

(Aus dem Krebsinstitut sowie dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Istanbul [Direktor: Prof. Dr. S. Oberndorfer].)

## Beiträge zur Kenntnis des Shopeschen Kaninchenpapilloms und seines „filtrierbaren Erregers“.

### II. Die Histogenese des Tumors.

Von

P. Ladewig und S. Oberndorfer.

Mit 9 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 4. Juni 1937.)

Seit der Beschreibung des Cottontail-Kaninchen-Papilloms durch Shope und Rous<sup>11, 6</sup> steht der Forschung ein epithelialer Tumor beim Säugetier zur Verfügung, der der Einwirkung eines ultrafiltrierbaren „Virus“ seine Entstehung verdankt und zugleich — wie spätere Arbeiten von Rous und seinen Mitarbeitern<sup>7, 9, 10</sup> zeigen — eine obligatorische Präcancerose darstellt.

Diese Tatsachen allein rechtfertigen den Versuch die Histogenese dieses Tumors eingehend zu untersuchen, um sowohl für die pathologische Anatomie menschlicher Papillome wie auch für die biologisch-experimentelle Forschung möglichst klare Vergleichsbedingungen zu schaffen. Über einen Teil unserer Ergebnisse haben wir schon früher berichtet<sup>4</sup>.

Den jetzigen Untersuchungen legen wir Serien- und Stufenschnittreihen von 26 Tumoren bzw. inokulierten Hautbezirken von Kaninchen verschiedener Rasse zugrunde. Das Material wurde durch Probeexcision oder Autopsie zwischen dem 1. und 334. Tage nach der Impfung gewonnen, in Formol (1:10), Zenker- oder Hellyscher Flüssigkeit fixiert und entweder in Gefrier- oder Paraffinschnitten untersucht. Dabei hat sich bei uns die Einbettung über Methylbenzoat-Celloidin mit mehrtägigem Verweilen in dieser Flüssigkeit für die oft recht schwer schneidbaren Tumoren gut bewährt. Ohne besondere Schwierigkeiten gelang es so, selbst bei starker Verhornung, Schnittserien von 6  $\mu$  Dicke zu erhalten.

Als Darstellungsmethoden neben der in jedem Falle ausgeführten Hämatoxylin-Eosin- und Eisenhämatoxylin-van Gieson-Färbung kamen in Anwendung: 1. Heidenhain-Eisenhämatoxylin-Färbung. 2. Panoptische Färbung nach Pappenheim. 3. Elastinfärbung nach Weigert. 4. Lipoidfärbung mit Scharlach-R. 5. Nuklealreaktion nach Feulgen. Zur Darstellung der Hornsubstanzen: 6. Kaliumpermanganatbeize-Hämatoxylin-Färbung. 7. Metachromatische Färbung mit Kresylechtviolett. 8. Hämatoxylin-Kongorot-Färbung. 9. Martinottische Darstellung der Hornsubstanzen mit Methyleosin-Orange-Wasserblau.

Das virushaltige Material erhielten wir lebenswürdigerweise von Herrn Prof. Shope in Form von Tumorstückchen wilder Watteschwanz-Kaninchen in 50%igem Glycerin konserviert. Die Inokulation führten wir im allgemeinen in der von den amerikanischen Autoren angegebenen Weise aus, wie wir sie in früheren Arbeiten<sup>3, 4, 5</sup> geschildert haben.

Um ein Bild über die Anfangsstadien der Entwicklung zu bekommen, haben wir in täglichen Intervallen vom 1. bis 16. Tage bei 3 Kaninchen gleichen Wurfs

umschichtig aus den Impfbezirken in Äthernarkose Hautstückchen nach Art von Thierschen Lappen entnommen. Zum Teil wurden diese jeweils der histologischen Untersuchung zugänglich gemacht, zum anderen Teil durch Autotransplantation in die Muskulatur auf ihre Tumoreigenschaften untersucht (hierüber siehe a. a. O.<sup>1)</sup>).

Wir haben die Befunde der ersten histologischen Notiz von Hurst<sup>11)</sup>, ebenso wie die von Rous und Mitarbeitern im ganzen bestätigen und belegen können sowie ihre zeitlichen Zusammenhänge zu klären versucht.

Während sich bis auf einen Tumor zur Zeit der Untersuchung alle makroskopisch gutartig verhielten, so haben wir ein sicheres Carcinom nur darum in die Betrachtung miteinbezogen, weil es Befunde verdeutlicht, die zur Abrundung des Gesamtbildes dienlich sind.

Es sei hier betont, daß wir in der histologisch-formalen Entwicklung der Tumoren — nicht so in der makroskopischen — keine Abhängigkeiten von der Rasse, vom Alter oder dem Geschlecht der Tiere beobachten konnten.

Die *normale Kaninchenepidermis* am Bauch und an den Flanken ist im allgemeinen 2—3 Zellagen dick und überschreitet kaum jemals 5. Papillen sind nicht oder nur angedeutet vorhanden. Das darunterliegende Bindegewebe ist locker und ziemlich zellarm. Vereinzelt trifft man Rundzellen, sehr selten Leukozyten außerhalb der Gefäße. Das Netzwerk elastischer Fasern erreicht seine größte Dichte in einem gewissen Abstände von der Basalmembran des Strat. germinativum. Das Gewebe enthält reichlich Capillaren in wechselndem Füllungszustand. Größere Gefäße sind hier selten. Mit den angegebenen Methoden sind Nervenfasern oder Endkörperchen schwer darstellbar. In Gruppen stehende Haarbälge mit den dazu gehörigen Talgdrüsen durchbrechen in spitzem Winkel die Oberfläche.

Die Keimschicht der Epidermis besteht aus einem einschichtigen, nahezu kubischen Plattenepithel von großer Regelmäßigkeit im Aufbau. Man erkennt deutlich die Zellgrenzen. Mitosen sind im ganzen selten zu finden. Die darüberliegenden Epithelien sind von nahezu gleicher Größe nicht so streng geordnet, ihre Zellgrenzen oft verwaschen. Das Protoplasma erscheint fast homogen. Hier und da beobachtet man um den zentral gelegenen, runden, lockeren Kern einen kleinen Vakuolensaum, der jedoch Kunstprodukt sein kann. Auch in dieser Schicht kommt den Zellen noch eine gewisse Teilungsfähigkeit zu.

