

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)  
und aus dem Institut für experimentelle Geschwulsterzeugung und Geschwulstbehandlung am  
Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. D. SCHMÄHL)

## **Vergleichende morphologische und toxikologische Untersuchungen an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Hund zur Prüfung der cancerogenen Wirkung und Organotropie des Diäthylnitrosamins\***

C. THOMAS und D. SCHMÄHL

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Juli 1965)

Nach Gaben von Nitrosaminen und Nitrosamiden sind bereits bei mehreren Tierarten verschiedene Organtumoren beschrieben worden. Besonders DRUCKREY und sein Arbeitskreis prüften diese Verbindungen an *Ratten* und beobachteten, daß die Organotropie der Wirkung nicht nur von dem chemischen Aufbau der angewandten Substanz abhängt, sondern auch von der Applikationsart bzw. -dauer bestimmt wird. Wir haben uns gefragt, ob die organotrope Wirkung eines Cancerogens auch von der Tierart abhängt. Daneben wollten wir an einem Beispiel (hier Diäthylnitrosamin DÄNA) prüfen, ob verschiedene Tierarten in gleicher Weise auf die zuerst bei Ratten beobachtete carcinogene Wirkung der Substanz ansprechen oder ob Unterschiede vorliegen. Die Ergebnisse solcher vergleichender Versuche an mehreren Tierarten sind naturgemäß von allgemein toxikologischer Bedeutung und gestatten eher Rückschlüsse auf die Reaktionsweise des Menschen als bei Beschränkung der Untersuchungen auf nur eine Tierspecies.

Vergleichende morphologische Untersuchungen über die Wirkung eines bestimmten Cancerogens bei verschiedenen Species liegen in der einschlägigen Literatur nur ganz vereinzelt vor. Das mag damit zusammenhängen, daß die histologische Diagnostik der experimentellen und spontanen Tiergeschwülste eine gewisse Einarbeitung erfordert; außerdem lassen sich durch eine Spezialisierung auf bestimmte Versuchstiere die mit ihrer Haltung zusammenhängenden Probleme (Nahrung, Temperierung der Räume, Schutz gegen Spontanerkrankungen usw.) leichter lösen. In Tabelle 1 sind nach den bisher vorliegenden Arbeiten die Folgen der Einwirkung gleichartig applizierter Cancerogene auf verschiedene Tierarten zusammengestellt. Aus ihr geht hervor, daß die meisten bis jetzt bekannten, resorptiv wirkenden cancerogenen Stoffe bei noch nicht genügend zahlreichen Species durchuntersucht wurden oder nur bei einigen Tierarten wirksam sind (Azo-Farbstoffe, Tetrachlorkohlenstoff) oder gleichzeitig Tumoren in mehreren Organen erzeugen, so daß von vornherein von keiner spezifischen Organotropie gesprochen werden kann (Fluoren-Abkömmlinge).

Aus verschiedenen Gründen schien uns das DÄNA für eine vergleichende Prüfung an mehreren Species besonders geeignet, so daß wir es bei Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, Fisch und Affe anwendeten. Dabei stellte sich eine sehr ausgesprochene Organotropie auf die Leber heraus, der wir daher unser besonderes Augenmerk zuwandten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, über die wir teilweise schon berichtet haben (s. Tabelle 2), fassen wir im folgenden kurz zusammen:

---

\* Die Untersuchungen wurden durch die Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Tabelle 1. Die Wirkung einiger cancerogener Substanzen bei verschiedenen Tierarten\*

Substanz	Applikationsart	Tierart	Tumor in
Urethan	intraperitoneal	Maus Ratte Meerschweinchen Kaninchen	Lunge, Leber Lunge ø ø
	per os epicutan	Maus Maus	Leber Leber
Tetrachlorkohlenstoff	Inhalation	Maus Ratte Meerschweinchen Kaninchen Affe	ø ø ø ø ø
	per os	Maus Ratte	Leber Leber
2-Acetyl-amino-fluoren	per os	Maus Ratte  Hund Kaninchen Katze	Leber Leber, Niere, Uterus, Gehörgang, Harnblase, Darm Leber, Harnblase Harnblase, Ureter Lunge
p-Dimethylamino-azobenzol	per os	Maus Ratte Hamster Hund	Leber (gelegentlich) Leber ø Harnblase

\* Literatur bei SHUBIK und HARTWELL.

## 1. Ratte

*Spontane* Lebercarcinome sind bei der Ratte äußerst selten. Unter 175 aus der Literatur zusammengestellten Spontangeschwülsten fand TAMASCHKE (2) 45 primäre Lebertumoren; dabei handelte es sich vorwiegend um Sarkome, die auf einen Parasitenbefall (*Cysticercus fasciolaris*) zurückgeführt wurden. Neben diesen Sarkomen konnte nur ein einziges primäres Lebercarcinom histologisch gesichert werden.

*Experimentell* sind maligne Hepatome besonders nach Gaben von Azo-Farbstoffen, Fluoren-Abkömmlingen und Nitrosaminen/Nitrosamiden beobachtet worden (Literatur bei SHUBIK und HARTWELL; SCHMÄHL). Je nach Applikationsart und -dauer zeigte das DÄNA eine unterschiedliche Organotropie. Nach langdauernder oraler, intravenöser oder intrarectaler Zufuhr traten vorwiegend Lebercarcinome auf. Die viermalige Gabe von je 25 bzw. 35 mg/kg ( $DI_{50} = 210$  mg/kg) führte zu Nieren- und Oesophagustumoren vom Typ der Adenome, Carcinome und Papillome. Durch hochdosierte intravenöse Applikation dieser Verbindung wurden Nieren-, Lungen- und Ovarialgeschwülste erzeugt [DRUCKREY et al. (1)].

Die *Leberkrebs-erzeugende* Wirkung des DÄNA wurde erstmalig von SCHMÄHL u. Mitarb. (7) beschrieben. Auch über die Morphologie dieser Geschwülste ist bereits mehrfach berichtet worden [THOMAS (1); BÜCHNER u. Mitarb.; GRUNDMANN u. SIEBURG]. In einer quantitativen Analyse ermittelten DRUCKREY u. Mitarb. (2) für verschiedene Tagesdosierungen die Gesamtdosis, Induktionszeit und Ausbeute an Lebertumoren (s. Tabelle 2). Makroskopisch zeigte die Leber der geschwulsttragenden Tiere mehrere unterschiedlich große, zum Teil hämorrhagisch-nekrotische Tumorknoten (Abb. 1 a u. b). Histologisch handelte es sich in ca. 95% der Fälle um solide, trabeculäre oder tubuläre Hepatome (Abb. 1 d). Unter den rest-

