

Pathologisches Institut der Universität zu Tokio; Sasaki Laboratorium, Surugadai,  
Kanda, Tokio

## Studien über das Ascites-Hepatom

Zugleich ein Beitrag zum Begriff der cellulären Autonomie  
im Wachstum der malignen Geschwulst einerseits,  
und der Individualität der einzelnen Geschwulst andererseits\*

Von

**TOMIZO YOSHIDA**

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. August 1956)

### 1. Die Malignitätsfrage

Es ist nicht immer leicht, die Malignität eines gegebenen Tumors histologisch zu bezeichnen. Bei der experimentellen Krebserzeugung durch chemische Substanzen ist eine vorsichtige Beurteilung der histologischen Befunde erforderlich, um die Malignität der dadurch erzeugten Gewächse festzustellen. Aber, wenn die Carcinogenität einer chemischen Substanz einmal allgemein anerkannt ist, so geschieht es leicht, daß die histologische Untersuchung der so erzeugten experimentellen Tumoren vernachlässigt wird. Denn das Vorurteil, daß die dann vorliegenden Gewächse bestimmt in die Malignität übergehen, verhindert dann die wirkliche mikroskopische Feststellung der Malignität im einzelnen Falle.

Bei der Entwicklung des malignen Hepatoms durch die Azo-Verbindungen wird die Begleitung durch ausgedehnte Gallengangswucherungen, die ja nicht selten geschwulstähnliche Gebilde darbieten, häufig beobachtet und gewöhnlich als „Cholangiom“ bezeichnet. Aber ihre Geschwulstnatur, nicht zu sprechen von der Malignität, ist offenbar noch fraglich, da weder Metastase noch eine Transplantation dieses sog. Cholangioms bekannt ist. Dazu ist die Gallengangswucherung keine unbedingte Folge der Wirkung der Azo-Verbindungen auf die Leber. Bei der Einverleibung von genügend kleinen Dosen der Substanz wird eine primäre, mikroskopisch reine Wucherung der Leberzellen hervorgerufen, welche zur endgültigen malignen Entartung der Leberzellen führt. Weder die genannte Wucherung der Gallengangsepithelien noch die cirrhotische Bindegewebswucherung, welche häufig als vorausgehende oder vorbereitende Veränderungen der Hepatomentwicklung beobachtet werden, treten jemals in den Vordergrund dieser Spielart der Carcinombildung der Leberzellen. Im Lichte unserer Beobachtungen

\* Herrn Professor Dr. ROBERT RÖSSLER, meinem Lehrer, zum 80. Geburtstag.

sind beide Veränderungen, die Gallengangswucherung wie die sog. Cirrhose durch Azo-Verbindungen, mit Recht als sekundäre, reparatorische Gewebsreaktionen infolge der Gewebsschädigungen der Leber zu betrachten, welche durch eine übermäßige Darreichung der Substanz hervorgerufen werden. Zum Zweck der sauberen Darstellung der carcinogenen Aktivität einer chemischen Substanz ist eine Schwellendosis, wenn sie sich auch nicht immer genau bestimmen lässt, zu berücksichtigen. Eine Überdosierung verursacht Verwirrung der histogenetischen Prozesse durch Beimengungen von unvermeidlichen begleitenden Schädigungen des betreffenden Gewebes durch die Substanz.

Bei den üblichen Experimenten zur Erzeugung des Hepatoms werden die Azo-Verbindungen sicherlich überdosiert. Die Reduktion bis zur Hälfte der jetzt gebräuchlichen Dosis erlaubte mir eine Verfolgung der Histogenese des Hepatoms von der initialen Wucherung der Leberzellen bis zur endgültigen malignen Entartung derselben, ohne wesentliche Begleitung durch Veränderungen der übrigen Gewebelemente der Leber. Das Hepatom wird in diesem Fall demgemäß betrachtet als die Folge der primären formativen Reizung der Leberzellen durch Azo-Verbindungen<sup>10\*</sup>. Diese Beobachtung machte die Geschwulstnatur des so einfach durch Azo-Verbindungen angenommenen Cholangioms immer mehr fraglich, wenn auch die Intensität der Wucherung der Gallengangsepithelien im Vergleich mit solchen nach Leberschädigung durch andere Lebergifte beträchtlicher sein kann.

Die morphologische Auffassung der Malignität des Geschwulstwachstums ist von M. BORST 1932 durchaus gekennzeichnet worden<sup>1</sup>, und die damals von ihm hervorgehobenen Schwierigkeiten des Problems scheinen immer noch unverändert in der Geschwulstpathologie zu bestehen. Als ich früher das experimentelle Hepatom durch o-Amidoazotoluol zuerst histologisch studierte, wurde die Bezeichnung „Hepatom“ nur auf solche Gewächse beschränkt, welche ich durch möglichst strenge histologische Untersuchungen als maligne beurteilen konnte<sup>8</sup>. Aber als ich solche histologische Präparate Herrn Professor BORST vorlegte (1936), fragte er mich, nach dem Durchsehen der ganzen Reihe der Präparate, ob ich alle die Präparate als maligne bezeichnen wolle. Meine bejahende Antwort wurde mit seinem stillen Lächeln erwiderst, welches ich mit meinem Lächeln begrüßte. Dieser vergnügte Gedankenaustausch geschah damals ganz kurz und still, aber ließ mir die immer noch haftende Aufgabe der „histologischen Malignität“ zurück.

\* Meine damalige Arbeit über die Histogenese des experimentellen Hepatoms mit besonderer Berücksichtigung der Frage der formativen Reizung VIRCHOWS verdankt ihre Anregung Herrn Prof. R. RÖSSLE. Meine primäre Absicht, die Arbeit in diesem Archiv erscheinen zu lassen, wurde durch den Ausbruch des II. Weltkrieges verhindert.

Der Begriff der Stufen der Malignität von Professor RÖSSLE<sup>7</sup> war eine mich so intensiv interessierende Darstellung, daß ich in einer japanischen Zeitschrift ihren Kommentar versuchte. In der pathologischen Anatomie der malignen Geschwülste des Menschen läßt sich in der Tat die Malignität der Geschwulst nur mit dem Begriff der „Stufen“ auf-fassen. Denn die Malignität des Geschwulstwachstums in der Medizin ist nichts anderes als der Grad der Intensität der Schädigung, welche durch das Tumorwachstum auf den Körper oder die Gewebe des Kranken ausgeübt wird und welche einen stufenweisen Unterschied auch in den anatomischen Bildern der Aggression und der Abwehr zwischen den beiden einander gegenüberstehenden Geweben des Tumors und des Wirtes wahrnehmen läßt.

Die einzelnen Krebsfälle des Menschen wiederholen sich nicht. Die Wachstumsweise der Krebszellen eines gegebenen Krebsfalles kann man in der Regel nur einmal, und zwar unter den gegebenen Umständen beobachten. Es kommen dabei nur die Zustandsbilder irgendeines Momentes aus den immer schwankenden gegenseitigen Wirkungen zwischen Tumor und Wirt zur Beobachtung. Diese Bilder der verschiedenen Fälle können miteinander verglichen werden. Aber es ist nicht möglich, dieselben Krebszellen unter veränderten Umständen oder unter den anderen Bedingungen bei anderen Wirten wiederholt zu beobachten.

In der experimentellen Krebsforschung, wo die Krebszellen als solche in die unmittelbare Beobachtung gebracht werden können, ist die Lage anders. Der Begriff des Grades oder der Stufen der Malignität kann hier nur von geringem Belang sein. Denn die Tumorzellen sind hier nur solche lebendige Wesen, die sich einfach vermehren, und solange nur die Zellen als solche in Betracht kommen, bleibt ihre *böse Intention* natürlich außerhalb der Entscheidung liegen. Es ergibt sich hier also die neue Frage nach der Malignität der Zelle selbst anstatt der Malignität des Tumors als Ganzes. Es ist die Frage nach der Möglichkeit der Charakterisierung oder Begriffsbestimmung der *malignen Zelle* im Rahmen der Pathologie. Die Studien am Ascitestumor oder der Versuch der Transformation des soliden Tumors in die ascitische Wachstumsform stellen uns vielleicht vor diese Aufgabe.

