

Die Gewebezüchtung als Hilfsmittel chemischer Krebsforschung

Von Dozent Dr. H. LETTRÉ

Chemische Abteilung des Allgemeinen Instituts gegen die Geschwulstkrankheiten
im Rudolf-Virchow-Krankenhaus, Berlin

Vor 30 Jahren berichtete Alexis Carrel über seine Versuche zur Züchtung von Geweben außerhalb des Organismus¹⁾. Wir verdanken ihm die Entwicklung der Technik zur Züchtung des Gewebes in vitro²⁾, die in der von ihm ausgearbeiteten Form heute noch angewendet wird, und die Erkenntnis, daß der Gewebesafte von jungen Embryonen alle für die unbegrenzte Vermehrung der Gewebe notwendigen Nähr- und Wirkstoffe enthält. Embryonalextrakt im Gemisch mit Plasma und Serum ist das geeignete Nährmedium zur unbeschränkten Weiterzüchtung tierischer Zellen außerhalb

des Organismus. Seit dieser Zeit sind wohl praktisch alle Körpergewebe und Zellen in der Gewebekultur gezüchtet und zur Behandlung morphologischer und physiologischer Fragen verwendet worden³⁾.

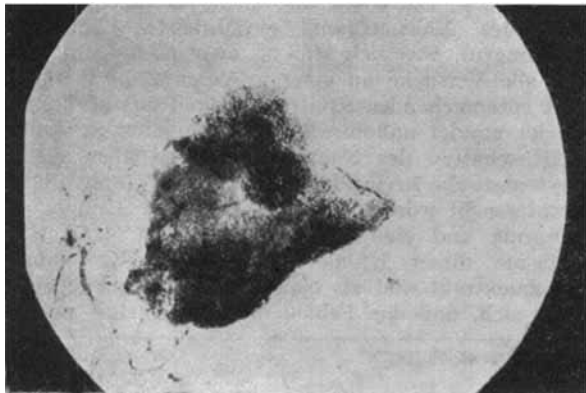
Ebenso wie die Zellen normaler Gewebe lassen sich auch Zellen von Tumoren in der Gewebekultur vermehren. Sie sind sogar im Verhältnis zu den normalen Zellen anspruchsloser: Für ihre Vermehrung ist der Embryonalextrakt nur bedingt notwendig, sie können in einem Gemisch von Plasma und Serum leben. In Abb. 1 sind Aufnahmen der in der Gewebekultur wachsenden Zellen des Ehrlichschen Mäuseadeno-

¹⁾ Carrel u. Burrows, J. Amer. med. Ass. 55, 1379 [1910].

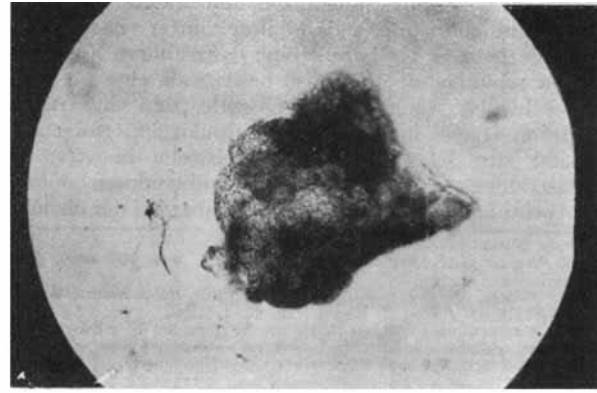
²⁾ Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 6, 51; Brous in Handb. d. biolog. Arbeitsmeth. V, 3A; Rhoda Erdmann: Praktikum der Gewebepflege oder Explantation, besonders der Gewebezüchtung. Springer 1930.

³⁾ A. Fischer: Gewebezüchtung. München 1930; Arch. exp. Zellforsch. Bd. 1—23 [1925—1939].

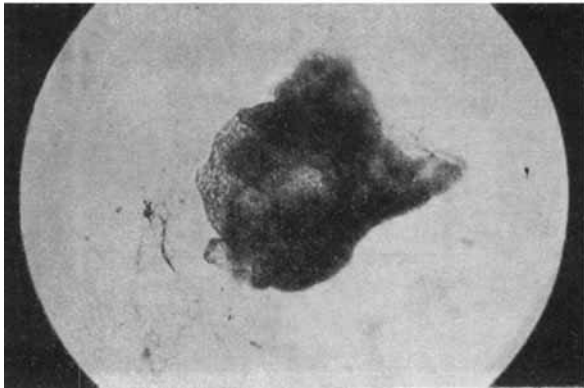
Abb. 1. Ehrlichsches Mäusecarcinom, in der Gewebekultur wachsend. Bild 1 unmittelbar nach dem Einsetzen, die nächsten Bilder nach jeweils einem Tage. Vergrößerung 48fach.