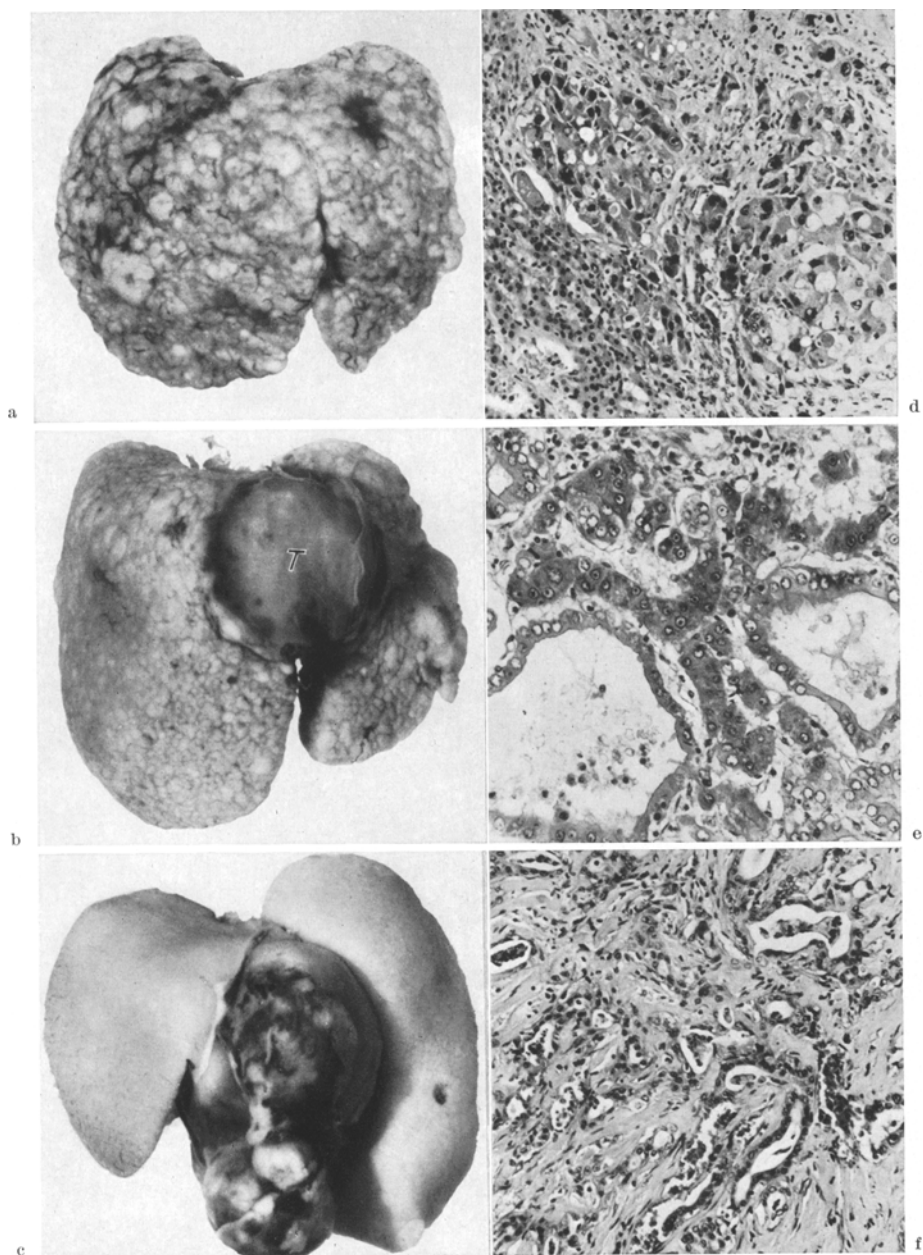


Abb. 1 a—f. Ratte. a Fein- bis grobgehöckerte Leberoberfläche (DÄNA  $d = 14,2$  mg/kg). b Großes Lebercarcinom (T) bei Cirrhose (DÄNA  $d = 9,6$  mg/kg). c Hämorrhagisch-nekrotisches Lebercarcinom, glatte, geschwulstfreie Leberoberfläche (DÄNA  $d = 2,4$  mg/kg). d Solides Leberzellcarcinom (HE 100  $\times$ ). e Adenohepatom (HE 120  $\times$ ). f Stromareiches Adenocarcinom vom Typ eines malignen Cholangioms (HE 100  $\times$ )

lichen 5% fanden sich stromareiche drüsenbildende, zum Teil verschleimende Carcinome, die in ihrem feingeweblichen Aufbau an maligne Cholangiome erinnerten, sowie Adenohepatome, die aus Leberzell-ähnlichen, alveolär gestalteten

Elementen bestanden (Abb. 1 c u. f). Metastasen der Lebercarcinome fanden sich mit unterschiedlicher Häufigkeit in den Lungen (s. Tabelle 2), gelegentlich auch in den paraaortalen Lymphknoten und im großen Netz. Außer den Tumoren waren in der Leber noch regressive Veränderungen nachweisbar, so z. B. Blutungen, Nekrosen, Fett- und Eiweiß-Einlagerungen im Cytoplasma der Leber- und Geschwulstzellen. Weiter lag regelmäßig bei den mit hohen Tagesdosen behandelten Ratten ( $d = > 4,8$  mg/kg) eine Lebercirrhose vor.

Als weitere Primärtumoren sind noch Oesophaguspapillome und -carcinome aufzuzählen, die in den Gruppen der mit täglich  $d = 0,15$ — $2,4$  mg/kg DÄNA behandelten Tiere zu finden waren [THOMAS (2); DRUCKREY u. Mitarb. (2)]. Mesenchymale Geschwülste, insbesondere Hämangioendotheliome, traten nicht auf.

## 2. Maus

Unter 10000 spontan gestorbenen Mäusen fand SLYE nur drei einwandfrei bösartige Lebergeschwülste, von denen eine Lungenmetastasen gesetzt hatte. TAMASCHKE (2) stellte 645 bei Mäusen beschriebene Spontangeschwülste zusammen, darunter 22 Leberadenome und 10 Lebercarcinome.

Induzierte Hepatome sind unter anderem nach Gaben von Tetrachlorkohlenstoff (LEATHAM), 2-Acetyl-amino-fluoren (STOWELL et al.), N-Nitrosomorpholin (BANNASCH u. MÜLLER) nachgewiesen worden. Hämangioendotheliome und „Blutcysten“ wurden nach Zufuhr von Urethan [TANNENBAUM u. SILVERSTONE; KAWAMOTO et al.; KLEIN; SCHMÄHL u. Mitarb. (3); TRAININ] und Diäthylnitrosamin [THOMAS u. SCHMÄHL (1)] beobachtet.

Nach viermaliger Gabe von 50 mg DÄNA/kg Körpergewicht in 2tägigem Abstand ( $DL_{50} = 180$  mg/kg) entwickelten sich bei den überlebenden Mäusen gut- und bösartige Hepatome sowie extrahepatische Geschwülste (feinpapillär gestaltete Nierenrindenadenome, Alveolarzelladenome und -carcinome, verhornende Plattenepithelcarcinome im Vormagen und äußeren Gehörgang). Weiter beobachteten wir bei vereinzelt Tieren eine diffuse cystische Wucherung der Gallenwege; makroskopisch täuschte die Leberoberfläche eine Cirrhose vor, histologisch fand sich jedoch keine wesentliche Bindegewebsvermehrung.

