

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

Experimentelle und morphologische Untersuchungen zur Tumorimmunität.

I. Immunisierungsversuche¹.

Von

Dr. Alexander Symeonidis.

(Eingegangen am 17. Januar 1939.)

Einleitung.

Eine der ersten wichtigen Beobachtungen, die in der Anfangszeit der experimentellen Geschwulstforschung gemacht wurde, war das Phänomen der Tumorimmunität. *Jensen* stellte am Anfang des Jahrhunderts bei den ersten gelungenen Übertragungen von Tumoren von Tier zu Tier fest, daß Tiere, bei denen eine erste Geschwulstimpfung nicht anging oder der angegangene Tumor sich wieder zurückbildete, gegen eine zweite Tumorimpfung refraktär blieben. Diese Beobachtung gab den Antrieb zu weiterer eifriger Erforschung dieser Erscheinung, welche mit der Immunität bei Infektionskrankheiten verglichen wurde. *Ehrlich* in Deutschland, *Bashford* in England, *Borrel* in Frankreich und ihrer Schüler haben ihrer Zeit diese Frage eingehend untersucht. Durch die Arbeiten dieser Forscher wurden die Grundlagen unserer heutigen Kenntnisse über die Tumorimmunität festgelegt. Seitdem ist unendlich viele und mühevoller Arbeit auf diesem Gebiet geleistet worden. Aber die Hoffnungen, die man damals für eine erfolgreiche Bekämpfung des Krebses durch diese rein biologischen Mittel gehegt hat, sind bis heute nicht erfüllt worden.

Die Geschwulstimmunität, welche seit 4 Jahrzehnten eine der Hauptfragen der Krebsforschung bildet, bleibt immer noch auf das Gebiet der Impftumoren beschränkt, so daß wenn man heute von Tumorimmunität spricht, man die angeborene oder erworbene Immunität von Versuchstieren gegen Impftumoren versteht.

Abgesehen von der Immunität bei den Virustumoren (*Rous-Sarkom* der Hühner), die eine Frage für sich bildet, sind wir über die angebliche Immunität gegen Spontantumoren oder experimentell erzeugten Geschwülste vollkommen im Unklaren. Aber auch selbst über die Impftumorenimmunität sind unsere Kenntnisse, trotz eifriger Arbeit nicht viel weiter fortgeschritten als sie zur Zeit *Ehrlichs* waren. *Caspari*, *Uhlenhut*,

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

Murphy, Bisceglie, Roffo und so viele andere haben diese Frage durch wertvolle Arbeiten wesentlich vorwärtsgetrieben. Aber das Kernproblem der Tumorimmunität wurde bis heute nicht gelöst.

Das tiefere Wesen der Geschwulstimmunität bleibt uns immer noch unbekannt. Es ist noch nicht geklärt worden, ob es sich hier um eine echte Immunität im bakteriologischen Sinne handelt. Irgendwelche spezifische Antikörper wurden bisher nicht gefunden. Eine bei jeder Art von Impftumoren und bei jeder Tierrasse ständig erfolgreiche Immunisierungsmethode wurde, trotz der Fülle solcher Methoden, bisher nicht erfunden.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. *Rössle*, habe ich mich der Aufgabe unterzogen, die bisher angewandten Verfahren zu einer Erzeugung von Resistenz gegen die Übertragung von Impfgeschwüsten einer kritischen Nachprüfung zu unterziehen und dabei die Morphologie dieser Art Immunität aufzuklären.

Bevor ich zum Ziele meiner morphologischen Untersuchungen gelangte, mußte ich mühselige und zeitraubende Immunisierungsversuche durchführen, die mir das nötige Material von immunen Tieren liefern würden. Dies führte mich zur Prüfung der wesentlichen bisher bekannten Immunisierungsverfahren und zur Ausarbeitung von einigen eigenen Immunisierungsmethoden. Diese experimentellen und morphologischen Tumorimmunitätsuntersuchungen erlaubten mir einen tieferen Blick in das Wesen der Tumorimmunität.

In dieser Arbeit wird über diese Immunisierungsversuche berichtet.

Versuchsmaterial und Methoden.

Die Erzielung eines möglichst einwandfreien Ergebnisses hing von der richtigen Auswahl einerseits der Impftumorenstämme und andererseits der Tierstämme mit denen die Versuche ausgeführt werden sollten, ab. Erforderlich war seitens der Impftumoren ein konstanter 100% Angang und seitens der Versuchstiere eine konstante Empfänglichkeit.

Die mir zu Verfügung stehenden Tumorstämme waren die gleichen, mit denen *Rössle* seine Untersuchungen über die Anfänge des Impftumorwachstums ausgeführt hat.

Es handelt sich um 3 Impftumoren, ein *Ehrlich-Carcinom*, ein *Ehrlich-Sarkom* (weiter als Stämme „Ca“ und „Sa“ bezeichnet), ein *Jensen-Sarkom*, sowie um einige Spontantumoren der Maus.

Beide *Ehrlich*-Impftumorstämme gingen bei gesunden Mäusen zu 100% an. Es waren aber beide Tumorstämme nicht von gleicher Virulenz. Der Virulenzgrad der Impftumoren findet seine äußerste Grenze nicht nur an dem 100%igen Angang. Darüber hinaus zeichnete sich der Stamm „Sa“ durch ein schnelleres Wachstum, durch den früheren Eintritt des Todes der Versuchstiere und durch den Ansatz von Metastasen aus. Die mit „Ca“ geimpften Tieren starben durchschnittlich 5—6 Wochen nach

der Impfung. Der Tumor erreichte in 10 Tagen durchschnittlich die Größe einer großen Bohne bis einer Haselnuß. (Die Tumorimpfung bei der Stammweiterführung wurde ständig durch Stückchentransplantation vorgenommen.) Die heranwachsenden Tumoren wurden *in vivo* 2mal wöchentlich gemessen. Beim Stamm „Sa“ die Mäuse starben durchschnittlich 3—4 Wochen nach der Transplantation. Nach 10 Tagen erreichte der geimpfte Tumor die Größe einer Haselnuß bis einer Kirsche, wobei beim Tode der Tiere öfters der Tumor beim Stamm „Ca“ größer als beim Stamm „Sa“ war. Weiter zeigte der Stamm „Sa“ einen bedeutenden Unterschied vom Stamm „Ca“. Der erstere setzte zahlreiche makroskopisch sichtbare und umfangreiche Metastasen, während beim Stamm „Ca“ keine Tochtertumoren festzustellen waren. Wie sich weiter herausstellte waren die Zellen des Tumorstammes „Sa“ bedeutend virulenter als die Zellen des Tumorstammes „Ca“. Durch eine von mir ausgearbeitete sehr empfindliche Messung der Geschwulstzellenvirulenz wurde festgestellt, daß zur Zeit höchster Virulenz des Stammes „Sa“ schon 3000 Zellen den Tumorangang sicherten. Nach dieser Virulenzmessung bezeichnetet die Zahl der Zellen, welche den Angang eines Tumors ständig sichert, den Virulenzgrad (im Sinne der Übertragbarkeit) dieses Impftumors. Die Zahl der Tumorzellen, die nur gelegentlich einen Tumor erzeugen, zeigt die unterste Stufe des Tumorvirulenzgrades an. Es wird daher der Virulenzgrad eines jeden Impftumors durch 2 Zahlen bezeichnet. Durch die „absolut minimale“ und die „optimal minimale“ Zahl von Geschwulstzellen, die gelegentlich und ständig einen Tumor erzeugen.

Zur Zeit der durchschnittlichen Virulenz des Stammes „Sa“ war seine „absolut minimale“ wirksame Dosis 50000 Zellen, die „optimal minimale“ 400000 Zellen. Beim Stamm „Ca“ war die erste ungefähr 400000 Zellen, die zweite über $1\frac{1}{2}$ Millionen Zellen. Der Virulenzgrad des „Ca“ blieb fast ständig unverändert, während das „Sa“ bedeutende Schwankungen zeigte. Aber der „Sa“-Stamm war auch zur Zeit seiner niedrigsten Virulenz unvergleichlich virulenter als der „Ca“. Dieser exakt gemessene Virulenzunterschied zwischen meinen Impftumoren zeigte sich bei den Immunitätsuntersuchungen von grundsätzlicher Bedeutung. Über weitere Einzelheiten zur Frage der Tumorvirulenz verweise ich auf meine Arbeit über diese Frage, wo auch ausführlich über die Eigenschaften meiner Tumorstämme berichtet wurde¹.

Was die Versuchstiere anbetrifft, braucht nach dem oben Gesagten nicht viel weiter darauf eingegangen werden. Ich verfügte über keinen eigenen „reinen“ Tierstamm, welcher eine rassisch bedingte konstante Empfänglichkeit gesichert hätte. Aber angesichts des konstanten 100%igen Angangs beider *Ehrlich*-Tumoren darf die Empfänglichkeit meiner Versuchstiere als gleichartig betrachtet werden, so daß auch die

¹ Virchows Arch. 300, 429 (1937).

zweite Bedingung für die möglichst einwandfreie Durchführung der Experimente als erfüllt angesehen werden kann.

Über die Eigenschaften des *Jensen*-Sarkomstammes, der in dieser Arbeit nur als Vergleichsmaterial verwendet wurde, wird an anderer Stelle berichtet.

Zusammengefaßt darf also behauptet werden, daß die Tumorstämme mit denen meine Immunitätsuntersuchungen ausgeführt wurden, stark virulent waren. Sog. „Nuller“, mit denen meist frühere ähnliche Untersuchungen ausgeführt wurden, standen mir nicht zur Verfügung. Immunität konnte also nur künstlich erreicht werden. Die künstlich immunisierten Tieren sind Organismen gewesen, die sicher eine „Umstimmung“ erfahren haben. Ob diese „Umstimmung“ eine echte Immunität im bakteriologischen Sinne ist, bleibt eine Frage, die vorläufig offen gelassen wird.

Viele Methoden zur künstlichen Tumorimmunitätserzeugung sind bisher bekannt gemacht. Chemische Substanzen, Strahlen, normale und Tumorgewebe sowie ihre Extrakte sind die meist angewandten Mittel für eine Tumorimmunitätserzeugung. Ich habe mich auf diejenigen Verfahren beschränkt, die methodisch mehr dem Begriffe „Immunität“ — im engeren Sinne — entsprechen und nicht schlechthin irgendeiner Resistenzsteigerung, also auf die Immunisierungen durch normale und Tumorgewebe sowie ihre Extrakte. Die ersten bezeichne ich als „unspezifische“ und die letzteren als „spezifische“ Immunisierungsmethoden. Weiter habe ich auch eigene Methoden ausgearbeitet, die zu den spezifischen gehören.

