

Sogenanntes „Fibrous Long-Spacing Collagen“ in einem Osteosarkom der Maus*

K.-H. Marquart, A. Luz und W. Gössner

Abteilung für Allgemeine und Experimentelle Pathologie
(Leiter: Prof. Dr. W. Gössner), Institut für Biologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München

Eingegangen am 23. Januar 1976

So-Called Fibrous Long-Spacing Collagen in a Murine Osteosarcoma

Summary. Peculiar periodically banded structures were found in the extracellular spaces of a vascular type of a murine osteosarcoma. The structures consisted of fine almost parallelly arranged filaments with electron-dense cross-bands of about 35–50 nm thickness. The periodicity of the bands was about 85–100 nm. Similar structures have been found by many authors in various tissues of different species. Commonly, they have been referred to as “fibrous long-spacing collagen”.

Key words: Cross-banded filamentous structures — Murine osteosarcoma — Fibrous long-spacing collagen.

Zusammenfassung. In einem vaskulären Typ eines Osteosarkoms der Maus wurden eigenartige, im Extrazellularraum gelegene, periodisch gebänderte Strukturen festgestellt. Diese bestanden aus dünnen, nahezu parallel angeordneten Filamenten mit elektronendichten Querbändern von etwa 35–50 nm Breite. Die Periodizität der Bänderung betrug etwa 85–100 nm. Ähnliche Strukturen wurden von zahlreichen Autoren in verschiedenen Geweben mehrerer Species gefunden. Im allgemeinen werden sie als „fibrous long-spacing collagen“ bezeichnet.

Bei den osteogenen Tumoren, die bei Mäusen nach Inkorporation des kurzlebigen osteotropen Radionuklids Ra-224 beobachtet werden, handelt es sich überwiegend um osteoblastische Osteosarkome (Gössner et al., 1972). Ihre Interzellulärsubstanz besteht aus Kollagenfibrillen und mineralisierter Knochengrundsubstanz (Marquart et al., 1974). In der vorliegenden Mitteilung wird über eine ungewöhnliche geformte Interzellulärsubstanz berichtet, die in einem bei den Versuchen mit Ra-224 (vgl. Gössner et al., 1976; Müller et al., 1976) selten auftretenden Osteosarkomtyp vorkam. Diese Interzellulärsubstanz, die nicht licht-, sondern nur elektronenmikroskopisch zu erfassen war, fanden wir in einem von 28 untersuchten Osteosarkomen.

Material und Methoden

Bei einer männlichen NMRI-Maus wurde ein kirschgroßer Tumor im proximalen Bereich des linken Humerus festgestellt. Das Tier gehörte zu einer Versuchsgruppe, in der NMRI-Mäusen von der 5. bis zur 8. Lebenswoche wöchentlich 2 mal 1,5 μ Ci/kg Ra-224 intraperitoneal injiziert worden war. Der Tumor wurde 19 Monate nach Versuchsbeginn gefunden. Die Einzelheiten der Versuchsbedingungen entsprechen den bereits früher gemachten Angaben (Marquart, 1974; Gössner et al., 1976; Müller et al., 1976).

* Durchgeführt im Rahmen eines EURATOM-Assoziationsvertrages (090-72-1 BIAD).

