111. Experimentelle Erzeugung des Sarkoms bei weissen Ratten durch kombinierte subkutane Applikation von Kieselgur und o-Aminoazotoluol.

Von Takaoki SASAKI, Naoaki NAGAO und Ichiro OTSUKA.

Sasaki-Laboratorium, Tokyo.

(Comm. by T. SASAKI, M.I.A., Nov. 12, 1940.)

Vor der Anstellung der Fütterungsversuche mit o-Aminoazotoluol von Sasaki und Yoshida (Proc. **8** (1932), 464), durch welche die carcinogene Wirkung des o-Aminoazotoluols auf Rattenleber festgestellt worden war, waren auch die Injektionsversuche mit derselben Substanz bei Ratten ausgeführt worden (Yoshida, Gann **28**, 441, 1934). Dabei wurde zwar Leberkrebs beobachtet, aber auch Hautcarcinom bei 2 Fällen konstatiert. Das Carcinom entstand nicht in der Injektionsstelle, sondern in einer ganz entfernten Stelle. Cysticercussarkom wurde auch dabei überaus häufig beobachtet.

Y. Nishiyama in hiesigem Laboratorium erzeugte bei Ratten Sarkome in loco durch wiederholte subkutane Injektionen von konzentrierter Glukoselösung. Dabei entstand Sarkom bei den gleichzeitig mit o-Aminoazotoluol gefütterten Fällen viel häufiger als bei den nicht gefütterten Fällen. Somit scheint o-Aminoazotoluol nicht nur Leberkrebs hervorzubringen imstande zu sein, sondern auch eine begünstigende Wirkung auf Sarkombildung zu haben (Gann **32**, 85, 1938). Tanaka konnte auch ein Reticulosarkom durch Injektion des 4-N-Dimethylaminoazobenzols (Strukturisomer des o-Aminoazotoluols) bei Ratten erzeugen (Gann **32**, 275, 1938, Osaka Ig. Z. **36**, 1774, 1937). Bei den ausgedehnten Versuchen von englischen sowie amerikanischen Forschern mit zahlreichen polyzyklischen aromatischen carcinogenen Substanzen wurde bei der Hautbepinselung der Substanz hauptsächlich Carcinom und bei der subkutanen Injektion Sarkom konstatiert. Somit scheint zwischen der Carcinom- und Sarkombildung ein gewissermassen gemeinsamer tumorbildender (carcinogen im weiteren Sinne) Faktor zu vorhanden.

Andererseits beschäftigte Podwyssotzki sich im Jahre 1912 mit der experimentellen Erzeugung der Riesenzellengranulomen durch Kieselgur. Er benutzte zu seinem Versuche eine Aufschwemmung von Kieselgur in physiologischer Kochsalzlösung und injizierte sie dem Meerschweinchen intraperitoneal. Der dabei entstandene Knoten bestand aus dicht aneinander liegenden kolossal grossen plasmodien- oder syncytienähnlichen mit zahlreichen Kernen besetzten Protoplasmassen oder Riesenzellen (Zieglers Beitr. **47**, 270, 1910). Schirokogoroff prüfte dieses Experiment nach und benannte ihn den dem Riesenzellensarkom äusserst ähnlichen gutartigen Tumor (Virchows Arch. **205**, 166, 1911). Mit diesem Riesenzellengranulome stellte Stieve Transplantationsversuche an. Aus 9 Fällen wurde das Granulom 50 Meerschweinchen übergepflanzt. Nur bei einem Fall aus einem Stamme zeigte das Transplantat ein selbständiges Wachstum. Dabei zeigte das Transplantat viele Mitosen-

figuren und wuchs in die Darmwand infiltrierend hinein, enthielt aber noch Kieselgur in sich (Zieglers Beitr. 54, 415, 1912). Morphologische Veränderungen von Kieselgurgranulomen unter dem Einfluss des Bazillenstammes Hü (Pickham, Z. Krebsf. 23, 496, 1926) und auch der Einfluss der Prolan-injektion auf Kieselgurgranulom (Caccia, Tumori 10, 38, 1936, ref. in Am. J. Canc. 32, 463, 1938) wurden auch untersucht. Eine echte Geschwulst wurde aber dabei nicht erzeugt.

