder erworben haben. Infolgedessen ist es nicht weiter verwunderlich, wenn eine kleine Anzahl von solchen hochvirulenten Zellen, die mit dem verimpften Organstückchen oder Organbrei an einen neuen Wirt übertragen werden, Impftumoren setzen können. Das Angehen wird wahrscheinlich, wie de Gaëtani und Blothner meinen, auch von dem mittransplantierten Organgewebe unterstützt. Auf die Frage, warum diese Zellen

meistens keine Tochtertumoren in den Organen, wo sie sich befinden, bilden, sowie auf das interessante Phänomen der Metastasierung der Tumoren, die aus solchen Zellen übertragen sind, werde ich hier nicht weiter eingehen. Das langsamere Wachstum solcher Tumoren ist einfach das gleiche wie das Wachstum der mit geringerer Zellanzahl erzeugten Impftumoren, wie Witte und ich beobachtet haben. Hier auch ist dieses Phänomen auf eine Änderung der Proliferationsenergie dieser latent lebenden Geschwulstzellen zurückzuführen. Übrigens wuchsen beim Tumorstamm „Sa“, die aus Organtransplantation entstandenen Tumoren fast genau so rasch, wie die mit reinem Ausgangstumorgewebe angesetzten Geschwülste. Leicht verständlich ist auch bei solchen Organtransplantationstumoren, die von biologisch veränderten Zellen ausgehen, die Änderung ihres morphologischen Charakters, die manchmal beobachtet wird.

Zusammenfassung.

Der Begriff der „Virulenz“ eines übertragbaren Tumors erschöpft sich nicht in der 100%igen Angang der Impfung, sondern zeigt sich darüber hinaus gesteigert durch beschleunigten Tod der geimpften Tiere, häufigere Metastasenbildung und schnelleres Wachstum des Tumors. Weiter konnte gezeigt werden, daß die Steigerung der „Virulenz“ mit einer Abnahme der Zellenzahl einhergeht, welche zum Angehen der Impfung nötig ist. Es konnten erfolgreiche Impfungen mit nur 3000 Zellen erzielt werden, während sicher zellfreie Filtrate wie in früheren Versuchen regelmäßig negative Ergebnisse hatten. Dadurch wird die mikroskopisch festgestellte Tatsache, daß eine Impfgeschwulst ihren Ausgang aus nur einigen wenigen Zellen nimmt, auch experimentell bestätigt. Das Überleben dieser wenigen Zellen ist hauptsächlich auf ihre besonders starke „Virulenz“, oder auf eine hohe Empfänglichkeit (Lahmlegung des Abwehrapparates des Tierorganismus) des Wirtes, zurückzuführen.

Der Virulenzgrad einer Impfgeschwulst in Hinsicht der Übertragbarkeit ist durch zwei Zahlen zu bestimmen: Erstens durch die „absolut minimale“, überhaupt wirksame Zellanzahl und zweitens durch die „optimal minimale“, d. h. ständig erfolgreiche Geschwulstzellendosis, bei bekannter und möglichst konstanter Empfänglichkeit der Wirtstiere. Damit gelingt es, eine feine und verhältnismäßig genaue Virulenzbestimmung aufzustellen.

Das Wesen des Begriffes „Virulenz“ in Hinsicht der Übertragbarkeit liegt in der Resistenz oder Unempfindlichkeit der Geschwulstzellen gegenüber den Abwehrkräften des Wirtsorganismus. Die Virulenzsteigerung eines Impftumors im Verlaufe der Tierpassagen findet durch eine Auslese der resisterenteren oder unempfindlicheren Zellen und durch Anpassung derselben an die Abwehrkräfte einer Tierspezies, ihrer Rassen und sogar selten auch einer fremden Tierspezies statt. Meistens erhöht sich gleichzeitig die Wachstumsenergie der Geschwulstzellen. Obwohl in der Regel

die Virulenzsteigerung eines Impftumors von einer Erhöhung seiner Malignität begleitet wird, sind diese Begriffe stets auseinander zu halten. Die Malignität einer Geschwulst setzt nicht ihre Übertragbarkeit voraus bzw. umgekehrt. Der Terminus „Virulenz“ ist den Impftumoren vorzubehalten. Die Resistenz der Geschwulstzellen im Sinne des Begriffes „Virulenz“ ist eine Eigenschaft, die speziell den Transplantationsvorgang betrifft. Bei hochvirulenten Tumoren zeigen sich die Geschwulstzellen resistent auch gegenüber Tieren mit künstlich erhöhten Abwehrkräften sowie widerstandsfähiger gegenüber äußerlichen Schädigungen (Kälte).