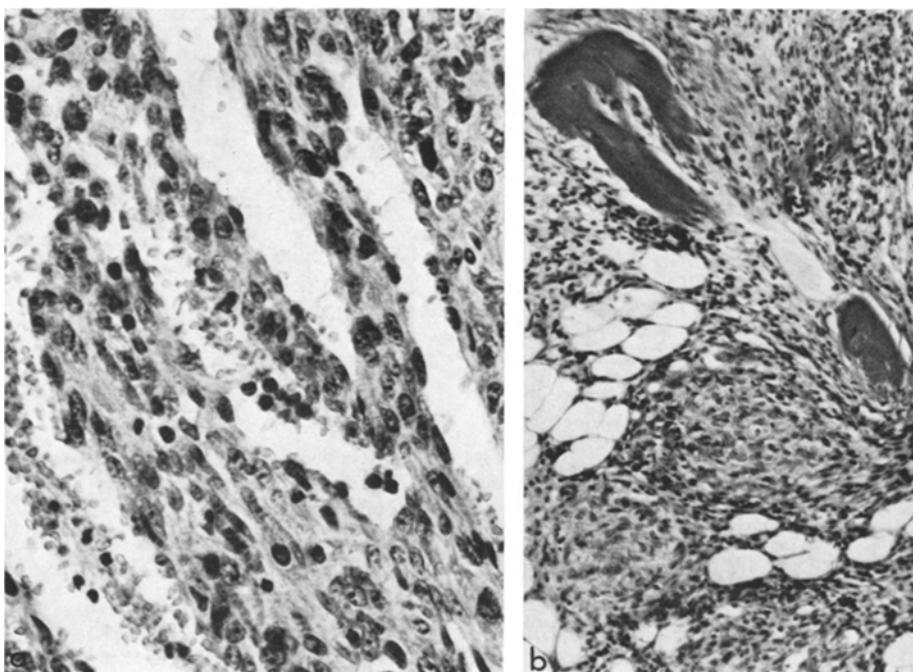


Abb. 1a u. b. Vasculärer Typ eines Osteosarkoms der Maus. (a) Tumorausschnitt mit Sinusoiden. HE, 310 \times . (b) Neugebildeter Knochen. v. G., 125 \times

Sofort nach Tötung der Maus durch Chloroform inhalation wurde ein kleines Gewebsstück zur elektronenmikroskopischen Untersuchung aus dem Tumor herausgeschnitten, in gekühlte, phosphatgepufferte 6,25%ige Glutaraldehydlösung (pH 7,3) gebracht und in kleine Würfel von etwa 1 mm Kantenlänge geschnitten. Diese wurden nach 4stündiger Fixierung in der Glutaraldehydlösung 2 h lang in gekühlter, phosphatgepufferter 1%iger OsO₄-Lösung (pH 7,3) nachfixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Epon 812 eingebettet. Mit einem Reichert-Ultramikrotom Om U2 stellten wir Ultradünnschnitte her, die mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden. Die elektronenmikroskopische Untersuchung führten wir mit einem AEI-Elektronenmikroskop EM6B durch.

Das übrige Tumorgewebe wurde nach röntgenologischer Untersuchung des Mausskelets in 4%iger Formalinlösung fixiert, in 20%iger EDTA-Lösung entkalkt und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin und van Gieson gefärbt. Außerdem wurde die Silberimprägnation nach Lendrum durchgeführt.

Befunde

Röntgenologisch zeigte sich eine wabig strukturierte Aufreibung des proximalen Humerusabschnitts links mit Defekten der Corticalis und spärlicher Neubildung von schmalen, von der Corticalis ausgehenden Knochenspangen in einem kirschgroßen Weichtilschatten. Makroskopisch fand sich ein mäßig fester, auffallend dunkelroter Tumor. Lichtmikroskopisch handelte es sich um einen zellreichen, wenig differenzierten Tumor, der invasiv gewachsen war und die Corticalis zerstört hatte. In dem Tumorgewebe fielen viele sinusartige Gefäßräume auf (Abb. 1a).