**Ascitische Transformation des Hepatoms.** Meine Studien über den Ascitestumor gehen ursprünglich auf die Stromafrage der Geschwülste zurück. In den gutartigen Tumoren, welche eine Art kontinuierlichen Überwuchses des normalen Gewebes darbieten, ist das Stroma der Geschwülste verständlich und läßt sich morphologisch verstehen. In den malignen Gewachsen dagegen, wo die *celluläre* Wucherung im Vordergrund steht, konnte eine erfolgreiche Verfolgung nach dem allgemeingültigen *eigenen* Stroma der Geschwulst, welches für weiteres Leben und Proliferation der Zellen eine unentbehrliche Voraussetzung sein

wird, niemals möglich sein<sup>11</sup>. Deshalb wurde das Interesse auf die andere Form des Tumorwachstums gerichtet, wo die Geschwülste ihr Wachstum ohne geformtes oder gewebliches Stroma fortsetzen können. Das Vorbild dieser Wachstumsform findet sich im sog. „Asciteskrebs“, der 1932 vom EHRLICHSEN Mäusekrebs abgeleitet wurde<sup>6</sup>.

Es wurde zuerst erwartet, daß die malignen Tumoren, nachdem sie entweder histologisch ein infiltratives Wachstum angenommen oder sich transplantabel erwiesen haben, immer die Möglichkeit der Transformation in die Ascitesform aufweisen würden. Aber das Resultat der Experimente fiel gegen diese Erwartung aus. Selbst die transplantablen Tumoren waren nicht immer umformungsfähig.

In dieser Beziehung ist die Voraussetzung bemerkenswert, die von G. KLEIN<sup>5</sup> vorgeschlagen wurde, daß es unter den malignen, transplantablen Tumoren den Unterschied bezüglich der biologischen Natur der Elemente in der Weise gibt, daß sie einmal für die Proliferation in der Ascitesflüssigkeit geeignet sind, während es bei den anderen nicht der Fall ist. Diese Differenz sollen nach ihm die Tumorzellen den ihnen innenwohnenden biologischen Eigenschaften verdanken.

Nach meinen Erfahrungen liefert das experimentelle Hepatom der Ratte ein nützliches Beispiel zur Prüfung der ascitischen Umformungsfähigkeit von Geschwülsten. Ich habe diesbezügliche Studien 1950 mit der Hilfe von mehreren Assistenten angefangen, die die verschiedenen Abschnitte der Arbeit erfolgreich ausgeführt haben. Die einzelnen Arbeiten sind seitdem in „Gann“, der japanischen Zeitschrift für Krebsforschung serienweise veröffentlicht worden und werden sich weiter fortsetzen. Die Erfahrungen bei diesen Studien mit dem sog. Yoshida-Sarkom, einem Ascitesarkom der Ratte, mit dem wir uns seit 1943 beschäftigt haben, dienten als Unterlage für die Experimente am Asciteshepatom.

Unter 61 experimentellen Hepatomen der Ratte, welche histologisch als maligne bezeichnet wurden, erwiesen sich 23, d.h. ungefähr 37%, als transplantabel in die Peritonealhöhle der gewöhnlichen, käuflichen Albino-Ratte. Unter diesen transplantablen Tumoren wurden nur 5 in die Ascitesform transformiert. Es läßt sich also zusammenfassend sagen, daß ungefähr 8% (5 unter 61) aller histologisch maligne bezeichneten Hepatome und 21% (5 unter 23) der transplantablen Hepatome in die Ascitesform umformungsfähig waren<sup>13</sup>.

Es ist von Interesse, daß in vielen Fällen der primären Hepatome spontan ein Tumorascites entsteht, d.h. eine spontane Befreiung der Hepatomzellen in die Bauchhöhlenflüssigkeit stattfindet. Es ist eine Art von Peritonitis carcinomatosa. Die Menge der in der Flüssigkeit frei liegenden Tumorzellen variiert je nach Fall mit ziemlich großer Schwankungsbreite.

Die Transplantation mit diesem spontanen Tumorascites wurde jüngst von neuem untersucht, und das Resultat ist in Tabelle 1 angegeben<sup>14</sup>. Es wurde zunächst erwartet, daß die intraperitoneale Transplantation mit der Flüssigkeit, die freie Hepatomzellen enthielt, immer mit der Bildung von Ascites-Hepatomen ausfallen würde. Aber 4 unter 9 positiven Fällen kehrten in Wirklichkeit wieder zur knotigen Tumorbildung zurück, ohne die erwartete Bildung von Ascites-Hepatomen zu zeigen. Einer von diesen 4 Fällen zeigte gleichzeitig in anderen Tieren die Transformation in die Ascitesform. Aber die übrigen 3 Fälle, welche alle sehr langsam wuchsen, blieben immer in knotiger Form während der ganzen Zeit der Fortsetzung der sukzessiven Transplantation bis zur 6. Generation, wo der Versuch abgebrochen wurde.

Tabelle 1. *Intraperitoneale Transplantation des spontanen Tumorascites der primären (experimentellen) Hepatom-Ratte*

Fälle	Erfolgreiche Transplantation	
	im Knoten	im Ascites
19	4	5

**Ascites- und Non-ascites-Hepatom.**  
Der Unterschied zwischen beiden Formen ist keineswegs ein absoluter.

Auch in den non-ascitisch bezeichneten Fällen gibt es ja mehr oder weniger Flüssigkeitsansammlung in

der Bauchhöhle, die mitunter geringe Mengen von Tumorzellen oder *Inseln* (s. unten) enthalten kann. Aber die Menge der Flüssigkeit oder der Tumorzellen ist so geringfügig, daß die Transplantation mit der Flüssigkeit nicht angeht. Die Tumorzellen von derartigen Fällen wachsen fast ausschließlich in der Weise, daß sie viele Tumorknoten auf der Oberfläche des Peritoneums bilden und in die darunterliegenden Gewebe weiter einwachsen. Es käme daher zuerst die Erklärung in Betracht, daß die Tumorzellen dieser Fälle die Stromareaktion vom Wirtsgewebe für ihr weiteres Wachstum nicht entbehren können. Das würde sich von der anderen Seite derart formulieren lassen, daß die Tumorzellen dieser Fälle noch unter der Bedingung, nur in einem einigermaßen bestimmten zelligen Zusammenhang weiterzuwachsen, stehen bleiben, d.h. daß sie noch nicht mit der Fähigkeit ausgestattet sind, das isolierte, einzellige Leben schrankenlos weiterzutreiben.

Dagegen ist bei der ascitischen Form die Proliferation der Tumorzellen in der Ascitesflüssigkeit so lebhaft, daß die Flüssigkeit in der Regel einen Zustand von fast reiner Kultur der Tumorzellen darbietet und daß die sukzessive Transplantation ausschließlich mit der Flüssigkeit praktisch unendlich fortgesetzt werden kann. Aber eine gleichzeitige knotige Tumorbildung in der Bauchhöhle läßt sich nicht vermissen, und zwar können in einigen Fällen die Tumorbildungen so großartig sein, daß die an der Tumorbildung teilnehmenden Tumorzellen zahlenmäßig diejenigen in der freien Flüssigkeit überwiegen.

Die Tumorzellen zeigen dabei also augenscheinlich doppelte Fähigkeit des *stroma-freien* Wachstums einerseits und des knotigen oder solid-geweblichen Wachstums andererseits. Das letztere möge zeigen, daß die ursprüngliche Eigenschaft der somatischen Mutterzellen, den gefäßbindegewebigen Apparaten sich anzulegen, noch in den Tumorzellen trotz alledem beibehalten ist.