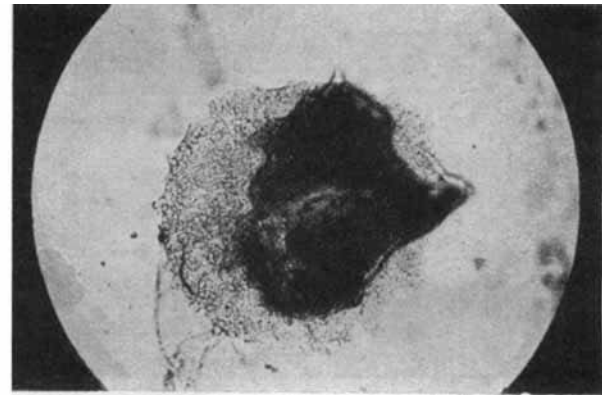
1



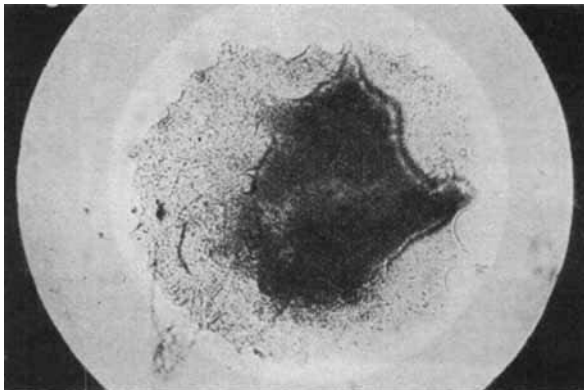
2



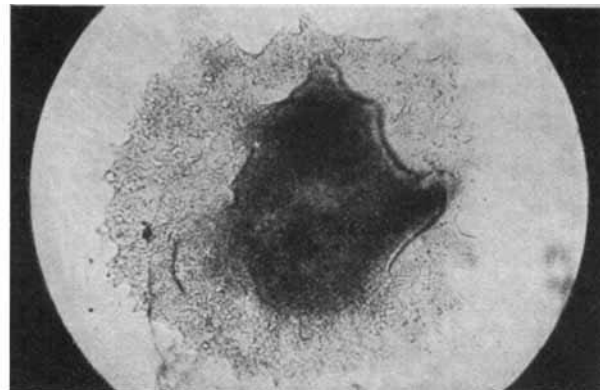
3



4



5



6

carcinoms wiedergegeben; eine Teilung der herangewachsenen Kultur und die Überführung der Teilstücke in neues Nährmedium würde immer wieder das gleiche Bild ergeben. A. Fischer⁴⁾ berichtete kürzlich über den Stand der bisher zwölfjährigen Züchtung dieses Mäusecarcinoms in der Gewebekultur. In über 800 Umsetzungen haben sich die Zellen immer wieder vermehrt und sind weiter gewachsen; diese 12 Jahre außerhalb des Organismus gezüchteten Krebszellen entwickelten sich nach der Transplantation auf die Maus wieder zu Tumoren. Ein eindrucksvoller Beweis, daß das „Wesen der Malignität“ innerhalb der Krebszelle selbst liegt. Auch andere Tiertumoren, Spontantumoren, Impftumoren und durch cancerogene Stoffe erzeugte Tumoren sind in der Gewebekultur gezüchtet worden⁵⁾. Über die Züchtung menschlicher Tumoren liegt eine Reihe von erfolgreichen Arbeiten vor, obschon eine Dauerzüchtung bisher noch nicht durchgeführt wurde⁶⁾. In Abb. 2 sind Gewebekulturen von Impftumoren einiger Tiere und von einem menschlichen Tumor dargestellt⁷⁾.

Es liegt auf der Hand, daß die in vitro frei von allen anderen Einflüssen gezüchtete Krebszelle als ein ideales Objekt für die Untersuchung der Beeinflussung ihres Wachstums durch äußere Faktoren erscheinen muß, vor allem für eine Beeinflussung durch physiologische Wirkstoffe, chemotherapeutisch wirksame Substanzen und andere. Aber ebenso selbstverständlich ist es, daß diese unter den subtilsten Kautelen gezüchtete Krebszelle eine ganz andere Empfindlichkeit gegen schädigende Einflüsse besitzt als eine im Verband einer Geschwulst wachsende Krebszelle, daß ihre Abtötung schon durch irgendeine triviale Manipulation erfolgen kann. Zwar sind zur Schädigung der Krebszelle in vitro durch Röntgenstrahlen sehr viel größere Strahlendosen notwendig als zur Abtötung der Krebszelle in vivo, aber bei der chemischen

Beeinflussung liegen die Verhältnisse in dem zu erwartenden Sinne.

Von primärer Bedeutung für das Wachstum der Gewebekultur ist das biologische Nährmedium, zu dessen Gewinnung tierische Organe und Körperflüssigkeiten dienen. Der Embryonalextrakt wird durch Zentrifugieren von zerkleinerten Embryonen aus angebrüteten Hühnereiern, Plasma und Serum werden aus dem Blut von Ratten oder Hühnern gewonnen. Die Gewebekultur braucht zu ihrer Entwicklung nicht nur ein optimales Nährmedium, sondern auch einen Stützapparat, auf und an dem sie wachsen kann. Diese beiden Funktionen, als Stützapparat und als Nährsubstrat zu dienen, erfüllt das gerinnende Gemisch (die feste Phase) von Embryonalextrakt und Plasma, in die das Gewebestück eingesetzt wird. Ein Gemisch von Serum und Embryonalextrakt, die mit Ringer-Lösung verdünnt sind, wird als flüssige Phase über die feste Phase gegeben. Diese flüssige Phase dient nur als Nährmedium, sie kann abgewaschen und erneuert werden, und in ihr lassen sich meistens die zu untersuchenden Substanzen lösen.

Die Eignung dieser biologischen Medien für die Gewebekultur wird natürlich von der Vorgeschichte und der Ernährung der verwendeten Tiere stark abhängig sein. Es ist bei den Versuchen also keine Konstanz der Eigenschaften des Nährmediums gewährleistet (jahreszeitliche Schwankungen), was sich störend auswirken kann und dazu zwingt, alle Versuche an einer größeren Zahl von Kulturen und mit entsprechenden Kontrollkulturen auszuführen. Diese mehr oder minder unkontrollierbaren äußeren Schwankungen der Eigenschaften des Nährmediums sind aber auch durch eine systematische Beeinflussung der zur Gewinnung benutzten Tiere untersucht worden. Gordonoff⁸⁾ setzte Hühner auf eine vitaminarme und eine vitaminreiche Kost. Die Eier und das Plasma dieser Hühner wurden zur Gewinnung von Embryonalextrakt und als Nährflüssigkeit verwendet. Dabei zeigte es sich, daß das Fehlen aller Vitamine und speziell

⁴⁾ A. Fischer, Nature London **148**, 436 [1939].

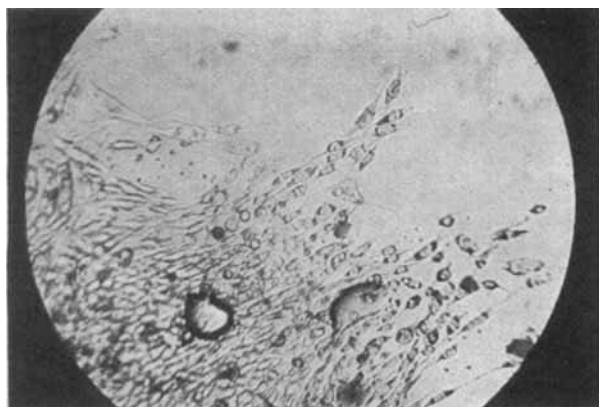
⁵⁾ S. 2) und Schopper, Arch. exp. Zellforsch. **14**, 14 [1933]; M. v. Möllendorf, ebenda **21**, 411 [1934].

⁶⁾ Carrel u. Burrows, J. Amer. med. Ass. **55**, 1732 [1910]; Höfer, Arch. exp. Zellforsch. **7**, 16, 193 [1934]; Weitzmann, Z. Krebsforsch. **48**, 1 [1939].

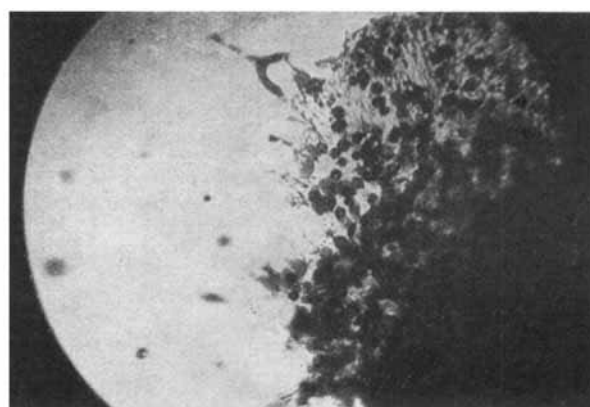
⁷⁾ Diese Aufnahmen wurden mit von Herrn Dr. K. Höfer für diese Zusammenstellung zur Verfügung gestellt. Die anderen Aufnahmen entstammen unseren gemeinsamen Arbeiten, wobei Fräulein Marianne Albrecht wertvolle Hilfe leistete.