Bei den durch DÄNA erzeugten Lebertumoren handelte es sich vorwiegend um *Hämangioendotheliome* (Abb. 2 a—b). Diese blutreichen Geschwülste zeigten in den peripheren Anteilen solide oder feinretikulär angeordnete Zellansammlungen mit einem dichten Gitterfasernetz, das sonst bei Mäusen nur spärlich angelegt ist. Gelegentlich beobachteten wir auch „Blutcysten“, die von dem benachbarten Leberparenchym durch einen abgeflachten Endothelzell-ähnlichen Saum abgegrenzt wurden und im Zentrum Blut enthielten. Bei diesen „Blutcysten“, die besonders nach oraler, epicutaner oder intravenöser Gabe von Urethan beobachtet worden sind, handelt es sich, nach Transplantationsversuchen von TRAININ, um echte Neubildungen. Außer den Hämangioendotheliomen und den „Blutcysten“ fanden wir keine weiteren Primärtumoren oder Fernmetastasen. Die schon bei der Ratte beschriebenen regressiven Veränderungen wurden ebenfalls bei den mit DÄNA behandelten Mäusen nachgewiesen. Eine Cirrhose konnten wir dagegen auch bei den mit hohen Tagesdosen behandelten Mäusen ( $d = 13$  mg/kg) nicht finden; gelegentlich waren kleinere Regeneratknoten oder gutartige Hepatome zu beobachten, die ein vorwiegend expansives Wachstum aufwiesen und das benachbarte Leberparenchym nicht infiltrierte (Abb. 2 c).

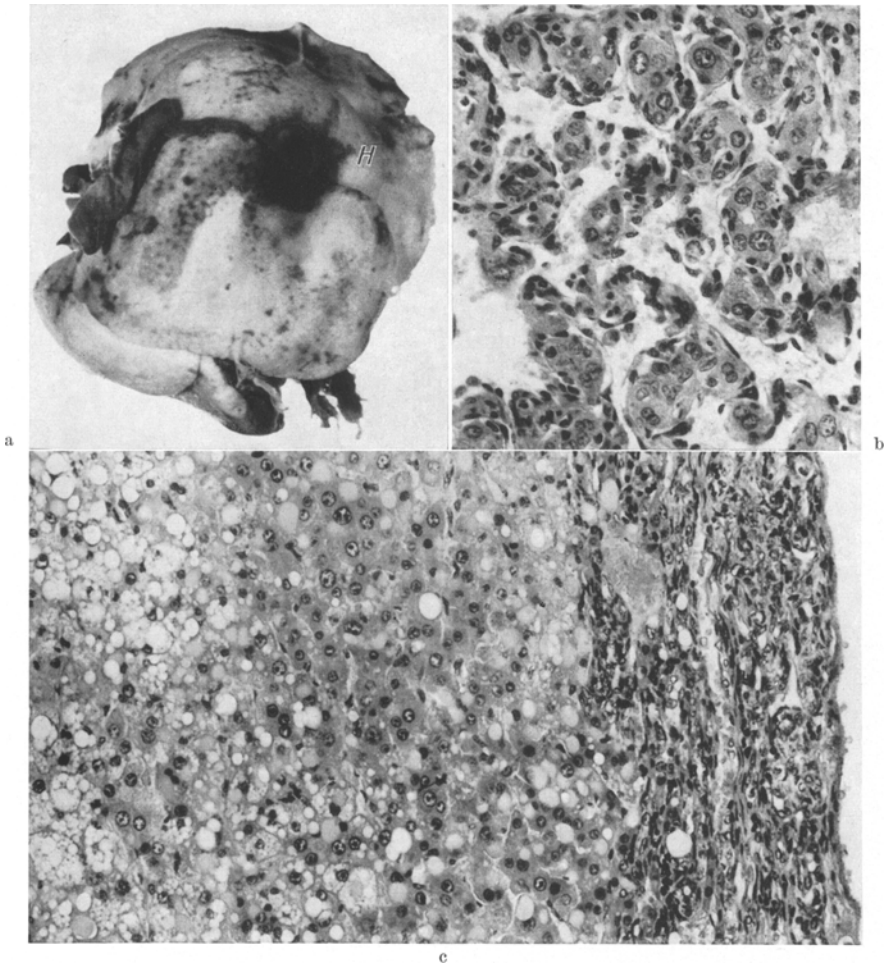


Abb. 2a—c. Maus. a Umschriebene, sehr blutreiche Knötchen (H) auf der Leberoberfläche. b Histologisch: Hämangioendotheliom (HE 190 $\times$ ). c Solides, verfettetes Hepatom, welches das benachbarte Lebergewebe verdrängt (HE 120 $\times$ )

### 3. Meerschweinchen

Diese Species wird als „Krebs-refraktär“ bezeichnet, da *Spontantumoren* nur selten auftreten und die meisten cancerogenen Verbindungen bei dieser Tierart unwirksam sind. Unter den aus der Literatur zusammengestellten Spontangeschwülsten finden sich an erster Stelle Brustdrüsentumoren, seltener Teratome, Weichteilsarkome, Lymphosarkome und Leukämien (WARREN u. GATES).

*Experimentell* wurden vorwiegend Gallenblasencarcinome (KAZAMA), Fibrome und Fibromyome im Uterus, Bauch- und Brustraum (BRUZZONE) sowie subcutane Sarkome nach Applikation von cancerogenen Kohlenwasserstoffen (WARREN u. GATES) erzeugt. Nach intravenöser Applikation von 30 mg 20-Methylcholanthren fanden HESTON u. DEHRINGER unter 105 Meerschweinchen ein Gallenblasencarcinom und ein weiteres, wahrscheinlich von der Leber ausgehendes Carcinom; vorwiegend handelte es sich jedoch bei den beobachteten Geschwülsten um Lungenkarzinome.

1962 berichteten DRUCKREY u. STEINHOFF über die Leberkrebs-erzeugende Eigenschaft des DÄNA bei dieser Tierart. Diese Versuche wurden später von

ARGUS u. HOCH-LIGETI sowie von uns [THOMAS u. SCHMÄHL (1)] bestätigt. Histologisch fanden wir in unserem Untersuchungsgut ausschließlich Lebercarcinome vom Typ der soliden, trabeculären, alveolären oder polymorphzelligen fast sarkomähnlichen Hepatome. Metastasen dieser Geschwülste ließen sich im großen Netz und in den paraaortalen Lymphknoten nachweisen. ARGUS u. HOCH-LIGETI fanden weitere Geschwulstabsiedlungen in den Lungen, den Nieren und Nebennieren. Außerdem beobachteten sie ein primäres Gallenblasencarcinom und eine Rhabdomyomatose des Herzmuskels. Neben den geschwulstartigen Veränderungen traten auch Nekrosen, Blutungen sowie die Zeichen einer ausgeprägten Lebercirrhose auf; letztere war bei den höheren Tagesdosierungen ( $d = 5 \text{ mg/kg}$ ) besonders deutlich, trat bei den niedrigeren Dosierungen ( $d = 3 \text{ mg/kg}$ ) dagegen nur gelegentlich auf.

#### 4. Kaninchen

Auch beim Kaninchen sind *Spontangeschwülste* der Leber nur selten beschrieben worden. So fand TAMASCHKE (2) unter 95 nicht induzierten Tumoren nur drei Neubildungen, die primär von der Leber ausgegangen waren (ein Sarkom, ein Adenom, ein Carcinom). Am häufigsten wurden Spontantumoren im Uterus entdeckt.

*Experimentell* sind beim Kaninchen vorwiegend Hautcarcinome, Blasenkarzinome und Knochensarkome erzeugt worden (Literatur bei SHUBIK u. HARTWELL). WILLIAMS u. STANSFIELD berichteten über drei Adenocarcinome der Gallenwege, die nach einer subcutanen Applikation von 200 mg 1,2,5,6-Dibenzanthracen entstanden waren.

