

XXII.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie
der Jagiellonischen Universität in Krakau. Direktor: Prof.
Dr. K. Klecki.)

Ueber die Bedingungen der Entstehung von makro- skopischen Metastasen bei carcinomatösen Mäusen.¹⁾

(Erster Teil der experimentellen Untersuchungen von malignen
Neubildungen.)

Von

Adam Wrzosek.

In der experimentellen und vergleichenden Pathologie der bösartigen Geschwülste, welche erst seit einigen Jahren sich schnell zu entwickeln begann, verwendet man für die Untersuchungen am meisten weisse Mäuse. Es ist dies aus vielen Rücksichten selbstverständlich. Angesichts der kurzen Lebensdauer dieser Tiere eignen sich dieselben vortrefflich zur Untersuchung des Einflusses, welchen das Alter auf die Entstehung und das Wachstum der Geschwülste ausübt. Angesichts der grossen Fruchtbarkeit der Mäuse und der leichten Züchtung derselben wird es dem Forscher nicht schwer über ein grosses Material zu verfügen, zu dessen Unterbringung nicht viel Platz nötig ist. Angesichts endlich der grossen Aehnlichkeit der malignen Geschwülste der Mäuse mit denjenigen des Menschen, kann die Untersuchung der ersteren eine nicht geringe Bedeutung für die Pathologie des Menschen haben. Je grösser die erwähnte Aehnlichkeit ist, sowohl im Bau der Neubildungen als auch in ihrem Verlaufe, desto mehr Recht haben wir auch beziehentlich der Pathologie und Therapie der menschlichen Geschwülste Schlüsse, obwohl mit Vorbehalt, auf Grund der ausgeführten Untersuchungen an Mäusen ziehen zu dürfen.

Nebst zahlreichen Forschern, welche behaupten, dass zwischen den Neubildungen des Menschen und der Mäuse es keinen prinzipiellen Unterschied gibt, fehlt es auch nicht an solchen, die dagegen auftreten und behaupten, dass die erwähnten Neubildungen grosse Unterschiede aufweisen. Als Be-

1) Vgl. Vorläufige Mitteilung in polnischer Sprache. Przegląd Lekarski. 1910.
Zeitschrift für Krebsforschung. 11. Bd. 3. Heft.

weis führen sie nämlich den Umstand an, dass die bösartigen Geschwülste der Mäuse nur selten, die menschlichen dagegen sehr häufig zu Metastasen führen. Makroskopische Metastasen begegnet man in der Tat selten, sowohl bei Mäusen, bei denen die Geschwülste selbständig entstanden, als auch bei solchen, denen sie von anderen Mäusen verimpft worden sind. Bei Mäusen mit spontan entstandenen Geschwülsten beobachtete die makroskopischen Metastasen von allen Forschern am häufigsten Murray, nämlich auf 68 Mäuse bei 16. Andere Forscher begegneten solchen Metastasen viel seltener: Apolant stellte auf 221 Mäuse nur in 6 Fällen makroskopische Metastasen fest, Michaelis nur in einem Falle, Borrel und Haaland desgleichen nur bei einer Maus, Jensen begegnete derselben kein einziges Mal. Die Metastasen entwickelten sich gewöhnlich in den Lungen, und nur selten in anderen Organen.

Obzwar bei Mäusen mit Spontangeschwülsten makroskopische Metastasen selten vorkommen, so fanden doch bei solchen Mäusen Borrel und Haaland sehr oft mikroskopische Metastasen in den Lungen, was von anderen Forschern bestätigt wurde.

Bei Mäusen, denen Geschwülste anderer Mäuse weiterverimpft wurden, bemerkte Haaland nur fünfmal makroskopische Metastasen in den Lungen und einmal im Pankreas, Michaelis einmal in den Lungen, Apolant beobachtete solche Metastasen in den Lungen in 3—30 pCt. der Fälle, aber ausschliesslich bei Mäusen, denen er eine gewisse Neubildung verimpft hatte, und nur bis zur zwanzigsten Generation; andere transplantable Tumoren bildeten, laut seinen Angaben, keine makroskopische Metastasen, und es wurden auch solche nach zwanzigfacher Verimpfung der oben erwähnten Geschwulst nicht mehr beobachtet. Jensen bemerkte kein einziges Mal Metastasen bei Mäusen, denen er Geschwülste verimpfte¹⁾.

