Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 1–2. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

La Leucose Bovine en France

Groupe d'Etude Comparée des Leucémies Humaine et Bovine (G. E. C. L. E.)* Paris, France

I—Constitution d'un Groupe de Travail Multidisciplinaire

P. DENOIX, H. GASSE et D. SCHWARTZ

Institut Gustave-Roussy, Villejuif (Seine), France
Service Vétérinaire du Ministère de l'Agriculture
Unité de Recherches Statistiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Villejuif (Seine), France

L'APPARITION en Europe, en Allemagne, et au Danemark notamment, [1–6] de véritables épizooties de leucose a, depuis quelques années, attiré l'attention sur cette maladie qui, autrefois, paraissait affecter assez rarement les bovidés.

La France ne devait pas être épargnée par l'apparente propagation de l'affection: des cas de plus en plus fréquents étaient signalés, si bien qu'au début de l'année 1964, le Ministère de l'Agriculture décidait de demander aux Services Vétérinaires départementaux de lui fournir un état annuel des leucoses bovines.

Le problème, d'autre part, intéressait les biologistes et les épidémiologistes. L'aspect épizootique du développement de la maladie faisait en effet songer à une origine virale; sa rapide extension fournissait un apport intéressant, sous l'angle de la pathologie comparée, à l'accroissement très important de la morbidité leucémique chez l'homme pendant la dernière décenries.

Il apparut dès lors souhaitable de créer un groupe de travail multidisciplinaire, de façon à pouvoir appréhender les divers aspects du problème et coordonner les recherches.

Le Groupe d'étude comparée des leucémies humaine et bovine (G.E.C.L.E.) fut constitué à la fin de l'année 1964*. Ses premiers objectifs furent, dans un premier temps, définis comme suit:

sur le *plan animal*, recueillir et analyser les données épidémiologiques sur la leucose bovine en France, réaliser des essais de mise en évidence d'un virus éventuel.

sur le *plan humain*, effectuer une enquête de morbidité détaillée dans certains départements, et une étude étiologique comparée des hémolymphopathies.

Les premiers résultats obtenus par le Groupe sont rapportés ci-après.

*Le G.E.C.L.E. comprend des représentants
—du Service Vétérinaire du Ministère de l'Agriculture (Directeur: H. Gasse): MM. Santamaria, Eychenne, Lucas.
—de l'Institut Gustave-Roussy (Directeur: Pr. P. Denoix): Mme F. Lacour (Unité d'Immunologie); MM. J. Huppert (Unité de Biologie moléculaire), J. Harel (Unité de Physiopathologie), R. Dechambre (Animalerie).
—de l'Unité de Recherches Statistiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Directeur: Pr. D. Schwartz): MM. P. Lazar, M. Hayat et P. Ducimetiére.
—de la Section Cancer de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Chef de Section: Dr. R. Flamant).
La liaison est assurée par P. Lazar, Institut Gustave-Roussy, Villejuif.

BIBLIOGRAPHIE

1. H. J. Bendixen, Preventive measures in cattle leukaemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **108,** 1241 (1963).
2. H. J. Bendixen, Leukosis enzootica bovis: principles of the epidemiologic investigations and preliminary results of the Public Control and Eradication Program in Denmark. *Bull. Off. int. Epiz.* **62,** 675 (1964).
3. R. Götze, G. Rosenberger et G. Ziegenhagen, Die Leukose des Rindes, ihre hamatologische und klinische Diagnose. *Mh. Vet-Med.* **9,** 517 (1954).
4. R. Götze, G. Rosenberger et G. Ziegenhagen, Über Ursachen und Bekämpfung der Rinderleukose. IV. Übertragbarkeit. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **63,** 105 (1956).
5. R. Götze, G. Rosenberger et G. Ziegenhagen, Über Ursachen und Bekämpfung der Rinderleukose. V. Übertragungswege und Bekämpfungsvorschlag. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **63,** 108 (1956).
6. A. Tolle, A. Rojahn et G. Hasse, Reihenuntersuchungen auf Rinderleukose in einem geschlossenen südniedersächsischen Gebiet. *Mh. Tierheilk.* **15,** 192 (1963).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 3–7. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

La Leucose Bovine en France (suite)

II—La Répartition Générale des Leucoses Bovines en France, en 1964 et 1965

P. LAZAR, J. SANTAMARIA et P. DUCIMETIERE*

Unité de Recherches Statistiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif (Seine), France
Service Vétérinaire du Ministère de l'Agriculture

L'OBJET de cette étude est de préciser la répartition géographique des leucoses bovines recensées par les directions départementales des Services Vétérinaires au cours des années 1964 et 1965.

1. MATERIEL ET METHODES

Il avait été demandé, en 1964, aux Directeurs des Services Vétérinaires départementaux, de dénombrer les cas de leucose bovine détectés dans les *abattoirs* publics ou industriels, en indiquant la race, le sexe, l'âge, et l'origine des animaux atteints. En 1965 (2ème semestre) une description sommaire des lésions et notamment des hypertrophies ganglionnaires importantes vint compléter les renseignements précédents. De plus l'enquête fut étendue aux cas de leucose décelés par l'ensemble des vétérinaires praticiens sur les *animaux vivants*. En cas de suspicion de leucose, une numération sanguine était effectuée; en cas d'hyperleucocytose (10.000 leucocytes pour les bovins de plus d'un an et 12.000 pour ceux de moins d'un an) un étalement de sang frais était adressé à l'Institut Gustave-Roussy, où le diagnostic était confirmé.

Dès la fin de 1964, il apparut que les leucoses paraissaient plus fréquentes dans certains départements. Un effort particulier fut demandé aux Directeurs des Services Vétérinaires de ces départements‡ et aux Vétérinaires inspecteurs d'abattoirs: lors de la découverte, à l'abattoir, d'une leucose, un *prélèvement* ganglionnaire ou tumoral devait être acheminé à l'Institut Gustave-Roussy pour examen-histologique des lésions.