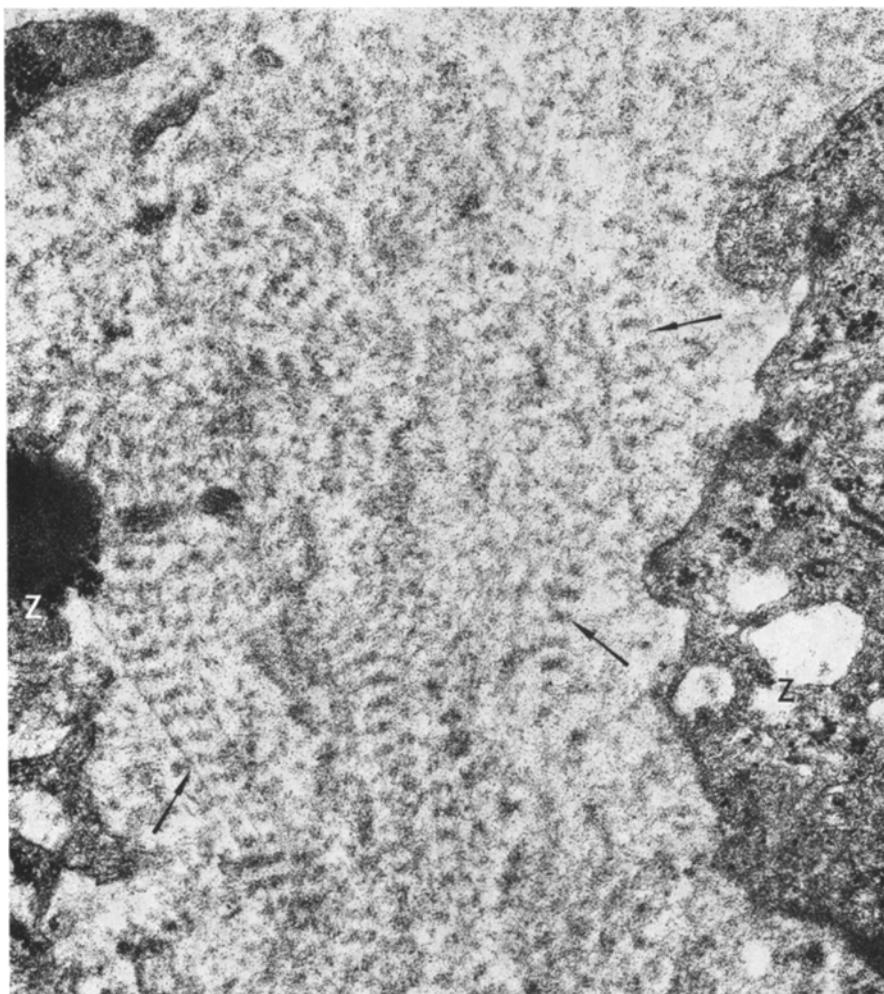
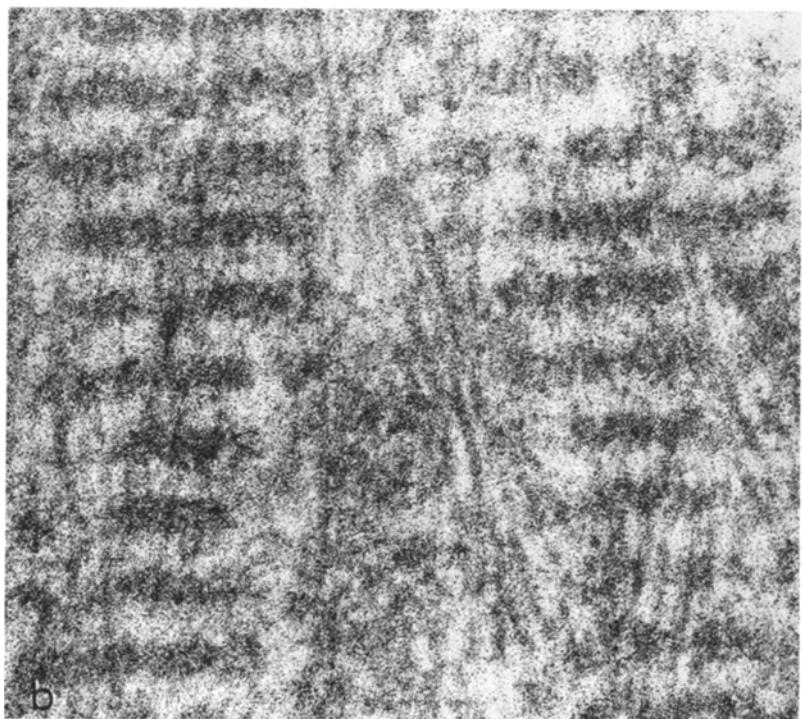
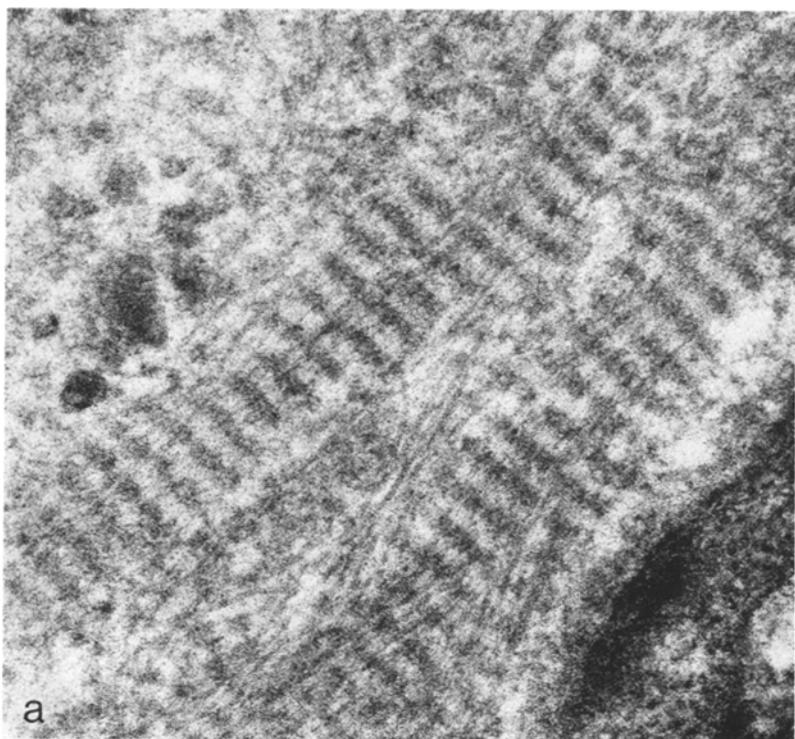