Erst in der obersten Zone platten die Zellen sich unvermittelt ab, werden mehr spindelförmig, der Kern ist schlecht färbbar oder verklumpt und im Zelleib häufen sich feinste staubartige Körnchen von Keratohyalin. Klare Zellen, wie sie in Eleidinschichten vorkommen, sind als geschlossene Lage nie vorhanden, als Einzelelemente kann man sie ab und zu beobachten. Nach außen findet das Organ seinen Abschluß durch eine dünne Hornschicht, die überall nahezu homogen erscheint und stark lichtbrechend ist.

*Die Bilder der ersten Tage nach der Impfung* sind ganz beherrscht von den reparativ-entzündlichen und regenerativen Vorgängen, die durch die Scarifikation ausgelöst werden.

Da der Eingriff möglichst steril durchgeführt wird, so kommt es kaum je zu heftigeren leukocyitären Reaktionen, auch dort nicht, wo zunächst das Bindegewebe frei an die Oberfläche grenzt. Solche Epitheldefekte können überall im Inokulationsfeld beobachtet werden. Eine mehr oder minder ausgesprochene Mobilisierung von Wanderzellen sowie das Auftreten lymphocytärer Rundzellen ist jedoch die Regel. Die Capillaren sind weit und strotzend gefüllt, auch sind schon frühzeitig, d. h. am 2. bis 3. Tage Capillarsprossungen zu sehen. Die Heilung der vollständigen Epitheldefekte geschieht immer vom Rande her und unter dem Schorf: dort, wo nur die Hornschicht oder die oberflächlichsten Zellschichten verletzt

waren, wie dies am häufigsten der Fall ist, tritt eine schnelle Regeneration von der Tiefe her ein. Am Zellbild der einzelnen Epithelien ändert sich bis zum 4. Tage kaum etwas, abgesehen von Zeichen leichten intercellulären Ödems im Verlaufe des 2. Tages, das die Protoplasmabrücken im Strat. germinativum und Rete Malpighii deutlich hervortreten läßt.

Ehe jedoch Reparation und Regeneration vollkommen zum Abschluß gekommen sind, lenken neu auftretende Vorgänge in den Zellen der Epidermis die Aufmerksamkeit auf sich. In unseren Beobachtungen finden wir am 5. Tage nach der Impfung zum ersten Male kleine, auf 3—5 Zellen begrenzte Herdchen, deren Einzelelemente sich durch ihre starke Vakuolisierung um den Kern sowie das Auftreten gröberer, mit Hämatoxylin

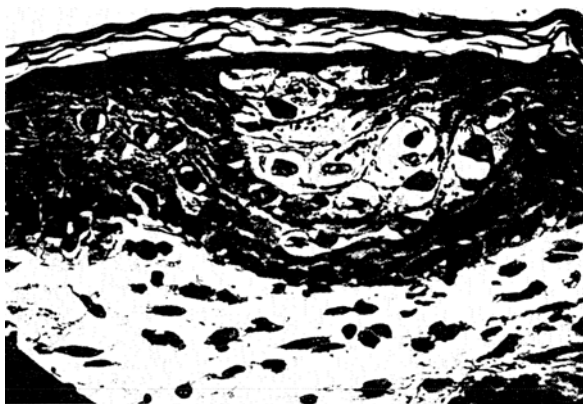


Abb. 1. Primärzentrum vom 6. Tage nach der Impfung. „Helle Zellen“ und Kompression der Keimschicht. Vergr. 450  $\times$ .

stark anfärbbarer Schollen und Brocken von der Umgebung unterscheiden (vgl. Abb. 3). Sie finden sich zunächst ausschließlich nahe der Oberfläche und lassen, wie Serienschnitte zeigen, die Keimschicht vollkommen intakt, es sei denn, daß die benachbarten Zellen ein wenig abgeplattet erscheinen. Die Anzahl der in den Keimlagern zu beobachtenden Mitosen gibt weder jetzt noch im folgenden Stadium einen verwertbaren Anhaltspunkt für die Geschwindigkeit und Ausdehnung der sich tatsächlich vollziehenden Proliferationsvorgänge. In den erwähnten vakuolisierten Zellen kommen Teilungen nicht vor.

Diese Herdchen bezeichnen wir als *Primärzentren* (P.Z.). Sie stellen die ersten morphologisch greifbaren Stadien des beginnenden Papillomwachstums dar. Die Elemente, die zu ihrem Aufbau dienen, sind die gleichen wie wir sie im endgültigen Tumor in riesiger Anzahl wiederfinden. Ehe wir sie eingehender schildern, verfolgen wir die Entwicklung noch ein Stück weiter.

In den Schnitten des Materials aus den nächsten Tagen (6. bis 9. Tag p. i.) können wir nun beobachten, wie solche P.Z. immer häufiger auftreten

und schnell an Größe zunehmen. Sie zeigen sich dann zunächst als kugelige, wabig gebaute Gebilde, die wie Fremdkörper zwischen Horn- und Keimschicht liegen und letztere nunmehr deutlich komprimieren (Abb. 1).

Es finden sich aber auch schon Stellen, wo das Strat. germinativum unter den P.Z. Zeichen seiner ausschlaggebenden Mitbeteiligung an den Vorgängen erkennen läßt. Man sieht, wie die vordem kubischen Zellen hochzylindrisch geworden sind und pallisadenförmig aufgereiht stehen; ihre Kerne sind walzenförmig und sehr chromatinreich (vgl. Abb. 2). Dieses Verhalten scheint uns den Schluß zuzulassen, daß eine lebhaft Vermehrung in seitlicher Richtung stattfindet. Zelle und Kern werden auf dem geringen zur Verfügung stehenden Platz nach der Seite des geringsten Widerstandes komprimiert. Die *Pallisaden im Strat. germinativum* gehören ebenso wie die „hellen Zellen“ zum Bilde des ausgebildeten Papilloms.

Um die Beschreibung abzukürzen, seien die nun folgenden Einzelbilder als Vorgang zusammengefaßt.