Die Ursache, warum bösartige Mäusegeschwülste, welche mit geringen Ausnahmen Carcinome sind, keine makroskopischen Metastasen bilden, wurde bis jetzt experimentell nicht festgestellt. Man äusserte nur verschiedene Mutmassungen in dieser Hinsicht. Gierke²⁾ z. B. ist der Ansicht, dass bei Mäusen mit Geschwülsten deshalb keine makroskopische Metastasen entstehen, weil dieselben nach der Verimpfung von Tumoren viel zu kurze Zeit leben, als dass sich die Metastasen ausbilden könnten.

1) Angaben über die Metastasen der Mäusegeschwülste hat C. Lewin in seiner Monographie unter dem Titel „Die bösartigen Geschwülste vom Standpunkt der experimentellen Geschwulstforschung dargestellt“, Leipzig 1909 zusammengestellt. Dasselbst ist auch die Literatur angegeben, welche sich auf experimentelle Untersuchungen bösartiger Geschwülste bezieht.

2) Gierke, E., Die hämorrhagischen Mäusetumoren mit Untersuchungen über Geschwulstresistenz und -disposition bei Mäusen. Zieglers Beiträge. 1909. Bd. 43.

Gegen diese Auffassung tritt Lubarsch¹⁾ auf, denn bei Mäusen, welche 9 bis 13 Monate nach der Impfung von Neubildungen lebten, bemerkte er keine Metastasen, während er dagegen solche bei Mäusen, welche nach der Tumorimpfung kürzere Zeit lebten, und zwar nur 3—7 Monate, viermal feststellen konnte. Lewin²⁾ erblickt die Ursache der seltenen Entwicklung der Metastasen in der Art ihrer Entstehung bei den Mäusen, und zwar hauptsächlich durch Vermittlung von Blut- und nicht Lymphgefässen; das Blut aber hat nach den Untersuchungen von M. B. Schmidt die Fähigkeit in vielen Fällen die Geschwulstzellen zu vernichten. Ehrlich³⁾ vermutet, dass die verimpften Tumoren, indem sie sehr schnell wachsen, die zu ihrer Entwicklung nötigen Substanzen im Blute vollständig verbrauchen, und auf diese Weise die Entwicklung von Metastasen unmöglich machen.

Indem ich die Mäusegeschwülste seit einigen Jahren experimentell untersuchte, bemerkte ich, gleich anderen Forschern, dass diese Geschwülste selten makroskopische Metastasen bilden. Ich hatte zur Verfügung 25 Mäuse mit Spontangeschwülsten. Die Mäuse, von denen hier die Rede ist, stammten aus den Universitätsinstituten in Krakau, hauptsächlich aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie. Bei keiner von diesen Mäusen hatten sich makroskopische Metastasen entwickelt. Bei den Mäusen dagegen, denen ich die Tumoren subkutan am Rücken oder am Bauch in der Inguinalgegend verimpft habe, entstanden zwar Metastasen, die mit blossem Auge zu sehen waren, jedoch waren sie nur selten.

Nachdem ich mir zur Aufgabe gestellt habe, möglichst vielseitig die Wachstumsbedingungen bösartiger Geschwülste zu untersuchen, wandte ich unter anderem das Augenmerk auf die Bedingungen der Entstehung von makroskopischen Metastasen bei weissen Mäusen, denen bösartige Geschwülste geimpft worden waren. Zu den experimentellen Untersuchungen gebrauchte ich zwei Tumoren, bezeichnet mit Nr. 1 und Nr. 4, welche von weissen Mäusen stammten.