Der wesentliche Unterschied zwischen den ascitischen und non-ascitischen Hepatomen besteht also nur darin, daß im ersten Fall die sukzessive Transplantation mit der Ascitesflüssigkeit immer weiter fortgesetzt werden kann, während dies bei dem letzteren nicht der Fall ist.

Es gibt daher den einen Unterschied unter den Tumorzellen der Hepatome verschiedenen Ursprungs, daß einige von ihnen *nur* in solider Form mit Unterstützung des Stomas wachsen können, während andere ganz isoliert und suspendiert in der Ascitesflüssigkeit, ohne die Unterstützung des Stomas zu fordern, weiterzuwachsen befähigt sind.

Es ist von Interesse zu fragen, ob es eine Art von Hepatomzellen gibt, welche nur in der Ascitesform zu wachsen befähigt ist. Es ist sicher, daß einige graduelle Unterschiede in dem Grade und der Geschwindigkeit der Ansammlung des Ascites je nach dem Hepatomstamm sich finden. In einem Stamm von unseren jetzigen 10 Ascites-Hepatomen (s. unten) wachsen die Zellen so lebhaft und rasch in der Flüssigkeit, daß die Tumortiere hauptsächlich durch die Vermehrung des Ascites getötet werden. Aber auch bei diesen Tieren werden zahlreiche miliare Tumorknötchen an der Peritonealfläche gebildet, und die Zellen wachsen in die darunterliegenden Gewebe hinein.

Es ist schwierig, einen Transplantatstamm von der non-ascitischen Form des Hepatoms zu verfolgen, da in diesen Fällen die Geschwülste gewöhnlich sehr langsam wachsen und die Zeitdauer bis zum Tod der Tumortiere ziemlich stark variiert, je nach Fall, so daß es praktisch unmöglich ist, die Transplantation solch eines Tumors lang fortzusetzen.

Kurz, die Transplantabilität des Hepatoms und die Fähigkeit des Tumors, ascitisch zu werden, gehen soweit immer parallel, d.h. ein Hepatom, das leicht transplantiert wurde und mit regelmäßigem Tempo wuchs, zeigte gleichzeitig immer die Fähigkeit des ascitischen Wachstums.

**Die celluläre Autonomie.** Das autonome Wachstum des malignen Tumors bezieht sich gewöhnlich auf das „Tumorgewebe“ als Ganzes, welches unabhängig von der biologischen Regulierung des Wirtorganismus schrankenlos wächst. Aber wenn man den Ascitestumor unter dem Mikroskop betrachtet, so findet man kein geformtes oder zusammenge setztes Gewebe, sondern lauter Zellen, die sich durch mitotische Teilung unendlich vermehren. Es könnte mit Recht gesagt werden, daß dies

Wachstumsbild des Ascitestumors eine höchst vereinfachte Wiedergabe der generellen Wachstumsweise der malignen Geschwülste darstellt.

Die mitotischen Teilungen der einzelnen Zellen des Ascitestumors gehen voneinander vollständig unabhängig vor sich, d.h. die Tumorzellen in der Ascitesflüssigkeit vermehren sich vollkommen unbeachtet von und ohne Rücksicht auf die danebenliegenden anderen Zellen. Man sieht hier also eine vollkommene Autonomie der einzelnen Tumorzellen. Der Ascitestumor muß also dafür gehalten werden, daß er die „zelluläre Autonomie“ des Tumors sichtbar macht, die bei der erfolgreichen Transplantation mit isolierter Einzelzelle am meisten realistisch wahrgenommen werden kann<sup>2, 4, 12</sup>.

Unter den drei autonomen Aktivitäten der normalen Gewebezellen, der nutritiven, funktionellen und formativen, die von VIRCHOW so lebhaft besprochen wurden, ist die Beschränkung (anstatt unbedingter Ausübung der Autonomie der Zellen) am meisten augenscheinlich hinsichtlich der formativen Leistung der Zellen, worauf die Schwelle der regeneratorischen Zellformation, sowohl im physiologischen wie im pathologischen Sinne, schon hinweist.

Für die maligne Entartung der somatischen Zellen ist es schon von klassischen Untersuchungen her allgemein anerkannt, daß die am meisten auffallende Äußerung der maligne entarteten Zellen die Emanzipation oder Befreiung der betreffenden Zellen von der Regulierung des ganzen Organismus in bezug auf ihre formative oder plastische Aktivität ist. Die Emanzipation kann sich natürlich nicht allein auf die Formation beziehen, sondern auf die Nutrition und Funktion auch mehr oder weniger ausdehnen.

Allerdings kann die Annahme der Emanzipation, soweit die Untersuchung der Geschwulst sich innerhalb des Rahmens der morphologischen Beobachtung auf die Schnittbilder der fixierten Tumorgewebe beschränkt, nur eine abstrakte sein. Aber in den Ascitestumoren, wo die Tumorzellen sich in lebendigem Zustand beobachten lassen, ist die Autonomie der plastischen Tätigkeit der individuellen Zellen mit den Augen zu erfassen.

Soweit die diesbezügliche Emanzipation oder Befreiung noch unvollständig ist, bleibt das Wachstum des Tumors im Rahmen der geweblichen Formation, wo die Parenchymzellen des Tumors immer noch im Zusammenhang mit dem Gefäßbindegewebssystem stehen, d.h. eine Art lokalisierten, pathologischen Überwuchses darstellen. Dies gilt für die sog. gutartigen (benignen) Tumoren. Selbst wenn ein Tumor sich übertragbar erweist, soweit er nur in der festen (soliden) Tumorförderung wächst, würde er mit Recht zu der Kategorie der benignen Tumoren zugerechnet werden. Denn die Zellen sind entweder noch

abhängig vom Stroma, oder die Teilung der individuellen Zellen haben aufeinander einigen Einfluß.

Zum Versuch, eine mehr saubere Grenzlinie zwischen den benignen und malignen Tumoren zu ziehen, scheint der Begriff der „cellulären Autonomie“ etwas beizutragen. Die Malignität oder richtiger das maligne Wachstum des Tumors nach diesem Begriff könnte den gebräuchlichen Ausdruck „maligne Zelle“ noch genauer bestimmen, wenn „die maligne Zelle“ in dieser Weise das Synonym der unbedingt autonom-wachsenden individuellen Zelle ausmachen würde. Die Malignität in diesem Sinne hat aber keinen unmittelbaren Zusammenhang mehr mit der Relation oder den gegenseitigen Beziehungen zwischen Tumor und Wirt, sondern bezieht sich ausschließlich auf das biologische Verhalten der Tumorzellen.

## 2. Beschreibung des Ascites-Hepatoms Individueller Unterschied der verschiedenen Übertragungsstämme des Ascites-Hepatoms

Es ist ein Vorteil der Studien mit dem Ascitestumor, daß verschiedene Eigenschaften des Tumors, die in der knotigen oder solid-geweblich konstruierten Form entweder maskiert oder schwer wahrnehmbar enthalten sind, leicht demonstriert werden können, und zwar in der Weise, daß die vergleichenden Untersuchungen der individuellen Geschwülste zu mehr oder weniger sauberer Aussagen geführt werden können. Was wir diesbezüglich soweit kennengelernt haben, ist, daß die experimentellen Hepatome, die von den Leberzellen immer durch dasselbe Verfahren erzeugt wurden, niemals miteinander in den biologischen Eigenschaften ganz übereinstimmen. Jeder Übertragungsstamm des Ascites-Hepatoms, den wir von einem primären Hepatomknoten eines Tieres abgeleitet haben, war immer verschieden von dem anderen Stamm, der vom Hepatom anderer Tiere abgeleitet wurde.