Enfin, dans une région particulièrement frappée, on procéda à une étude détaillée de *l'entourage* des animaux atteints, notamment du point de vue hématologique. Des étables situées dans le voisinage des exploitations touchées par la leucose furent également examinées.

Les éléments de référence sur la répartition générale des bovins en France sont puisés dans "l'Etude sur la structure du troupeau bovin en 1963" publiée en mai 1965 par le Ministère de l'Agriculture. On a choisi de prendre comme "population bovine exposée au risque de leucose" *la totalité du troupeau bovin.* On aurait pu essayer de se limiter aux animaux adultes, c'est-à-dire essentiellement aux vahes. Mais, d'une part, la leucose ne frappe pas *que* des animaux adultes; d'autre part, le nombre de vaches par département est très étroitement lié au nombre total de bovins. Il nous a donc paru préférable de ne pas limiter la population de base: moyennant quoi, si les valeurs absolues des taux de leucose sont discutables, leur valeur

*Il s'agit des Directeurs des Services Vétérinaires des départements suivants: Aisne, Ardennes, Haute-Garonne, Tarn-et-Garonne, Gers, Gironde, Landes, Basses-Pyrenees, Hautes-Pyrenees; qu'ils soient ici remerciés de leur précieuse collaboration tant pour la mise au point de l'enquête que pour sa réalisation.

comparative, d'un département à l'autre, est satisfaisante.

2. RÉSULTATS

Le Tableau 1 donne, par département, la répartition du cheptel bovin au 1-1-63, le nombre de leucoses bovines en 1964 et en 1965, et les taux correspondants pour 100.000 bovins. La Fig. 1 complète ces données. Le nombre total de leucoses déclarées a été de 399 en 1964 et de 520 en 1965, les taux correspondants rapportés à l'ensemble du cheptel respectivement de 2,0 et 2,6 pour 100.000 bovins.

La Fig. 3 fournit la répartition communale

Tableau 1. *Répartition départementale du cheptel et des cas de leucose bovine en* 1964 *et* 1965. *Les leucoses ont été rapportées au département d'origine de l'animal, sauf dans quelques départements où l'on sait seulement que l'animal provient du département ou d'un département limitrophe. Elles ont alors été rapportées au département d'abattage. Les valeurs en question ont été marquées d'un astérisque*. Les taux ne sont donnés ici qu'à titre indicatif; ils sont d'une précision très différente selon que le cheptel est abondant ou rare; ils ne prennent de réel intérêt que dans la mesure où ils ont une valeur voisine dans toute une région*

Département	Cheptel	Nombre de leucoses		Taux pour. 100.000 bov.		Département	Cheptel	Nombre de leucoses		Taux pour 100.000 bov.	
	(milliers)	1964	1965	1964	1965		(milliers)	1964	1965	1964	1964
Ain	225	3	3	1,3	1,3	Lot & Garonre	170	3	8	1,8	4,7
Aisne	365	23	8	6,3	2,2	Lozère	79	0	0	0	0
Allier	402	5	4	1,2	1,0	Maine & Loire	431	4	2	0,9	0,5
Alpes (Bsses)	9	0	0	0	0	Manche	611	0	1	0	0,2
Alpes (Htes)	36	0	0	0	0	Marne	223	2	10	0,9	4,5
Alpes Mmes	8	0	0	0	0	Marne (Hte)	204	5	8	2,5	3,9
Ardèche	55	0	0	0	0	Mayenne	512	1	6	0,2	1,0
Ardennes	259	21	31	8,1	12,0	M. & M.	180	3	7	1,7	3,9
Ariège	80	5	4	6,3	5,0	Meuse	208	11	2	5,3	1,0
Aube	117	5	7	4,3	6,0	Morbihan	426	3	3	0,7	0,7
Aude	25	1	2	4,0	8,0	Moselle	211	4	0	1,9	0
Aveyron	279	5	16	1,8	5,7	Nièvre	263	1	2	0,4	0,8
Bouches du R.	13	0	2	0	15,4	Nord	395	10	15	2,5	3,8
Calvados	477	14	7	2,9	1,5	Oise	235	1	0	0,4	0
Cantal	272	1	6	0,4	2,2	Orne	513	1	5	0,2	1,0
Charente	208	11	22	5,3	10,6	P. de Calais	466	2	1	0,4	0,2
*Che Mme	309	40	45	12,9	14,6	Puy de Dôme	296	2	1	0,7	0,3
Cher	230	0	0	0	0	Pyrénées (Bs.)	261	5	10	1,9	3,8
Corrèze	211	1	0	0,5	0	Pyrénées (Ht.)	120	22	11	18,3	9,2
Côte d'Or	218	1	3	0,5	1,4	Pyrénées Oles	12	0	0	0	0
Côtes du Nord	452	4	9	0,9	2,0	Rhin (Bas)	172	0	0	0	0
Creuse	288	2	1	0,7	0,3	Rhin (Haut)	85	5	0	5,9	0
Dordogne	265	2	10	0,8	3,8	Rhône	93	0	2	0	2,2
*Doubs	199	5	10	2,5	5,0	Saône (Haute)	180	0	0	0	0
Drôme	50	0	1	0	2,0	Saône & Loire	420	6	3	1,4	0,7
Eure	324	3	9	0,9	2,8	Sarthe	391	12	6	3,1	1,5
Eure & Loir	144	0	1	0	0,7	Savoie	104	0	0	0	0
*Finistère	529	9	5	1,7	0,9	Savoie (Hte)	135	0	0	0	0
Gard	7	0	0	0	0	Seine Mme	560	0	0	0	0
Hte Garonne	208	25	35	12,0	16,8	Seine & Marne	122	0	0	0	0
Gers	235	9	20	3,8	8,5	Seine & Oise	79	0	3	0	3,8
*Gironde	143	3	11	2,1	7,7	*Sèvres (Deux)	378	11	37	2,9	9,8
Hérault	4	0	0	0	0	Somme	351	2	0	0,6	0
Ille & Vil.	497	2	5	0,4	1,0	Tarn	165	6	8	3,6	4,8
Indre	167	0	1	0	0,6	Tarn & Garonne	117	3	0	2,6	0
Indre & Loire	167	2	4	1,2	2,4	Var	1	0	0	0	0
Isère	214	2	1	0,9	0,5	Vaucluse	4	0	0	0	0
Jura	163	2	0	1,2	0	Vendée	470	3	10	0,6	2,1
Landes	122	27	29	22,1	23,8	Vienne	198	4	4	2,0	2,0
Loir & Cher	111	2	1	1,8	0,9	Vienne (Hte)	276	2	8	0,7	2,9
Loire	221	6	1	2,7	0,5	Vosges	194	4	1	2,1	0,5
Hte Loire	196	0	0	0	0	Yonne	181	4	4	2,2	2,2
Loire Atl.	415	10	25	2,4	6,0						
Loiret	173	3	3	1,7	1,7	Total	19696	399	520	2,0	2,6
Lot	112	3	0	2,7	0						