Bevor ich zu den einzelnen Versuchen übergehe, möchte ich, um Wiederholungen zu vermeiden, die Bezeichnungen definieren, welche weiter unten sehr oft wiederholt gebraucht werden. Zusammen mit *Caspari* bezeichne ich als *absolut immune*, diejenige Tiere bei denen nach Immunisierungsbehandlung die Erfolgsimpfung absolut negativ blieb. Als *relativ immune*, diejenige Tiere bei denen die Erfolgsimpfung anging aber das Wachstum des Tumors später als bei den Kontrollen eintrat und die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren hinter derjenigen bei den Kontrolltieren blieb. Die Kontrollen starben früher als die relativ immunen Tiere. Da die relative Immunität nicht immer gleichen Grades war, habe ich sie der Kürze halber in 3 Stufen geteilt: Die „schwache“, die „mäßige“ und die „starke“ relative Immunität.

Es wurde besonders darauf geachtet, daß die erste Stufe, nämlich die „schwache“ relative Immunität, mit den üblichen individuellen Schwankungen der Empfänglichkeit nicht verwechselt wurde, so daß stets die Grenzen des „normergischen“ und des „allergischen“ weit auseinander gehalten worden sind. Im folgenden werden die absolute und die relative Immunität mit den ersten Buchstaben dieser Worte (A.I. und R.I.) bezeichnet. Alle Versuche wurden nur mit männlichen

jungen Tieren ausgeführt und neben jeder Versuchsreihe wurde eine Reihe von Kontrolltieren aufgestellt.

I. Unspezifische Immunisierungsmethoden.

a) Immunisierungsversuche mit Embryonen- und Placentageweben.

Immunisierungsversuche gegen Impftumoren mit Embryonengeweben wurden zuerst von Schöne im Institut Ehrlichs vorgenommen. Die Ergebnisse waren ermunternd. Eine Anzahl der auf diese Weise vorbehandelten Tiere blieb gegen ein Ehrlich-Carcinom A.I. Noch befriedigender waren die Ergebnisse bei Vorbehandlung mit Embryonenhaut. Bashford bestätigte teilweise die Befunde Schönes. Dabei stellte er fest, daß die Auswirkung dieser Methode eine verschiedene bei den verschiedenen Stämmen von Impftumoren war. Diese grundlegende Beobachtung Bashfords gilt für sämtliche bisher bekannten Immunisierungsmethoden. Bashford und seine Mitarbeiter stellten fest, daß bei Tieren, welche mit Embryonenhaut vorbehandelt waren und dann mit einem Plattenepithelecarcinom nachgeimpft wurden, die Immunitätserscheinung häufiger war. Dies führten sie auf die Verwandtschaft des Plattenepithels der Epidermis und des Carcinoms zurück. Über die immunisierende Eigenschaft des Placentagewebes berichtet Murphy.

Für die Immunisierung mit Embryonenbrei habe ich 2 Versuchsreihen von je 20 Mäusen (im folgenden als Reihe „Ca“ und „Sa“ genannt) angestellt. Der Embryonenbrei wurde folgendermaßen zubereitet. Die Embryonen wurden unter aseptischen Kautelen dem Uterus trächtiger Mäuse entnommen, wobei darauf geachtet wurde, daß die Embryonen nicht zu groß seien. Sofort nach der Entnahme wurden sie mit der Schere zerstückelt und dann zu einer breiigen Emulsion von 1 Teil Gewebe und 4 Teilen Ringersche Lösung im Mörser verrieben. Die ganze Behandlung fand stets bei tiefen Temperaturen statt. Um Wiederholungen zu vermeiden, sei hier erwähnt, daß die Bereitung von breiigen Emulsionen auch von anderen Geweben, über die im folgenden berichtet wird, in gleicher Weise geschah.

Jede Maus erhielt subcutan 0,5 ccm des frischbereiteten Breies. 10 Mäuse von jeder Reihe wurden weiter 2mal im Abstand von 5 Tagen mit der gleichen Menge des Breies subcutan gespritzt. Die Vorbehandlungsimpfungen erfolgten stets an der linken Hälfte des Rückens und die Erfolgstransplantation des Tumors weit davon entfernt in die rechte Hälfte des Rückens der Tiere.

Von beiden Reihen wurde die Hälfte von den einmal und die Hälfte von den 3mal vorbehandelten Mäusen 17 Tage nach der letzten Impfung mit Stückchen von „Ca“ und „Sa“ geimpft. Gleichzeitig wurde die gleiche Anzahl von Kontrolltieren mit den gleichen Tumoren geimpft.

Ergebnis. Keine A.I. Eine Maus der ersten Reihe (mehrmales vorbehandelt) ging frühzeitig ein. Von den übrigen mehrmales vorbehandelten Mäusen der „Ca“-Reihe zeigte 1 Tier eine „starke“ R.I., 2 Tiere waren „mäßig“ R.I. und eine vierte Maus war kaum „schwach“ R.I. Von den

einmal gespritzten Tieren zeigte 1 Tier eine „schwache“ R.I., die übrigen Tiere verhielten sich normal.

Bei der „Sa“-Reihe zeigten von den mehrmals vorbehandelten Tieren 3 Tiere eine „schwache“ R.I. Alle einmal geimpften Tiere blieben normal.

Die 20 übrigen vorbehandelten Mäuse (je 10 Tiere) wurden nicht nachgeimpft und zur weiteren Beobachtung aufbewahrt. Von den 10 einmal geimpften Tieren bildeten sich bei 4 Mäusen kleine „Embryome“ von der Größe einer Bohne bis einer Haselnuß. Bei den mehrmals vorbehandelten Tieren bildeten sich nur auf 2 Mäusen haselnüßgroße „Embryome“. Bei sämtlichen Tieren gingen die „Embryome“ innerhalb 4 Wochen zurück. Eines von diesen Tieren starb frühzeitig. Die übrigen Tiere wurden nach dem Rückgang des „Embryoms“, ungefähr 10 Wochen nach der Vorbehandlung, nachgeimpft und zwar 3 Mäuse mit „Ca“ und 2 mit „Sa“. Die ohne „Embryome“ gebliebenen 14 Tiere wurden gleichzeitig zur Hälfte mit „Ca“ und „Sa“ geimpft.

Ergebnis. „Ca“-Reihe: Alle 3 Tiere mit „Embryomen“ „stark“ R.I. „Sa“-Reihe: Von den beiden Mäusen mit „Embryomen“ war eine „mäßig“ und die andere „stark“ R.I.

Die 14 Mäuse ohne „Embryome“ zeigten keine Immunität.

Besprechung der Befunde. Die Vorbehandlung mit Embryonengewebe vermochte keine A.I. gegen meine Tumorstämmme „Ca“ und „Sa“ hervorzurufen, wohl aber bei einer Anzahl von Tieren eine R.I. Die R.I. war stärker bei den mehrmals vorbehandelten Mäusen als bei den einmal gespritzten. Noch auffallender und stärker äußerte sich die R.I. bei den Tieren, bei denen ein „Embryom“ sich gebildet hatte, obwohl die Nachimpfung 10 Wochen nach der Vorbehandlung erfolgte.

Der Vergleich zwischen beiden Versuchsreihen zeigt, daß bei der „Ca“-Reihe die Zahl der immunisierten Tieren größer als bei der „Sa“-Reihe und daß der Grad der R.I. durchschnittlich höher bei der ersten als bei der zweiten Reihe war. Dies wurde stets auch bei den übrigen Immunisierungsversuchen und öfters sogar in stärkerem Ausmaß beobachtet.

Was die embryonenfreie Tiere anbetrifft, welche 10 Wochen nach der Vorbehandlung nachgeimpft wurden, bestätigte sich wieder die bekannte Tatsache, daß nach dem Ablauf einer bestimmten Zeit die erworbene Immunität verschwindet, falls dazwischen nicht der Prozeß des Wachstums und des Rückgangs der geimpften Gewebe sich einschaltet.

Vorbehandlung mit Placentagewebe. Für diesen Versuch wurden 2 Reihen („Ca“ und „Sa“) von je 10 Mäusen aufgestellt. Die Tiere beider Reihen erhielten subcutan zur einen Hälfte einmal und zur anderen Hälfte im Abstand von 5 Tagen 3mal 0,5 ccm des Placentabreies. Die Nachimpfung mit „Ca“ und „Sa“ erfolgte 15 Tage nach der Vorbehandlung.

Ergebnis. „Ca“-Reihe: Vier von den mehrmals geimpften Mäusen hatten „schwache“ R.I. Eine von den einmal gespritzten „schwach“ R.I. Die übrigen Tiere normal. „Sa“-Reihe: Drei von den mehrmals

vorbehandelten Tieren R.I. Von den einmal gespritzten 1 Maus „schwach“ R.I. Die übrigen Mäuse normal.

Besprechung der Befunde. Der Befund hier ist ungefähr der gleiche wie der der obigen Versuche. Nur der Grad der R.I. ist hier geringer.

b) Immunisierungsversuche mit normalen Geweben von erwachsenen Tieren.

Bashford und seine Mitarbeiter sind die ersten, die durch subcutane Impfungen von normalen Geweben (Blut und lactierendes Brustdrüsengewebe der Maus) Mäuse gegen Tumorimpfungen immunisieren konnten. Die Vorbehandlung mit lactierendem Brustdrüsengewebe ergab befriedigende Ergebnisse bei Nachimpfungen mit einem Stamm von Adenocarcinom der Brustdrüse der Maus. *B. Lewin, Flexner* und *Jobling* erzielten durch Vorbehandlung mit verschiedenen Geweben eine Resistenz erhöhung der Tiere gegen Impftumoren. *Borrel* und *Bridré* haben in Vergleichsversuchen die Immunisierungsfähigkeit von verschiedenen Geweben untersucht, wobei festgestellt wurde, daß Leber-, Milz- und Gehirngewebe eine Resistenz erhöhung gegen Impftumoren hervorrufen; das Hodengewebe zeigte keine immunisierende Wirkung. *C. Lewin* schreibt dem transplantierten Milzgewebe eine starke immunisierende Wirkung zu. *Ehrlich, Schöne* und *Apoland* erzielten durch die Milzvorbehandlung nur „eine Immunität geringen Grades“, was sie auf die starke Virulenz ihrer Impftumorstämmen zurückführen. *Bashford, Murnay* und *Halland* haben als erste die Bedeutung der Dosis der zu Vorbehandlung verwendeten Geweben sowie der Zeit, welche zwischen Vorbehandlung und Erfolgsimpfung verlaufen muß, erkannt.

Solehe Immunisierungsversuche habe ich mit verschiedenen Geweben (Leber, Milz, Lunge, Niere) in mehreren Versuchsreihen ausgeführt. Die Organe wurden jungen gesunden männlichen Mäusen entnommen. Erbsengroße Stücke dieser Organe wurden subcutan auf die Versuchsmäuse geimpft. Es wurden 4 Versuchsreihen angestellt. Jede Reihe bestand aus 20 Mäusen. Die Tiere aller 4 Reihen wurden 18 Tage später zur Hälfte mit „Ca“ und „Sa“ geimpft.