In dem zusammenfassenden Bericht des vorigen Jahres<sup>13</sup> wurden 4 Stämme des Ascites-Hepatoms verglichen. Sechs neue Stämme wurden seitdem begründet und zu den Untersuchungen hinzugefügt<sup>14</sup>. Eine kurzgefaßte Beschreibung einschließlich dieser neuen Stämme wird versucht, um zum Individualitätsbegriff der einzelnen Geschwulst beizutragen.

**Mikroskopisches.** Die Zellen des Ascites-Hepatoms behalten auch in der Flüssigkeit deutlich die epitheliale Natur und bilden Zellverbände und weitere Zellkonglomerate verschiedener Größe, die wir vorläufig „Inseln“ genannt haben (Abb. 1). Die Größe und Gestalt der Inseln, die nachweislich nur aus epithelialen Parenchymzellen des Hepatoms gebildet sind<sup>13</sup>, variieren von einem sog. „Paar“, d.i. eine Zusammenfügung von 2 Tumorzellen (Abb. 1) bis zu enorm großen Inseln, die unter

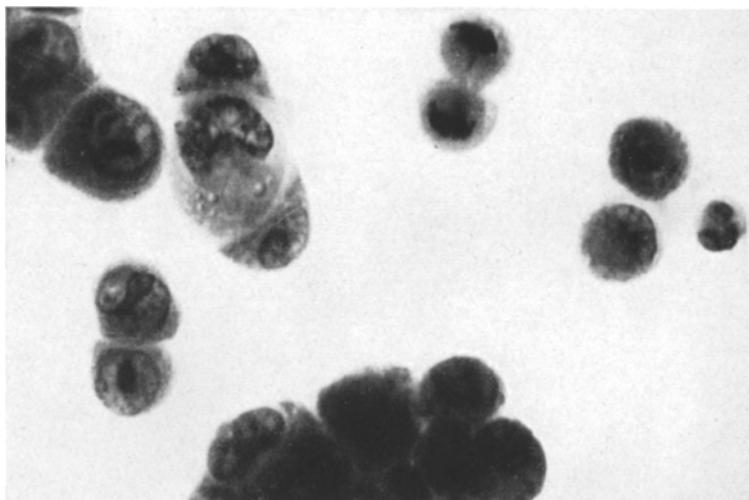


Abb. 1. Hepatomzellen in der Ascitesflüssigkeit. Kleine Inseln und isolierte Zellen

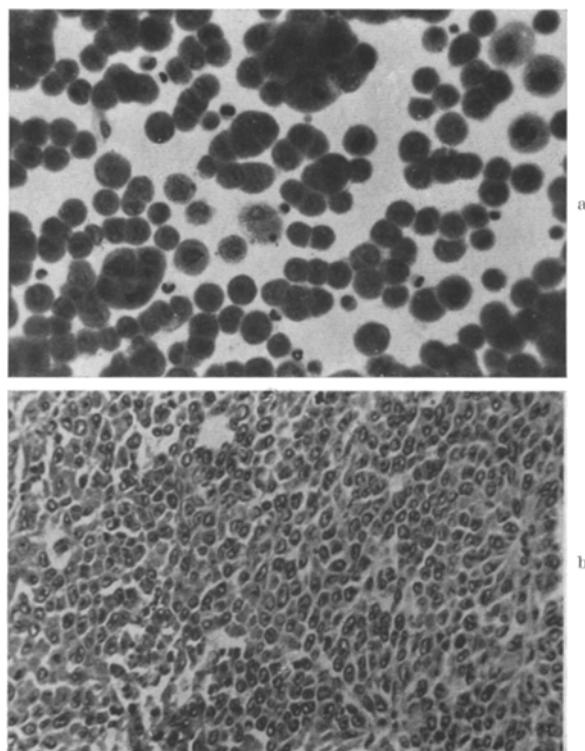


Abb. 2 a. u. b. Ascites-Hepatom AH 130 (begonnen im Juni 1951). a Ascitesbild. Zahlenreiche isolierte Tumorzellen und mehr kleine Inseln.  $100\times$ . b Schnittbild des soliden Tumors aus dem großen Netz.  $50\times$

Umständen schon mit bloßem Auge erkannt werden können. Der Ascites stellt also eine Suspension von diesen verschiedenen großen Inseln dar, zwischen denen eine Menge von individuell isolierten Hepatomzellen verstreut sind (Abb. 1).

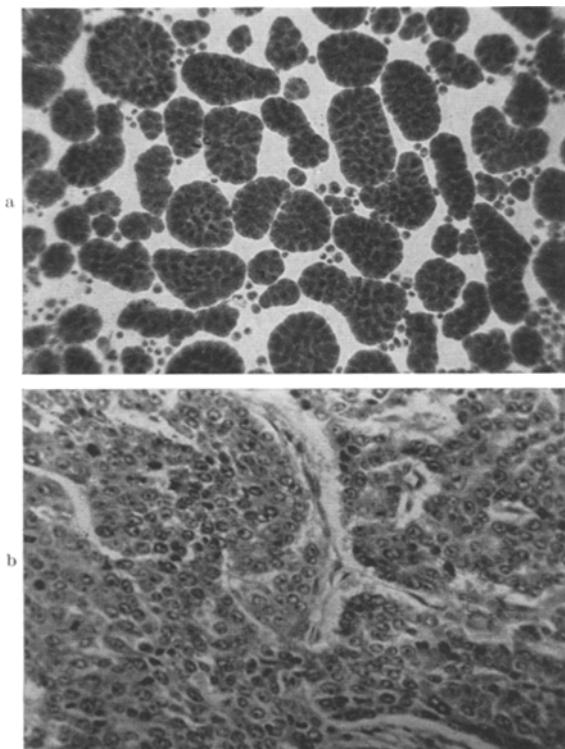


Abb. 3 a u. b. AH 7974 (begonnen im Juli 1952). a Ascitesbild. Mehr regelmäßige geformte Inseln. Wenige isolierte Tumorzellen. 50×. b Schnittbild des Tumors im Netz. 50×

Nun, jeder Stamm des Ascites-Hepatoms hat seine eigene Zusammensetzung aus diesen Gebilden der cellulären Elemente, d.h. ein eigenes Ascitesbild, das in bezug auf die Form, Größe, Festigkeit der Zellverbindungen der Inseln usw. je nach dem Stamm verschieden ist. Die Ascitesbilder\* von jedem der 10 Stämme sind in Abb. 2—11 gezeigt. Sie sind voneinander so verschieden, daß jeder Stamm sich unter dem Mikroskop leicht identifizieren läßt.

\* Die mikroskopische Untersuchung des Ascites-Hepatoms, wo Inseln enthalten sind, läßt sich erfahrungsgemäß am ehesten leicht und erfolgreich durch die Färbung mit Acetogentianaviolett, anstatt der üblichen Giemsa-Färbung, ausführen.

In Paraffin-Schnittbildern der eher größeren Inseln, wird es demonstriert, daß sie meistens nicht voll, sondern Höhlengebilde wie die Blastula sind.

