

Die Versuchsergebnisse führen uns zu folgenden Schlussfolgerungen: Zur Entstehung der Fettinfiltration der Leber nach Bestrahlung ist das Vorhandensein von wenigstens einem kleinen Teil der Nebennierenrinde notwendig, was schon früher mit Rücksicht auf die Wirkung von verschiedenen Noxen⁶ festgestellt wurde. Zugabe von Cortison kann die Nebennierenrindentätigkeit ersetzen, wie dies auch bei der Fettinfiltration der Leber durch Alkoholvergiftung der Fall ist⁷.

Wir kommen deshalb zur Ansicht, dass die Nebennierenrinde mit ihren Hormonen im Fall der Fettinfiltration nach Bestrahlung nur die Rolle eines Vermittlers spielt, welche metabolische Wege zur Fettvermehrung in der Leber aus anderen Gründen ermöglicht. Nach unseren Versuchen ist es nicht möglich, die Verfettung der Leber als Folge der Störung der Nebennierenrindenfunktion durch Bestrahlung aufzufassen.

M. SKALKA

Biophysikalisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Brno, 14. Oktober 1958.

Summary

The presence of adrenals is necessary for the genesis of the fatty liver damage in the second week after the total-body X-irradiation. Cortison in moderate daily doses is capable of replacing this function of the adrenals in adrenalectomized mice.

⁶ E. M. MACKEY und H. O. CARNE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **38**, 131 (1938). – F. VERZÁR und L. LASZT, *Biochem. Z.* **288**, 356 (1936).

⁷ S. MALLOW und J. L. BLOCH, *Amcr. J. Physiol.* **164**, 29 (1956).

Die Infektiosität des Ribonukleinsäureanteils von Maul- und Klauenseuche-Virus

Nachdem es im Jahre 1956 GIERER und SCHRAMM^{1,2} sowie 1957 FRAENKEL-CONRAT, SINGER und WILLIAMS³ gelungen war, das Virus der Tabakmosaikkrankheit in infektiöse Ribonukleinsäure (RNS) und einen apathogenen Proteinanteil zu trennen, ist in kurzer Aufeinanderfolge auch über die Gewinnung von infektiöser RNS aus verschiedenen tierpathogenen Viren berichtet worden^{4,5}.

So haben BROWN, SELLERS und STEWART DOREEN⁶ vor kurzem aus dem Maul- und Klauenseuche-Virus (MKS) RNS-Präparate erhalten können, die sich für die säugende Maus und für Kulturen von Schweinenieren-Zellen als infektiös erwiesen.

Ganz analoge Versuche sind von uns unternommen worden, nachdem es sich gezeigt hatte, dass für die Aufteilung in RNS-Anteil und Protein von verhältnismässig wenig gereinigten Viren ausgegangen werden kann^{4,5}.

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung infektiöser RNS aus MKS-Virus benützten wir Zungenaphthen von künstlich mit MKS-Virus infizierten Rindern. Zur Infektion der Rinder waren die Stämme Spanien II (0-Typ),

Eystrup (A-Typ) und Tözl (C-Typ) verwendet worden. Es kamen sowohl frisch gewonnene Zungenaphthen als auch solche, die während 9 Monaten bei -40° aufbewahrt worden waren, zur Verwendung. Die Virus enthaltenden Zungenepithelien wurden mechanisch fein zerkleinert und hierauf mit 0,02 M Phosphat-Puffer (pH 7,5–7,6) im Verhältnis 1:4 aufgenommen, anschliessend 30 min bei 8000 T/min zentrifugiert. Die so gewonnene Virussuspension wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform durch kräftiges mechanisches Rühren homogenisiert, anschliessend zentrifugiert, abdekantiert und die überstehende Lösung während 24 h bei $+4^{\circ}$ aufbewahrt.

Die Gewinnung infektiöser RNS aus dieser Virussuspension geschah sodann mit der Phenolmethode nach GIERER und SCHRAMM^{1,2}.