⁸⁾ Z. Krebsforsch. **46**, 73 [1937].

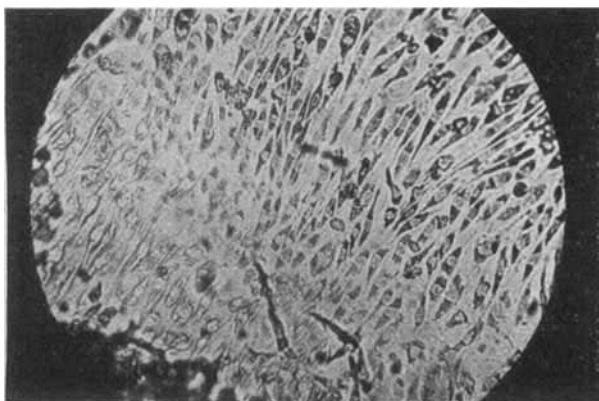
Abb. 2. Einige Tumoren in der Gewebekultur.



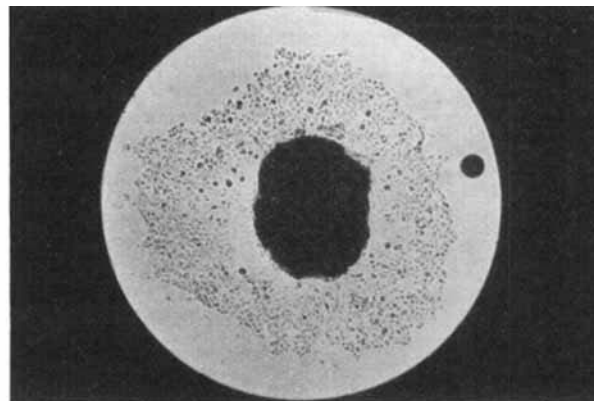
Jensen-Sarkom der Ratte.



Flexner-Jobling-Carcinom der Ratte.

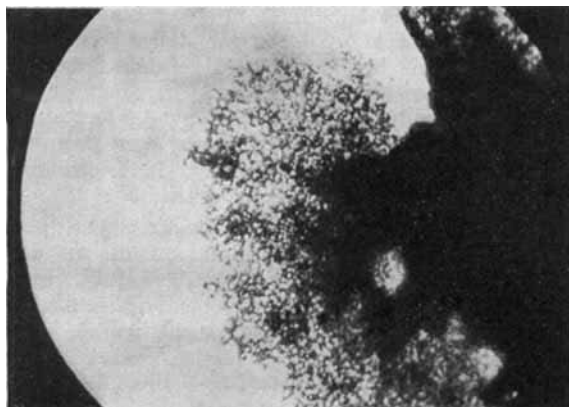


Brown-Pearce-Tumor des Kaninchens.

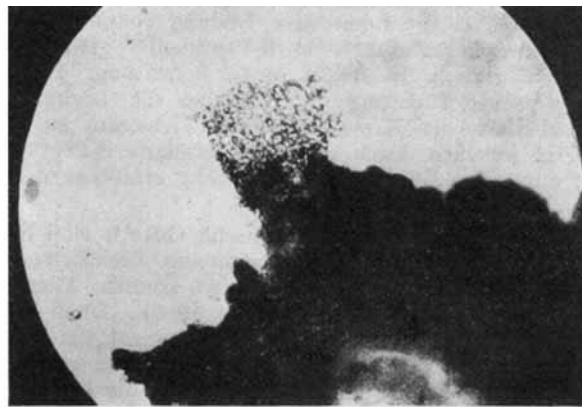


Geschwulst der Parotis vom Menschen.

Abb. 3. Vergrößerung 48fach.



a) Kontrolle, Mäusecarcinom in Plasma und Serum un behandelter Ratten.



b) Ein Stück der gleichen Kultur in Plasma und Serum von mit Mäusecarcinom vorbehandelten Ratten.

das Fehlen der Vitamine A und B₁ das Wachstum von Krebsgewebe in den gewonnenen Nährmedien herabsetzte. Das Fehlen der Vitamine C, D und E hatte keinen Einfluß auf das Wachstum. Umgekehrt bewirkte eine Zufuhr der Vitamine A, B₁ und B₂ an die Hühner eine Begünstigung des Wachstums des Krebsgewebes in den Nährmedien, während die zusätzliche Zufuhr der Vitamine C, D und E keinen Einfluß hatte. Die Versuche zeigen, daß eine gleichmäßige, vitaminreiche Ernährung der Tiere, die zur Gewinnung der Nährmedien dienen, notwendig ist. Etwas unterschiedlich sind die Wirkungen der Vitamine, wenn sie nicht auf dem Umwege über das Tier, sondern in reiner Form dem Kulturmedium zugesetzt werden. Nach Vollmar⁹⁾ hemmen die Vitamine A, B₁ und E in größeren Dosen das Wachstum des Krebsgewebes, die Vitamine C und D sind ohne Einfluß. Über die Beeinflussung durch Hormone sind bisher nur eine Förderung des Wachstums durch Extrakte von Schilddrüsengewebe¹⁰⁾ und eine Hemmung durch Prolan¹¹⁾ bekannt. Im Plasma von entnützten Tieren wurde eine Förderung des Wachstums beobachtet¹²⁾. Bei der Untersuchung einiger Atmungskatalysatoren fand Silva-Lafrentz¹³⁾ keine Beeinflussung des Wachstums von Kulturen des Jensen-Sarkoms durch Häm in und Cytochrom c, während Lactoflavin und Lactoflavinphosphorsäure die Kulturen stark schädigten.

⁹⁾ Arch. exp. Zellforsch. **23**, 42 [1939].

¹⁰⁾ Zakrevski, Z. Krebsforsch. **30**, 122 [1929].

¹¹⁾ Ludwig u. v. Ries, Schweiz. med. Wschr. **16**, 5 [1935].

¹²⁾ Brüda u. Pfeiffer, Z. ges. exp. Med. **68**, 116 [1929].

¹³⁾ Z. Krebsforsch. **48**, 532 [1939].