Der Tumor Nr. 1 war in der rechten Inguinalgegend des Weibchens entstanden, dessen Alter unbekannt war. Die dunkle Farbe der Geschwulst wurde durch die übermässig gespannte Haut sichtbar. Als die Geschwulst sich zum Umfange einer Kirsche vergrössert hatte, entfernte ich dieselbe in der Aethernarkose am 20. Februar 1907. Die Operationswunde nähte ich zu und verklebte mit Kollodium. Die Vernarbung der Wunde erfolgte sehr rasch. Doch am 9. März 1907 entstand an einer Stelle, die von der

1) Lubarsch, Allgemeine Biologie und Pathologie. Jahreskurse für ärztliche Fortbildung. 1910. H. 1.

2) Lewin, a. a. O.

3) Ehrlich, P., Experimentelle Carcinomstudien an Mäusen. Arbeiten aus dem königl. Institut f. experim. Therapie zu Frankfurt a. M. 1906. H. 1.

Wunde $\frac{1}{2}$ cm nach vorne zu entfernt war, ein Geschwülstchen von der Grösse eines Nadelkopfes. Die Geschwulst begann sich allmählich zu entwickeln und erreichte grosse Dimensionen. Ausser dieser Geschwulst bemerkte ich am 6. April 1907 eine zweite auf dem Rücken in der hinteren Hälfte der linken Seite. Die Geschwulst befand sich unter der Haut. Endlich bemerkte ich am 16. Mai 1907 eine dritte Geschwulst in der vorderen Hälfte des Körpers, gerade neben dem Ansätze der vorderen linken Extremität. Am 19. Mai 1907 verendete die Maus. Bei der Sektion wurden in den Organen der Bauchhöhle und des Brustkorbes keine makroskopischen Metastasen nachgewiesen. Die Tumoren wogen 9,5 g und die Maus nach der Entfernung der Geschwülste 15,5 g. Die grösste Geschwulst war in der rechten Inguinalgegend, eine kleinere am Rücken und die kleinste neben dem Ansätze der vorderen linken Extremität. Die während der Operation am 20. Februar 1907 entfernte Geschwulst war von dunkler Farbe. Nach dem Durchschneiden derselben trat etwas zähe dunkle Flüssigkeit hervor. Einen kleinen Teil der Geschwulst nahm ich zur histologischen Untersuchung und den weit grösseren verwendete ich zur Verimpfung. Ich impfte zwei Mäusen in den Rücken subkutan je ein Stückchen der Geschwulst, das von der Grösse eines Erbsenkornes war. Den Rest der Geschwulst zerschnitt ich mit der Schere in kleinste Teile. Den so erhaltenen Tumorbrei impfte ich mit Hilfe der Pasteurschen Pipette acht Mäusen subkutan in den Bauch. Bei allen geimpften Mäusen war der Erfolg positiv. Bei weiteren Impfungen bediente ich mich ausschliesslich des Tumorbreis, den ich auf oben erwähnte Weise erhalten habe. Bis zur elften Generation einschliesslich (den 30. Dezember 1907) gelang die Impfung des Tumorbreis bei allen Mäusen ohne Ausnahme, unabhängig davon, an was für einer Stelle des Rumpfes der Tumor geimpft worden war. Jedoch von der zwölften Generation an (30. Januar 1908) gelang die Uebertragung des Tumors nicht auf alle geimpften Mäuse. So gelang die Uebertragung nach der 21. Transplantation von 45 geimpften Mäusen nur auf 17; und nach der 27. Transplantation von 19 Mäusen nur auf eine. Dann steigerte sich aber seine Uebertragbarkeit, denn nach der 29. Transplantation gelang sie bei 14 Mäusen von 69 geimpften, nach der 30. Transplantation bei 14 von 16 geimpften, und bei der 31. Generation (13. September 1910) wiesen alle Einzelimpfungen (15 Mäuse) einen positiven Erfolg auf. Im Laufe der Weiterverimpfung änderte sich das Bild des Tumors auf dem Durchschnitt; in der zweiten Generation stellte er anstatt des dunkelvioletten Farbentons ein fleckiges Aussehen dar, stellenweise grau und stellenweise dunkel, und in einigen nachfolgenden Generationen wurde es grau-blass, wonach es die Farbe nicht mehr änderte. Die Konsistenz des Tumors war anfangs unbedeutend, dann nach mehrmaliger Ueberimpfung grösser, doch im Allgemeinen nicht überaus gross. Der histologische Bau des Tumors