Ergebnisse. Leber-Reihe: Keine A.I. Von den „Ca“-Mäusen 2 „mäßig“ und 4 „schwach“ R.I. Von den „Sa“-Mäusen 2 „mäßig“ und 3 „schwach“ R.I.

Milz-Reihe: Keine A.I. Von den „Ca“-Mäusen 2 Tiere frühzeitig eingegangen. 1 Tier „mäßig“ und 3 Tiere „schwach“ R.I.

Nieren-Reihe: 4 Tiere frühzeitig eingegangen. Keine A.I., keine R.I. Bei 4 Tieren von den „Ca“-Mäusen war das Wachstum der Tumoren beschleunigt.

Lungen-Reihe: Keine A.I. Von den „Ca“-Mäusen 1 Tier frühzeitig eingegangen. 3 Tiere „schwach“ R.I. Von den „Sa“-Mäusen 1 Tier „schwach“ R.I.

Bessere Ergebnisse erhielt ich bei mehrmaliger Vorbehandlung mit Lebergewebe. Über diese Versuche habe ich in meiner Arbeit zur Frage der „*Transplantationsimmunität*“¹ bereits berichtet. Ich erwähne hier diese Versuche in aller Kürze. 8 Mäuse wurden im Abstand von 5—7 Tagen 4mal subcutan mit einer progressiv steigenden Dosis von 0,5—1,0 ccm einer Lebergewebemulsion geimpft. 15 Tage nach der letzten Impfung wurden die Tiere zur Hälfte mit „Ca“ und „Sa“ geimpft.

Ergebnis. Keine A.I. „Ca“-Mäuse: Alle 4 Tiere „stark“ R.I. „Sa“-Mäuse: 3 Tiere „stark“ und 1 Tier „mäßig“ R.I.

Besprechung der Befunde. Die Vorbehandlung mit normalen Geweben von erwachsenen Tieren hat gegen meine Impftumorstämme keine A.I. hervorrufen können, wohl aber eine R.I.

Bei den ersten 4 Versuchsreihen war die erreichte R.I. eine geringe und beschränkte sich auf eine kleine Anzahl von Tieren. Die Vorbehandlung mit Nierengewebe rief bei 4 der „Ca“-Mäusen statt einer Resistenz eine erhöhte Empfindlichkeit hervor. Der Vergleich der Immunisierungskraft zwischen Leber-, Milz- und Lungengewebe zeigt, daß bei meinen Versuchen an erster Stelle die Leber kommt und dann die Milz. Das Lungengewebe zeigt eine sehr geringe Immunisierungsfähigkeit.

Wichtig ist bei diesen Versuchen die Feststellung, daß eine mehrmalige und mit starken Dosen vorgenommene Vorbehandlung eine bedeutend höhere Tumorresistenz hervorruft.

II. Spezifische Immunisierungsmethoden.

a) Immunisierungsversuche mit Spontantumoren.

Bekanntlich gibt die homologe Transplantation von Spontantumoren einen sehr geringen Prozentsatz von positiven Ergebnissen. Dies ist auf die geringe Virulenz der spontanen, malignen Tumoren zurückzuführen. (Darüber ausführlich in der Arbeit des Verf. über die Virulenzfrage.) Ehrlich hat beobachtet, daß Tiere bei denen die Transplantation von Spontantumoren negativ verlief, auch gegen eine zweite Impfung und zwar mit virulenten Impftumoren, refraktär blieben. Dieses Phänomen verglich Ehrlich mit der Immunität gegen virulente Bakterien nach Vorbehandlung mit gleichem, aber avirulentem Material.

Ich habe dieses klassische Immunisierungsverfahren mit einer ziemlich großen Anzahl von Spontantumoren und in mehreren Versuchsreihen nachgeprüft. Mir standen im Laufe meiner Versuche 12 Weibchen mit primären Mammatumoren (Mäuse Sp. A. — Sp. L.) zu Verfügung. Die Tumoren Sp. K. und Sp. L. waren sehr bösartig. Sie wuchsen stark infiltrierend und hatten zahlreiche Metastasen in den regionalen Lymphknoten und den Lungen angesetzt. Mikroskopisch boten beide Tumoren das Bild eines papillären Adenocarcinoms. Die übrigen Tumoren waren

¹ Virchows Arch. 302, 443 (1938).

scharf umschrieben und stark hämorrhagisch. Mikroskopisch handelte es sich bei diesen Tumoren um hämorrhagische Adenocarcinome (*Apoland*) der Brustdrüse.

Mit jedem von diesen Tumoren wurde je nach der Größe des Tumors eine Reihe von Mäusen geimpft. Von jeder Versuchsreihe wurde nur ein Teil der Tiere für die Immunitätsuntersuchungen verwendet. Die übrigen Tiere dienten zum Studium der biologischen Eigenschaften jedes einzelnen Tumors (Virulenz, Angangsfähigkeit usw.) und zur Prüfung von anderen Fragen.

1. Versuchsreihe Sp. A.: 10 Mäuse erhielten subcutan ein erbsengroßes Stück des hämorrhagischen Tumors. 5 Tiere wurden 15 Tage mit „Ca“ geimpft. Es war bei allen 5 Tieren keine Immunität zu beobachten. Die übrigen Tiere wurden zur weiteren Beobachtung aufbewahrt. Der geimpfte Spontantumor wuchs bei keinem von diesen Mäusen. 3 von diesen Tieren wurden 6 Wochen nach der ersten Impfung mit „Ca“ geimpft. Alle 3 Tiere zeigten eine „mäßige“ R.I.

2. Versuchsreihe Sp. B.: Hämorrhagisches Adenocarcinom. Stückchentransplantation (subcutan) auf 12 Mäuse. Kein Angang des Tumors. 6 Mäuse wurden 5 Wochen nach der ersten Impfung noch einmal mit einem Spontantumor (Sp.C.) geimpft. 4 Wochen später wurde auf diese Tiere die Erfolgsimpfung mit „Ca“ vorgenommen. Ein Tier war A.I. 2 Tiere waren „stark“ R.I. und die 3 übrigen „mäßig“ R.I.

3. Versuchsreihe Sp. D.: Hämorrhagisches Adenocarcinom. Stückchentransplantation auf 7 Mäuse. 4 Tiere wurden 5 Wochen später mit „Ca“ geimpft. 2 Tiere „mäßig“ R.I. Die 2 übrigen Mäuse normal.

4. Versuchsreihe Sp. G.: Hämorrhagisches Adenocarcinom. Breiimpfung auf 11 Mäuse. Kein Angang. 6 Tiere wurden 4 Wochen später zur Hälfte mit „Ca“ und „Sa“ geimpft. 1 „Ca“-Maus „mäßig“ R.I., die beiden übrigen „schwach“ R.I. Von den „Sa“-Mäusen nur ein Tier „schwach“ R.I. Die 5 anderen Tiere der Reihe wurden 6 Wochen nach der ersten Impfung ein zweites Mal mit Spontantumor (Sp.H.) geimpft (Stückchentransplantation). Auch diesen Transplantation blieb negativ. 6 Wochen nach der zweiten Impfung wurden 2 Tiere mit „Ca“ und 3 mit „Sa“ geimpft. 2 von den „Ca“-Mäusen „mäßig“ R.I.

5. Versuchsreihe Sp. H.: Hämorrhagisches Adenocarcinom. Stückchentransplantation auf 8 Mäuse. Kein Angang. Nach 5 Wochen 6 Tiere zur Hälfte mit „Ca“ und „Sa“ geimpft. Keine A.I. „Ca“-Mäuse: 1 Tier „mäßig“ und 2 Tiere „schwach“ R.I. „Sa“-Mäuse: 1 Tier „schwach“ R.I. Die übrigen Tiere normal.

6. Versuchsreihe Sp. G.: Hämorrhagisches Adenocarcinom. Stückchentransplantation (subcutan) auf 10 Mäuse. Kein Angang. Nach 6 Wochen 6 Tiere mit „Ca“ geimpft. 2 Tiere „mäßig“ und 3 „schwach“ R.I. Eine Maus normal.

7. Versuchsreihe Sp. K.: Papilläres Adenocarcinom. Breiimpfung. 6 Mäuse wurden mit 0,5 ccm Tumorbrei subcutan geimpft. 6 Mäuse mit 0,5 ccm eines Breigemisches von Tumor und Embryonengewebe zu gleichen Teilen subcutan geimpft. Bei der ersten Reihe verlief die Impfung bei 2 Mäusen positiv. Bei der einen Maus ging der haselnußgroße Tumor wieder zurück. Dieses Tier sowie 3 Mäuse mit negativen Ergebnissen wurden 8 Wochen nach der ersten Impfung mit „Ca“ geimpft. Die Maus mit dem zurückgegangenen Tumor war „stark“ R.I., die übrigen Tiere „mäßig“ R.I.

Bei der zweiten Reihe kein Augang. 6 Wochen nach der ersten Impfung wurden die Tiere mit „Ca“ geimpft. Ein Tier blieb A.I. 3 Tiere „stark“ R.I. 2 Mäuse „mäßig“ R.I.

8. Versuchsreihe Sp. L.: Papilläres Adenocarcinom. Stückchenimpfung auf 12 Mäuse. Auf eine Maus (mit Blockade des R.E.S.) ging die Impfung an. 6 Mäuse wurden 5 Wochen später mit „Ca“ geimpft. Ein Tier blieb A.I. Die übrigen 5 Mäuse waren „stark“ R.I.

Besprechung der Befunde. Von den 59 mit Spontantumorgewebe vorbehandelten Mäusen zeigten 3 Tiere gegen den Tumorstamm „Ca“ eine A.I. Gegen den hochvirulenten Stamm „Sa“ wurde keine A.I. erreicht. Die geringe Zahl von A.I.-Tieren bei meinen Versuchen, im Vergleich zu der großen Anzahl von absolut immunen Mäusen, die *Ehrlich* durch Vorimpfung mit Spontantumoren erzielte, ist meines Erachtens auf einen Virulenzunterschied meiner Impftumorstämmen und derjenigen *Ehrlichs* zurückzuführen.

Die 3 A.I.-Tiere gehören zu den Versuchsreihen Sp.B., Sp.K. und Sp.L. Die A.I.-Maus der Reihe Sp.B. wurde 2mal im Abstand von 5 Wochen mit Stückchen von 2 hämorragischen Adenocarcinomen der Mamma vorgeimpft. Auch die übrigen Tiere dieser Reihe, die 2mal vorbehandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den Mäusen, die mit gleichen oder ähnlichen Spontantumoren einmal vorbehandelt wurden, eine verhältnismäßig stärkere R.I. Dadurch wird wieder bestätigt, daß eine mehrmalige Vorbehandlung den Grad der Immunität erhöht.