*La Seine, la Corse et le Territoire de Belfort ont été exclus.

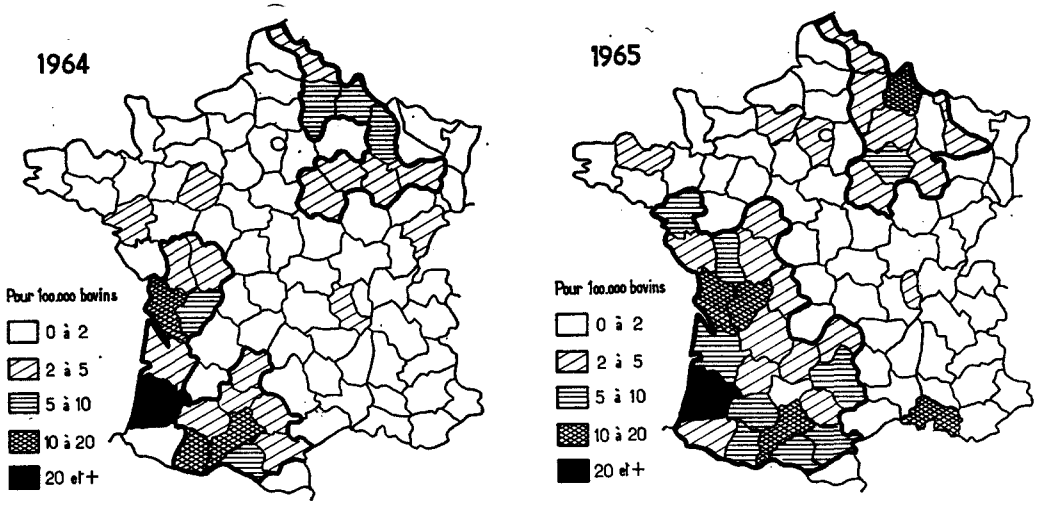


Fig. 1. *Taux de leucose bovine pour* 100.000 *bovins toutes catégories. (Cas de leucoses dénombrés par les soins des direction des Services Vétérinaires départementaux, rapportés au département d'origine des animaux.)*

des cas de leucose constatés en 1964 et 1965 dans l'une des régions apparemment les plus touchées, celle de Mont-de-Marsan (Landes). Les 38 cas de leucose bovine qui y figurent ont tous été décelés dans des exploitations situées dans un rayon de 30 kilomètres autour de cette localité. Une vérification histologique du diagnostic a été fréquemment effectuée à partir de l'année 1965 et, *systématiquement*, à partir du 2ème semestre de cette même année.

Les races des animaux atteints sont, dans l'ensemble, extrêmement diverses.

La répartion par âge et les résultats hématologiques font l'objet d'une étude séparée.

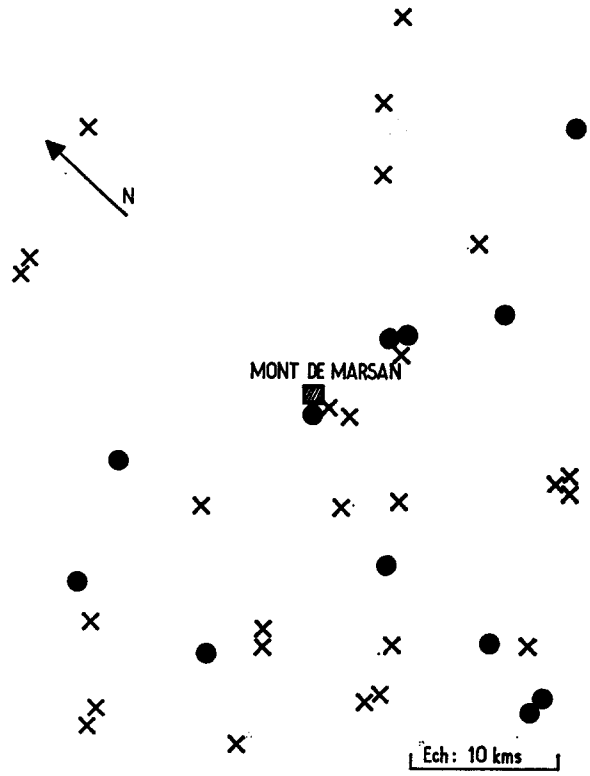


Fig. 2. *Les cas de leucose bovine dans un rayon d'une trentaine de kilomètres autour de Mont-de-Marsan (Landes). En* 1964 ● *et* 1965 ×.