erlitt im Laufe der Ueberimpfung keine bedeutenden Veränderungen. Die histologische Untersuchung ergab, dass die bei der Maus entfernte Spontangeschwulst ein Adenocarcinom war, in welchem das Carcinomgewebe stärker entwickelt war als das Adenomgewebe. Nach mehrmaliger Ueberimpfung war das Adenomgewebe nicht minder stark entwickelt als das Carcinomgewebe, und dieses war sowohl in den geimpften Tumoren, als auch in ihren makroskopischen Metastasen in den Lungen der Fall. Die Grösse dieser Metastasen unterlag bedeutenden Schwankungen: von der Grösse eines Nadelkopfes bis zu den Dimensionen fast des ganzen Brustkorbes, den sie ausfüllten, wobei von dem Lungengewebe nicht viel übrig blieb.

Der Tumor Nr. 4 ist auch ein Adenocarcinom. Er unterscheidet sich jedoch von dem Tumor Nr. 1 dadurch, dass das Carcinomgewebe stets darin stärker entwickelt ist als das Adenomgewebe. Das histologische Bild dieses Tumors stimmt im grossen Ganzen mit dem Adenocarcinom, das in der Arbeit von Apolant¹⁾ (Taf. II, Fig. 9) abgebildet ist. Nach weiterer Ueberimpfung konnten keine deutlichen Veränderungen desselben verzeichnet werden. Dieser Tumor entwickelte sich in der linken Axilla bei einem über 2 Jahre alten Weibchen. Im Laufe von zwei Monaten erreichte er bedeutende Dimensionen. Nachdem die Maus am 9. April 1907 mit Chloroform getötet wurde, entfernte ich den Tumor. Er wog 3,4 g, die Maus ohne Geschwulst wog 25,6 g. Die Geschwulst war auf dem Durchschnitt stellenweise dunkel-violett gefärbt und wies auch graue Flecken auf. Die grau gefärbten Stellen zeigten stärkere Konsistenz als die dunkel-violetten. Nach mehrmaliger Ueberimpfung wurde der Tumor graublass. Den Tumorbrei impfte ich den Mäusen auf solche Weise wie den Tumor Nr. 1. Die erste Transplantation gelang von 6 geimpften Mäusen nur bei einer. In folgenden Generationen war die Impfausbeute grösser. Durch fortgesetzte Ueberimpfung gelang es aber, die Uebertragbarkeit erheblich, schliesslich bis auf 100 pCt. zu steigern.

Den Brei sowohl des Tumors Nr. 1 als auch des Tumors Nr. 4 impfte ich überwiegend jungen, 2—3 Monate alten Mäusen. Am häufigsten impfte ich subkutan, in den Rücken oder den Bauch, in die rechte oder die linke Inguinalgegend, seltener in den Schwanz, sehr selten in die Bauch- oder Pleurahöhle. Bei jeder neuen Reihe von Mäusen impfte ich gewöhnlich gleiche Mengen des Tumorbreis, welcher sowohl unverdünnt als auch mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt verwendet wurde. Die Mengen reinen Tumorbreis, nach Abzug des Gewichtes der Kochsalzlösung, falls der Tumorbrei verdünnt war, waren bei verschiedenen Reihen der Mäuse ver-

1) Apolant, H., Die epithelialen Geschwülste der Maus. Arbeiten aus dem königl. Institut f. experim. Therapie zu Frankfurt a. M. 1906. H. 1.