Die beiden übrigen A.I.-Tiere wurden mit 2 Spontantumoren vorbehandelt, die „klinisch“ und mikroskopisch sehr bösartig waren. Auch die übrigen mit diesen Tumoren vorbehandelten Mäuse zeigten durchschnittlich eine stärkere R.I. als die Tiere aller anderen Versuchsreihen. Obwohl das Versuchsmaterial nicht genug groß ist, um allgemeine Rückschlüsse aus den Ergebnissen dieser beiden letzteren Versuchsreihen zu ziehen, erlauben doch die eindeutige Befunde hier die Feststellung, daß die Vorbehandlung mit Tumormaterial von einer verhältnismäßig stärkeren Virulenz (bei der Reihe Sp.K. waren 2 positive Impfungen des Spontantumors zu verzeichnen) eine Immunität stärkeren Grades hervorruft als die Vorbehandlung mit avirulentem Material. Der Grad der künstlichen Tumorimmunität hängt bei dieser spezifischen Immunisierungsmethode einerseits von der Virulenz des zur Vorbehandlung gebrauchten Tumormaterials und andererseits von dem Virulenzgrad des zur Erfolgsimpfung verwendeten Impftumors ab.

Was die Zeit zwischen Vorbehandlung und Erfolgsimpfung anbetrifft, so besteht hier ein wesentlicher Unterschied zu den unspezifischen Methoden. Hier liegt die optimale Zeit der Nachimpfung zwischen 4 und 6 Wochen nach der Vorbehandlung. Die Bedeutung der Zeit, zwischen Vorbehandlung und Nachimpfung zeigt die Versuchsreihe Sp.A. Die Tiere, welche 15 Tage nach der Immunisierungsimpfung nachgeimpft wurden, zeigten keine Immunität, während die Tiere, bei denen die Erfolgsimpfung 6 Wochen nach der Vorbehandlung vorgenommen wurde, alle deutlich R.I. waren.

b) Immunisierungsversuche mit Tumorextrakten
(nach Domagk und Hackmann).

Versuche zur Tumorimmunitätserzeugung mit Extrakten, Autolysaten und zellfreien Preßsäften von Impftumoren sind im Laufe der Zeit von fast allen Untersuchern, die sich mit der Tumorimmunität befaßt haben, ausgeführt worden. Die Erfahrung ist daher mit diesen Immunisierungsmethoden genug groß und die Rückschlüsse sind fast immer die gleichen gewesen, daß nämlich nicht lebendes Tumormaterial und Autolysate oder Exakte, die bei höherer Temperatur hergestellt wurden, unwirksam sind. Dies führte zu der Ansicht, daß eine Immunisierung gegen Impftumoren nur mit zellhaltigem lebenden Material (von Tumor oder von normalen Geweben) möglich ist.

Neuerdings berichteten Domagk und Hackmann über Immunisierungsversuche mit zellfreien Tumorextrakten, die bei niedriger Temperatur hergestellt wurden. Nach diesen Forschern gelingt es, wenn bei der Herstellung der Exakte auf die Wärmeempfindlichkeit des wirksamen Faktors Rücksicht genommen wird, ohne weiteres mit zellfreien Tumorextrakten eine A.I. zu erzeugen. Ferner fanden Domagk und Hackmann, daß mit Eiweißfällungen, die aus diesen Extrakten durch Einleiten von Kohlensäure hergestellt werden, sich eine Resistenz gegen nachfolgende Tumortransplantation regelmäßig erzeugen läßt. Sie nehmen an, daß die immunisierende Substanz in diesen durch CO_2 fällbaren Eiweißkörpern enthalten ist.

Ich habe diese Immunisierungsmethode an 7 Versuchsreihen geprüft.
3 „Ca“-Reihen, 2 „Sa“-Reihen und eine Reihe von Jensen-Sarkom.

Der Tumorextrakt wurde nach den Angaben von Prof. Dr. Domagk, dem ich auch an dieser Stelle bestens danke, folgendermaßen hergestellt. Die Bearbeitung der frisch entnommenen Impftumoren wurde bei niedriger Temperatur vorgenommen, um jede Autolyse zu vermeiden. Nach wiederholtem Gefrieren (in Kohlensäure) und Auftauen zur Aufschließung der Tumorzellen wurde das Tumorgewebe im Mörser rasch fein zerrieben und der Brei im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. versetzt. Bei meinen Versuchen wurde nur das lebende Gewebe von jungen frischen Tumoren verwendet. Nach einer 24stündigen Extraktion im Eisschrank wurde der Tumorbrei unter Kühlung eine halbe Stunde mit 3000 Touren zentrifugiert, um damit die größeren Gewebsfetzen zu entfernen. Der überstehende Extrakt wurde sofort durch sterile und gekühlte Seitz-EK-Filter filtriert. Man erhält so wasserklare Filtrate, die frei von Zellen und Keimen sind.

Versuchsreihen „Ca“. Erste Reihe: 12 Mäuse in Abstand von 3 Tagen 4mal mit 0,4 ccm „Ca“-Tumorextrakt gespritzt. 15 Tage nach der letzten Spritzung „Ca“-Impfung.

Ergebnis: Keine A.I. 4 Tiere sehr „stark“ R.I. 3 Tiere „stark“ R.I. und die übrigen 5 Mäuse „mäßig“ R.I.

Zweite Reihe (3 Monate nach der ersten Versuchsreihe) 12 Mäuse 4mal einen Tag nach dem anderen mit 0,3 ccm „Ca“-Tumorextrakt subcutan injiziert. Erfolgsimpfung mit „Ca“ 18 Tage später.

Ergebnis: 2 Mäuse frühzeitig gestorben. Keine A.I. 2 Tiere „mäßig“ R.I. 4 Mäuse „schwach“ R.I. und die übrigen Tiere normal.

Dritte Reihe (2 Monate nach der zweiten Versuchsreihe): 12 Mäuse 4mal im Abstand von 3 Tagen mit 0,3, 0,5, 0,8 und 1,0 ccm progressiv subcutan mit „Ca“-Extrakt gespritzt. Erfolgsimpfung mit „Ca“ 14 Tage nach der letzten Spritzung.

Ergebnis: Bei einer „stark“ R.I.-Maus ging der bis Haselnuß herangewaschene Tumor zurück und verschwand. Die Maus blieb gegen eine zweite Impfung mit dem gleichen „Ca“-Impftumor A.I. 5 andere Tiere waren „stark“ R.I. und 3 Mäuse „mäßig“ R.I. Eine Maus blieb normal und 3 Tiere zeigten eine Überempfänglichkeit. Die Impfung ging bei diesen Tieren rasch an, die Tumoren zeigten eine stärkere Wachstumsgeschwindigkeit und die Tiere starben früher als gewöhnlich.

Versuchssreihen „Sa“: *Erste Reihe:* 12 Mäuse erhielten subcutan im Abstand von 3 Tagen 4mal 0,4 ccm des „Sa“-Tumorextraktes. 14 Tage nach der letzten Spritzung „Sa“-Impfung.

Ergebnis: Keine A.I. 3 Tiere „mäßig“ R.I. 7 Tiere normal. 2 Mäuse „überempfänglich“.

Zweite Reihe (2 Monate nach der ersten Reihe, zur Zeit höchster Virulenz des Stammes „Sa“): 10 Mäuse wurden 4mal in Abstand von 2 Tagen mit 0,3, 0,5, 0,7 und 1,0 ccm subcutan mit „Sa“-Extrakt injiziert. Erfolgsimpfung mit „Sa“ 16 Tage nach der letzten Injektion.

Ergebnis: Keine A.I. Keine R.I. Bei 3 Mäusen äußerte sich die schon sehr starke Virulenz des „Sa“-Stammes in noch höherem Grad. Die Tiere starben innerhalb 16–18 Tage nach der Tumorimpfung mit zahlreichen Metastasen.

Versuchssreihe Jensen-Sarkom: 12 Ratten wurden 4mal mit einer steigenden Dosis von 0,5, 0,8, 1,0 und 1,2 ccm Extrakt von *Jensen-Sarkom* in Abstand von 3 Tagen injiziert.

Ergebnis: Alle 12 Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine unverkennbare Überempfänglichkeit. Bei allen 12 vorbehandelten Ratten ging die Erfolgsimpfung an, während von den 12 Kontrollen 3 Ratten refraktär blieben. Die Tumoren wuchsen bei den vorbehandelten Tieren rascher und die Tiere starben früher als die Kontrollen.

Besprechung der Befunde. Die Ergebnisse der Immunisierung mit dem Kälteextrakt stimmen bei meinen Versuchen nicht vollkommen mit denen von *Domagk* und *Hackmann* überein. Bei meinen Versuchen konnte nur an einer Maus eine A.I. erzielt werden, während *Domagk* und *Hackmann* bei der größten Anzahl ihrer Versuchstiere eine A.I. erreichten. Jedoch ist die immunisierende Wirkung wie überhaupt die Fähigkeit dieser Tumorextrakte zu Erzeugung einer „Umstimmung“ nach beiden gegensätzlichen Richtungen (Immunität-Sensibilität) nicht zu erkennen. Eine große Anzahl von den vorbehandelten Tieren meiner Versuchssreihen zeigten eine „starke“ bzw. „sehr starke“ R.I. Sogar blieb eine dieser Mäuse nach dem Rückgang des angegangenen Tumors A.I. gegen weitere Impfungen mit demselben Impftumor. Interessant ist der Vergleich der erzielten Ergebnisse zwischen den verschiedenen Versuchssreihen. Bei allen 3 „Ca“-Reihen kommt sehr deutlich die wichtige Rolle der Extraktdosierung zum Vorschein. Stärkere Dosen erzeugten eine stärkere R.I. und bei einigen Tieren eine „Sensibilität“. Der Vergleich zwischen der ersten und der zweiten „Ca“-Reihe zeigt, daß wahrscheinlich bei gleichen Extraktdosen der Immunitätsgrad ein anderer ist, wenn diese Dosen fraktioniert und im Abstand von einigen Tagen statt täglich verimpft werden. In diesem Fall spielte vielleicht auch die Jahreszeit