Nach täglicher Gabe von 3,4 mg DÄNA/kg Körpergewicht beobachteten wir nach Aufnahme eine Gesamtdosis von 2382 auf 2736 mg/kg bei zwei mischrassigen Kaninchen primäre Lebercarcinome (Abb. 3a) mit einem teils soliden, teils tubulär-trabeculären Aufbau (Abb. 3b). Das geschwulstfreie Leberparenchym zeigte die Zeichen einer feinseptalen Cirrhose. Weitere Primärtumoren oder Metastasen der Hepatome lagen nicht vor.

#### 5. Hund

*Spontantumoren* sind beim Hund besonders aus dem veterinär-pathologischen Schrifttum gut bekannt. In einem kasuistischen und statistischen Beitrag zur Geschwulsterkrankung bei diesem Tier zählten GARLT u. RÖSSGER unter 1788 Hunden 143 Spontantumoren auf. Am häufigsten waren sie in der Mamma (61 Fälle) und in der Haut (28 Fälle) entstanden. Wesentlich seltener waren die Tumoren in der Leber (vier Carcinome und ein Sarkom) und in der Harnblase (ein Carcinom). In der statistischen Zusammenstellung von KRONBERGER ist die Beteiligung der Lebergeschwülste unter den Spontantumoren dagegen wesentlich höher: er fand bei 9538 obduzierten Hunden 743 (7,8%) spontane Neubildungen, darunter 143 Leber- und Gallengangstumoren (unter anderem 104 Carcinome und zwei Leiomyome).

Der häufigste Sitz eines Primärtumors in dieser Statistik von KRONBERGER war die Leber (21,9%), es folgten Mamma (11,7%), Lunge (7,6%), Schilddrüse (7,4%), Haut (6,1%) und Knochen (5,3%). Die restlichen 40% Tumoren wurden in 27 Organen bzw. Organsystemen beobachtet. Bemerkenswert ist, daß diese Lebercarcinome vorwiegend bei älteren Hunden (über 8 Jahre) auftreten. Knotige Hyperplasien und Lebercirrhosen sind bei diesem Tier häufiger zu beobachten; ihr Zusammenhang mit dem Carcinom ist jedoch unklar (ROONEY). Weiter fällt bei den oben erwähnten Zusammenstellungen auf, daß die Muskelgeschwülste (Leiomyome und Myosarkome) relativ häufig im Verdauungstrakt, in den Harn- und Genitalorganen, gelegentlich auch in der Leber auftreten [TAMASCHKE (1); GARLT u. RÖSSGER; KRONBERGER; MULLIGAN (1 u. 2)].

*Experimentell* sind Lebertumoren nach Gaben von 2-Acetyl-amino-fluoren beobachtet worden (ALLISON et al.; MORRIS u. EYESTONE). Auch nach Zufuhr von o-Aminoazotoluol, 4-Dimethyl-aminoazobenzol sowie  $\beta$ -Naphthylamin sind Harnblasencarcinome sowie Hepatome und Cholangiome beschrieben worden (NELSON u. WOODARD; BONSER).

Zur Prüfung der cancerogenen Eigenschaften des DÄNA beim Hund behandelten wir zwei mischrassige Tiere (♀♀) mit dieser Verbindung. Das erste Tier erhielt täglich  $d = 6$  mg DÄNA/kg Körpergewicht; bereits nach 5 Wochen und einer Gesamtaufnahme von 210 mg/kg entwickelte sich das klinische Bild eines Pfortaderhochdruckes. Bei der Sektion fanden wir eine feinseptale Lebercirrhose. Das zweite Tier erhielt eine Tagesdosis von  $d = 3$  mg/kg. Auch dieser Hund erkrankte

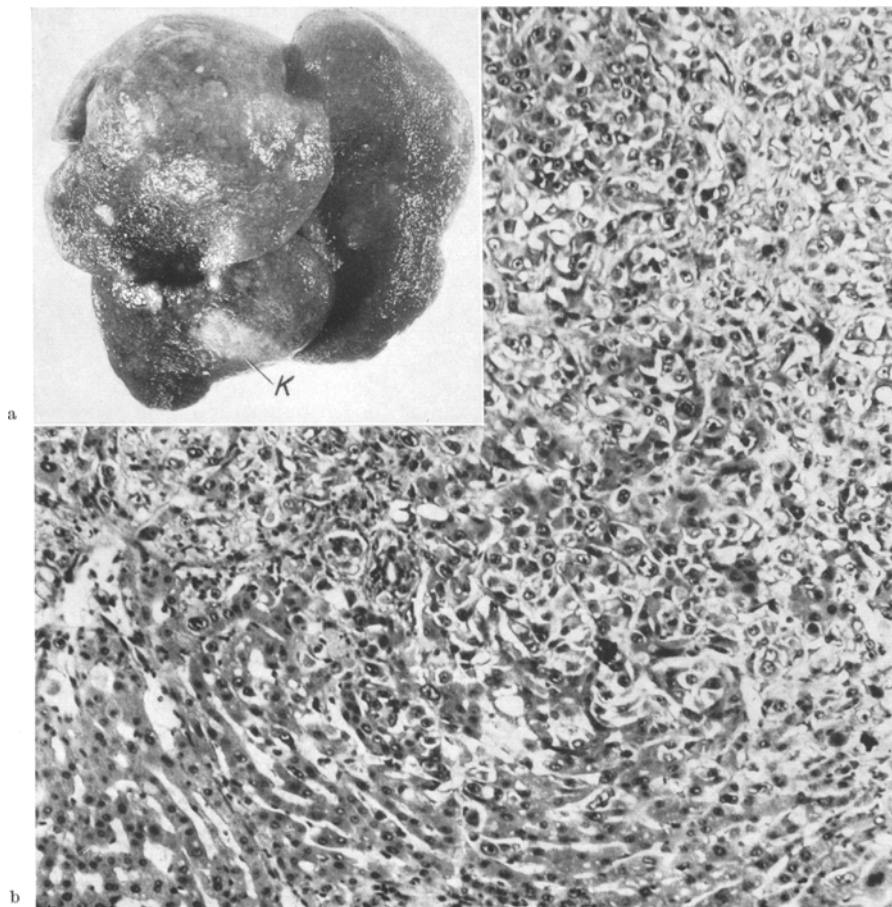


Abb. 3a u. b. Kaninchen. a Kleinknotige Lebercirrhose mit Tumorknoten (K). b Histologisch: solides Leberzellcarcinom, welches das angrenzende Lebergewebe infiltriert und verdrängt (HE 140 $\times$ )

nach 10monatiger Behandlung: Es traten Blutungen aus dem Verdauungstractus auf sowie ein durch medikamentöse Behandlung nicht beherrschbarer Ascites. Die DÄNA-Behandlung wurde vorübergehend abgebrochen. Da sich trotzdem Blutungen und Ascites nicht beherrschen ließen, mußte eine portocavale Anastomose angelegt werden. Eine Probeexzision aus der Leber zeigte eine diffuse Wucherung von Pseudogallengängen und eine ausgeprägte Faservermehrung, besonders der Gitterfasern. Nach der Operation besserte sich der Allgemeinzustand, so daß die Behandlung mit DÄNA wieder aufgenommen werden konnte. Ein Jahr später trat erneut eine Verschlechterung ein, die uns veranlaßte, das Tier

zu töten. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte der Hund 565 mg/kg DÄNA erhalten und war etwa  $2\frac{1}{2}$  Jahre alt. Die Obduktion deckte im rechten Leberlappen einen doppelfaustgroßen, derben, grau-weißen Tumor auf (Abb. 4a). Die Oberfläche der geschwulstfreien Leber war fein- bis grobgehöckert. Die paraaortalen Lymphknoten und die Milz erschienen deutlich vergrößert. Die angelegte portocavale