Abb. 2. Der Extracellularraum zwischen zwei Osteosarkomzellen (Z) ist größtenteils mit elektronendichtem amorphem Material ausgefüllt. Man erkennt mehrere bandförmige Körper mit hell-dunkler periodischer Querstreifung (Pfeile). $40000 \times$

Kollagen- und Knochenbildung waren nur gering ausgeprägt (Abb. 1 b). Stellenweise sah man Bündel argyrophiler Fasern. Auf Grund der zahlreichen Gefäßräume wurde der Tumor als vasculärer Typ eines Osteosarkoms bezeichnet.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Tumorgewebes zeigte, daß es sich bei den Tumorzellen überwiegend um polymorphe, mit einem gut entwickelten rauen endoplasmatischen Reticulum ausgestattete fibro- und osteoblastenähnliche Zellen handelte. Eine Unterscheidung zwischen beiden Zelltypen war oft nicht möglich, da in dem untersuchten Material keine mineralisierte Knochengrundsubstanz zu finden war. Bei sonst ähnlicher Ultrastruktur war für osteoblastenähnliche Zellen ihr Gehalt an Lipidvacuolen kennzeichnend. Ver-



einzelten kamen präosteoblastenähnliche Zellen vor, die durch intracytoplasmatische Glykogendepots charakterisiert waren. Die Capillaren und Sinusoide, die in dem Tumorgewebe reichlich vorhanden waren, wurden von schmalen, langgestreckten Zellen begrenzt, die wenig rauhes endoplasmatisches Reticulum enthielten. In einigen wenigen Tumorzellen kamen sogenannte „intracisternale A-Typ-Viruspartikel“ vor.

Zwischen den Zellen des Tumorgewebes waren nur spärlich Kollagenfibrillen vorhanden. Die Intercellularräume waren zum größten Teil mit elektronendichtem amorphem Material ausgefüllt (Abb. 2). Als auffälligster Befund waren gelegentlich band- oder spindelförmige Körper mit hell-dunkler periodischer Querstreifung zu finden (Abb. 2, 3a). Bei stärkerer Vergrößerung zeigte sich, daß die eigenartigen länglichen Strukturen aus längs und ungefähr parallel verlaufenden Filamenten bestanden, die wesentlich dünner als Präkollagenfibrillen waren (Abb. 3b). Die hellen und dunklen Querbänder der mikrofilamentären Strukturen waren wesentlich breiter und ihre Periodizität wesentlich länger als die von Kollagenfibrillen. Die elektronendichten Bänder waren etwa 35–50 nm breit, die Periodizität der Bänderung betrug etwa 85–100 nm.