Die erhöhte „Virulenz“ der Geschwulstzellen als wichtiger Faktor für die Metastasenbildung der Impfgeschwülste tritt besonders bei ungewöhnlich hochvirulenten Tumoren in Vordergrund.

Die Entstehung von Impftumoren nach Transplantation von Organen tumortragender Tiere ist nicht auf die Übertragung von hypothetischem „Virus“ zu beziehen. Solche Tumoren nehmen ihren Ausgang entweder aus nur mikroskopisch feststellbaren Tumorzellenhäufchen, oder aus einigen wenigen in dem Organparenchym zerstreut liegenden Geschwulstzellen. Diese „schlummernden“ Zellen, die den Abwehrkräften des Organismus besonders ausgesetzt sind, müssen dazu besonders hoch resistent bzw. leicht übertragbar sein.

Literaturverzeichnis.

- Bashford, Murray u. Haaland:* Z. Immun.forsch. 1, 1 (1908/09). (Hier Literatur über die Arbeiten Bashfords und seiner Mitarbeiter.) — *Bittner:* J. Genet. 31 (1935). — *Blumenthal, Auler u. Solecke:* Z. Krebsforsch. 25 (1927). — *Büngeler:* Frankf. Z. Path. 35 (1927). — *Caspari:* Handbuch pathologischer Mikroorganismen, Bd. 1. 1930. — Z. Krebsforsch. 19 (1923). — *Caspari u. Schwarz:* Z. Krebsforsch. 36 (1932). — *Costa:* Z. Krebsforsch. 36 (1932). — *Domagk u. Hackmann:* Verh. dtsch. path. Ges. 28 (1935). — Z. Krebsforsch. 42 (1935). — *Ehrlich:* Arb. Inst. exper. Ther. Frankf. 1 (1906). — Verh. dtsch. path. Ges. 13 (1908). — *Fischer, Albert:* Gewebezüchtung. 1931. — Z. Krebsforsch. 25 (1927). — *Fischer, A., Laser u. Meyer:* Z. Krebsforsch. 39 (1933). — *Fischer-Wasels:* Handbuch der Physiologie, Bd. 14/2. 1927. — *Gaëtani de u. Blothner:* Z. Krebsforsch. 44 (1936). — *Gierke, v.:* Verh. dtsch. path. Ges. 13 (1908). — *Konsuloff:* Z. Krebsforsch. 39 (1933). — *Koenigsfeld u. Praussnitz:* Zbl. Bakter. I, 74 (1914). — *Lewin, C.:* Die Ätiologie der bösartigen Geschwülste. 1928. — *Oberling, Guerin, M. et P. Guerin:* Bull. Assoc. franç. Étude Canc. 22 (1933). (Hier Literatur über die Verimpfung von gutartigen Tumoren.) — *Ottensooser:* Z. Krebsforsch. 30 (1933). — *Ratto:* C. r. Soc. Biol. Paris 88 (1920). — *Rössle:* Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. 1936. — *Schöne:* Arch. klin. Chir. 39 (1910). — *Schwarz:* Inaug.-Diss., Breslau 1919. — *Selbie:* Brit. J. exper. Path. 17 (1936). — *Strong u. Little:* Erwähnt bei Caspari (a). — *Teutschlaenter:* Handbuch der pathologischen Mikroorganismen, Bd. 10. 1930. — *Uhlenhuth u. Seiffert:* Med. Klin. 1925 I. — *Witte:* Dtsch. Z. Chir. 245 (1935). — Z. Krebsforsch. 42 (1935). — *Wogloom:* J. Canc. Res. 4 (1919).