schieden: von 2 mg bis 65,4 mg. Um den Tumorbrei subkutan in den Rücken oder den Bauch zu verimpfen, machte ich mit der Schere einen kleinen Schlitz in der Haut, führte durch denselben die Spitze der Pasteurschen Pipette und spritzte den Tumorbrei unter die Haut ein. In ähnlicher Weise führte ich auch den Impfbrei in die Bauchhöhle oder in die Pleurahöhle. Anders verfuhr ich, wenn ich den Tumor in den Schwanz impfte. Nach Anästhesieren der Maus mit Hilfe einer narkotischen Mischung, welche aus gleichen Teilen Alkohol, Aether und Chloroform bestand, stach ich den Schwanz möglichst entfernt von der Basis mit der Nadel einer Pravazschen Spitze an und nach der Herausnahme der Nadel führte ich in derselben Stelle die Spitze der Pasteurschen Pipette und blies den Geschwulstbrei hinein. Alle Instrumente, die zur Impfung gebraucht wurden, waren sterilisiert und die Haut war an der Stelle, an der ich die Pipette hineinstach, glattgeschoren und mit Aether gehörig gereinigt. Zur Ueberimpfung des Tumors jeder neuen Reihe der Mäuse gebrauchte ich dieselbe Pipette, an der ich auch die Stelle bezeichnete, wo der Impfbrei eingetrieben worden war. Nach jeder Impfung führte ich die Spitze der Pipette mehrmals durch die Flamme hindurch, bevor ich in die Pipette neuerdings Impfbrei aufnahm.

Einen Teil der geimpften Mäuse, auf denen die Uebertragung der Geschwulst gelang, tötete ich nach einer gewissen Zeit mittelst Chloroform, und die entfernten Geschwülste verwendete ich zur Weiterverimpfung und zur mikroskopischen Untersuchung. Den anderen Teil der positiv geimpften Mäuse beobachtete ich bis zum Ende ihres Lebens. Wenn irgend eine zugrunde ging, seziierte ich dieselbe und gab insbesondere darauf acht, ob in irgend einem Organe Metastasen nicht vorhanden wären, und notierte das Geschlecht des Tieres, sein Gewicht und das der Geschwulst. In den unten angegebenen Zusammenstellungen habe ich nur solche Mäuse berücksichtigt, welche von selbst zugrunde gingen, bis Ende ihres Lebens beobachtet worden sind und denen ich die Geschwulst subkutan in den Rücken, den Bauch oder den Schwanz geimpft habe. In die Brust- oder Bauchhöhle habe ich den Tumor bis jetzt einer noch zu geringen Anzahl von Mäusen eingeimpft, um mich schon jetzt der Resultate dieser Impfungen als statistischen Materials zu bedienen.

Makroskopische Metastasen traf ich nur in den Lungen an. Sie entwickelten sich selten nach der subkutanen Impfung des Tumors in den Rücken oder den Bauch. Dagegen entstanden sie weit häufiger nach der Impfung des Tumors in den Schwanz. Unter 354 Mäusen mit positiv verimpftem Tumor Nr. 1 subkutan in den Bauch oder den Rücken entwickelten sich die makroskopischen Metastasen kaum bei 5 Mäusen, d. h. in 1,4 pCt., dagegen unter 89 Mäusen, welche nach der Entwicklung des in den Schwanz geimpften Tumors Nr. 1 zugrunde gingen, wiesen 39 makroskopische Meta-

stasen auf, d. h. in 43,8 pCt. der Fälle. Ein ähnliches Verhalten war bei den Metastasen des Tumors Nr. 4 zu verzeichnen. Unter 442 mit dieser Geschwulst erfolgreich subkutan in den Rücken oder den Bauch geimpften Mäusen stellte ich in 26 Fällen, d. h. in 5,9 pCt., während der Sektion Metastasen fest; unter 131 Mäusen dagegen, welche nach erfolgreicher Impfung des Tumors Nr. 4 in den Schwanz verendeten, hatten 63 Metastasen, d. h. 48 pCt.

Beide Tumoren, welche ich den Mäusen einimpfte, zeichneten sich durch grosse Bösartigkeit aus: Mäuse, die mit dem Tumor Nr. 1 subkutan in den Bauch oder den Rücken erfolgreich geimpft waren, gingen durchschnittlich am 59. Tage nach der Impfung des Tumors zugrunde, und diejenigen in derselben Weise mit dem Tumor Nr. 4 geimpften verendeten am 52. Tage. Mäuse mit positiv in den Schwanz geimpften Tumoren lebten bei weitem länger, denn nach Verimpfung des Tumors Nr. 1 gingen sie im Durchschnitt am 83. Tage nach der Impfung zugrunde und nach Verimpfung des Tumors Nr. 4 am 127. Tage.