Die „hellen Zellen“ stellen, wie noch zu zeigen ist, vermehrungsunfähige, charakteristische Differenzierungselemente der unter ihnen gelegenen Keimschichten dar. Beobachten wir nun, wie einerseits die Zellen im Strat. germinativum — und nur dort — Zeichen lebhafter Vermehrung in horizontaler Richtung bieten und wie andererseits die Gebiete „heller Zellen“ (H.Z.) mit diesen in ihrer Ausbreitung Schritt halten, so glauben wir uns zu dem Schluß berechtigt, daß auch den neu entstandenen Zellen des Keimlagers die Fähigkeit zukommt, solche H.Z. zu bilden. Auf diese Weise schreitet die Entwicklung konzentrisch um den Ausgangsherd fort.

Zwischen Tumormutterzellen und ihren ausdifferenzierten Abkömmlingen wird mit fortschreitender Entwicklung eine *Übergangszone* deutlich (Abb. 2), deren Zellen keinerlei oder nur geringe morphologische Besonderheiten bieten. Sie gleicht im ganzen dem Rete Malpighi der unveränderten Kaninchenhaut. Wohl können die Einzelelemente etwas größer und



Abb. 2. Älteres Primärzentrum (7. Tag nach Impfung). Pallisadenstellung im Keimlager, wohlausgebildete Intermediärzone. Vergr. 450 ×.

plumper sein als im gesunden Hautorgan, aber die Hauptmerkmale bleiben zunächst erhalten: runde, wohlstrukturierte, gleich große und teilungsfähige Kerne, fast homogenes Zellplasma, undeutliche Zellgrenzen.

Daß alle diese Vorgänge mit erheblicher Volumenvermehrung einhergehen, liegt klar auf der Hand; so werden daher aus den P.Z. in wenigen Tagen polsterartige, oft recht ausgedehnte Zellager. Die am 9. Tage in der Reihe unserer Untersuchungen excidierten Hautpartien zeigten schon mit aller Sicherheit makroskopisch wachsartig glänzende, kleine Eruptionen: Ausgangspunkte der wenige Wochen später oft mächtigen papillomatösen Wucherungen.

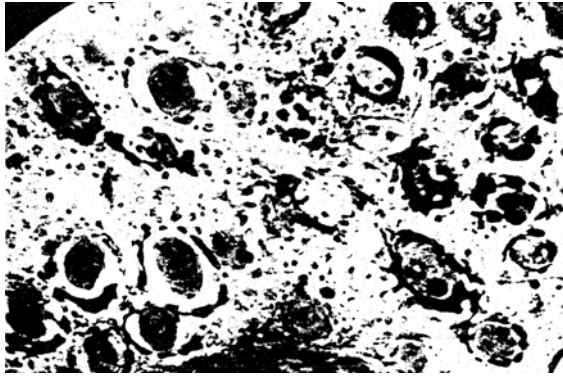


Abb. 3. „Hefle Zellen“. Kerne undeutlich strukturiert, perinukleäre Vakuolen, massige Keratohyalinablagerungen. Vergr. 740 : 1.

Wie sehen nun die obenerwähnten H.Z. im einzelnen aus und wie können wir uns ihre Entstehung ableiten?

Das Bild (Abb. 3) zeigt deutlich, wie um den zuweilen unregelmäßig eingedellten, chromatinarmen oder pyknotischen Kern, an dem in keinem Stadium mehr Teilungsvorgänge irgendwelcher Art zu beobachten sind, eine große Vakuole liegt. Ihr Inhalt läßt sich mit keiner der angegebenen Methoden darstellen. Sie wiederum ist umgeben vom eigentlichen Zellkörper. Dort wo das Protoplasma scharfrandig an die Vakuole grenzt, lassen sich in seiner Randzone verschiedenartig geformte, dichte, stark lichtbrechende Brocken oder Körperchen nachweisen. Oft finden sich nur zwei solcher Gebilde gegenüber den Kernpolen, oft umgeben sie den ganzen Rand wie eine Perlschnur oder verdichten sich sogar zu vollständigen Ringen. Das Protoplasma reagiert schwach eosinophil und ist angefüllt mit mehr oder minder dicht gelagerten staubförmigen Körnchen, die in ihrem färberischen Verhalten den beschriebenen gröberen Einschlüssen gleichen. Die Grenzen, dieser im allgemeinen recht umfangreichen Zellen sind gut darstellbar.

Mit Hilfe der im Anfang aufgezählten Färbemethoden gelang es, soweit histochemische Methoden überhaupt beweiskräftig sind, die Natur dieser auffälligen Zelleinschlüsse als *Keratohyalin* zu identifizieren.

Im Hämatoxylin-Eosin-Präparat färben sich die genannten Gebilde im Vakuolenrand — je nach Fixierung — blau bis rotblau; war der Schnitt zuvor mit einer Kaliumpermanganatlösung behandelt, so wurden sie nahezu schwarz. Manche von ihnen zeigen regelmäßig einen eosinophilen Hof. Mit den verschiedenen Fe-Hämatoxylinen erscheinen sie tiefschwarz. Bei *van Gieson*-Gegenfärbung werden die acidophilen Höfe orangegeb. Um eine einwandfreie Scheidung vom Chromatin zu bekommen, wandten wir die *Feulgense* Nuklealreaktion an und erzielten so eine klare Darstellung der Kerne mit allen Struktureinheiten ohne die geringste Anfärbung der fraglichen Elemente. Die endgültige Entscheidung trafen wir nach dem Ausfall 1. der Kresylechtviolett-färbung nach *Zenker*-Fixierung, bei der die Einschlüsse sich metachromatisch rötlich färbten und 2. der *Martinotti*schen Färbung zur Darstellung der Hornsubstanzen, die sehr klare Bilder liefert (Keratin violett, Keratohyalin tiefblau, Übergangssubstanz rot, Eleidin und Paraeleidin goldgelb bis orange). Hier erhielten wir eine tiefblaue Tönung der merkwürdigen Gebilde, die zuweilen von hellvioletten bis roten Höfen umgeben waren. Wir glauben uns danach berechtigt, die Einschlüsse als Keratohyalinablagerungen mit gelegentlichen Inkrustationen von Keratin oder Übergangssubstanz anzusprechen. Die staubförmigen Granulationen im Protoplasma dieser Zellen ebenso wie die als Test benutzten Körnchen im Strat. granulosum der gesunden Epidermis gaben die gleichen Keratohyalinreaktionen.