eine Rolle, während deren die Versuche der ersten und zweiten „Ca“-Reihe ausgeführt wurden. *Dittmar*, der die Versuche *Domagk* und *Hackmanns* auf einer breiten Basis nachgeprüft hat und die Befunde dieser Untersucher teilweise bestätigen konnte, vermutet, daß die Schwankungen des Immunitätsgrades auf eine jahreszeitlich wechselnde Empfindlichkeit der Versuchstiere gegen die Extrakte und auf einen verschiedenen Gehalt der Tumoren an wirksamen Substanzen, aus denen die Extrakte hergestellt werden, zurückzuführen sind. Ich möchte die wichtige Rolle der jahreszeitlichen Schwankung der Impftumorenvirulenz hinzufügen. Der Grad der Virulenz spielt eine bedeutende Rolle bei der Tumorimmunität. Der Vergleich der Versuchsreihen „Ca“ und „Sa“ zeigt, daß obschon die „Sa“-Mäuse genau so wie die „Ca“-Tiere vorbehandelt wurden, die Immunität bei den ersteren Tieren bedeutend geringeren Grades war. Bei starker Extraktdosierung wurde statt einer Immunität eine deutliche *Überempfänglichkeit* beobachtet. Ob dies auf den verschiedenen Gehalt der Tumoren an wirksamen Substanzen oder auf die verschiedene Art dieser Substanzen zurückzuführen ist, bleibt noch aufzuklären. Daß bei den verschiedenen Tumoren auch die Wirkung des Extraktes verschieden ist, zeigen am deutlichsten die Versuche mit *Jensen*-Sarkomextrakten. Der Kälteextrakt dieses Tumors bewirkte bei sämtlichen Ratten eine deutliche „Sensibilität“. Bemerkenswert ist, daß genau die gleichen Ergebnisse *Uhlenhut* bei Immunisierungsversuchen mit Kälteextrakt seines *Jensen*-Sarkomstammes erzielte. Er hat auch eine Überempfänglichkeit beobachtet. Weiter stellte *Uhlenhut* fest, daß der Kälte-Extrakt seines *Ehrlich*-Carcinomstammes keine Immunität zu erzeugen vermochte, während der Extrakt des *Ehrlich*-Carcinomstammes von *Domagk*, mit dem *Uhlenhut* Vergleichsversuche ausführte, positive Ergebnisse lieferte. *Dittmar* fand, daß homologe Tumorextrakte eine Resistenzsteigerung gegen die gleichen Tumoren erzeugen. Er hat selten eine A.I. erzielt. Extrakte aus Mäusesarkomen übten eine Hemmung auf das Wachstum von Mäusecarcinomen aus. Dagegen waren heterologe Tumorextrakte (*Jensen*-Rattensarkom und *Brown-Pearce*-Kaninchentumor) ohne Einfluß auf das Angehen von Mäusecarcinom. Beachtenswert ist, daß der *Jensen*-Sarkomextrakt das Wachstum der Mäusecarcinome anregte. Auch Milzextrakte zeigten eine immunisierende Wirkung gegen Tumorenimpfungen geringeren Grades. Daraus schließt *Dittmar*, daß die homologen Tumorextrakte wahrscheinlich eine tumorspezifische Komponente enthalten, die jedoch nicht spezifisch für jede Art von homologen Tumoren ist. Auf diese Frage werde ich hier nicht weiter eingehen.

Raab hat die Wirkung solcher zellfreien Kälteextrakte aus *Brown-Pearce*schem Kaninchentumor durch intravenöse und intracutane Anwendung geprüft. Obschon bei einigen Versuchsreihen eine Beschränkung der Metastasen und bei anderen Kaninchen eine Begünstigung des

Angangs sowie Förderung des Wachstums nach der Vorbehandlung zu beobachten war, faßt er die Ergebnisse seiner Versuche als negativ auf. Demnach zieht *Raab* den Rückschluß, daß die Immunisierung gegen maligne Tumoren mit zellfreien oder abgetötetem Material „gegenwärtig an einem toten Punkt angelangt zu sein scheine“.

Man kann dieser Meinung *Raab*s nicht beistimmen. Daß das tote Tumormaterial keine immunisierende Wirkung hat, ist eine altbekannte Tatsache. Was aber das zellfreie Kälteextrakt anbetrifft, muß man anerkennen, daß er das erste Tumorfiltrat ist, mit dem man eine deutliche und unverkennbare „Umstimmung“ des Tierorganismus hervorrufen kann. Freilich die *Domagk-Hackmannsche* Methode ist in ihrer heutigen Form sozusagen keine „standard“-Tumorimmunitätsmethode. Wie alle bisher bekannten Immunisierungsmethoden zeigt auch dieses Verfahren die gleiche schwache Seite, die Achillesferse der Methoden der Tumorimmunisierung, nämlich die starken Schwankungen und die oft gegenseitlichen Ergebnisse bei der Nachprüfung mit verschiedenen Impftumoren und Tierrassen. Ich bin aber der Meinung, daß die weitere Vervollständigung der Extrakttherstellung und die weitere Bearbeitung dieser Methode die Frage der Tumorimmunität bzw. Sensibilität wesentlich fördern wird.

*c) Immunisierungsversuche durch intracutane Tumorimpfungen
(nach Besredka und Gross).*

Vor kurzer Zeit berichteten *Besredka* und *Gross*, daß es Ihnen gelungen ist, durch intracutane Impfungen von schwachen Dosen Tumoremulsionen (*Ehrlich-Sarkom* und *Brown-Pearce-Carcinom*) Mäuse und Kaninchen gegen diese Tumoren zu immunisieren. Die Untersucher führen diese spezifische Immunisierung auf die dominante Rolle der Haut für die Immunitätserzeugung zurück. Der Erfolg dieser Methode hängt nach *Besredka* und *Gross* von der geschickten Einführung der Emulsion in die Cutis und von der richtigen Dosierung ab. Für das *Ehrlich-Sarkom* soll die Impfdosis nicht stärker als 0,01—0,02 ccm sein. Bei diesen Dosen bildet sich an der Stelle der Impfung ein kleiner intracutaner Tumor, der bald exulceriert und später vollkommen verschwindet. Nach dem Rückgang des Tumors, falls keine Metastasen eingetreten sind, bleibt die Maus gegen nachfolgende Impfungen mit dem gleichen Tumor absolut immun. Im Falle, daß die Tumoremulsionsdosen stärker sind, geht der angegangene Tumor nicht zurück, sondern wächst weiter und tötet schließlich das Tier.

Ich habe diese Immunisierungsmethode in 3 „Ca“, 3 „Sa“ und 1 *Jensen-Sarkom*-Versuchsreihen geprüft. Die Methode wurde genau nach den Angaben von *Besredka* und *Gross* ausgeführt. Die Einführung der dünnen Kanüle (Durchmesser 0,4 mm) in die Haut der Maus bedarf einer gewissen Übung. Dies gelingt nach meiner Erfahrung am besten am

Rücken der Maus und zwar an der Schwanzwurzel, wo die Haut etwas dicker ist und fester auf der Wirbelsäule liegt. Die Tumoremulsion wurde nach der üblichen Weise mit *Ringerscher Lösung* zu einem dünnflüssigen Brei zubereitet.

,,Ca"-Versuchsreihen. Erste Reihe: 20 Mäuse erhielten intracutan 0,01 bis 0,02 ccm einer „Ca"-Emulsion von 1 Teil Tumor und 5 Teilen *Ringerscher Lösung*. Bei 3 Tieren entstand kein Tumor. 4 Wochen später wurden alle 3 Mäuse nach der üblichen Weise subcutan mit „Ca" geimpft. Diese zweite Impfung ging an, ohne irgendwelche Immunitätserscheinung. Bei 2 weiteren Mäusen mißglückte die intracutane Impfung, so daß gewöhnliche subcutane Tumoren sich bildeten. Bei den übrigen 15 Tieren bildeten sich kleine intracutane Tumoren, die langsam weiterwuchsen. Bald durchbrachen die Tumoren die Haut nach der Oberfläche und wuchsen später infiltrierend auch nach der Tiefe, so daß nach einigen Wochen die Tiere am hinteren Ende des Rumpfes große exulcerierte Tumoren trugen. Sämtliche Tiere gingen ein. Sie lebten aber bedeutend länger als die Kontrolltiere.

Zweite Reihe. 14 Mäuse erhielten intracutan 0,01 ccm einer verdünnten „Ca"-Emulsion (1 Teil Tumor zu 10 Teilen *Ringerscher Lösung*), nur auf 6 Mäusen bildeten sich intracutane Tumoren, die genau so wie die intracutanen Tumoren der ersten Reihe sich entwickelten. Sie wuchsen langsam. Bei einer Maus bildete sich im regionären, inguinalen Lymphknoten eine erbsengroße Metastase. Alle 6 Tiere starben 10—12 Wochen nach der Impfung. Bei den übrigen 8 Mäusen ging die Impfung nicht an. Sie wurden 4 Wochen später noch einmal intracutan mit 0,01 ccm „Ca"-Emulsion (1 Teil Tumor zu 6 Teilen *Ringerscher Lösung* geimpft). Die Impfung ging bei 7 Tieren an. Die Tumoren wuchsen wie oben und tödeten sämtliche Mäuse. Keine Metastasen. Die tumorfreie Maus wurde subcutan nach der üblichen Weise mit „Ca" geimpft. Die Impfung ging ohne jegliche Immunitätserscheinung an.

,,Sa"-Versuchsreihen. Erste Reihe: 20 Mäuse wurden intracutan mit 0,01, 0,02 ccm „Sa"-Emulsion (1 Teil Tumor zu 6 Teilen *Ringerscher Lösung*) geimpft. Bei 4 Tieren bildeten sich die Tumoren subcutan. Bei sämtlichen übrigen 16 Mäusen bildeten sich kleine intracutane Tumoren, die das gleiche Wachstum der intracutanen „Ca"-Tumoren zeigten. Hier auch starben die Tiere später als die Kontrollen. Bei 10 Tieren entwickelten sich Metastasen in den Lymphknoten und den inneren Organen.

Zweite Reihe (sie wurde zur Zeit höchster Virulenz des Stammes „Sa" ange stellt): 12 Mäuse erhielten intracutan 0,01 ccm einer verdünnten „Sa"-Emulsion (1 Teil Tumor, 12 Teilen *Ringerscher Lösung*). Bei sämtlichen Tieren ging die Impfung an. Die Tumoren wuchsen wie bei den obigen Reihen. Die Tumoren aber blieben verhältnismäßig kleiner und setzten bei sämtlichen Tieren, große Metastasen in den Lymphknoten und den inneren Organen an.

Versuchsreihe Jensen-Sarkom: 15 Ratten wurden mit 0,01, 0,02 ccm einer Emulsion von *Jensen-Sarkom* (1 Teil Tumor, 6 Teilen *Ringerscher Lösung*) intracutan nach der gleichen Weise wie bei den Mäusen geimpft. Die Impfung ging bei 11 Tieren an. Es bildeten sich kleine intracutane Tumoren, die langsam aber ständig weiterwuchsen. Bei 4 Ratten wurden die haselnussgroßen, scharf umschriebenen intracutanen Tumoren operativ entfernt. Die Tiere blieben rezidivfrei. 4—6 Wochen nach der Tumorentfernung wurden diese Ratten in der üblichen Weise subcutan mit demselben Stamm von *Jensen-Sarkom* geimpft. Bei allen 4 Tieren ging die Impfung an und die Tiere starben gleichzeitig mit den Kontrollen. Die Tumoren der 7 übrigen Ratten wuchsen weiter sowohl nach der Oberfläche als auch nach der Tiefe. Es bildeten sich keine Metastasen. Alle Tiere starben 8—9 Wochen später als die Kontrollen. Von den 4 Ratten, die bei der ersten intracutanen Impfung refraktär blieben, wurden 2 Tiere noch einmal intracutan und 2 Tiere subcutan mit

0,05 der *Jensen-Sarkomemulsion* geimpft. Die Impfung ging bei allen 4 Tieren an. Die Tumoren wuchsen und töteten die Tiere ohne jegliche Andeutung einer Immunität.