Auf Grund der obengenannten Tatsachen wurde in hiesigem Laboratorium der Kombinationsversuch von o-Aminoazotoluol und Kieselgur studiert. Die Kieselgursuspension in Olivenöl wurde den Ratten subkutan mehrmals injiziert. Dabei wurde o-Aminoazotoluol gleichzeitig einerseits subkutan andererseits per os einverleibt. Bei 6 Fällen entstand Sarkom in loco und ein davon war übertragbar. Histologisch war es spindelzelliges oder polymorphzelliges Sarkom und enthielt weder mehrkernige Fremdkörperriesenzellen noch Kieselgurreste.

Somit wurde festgestellt, dass o-Aminoazotoluol unter Umständen Sarkombildung begünstigt, wenn auch nicht so stark wie carcinogene polyzyklische Kohlenwasserstoffe. Die Frage, ob es sich dabei um die Steigerung der allgemeinen Tumorbereitschaft oder nur um eine lokale Wirkung der Substanz handelt, bleibt noch unentschieden.

Tierversuche.

Kieselgur „Kahlbaum“ wurde zuerst mit verdünnter Salzsäure gekocht, mit Wasser ausgewaschen, im Achatmörser fein pulverisiert und gesiebt. Diese ganz feine Kieselgur wurde im Verhältnis von 1 g zu 10 ccm in Olivenöl oder im 1% o-Aminoazotoluol enthaltenden Olivenöl suspendiert.

Bei der ersten Versuchsreihe wurden 30 Ratten die o-Aminoazotoluol enthaltenden Kieselgursuspension je 0.5 ccm oder 1.0 ccm wöchentlich einmal subkutan in dieselbe Stelle injiziert. Die Tiere wurden mit unpolierten Reikörnern, die o-Aminoazotoluol nicht enthielt, ernährt. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden 20 Ratten die Kieselgursuspension, die o-Aminoazotoluol nicht enthielt, in derselben Weise injiziert. Die Tiere wurden aber dabei mit dem 0.1% o-Aminoazotoluol enthaltenden Futter ernährt. Bei der dritten Versuchsreihe wurden schliesslich 10 Ratten mit der o-Aminoazotoluol nicht enthaltenden Kieselgursuspension injiziert und gleichzeitig mit dem o-Aminoazotoluol auch nicht enthaltenden Reisfutter ernährt.

Nach etwa 12 maligen Injektionen wurde die weitere Injektion unterbrochen. Nach etwa 100 oder 180 tägiger Fütterung mit dem o-Aminoazotoluol enthaltenden Reisfutter wurde das Futter in das gewöhnliche o-Aminoazotoluol nicht enthaltende Futter umgesetzt.

Bei allen drei Versuchsreihen entstand in loco nach den 12 maligen Injektionen eine Konglomeratbildung, die aus miteinander fest verwachsenen von linsen- bis erbsengrossen knorpelhaften Knoten bestand und von der Umgebung scharf begrenzt war. Dieses Knoten blieb bei den meisten Fällen ziemlich unverändert und weder vergrösserte noch verkleinerte selbst nach einjähriger Versuchsdauer.

Das Knoten war gelblich grau, knorpelhart und schwer schneidbar. Seine Schnittfläche war fast gleichmässig, gelblich und sah etwas abgetrocknet aus. Histologisch war der zentrale Teil ganz kernarm und bestand aus einer Durchflechtung grober, hyalinisierter Bündeln der kollagenen Fasern und dazwischen liegenden Kieselgurpartikelchen. Das Kieselgurpartikelchen war selbst nach einer langen Versuchsdauer mikroskopisch sehr leicht zu erkennen. Im peripheren Teil befand sich eine Zone von einem schmalen Granulationsgewebe, welches eine Neubildung von zarten kollagenen Fasern begleitete und auch Kieselgurpartikelchen und mehrkernige Fremdkörperriesenzellen enthielt.