Es handelt sich also bei dieser Anordnung der H.Z. um eine besonders gestaltete Keratohyalinschicht. Bestätigt und ergänzt wird diese Annahme dadurch, daß wir an den Rändern der jungen Tumoren, wo sie in unveränderte Haut übergehen, deutlich erkennen, wie die schmale Lage des gesunden Str. granulosum fächerartig in diese Zone ausstrahlt (vgl. Abb. 1 und 2). Hier wie dort sind die Kerne im Untergang begriffen.

Auch wie in der gesunden Epidermis stößt sie unmittelbar an die Hornoberfläche unter Zwischenlagerung eines schmalen Saumes von Übergangssubstanz an. Hingegen fehlen selbst Andeutungen eines Strat. lucidum, einer Eleidinschicht, soweit das färberische Verhalten eine solche Aussage zuläßt. Paraeleidin scheint vorzukommen. Ein wesentlicher Unterschied zum Verhalten intakter Epidermis liegt noch darin, daß diese Keratohyalinzellen sich nicht abflachen, sondern bis zur Grenze der Hornschicht nahezu ihre volle Höhe beibehalten und in der Hornsubstanz selbst noch oft in Zell- und Kernkonturen nachweisbar sind. Ein Bild, das die dermatologische Histologie als *Parakeratose* kennt, während ähnliche Veränderungen, wie wir sie am Strat. granulosum soeben sahen, als *Dyskeratose* bezeichnet werden.

In den meisten Tumoren beobachtet man nach dem 11. Tage — oft in großer Menge — in oder zwischen den Zellen gelegene kreisrunde scharfumschriebene, stark eosinophile Körperchen, die, wie die Serien zeigen, mehr oder minder stark abgeplattet sind. In ihrer Größe entsprechen sie etwa großen Leukoeyten. Sie enthalten fast immer ein unregelmäßig geformtes basophiles Bröckelchen im Zentrum. Genaue Untersuchungen

haben gezeigt, daß diese Einschlüsse in den tiefsten Schichten der Tumoren, und zwar zumeist in unmittelbarer Nähe des Keimlagers *intracellulär* auftreten. Die diese Körperchen enthaltenden Zellen können um ein Vielfaches vergrößert sein. Sie bewirken dann Kompressionserscheinungen im umgebenden Gewebe; dabei treten merkwürdige schichtkugel- oder zwiebelschalenähnliche Zellkomplexe auf, deren Zentrum von solch einer Zelle mit Einschluß gebildet wird (Abb. 4). Es handelt sich dabei, wie die Farbreaktionen vermuten lassen, um Scheibchen oder Kugeln aus Übergangssubstanz, einer Vorstufe zum Keratin, mit einem zentral

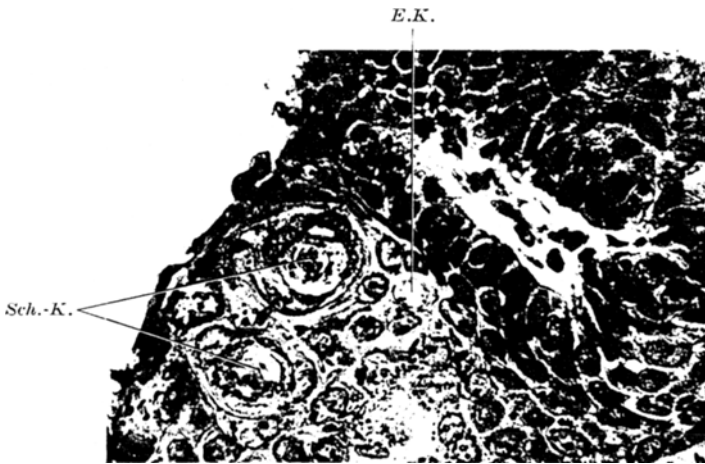


Abb. 1. Zwei Schichtkugeln (Sch.-K.) mit eosinophilen Einschlüssen, sowie ein freies eosinophiles Körperchen (E.K.). Vergr. 450 ×.

gelegenen Keratohyalinrest. Die Wirtszellen scheinen im Verlaufe der Entwicklung entweder zugrunde zu gehen — ihr Kern, der stark an den Rand gedrängt ist, wird pyknotisch — oder sie stoßen den Einschluß während einer vielleicht amitotischen Teilung aus. Wir haben Bilder, die dies vermuten lassen zu verschiedenen Malen gesehen. Wahrscheinlich kommen beide Formen nebeneinander vor. Die so freigewordenen und *intercellulär* gelagerten Körperchen werden allmählich der Oberfläche zugetragen. Sie sind sicher nicht identisch mit den oben beschriebenen Ablagerungen in der Körnerschicht.

Über Art und Weise der Entstehung beider Gruppen von „Einschlüssen“ können wir bisher nichts aussagen. Daß es sich dabei um anormale Verhornungsvorgänge — mit zum Teil intracellulärer Hornbildung handelt, ist nach allem Gesagten klar. Welche Veränderungen aber im Stoffwechsel und Chemismus vor sich gehen, welches die äußeren Ursachen sind, wissen wir nicht.

Auch in einer Anzahl menschlicher Hauttumoren und Dermatosen sind solche Einschlüsse beschrieben. Besonders die letzteren haben sogar in der Dermatologie eine bedeutsame Rolle gespielt, da sie lange Zeit für parasitäre Bildungen gehalten

wurden. Man findet sie jetzt in der Literatur als „corps ronds“ oder „grains“ beschrieben (*Darrier*).

Wir wenden uns nunmehr wieder der Weiterentwicklung der Tumoren zu, die wir im Stadium der „Polsterbildung“ verließen. Die Proliferation im Keimlager mit der Ausbildung der immer mächtiger werdenden oberflächlichen Zellagen auf räumlich beengter Basis, führt zur Entstehung von Faltungen und Zapfen.