Zum Ascitesbild jedes Stammes gehört in den Abbildungen ein histologisches Bild des Schnitt-Präparates des soliden Tumors des selben Stamms, der durch die Zellinfiltration in die Umgebung des Ascites, meistens in das große Netz, gebildet wurde; es ist zum Vergleich

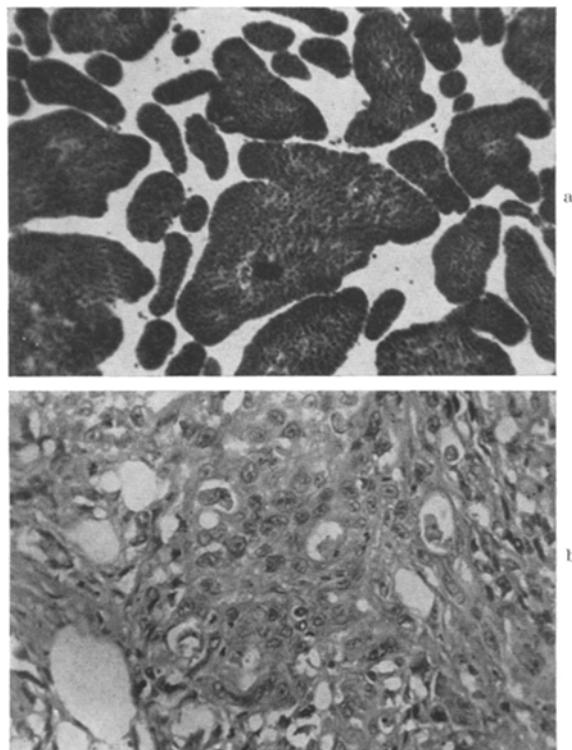


Abb. 4a u. b. AH 601 (begonnen im August 1952). a Ascitesbild. Außerordentlich große, unregelmäßig geformte Inseln mit mehr glatter Oberfläche.  $50 \times$ . b Schnittbild. Infiltration der Tumorzellen ins Netz.  $100 \times$

gegenübergestellt. In 5 von den 10 Stämmen sind auch noch Schnittbilder der primären Hepatomknoten hinzugefügt. Durch den Vergleich aller dieser Bilder wird es augenscheinlich, wie die Eigentümlichkeit der Zellordnung jedes Tumors, die in den Schnittbildern kaum zu definieren ist, in den Ascitesbildern ausgeprägt ist.

**Wachstumstempo und Transplantabilität.** Das Wachstumstempo, das durch die durchschnittliche Lebensdauer der Tumortiere dargestellt wird, kann je nach dem Stamm ziemlich weit variieren. Es ergibt sich, daß Stämme, bei denen Tumortiere länger überleben, in der Regel weniger transplantabel sind.

Es wurde bei anderen Gelegenheiten von mir besprochen, daß die Transplantabilität eines Tumors, entgegen der allgemeinen Annahme oder des Eindrucks, von der ersten Transplantatgeneration des Tumors an fixiert ist<sup>13</sup>. Auch bei den jetzigen 10 Stämmen des Ascites-Hepatoms

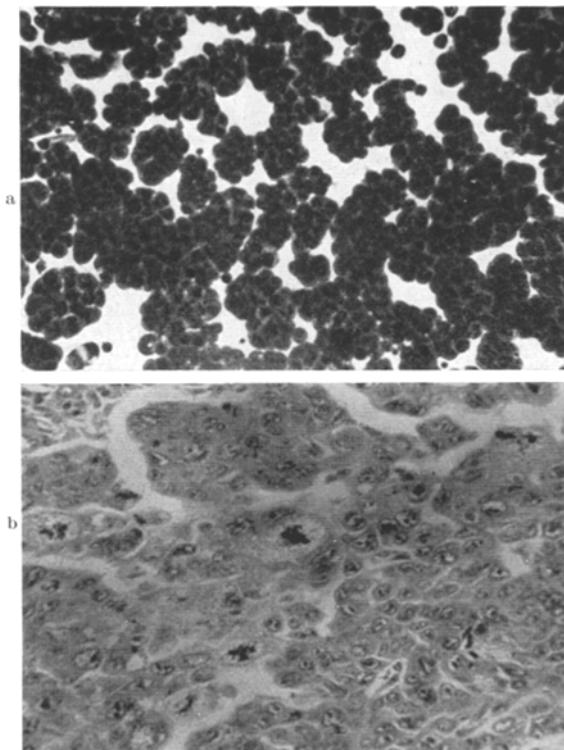


Abb. 5a u. b. AH 602 (begonnen im September 1952). a Ascitesbild. Sehr ungeformte Inseln mit lockeren Zellverbindungen. 50 ×. b Schnittbild. Infiltrat des Netzes. Mehr große Zellen mit Mitosen. 100 ×

wurde keine graduelle Steigerung in der Transplantabilität durch genauere Analyse festgestellt. Bei allen Stämmen ist das Wachstums- tempo auch von Anfang der Transplantation an wesentlich unverändert geblieben.

**Transplantation mit einer einzigen Zelle.** Der Versuch wurde mit dem Stamm AH 130, der am reichlichsten isolierte individuelle Tumorzellen enthält, ausgeführt (vgl. Abb. 2). Das Verfahren war prinzipiell dasselbe wie bei dem sog. Yoshida-Sarkom<sup>2,4,12</sup>. Die Transplantation war erfolgreich nur in 3 unter 93 Versuchen. Der Erfolg ist viel geringer im Vergleich mit der 55%igen positiven Transplantation mit Einzel-

zellen beim Yoshida-Sarkom<sup>2</sup>. Der Beginn der Proliferation der Hepatomzellen in der Bauchhöhle bei den erfolgreichen Einführungen wurde jedesmal binnen ungefähr 15 Tagen nach der Inoculation festgestellt. Die 3 Tumortiere der erfolgreichen Fälle starben an dem Ascites-Hepatom am 30., 40. und 46. Tag nach der Inoculation.

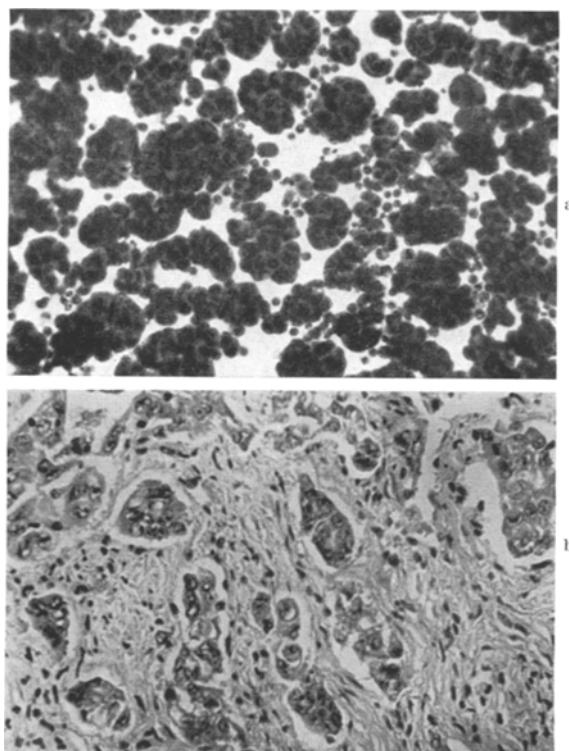


Abb. 6a u. b. AH 63 (begonnen im März 1955). a Ascitesbild. Unregelmäßige, kleine und lockere Inseln ähnlich wie die der Abb. 5, aber mit Beimengung von isolierten Zellen sowie kleinsten Inseln. 50×. b Schnittbild. Tumorbildung im Fettgewebe um den Samenstrang. 100×

Bei 3 Unterstämmen, SH 1, 2 und 3, die je von diesen drei erfolgreichen Fällen abgeleitet wurden, wurde die sukzessive Transplantation in mehr als 50 Generationen fortgesetzt. Die Lebensdauer der Tumortiere und die Transplantabilität aller dieser Unterstämmen stimmten vollständig mit denen des Mutterstamms AH 130 überein<sup>13</sup>. Die mikroskopischen Bilder des Tumorascites aller dieser Tochterstämmen, welche vollständig miteinander übereinstimmten, war nicht zu unterscheiden von dem des Mutterstamms AH 130. Auch die Chromosomenzahl der Tumorzellen dieser vier verwandten Stämme stellte eine überraschende Einförmigkeit dar<sup>13</sup>.