Immunitätsbesprechung der Befunde. Die Nachprüfung der Immunisierung durch intracutane Tumorimpfung mit meinen 3 Tumorstämmen („Ca“, „Sa“ und *Jensen-Sarkom*) konnte die Befunde von *Besredka* und *Gross* nicht bestätigen. Bei meinen Versuchen ging der einmal angegangene intracutane Tumor nicht mehr zurück, wie nach der Beschreibung von *Besredka* und *Gross* zu erwarten war, sondern wuchs weiter und tötete schließlich das Tier. Nach *Besredka* und *Gross* hängt der Erfolg dieser intracutanen Immunisierung von der richtigen Dosierung der in der Haut eingeführten Tumoremulsionen. Sie fanden, daß bei ihrem *Ehrlich-Sarkomstamm* die wirksame Tumoremulsionsdosis (1 Teil Tumor zu 5 Teilen physiologischer Kochsalzlösung) 0,01—0,02 war. Meine ersten Versuche mit je einer Reihe „Ca“ und „Sa“ wurden genau, was auch die Impfdosis anbetrifft, nach den Angaben von *Besredka* und *Gross* ausgeführt. Die Ergebnisse aber stimmten nicht mit denen von *Besredka* und *Gross* überein. Angesichts der starken Virulenz meiner Tumorstämmen habe ich weitere Versuche mit stärkeren Verdünnungen der Tumoremulsionen ausgeführt. Die Ergebnisse waren diesmal auch die gleichen wie bei den ersten Reihen.

Die Immunisierung durch intracutane Tumorimpfungen wurde auch von anderen Untersuchern mit negativen Ergebnissen nachgeprüft. *Wilner* und *Zakrzenski* haben eingehend die Methode von *Besredka* und *Gross* mit dem gleichen Tumorstamm von *Ehrlich-Sarkom* nachgeprüft. Auch sie führten ihre Versuche mit verschiedenen Verdünnungen und Dosen der Tumoremulsionen aus. Sie erhielten die gleichen Ergebnisse wie ich. Die einmal angegangenen intracutanen Tumoren bildeten sich nicht mehr zurück, sondern wuchsen weiter und töteten die Tiere.

Es fragt sich nun, worauf die gegensätzlichen Befunde von *Besredka* und *Gross* und der Nachprüfer ihrer Methode zurückzuführen sind. Daß *Besredka* und *Gross* eine Immunität bei denjenigen Tieren beobachtet haben, bei denen die intracutanen Tumoren sich zurückgebildet haben, steht außer Zweifel. Es ist eine alte bekannte Tatsache, daß Tiere bei denen der angegangene Imptumor aus irgendwelchen Gründen sich zurückbildet, gegen eine zweite Tumorimpfung vor allem mit dem gleichen Tumorstamm, refraktär bleiben. Das ist auch der Fall bei den Tieren von *Besredka* und *Gross* gewesen. Es fragt sich aber, warum die intracutanen Tumoren bei den Versuchen von *Besredka* und *Gross* sich zurückbildeten und dies bei meinen sowie den Versuchen von *Wilner* und *Zakrzenski* nicht geschah. *Wilner* und *Zakrzenski* geben dafür folgende Erklärung. Die intracutane Tumorimpfung, kann trotz allen Maßnahmen nicht aseptisch sein. Eine vollkommene Desinfizierung der Haut der Tiere ist unmöglich, so daß die in die Haut eingeführte Kanüle nicht mehr

steril bleiben kann. Dann bietet der Stichkanal auch einen Weg für Infizierungen. Es ist nun bekannt, daß infizierte Tumoren öfters zurückgehen, was höchst wahrscheinlich der Fall bei den Versuchen von *Besredka* und *Gross* der Fall war. Die kleinen intracutanen Tumoren, die an sich keine starke Wucherungskraft hatten, gingen dadurch zurück. Den mangelnden Rückgang der intracutanen Tumoren ihrer Versuche führen *Willner* und *Zakrzenski* auf das Fehlen derjenigen Keime, die die Rückbildung der Tumoren bei den Versuchen von *Besredka* und *Gross* hervorgerufen haben. Dies könnte auch für meine Versuche gelten. Ich glaube aber, daß bei meinen Versuchen die Nichtrückbildung der intracutanen Tumoren an erster Stelle auf die Höhe Virulenz meiner Impftumorstämme zurückzuführen ist, die trotz ihrer Infizierung weiterwuchsen.

Zusammengefaßt ist die von *Besredka* und *Gross* beobachtete Immunität bei intracutanen Tumorimpfungen nicht irgendwelcher spezifischen Rolle der Haut oder der intracutanen Einführung des angeblichen Tumor „Virus“ zuzuschreiben, sondern diese Immunität führt sich einfach auf den Rückgang der Impftumoren zurück der zufälligerweise bei den Versuchen der genannten Untersucher zustande kam. Ihre Methode wird daher einen praktischen Wert als eine einfache Immunisierungsmethode erfahren, wenn man durch irgendwelchen Kunstgriff Impftumoren (gleich ob sie intra- oder subcutan sitzen) zur Rückbildung bringt. Über eine solche Methode berichte ich weiter unten.

Die radikale und rezidivfreie operative Entfernung von heranwachsenden Impftumoren, wie mir die oben ausgeführten Versuche bei der *Jensen-Sarkomreihe* und zahlreiche operative Entfernungen von Impftumoren gezeigt haben, hinterläßt keine Immunität gegen eine zweite Tumorimpfung. Dafür ist nötig die Resorption des Tumors vom Tierorganismus selbst.

III. Weitere Immunisierungsmethoden.

a) Immunisierung durch künstlichen Rückgang und Resorption heranwachsender Impftumoren.

Wie oben ausgeführt, hinterläßt der spontane Rückgang und die Resorption von heranwachsenden Impftumoren eine Immunität gegen weitere Tumorimpfungen. Es ist schon seit der Anfangszeit der Geschwulsttransplantation bekannt, daß durch Massieren und Quetschen die Impftumoren zur Rückbildung und Verschwinden gebracht werden. Ich habe diese einfache Methode zu Immunisierungszwecken verwendet.

„Ca“-Versuchsreihen: 2 Reihen von je 16 und 20 Mäusen wurden mit „Ca“ subcutan geimpft (Stückchentransplantation). Als die Tumoren die Größe einer Erbse bis Bohne erreicht hatten, wurden sie 3—5mal einen Tag nach dem anderen massiert und zerquetscht.

Ergebnis. Erste Reihe: Bei einer Maus ging der erbsengroße Tumor nach der dritten Quetschung zurück und die Maus blieb gegen weitere Impfungen mit „Ca“

A.I. Die übrigen Mäuse zeigten eher ein Aufflackern des Tumorwachstums. *Zweite Reihe:* Der bohnengroße Tumor einer Maus ging nach einer 4maligen Quetschung zurück. Die Maus blieb A.I. Die übrigen Mäuse zeigten wie bei der ersten Versuchsreihe, ein beschleunigtes Tumorwachstum.

,Sa“-Versuchsreihe: 20 Mäuse subcutan mit „Sa“ geimpft. Die erbsengroßen Tumoren 3mal einen Tag nach dem anderen zerquetscht.

Ergebnis: Keine Immunität. Bei sämtlichen Tieren wurde eine Wachstumsbeschleunigung mit Metastasierung beobachtet.

Besprechung der Befunde. Die durch diese sehr einfache Methode erreichten Ergebnisse sind im Vergleich zu anderen oben beschriebenen mühseligen und zeitraubenden Immunisierungsmethoden sehr befriedigend. Auf beiden „Ca“-Reihen ist je eine A.I.-Maus zu verzeichnen. Beim stark virulenten Stamm „Sa“ war nichts anderes als eine Wachstumsbeschleunigung zu erwarten. Das gleiche war auch beim größten Teil der „Ca“-Tiere zu beobachten.

Dieses Immunisierungsverfahren bringt nichts Neues zur Tumorimmunitätsfrage und kann für sich kaum die Bezeichnung einer Methode beanspruchen. Es ist einfach ein leichtes Mittel mit dem man besonders bei schwach virulenten Impftumoren, absolut immune Tiere in kürzester Zeit erhalten kann.

b) Immunisierung durch kleine fraktionierte Dosen von Tumoremulsionen.

Ausgehend vom gleichartigen Immunisierungsverfahren der Bakteriologie habe ich versucht, durch wiederholte Impfung von kleinen Dosen verdünnter Tumoraufschwemmung eine Tumorimmunität bei Versuchstieren zu erzeugen. Obwohl diese Versuche noch nicht abgeschlossen sind, erwähne ich sie hier in aller Kürze, da einige Mäuse, die für meine weitere Immunitätsuntersuchungen verwendet wurden, auf diese Weise immunisiert worden sind.

Die bisherigen Versuche habe ich mit den Tumorstämmen „Ca“ und „Sa“ ausgeführt. Bei den ersten Versuchsreihen bin ich folgenderweise vorgegangen. Die Tiere erhielten subcutan im Abstand von 3—4 Tagen 3—6 Injektionen verdünnter Tumoremulsion. Die Verdünnung, sowie die Impfdosen der Emulsion wurde empirisch bestimmt. Jede Impfdosis für sich sollte keinen Tumor erzeugen können.

Ergebnisse. Von den 60 mit „Ca“-Emulsion vorbehandelten Mäusen erzeugte nur bei 2 Tieren die Vorbehandlung keinen Tumor. Diese beiden Mäuse blieben A.I. gegen die Erfolgsimpfung mit dem gleichen „Ca“-Tumor. Bei den übrigen 58 Tieren (2 Mäuse waren frühzeitig eingegangen) entwickelten sich Tumoren, die bei mehreren Tieren auffallend rasch wuchsen.

Die Versuche mit „Sa“-Emulsionen mußte ich aufgeben, da die hohe Virulenz dieses Tumors ihn ungeeignet für solche Versuche machte.

Die an sich ermunternden Ergebnisse der ersten „Ca“-Versuchsreihen haben mich veranlaßt, die Versuche weiter zu führen, da eine

Umstimmung nach beiden Richtungen (Immunität—Sensibilität) bei den durch diese Methode behandelten Tieren unverkennbar war. Es war aber deutlich, daß die empirische Bestimmung der Verdünnung und der Dosierung der Tumoremulsion durch eine exaktere Bestimmung dieser Zahlen ersetzt werden sollte. Hierzu haben mir meine Tumorvirulenzuntersuchungen geholfen.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde in Kürze meine Methode zur Tumorvirulenzbestimmung auseinandergesetzt. Dort wurde von der „optimal minimalen“ Tumoremulsionsdosis, die ständig einen positiven Angang gibt und von der „absolut minimalen“ Impfdosis, die nur gelegentlich positiv ist, gesprochen. Die exakte, numerische Bestimmung dieser Impfdosen erfolgt durch das Zählen der Tumorzellen in der Zählekammer. Nun lag es nah, daß die Immunisierungsimpfdosen unterhalb der „absolut minimalen“ wirksamen Impfdosen liegen sollten. Aber auch nach dieser wesentlichen Verbesserung waren die Ergebnisse nicht die erwarteten. Es stellte sich heraus, daß die exakte Bestimmung der Vorbehandlungsdosierungen für eine sichere Immunitätserzeugung nicht genügt. Ebenso wichtig ist die Bestimmung der Zahl der Vorbehandlungsimpfungen, wie auch des Zeitabschnittes, welcher zwischen diesen Impfungen ablaufen muß. Ich werde auf diese Versuche später zurückkommen.

c) *Immunisierung durch Lungengewebe krebskranker Tiere.*

Von den Versuchen der Immunisierung durch normale Gewebe ausgehend, habe ich die Wirkung von Organen krebskranker Tiere geprüft. Auch diese Versuche sind noch nicht abgeschlossen. Ich erwähne sie aber hier in Kürze, da ein Teil meiner morphologischen Tumorimmunitätsuntersuchungen an Tieren ausgeführt wurde, die auf diese Weise immunisiert waren.