In dieser Phase greifen Faktoren ein, die die endgültige Gestaltung der Papillome bestimmend beeinflussen. Es konkurrieren dabei die Wachstumsneigung der Geschwülste — im wesentlichen vorbestimmt durch die Menge der ursprünglich induzierten Wachstumszentren — mit mechanischen und physiologischen Eigenarten der bindegewebigen, ernährenden Unterlage.

Die entzündlichen Prozesse im Stroma, die schon im Anfange der Entwicklung erwähnt werden, kommen kaum jemals vollständig zur Ruhe; selten sehen wir auch jetzt bedeutendere leukocytaire Exsudate. Sie kommen nur bei Infektionen im Gefolge von Oberflächenverletzungen vor; in diesen Fällen können dann auch die Tumorschichten von Leukoeyten stark durchsetzt sein. Produktive Prozesse hingegen gehören zur Regel und sie führen oft schon in der zweiten Woche zu einem derben kollagen-bindegewebigen Lager im subepithelialen Bindegewebe. Dieses kann von recht großkalibrigen Gefäßen durchzogen sein, die sich am Grunde der Tumoren in Capillaren aufteilen. Sie sind, wie auch die Lymphspalten, die richtige kavernöse Räume bilden können, weit und meist stark gefüllt. Zwischen der kollagenen Schranke und der Tumorunterfläche findet sich immer ein schmaler Bezirk von lockerem, sehr saftreichem Gewebe. Neubildung oder Schwund von elastischen Fasern in wesentlichem Ausmaße konnten wir im Verlaufe dieser Vorgänge nicht beobachten.

Blieb das subepitheliale Bindegewebe im Bereich der Tumoren verhältnismäßig locker und gut durchblutet, so stehen sowohl der Epithelzapfen- wie ausgiebiger Papillenbildung keine Hemmungen entgegen; selbst bei starker Wachstumsneigung wird das Geschwulstgewebe gut mit Nährstoffen versorgt und bleibt succulent. Hat sich aber eine derbere Bindegewebsschranke ausgebildet oder sind die Unterlagebedingungen von vornherein ungünstiger, wie dies z. B. auf den Ohrmuscheln der Fall ist, so leidet die Blutversorgung der wachsenden Tumoren leicht Mangel und es entstehen derbe flach-aufsitzende Papillome, deren Spitzen frühzeitig nekrotisieren. Wir haben auch den Eindruck, den wir jedoch an unserem Material noch nicht mit Sicherheit beweisen können, daß diese letzteren Geschwülste viel stärker und früher verhornen als die gut ernährten. In jedem Falle aber kommt es zu einer gewissen *Hyperkeratose* der im Wachstum fortgeschritteneren Tumoren.

Einem P.Z., das seine Entstehung nur einer oder wenigen „infizierten“ Zellen verdankt, kommt auf jeden Fall selbst bei günstigsten Ernährungsbedingungen nur eine recht beschränkte Wachstumsmöglichkeit zu. Unter gleichen zusätzlichen Voraussetzungen werden immer die Papillome am stärksten wachsen, die sich aus der größeren Anzahl und den von



vornherein ausgedehnteren P.Z. bilden. Aber auch die größten Tumoren, die wir sahen, erreichten das Ende ihres makroskopisch wahrnehmbaren Wachstums spätestens nach 4—6 Wochen.

Die zwischen den einzelnen Geschwulstzentren gelegenen Partien normaler Epidermis bleiben erhalten, solange sie von den benachbarten Geschwulstteilen nicht zu schwer geschädigt werden. Ist dies aber der



Abb. 5. Papillom im Rückgang. Nahezu normale Epidermis, nekrotisierende austrocknende Papillomspitzen und wohlerhaltene Papillome nebeneinander. Lokalisierte Elephantiasis der Subcutis. Vergr. 17 · .

Fall, so atrophieren sie schnell und gehen zugrunde. Ebenso verfallen die Haarwurzeln und Talgdrüsen allmählich der Atrophie.

An dieser Stelle sei eine Beobachtung kurz erwähnt, die wir makroskopisch früher schon genau beschrieben haben<sup>4</sup>. Es handelte sich dabei um ein großes vollentwickeltes Papillom, das nicht wie in der Regel äußerlich unverändert bestehen blieb bzw. maligne entartete, vielmehr unter eigenartigen Veränderungen im dazugehörigen Bindegewebe vollkommen zur Rückbildung kam (Abb. 5). In zentimeterdicker Schicht hatte sich unter den Epithelwucherungen eine succulent-elastische Schwellung ausgebildet, die in ihrem histologischen Aufbau aus zellarmem, feinfaserigem, weitmaschigem, kollagenem Geflecht bestand, das in Abständen von Zügen parallel gerichteter Bindegewebsfasern senkrecht zur Oberfläche durchzogen war. Gegen die Epithelgrenze bildete eine weitere Lage derber leingebender Fasern den Abschluß. Das Bild läßt sich am ehesten mit den Folgen einer umschriebenen, chronischen Lymphstauung, einer lokalisierten Elephantiasis vergleichen. Über seine

Entstehung wissen wir nichts. Nach völliger Rückbildung der Papillome, die vom Zentrum her peripherwärts unter Eintrocknungserscheinungen vor sich ging, sind dann auch im Verlaufe von Monaten die beschriebenen Veränderungen in der Subcutis wieder restlos verschwunden.

Die Melaninpigmentbildung im Tumor verläuft anscheinend ungestört, ebenso wie sein Abtransport. Über gewisse Pigmentierungsanomalien im inokulierten Gebiet werden wir später im Zusammenhang berichten (Vgl. a. a. O.<sup>4</sup>).

Damit wäre die erste Entwicklungszeit des Papilloms abgeschlossen: sie entspricht einem Zeitraum von etwa 2—3 Monaten, nach denen makroskopisch über lange Zeit hin nur sehr geringe Veränderungen statt haben. Das Wachstum in horizontaler und vertikaler Linie — Proliferation und Ausdifferenzierung — sind in einen vorläufigen Gleichgewichtszustand getreten. Daß aber keineswegs ein Ruhezustand vorliegt, nicht einmal in dem Sinne wie etwa in der gesunden Epidermis, in der ja auch ein unentwegtes Absterben und Neuentstehen im Gange ist, sollen die weiteren Betrachtungen zeigen.