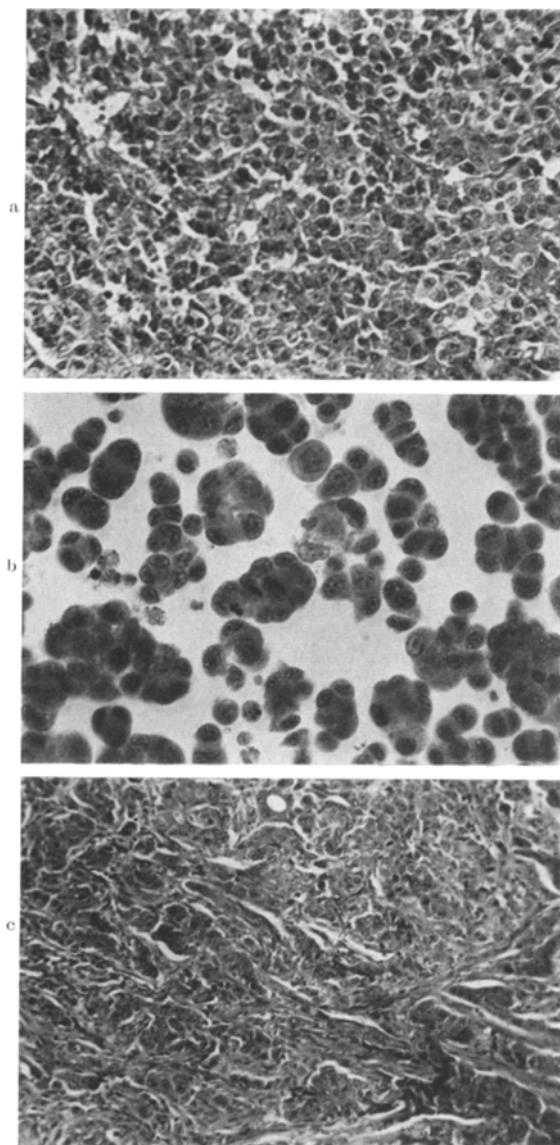


Abb. 7a—c. AH 66 (begonnen im Oktober 1954). a Primäres Hepatom. 50×. b Ascitesbild des Hepatoms nach mehrmalig fortgesetzten Übertragungen mit dem Tumorascites. Durchgängig kleine saubere Inseln. 100×. c Infiltration der ascitischen Tumorzellen ins große Netz. 50×

Es ergab sich also, daß jede individuelle Zelle des Ascites-Hepatoms AH 130, die ohne Auswahl herausgenommen wurde, mit vollkommen gleichartigen biologischen Eigenschaften ausgestattet war; sie wurden auf ihre Nachkömmlinge fortlaufend unverändert weiter übertragen.

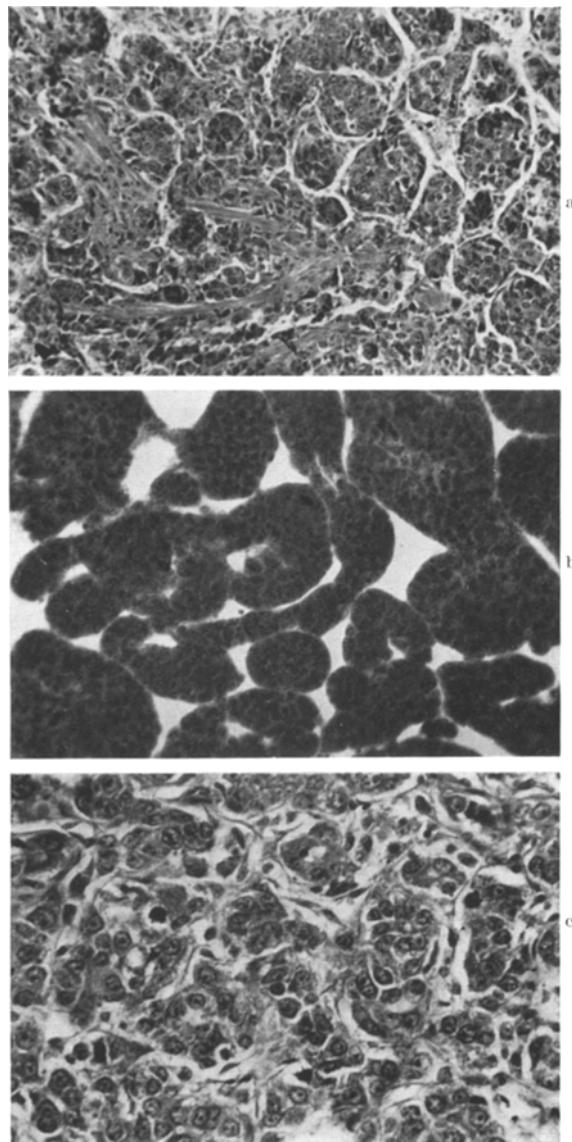


Abb. 8a—c. AH 149 (begonnen im November 1955). a Primäres Hepatom.  $50\times$ . b Ascitesbild desselben Hepatoms. Saubere, große Inselbildungen.  $50\times$ . c Infiltration der Inselzellen ins Netz.  $100\times$

**Die Chromosomenzahl:** Die Chromosomenzahl der Tumorzellen wurde in 5 unter 10 Stämmen des Ascites-Hepatoms untersucht. In allen Fällen wurde 4 Tage alte Tumorflüssigkeit gebraucht\*. 100 Kerne

\* Bei der Untersuchung auf Chromosomenzahl wurde eine Modifikation der sog. hypotonischen Methode von Dr. Hsu erfolgreich angewandt<sup>3, 13</sup>.

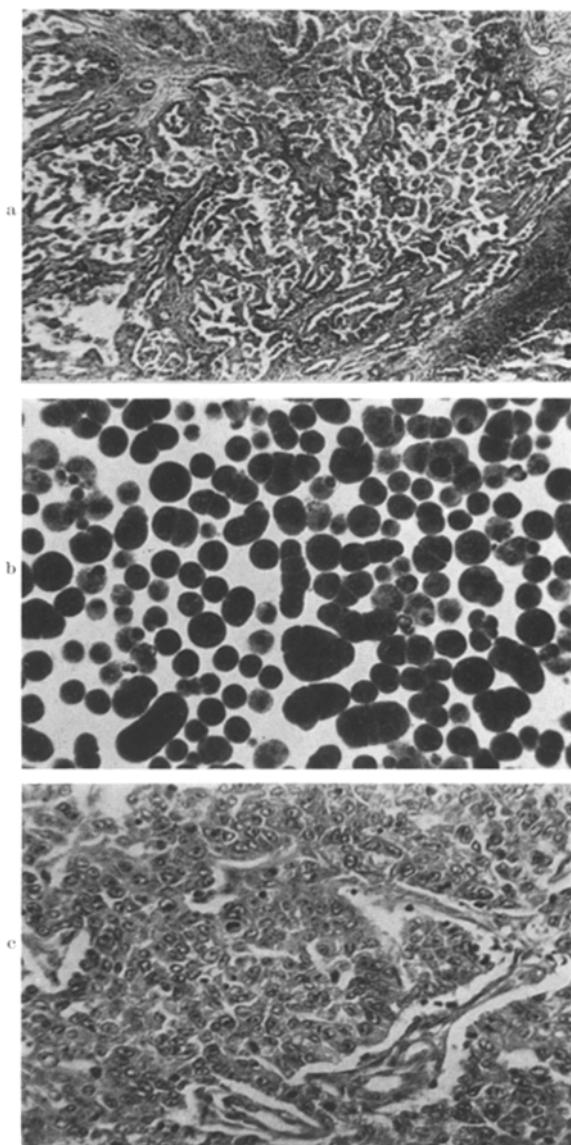


Abb. 9a—c. AH 39 (begonnen im Dezember 1955). a Primäres Hepatom.  $20\times$ . b Sehr kleine Inselbildung, beigemengt reichliche solitäre Tumorzellen in der Ascitesform desselben Hepatoms.  $100\times$ . c Infiltration der Asciteszellen ins Netz.  $100\times$

in der Metaphase wurden ohne Auswahl mit Hilfe des ABBÉSchen Apparats gezeichnet und die Chromosomen gezählt. Das Resultat der Untersuchung von 5 Stämmen ist in Abb. 12 angegeben.