3. DISCUSSION

Ce qui frappe immédiatement à la lecture du tableau 1, et à la vue de la figure 1, c'est, qu'en dehors de quelques départements moyennement touchés et de façon instable d'une année à l'autre, *deux régions* bien définies paraissent très fortement atteintes: il s'agit, d'une part, de toute la région du *Sud-Ouest* (Aquitaine, Poitou, Pyrénées), et, d'autre part, de la région du *Nord-Est* (Champagne, Picardie, Lorraine). On remarque également une nette tendance à l'extension géographique de chacune des régions touchées, entre 1964 et 1965. Dans chacune de ces régions le taux moyen est de l'ordre de 6 pour 100.000 bovins.

Il est intéressant de noter que ces régions sont loin de se situer parmi les premières régions d'élevage en France. Les grandes régions d'élevage, c'est à dire essentiellement la Bretagne, la Normandie, les Pays de la Loire et le Massif Central sont, au contraire, très peu touchées, aussi bien en taux d'animaux leucosiques qu'en nombre absolu.

Bien entendu, il ne faut pas considérer ces données comme très précises. Il ne fait pas de doute que, dans une enquête de ce genre, de nombreuses causes de sous-estimation, voire de *biais*, des résultats peuvent intervenir. On peut citer notamment:

— *les défauts de déclaration d'animaux leucosiques.* En particulier il faut savoir que tous les bovins ne sont pas abattus dans des abattoirs publics ou industriels, et que certains cas de leucose ont ainsi pu échapper à la vigilance des vétérinaires inspecteurs. En outre, en 1964, il n'avait pas été tenu compte des animaux directement envoyés à l'équarrisseur; en 1965, leur recensement est sans doute loin d'avoir été exhaustif.

— *les erreurs de diagnostic.* Il est quelquefois difficile de distinguer, sans examen histologique, une leucose d'une autre affection ganglionnaire ou tumorale.

Toutefois ces objections ne paraissent pas devoir remettre en cause *fondamentalement* l'existence de deux zônes particulièrement atteintes.

D'une part, en effet, les erreurs de diagnostic paraissent (au moins dans le sens "fausse leucose") assez rares: la quasi-totalité des prélèvements histologiques adressés à l'Institut Gustave-Roussy correspondaient bien à des cas de leucose. D'autre part, la *contiguïté* des départements à taux de leucose élevé, et l'extension géographique également par contiguité d'une année à l'autre, rendent assez improbable l'hypothèse que les différences constatées ne résulteraient que d'une différence dans la qualité du recensement.

L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'il y a en France deux grandes épizooties de leucose bovine, en cours de développement. Le département le plus touché paraît être celui des Landes, et notamment la région de Mont-de Marsan. La Fig. 2 est, de ce point de vue, fort explicite. En 1964, 12 cas de leucose bovine étaient recensés dans l'abattoir de Mont-de-Marsan en provenance des communes distantes de moins de 30 kilomètres de la ville. En 1965, le nombre de leucoses, dans la même région, est passé à 26. L'augmentation réelle n'est probablement pas aussi importante car un effort de détection tout particulier a été réalisé en 1965*. Elle est cependant nette, même lorsqu'on se limite aux animaux de l'abattoir municipal de Mont-de-Marsan. Le taux dans la région pourrait être de l'ordre d'au moins 1 pour 1.000 bovins.

Les troupeaux élevés dans la région de Mont-de-Marsan sont, en général, de très petite taille (quelques animaux); les fermes sont isolées les unes des autres. La région est une lande assez clairsemée (cultures, pins et fougères). Les bovins sont nourris de façon très traditionnelle, pratiquement uniquement de fourrages. Aucune modification essentielle dans l'agriculture ou dans l'élevage ne paraît avoir été introduite au cours des dernières années.

*Nous tenons, à cette occasion, à remercier vivement Mr. Labatut, Directeur du Service Vétérinaire Départemental des Landes, Mr. Ferlin, son adjoint, ainsi, que tous les Vétérinaires praticiens de la région de Mont-de-Marsan de leur collaboration active et efficace.

RÉSUMÉ

La France ne paraît pas avoir été épargnée par les épizooties de leucose bovine constatées au cours des dernières années dans certains pays de l'Ouest européen. Deux zones paraissent particulièrement touchées: le Nord-Est et, plus encore, le Sud-Ouest, notamment la région de Mont-de-Marsan (Landes) où le taux de leucose paraît dépasser la valeur de 1 *pour* 1.000 *bovins.*

SUMMARY

France does not seem to have been spared by the bovine leukosis epizooties observed during the last few years in some countries of Western Europe. Two areas have been particularly involved, the North-East and more still the South-West regions, especially that of Mont-de-Marsan (Landes) where leukosis occurs in more than 1 *in* 1000 *cattle.*

ZUSAMMENFASSUNG

Frankreich war anscheinend von den Seuchen der Rinderleukose, die während der letzten Jahren in einigen westeuropäischen Ländern festgestellt wurden, nicht verschont. Zwei Zonen sind anscheinend am ehesten befallen: Nordost-Frankreich und noch mehr Südwest-Frankreich, besonders die Gegend von Mont-de-Marsan (Landes), wo die Anzahl der erkrankten Rinder mehr als 1‰ *ausmacht.*

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 9–12. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

La Leucose Bovine en France (suite)

III—Leucoses Aiguës chez des Veaux de moins de 6 Mois dont Quatre Jumeaux

F. LACOUR et R. P. DECHAMBRE

Institut Gustave-Roussy, Villejuif (Seine), France

1. INTRODUCTION

CLASSIQUEMENT, la leucose bovine est une affection frappant surtout les animaux âgés [1–3]. Ayant observé un nombre relativement important de leucémies chez des animaux jeunes et même très jeunes, il nous a paru intéressant de les rapporter et de les décrire de façon détaillée, car elles sont survenues chez des veaux de moins de 6 mois et il s'agissait de formes aiguës à évolution particulièrement rapide.