Der Periode des „gutartigen Tumors“ folgt nun ein Stadium *präcancerotischer Veränderungen*. Während schon bisher Mitosen und Teilungsvorgänge in den Keimlagern nachweisbar waren, so sind die folgenden Bilder geradezu durch ihren ungewöhnlichen Reichtum an solchen gekennzeichnet. Unzweifelhaft dienen die dabei neugebildeten Zellen *auch* zum Nachschub für die in der oft sehr bedeutenden Hornproduktion aufgehenden Elemente. Aber gleichzeitig vollzieht sich eine Um- und Entdifferenzierung in den Zellaggregaten sowie ein scharfer „Grenzkampf“ zwischen Epithel und Bindegewebe, bei den einzelnen Tumoren in verschiedener Geschwindigkeit und wechselndem Ausmaß. Immer aber sind diese Vorgänge morphologisch faßbar und erreichen in dem Augenblick ihre höchste Bedeutung für den Wirtsorganismus, wo aus der „Präcanerose“ das Carcinom wird. Daß solche Prozesse aber nur bei fortdauernder Neubildung jugendlicher Zellen vor sich gehen können, liegt in den Voraussetzungen des Geschehens begründet.

Die Entdifferenzierung zeigt sich in der Verschiebung der Anteilsverhältnisse von Intermediärzone und „Zone der H.Z.“ im Gesamtaufbau der Geschwulst zugunsten der ersteren. Langsam verdrängt die jugendlichere Tumorkomponente das höher differenzierte Gewebe. Man sieht dann bei besonders ausgesprochenen Fällen im ganzen Zellager oberhalb der Keimschicht ein Bild, das zwar der Intermediärzone weitgehend ähnelt, deren Zellen aber vereinzelt Keratohyalinbrocken und -körner enthalten. Auch kommt es zu mehr oder weniger ausgesprochenen Vakuolenbildungen um die Kerne, die größtenteils noch wohlstrukturiert sind und erst in den oberflächlichsten Schichten zugrunde gehen. Die Architektur kann auf diese Weise weitgehend verändert sein (Abb. 6). Dabei werden die äußersten Schichten weit plötzlich als vordem vom Verhornungstode befallen. Man findet stellenweise sehr ausgesprochene

Parakeratosen. Mitosen konnten wir bis in die zweite und dritte Zellage dieser verwandelten Zwischenschicht beobachten.

Der Grenzkampf gibt sich darin zu erkennen, daß in umschriebenen Bezirken der ursprüngliche Rhythmus im Keimlager durchbrochen ist



Abb. 6.

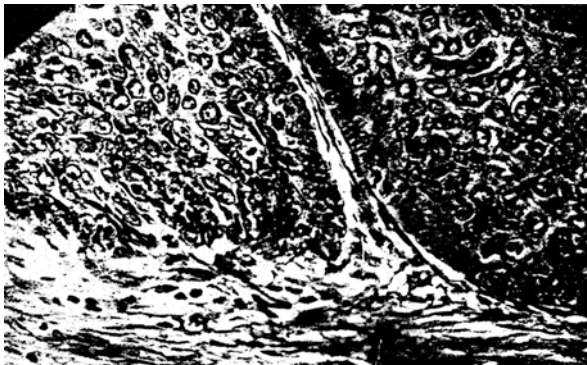


Abb. 7.

Abb. 6 und 7. *Präcancerose*.

Abb. 6. Entdifferenzierung. Reiche Gliederung und Faltung. „Helle Zellen“ nur noch in ganz schmaler Schicht an der Verhornungsgrenze. Vergr. 17  $\times$ . Abb. 7. Grenzkampf. Rechts: regelmäßige Grenzlinie; links: Zerstörung der Basalmembran, Auflösung des Rhythmus im Keimlager (127. Tag). Vergr. 250  $\times$ .

und an Stelle der sonst wohlaufgereihten Pallisaden Epithelien mehr oder minder regellos in das unterliegende Bindegewebe vorgedrungen sind. (Abb. 7). Die Zahl der Mitosen ist in diesen Gebieten besonders groß. Die Bilder sprechen dafür, daß die Grenzmembran, soweit eine solche wirklich vorhanden, in ihrer Kontinuität unterbrochen wurde. Schon etwa 3 Monate p. inoc. können diese Erscheinungen beobachtet werden. Sie

häufen sich mit zunehmendem Alter der Tumoren. Es vergehen aber dennoch wieder Monate und Monate bis das Prinzip des geordneten Wachstums endgültig durchbrochen wird und unregelmäßige, infiltrierende, destruierende Proliferation die Oberhand gewinnen: bis aus dem „gut-

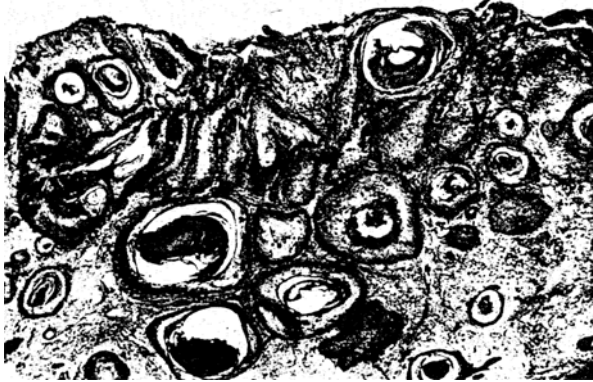


Abb. 8.

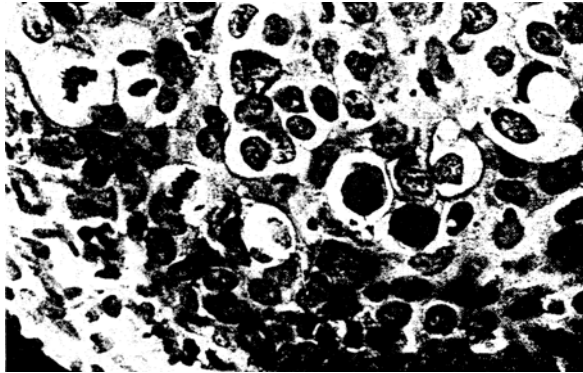


Abb. 9.