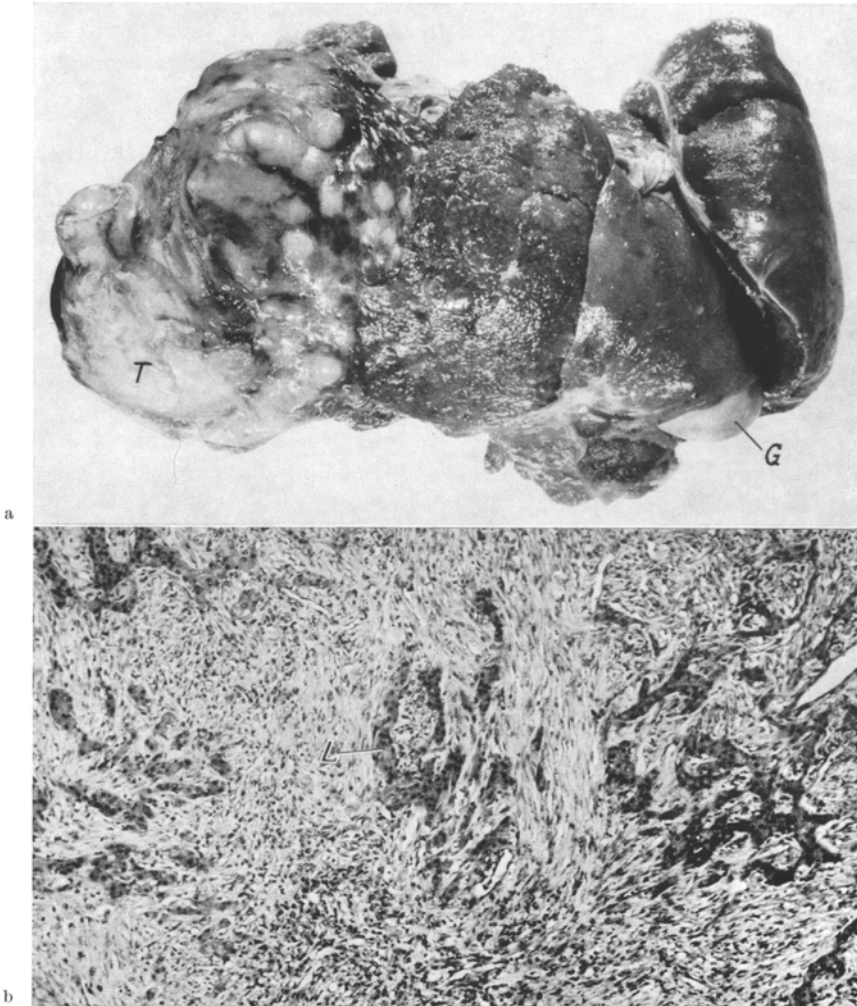


Abb. 4 a u. b. Hund. a Im rechten Leberlappen ein großer, weißlicher Tumor (T). Die geschwulstfreie Leberoberfläche ist teils glatt, teils fein gehöckert. Gallenblase (G). b Spindelzellsarkom (Leiomyosarkom), welches noch erhaltene Leberbalkchen (L) einschließt (HE 120 ×)

Anastomose war für eine kleine Sonde gut durchgängig; Zeichen eines portalen Hochdruckes (Ascites oder Oesophagusvaricen) waren jetzt nicht mehr nachweisbar. Die feingewebliche Untersuchung des Lebertumors deckte ein Leiomyosarkom auf (Abb. 4b), das Metastasen in die paraaortalen Lymphknoten gesetzt hatte, dagegen waren die Lungen frei. Außerdem fand sich in der Leber eine ausgeprägte Pseudogallengangswucherung mit stärkerer Vermehrung der Gitter- und



Kollagenfasern, entsprechend einer Cirrhose. Weitere Primärtumoren, insbesondere in der Harnblase, beobachteten wir nicht.

### 6. *Fisch*

Aus der Literatur sind *spontane* Lebergeschwülste vom Typus der Hepatome besonders bei der Regenbogenforelle gut bekannt (s. Literatur bei SCARPELLI et al.).

Versuche, derartige Neubildungen beim *Goldfisch experimentell* zu erzeugen (wir hielten die Tiere in einer 0,02%igen DÄNA-Lösung), waren bis jetzt ergebnislos. Ebenso konnten wir durch subcutane Injektionen (Einzeldosis 3 mg/kg, Gesamtdosis 873 mg/kg) bei dieser Fischart keinen Leberkrebs hervorrufen.

Bei Aquariumsfischen (*Brachydanio rerio*), die in einer DÄNA-Lösung (10 bis 100 ppm) gehalten wurden, konnte allerdings STANTON Lebergeschwülste vom Typus der malignen Hepatome und Cholangiome nachweisen. Diese Tumoren waren zwischen der 10. und 30. Versuchswoche aufgetreten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam HALVER, der bei der Regenbogenforelle Lebergeschwülste beobachtete, die auf die cancerogene Einwirkung von Dimethylnitrosamin zurückzuführen waren.

### 7. *Totenkopf-Äffchen*

Beim Totenkopf-Äffchen führte die Verfütterung von DÄNA ( $d = 3$  mg/kg) in unseren Versuchen zu schweren Leberschädigungen und somit frühzeitig zum Tode. Dagegen konnten O'GARA u. KELLY beim Rhesus- und Cynomolgus-Affen nach Gaben von DÄNA ( $d = 1-30$  mg/kg/Tag) Leberzellcarcinome mit Lymphknotenmetastasen beobachten.

### 8. *Syrischer Goldhamster*

Dieses Tier ist erst in den letzten Jahren zu Krebsversuchen eingesetzt worden. Dementsprechend liegen besonders über *Spontanumoren* nur vereinzelte Beobachtungen vor (ASHBELL).

*Experimentell* sind vorwiegend Sarkome nach Gaben von cancerogenen Kohlenwasserstoffen erzeugt worden (GYE u. FOULDS). Induzierte Hepatome traten nach Gaben von Oestrogenen (Oethinyl-Oestradiol und Fenocylin) auf (KIRKMAN).

1961 und 1962 berichteten DONTENWILL u. Mitarb. über Carcinome in Lungen und Trachea, die nach Sondenfütterung mit DÄNA entstanden waren. HERROLD u. DUNHAM, die ebenfalls Goldhamster mit DÄNA behandelten (intratracheal und oral mit Sonde), fanden auch Carcinome in den Lungen und in der Trachea; außerdem beobachteten sie Nasenhöhlen- und Lebercarcinome sowie Nierenwucherungen, die sie als Präneoplasien deuteten. Die Hepatome zeigten einen trabeculären Aufbau und hatten in die Lungen, Nieren, Nebennieren, Lymphknoten und Uterus metastasiert. Auch nach Applikation von Dimethylnitrosamin traten bei dieser Species Lebergeschwülste vom Typ der Hepatome (Ausbeute 50%) und Cholangiome (Ausbeute 19%) auf (TOMATIS et al.).