Matériel

Lors de notre enquête, qui fait l'objet du chapitre précédent de cette publication, l'âge des animaux atteints de leucose avait pu être précisé dans 60% des cas.

La répartition des animaux, selon l'âge, est représentée dans le tableau suivant qui couvre les années 1964 et 1965.

Tableau 1. *Répartition par âge des animaux leucosiques en* 1964–1965

Age:	Moins d'un an (%)	De 1 à moins de 2 ans (%)	De 2 à moins de 5 ans (%)	5 ans et plus (%)
1964	3	5	16	76
1965	6	7	17	70

On peut remarquer que la proportion d'animaux de moins d'un an, qui était de 3% en 1964, s'est élevée à 6% en 1965. En particulier, de mars 1965 à février 1966, nous avons rencontré 10 cas de leucose chez des veaux âgés de moins de 6 mois dont 4 étaient des jumeaux.

Pour 7 d'entre eux seulement, le diagnostic a été posé sur des résultats de l'examen hématologique; mais, dans tous les cas, un examen histologique des prélèvements effectués après l'abattage a confirmé ou affirmé le diagnostic.

2. ETUDE CLINIQUE†

Les symptômes, l'évolution clinique et les constatations nécropsiques sont assez semblables chez les 10 veaux que nous avons étudiés. Nous relaterons donc les observations faites sur les jumeaux; les autres cas, qui ne présentent pas avec eux de différences notables, seront étudiés globalement.

a — *Les deux premiers jumeaux* étaient des jumeaux vrais (univitellins) de sexe mâle, race française, frisonne, pie noire, provenant des Basses-Pyrénées. A deux semaines d'intervalle, l'un à 1 mois ½, l'autre à 2 mois, les deux

†Nous remercions Messieurs les Docteurs Vétérinaires Bescade, Ben Moura, Courrèges, Curtet, Dupin, Labatut et Meunier de leur aimable collaboration.

animaux ont présenté des symptômes identiques, caractérisés par une hypertrophie ganglionnaire généralisée. Les ganglions lymphatiques, accessibles à la palpation, ont un volume atteignant cinq ou six fois le volume normal. L'état général, satisfaisant au début, se dégrade rapidement: en une semaine l'appétit disparait, la respiration devient ronflante, un amaigrissement important survient. La température rectale demeure normale.

L'examen hématologique révèle une nette leucopénie chez les deux sujets: 2.060 et 3.820 leucocytes par mm².

La formule leucocytaire est très modifiée:

	1er Jumeau (%)	2ème Jumeau (%)
Lymphocytes	96 (dont 10% de cellules souches)	93 (dont 12% de cellules souches)
Polynucléaires		
— neutrophiles	3	6
— éosinophiles	1	1

A l'autopsie, les lésions observées, identiques pour les deux jumeaux, sont considérables.

Le tissu conjonctif sous-cutané renferme de nombreux ganglions hématiques au niveau de l'encolure, de l'épaule, dans le creux du flan et en région périnéale. Les ganglions préscapulaires, axillaires, cervicaux et poplités présentent une forte hypertrophie symétrique.

A l'ouverture du cadavre, on est frappé par l'hypertrophie généralisée de tout le système ganglionnaire.

Les ganglions de la cavité thoracique (médiastinaux, trachéobronchiques, costaux) occupent un volume égal à celui du parenchyme pulmonaire. Les ganglions mésentériques ont le volume d'un pamplemousse. Les ganglions iliaques obstruent presque totalement l'entrée du bassin, et tous les ganglions de la chaîne lombo-aortique ont le volume d'un oeuf de poule. Les ganglions sus-hépatique et rétro-hépatique atteignent le volume d'une mandarine. La pulpe ganglionnaire est tantôt blanche, grenue et friable, tantôt de consistance lardacée avec des arborisations hémorragiques.

La rate, de taille normale chez un sujet, hypertrophiée chez l'autre, de couleur rouge vineux, a une consistance scléreuse. Le foie, augmenté de volume, de couleur blanc-violacé, présente de multiples taches blanches ainsi que des nodules blancs du volume d'une noisette. Sa consistance est scléreuse. Les reins sont entièrement envahis par des nodules blancs du volume d'une noisette. Le parenchyme rénal a presque entièrement disparu.

A l'ouverture de la cavité thoracique, on ne voit que du tissu tumoral, blanc, lardacé, correspondant aux ganglions hypertrophiés, au thymus, aux poumons entièrement infiltrés. Tous les lobes pulmonaires présentent, en surface et en profondeur, de très nombreux nodules de la taille d'une noix. Le thymus est boursouflé et hypertrophié. Le myocarde est très pâle et présente deux nodules blancs à sa surface. La plèvre costale est tapissée de placards blancs de 10 à 20 mm d'épaisseur.

Enfin, la section des os longs laisse apparaître, chez les deux animaux, une moelle blanchâtre, de consistance graisseuse.

On est frappé, à l'examen de ces deux cas, par la généralisation complète du processus tumoral et par la similitude presque totale des lésions observées.

b — *Les deux autres jumeaux* (bivitellins) âgés de 2 mois ½ étaient de race gasconne et provenaient du Gers. A la naissance, le veau n° 1 pesait 19 kg et le veau n° 2, 31 kg.

L'examen clinique a révélé, chez le premier, une hypertrophie des ganglions lymphatiques externes, mais l'appétit était conservé, et l'animal, en apparente santé, avait une température normale.