Abb. 8 und 9. *Carcinom*.

Abb. 8. Endgültige Überschreitung der Epithelgrenzlinie, Tiefenwucherung der Zapfen. Vergr. 17 $\times$ . Abb. 9. Aus der Randpartie eines Zapfens: Zell- und Kernpolymorphie, Mitosenreichtum mit atypischen und Riesenformen. Vergr. 740 $\times$ .

artigen“ Papillom über ein Stadium der Präcancerose das Carcinom geworden ist.

Einen solchen Fall haben wir in die Betrachtung miteinbezogen, weil er geeignet ist, den vorläufigen Schlußstein für die Untersuchungen abzugeben. Hier ist an mehreren Stellen gleichzeitig die Epithelgrenze durchbrochen und die ins unterliegende Bindegewebe eindringenden Epithelzapfen proliferieren hemmungslos in die Tiefe (Abb. 8). Kein Zweifel

besteht auch darüber, daß der Aufbau der einzelnen Zapfen alle Zeichen der malignen Entartung bietet: Gewebsunordnung, Zell- und Kernpolymorphie sowie enormen Mitosenreichtum mit weiter Verbreitung atypischer Teilungsabbildungen (Abb. 9).

Die Darstellung der Entstehungsweise der einzelnen Carcinomformen, die sich auf der Basis der Papillome entwickeln können, ist ausführlich von Rous und seinen Mitarbeitern beschrieben worden<sup>7</sup>.

### Diskussion.

Es erscheint uns notwendig, abschließend an Hand der Befunde eine Reihe theoretischer Fragen kurz zu besprechen.

Können wir aus den Anfangsbildern der Tumorentwicklung ersehen, in welchen Zellen oder Zellgruppen das wirksame Agens bei der Inokulation angreift? Wir glauben dies bejahen zu dürfen.

Das erste „spezifische Bild“ liegt uns in den P.Z. des 5. Tages vor und es wurde gezeigt, daß wir es dabei mit Zellgruppen zu tun haben, die im Endstadium einer Entwicklung stehen, und zwar einer krankhaft veränderten, atypischen. Wir haben ferner zeigen können, daß diese so veränderten Zellen in enger verwandtschaftlicher Beziehung zu normalen Differenzierungselementen der Haut stehen. Ihnen selbst kommt keinerlei Proliferationsfähigkeit mehr zu. Sie können also nur Ausdruck eines krankhaften Geschehens sein, nur Symptom. Ihre Abstammung zum darunterliegenden Keimlager gehört zu den natürlichen Voraussetzungen eines jeden Wachstumsprozesses. Wir gehen also kaum fehl, wenn wir annehmen, daß der Angriffspunkt des „*ens morbi*“ an den Zellen der Keimschicht liegt. Die ersterkrankten Zellen können wir mit unseren heutigen Methoden nur an ihren abgewandelten Lebensfunktionen erkennen und müssen aus Indizien den Kreis der gegebenen Möglichkeiten einzunengen suchen.

Wir wissen aus Erfahrung, daß die wirksame Substanz *nur* dann den Weg zum Bereitschaftssystem findet, wenn wir sie auf die verletzte Haut einwirken lassen; kein anderes Organ zeigte sich bisher empfänglich; ferner können wir mit Bestimmtheit aussagen, daß die charakteristische Wirkung des unbekannten Stoffes darin liegt, Proliferationsvorgänge zu erzeugen; somit ist auch in diesen Feststellungen ein Beweisstück für die Auffassung gegeben, daß der Angriffspunkt des „Virus“ im Keimlager zu suchen ist. Es muß an oder in die Zellen des Strat. germinativum gelangen, um zu wirken.

Werden nun alle Zellen dieser Schicht im scarifizierten Bezirk primär „infiziert“ und kann vielleicht überdies nach erfolgter „Infektion“ eines Zellkomplexes die Erkrankung auf die Nachbarelemente übergreifen?

Daß nicht alle Keimlagerzellen des Inokulationsbezirks gleichmäßig ergriffen werden, geht aus dem Gesagten deutlich hervor, denn wir sahen,

daß je nach der Wirksamkeit der verimpften Extrakte viele engstehende oder wenige sporadische Tumorzentren auf gleich großen Gebieten entstehen. Die Anzahl ersterkrankter Zellen ist demnach in gewissen Grenzen proportional der „Virulenz“ der verimpften Ausgangsextrakte. Wieviele Zellen aber mindestens „infiziert“ sein müssen, um Ausgangsstätte eines Tumors zu werden, das kann man solange nicht einwandfrei entscheiden, wie uns keine Möglichkeiten zur Verfügung stehen, entweder *eine* Zelle zu infizieren oder die Zeichen der „Erstinfektion“ mit Sicherheit zu erkennen.

Es liegen aber kaum begriffliche Schwierigkeiten vor, einer Zelle allein diese Möglichkeiten zuzuschreiben. In diesem Sinne sprechen auch Befunde, bei denen wir die Entwicklung besonders kleiner P.Z. beobachten konnten, deren Abstammung von einer einzelnen Keimlagerzelle aus dem histologischen Bilde hervorzugehen scheint. Wie aber schon oben betont wurde, ist die Wachstumsenergie so kleiner Geschwulstzentren gering: sie scheinen vielmehr verhältnismäßig leicht wieder dem Untergange zu verfallen.

Daß eine nachbarliche „Ansteckung“ von einmal erkrankten Zellen aus nicht vorkommt — oder zum mindesten nicht in der Regel —, haben die amerikanischen Autoren in beweiskräftigen Versuchen nachgewiesen<sup>6</sup>, in denen sie gesunde und Tumorkaninchen unter den verschiedensten Bedingungen in nachbarlichen Kontakt gebracht haben. Nie kam es dabei zur Geschwulstbildung im Bereich der intakten Epidermis. Unsere eigenen Befunde können nur als Ergänzung dazu gewertet werden. Die konzentrische, wohlbegrenzte Ausbreitung der Einzelherde sowie die persistierenden kleineren oder größeren Gebiete gesunder Haut zwischen Papillomherden sprechen im Sinne der genannten Erfahrungen.