### Diskussion

Nicht induzierte, d. h. spontane Lebercarcinome und -sarkome sind bei allen Tierarten selten, sie treten höchstens gelegentlich bei älteren Hunden gehäuft auf. Experimentell wurden sie bisher vorwiegend bei Ratte und Maus erzeugt, während bei anderen Tieren die Versuche ergebnislos blieben oder nur eine sehr geringe Geschwulstausbeute ergaben. Es ist daher bemerkenswert, daß nach langdauernder oraler Gabe von DÄNA bei Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Hamster,

Tabelle 2. Eigene histologische Untersuchungen an den durch orale Gabe von Diäthylnitrosamin erzeugten Tumoren

Jahr	Autor	<i>d</i>	<i>D</i> <sub>50</sub>	<i>t</i> <sub>50</sub>	Aus- beute	Met.	Cirrhose	Tumoren in
Ratte								
1960	SCHMÄHL et al. (7)	14,2	968	68	5/5	Ø	+++	Leber
		9,6	963	101	25/25	4 L	++	Leber
		4,8	660	107	25/25	4 L	++	Leber
1961	THOMAS	2,4	460	192	34/34	7 L	Ø	Leber, Oeso- phagus
1963	DRUCKREY et al. (2)	1,2	285	238	36/36	10 L	Ø	Leber, Oeso- phagus
		0,6	213	335	49/49	8 L	Ø	Leber, Oeso- phagus
		0,3	137	457	67/67	4 L	Ø	Leber, Oeso- phagus
		0,15	91	609	27/30	2 L	Ø	Leber, Oeso- phagus
		0,075	64	840	1/3	Ø	Ø	Leber
1964	DRUCKREY et al. (1)	25	100	490	1/2	Ø	Ø	Nieren-Ca.
	THOMAS u. SCHMÄHL(1)	35	140	528	1/2	Ø	Ø	Nieren-Ca., Leberadenom, Oeso- phagus- papillom
Maus								
1963	SCHMÄHL et al. (1)	3	871	290	19/19	Ø	Ø	Leber
		8	1360	170	14/18	Ø	Ø	Leber
1963	THOMAS u. SCHMÄHL(1)	13	2340	180	28/28	Ø	Ø	Leber
1965	SCHMÄHL u. THOMAS(2)	50	200	400	9/17	Ø	Ø	Leber, Niere, Vormagen, Gehörgang
Meerschweinchen								
1962	DRUCKREY und STEIN- HOFF	5	1200	240	11/11	Ly.M.	+++	Leber
1963	THOMAS u. SCHMÄHL(1)	3	1200	400	7/8	Ly.N.	±	Leber
Kaninchen								
1965	SCHMÄHL u. THOMAS (1)	3,4	2559	750	2/2	Ø	++	Leber
Hund								
1964	SCHMÄHL et al. (4)	3*	565	660	1/2	Ly.	+++	Leber

Die für die Ratte angegebenen Dosierungen  $d=14,2-0,075$  mg/kg sind in der Arbeit DRUCKREY et al., 1963, angegeben.  $d$  = Einzeldosis in mg/kg Körpergewicht.  $D_{50}$  = mittlere Gesamtdosis in mg/kg Körpergewicht.  $t_{50}$  = mittlere Induktionszeit in Tagen. Ausbeute bezieht sich auf die Zahl der überlebenden Versuchstiere. Met = Metastasen, L = Lunge, Ly = Lymphknoten, M = Milz, N = großes Netz. \*Mit mehrmaliger Unterbrechung.

Fisch, Affe und Hund Lebergeschwülste, zum Teil mit fast 100%iger Ausbeute und in der gleichen Größenordnung bezüglich der zur Krebserzeugung benötigten Gesamtdosis, erzeugt werden können. Beim Goldhamster beobachteten DONTENWILL u. Mitarb. allerdings vorwiegend Papillome und Carcinome in Lungen und Trachea. Die in der Leber nachgewiesenen Veränderungen (Parenchymnekrosen

und Cirrhose) sprachen aber für eine auch beim Hamster vorliegende hepatotrope Wirkung des DÄNA. Für die Entstehung von Lebertumoren war jedoch offenbar die Induktionszeit zu kurz, da die oben erwähnten Geschwülste bereits nach zweimonatiger Behandlung auftraten und frühzeitig durch Erstickten zum Tode führten. Bei länger überlebenden Tieren konnten ARGUS u. HOCH-LIGETI tatsächlich Hepatome beobachten. Es liegt also bei allen mit DÄNA behandelten Versuchstieren eine sehr *charakteristische Organotropie* vor, die durch eine entsprechende Applikationsform bzw. -dauer der Substanz variiert werden kann.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die „Giftung“ des DÄNA zu der entsprechenden mutmaßlichen „Wirkform“, dem Diazoäthan, durch Angriff der Hydroxylase am  $\alpha$ -C-Atom und anschließender Aufspaltung der C-N-Bindung unter Dealkylierung bei allen untersuchten Tierarten gleichermaßen erfolgt. Das ist nicht überraschend, da Hydroxylasen bei allen Säugetierarten vorkommen und eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel spielen. Es ist daher damit zu rechnen, daß auch beim Menschen die Umwandlung des DÄNA zum Diazoäthan nach dem gleichen Schema vonstatten geht.

Wir haben uns nun gefragt, ob der *histologische Typus* der durch DÄNA induzierten Lebertumoren mehr von der jeweiligen *Tierart* oder vom *Cancerogen* her bestimmt wird.

Auf anderen Gebieten liegen Beobachtungen vor, die für die letztere Annahme sprechen könnten. So sind z. B. in der Prostata der Ratte Plattenepithelcarcinome beobachtet worden, die nach lokaler Applikation von cancerogenen Kohlenwasserstoffen entstanden waren. Plattenepithelcarcinome sind nach Gaben derselben Substanzen auch in anderen Organen, wie z. B. Lunge, Nierenbecken usw., beschrieben worden. Wir haben deshalb die Histologie der bei verschiedenen Tierarten durch DÄNA erzeugten Lebertumoren miteinander verglichen.

Nach oraler Zufuhr von DÄNA fanden wir bei Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Hamster *epitheliale* Lebertumoren vom Typ der Hepatome, seltener Cholangiome. Bei Maus und Hund traten dagegen *mesenchymale* Geschwülste auf; hier handelte es sich um Hämangioendotheliome und um ein Leiomyosarkom. Bei den anderen Species läßt sich ein derartiger Vergleich nicht durchführen, da Lebertumoren experimentell nur in Ausnahmefällen beobachtet wurden. Es finden sich also nach *Anwendung der gleichen Leberkrebs-erzeugenden Noxe bei verschiedenen Tierarten verschiedene Tumortypen*. Bemerkenswert ist, daß beim Hund ein Leiomyosarkom auftrat, eine Geschwulst, die als Spontantumor in der Leber nur sehr selten beschrieben wurde; dagegen liegen mehrere Beobachtungen über derartige im Verdauungstrakt und in den Harn- und Genitalorganen lokalisierte Geschwülste vor. Wir möchten daher annehmen, daß die beim Hund nachgewiesenen Leberveränderungen (Cirrhose mit Regeneraten) an die Möglichkeit einer späteren Hepatombildung — bei genügend langer Induktionszeit — denken lassen; die Verhältnisse lägen dann ähnlich wie beim Goldhamster.