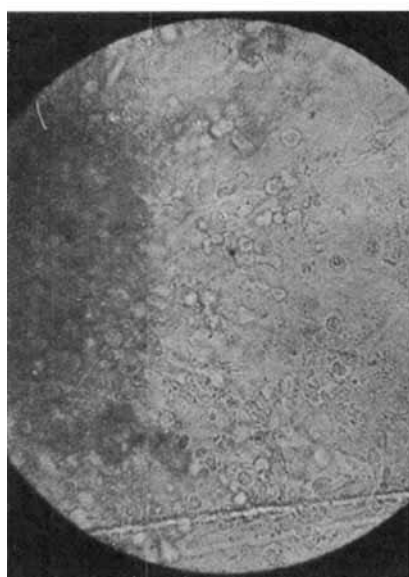
Von besonderem Interesse sind Versuche, in denen Serum und Plasma von solchen Tieren verwendet werden, die entweder selbst Tumoren tragen oder durch die Injektion mit Tumorphosphoren oder artfremden Tumoren zur Bildung von Antikörpern oder Abwehrfermenten veranlaßt sind. Hier sind vor allem die Untersuchungen von Lumsden zu nennen¹⁴⁾. Er injizierte Ratten Aufschwemmungen von Zellen des Ehrlich'schen Mäusecarcinoms und fand, daß Serum und Plasma dieser Ratten eine lytische Wirkung den Zellen des Mäusecarcinoms gegenüber haben und ein Wachstum dieser Zellen in diesen Medien nicht möglich ist. Den Versuchen ist oft widersprochen worden¹⁵⁾, doch hat Lumsden sie immer wieder reproduzieren können. In Abb. 3 sind zwei Teilstücke der gleichen Kultur des Ehrlich'schen Mäusecarcinoms dargestellt, von denen die eine in Plasma und Serum un behandelter Ratten wächst, die andere in Plasma und Serum von Ratten, die mehrfach mit dem Mäusecarcinom geimpft waren und den anfänglich gewachsenen Tumor resorbiert hatten. Wir haben zwar häufig eine Hemmung des Wachstums in den Flüssigkeiten aus vorbehandelten Ratten gesehen, doch keine 100%ige Hemmung oder Auflösung der Krebszellen. Entscheidend hierfür wird das Verhältnis von lösenden Agens zu Krebszellen sein, worauf Lumsden¹⁶⁾ nachdrücklichst hinweist.

¹⁴⁾ Amer. J. Cancer **15**, 563 [1931], **29**, 517 [1937], **32**, 395 [1938]; Lancet **203**, 385 [1934], **209**, 533 [1935]; Biochem. J. **23**, 1338 [1934]; J. Pathol. Bacteriology **39**, 595 [1934], **44**, 515 [1937].

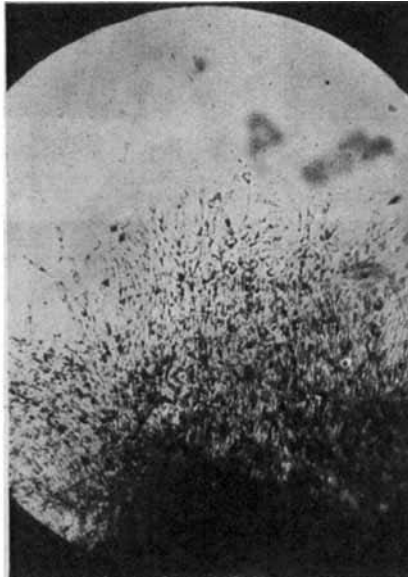
¹⁵⁾ Ludford, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B **112**, 250 [1933].

¹⁶⁾ Mitt. des II. Int. Kongr. f. Krebsforschung u. Krebsbekämpfung, Brüssel 1937, S. 227, 229.

Abb. 4. Hühnerherz-Fibroblasten. Vergrößerung 48fach.



Zusatz von Colchicin
40 γ/cm³.



Normales Nährmedium.



Zusatz von
5,6-Benzo-9-n-butyl-flavin. 25 γ/cm.

Durch die Befunde über die Anwesenheit von Abwehrfermenten¹⁷⁾ und von d-Peptidasen¹⁸⁾ im Serum von Carcinomträgern und über die fakultative Bildung von d-Peptidasen nach parenteraler Zufuhr von d-Peptiden¹⁹⁾ gewinnen die Versuche von Lumsden erneut große Bedeutung. Es bietet sich der Gewebezüchtung die Aufgabe, die Beeinflussung des Wachstums der Krebszelle durch Tiereserum zu untersuchen, in welchem durch chemisch definierte d-Peptide bedingte, durch ihre Wirkung mengenmäßig erfassbare d-Peptidasen vorhanden sind.

Mitosegifte oder karyoklastische Gifte²⁰⁾ sind Stoffe, welche die Mitose, den Zellteilungsvorgang, beeinflussen und auf Phasen der Teilung hemmend wirken können. Hierzu gehören Colchicin, Kakodylate und Trypaflavin. Diese Mitosegifte sind von Dustin²¹⁾ in ihrer Wirkung zuerst am Tier erkannt worden; Ludford²²⁾ zeigte später, daß sie in der Gewebekultur auf normale und auf Krebszellen die gleiche Wirkung ausüben. In Abb. 4 (s. S. 365) sind Fibroblasten von Hühnerherzen wiedergegeben, die der Einwirkung von Colchicin ausgesetzt waren. Die abgerundeten Zellen stellen im Mitosestadium fixierte Zellen dar.

Gelegentlich der Untersuchung der Einwirkung von Flavinen auf die Krebszelle wurde die Beobachtung gemacht, daß das 5,6-Benzo-9-n-butylflavin die Zellen des Ehrlichschen Mäusecarcinoms stark verändert. In Abb. 5 sind Zellen dieses Carcinoms dargestellt, die unter der Einwirkung von 25 γ/cm^3 dieses Flavins gewachsen sind. Es bilden sich relativ wenige, aber außerordentlich stark vergrößerte Zellen, die etwa das 30fache der Größe der ursprünglichen Krebszelle haben. Man hat den Eindruck, als ob es sich hierbei auch um eine Zellteilungsstörung handelte, doch muß die nähere Unter-

suchung der reinen Zellforschung überlassen bleiben, für die diese veränderten Krebszellen wahrscheinlich interessante Objekte darstellen. Ich habe mich in erster Linie mit der Abhängigkeit der Entstehung derartiger Zellen von der Konstitution der Flavine beschäftigt und gefunden, daß die Erscheinung chemospezifisch ist. Außer dem genannten Flavin wurde nur das 9-Äthyl- und das 9-Propyl-5,6-benzoflavin als wirksam befunden, während das 9-Methylderivat unwirksam ist. Andersartig substituierte Flavine, z. B. Lactoflavin und 9-Phenylflavin, bilden diese Formen nicht.