Der RNS-Anteil aller 3 Virustypen (0, A und C) erwies sich sowohl auf Rind wie auf Meerschweinchen als infektiös. Das in diesen Tieren gebildete Virus liess sich in Passagen weiterzüchten und zeigte jedesmal typenspezifisch an (Komplementbindungsreaktion).

Der absolute Beweis des Fehlens von restlichen Viruspartikeln in unseren RNS-Präparaten konnte noch nicht erbracht werden. (In jedem Versuch wurden 3–5 Phenol-extraktionen und anschliessend 4–5 Ätherextraktionen ausgeführt.)

Immerhin deuten folgende Prüfungen auf das Fehlen von komplettem Virus in unseren infektiösen RNS-Lösungen hin:

1. Nach Behandlung mit Ribonuklease in einer Konzentration von 10–20 μ g pro ml verliert der RNS-Anteil vollständig seine Infektiosität (Kontaktzeit 15 min bei $+4^{\circ}$). Eine Viruskontrollsuspension, die sogar auf 10^{-4} verdünnt worden war, behielt unter gleichen Bedingungen ihre Infektiosität vollständig bei.

2. Erwärmung während 30 min auf 37° vernichtet die Aktivität der RNS. Eine Viruskontrollsuspension (Verdünnung 10^{-4}) zeigte unter gleichen Bedingungen keine Einbusse der Infektiosität.

3. Die RNS-Lösungen verlieren ihre Wirksamkeit sehr rasch. Eine Lösung erwies sich nach 4 Tagen bei -4° nicht mehr als infektiös. Eine weitere RNS-Lösung zeigte schon nach 48 h bei $+4^{\circ}$ keine Wirksamkeit mehr. Nach 24 h bei $+4^{\circ}$ erwies sich ein RNS-Präparat noch als infektiös, jedoch in erheblich reduziertem Masse. Suspensionen von komplettem Virus der MKS bleiben auch in starken Verdünnungen bei obigen Temperaturen und in gleichen Zeitintervallen noch stark infektiös.

V. SPUHLER

Eidg. Veterinäramt, Bern, und Eidg. Vakzine-Institut, Basel, 29. Dezember 1958.

Summary

Using the phenol method described by GIERER and SCHRAMM, preparations of infective ribonucleic acid were prepared from tongue tissues of cattle infected with the virus of foot-and-mouth disease.

Induction of Lactation

in Precancerous Hyperplastic Alveolar Nodules in the Mammary Gland of C3H/He Crgl Mice

The hyperplastic alveolar nodule in the mammary gland of the C3H/He Crgl mouse is a precancerous lesion that is morphologically indistinguishable from a normal

¹ A. GIERER und G. SCHRAMM, *Nature* **177**, 702 (1956).

² A. GIERER und G. SCHRAMM, *Z. Naturforsch.* **11b**, 138 (1956).

³ H. FRAENKEL-CONRAT, B. SINGER und R. C. WILLIAMS, *Biochim. biophys. Acta* **25**, 87 (1957).

⁴ J. S. COLTER, *Progr. med. Virol.*, vol. 1 (Karger, Basel/New York 1958), p. 1–35.

⁵ E. WECKER und W. SCHÄFER, *Z. Naturforsch.* **12b**, 415 (1957).

⁶ F. BROWN, R. F. SELLERS, and DOREEN L. STEWART, *Nature* **182**, 535 (1958).

lobule of prelactating alveoli characteristic of the mammary gland of pregnancy¹. However, the nodule is distinct from the normal lobule in its possession of large numbers of virus-like particles² and in its hormonal sensitivity^{3,4}. The nodule in a pregnant mouse will lactate prematurely.