Die Organe wurden aus Mäusen mit Impf- und Spontantumoren unter aseptischen Bedingungen entnommen, in erbsengroßen Stückchen zerstückelt und lebensfrisch subcutan auf junge gesunde männliche Mäuse geimpft. Die Impftumoren waren nicht exulceriert und hatten die Größe einer Haselnuss oder einer Kirsche. Die zur Impfung verwendeten Organe waren makroskopisch metastasenfrei.

,,Ca“-Versuchsreihen. Erste Reihe: 7 Mäuse. 3 Tiere wurden mit Lungen-, 2 mit Milz- und 2 mit Leberstücken geimpft. Alle 7 Tiere wurden 30 Tage später mit „Ca“ nachgeimpft.

Ergebnis: 2 Lungentiere A.I. Bei der dritten Maus ging die Erfolgsimpfung an. Ob bei dieser Maus eine R.I. bestand, konnte nicht festgestellt werden, da sie frühzeitig getötet wurde. Die Milz und Lebermäuse zeigten eine geringe R.I.

Zweite Reihe: 12 Mäuse erhielten subcutan ein Lungenstückchen aus einer Maus mit „Ca“-Impftumor.

2 Tiere wurden „klinisch“ krank aus der Reihe ausgeschlossen. Auf 3 Mäusen wuchsen aus dem Lungentransplantat „Ca“-Tumoren, die langsam wucherten und metastasierten. Bei 3 weiteren Tieren wuchs das Transplantat bis zu Bohnengröße und dann gingen diese kleinen Tumoren innerhalb 3 Wochen vollkommen zurück.

Diese Tiere sowie die übrigen 3 Mäuse wurden 25 Tage nach der Lungentransplantation mit „Ca“ nachgeimpft.

Ergebnis: 4 Mäuse, von denen 2 eine Wucherung und Rückbildung des Lungentransplantates zeigten, A.I. Beide übrigen Tiere „stark“ R.I.

Die gleichen Befunde ergab eine dritte Versuchsreihe, die vor allem zur Prüfung von Metastasenfragen aufgestellt wurde.

Auch bei dieser Versuchsreihe von 3 mit Lungen vorbehandelten Mäusen blieb 1 Tier gegen die „Ca“-Nachimpfung, die 5 Wochen später erfolgte, A.I. Eine Maus „stark“ R.I. und die dritte Maus wurde nicht nachgeimpft, weil aus dem Lungentransplantat ein „Ca“-Tumor wuchs, welcher mehrere Metastasen ansetzte, was normalerweise beim Stamm „Ca“ nicht vorkam.

Aber auch die Vorbehandlung mit Lungen von Tieren mit Spontantumoren ergab die gleichen Ergebnisse.

Eine Reihe von 5 Mäusen erhielt subcutan Lungenstücke einer Maus mit spontanem Mammacarcinom (adenopapilläres Carcinom). Ein Tier war frühzeitig eingegangen. 2 Mäuse wurden für andere Untersuchungen verwendet und die zwei übrigen Tiere wurden 30 Tage nach der Lungeneimpfung mit „Ca“ nachgeimpft.

Ergebnis: Alle beide Mäuse blieben gegen die „Ca“-Nachimpfung A.I.

Die Versuche mit Lungengewebe von *Mäusen mit „Sa“-Tumoren* blieben ergebnislos, da aus den Lungentransplantaten stets „Sa“-Tumoren mit zahlreichen Metastasen wuchsen.

Besprechung der Befunde. Wie ausgeführt, benötigen diese Versuche weitere, auf einer breiteren Basis fundierte Untersuchungen. Dies ist nötig nicht nur zur Bestätigung der obigen so günstig ausgefallenen Experimente, sondern auch zur Lösung einer Anzahl von wichtigen Fragen. Es fragt sich nämlich, wo die immunisierende Wirkung der Lungeneimpfung liegt, im Lungengewebe selbst? Diese Annahme scheint unwahrscheinlich, da die Versuche mit Lungengewebe von normalen gesunden Tieren, wie im Kapitel der Immunisierungsversuche mit normalen Geweben ausgeführt wurde, negativ ausfielen. Dies spricht dafür, daß man die immunisierende Wirkung nicht im Lungengewebe selbst, sondern in *etwas anderem*, was den lungenkrebskranken Tieren zukommt, zu suchen ist.

Diese Wirkung kann den „schlummernden“ Tumorzellen, die sich in den Lungen krebskranker Tiere befinden und aus denen gelegentlich oder ständig, je nach der Virulenz der Zellen, bei der Lungentückchentransplantation Tumoren wachsen, zugeschrieben werden. Solche latente Geschwulstzellen sind mehrmals experimentell und morphologisch in den Lungen von krebskranken Menschen und Tieren gefunden worden. Man konnte weiter annehmen, daß die Immunität in diesem Falle durch *Stoffe* erzeugt wird, die sich in den Lungen krebskranker Tiere befinden und sozusagen „anticarcinöse“ Eigenschaften besitzen. In diesem Falle wird es sich um eine passive Tumorimmunität handeln.

Versuche zur Erzeugung einer passiven Tumorimmunität verliefen bekanntlich stets negativ. Andererseits sind hier die Befunde Schairers in Betracht zu ziehen. Schairer hat vor kurzer Zeit und nach dem Abschluß meiner vorliegenden Versuche sehr interessante Befunde bei

Versuchen erhoben, die sehr deutlich eine erworbene Resistenz der Lungen von Ratten, die ein *Jensen-Sarkom* trugen, gegen Zellaufschwemmungen des gleichen Tumors zeigen. Er hat nämlich beobachtet, daß intravenöse Injektion von Tumoremulsionen bei tumortragenden Tieren negativ verlaufen, während bei normalen, tumorfreien Tieren durch die gleichen intravenösen Tumorimpfungen Lungentumoren sich bilden. Das histologische Bild der Lungen bei den ersteren Tieren zeigte die von der menschlichen Pathologie (*M. B. Smidh, W. Ceelen u. a.*) her bekannten Bilder des Abbaues der Tumorzellen. *Schairer* läßt die Frage offen, ob die beobachteten cellulären Reaktionen oder normale Vorgänge für den Abbau der eingeschwemmten Tumorzellen verantwortlich zu machen sind. Er stellt kurzgesagt fest, daß während der Entwicklung eines Sarkoms der Haut bei der Ratte eine Resistenz gegen diesen Tumor in den Lungen entsteht, die beim normalen Tier nicht vorhanden ist, daß diese Resistenz sich als in der Lunge verankert erweist und nicht sofort nach Entfernung des Hauttumors verschwindet.

Diese Beobachtungen *Schairs* sind besonders für meine obigen Versuche, die von einem anderen Standpunkt die immunisierende Wirkung des Lungengewebes krebskranker Tiere beweisen, sehr lehrreich. Alle diese Versuche stellen uns vor eine Reihe wichtiger Fragen, die die Tumorresistenz und überhaupt die erworbene Immunität krebskranker Organismen sowie die *Übertragung* dieser Resistenz- oder Immunisierungskraft auf andere Organismen betreffen.

IV. Versuche zur Prüfung der Geschwulstartspezifität der Tumorimmunität.

Ehrlich stellte seinerzeit fest, daß gegen einen bestimmten Tumor immune Tiere auch gegen andere Impftumoren immun waren. Dies bezeichnete *Ehrlich* als „Panimmunität“. Spätere Untersuchungen haben diese Beobachtung *Ehrlichs* nicht immer bestätigen können. *Klinke* hat neuerdings auf Grund von gekreuzten Impfungen verschiedener Tumoren auf Tiere, die gegen einen bestimmten Tumor absolut immun waren, eine immunbiologische Differenzierbarkeit der geprüften Tumorstämme zu erweisen versucht.

Mir standen zur Verfügung nur „Ca“-A.I.-Tiere, da eine A.I. gegen den hochvirulenten Stamm „Sa“ nicht erzielt werden konnte. Ich konnte daher nur das Verhalten von „Ca“-Immunen Tieren gegen „Sa“-Impfungen prüfen und nicht umgekehrt. Obwohl diese Einseitigkeit des Versuches ihn mangelhaft macht, sind doch die Ergebnisse dieser Prüfung nicht ohne Interesse.

Es wurden 6 „Ca“-A.I.-Mäuse, die durch verschiedene Methoden (Vorbehandlung mit avirulentem Tumormaterial, mit kleinen Dosen von Tumoremulsionen lungenkrebskranker Tiere und nach künstlichem Rückgang von Impftumoren) immunisiert waren und deren „Ca“-A.I. mehrmals geprüft wurde, 4—6 Wochen nach den letzten negativen „Ca“-Impfungen mit „Sa“ geimpft.

Ergebnis: Auf sämtlichen Tieren ging die „Sa“-Impfung an. Die Tumoren wuchsen langsam. Bei 2 Mäusen wurden 12 Tage nach der Impfung die erbsengroßen Tumoren radikal mit der umgebenden Haut operativ entfernt. Diese beiden Tiere blieben rezidiv- und metastasenfrei, was sonst bei anderen radikal operierten „Sa“-Tieren nicht vorkam. Die übrigen 4 Mäuse gingen 6—8 Wochen nach der Impfung mit großen Tumoren und Lymphknotenmetastasen ein.

Besprechung des Befundes. Der Versuch beweist, daß die „Ca“-Immunität gegen eine „Sa“-Impfung nicht schützt. Die „Ca“-immunen Tiere sind gegen eine „Sa“-Impfung nur relativ immun. Diese Feststellung gibt Anlaß zu weiteren Untersuchungen, ob nämlich die Schutzlosigkeit der „Ca“-immunen Tiere gegen den „Sa“-Stamm auf den Artunterschied des „Ca“- und „Sa“-Tumorstammes, oder auf die Differenz ihres Virulenzgrades zurückzuführen ist. Darauf komme ich weiter unten zurück.