Bei 4 Fällen von der ersten Versuchsreihe (add. o-Aminoazotoluol subkutan) und bei 2 Fällen von der zweiten Versuchsreihe (add. o-Aminoazotoluol per os) fing dann ziemlich plötzlich ein Knoten in dem oben erwähnten Konglomerat ein schnelles Wachstum zu zeigen an. Das Knoten entwickelte sich in 2 bis 4 Wochen zu einem Tumor von der Grösse einer Haselnuss oder Walnuss. Der Tumor war von grau-weißer Farbe, elastisch und von weniger derber Konsistenz als andere Konglomeratknoten. Er war leicht schneidbar und seine Schnittfläche markig, grauweiss und feucht. Histologisch zeigte der Tumor das Bild des Spindelzellensarkoms oder polymorphzelligen Sarkoms. Bei einem Fall von polymorphzelligen Sarkom wuchsen die Tumorzellen infiltrierend in das Muskelgewebe hinein.

Das Kieselgurpartikelchen, das immer im Konglomeratknoten nachgewiesen wurde, wurde im Sarkomgewebe nicht gefunden, mit Ausnahme eines einzigen Falls. Das Spindelzellensarkom war oft von einer Neubildung der zarten kollagenen Fasern begleitet und zeigte eine fibroplastische Natur. Das Sarkomgewebe wurde bis zur vierten Generation mit Erfolg transplantiert.

Zwischen dem Sarkom und dem Granulationsgewebe des Konglomeratknotens liess sich ein Übergangsbild erkennen. Das schmale Granulationsgewebe verbreitete sich an verschiedenen Stellen, oft sogar im zentralen Teil des Knotens. In diesem Granulationsgewebe nahmen die Wander- und Fremdkörperriesenzellen an Zahl ab. Die Fibroblasten waren dabei meistens gleichmässig gestaltet, zuweilen aber zeigten sie eine gewisse Zellatypie. Plump verdickten oder unregelmässig gestaltete Kernen oder Mitosenfiguren traten dabei oft auf. Das Kieselgurpartikelchen war dabei noch leicht zu finden.

Bei der dritten Versuchsreihe (d. i. Kieselgur allein ohne o-Aminoazotoluolzugabe) wurde keine Sarkombildung selbst nach sehr langer Versuchsdauer beobachtet.

Die ausführliche Mitteilung wird demnächst in „Gann“ erscheinen.

TABELLE.

Versuchs-Nr.	Geschlecht	Versuchsdauer	Injektionszahl	Gesamtdosis vom ein- verleibten o-Amino- azotoluol in mg.	Körperge- wicht in g.		Sarkom	
					Beginn	Ende		

30 Versuchstiere, mit der o-Aminoazotoluol enthaltenden Kieselgursuspension injiziert, mit dem o-Aminoazotoluol nicht enthaltenden Futter ernährt, darunter innerhalb 326 Tagen getöteten Fälle aus der Tabelle ausgelassen.

20	♂	330	12	120	230	180	+	
21	♂	358	12	75	115	145		
22	♀	390	12	75	108	120		
23	♀	390	12	75	115	135	+	
24	♂	391	14	140	170	130		
25	♂	398	14	140	120	140	+	
26	♀	448	12	75	130	135		
27	♀	452	12	75	130	105		
28	♀	453	15	150	120	186	+	
29	♀	494	12	75	103	130		
30	♀	588	12	75	115	160		

20 Versuchstiere, mit der o-Aminoazotoluol nicht enthaltenden Kieselgursuspension injiziert, mit dem o-Aminoazotoluol enthaltenden Futter ernährt, darunter innerhalb 400 Tagen getöteten Fälle aus der Tabelle ausgelassen.