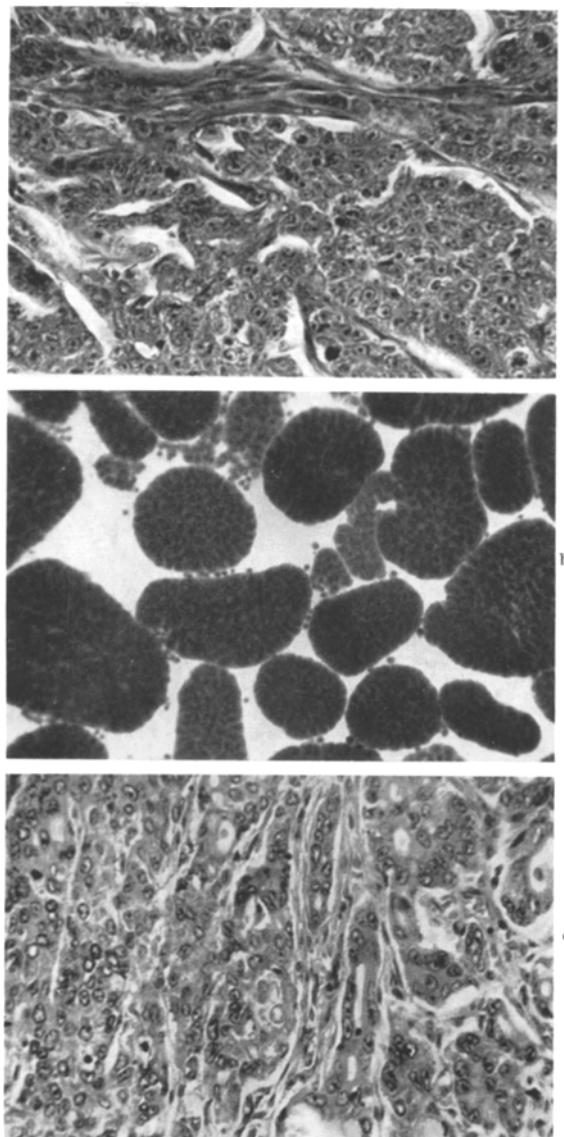


Abb. 10a—c. AH 49 (begonnen im Dezember 1955). a Primäres Hepatom. 100 $\times$ .  
b Große, kugelige und kompakte Inseln in der Ascitesform des Tumors. 20 $\times$ . c Infiltration  
der Asciteszellen ins Netz. 100 $\times$

Der „Modus“ der Variationen der Chromosomenzahl stimmte niemals miteinander bei den fünf untersuchten Fällen überein. Daß AH 601 und AH 602 ausnahmsweise eine vollkommene Übereinstimmung

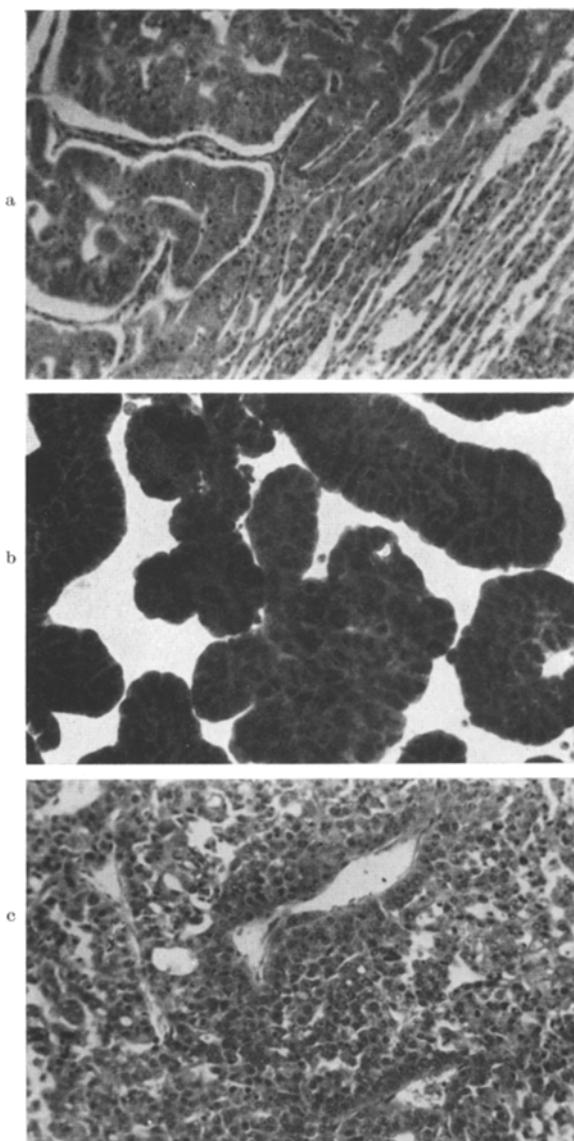


Abb. 11a—c. AH 27 (begonnen im Dezember 1955). a Lungenmetastase des primären Hepatoms.  $50\times$ . b Ascitesbild des Hepatoms. Eigentümliche Gestalt der großen Inseln.  $50\times$   
c Infiltrationsbild des Ascitestumors.  $50\times$

zeigte, ist dadurch erklärt, daß beide ursprünglich von demselben primären Hepatomknoten eines Tieres abgeleitet sind. Obgleich beide voneinander verschiedene mikroskopische Bilder in der Ascitesflüssigkeit zeigten (Abb. 4 und 5), war ihre Chromosomenzahl übereinstimmend. Es

wäre zu erwähnen, daß bei AH 601 die ascitische Transformation schon in der ersten Transplantgeneration geschah, während im AH 602 sie erst in der zweiten Generation verwirklicht wurde.

Zwischen AH 7974 und 130 besteht ein geringer Unterschied der Chromosomenzahl von 6, der vielleicht nicht ohne Bedeutung sein dürfte.

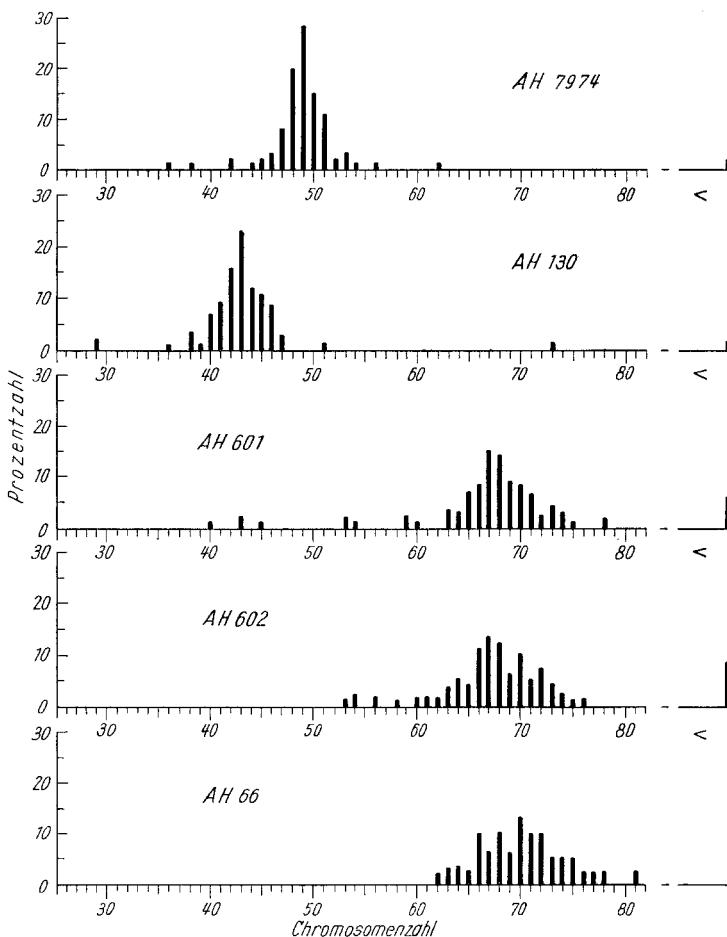


Abb. 12. Verteilung der Anzahl der Chromosomen von je 100 Zellen

Zwischen AH 601 (602) und AH 66 ist der diesbezügliche Unterschied noch geringer. Aber der Unterschied zwischen AH 130 und AH 66 beträgt 27.