Im vorigen Jahr hat Ludford²³⁾ die Ergebnisse über den Einfluß schädigender Faktoren auf die in der Gewebekultur wachsende Krebszelle zusammengefaßt. In Tab. 1 ist eine Zahl von Substanzen angegeben, deren Einfluß auf das Wachstum der Krebszelle untersucht wurde. Aus den bisherigen Befunden ergeben sich einige, wahrscheinlich zu verallgemeinernde Feststellungen: Die Krebszelle erwies sich in der Gewebekultur stets als labiler gegen eine Schädigung als zum Vergleich untersuchte Zellen von embryonalem Gewebe. Z. B. braucht man von kolloidalen Metallen zur Schädigung von embryonalen Zellen das Fünffache der an Krebszellen wirksamen Dosis. Hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit findet man ein Konzentrationsgebiet, in dem das Wachstum ganz verhindert ist, und ein Gebiet geringerer Konzentration, in dem das Wachstum verlangsamt ist. Stärkere Verdünnungen haben dann gar keinen Einfluß auf das Wachstum. Es ist die Frage gestellt worden, ob noch geringere Konzentrationen eine reizende, stimulierende Wirkung auf das Wachstum haben können. In einer Nachprüfung dieser Frage an Herzfibroblasten kommt Heubner²⁴⁾ zu dem Ergebnis, daß für Histamin, Ouabain und Kupfersalze eine solche nicht vorhanden ist. Wahrscheinlich wird eine Förderung des Wachstums bei solchen Substanzen vorhanden sein, die an sich für das Wachstum notwendig sind und sich zu den im Nährmedium vorhandenen addieren²⁵⁾.

¹⁷⁾ S. hierzu Abderhalden, Med. Klinik 18, 487 [1940].

¹⁸⁾ Waldschmidt-Leitz, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 262, IV [1940]; Herken u. Erleben, ebenda 264, 251 [1940]; Bayerle, ebenda 264, 189 [1940]; M. Bergmann, J. biol. Chemistry 132, 467 [1940]; Abderhalden u. Caesar, Fermentforsch. 18, 299 [1940].

¹⁹⁾ Waldschmidt-Leitz, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 263, I [1940].

²⁰⁾ Rites, Naturwiss. 27, 505 [1939].

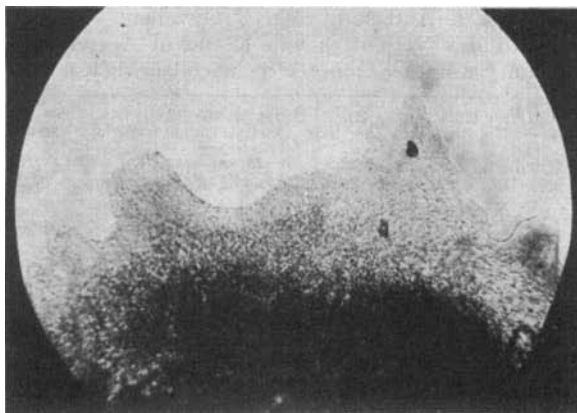
²¹⁾ Arch. exp. Zellforsch. 22, 305 [1939].

²²⁾ Ebenda 18, 411 [1939]. S. u. Schairer, Z. Krebsforsch. 50, 143 [1940].

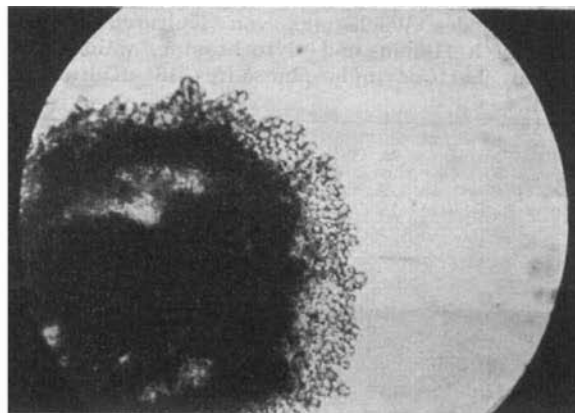
²³⁾ Ebenda 22, 317 [1939].

²⁴⁾ Nannyn-Schmielebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 104, 78 [1939].

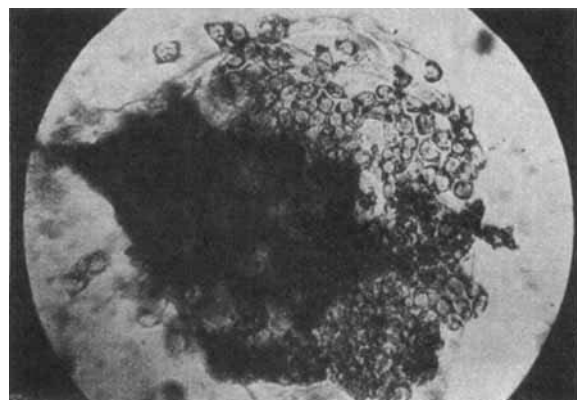
Abb. 5. Ehrlichsches Mäusecarcinom. Vergrößerung 48fach.



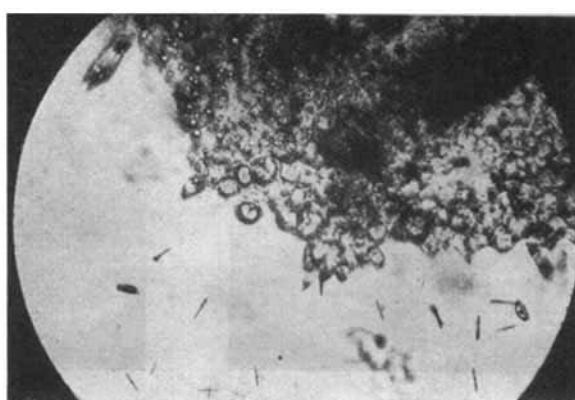
a) In normalem Nährmedium.



b) Zusatz von 25 γ/cm^3 5,6-Benzo-9-n-butylflavin.



c) Wie b.



d) Wie b.

Tabelle 1.

Zusammenstellung einiger Substanzen, deren Wirkung auf die Krebszelle in vitro untersucht wurde.

Kollidale Metalle: Magnesium, Zink, Eisen, Kobalt, Nickel, Blei, Gold, Uran²⁵⁾, Kaliumchlorid, Calciumchlorid²⁶⁾, Magnesiumchlorid²⁷⁾, Kaliumcyanid²⁸⁾, Natriumfluorid²⁹⁾, Kalium- und Rubidiumseleat³⁰⁾, Alkali- und Magnesium-vanadochromate³¹⁾, Kongorot und Salze³²⁾, Malachitgrün, Derivate und Salze³³⁾, Fluorescein und Derivate³⁴⁾, Methylenblau³⁵⁾, Phenol, Trikresol, Zephirol, Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Benzylester der p-Oxybenzoesäure³⁶⁾, Äthylurethan, Methylsulfont, Auramin, Natriumkakodylat, Colchicin³⁷⁾, Bromessigsäure, Jodessigsäure³⁸⁾, Oxydationsprodukte des Cholesterins und Salze³⁹⁾, Cholesterin⁴⁰⁾, Bestrahltes Lecithin, Lecithin und Farbstoffe⁴¹⁾, Reiskleienöl und Fraktionen⁴²⁾, Chininsalze⁴³⁾, Filocarpin, Adrenalin⁴⁴⁾, Kobragift⁴⁵⁾, Gift von *Bothrops jararaca*⁴⁶⁾, „Antikrebsmittel“⁴⁷⁾.