13	♂	404	19	940	200	100		
14	♂	411	12	1550	105	120		
15	♂	425	12	1650	125	110		
16	♂	476	12	1700	130	205	+	
17	♀	483	12	1650	115	125		
18	♀	499	14	850	155	90		
19	♀	509	12	1550	105	90		
20	♂	648	12	1550	115	170	+

Abb. 1. (Nr. I-23; 390 Tage).
S—Sarkom, Gr—Kieselgurgranulom.

Abb. 2. (Nr. II-20; 648 Tage).
S—Sarkom, Gr—Kieselgurgranulom.

Abb. 3. (Nr. II-16; 476 Tage).
S—Sarkom, Gr—Kieselgurgranulom.

Abb. 4.
Intraperitoneale Transplanplantation.
S—Transplantat.

Abb. 5.
Subkutane Transplantation.

Abb. 6. (Nr. II-8; 340 Tage).
Drei Kieselgurgranulomknoten, sich
nebeneinander liegend.

Abb. 7. (Nr. I-6; 295 Tage).
Kieselgurgranulom, aus groben hyalinierten Bindegewebsfasern besteht, mit einer schmalen zellreichen Randzone.

Abb. 8. (Nr. I-30; 588 Tage).
Zentrale Partie eines Kieselgurgranuloms, ganz kernarm, grobe hyaline Balken und dazwischen liegende Kieselgurpartikelchen.

Abb. 9. (Nr. II-9; 363 Tage).
Randzone eines Kieselgurgranuloms, Zahlreiche mehrkernige Fremdkörperriesenzellen und dazwischen liegende Kieselgurpartikelchen.

Abb. 10. (Nr. II-9; 363 Tage).
Dieselbe Präparatstelle von Abb. 9, stark vergrößert. Fremdkörperriesenzellen und Kieselgurpartikelchen.

Abb. 11. (Nr. I-24; 391 Tage).
Randzone eines Kieselgurgranuloms, faserig, ohne Fremdkörperriesenzellen.

Abb. 12. (Nr. I-24; 391 Tage).
Dieselbe Präparatstelle von Abb. 11, stark vergrößert. Faseriges Granulationsgewebe mit Kieselgurpartikelchen.

Abb. 13. (Nr. I-25; 398 Tage).
Zellhaufen mit Zelltypie.

Abb. 14. (Nr. II-16; 476 Tage).
Spindelzellensarkom.

Abb. 15. (Nr. I-28; 453 Tage).
Infiltratives Wachstum des Sarkoms in
Muskelfasern.

Abb. 16. (Nr. I-28; 453 Tage).
Dieselbe Präparatstelle von Abb. 15,
stark vergrößert.

Abb. 17. (Nr. II-20; 648 Tage).
Mikroskopische Bild des Falls von Abb.
2. Kernarmes Kieselgurgranulom (Gr)
und dicht darauf liegendes Sarkomge-
webe (S).

#—Bei der Herstellung des Schnittes
künstlich erzeugte Lücke.

Abb. 18. (Nr. II-20; 648 Tage).
Derselbe Fall wie Abb. 17. Polymor-
phezelliges Sarkom. Mittelstark ver-
größert.

Abb. 19. (Nr. II-20; 648 Tage).
Derselbe Fall wie Abb. 17. Stark vergrössert.

Abb. 20. (Nr. II-16; 476 Tage).
Mikroskopisches Bild des Falls von Abb. 3. Kernarmes Kieselgurgranulom (Gr), Fremdkörperriesenzellen enthaltende Randzone und darauf liegendes Spindelzellensarkom (S).

Abb. 21. (Nr. I-25; 398 Tage).
Derselbe Fall wie Abb. 13. Polymorphzelliges Sarkom. Sarkomzellen mit Protoplasmafortsätzen miteinander in Verbindung.

Abb. 22. (Nr. II-16; 476 Tage).
Derselbe Fall wie Abb. 20. Mittelstark vergrössert. Spindelzellensarkom.