Two kinds of experiments have been conducted on adult multiparous tumor-bearing mice whose mammary glands contain numerous hyperplastic nodules, in order to examine the reactivity of the nodules to hormones. In the first series of experiments, intact mice were subjected to month-long treatment with (a) 3–4 mg pellet of estradiol-17 β implanted subcutaneously, (b) 1 mg progesterone and 2.5 μ g estradiol injected daily, (c) 0.25 mg cortisol acetate injected daily, (d) 0.25 mg desoxycorticosterone acetate injected daily, (e) 1 mg testosterone injected daily. Groups of 10–20 mice were employed, and the mammary glands were compared before fixation and after preparation as whole-mounts stained with hematoxylin, with those of untreated controls.

All treatments employed resulted in a degree of stimulation of at least some hyperplastic nodules. Nodules underwent significant hypertrophy as a result of administration of estrogen, estrogen with progesterone, and cortisol; individual alveoli became dilated with secretion. Lactogenesis was evident in many nodules after cortisol treatment (Fig. B), in parts of some nodules after estrogen (Fig. C), but not at all after administration of both ovarian steroids (which induced extensive lobuloalveolar development throughout the entire mammary apparatus) (Fig. D). All nodules were stimulated (as judged by alveolar size) by the ovarian steroids; however, semi-regressed nodules were found adjacent to considerably hypertrophied nodules after cortisol treatment. In two of the 10 androgen-treated mice, some nodules with milk were seen; however, stained preparations revealed only occasional evidence of nodule stimulation, and some nodules had obviously partly regressed. No milk secretion, moderate stimulation of some nodules, and partial regression of others occurred after desoxycorticosterone administration. Nodules in untreated control mice (Fig. A) may occasionally show an alveolus or two with milky-appearing secretion. It should be emphasized that detection of milk formation was possible only by examination of fresh material; it has not proven feasible to decide from the stained whole-mounts alone whether or not the intense secretory activity evident in some nodules is accompanied by milk formation.

NANDI⁵ has shown that properly prepared mammary glands in hypophysectomized-ovariectomized-adrenalectomized female C3H/He mice can be made to lactate by administration of cortisol along with either ovine mammotropin or bovine somatotropin (purified pituitary hormones generously provided by Professor C. H. LI). If the nodule be considered as a lobule of prelactational alveoli in a non-pregnant mouse approximately equivalent to its normal counterpart in pregnancy^{1,6}, one might expect that lactogenic hormonal combinations would result in

milk formation. In a second series of experiments, small groups (3 to 9) of multiparous tumor-bearing mice were hypophysectomized, ovariectomized and adrenalectomized. In the absence of replacement therapy, the nodules, as well as the normal gland, will regress, and alveoli are not detectable after 21–30 days³. A 'ghost' of the nodule can often be found, consisting of its atrophic terminal duct system.

When 125 μ g cortisol acetate are given along with 1 mg of mammotropin or somatotropin daily immediately after the triple operation, most of the recognizable alveolar nodules are found to be lactating 21 days later (Fig. E–G). As is the case with normal lobules in the C3H/He Crgl mouse⁶, somatotropin is as effective as mammotropin in inducing lactogenesis in alveolar nodules (Fig. F). If the protein hormone dosage is reduced to 100 μ g daily, full lactation is seen in only a few nodules and in parts of other nodules. Many nodules are clearly milk-free. If 250 μ g desoxycorticosterone acetate are used daily with 1 mg somatotropin (but not mammotropin), a few nodules are found to be partially lactating; the overall picture resembles that seen after cortisol and the 100 μ g protein hormone treatment. Nodules are thus seen to show a spectrum of sensitivity to various lactogenic combinations, and in the case of desoxycorticosterone and somatotropin, to respond to a combination that does not result in lactogenesis in normal prelactating C3H/He mouse tissue⁵.

It can be postulated that the lactogenic effect of certain steroids (estradiol and testosterone) in intact mice results from the release of a pituitary factor, presumably mammotropin, that then acts in the presence of adequate endogenous corticosteroid. It is also possible that estrogen may result in increased corticoid secretion by triggering ACTH release⁷. The lactogenic effect of cortisol may be ascribed to its direct action in the presence of endogenous mammotropin and/or somatotropin^{4,5}. The failure to observe lactation after estrogen and progesterone in intact mice, despite extensive general lobuloalveolar development, may indicate an inhibition of mammotropin release by progesterone or some effect mediated by the adrenal cortex.