*Histologisch* handelte es sich bei den Ratten fast ausschließlich um Lebercarcinome, die einem Hepatom oder Cholangiom entsprachen. Aus dem histologischen Bild der Lebergeschwulst ist also nicht zu entnehmen, welcher krebserzeugende Stoff angewandt wurde, da die durch Buttergelb, DÄNA, N-Nitrosomorpholin oder 2-Acetyl-amino-fluoren hervorgerufenen Lebertumoren einen sehr ähnlichen feingeweblichen Aufbau zeigen. Es finden sich lediglich quan-

titative Unterschiede in der Ausbeute an Tumoren und in der prozentualen Verteilung der einzelnen Tumortypen (Hepatome, Adenohepatome und Cholangiome).

Bei der *Maus* sahen wir nach Gaben von DÄNA und Urethan Hämangioendotheliome und „Blutcysten“; Hepatome sind nach Applikation von N-Nitrosomorpholin sowie gelegentlich nach Zufuhr von Tetrachlorkohlenstoff beschrieben worden. Auch bei dieser Tierart treten also keine Geschwülste auf, die für eine bestimmte cancerogene Noxe typisch oder pathognomonisch wären.

Durch Anwendung bestimmter krebserzeugender Noxen, wie z.B. DÄNA, lassen sich Substanz-spezifische Organtumoren erzeugen, die in ihrer Entstehung nicht von einer (genetisch) Species-bedingten Geschwulstresistenz bzw. -empfindlichkeit abhängig sind, sondern lediglich von der organotropen Wirkung des applizierten Cancerogens. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. So erzeugt oral zugeführtes Äthyl-butyl-nitrosamin bei einer Species (Ratte) Oesophaguspapillome und -carcinome, während bei einer anderen (Maus) die Geschwülste vorwiegend im Vormagen auftreten [SCHMÄHL u. Mitarb. (5)]; nach subcutaner Applikation von Dinitroso-piperazin lassen sich bei Ratten Nasenhöhlelntumoren [DRUCKREY et al. (3); THOMAS (2)], bei Mäusen dagegen Leber- und Lungencarcinome nachweisen [SCHMÄHL u. THOMAS (2)]. Das spricht dafür, daß selbst bei so nahe verwandten Tierarten, wie Ratte und Maus, das „Giftungsvermögen“ von der „Transport- zur Wirkform“ in den einzelnen Organen und Geweben unterschiedlich sein kann. Nach den vorliegenden Ergebnissen der Untersuchung verschiedener Nitrosamine bei mehreren Tierarten kann daher angenommen werden, daß diese im Tierversuch onkogenen Verbindungen wahrscheinlich auch beim Menschen Krebs erzeugen, die Organotropie der Wirkung könnte indessen eine völlig andere als bei den Versuchstieren sein.

### Zusammenfassung

Nach langandauernder oraler Zufuhr von Diäthylnitrosamin wurden bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hund Lebertumoren beobachtet. Es handelte sich z. T. um epitheliale Neubildungen vom Typ der Leberzellcarcinome; mesenchymale Tumoren wurden lediglich bei Mäusen (Hämangioendotheliome) und beim Hund (Leiomyosarkom) nachgewiesen. Das Diäthylnitrosamin zeigt bei den untersuchten Tierarten (von anderen Autoren liegen ganz entsprechende Beobachtungen bei Affen und Fischen vor) eine spezifische Organotropie seiner cancerogenen Eigenschaften, da bei allen Tieren fast ausschließlich die Leber betroffen war.

### Comparative Morphological and Toxicological Investigations Carried out in Mice, Rats, Guinea Pigs, Rabbits and Dogs for Testing the Cancerogenic Effects and Organotropy of Diethylnitrosamine

#### Summary

Liver tumors were observed in mice, rats, guinea pigs, rabbits, and dogs following the prolonged oral administration of diethylnitrosamine. Some were epithelial neoplasms of the liver cell carcinoma type. Mesenchymal tumors were found only in mice (hemangioendothelioma) and dogs (leiomyosarcoma).

In the animal species examined diethylnitrosamine exhibited a specific organotropy of its cancerogenic properties (equivalent observations have been made by other authors in monkeys and fish), since only the liver was affected in almost all animals.

### Literatur

- ALLISON, J. B., A. W. WASE, J. H. LEATHEM, and W. W. WAINIO: Some effects of 2-acetylaminofluorene on dogs. *Cancer Res.* **10**, 266—271 (1950).
- ARGUS, M. F., and C. HOCH-LIGETI: Induction of malignant tumors in the guinea pig by oral administration of diethylnitrosamine. *J. nat. Cancer Inst.* **30**, 533—551 (1963).
- ASHBELL, R.: Spontaneous transmissible tumours in the Syrian hamster. *Nature (Lond.)* **155**, 607 (1945).
- BANNASCH, P., u. H.-A. MÜLLER: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus. *Arzneimittel-Forsch.* **14**, 805—814 (1964).
- BRUZZONE, S., H. ELGUETA, R. IGLESIAS, and A. LIPSCHUTZ: Oestrogeninduced fibroids of the thoracic serosa. *Brit. J. Cancer* **2**, 267—272 (1948).
- BÜCHNER, F., E. GRUNDMANN u. W. OEHLERT: Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle. *Dtsch. med. Wschr.* **86**, 1845—1850 (1961).
- BULLOCK, F. D., and M. R. CURTIS: Spontaneous tumors of the rat. *J. Cancer Res.* **14**, 1—115 (1930).
- DONTENWILL, W., u. U. MOHR: Carcinome des Respirationstractus nach Behandlung von Goldhamstern mit Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* **64**, 305—312 (1961).
- — u. M. ZAGEL: Über die unterschiedliche Lungen-carcinogene Wirkung des Diäthylnitrosamins bei Hamster und Ratte. *Z. Krebsforsch.* **64**, 499—502 (1962).
- DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC, H. D. MENNEL u. R. PREUSSMANN: (3) Selektive Erzeugung von Carcinomen der Nasenhöhle bei Ratten durch N,N'-Dinitrosopiperazin, Nitrosopiperidin, Nitrosomorpholin, Methyl-allyl-, Dimethyl- und Methylvinyl-nitrosamin. *Z. Krebsforsch.* **66**, 138—150 (1964).
- A. SCHILDBACH, D. SCHMÄHL, R. PREUSSMANN u. S. IVANKOVIC: (2) Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. *Arzneimittel-Forsch.* **13**, 841—851 (1963).
- , u. D. STEINHOFF: Erzeugung von Leberkrebs an Meerschweinchen. *Naturwissenschaften* **49**, 497—498 (1962).
- — R. PREUSSMANN u. S. IVANKOVIC: (1) Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methyl-nitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. *Z. Krebsforsch.* **66**, 1—10 (1964).
- FOULDS, L.: The induction of tumours in mice of R3 strain by 2-acetylaminofluorene. *Brit. J. Cancer* **1**, 172—176 (1947).
- GARLT, CHR., u. M. RÖSSGER: Ein statistischer und kasuistischer Beitrag zur Geschwulsterkrankung des Hundes. *Mh. Vet.-Med.* **15**, 153—158 (1960).
- GRUNDMANN, E., u. H. SIEBURG: Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126**, 57—90 (1962).
- GYE, W. E., and L. FOULDS: A note on the production of sarcomata in hamsters by 3,4-benzpyrene. *Amer. J. Cancer* **35**, 108 (1939).
- HALVER, J. E.: Zit. bei STANTON.
- HERROLD, K. H., and L. J. DUNHAM: Induction of tumors in the Syrian hamster with diethylnitrosamine (N-nitroso-diethylamine). *Cancer Res.* **23**, 773—777 (1963).
- HESTON, W. E., and M. K. DEHRINGER: Induction of pulmonary tumors in guinea pigs by intravenous injection of methylcholanthrene and dibenzanthracene. *J. nat. Cancer Inst.* **13**, 705—718 (1952).
- HIGHMAN, B., and A. B. ESCHENBRENNER: Influence of choline on the incidence of carbon tetrachloride hepatomas in CH3 mice. *Cancer Res.* **11**, 256 (1951).
- KAWAMOTO, S., M. L. IBANEZ, and A. KIRSCHBAUM: Haemangioma formation in various organs of the mouse following intraperitoneal administration of urethan. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **3**, 32 (1959).