Erwähnenswert bei diesen Versuchen ist auch folgendes. Die 2 Mäuse, aus denen die heranwachsenden „Sa“-Tumoren rezidivfrei extirpiert wurden, sind wieder mit „Ca“ geimpft worden. Es zeigte sich, daß diesmal die „Ca“-Immunität herabgesetzt war.

Schlußfolgerungen.

Die Besprechung jeder einzelnen Immunisierungsmethode, die bei vorliegenden Untersuchungen geprüft wurden, wurde bereits in den zuständigen Abschnitten vorgenommen. Hier sollen nur allgemeine Rückschlüsse aus dem gesamten Überblick der ausgeführten Versuche gezogen werden.

Die Durchführung der Versuche gleichzeitig mit 2 und manchmal mit 3 verschiedenen Impftumoren erlaubte eine bessere Bewertung der geprüften Immunisierungsmethoden und ermöglichte vor allem Vergleichsbeobachtungen, die von Wichtigkeit für das Wesen der Tumorimmunität sind.

Die Immunisierungsversuche mit beiden Tumorstämmen „Ca“ und „Sa“ wurden gleichzeitig und unter genau gleichen Bedingungen ausgeführt. Doch waren die erzielten Ergebnisse verschiedene für jeden Tumorstamm. Gegen den hochvirulenten Stamm „Sa“ konnte keine absolute Immunität erzielt werden, während gegen den verhältnismäßig weniger virulenten Stamm „Ca“ bei einer kleinen Anzahl von Tieren eine absolute Tumorimmunität erzeugt werden konnte. Ebenso bestand ein deutlicher Unterschied im Grad der relativen Immunität, die gegen diese beiden Impftumorstämmen durch die verschiedenen Immunisierungsmethoden erzeugt wurde. Der Grad der relativen Immunität stand in umgekehrtem Verhältnis zum Grad der Virulenz der Tumorstämmen. Die relative Immunität gegen den Stamm „Sa“ war durchschnittlich niedrigeren Grades. Dadurch wird die grundsätzliche Rolle der Tumorvirulenz bei der Tumorimmunität sehr deutlich wieder bestätigt. Bekanntlich

ist *Uhlenhut* derjenige, welcher auf die wichtige Rolle der Tumorvirulenz bei der Tumorimmunität aufmerksam machte.

Aber die Rolle der Virulenz bezieht sich nicht nur auf den Grad der künstlich erzeugten Immunität, sondern begreift weiter das Wesen der Tumorimmunität selbst. Tiere welche absolut immun gegen den Stamm „Ca“ waren, zeigten nur eine geringe relative Immunität gegen den Stamm „Sa“. Also während eine „Ca“-Impfung auf diesen Tieren überhaupt nicht anging, gab eine „Sa“-Impfung auf die gleichen Tiere ständig positive Ergebnisse. Dieses Phänomen wurde von den meisten Untersuchern, die sich mit dieser Frage befaßt haben, als ein Beweis der biologischen Spezifität der verschiedenen Impftumoren und daher auch der Spezifität der Immunität, welche sich gegen diese bestimmten Tumoren richtet, aufgefaßt. Bei diesen Rückschlüssen wurde der Faktor „Virulenz“ entweder vernachlässigt oder flüchtig betrachtet. Ich glaube, daß gerade hier dieser Faktor besonders beachtet werden muß. Der Angang eines Impftumors auf einem Tier, welches gegen einen anderen Tumor immun ist, kann ebensogut auf die stärkere Virulenz dieses Impftumors zurückgeführt werden. Hätte ich „Sa“ absolut-immune Tiere, dann wäre der Beweis dieser letzteren ein leichtes, weil der nicht Angang von „Ca“-Transplantaten auf „Sa“ absolut-immunen Tiere den Beweis mit sich bringen würde, daß der ausschlaggebende Faktor bei der Tumorimmunität der Virulenzgrad des Vorbehandlungs- und des Nachimpfungstumors ist. Gingen umgekehrt „Ca“ Transplantate auf „Sa“ absolut immuren Tieren an, dann hätten wir einen überzeugenden Beweis dafür, daß tatsächlich die Tumorimmunität spezifisch für jede Art von Tumor ist und daß diese Immunität sich gegen eine jede bestimmte, morphologisch und vor allem biologisch gut charakterisierte Geschwulst, richtet. Die Unmöglichkeit, absolute Immunität gegen meinen Sarkomstamm bei Mäusen zu erreichen, hinderte die Entscheidung dieser wichtigen Frage. Sie soll auf Grund anderer Versuche später nochmals in Angriff genommen werden.

Aus dem Gesagten wird die überragende Rolle der Tumorvirulenz bei der Tumorimmunität deutlich ersichtlich. Die Unstimmigkeit der Ergebnisse gleicher Tumorimmunitätsversüche bei verschiedenen früheren Untersuchern, wenn keine anderen Gründe vorliegen, ist meines Erachtens hauptsächlich auf den verschiedenen Virulenzgrad und überhaupt auf die verschiedenen biologischen Eigenschaften der Impftumoren zurückzuführen. Es ist daher bei Versuchen mit Impftumoren, und zwar bei Tumorimmunitätsversuchen die Bestimmung der Virulenz der Tumorstämme, mit denen die Untersuchungen ausgeführt werden, unbedingt erforderlich. Die von mir ausgearbeitete Methode der Tumorvirulenzbestimmung gestattet uns heute die exakte Virulenzmessung eines jeden Impftumors. Daß außer der Virulenz noch andere Faktoren die Tumorimmunität wie überhaupt den Angang und das Wachstum von Impf-

tumoren beeinflussen, wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei der Tumorimmunität nicht nur der Virulenzgrad des zur Nachimpfung verwendeten Tumors von grundsätzlicher Bedeutung ist, sondern daß auch die Virulenz, die Malignität und überhaupt die Blastomeigenschaft des Vorbehandlungsgewebes ausschlaggebend für den Grad der durch diese Gewebe erzeugten Immunität ist. Meine Versuche zur Immunisierung durch Spontantumorimpfungen zeigen deutlich, daß das verhältnismäßig virulenter und gleichzeitig malignere Material eine Immunität höheren Grades hervorruft als das Material von avirulenten Spontantumoren. Weiter zeigt der Vergleich zwischen spezifischen und unspezifischen Immunisierungsmethoden, daß die normalen Gewebe stets eine Immunität niedrigeren Grades erzeugen als das Geschwulstgewebe. Gegen meine hochvirulenten Tumorstämme vermochte die Vorbehandlung mit normalen Geweben keine absolute Immunität sondern nur eine relative Immunität zu erzeugen. Es sei hier bemerkt, daß die obigen Feststellungen sich auf Vergleichsversuche stützen, welche gleichzeitig, unter gleichen Bedingungen und mit den gleichen Tumorstämmen ausgeführt wurden.

Was die Wirkung der verschiedenen normalen Gewebe anbetrifft, so steht an erster Stelle das embryonale Gewebe. Vor allem die Bildung und der Rückgang eines künstlichen „Embryoms“ ruft eine starke Tumorresistenz hervor. Diese Erscheinung ist mit der Immunität nach der Rückbildung von Impftumoren zu vergleichen, wobei zu bemerken ist, daß der gleiche Prozeß beim „Embryom“ eine starke, aber nur relative Immunität hervorruft, während er beim Blasztom stets eine absolute Immunität erzeugt. Ich beschränke mich hier nur auf die Feststellung dieser Tatsachen, die das Wesen der Tumorimmunität betreffen.

Ebensowichtig in der Frage der Tumorimmunität ist die Erscheinung der Tumorsensibilität bzw. Überempfänglichkeit. Obwohl jeder Untersucher, der sich mit Tumorimmunitätsversuchen befaßt hat, das Phänomen der Sensibilität kennt, ist diese Frage meist vernachlässigt worden. Die Faktoren, welche die Erscheinung einmal dieser einmal jener Form der Organismusumstimmung gegenüber Tumorimpfungen hervorrufen, sind noch nicht genau bekannt. Bei meinen Versuchen trat die Tumorsensibilität am deutlichsten nach der Vorbehandlung mit Kälte-Tumorextrakten und bei den Versuchen mit kleinen fraktionierten Tumoremulsionsdosen in Erscheinung. Auffallend ist, daß die Jensen-Sarkomextrakte sowohl bei meinen Versuchen wie auch bei gleichen Experimenten von Uhlenhut stets eine sehr deutliche Begünstigung der Nachimpfung mit dem gleichen Tumor hervorriefen.

Der Rückblick auf die geprüften Immunisierungsmethoden und auf die damit erzielten Ergebnisse zeigt sehr deutlich die relative Gültigkeit aller dieser Methoden bei den verschiedenen Tumorstämmen und ihre

Unzulänglichkeit gegen stark virulente Impftumoren. Von diesen Methoden bietet, meiner Ansicht nach, nur die *Domagk-Hackmannsche* eine aussichtsreiche Grundlage zur Ausarbeitung eines rein biologischen, zuverlässigen Immunisierungsverfahrens. Das gleiche versprechen meine bisherige Versuche mit kleinen, fraktionierten Dosen von Tumoremulsionen. Was die Immunisierung durch Lungengewebe krebskranker Tiere anbetrifft, so beschränke ich mich vorläufig auf die Aufzeichnung der sehr günstig ausgefallenen bisherigen Versuche mit dieser Methode, die uns vor eine Reihe wichtiger Fragen stellt.

Zusammenfassung.

Es wird über Versuche zur Erzeugung einer Tumorimmunität bei Tieren gegen Impftumoren verschiedener Art und Virulenz durch mehrere bekannte und eigene Immunisierungsmethoden berichtet.

Die Befunde werden besprochen und allgemeine Rückschlüsse aus den erzielten Ergebnissen gezogen.

Literaturverzeichnis.

Eine ausführliche Literatur über die Tumorimmunität und die Immunisierungsmethoden findet sich bei *Caspari*: Die experimentelle Erforschung der Geschwülste vom Standpunkt der Infektions- und Immunitätslehre. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. 1. 1930. — *Lewin, C.*: Die Ätiologie der bösartigen Geschwülste. Berlin 1927. — *Uhlenhuth und Seifert*: Kritische Übersicht über die Grundlagen der Immunität gegen transplantable Tumoren. Med. Klin., 1925 I.

Arbeiten die in den obigen Verzeichnissen nicht erwähnt werden:

Besredka: Presse méd. 1935, Nr 98. — *Besredka u. Gross*: Ann. Inst. Pasteur. Oktober-November 1935. — Wien. med. Wschr. 1935 I. — *Dittmar*: Z. Krebsforsch. 45 (1937). — *Domagk u. Hackmann*: Verh. dtsch. path. Ges., Tagg 28 (1935). — Z. Krebsforsch. 42 (1935). — *Klein u. Klinke*: Z. Krebsforsch. 44 (1936). — *Klinke*: Z. Krebsforsch. 76 (1937). — *Raab*: Z. Krebsforsch. 46 (1937). — *Rössle*: Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. 1936. — *Wilner u. Zakrzenski*: Presse méd. 1937, Nr 4.