Die periodisch auftretenden dunklen Querstreifen waren offenbar durch Bündelung der Mikrofilamente an jeweils diesen Stellen bedingt. Teilweise waren etwa 10–20 nm dicke, nicht quergestreifte Mikrofibrillen, die Präkollagenfibrillen glichen, nahezu parallel in sehr enger Nachbarschaft zu den quergebänderten Filamenten lokalisiert (Abb. 3a und b). Die beschriebenen Strukturen befanden sich zwar manchmal direkt neben Capillaren oder Sinusoiden, zeigten jedoch keine Lagebeziehung zu den Blutgefäßen.

Diskussion

Filamentäre Strukturen mit periodischer Querstreifung, die den hier mitgeteilten sehr ähnlich sind, werden von zahlreichen Autoren beschrieben (Lit. bei Banfield et al., 1973; Hashimoto und Ohyama, 1974; Schubert und Adam, 1974; Kimura et al., 1975). Solche, in verschiedenen Geweben mehrerer Species gefundene Strukturen werden meist als „fibrous long-spacing collagen“ (Luse et al., 1963) bezeichnet. Andere Bezeichnungen sind „Luse's bodies“ (Raimondi et al., 1962), „Gitterkollagen“, „Kollagenoid“ (Rohen, 1962), „banded bodies“ (Pillai, 1964), „cross-banded filamentous aggregations“ oder „zebra bodies“ (Hashimoto und Ohyama, 1974).

Die Bedeutung des „long-spacing collagen“ und die Bedingungen für sein Auftreten in normalen und pathologisch veränderten Geweben sind nicht bekannt. Einige Autoren vermuten, daß eine Störung der Mucopolysaccharidproduktion in den dem „long-spacing collagen“ benachbarten Zellen bei seiner Entstehung eine Rolle spielt (Ramsey, 1965; Hashimoto und Ohyama, 1974; Kimura et al., 1975).

Abb. 3. (a) Zwei bandförmige Körper mit hell-dunkler periodischer Querstreifung im Extracellularraum eines Osteosarkoms der Maus. 60000×. (b) Ausschnittvergrößerung von (a). Die länglichen Strukturen bestehen aus längs und ungefähr parallel verlaufenden Filamenten. Teilweise sind Mikrofibrillen nahezu parallel in sehr enger Nachbarschaft zu den quergebänderten Filamenten lokalisiert. 120000×

In manchen Arbeiten wird eine enge Lagebeziehung zwischen „fibrous long-spacing collagen“ und Kollagenfibrillen beschrieben (Ramsey, 1965; Mollo und Monga, 1971; Hashimoto und Ohyama, 1974). In dem von uns untersuchten Tumorgewebe waren Kollagenfibrillen nur spärlich vorhanden. Wir sahen jedoch häufig nicht quergestreifte Mikrofibrillen, die Prækollagenfibrillen glichen, in sehr enger Nachbarschaft zu den quergebänderten Strukturen lokalisiert.

Befunde über das Vorkommen von „long-spacing collagen“ in neoplastischem Gewebe bezogen sich bisher auf menschliche Tumoren des Nervengewebes (Lit. bei Raimondi et al., 1962; Ramsey, 1965; Cravioto und Lockwood, 1968; Cervós-Navarro et al., 1968), des lymphoreticulären Gewebes (Mollo und Monga, 1971) und der Haut (Hashimoto und Ohyama, 1974). Außerdem wurde diese Kollagenform in einem Hämangiosarkom der Maus und einem Mastocytom des Hundes gefunden (unveröffentl. Beobachtungen, erwähnt bei Banfield et al., 1973).