- KAZAMA, Y.: Experimentelle Untersuchung über Geschwulstbildung an den Eingeweiden. II. Mitt. Gann 17, 51—58 (1924).
- KIRBY, A. H. M.: The action of 2-aminofluorene in three pure strains of mice. Brit. J. Cancer 2, 294—300 (1948).
- KIRKMAN, H.: The effect of different estrogens on the induction of renal tumors and hepatomas in male golden hamsters. Cancer Res. 12, 274—275 (1952).
- KLEIN, M.: Induction of lymphocytic neoplasm hepatomas and other tumors after oral administration of urethan to infant mice. J. nat. Cancer Inst. 29, 1035 (1962).
- KRONBERGER, H.: Spontane Geschwülste bei Haussäugetieren. Mh. Vet.-Med. 15, 730—735 (1960).
- MORRIS, H. P., and W. H. EYESTONE: Tumors of the liver and urinary bladder of the dog after the ingestion of 2-acetylaminofluorene. J. nat. Cancer Inst. 13, 1139—1165 (1953).
- MULLIGAN, R. M.: (1) Multiple primary tumors in dogs. Cancer Res. 4, 505—509 (1944).  
— (2) Primary liver-cell carcinoma (hepatoma) in the dog. Cancer Res. 9, 76—81 (1949).
- NELSON, A. A., and G. WOODARD: Zit. SHUBIK and HARTWELL.
- O'GARA, R. W., and M. G. KELLY: Induction of hepatomas in monkeys given N-nitrosodiethylamine (DNA). Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 6, 50 (1965).
- ROONEY, J. R.: Liver carcinoma in the dog. Acta path. microbiol. scand. 45, 321—330 (1959).
- SCARPELLI, D. G., M. H. GREIDER, and W. J. FRAJOLA: Observations on hepatic cell hyperplasia, adenoma, and hepatoma of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). Cancer Res. 23, 848—857 (1963).
- SCHMÄHL, D.: Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren. Aulendorf: Cantor 1963.
- , u. C. THOMAS: (1) Erzeugung von Leberkrebs beim Kaninchen durch Diäthylnitrosamin. Naturwissenschaften 52, 165 (1965).  
— — (2) Dosis-Wirkungsbeziehungen bei der Erzeugung von Hämangioendotheliomen der Leber bei Mäusen durch Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch. 66, 533—535 (1965).  
— — (3) Erzeugung von Lungen- und Lebertumoren bei Mäusen mit N,N'-Dinitrosopiperazin. Z. Krebsforsch. 67, 11—15 (1965).  
— — u. K. KÖNIG: (1) Versuche zur Krebs erzeugung mit Diäthylnitrosamin bei Mäusen. Naturwissenschaften 50, 407 (1963).  
— — — (2) Leberkrebs erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach rectaler Applikation bei Ratten. Z. Krebsforsch. 65, 529—530 (1963).  
— — u. H. BRUNE: (3) Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. II. Mitt. Versuche zur Krebs erzeugung bei Mäusen bei gleichzeitiger Applikation von Urethan und 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen. Z. Krebsforsch. 66, 297—302 (1964).  
— — u. G. SCHELD: (4) Cancerogene Wirkung von Diäthylnitrosamin beim Hund. Naturwissenschaften 19, 466—467 (1964).  
— — u. W. SÄTTLER: (5) Carcinogene Wirkung von Äthyl-butyl-nitrosamin bei Mäusen. Naturwissenschaften 50, 717 (1963).  
— — — (6) Hepatotoxische und zirrhogene Wirkung von Diäthylnitrosamin bei Hunden. Arzneimittel-Forsch. 14, 73—74 (1964).  
— R. PREUSSMANN u. H. HAMPERL: (7) Leberkrebs erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. Naturwissenschaften 47, 89 (1960).
- SHUBIK, P., and J. L. HARTWELL: Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. Suppl. I. U.S. Dep. Health. Public Health Serv. Washington 1957.
- STANTON, M. F.: Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish, *Brachydanio rerio*. J. nat. Cancer Inst. 34, 117—130 (1965).
- STOWELL, R. E.: Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride. Cancer Res. 11, 345—354 (1951).
- TAMASCHKE, CHR.: (1) Beiträge zur vergleichenden Onkologie der Haussäugetiere. Wiss. Z. Humboldt-Univ. 1, 37—77 (1951/52).  
— (2) Die Spontanumoren der kleinen Laboratoriumssäuger in ihrer Bedeutung für die experimentelle Onkologie. Strahlentherapie 96, 150—168 (1955).
- THOMAS, C.: (1) Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. Z. Krebsforsch. 64, 224—233 (1961).

- THOMAS, C.: (2) Zur Morphologie der Nasenhöhlentumoren bei der Ratte. *Z. Krebsforsch.* **67**, 1—10 (1965).
- , u. D. SCHMÄHL: (1) Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Lebertumoren bei der Maus und bei dem Meerschweinchen. *Z. Krebsforsch.* **65**, 531—536 (1963).
- — (2) Zur Morphologie der Nierentumoren bei der Ratte. *Z. Krebsforsch.* **66**, 125—137 (1964).
- TOMATIS, L., P. N. MAGEE, and P. SHUBIK: Induction of liver tumors in the Syrian golden hamster by feeding dimethylnitrosamine. *J. nat. Cancer Inst.* **33**, 341—345 (1964).
- TRAININ, N.: Neoplastic nature of liver "blood cysts" induced by urethan in mice. *J. nat. Cancer Inst.* **31**, 1489—1499 (1963).
- WARREN, S., and O. GATES: Spontaneous and induced tumors of the guinea pig. *Cancer Res.* **1**, 65—68 (1941).
- WILLIAMS, J. L., and R. STANSFIELD: Zit. SHUBIK u. HARTWELL.

Dr. C. THOMAS  
Pathologisches Institut der Universität Bonn  
53 Bonn 1, Postfach