La numération globulaire montrait une hyperleucocytose à 14.600 dont 87% de lymphocytes, avec une forte proportion de formes jeunes.

Le deuxième animal présentait un moindre retard de développement, une amyotrophie générale et, lui aussi, une très importante hypertrophie ganglionnaire. Son état général était plus atteint, il était triste et anorexique; il restait le plus souvent couché; la température était normale. On note chez lui une hyperleucocytose plus marquée: 23.000 G.B./mm³ et la formule était celle d'une leucose aiguë: 98% de lymphocytes avec prédominance de cellules souches.

Dans les deux cas, une insuffisance myéloïde se manifestait par une anémie à 2.100.000 globules rouges pour le premier animal, et 3.300.000 globules rouges pour le second.

L'évolution de la maladie a été extrêmement rapide et les deux veaux ont été abattus quelques jours après l'examen hématologique, car leur état général s'est aggravé brusquement.

Comme dans les deux cas précédents, l'autopsie a révélé une hypertrophie généralisée à tous les ganglions, mais plus modérée chez le premier. La rate était 6 fois plus volumineuse que normalement et le foie lui-même était hypertrophié.

c — *Les six autres cas observés* présentent une évolution clinique et des lésions très compa-

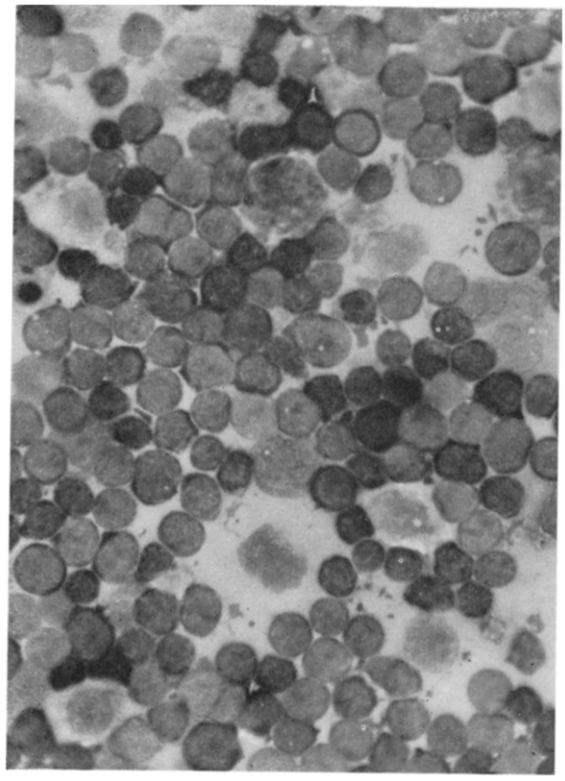


Fig. 1. *Empreinte fraîche de ganglion: coloration May Grünwald-Giemsa. On reconnaît les lymphoblastes à couronne cytoplasmique très réduite, très basophiles; on peut noter la présence de vacuoles claires.*