Silberberg et al. (1963) beobachteten zwar „long-spacing collagen“ im Gelenkknorpel am Femurkopf der Maus, unseres Wissens gibt es jedoch keine Berichte über das Vorkommen dieser Strukturen in normalem oder neoplastischem Knochengebe. Das bisher nicht bekannte Auftreten von „fibrous long-spacing collagen“ in einem osteogenen Sarkom der Maus bestätigt seine ubiquitäre Verbreitung.

Literatur

- Banfield, W. G., Lee, C. K., Lee, C. W.: Myocardial collagen of the fibrous long-spacing type. *Arch. Path.* **95**, 262—266 (1973)
- Cervós-Navarro, J., Matakas, F., Lazaro, M. C.: Das Bauprinzip der Neurinome. Ein Beitrag zur Histogenese der Nerventumoren. *Virchows Arch. Abt. A* **345**, 276—291 (1968)
- Cravioto, H., Lockwood, R.: Long-spacing fibrous collagen in human acoustic nerve tumors. In vivo and in vitro observations. *J. Ultrastruct. Res.* **24**, 70—85 (1968)
- Gössner, W., Hindringer, B., Luz, A., Schwabe, M.: Morphologie und Enzymhistochemie ^{224}Ra -induzierter osteogener Sarkome bei der Maus. *Z. Krebsforsch.* **78**, 225—235 (1972)
- Gössner, W., Hug, O., Luz, A., Müller, W. A.: Experimental induction of bone tumors by short-lived bone-seeking radionuclides. In: *Recent results in cancer research*, Bd. 54, S. 36—49. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1976
- Hashimoto, K., Ohyama, H.: Cross-banded filamentous aggregation in the human dermis. *J. invest. Derm.* **62**, 106—112 (1974)
- Kimura, K., Koizumi, F., Kihara, I., Kitamura, S.: Fibrous long spacing type collagen fibrils in the glomeruli of experimental amyloidosis in rabbit. *Lab. Invest.* **32**, 279—285 (1975)
- Luse, S. A., Zopf, D., Cox, J. W.: An electron microscopic study of in vitro and in vivo long-spacing collagen. *Anat. Rec.* **145**, 254—255 (1963)
- Marquart, K.-H.: Virus-like particles in ^{224}Ra -induced murine osteosarcomas. *Beitr. Path.* **152**, 116—126 (1974)
- Marquart, K.-H., Luz, A., Gössner, W.: Zur Ultrastruktur des strahleninduzierten Osteosarkoms der Maus. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **58**, 434—437 (1974)
- Mollo, F., Monga, G.: Banded structures in the connective tissue of lymphomas, lymphadenitis, and thymomas. *Virchows Arch. Abt. B* **7**, 356—366 (1971)
- Müller, W. A., Gössner, W., Hug, O., Luz, A.: Late effects after incorporation of the short-lived α -emitters ^{224}Ra and ^{227}Th in mice. *Hlth Phys.*, im Druck (1976)
- Pillai, P. A.: A banded structure in the connective tissue of nerve. *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 455—468 (1964)
- Raimondi, A. J., Mullan, S., Evans, J. P.: Human brain tumors: an electron-microscopic study. *J. Neurosurg.* **19**, 731—753 (1962)

- Ramsey, H. J.: Fibrous long-spacing collagen in tumors of the nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **24**, 40—48 (1965)
- Rohen, J. W.: Über das Ligamentum pectinatum der Primaten. *Z. Zellforsch.* **58**, 403—421 (1962)
- Schubert, G. E., Adam, A.: Glomerular nodules and long-spacing collagen in kidneys of patients with multiple myeloma. *J. clin. Path.* **27**, 800—805 (1974)
- Silberberg, R., Silberberg, M., Feir, D.: Occurrence of long-spacing (FLS) collagen in the articular cartilage of the mouse. *Path. et Microbiol. (Basel)* **26**, 779—783 (1963)

Dr. K.-H. Marquart
Abt. f. Allg. u. Exp. Pathologie
Gesellschaft für Strahlen-
und Umweltforschung mbH München
D-8042 Neuherberg
Bundesrepublik Deutschland