Welchen Wert haben nun die an der Gewebekultur gefundenen Wirkungen einer Substanz für eine etwaige chemotherapeutische Anwendung, wie lassen sie sich zunächst auf das Tierexperiment übertragen? In Tab. 2 sind einige Werte angegeben, die die schädigende Konzentration einiger Flavine bei der Einwirkung auf die Zelle des Ehrlichschen Mäusecarcinoms und andere Eigenschaften darstellen. Z. B. wirkt das 9-Phenylflavin mit 15 γ/cm^3 in der Gewebekultur schädigend. Den Quotienten γ/cm^3 kann man praktisch mit der Giftdosis mg/kg gleichsetzen, die für 9-Phenylflavin bei 17 mg/kg liegt⁴⁸⁾. Da Giftigkeit an der Maus und an der Krebszelle übereinstimmen, kann das 9-Phenylflavin für eine Beeinflussung des Tumorstadiums im Tier nicht in Frage kommen. Es ist nun weiter zu fragen, ob die in der Gewebekultur ermittelte Konzentration nicht nur im Tier überhaupt, sondern speziell in der Umgebung des Tumors oder im Tumor erreicht werden kann. Diese Frage ist für die bisher untersuchten Flavine zu verneinen; von diesen beeinflusst keines bei tumorferner Injektion das Wachstum eines Impftumors nennenswert, lediglich bei direkter Einführung in den Tumor kann eine Hemmung des Wachstums festgestellt werden.

Die Konzentration einer Substanz im Tumor wird einmal bestimmt durch die Versorgung des Tumors mit den Körperflüssigkeiten, zum anderen durch die Fähigkeit der Substanz, in die Gewebe einzudringen, durch ihre Verteilung im Organismus und durch ihre Ausscheidungsform, also Eigenschaften, die zu den an der Gewebekultur festgestellten als neue unabhängige Eigenschaften hinzutreten und den Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Substanzen erschweren.

Diese Schwierigkeiten kann man umgehen, wenn man eine besondere Vermehrungsform des Ehrlichschen Mäusecarcinoms, den Ascitestumor⁴⁹⁾, heranzieht. Bei diesem werden die Krebszellen in die Bauchhöhle injiziert, in der sie sich rasch vermehren, während gleichzeitig die Bauchhöhle mit einer serösen Flüssigkeit erfüllt wird. Diese Wachstumsform ähnelt in ihren Bedingungen am ehesten den Verhältnissen der Gewebekultur: ein abgeschlossener Raum und ein Nährmedium, in dem die Krebszellen wachsen. Durch intraperitoneale Injektion kann man die zu untersuchenden Substanzen in unmittelbare Berührung mit den Krebszellen

bringen und so ihre Einwirkung studieren. Parallel mit der Vermehrung der Krebszellen in der Bauchhöhle läuft die Zunahme der Ascitesflüssigkeit, die so stark ist, daß sie die Gewichtskurve der Tiere stark verändert und deren Verlauf einen Maßstab für die Vermehrung der Tumorzellen abgibt.

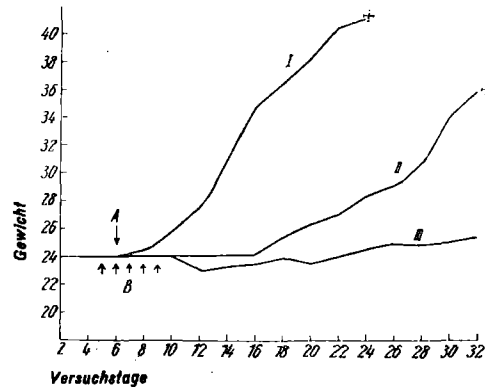


Abb. 6. Gewichtskurve von Mäusen.

- I Mit Ascitestumorfürflüssigkeit gespritzt.
- II Mit Ascitestumorfürflüssigkeit und mit 5,6-Benzo-9-phenyl-flavin gespritzt.
- III Mit 5,6-Benzo-9-phenyl-flavin gespritzt.

In Abb. 6 ist in Kurve I die durchschnittliche Gewichtskurve von 5 Mäusen dargestellt, die bei A mit Ascitestumorfürflüssigkeit intraperitoneal gespritzt wurden. Der Anstieg des Gewichts erreicht die Hälfte des ursprünglichen Körpergewichts; nach Überschreiten eines Maximalwertes geht dem Tode der Tiere meist ein Absinken des Gewichts voraus. Kurve III stellt die Gewichtskurve von Mäusen dar, die bei B mit je 1 mg 5,6-Benzo-9-phenyl-flavin intraperitoneal gespritzt wurden. Dieser Vorgang hat auf die Gewichtskurve keinen nennenswerten Einfluß. Kurve II schließlich ist die Gewichtskurve von Mäusen, die bei A mit Ascitestumor und bei B mit den gleichen Mengen des Flavins wie bei III intraperitoneal gespritzt wurden. Gegenüber Kurve I ergibt sich eine deutliche Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit. Geringere Mengen des Flavins hemmen weniger, größere stärker; andere Substanzen hemmen das Wachstum nicht oder fördern es.

Entgegen den Angaben über eine Chemoresistenz⁴⁸⁾ des Ascitestumors erscheint dieser geeignet, die Brücke zwischen den Versuchen an der Gewebekultur und einer Beeinflussung des Tumorstadiums am Tier zu schlagen. Wenn man die vorhandenen Testobjekte in einer Reihe ordnet, so kommt man zu einer Skala, die annähernd dem Empfindlichkeitsgrad entspricht: 1. Gewebekultur der Krebszelle, 2. Ascitestumor, 3. Expansiv wachsende⁴⁹⁾ Impftumoren (z. B. Ehrlichsches Mäusecarcinom, Jensen-Sarkom der Ratte), 4. Metastasierende⁴⁹⁾ Impftumoren (Brown-Pearce-Tumor des Kaninchens, 5. Spontan- und Reiz- (etwa Benzpyren-) Tumoren. In der Gewebekultur liegt also die schwächste Position der zu beeinflussenden Krebszelle vor, von der aus man eine Substanz an den anderen Testobjekten erproben muß.

Tabelle 2.

Einwirkung einiger Flavine auf die Zelle des Ehrlichschen Mäusecarcinoms.