Die Lebensdauer der Mäuse nach der Verimpfung von Tumoren hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Häufigkeit der Entstehung makroskopischer Metastasen in den Lungen. Diese Metastasen kamen vor sowohl bei solchen Mäusen, welche ausnahmsweise lange nach der Impfung des Tumors lebten, als auch bei solchen, welche verhältnismässig sehr schnell zugrunde gingen. Einmal z. B. fand ich eine Metastase in den Lungen einer Maus, welche am 30. Tage nach der Impfung der Geschwulst Nr. 1 in den Schwanz zugrunde ging; ein anderes Mal bei einer solchen, welche nach der gleichen Impfung mit dem Tumor Nr. 4 50 Tage lebte, und das dritte Mal bei einer Maus, welche nach der Verimpfung in den Schwanz des Tumors Nr. 1 131 Tage gelebt hat. Manchmal liessen sich keine Metastasen feststellen, obwohl die Mäuse nach erfolgreicher Impfung der Neubildungen in den Schwanz lange gelebt hatten; so z. B. zwei Mäuse, welchen der Tumor Nr. 4 in den Schwanz geimpft worden ist, waren frei von Metastasen, obwohl eine Maus 289 und die andere 316 Tage nach der Impfung gelebt hatte. Manchmal fand ich aber Metastasen bei Mäusen, die kürzer als solche, bei denen überhaupt keine Metastasen sich vorfanden, gelebt hatten; in anderen Fällen war gerade das Gegenteil zu konstatieren. Als Beispiel führe ich zwei Auszüge aus den Versuchsprotokollen an.

Einmal hatte ich zwei Mäusen den Tumor Nr. 4 in den Schwanz geimpft; bei beiden Mäusen fiel die Impfung positiv aus. Eine Maus ging am 117. Tage nach der Impfung zugrunde, die andere am 144. Tage. Bei der ersteren gab es keine Metastasen, während die andere dieselben aufwies. Ein anderes Mal verimpfte ich vier Mäusen desselben Wurfs je 5,7 mg Impfbreis des Tumors Nr. 4 in den Schwanz. Bei allen Tieren erwies sich die Impfung erfolgreich. Zwei Mäuse gingen am 80. Tage

nach der Impfung zugrunde; beide hatten Metastasen in den Lungen. Von den zwei anderen, welche keine Metastasen aufwiesen, ging eine am 109., die andere am 112. Tage nach der Impfung zugrunde.

Daraus folgt, dass bei der Entstehung von makroskopischen Metastasen bei Mäusen mit geimpften Geschwülsten neben anderen Faktoren auch die individuelle Disposition eine gewisse Rolle spielen muss.

Den grössten Einfluss auf die Entstehung von makroskopischen Metastasen bei Mäusen übt aber der Entwicklungsboden der geimpften Geschwulst. Die in den Schwanz geimpften Geschwülste gaben eine geringere Impfausbeute, hatten eine längere Latenzperiode, geringere Wachstumsenergie, und erreichten bei weitem geringere Dimensionen, als Geschwülste, welche subkutan in den Rücken oder den Bauch geimpft worden waren; dagegen bildeten sie weit öfter makroskopische Metastasen.

Auf Grund meiner Experimente und Beobachtungen kam ich zur Ueberzeugung, dass zur häufigeren Entstehung von makroskopischen Metastasen bei Mäusen folgende drei Bedingungen nötig sind;

1. dass die zur Impfung verwendete Geschwulst sich durch ausgesprochene Wachstumsenergie auszeichne;
 2. dass dieselbe an einer der raschen Entwicklung der Geschwulst ungünstigen Stelle geimpft werde;
 3. dass sie Mäusen eingeimpft werde, deren Organismus zur Bildung makroskopischer Metastasen geeignet ist.
-