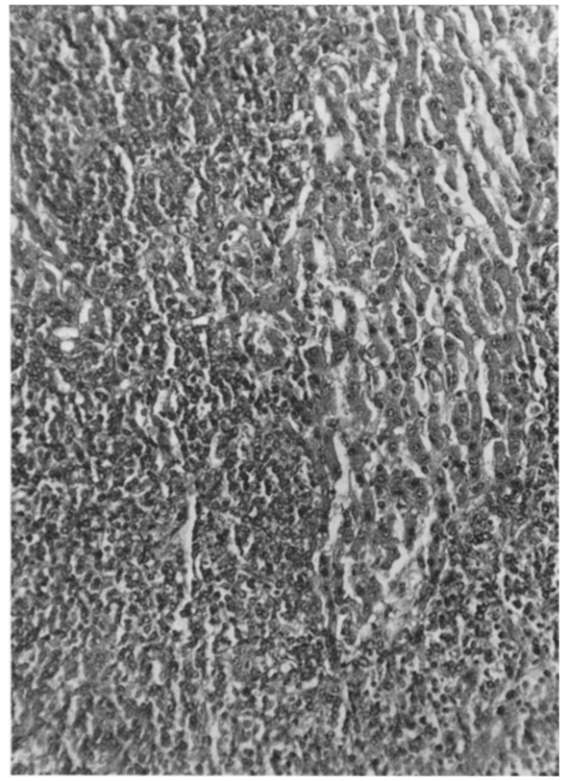


Fig. 2. *Infiltration du parenchyme hépatique par des lymphoblastes.*

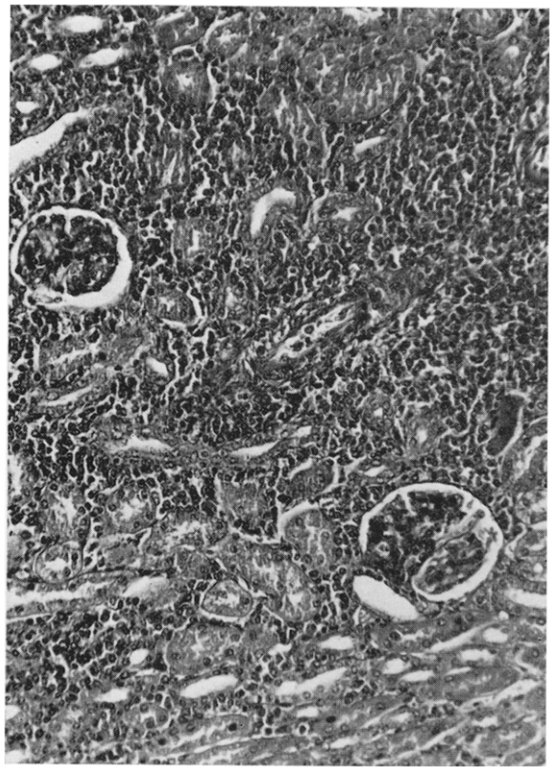


Fig. 3. *Rein: on remarque une infiltration interstitielle.*

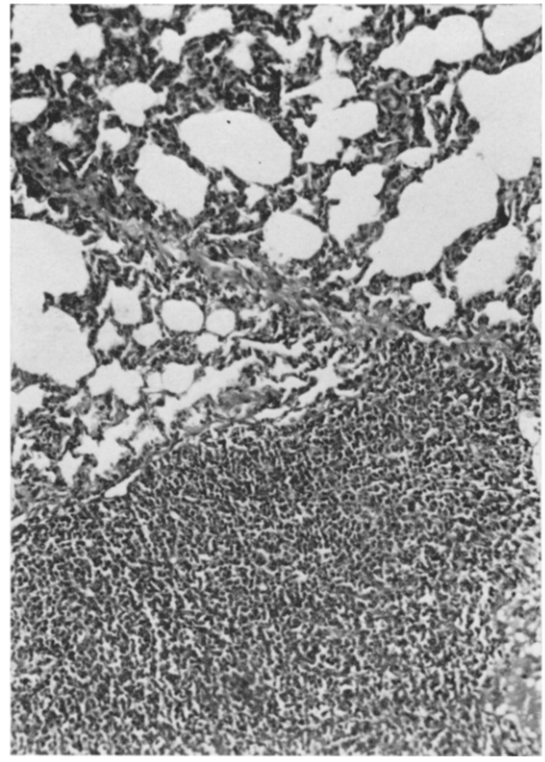


Fig. 4. *Nodule tumoral pulmonaire.*

(to face p. 10)

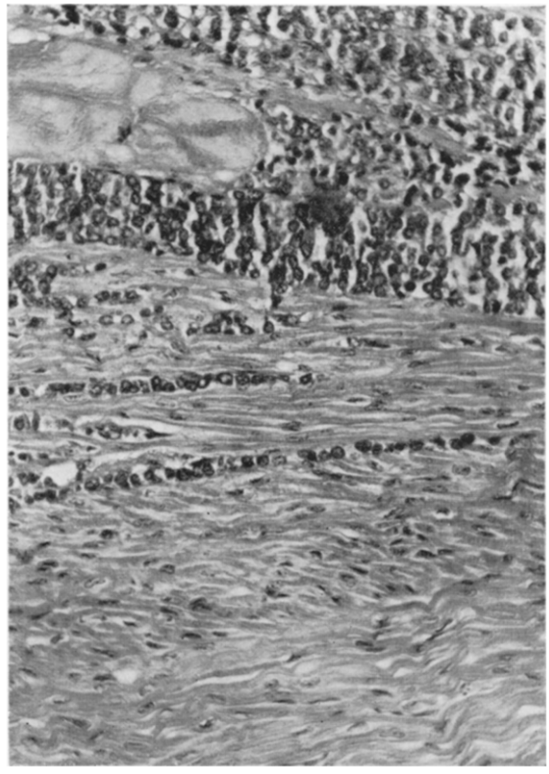


Fig. 5. *Myocarde : infiltration réalisant un clivage des fibres musculaires.*

rables à celles notées chez les jumeaux étudiés ci-dessus. Les animaux se répartissent comme suit: 1 veau d'un mois provenant de la Manche; 1 génisse normande de 2 mois, provenant du Loiret; 2 veaux âgés de 3 mois dont 1 mâle de race limousine provenant de Haute-Garonne; 1 veau femelle de race hollandaise provenant du Bas-Rhin; 1 génisse âgée de 5 mois ½ provenant des Landes; et enfin 1 veau mâle de 6 mois de race française frisonne pie noire, provenant des Ardennes.

Tous ces animaux présentaient une adénomégalie symétrique. C'est d'ailleurs ce signe qui a permis d'orienter le diagnostic vers celui de leucose. Les symptômes pour lesquels le praticien est appelé en consultation ne sont pas caractéristiques: tristesse, inappétence, amaigrissement progressif, parfois début de gêne respiratoire. La température rectale demeure normale.

L'examen clinique révèle une adénomégalie généralisée. L'évolution de la maladie fut très rapide dans les cas que nous avons observés. Entre le moment où le diagnostic est posé (début de l'adénomégalie, perturbation de la formule leucocytaire) et la mort de l'animal, il s'écoule au maximum deux semaines. Si l'animal n'est pas sacrifié, il succombe dans un état de cachexie avancée, après avoir, la plupart du temps, présenté une détresse respiratoire prononcée.

L'examen hématologique confirme le diagnostic de leucose. Qu'il s'agisse d'hyperleucocytose (le nombre de leucocytes varie entre 13.200 et 23.000 par mm^2) ou de leucopénie (cas des 2 jumeaux étudiés ci-dessus) la formule leucocytaire est très perturbée. Le pourcentage de lymphocytes est, selon le cas, de 87 à 98 avec présence de formes jeunes; la proportion de polynucléaires basophiles et éosinophiles varie de 13% à 2%.

Dans un seul cas il s'agissait d'une forme aleucémique.

3. ETUDE HISTO-PATHOLOGIQUE*

a—*Cas des jumeaux* L'examen des ganglions au petit grossissement, fait déjà penser à une leucose: uniformité de la population cellulaire, effacement presque total de la structure lymphoïde normale. A un plus fort grossissement, on note que le tissu ganglionnaire est constitué de cellules rondes libres, beaucoup plus denses que normalement.

La présence de ces cellules est observée dans les vaisseaux sanguins et hors de la capsule. Au plus fort grossissement, les noyaux assez réguliers à chromatine finement réticulée paraissent peu ou mal nucléolés. Les mitoses sont fréquentes.