The hyperplastic alveolar nodule represents a special test area for lactogenic combinations. In intact mice, the nodules not only lactate normally during pregnancy and *post partum*, but can be induced to lactate most effectively by the lactational triad of mammotropin, somatotropin, and cortisol that LYONS and LI and their collaborators have found most effective in the Long-Evans rat⁸. It is proving possible to construct a kind of hormonal 'sieve' by using graded doses of lactogenic hormones and thus to arrive at a picture of differential nodule sensitivity. We are presently concerned with the determination of the relationship between the hormonal sensitivity of nodules and their predisposition to neoplasia, by employing a combination of graded hormonal stimuli and subsequent transplantation in accordance with a technique recently developed in our laboratory by DEOME and FAULKIN.

This work was aided by grants (MOR-27 and E-11) from the American Cancer Society and by University of California cancer research funds. We are indebted to Dr. G. K. HAWKINS of Schering Corporation, Bloomfield, New Jersey, for the estradiol, progesterone, desoxycorticosterone acetate and testosterone, and to Dr. J. R. BEEM of Merck, Sharp and Dohme, West Point, Pennsylvania, for the cortisol acetate.

H. A. BERN, S. NANDI, and V. FINSTER

¹ M. N. HARKNESS, H. A. BERN, M. ALFERT, and N. O. GOLDSTEIN, *J. Nat. Cancer Inst.* 19, 1023 (1957).

² D. R. PITEKKA, H. A. BERN, K. B. DEOME, C. N. SCHOOLEY, and S. R. WELLINGS, *J. Nat. Cancer Inst.* 20, 541 (1958).

³ H. A. BERN, S. NANDI, and K. B. DEOME, *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 2, 187 (1957).

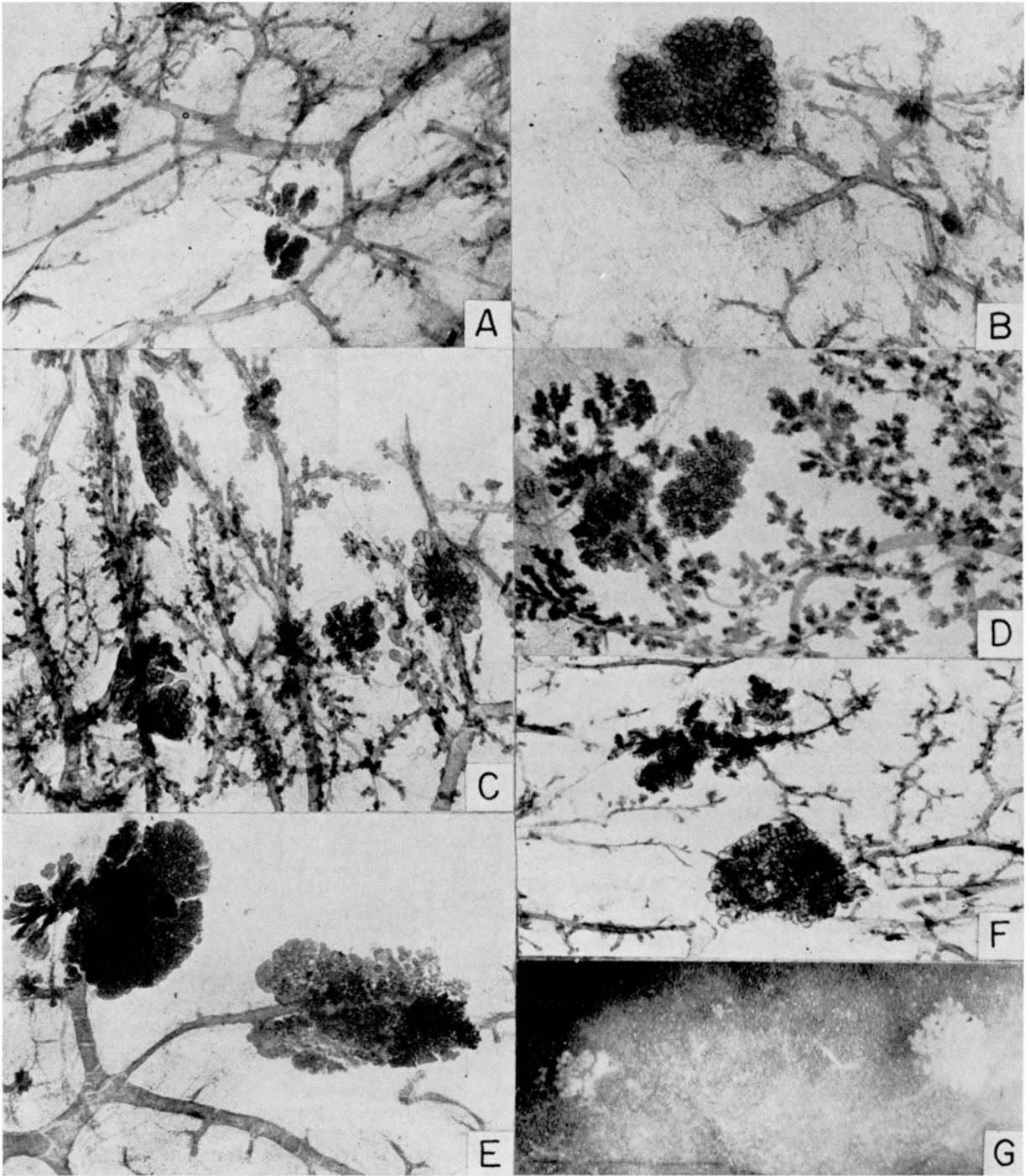
⁴ J. J. ELIAS, *Science* 126, 842 (1957). – J. J. ELIAS and E. RIVERA, *Cancer Research*, in press (1959).