	Giftigkeit an der Maus in mg/kg	Schädigung der Gewebekultur	Ascitestumor	Impftumor
Lactoflavin	340 ungiftig	100 γ/cm^3	1 mg tägl. keine Hemmung	keine Hemmung
5,6-Benzo-9-phenyl-flavin	350 ungiftig	15 γ/cm^3	1 mg tägl. Hemmung	keine Hemmung
9-Phenyl-flavin	17 giftig	15 γ/cm^3	nicht prüfbar	nicht prüfbar

Es liegt im Wesen der Gewebezüchtung, daß sie nur eine unmittelbare Einwirkung auf die Krebszelle nachweisen kann, während sie bei Wirkungen, die auf dem Umwege über den Organismus erfolgen, versagen muß, also grundsätzlich den Tierversuch nicht ersetzen kann. Andererseits kann sie aber zur Klärung beitragen, ob ein Stoff mittelbar oder unmittelbar auf die Krebszelle einwirkt. Zwei Beispiele: Haddow⁵⁰⁾ stellte eine hemmende Wirkung von cancerogenen Kohlenwasserstoffen auf die Entwicklung von Impftumoren fest,

²⁵⁾ Roffo, Bol. Inst. Med. exp. Estud. Tratamiento Cáncer (im folgenden als Bol. bezeichnet) 15, 855 [1938].
²⁶⁾ Roffo, ebenda 1, 307, 537 [1925].
²⁷⁾ Roffo u. Thomas: La chimie du cancer, Paris 1933, S. 65; Shear, Amer. J. Cancer 18, 924 [1933].
²⁸⁾ Németh, Arch. exp. Zellforsch. 8, 177 [1929].
²⁹⁾ Lustig u. Werber, Z. Krebsforsch. 43, 364 [1936].
³⁰⁾ Roffo, Bol. 1, 847 [1925].
³¹⁾ Roffo u. Calcagno, Bol. 8, 108 [1931]; Z. Krebsforsch. 46, Ref. 171 [1937].
³²⁾ Dieselben, ebenda 34, 1 [1931].
³³⁾ Dieselben, Ann. Physiol. Physiochim. Biol. 6, 608 [1932].
³⁴⁾ Dieselben, Bol. 9, 60 [1932].
³⁵⁾ Roffo, Z. Krebsforsch. 32, Ref. 70 [1930].
³⁶⁾ Kronowski, ebenda 34, 457 [1932].
³⁷⁾ Roffo u. Calcagno, Bol. 11, 470 [1934].
³⁸⁾ Roffo, Bol. 3, 55 [1927].
³⁹⁾ Roffo, Arch. exp. Zellforsch. 20, 1 [1937]; Tokumitsu, Z. Krebsforsch. 45, Ref. 296 [1937].
⁴⁰⁾ Morigami, Chem. Ztbl. 1940, I 1510.
⁴¹⁾ Vollmar, Arb. staatl. Inst. exp. Therap. Forschungsinst. Chemotherap. Frankfurt a. M. 25, 184 [1931].
⁴²⁾ Baroni, O. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 101, 885 [1929].
⁴³⁾ Levaditi, ebenda 74, 1305, 1379 [1913].
⁴⁴⁾ Lustig u. Werber, Z. Krebsforsch. 43, 359 [1936].
⁴⁵⁾ Amer. J. Cancer 33, 560 [1938].
⁴⁶⁾ R. Kuhn u. Boulanger, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 241, 233 [1936].
⁴⁷⁾ Z. Krebsforsch. 37, 439 [1932].

⁴⁸⁾ Z. Krebsforsch. 40, 298 [1934].
⁴⁹⁾ Domagk in Med. u. Chem. II, 62 [1934].
⁵⁰⁾ Nature, London 136, 868 [1935]; Proc. Roy. Soc., London, Ser. B 122, 442 [1937]; K. H. Bauer, Arch. klin. Chirurgie 189, 1 [1937].

zeigte aber später⁵¹⁾, daß diese Wirkung auf dem Umwege einer Schädigung des Wirtsorganismus erfolgt. In vitro haben die cancerogenen Kohlenwasserstoffe keine stark schädigende Wirkung auf die Krebszelle⁵²⁾. Andererseits werden Präparate von Vitamin F zur Carcinomtherapie empfohlen. In der Gewebekultur haben wir keinen schädigenden Einfluß dieser Präparate auf die Krebszelle gesehen. Ihre etwaige günstige Wirkung auf den Krebskranken dürfte daher in einer Anregung des Organismus, einer unterstützenden Wirkung zu sehen sein.

Zu einer analogen Fragestellung, der nach der mittelbaren oder unmittelbaren Wirkung cancerogener Stoffe, kann die Gewebezüchtung Stellung nehmen. Falls die Wirkung cancerogener Stoffe auf die normale Zelle unmittel-

bar ist, sollte es möglich sein, normale Zellen in vitro in Krebszellen zu verwandeln. Positiven Ergebnissen⁵³⁾ stehen hier negative⁵⁴⁾ gegenüber, so daß mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß der Organismus an der malignen Entartung von Körperzellen unter der Einwirkung cancerogener Stoffe in irgendeiner Weise teilnimmt.

In diesem kurzen Überblick sollte auf einige Punkte hingewiesen werden, in denen die Gewebezüchtung für die chemische Krebsforschung nutzbar gemacht werden kann. Nicht eingegangen wurde auf die Stoffwechseluntersuchungen an Gewebekulturen, die eine weitere aufschlußreiche Methodik für die Untersuchung der Beeinflussung des Tumorstwachstums darstellen.

Eingeg. 13. Juni 1940. [A. 67.]

⁵¹⁾ Proc. Roy. Soc., London, Ser. B **122**, 477 [1937]; **127**, 277 [1939]; *Racci u. Gammel*, Z. Krebsforsch. **48**, 355 [1939].

⁵²⁾ S. ⁵³⁾ und *Graffi*, ebenda **49**, 477 [1939].

⁵³⁾ Literatur s. *Mauer*, Arch. exp. Zellforsch. **21**, 191 [1938]; *K. H. Bauer*, Arch. klin. Onkurgie **189**, 1 [1937].

⁵⁴⁾ *Larinow*, Z. Krebsforsch. **43**, Ref. 375 [1939]; *Earle u. Voegtlin*, Amer. J. Cancer **34**, 373 [1936]; *Morigami*, Chem. Ztbl. **1940**, I, 1081.

Das Carcinom vom Standpunkt des Gewerbetoxikologen

Von Prof. Dr. E. GROSS

Gewerbehygienisches I. G.-Laboratorium (I. G. Farbenindustrie A.-G., Wuppertal-E.)

Während man bei den meisten Krebsfällen bezüglich der Ätiologie noch völlig im Dunkeln tappt oder über mehr oder weniger gut begründete Vermutungen noch nicht hinausgekommen ist, gibt es eine verhältnismäßig kleine Gruppe von Carcinomen, bei denen wir mit ziemlicher Eindeutigkeit auf bestimmte ursächliche Momente hingeführt werden, die bei der Entstehung dieser Krankheiten von maßgebender, wenn vielleicht auch nicht alleiniger Bedeutung sind. Das ist der Berufskrebs, bei dem der ursächliche Zusammenhang zwischen beruflicher Tätigkeit und Auftreten der Erkrankung auf Grund ärztlicher Erfahrungen und statistischer Feststellungen, teilweise auch an Hand tierexperimenteller Forschungen, mehr oder weniger deutlich in die Erscheinung tritt.