Es wurden keine wesentlichen Beziehungen zwischen der Chromosomenzahl und dem Wachstumstempo, Transplantabilität oder den mikroskopischen Erscheinungen der Tumoren wahrgenommen.

Die Chromosomenzahl von SH 1, 2 und 3, die Einzelzellderivate vom AH 130, wurde nach dem Durchlauf von 40 Transplantgenerationen

in derselben Weise wie die anderen Fälle untersucht. Die 3 Tochterstämme und der Mutterstamm stimmten miteinander vollkommen überein<sup>13</sup>.

**Unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Stämme des Ascites-Hepatoms für therapeutische Anwendungen der N-Lost-Derivative.** Die ascitischen Tumoren sind wegen ihrer leichten Verwendbarkeit für cytologische Studien sehr nützlich bei Studien über die experimentelle Chemotherapie des Krebses am Tier. Die mitoseschädigende Wirkung vom N-Lost auf die Tumorzellen konnte mit dem sog. Yoshida-Sarkom überzeugend demonstriert werden. Sein milderer Derivativ, N-oxyd-Lost, brachte in ungefähr 40% eine vollkommene Heilung der 4 Tage alten Tumortiere des Yoshida-Sarkoms sowie eine 2—3fache Verlängerung der Überlebenszeit der übrigen Tumortiere. Ein Stamm des Ascites-Hepatoms, AH 130, zeigte einen noch größeren Behandlungseffekt, d. h. es wurden in ungefähr 80% vollkommene Heilung der Tumortiere erreicht.

Aber es wurde in weiteren Experimenten gefunden, daß Tumortiere eines anderen Stamms des Ascites-Hepatoms, AH 7974, sich vollkommen refraktär gegen diese Behandlung erwiesen. Da dieses eine ganz unerwartete Beobachtung war, wurden weitere Experimente mit im ganzen 110 Tieren wiederholt. Das Resultat war aber nur die weitere Bestätigung der ersten Beobachtung.

Ausgedehnte Experimente mit anderen Derivativen vom N-Lost, im ganzen 13 Verbindungen, deren hemmende Wirkung auf das Wachstum des Yoshida-Sarkoms schon bekannt waren, verliefen vollständig in derselben Weise wie die vorigen, d.h. bei AH 130 konnten alle Verbindungen in ungefähr 80% eine vollständige Heilung der Tumortiere sowie die Verlängerung des Lebens der übrigen Tiere erzielen, während bei AH 7974 alle Tumortiere refraktär gegen alle Verbindungen blieben. Es wurde in dieser Weise demonstriert, daß der Tumorstamm AH 7974 vollkommen refraktär gegen solche Verbindungen war, welche bedeutende hemmende Wirkung auf die Tumortiere des Yoshida-Sarkoms sowie AH 130 ausübten<sup>13</sup>.

Eine vorläufige Untersuchung mit einer *in vitro*-Methode wurde mit acht überbleibenden Stämmen durchgeführt, um ihre Empfänglichkeit für die genannten Verbindungen zu finden. Sieben unter den 8 Stämmen waren resistent gegen die Verbindungen, während ein Unterschied des Grades bezüglich der *in vitro* minimalen effektiven Dose nachgewiesen wurde<sup>9</sup>.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß ein einziges Chemotherapeutikum nicht allgemeingültig für alle Arten von Krebs sein kann, und zwar selbst nicht für maligne Geschwülste, die eine gemeinsame normale Mutterzelle haben. Die Krebszellen können also keineswegs immer gleichartig in bezug auf ihre Empfänglichkeit für die

Chemotherapie mit derselben Verbindung sein. Dieser Befund bedeutet einen wichtigen Bestandteil des Individualitätskomplexes der malignen Geschwulst.

Es ist von besonderem Interesse, daß die genannten 2 Hepatome AH 130 und AH 7974, welche in bezug auf die sonstigen Verhältnisse wie Transplantabilität, Wachstumstempo und Chromosomenzahl, abgesehen von Ascitesbildern, keinen bedeutenden Unterschied wahrnehmen lassen, nur gegen bestimmte chemische Einwirkung in vollkommen verschiedener Weise reagieren. Es ist zu erwarten, daß die chemische oder biochemische Analyse der Krebszellen, die außerhalb des Rahmens der vorliegenden Abhandlung liegt, einen wesentlichen Beitrag zur weiteren Annäherung an diese anziehende Frage liefern wird, die offenbar auch mit der Frage nach der somatischen Mutation bei der Krebsentstehung in enger Beziehung steht.

### Zusammenfassung

Der Ascitestumor führt in die Geschwulstpathologie ein Material ein, das sich zu weiteren Studien über wenigstens zwei fundamentale Probleme der Geschwülste zu eignen scheint: Das erste ist der Begriff der Malignität der Geschwulst und das zweite die biologische Individualität der einzelnen Geschwulst.

Begründet auf den Erfahrungen, die durch die Studien an dem sog. Yoshida-Sarkom und Ascites-Hepatomen gewonnen wurden, wird der Begriff der „zellulären Autonomie“ von malignen Geschwülsten besprochen.

Die Studien mit den Ascites-Hepatomen, die durch ascitische Transformation der experimentell erzeugten Hepatome hergestellt wurden, zeigen deutlich, daß jedes Hepatom in bezug auf die biologischen Eigenschaften seine eigene Individualität besitzt.

### Literatur

- <sup>1</sup>BORST, M.: Z. Krebsforsch. **40**, 3 (1934). — <sup>2</sup>HOSOKAWA, K.: Gann **42**, 343 (1951). — <sup>3</sup>HSU, T. C., and C. M. POMERAT: J. Hered. **44**, 23 (1953). —
- <sup>4</sup>ISHIBASHI, K.: Gann **41**, 1 (1950). — <sup>5</sup>KLEIN, G., and E. KLEIN: Ann. New York Acad. Sci. **1956**, 640. — <sup>6</sup>LOEWENTHAL, H., u. G. JAHN: Z. Krebsforsch. **37**, 439 (1932). — <sup>7</sup>RÖSSLER, R.: (a) Sitzgsber. dtsch. Akad. Wiss. Berlin. Math.-naturwiss. Kl. **1949**, Nr V. — (b) Dtsch. med. Wschr. **1950**, Nr I, 6. —
- <sup>8</sup>SASAKI, T., u. T. YOSHIDA: Virchows Arch. **295**, 175 (1935). — <sup>9</sup>SATOH, H.: Gann **47**, 334 (1956). — <sup>10</sup>YOSHIDA, T.: Gann **36**, 9 (1942). — <sup>11</sup>YOSHIDA, T. u.a.: Gann **37**, 341, 343 (1943). — <sup>12</sup>YOSHIDA, T.: J. Nat. Canc. Inst. **12**, 947 (1952). — <sup>13</sup>YOSHIDA, T.: Ann. New York Acad. Sci. **63**, 852 (1956). —
- <sup>14</sup>YOSHIDA, T. u.a.: Gann. **47**, 612 (1956).

Professor Dr. TOMIZO YOSHIDA, Dept. of Pathology, Faculty of Medicine,  
University of Tokyo, Hongo, (Tokyo Japan)