⁵ S. NANDI, *Univ. Calif. Pubs. Zool.*, in press (1959); *J. Nat. Cancer Inst.*, in press (1958); *Science* 28, 772 (1958).

⁶ H. A. BERN, K. B. DEOME, M. ALFERT, and D. R. PITEKKA, *Proc. II. Internat. Symp. on Mammary Cancer*, Perugia (1958).

⁷ C. A. GEMZELL, *Acta endocrinol.* 11, 221 (1952).

⁸ W. R. LYONS, C. H. LI, and R. E. JOHNSON, *Recent Progr. Hormone Res.* 14, 219 (1958).



Hyperplastic alveolar nodules in mammary glands of variously treated multiparous female C3H/He Crg1 mice. *A-F* are whole-freshly fixed material, $\times 10$; *G* was photographed from pregnant mouse; *B*, from cortisol-treated intact mouse (lactating nodules); *C*, from estrogen-treated intact mouse (partially lactating nodules); *D*, from estrogen + progesterone-treated intact mouse (non-lactating nodules); *E* and *G*, from hypophysectomized-ovari-

ectomized-adrenalectomized mouse treated with 1 mg mammotropin and 125 μg cortisol daily (lactating nodules); *F*, from hypophysectomized-ovariectomized-adrenalectomized mouse treated with 1 mg somatotropin and 125 μg cortisol daily (lactating nodules).

Department of Zoology and its Cancer Research Genetics Laboratory, University of California, Berkeley, September 17, 1958.

Résumé

La sécrétion lactée se produit dans les nodules alvéolaires hyperplastiques de la glande mammaire des souris

femelles intactes de la souche C3H/He Crg1, à la suite de l'administration du cortisol et de l'œstradiol, mais non pas après l'emploi de l'œstrogène avec le progestérone. Lorsque l'hypophyse, l'ovaire et la glande surrénale ont été enlevés, les nodules montrent une sécrétion lactée sous l'effet du cortisol et de la mammothropine ou de la somatotropine et indiquent une sensibilité différentielle aux combinaisons hormonales lactogènes.