Will man sich über die zahlenmäßige Bedeutung des Berufskrebses einen Überblick verschaffen, so hat man sich zuvor der Häufigkeit des Krebses i. allg. zu vergewissern. Das ist nur in großen Zügen möglich. Ein wesentliches Hindernis, zu einem wirklich einwandfreien statistischen Zahlenmaterial zu gelangen, liegt in dem Fehlen einer allgemeinen Meldepflicht für Krebserkrankungen, wie sie z. B. für gewisse Infektionskrankheiten besteht. Die auch in Deutschland gebräuchliche internationale Todesursachenstatistik verzeichnet für unser Vaterland in den letzten Jahren jeweils ~ 100 000 Krebssterbefälle (Krebs und andere Neubildungen). Es herrscht kein Zweifel darüber, daß diese Zahl recht ungenau ist, denn die Feststellung der Todesursache ist besonders beim Krebs, soweit ein Obduktionsbefund fehlt, auch heute oft noch ungenügend. Sicher ist, daß unter den ~ 70 000 unter „Altersschwäche“ jährlich registrierten Todesfällen noch zahlreiche unerkannt gebliebene Krebsfälle anzunehmen sind. Damit stünde der Krebs heute als Todesursache wohl an erster, zum mindesten aber hinter den Krankheiten der Kreislauforgane (~ 130 000 Todesfälle jährlich) an zweiter Stelle. Man nimmt gegenwärtig allgemein an, daß mehr als 10% aller Menschen, die das 20. Lebensjahr überschritten haben, später an Krebs sterben. In absoluten Zahlen gerechnet hat die Krebssterblichkeit in den letzten Jahrzehnten bei uns, wie wohl auch in den meisten anderen Ländern, stark zugenommen. Nach *Stupening*¹⁾ stand der Krebs in Deutschland 1910 noch an 9. Stelle unter den Todesursachen, 1928 an 3. Stelle und 1936 schon an 2. Stelle. Im Jahre 1890 wurden im Altreich ~ 29 000 Krebstodesfälle, 1935 schon ~ 93 000 verzeichnet. Das Ansteigen der Krebszahlen mag z. T. darauf zurückzuführen sein, daß es uns heute besser als ehemals, wenn auch noch nicht mit befriedigender Sicherheit, möglich ist, den Krebs am Lebenden oder Toten statistisch festzustellen. Über die Frage, ob die Zunahme des Krebses nicht einfach eine Folge des zunehmenden durchschnittlichen Lebensalters der Bevölkerung ist, wird noch heftig debattiert. Der Krebs entsteht ja — wenigstens in der überwiegenden Zahl — im reiferen Alter. Da nun heutzutage mehr alte Leute leben als in früheren Jahrzehnten, so gibt es auch mehr Krebsfälle, und andere

Krankheiten treten dafür, relativ gesehen, zurück. Unter Berücksichtigung der zunehmenden Überalterung der Bevölkerung braucht nach dieser Theorie die Wahrscheinlichkeit für den einzelnen, an Krebs zu erkranken oder zu sterben, nicht größer zu sein, als in früheren Zeiten. Immerhin ist nach *Hecker*²⁾ beim Vergleich der wirklichen und rechnerisch im Versicherungswesen erwarteten Sterblichkeit eine erhebliche Zunahme des Krebses in den letzten Jahrzehnten zu erkennen.

Eine Art von Krebs, der Lungenkrebs, nimmt anscheinend in der ganzen Welt in erschreckendem Maße zu. Während nach *Dormanns*³⁾ das Verhältnis zwischen dem überhaupt häufigsten Krebs, dem Magenkrebs, zum Lungenkrebs 1920/21 noch 1000:118 war, betrug dieses im Durchschnitt der Jahre 1925/33 schon 1000:232. Das bedeutet also eine relative Zunahme um mehr als das Doppelte in so kurzer Zeit. Man hat hier an die verschiedensten ursächlichen Möglichkeiten gedacht. So hat man den teerhaltigen Straßenstaub, die Auspuffgase der Motoren, die Kampfgase des Weltkrieges, den Tabakrauch, die Grippe der Nachkriegsjahre und manches andere mehr beschuldigt. Eine befriedigende Erklärung für die Zunahme des Lungenkrebses, dem 2 1/2 mal mehr Männer als Frauen zum Opfer fallen, hat sich aber bislang nicht erbringen lassen. Die relativ geringe Zahl beruflicher Lungenkrebse, bei denen wir die Ursache in gewissem Maße kennen, kann — das sei hier vorweg gesagt — die Allgem. Statistik nicht merklich beeinflussen.

Nach der anatomischen Lokalisation bisher bekannter beruflicher Krebsarten unterscheidet man Hautkrebs, Lungenkrebs, Blasenkrebs und Knochenkrebs; nach dem ätiologischen Prinzip den Berufskrebs durch strahlende Energien, den Teerkrebs, den Berufskrebs durch besondere chemische Gifte: Arsen, Anilin und andere aromatische Basen, Asbeststaub und Chromat. Diese Gruppeneinteilung erhebt allerdings keinen Anspruch auf Vollkommenheit, sondern soll rein praktischen Zwecken dienen.

Den Krebs durch parasitäre Gifte, wie er bei der Bilharziosis, einer in Ägypten verbreiteten Wurmkrankheit, durch Eiablage besonders in der Harnblasenschleimhaut in ~ 5% der Erkrankungsfälle vorkommt⁴⁾ oder wie ihn *Askanazy*⁵⁾ 1900 als Gallengangkrebs beschrieb, der besonders bei Fischern des Kurischen Haffs durch Infektion mit dem Egel *Opisthorchis felinus* nach Genuß von rohem Fischfleisch auftritt, wollen wir hier nur kurz erwähnen. Diese Krebse sind nur insofern als Berufskrebse aufzufassen, als sie vornehmlich bei Fellachen des Niltales, die beruflich heute noch wie vor Jahrtausenden barfuß im Schlamm waten und sich dabei immer wieder mit dem durch die Haut dringenden Wurm infizieren, bzw. bei gewissen Fischern infolge der unhygienischen Ernährungsweise vorkommen.

¹⁾ *Machr. Krebsbekämpfung* **1939**, 153.

²⁾ Z. Krebsforsch. **45**, 471 [1937].

³⁾ *Ibrahim Pascha*, *Alt. Soc. int. d. Chir.*, X. Congr., Verhandl. III, 475 [1936].

⁴⁾ *Schweiz. med. Wschr.* **12**, 289 [1931].