Wichtig ist, darauf hinzuweisen, daß die Wachstumsfähigkeit der Einzelgeschwülstchen in den Stadien der absoluten oder relativen Gutartigkeit eine durchaus und in engen Grenzen beschränkte ist.

Ein Problem wird bei der Papillomentstehung immer wieder zu Diskussionen Anlaß geben: Kommt dem Stroma eine bestimmende oder induzierende Bedeutung für die Entwicklung der Tumoren zu?

Für das *Shopesche* Kaninchenpapillom glauben wir diese Frage entschieden ablehnen zu dürfen, soweit es sich um die primären Entstehungsursachen und -bedingungen handelt; alle Befunde sowie die vorstehende Diskussion scheinen uns diese Auffassung genügend zu rechtfertigen. Daß hingegen das Stroma eine Bedeutung für die Formgebung und Weiterentwicklung der Tumoren hat, ist oben ausführlich erörtert. Wieweit das mesenchymale System möglicherweise in den Vorgang der malignen Entartung eingreift, soll an dieser Stelle nicht besprochen werden.

Im Zusammenhang mit der Frage der „Virus“-Veränderungen spielen „spezifische“ Zelleinschlüsse eine Rolle. Wir haben — ebenso wie die

Voruntersucher — keinerlei für diesen Tumor charakteristische Einschlüßkörperchen nachweisen können. Sowohl die Keratohyalinablagerungen in der Zone der H.Z. wie auch die „corps ronds“, die beide ausführlich beschrieben sind, kennen wir aus einer Reihe von Hauttumoren und Dermatosen; besondere Ähnlichkeit auch im Gesamterscheinungsbild scheint uns zu der Gruppe der dyskeratotischen Erkrankungen, dem Morbus Paget, der *Bowenschen* Dermatose und dem Epithelioma pagetoides zu bestehen. Wir behalten uns vor, diese Frage in einer späteren Arbeit abzuhandeln.

Über die Entstehungsursachen der Einschlüsse und den Chemismus ihrer Bildung ebenso wie über die Gründe der fehlerhaften Ausdifferenzierung der einzelnen Schichten können wir bisher nichts Sicheres aussagen. Ebenso wenig darüber, ob oder welche Zusammenhänge — auch morphologischer Art — zwischen erzeugendem Agens, dem „Virus“ bzw. seinen Vermehrungs- oder Spaltprodukten und diesen Erscheinungen bestehen.

Anhangsweise sei kurz berichtet, daß wir seit langem bemüht sind, Elementarkörperchen im Tumorgewebe, d. h. in Ausstrichen, Autolysaten und Schnitten nachzuweisen. Schlüssige Befunde waren bisher nicht zu erzielen.

### Zusammenfassung.

1. Die Histogenese des *Shopeschen* Kaninchenpapilloms wird an Hand von 26 Impfbezirken bzw. Tumoren vom 1. bis 334. Tage nach der Inokulation dargestellt.

2. Die ersten morphologisch-charakteristischen Veränderungen stellen die „P.Z.“ dar; sie bestehen jedoch aus nicht mehr teilungsfähigen Ausdifferenzierungen der eigentlichen Wachstumszentren. Diese liegen im Keimlager der Epidermis.

3. Bei der Einimpfung der tumorerzeugenden Extrakte werden Zellkomplexe der Keimschicht direkt „infiziert“. Die Papillome entstehen multizentrisch. Jeder Einzelherd wächst nur aus sich heraus.

4. Dem gefäßführenden Bindegewebe und Stroma kommt nur eine ernährende, und damit sekundär-formende Bedeutung zu.

5. Die einzelnen Zellschichten des Tumors können von den verschiedenen Lagern der gesunden Epidermis entwicklungsmäßig abgeleitet werden; sie tragen die Zeichen pathologisch-veränderter Funktionen.

6. Nach Abschluß des eigentlichen Wachstums der Papillome setzt eine Periode ein, in der tiefgreifende Änderungen im feineren Zellgefüge — langsame Entdifferenzierung und stetig zunehmender Epithel-Bindegewebs-Grenzkampf — die präcancerotische Bedeutung dieser Phase zeigen.

7. Die nachgewiesenen Zelleinschlüsse sind für das *Shopesche* Papillom nicht spezifisch. Sie finden sich vielmehr in ganz ähnlicher

Weise bei einer Reihe von menschlichen Hauterkrankungen, unter ihnen vor allem bei den dyskeratotischen Tumoren. Histochemisch geben sie die Reaktionen verschiedener Hornsubstanzen.

8. Ausgedehnte Versuche zum Nachweis von Elementarkörperchen haben bisher zu keinem sicheren Ergebnis geführt.

#### Schrifttum.

- <sup>1</sup> *Beard, J. W.* u. *P. Rous*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **33**, 191—193 (1935). —
- <sup>2</sup> *Kidd, J. K.*, *J. W. Beard* u. *P. Rous*: J. of exper. Med. **64**, 1, 63—77 u. 79—96 (1936). — <sup>3</sup> *Ladewig, P.*: Virchows Arch. **298**, 3, 636—639 (1937). — <sup>4</sup> *Ladewig, P.*: Schweiz. med. Wschr. **67**, 8, 165 f. (1937). — <sup>5</sup> *Oberndorfer, S.*: Vortrag 2. internat. Kongr. Krebsforsch. Brüssel 1936. — <sup>6</sup> *Rous, P.* u. *J. W. Beard*: J. of exper. Med. **60**, 6, 701—766 (1934). — <sup>7</sup> *Rous, P.* u. *J. W. Beard*: J. of exper. Med. **62**, 4, 523—548 (1936). — <sup>8</sup> *Rous, P.* u. *J. W. Beard*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **32**, 193—195 (1935). — <sup>9</sup> *Rous, P.* u. *J. W. Beard*, *J. G. Kidd*: J. of exper. Med. **64**, 3, 401—421 (1936). — <sup>10</sup> *Rous, P.*, *J. G. Kidd* u. *J. W. Beard*: J. of exper. Med. **64**, 3, 385—400 (1936). — <sup>11</sup> *Shope, R. E.* with a note by *E. W. Hurst*: J. of exper. Med. **58**, 5, 607 bis 624 (1933).