L'imprégnation argentique ne montre pas de réseau réticulaire très riche ni un engainement cellulaire individuel.

Sur l'empreinte fraîche d'un de ces ganglions (Fig. 1) le diagnostic cytologique de lymphoblastes paraît évident: cellules souches à couronne cytoplasmique très réduite, parfois très basophile. On observe la présence de vacuoles claires.

Il s'agit donc d'une prolifération tumorale lymphoblastique.

Cette prolifération maligne des lymphoblastes se retrouve dans tous les organes lymphoïdes prélevés: ganglions, rate, thymus et moëlle osseuse, comme dans presque tous les organes et tissus qui ont été examinés; au niveau du foie (Fig. 2), elle est massive dans les espaces portes; dans le rein (Fig. 3), l'infiltration est interstitielle, diffuse ou nodulaire. De nombreux nodules sont observés dans les poumons (Fig. 4). Une infiltration des fibres musculaires, au voisinage des ganglions, ainsi que du myocarde, est également observée (Fig. 5).

Il est à remarquer que, dans les deux couples de jumeaux, il existait une identité frappante entre les différents aspects hématologique, cytologique et histologique.

b — L'étude histologique des prélèvements des *six autres animaux* a permis de faire le diagnostic de lymphoblastosarcome.

4. DISCUSSION

Les 10 cas de leucose que nous venons de décrire appellent, à notre avis, trois remarques:

1. Sur le plan symptomatique évolutif et cytologique elles ressemblent aux leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant (Mathé et col.) [4]. Le type cellulaire en est aussi le lymphoblaste. L'infiltration tumorale de tous les organes lymphoïdes et de certains parenchymes en est la règle, et on peut observer, comme chez l'enfant, des formes aleucémiques.

2. Apparemment, aucun de ces cas ne provient d'une étable "leucémique". Ces cas pourraient donc correspondre aux "leucémies sporadiques" des jeunes veaux de moins de 2 ans que Bendixen [5] oppose à la forme "enzootique".

Cependant, nous n'osons pas l'affirmer, car l'enquête rétrospective que nous avons entre-

*Nous tenons à remercier M. le Docteur R. Gérard-Marchant, Chef du Laboratoire d'Histopathologie de l'Institut Gustave-Roussy, des précieux conseils qu'il nous a donnés pour l'interprétation des coupes histologiques.

prise manque de précision.

3. Nous avons surtout été frappés par l'apparition simultanée de leucose chez 2 paires de jumeaux. En effet, la fréquence des leucoses est faible (de l'ordre de 6 pour 100.000 bovins dans les régions où ils sont nés). Il n'y a donc qu'une chance minime pour que l'apparition simultanée des leucoses chez nos deux couples de jumeaux soit due au hasard.

L'évolution parfaitement concordante et synchrone de ces leucoses et l'atteinte du même type cellulaire suggèrent fortement l'hypothèse de l'existence d'un facteur génétique commun chez ces animaux.

Ce facteur génétique serait susceptible de créer, par exemple, une réceptivité particulière favorisant la transmission verticale d'un agent exogène de type viral.

RESUME

Au cours des derniers mois, nous avons étudié 10 cas de leucose aiguë survenue chez des veaux de moins de 6 mois, dont 4 étaient des jumeaux. Cette leucose aiguë était, chez tous les animaux, de type lymphoblastique, et a tué les animaux en quelques semaines. Elle était assez comparable à la leucémie lymphoblastique de l'enfant. L'apparition simultanée de cette leucose aiguë chez 2 couples de jumeaux fait discuter l'hypothèse de l'existence d'un facteur génétique particulier.

SUMMARY

During the last few months, we studied ten acute leukoses in calves less than 6 months old, four of which were twins. All the animals presented a lymphoblastic leukosis and died within a few weeks. This type of leukosis was almost similar to the child lymphoblastic leukaemia. From the simultaneous appearance of this acute leukosis in two couples of twins, we may assume the existence of a genetic factor.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben während der letzten Monate zehn Fälle einer akuten Leukose untersucht, und zwar in Kälbern, die jünger als sechs Monate alt waren, vier davon Zwillinge. Alle Tiere hatten eine lymphoblastische Leukose und starben daran innerhalb einiger Wochen. Diese glich ziemlich der lymphoblastischen Leukämie des Kindes. Das gleichzeitige Auftreten dieser Leukose bei zwei Zwillingspaaren erlaubt uns das Bestehen eines besonderen genetischen Faktors hypothetisch auszusehen.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. Cotchin, Neoplasms of the domestic animal. A review, p. 23. Farnham Royal Bucks, England: Commonwealth Agricultural Bureaux (1956).
2. C. Lombard, La leucose des bovidés. *Bull. Ass. franc. Cancer* **51,** 301 (1964).
3. R. Squire, Tumeurs hématopoïetiques chez les animaux domestiques. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* **4,** 825 (1964).
4. G. Mathe et G. Seman, *Aspects Histologiques et Cytologiques des Leucémies et Hémato-sarcomes.* Librairie Maloine, Paris (1963).
5. H. Y. Bendixen, Undersoegelser over kvaegets leukose — 3. Om kontrollen med leukosebesaetniger ved haematologiske undersoegelsesmethoder. *Nord. Vet.-Med.* **2,** 733 (1959).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 13–16. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

La Leucose Bovine en France (suite)

IV—Etude Hématologique du "Voisinage" Immédiat de Bovins Leucosiques et d'Exploitations Indemnes

F. LACOUR et O. WEILER
Institut Gustave-Roussy, Villejuif (Seine), France

1. INTRODUCTION

LA PRATIQUE, en Europe, d'examens hématologiques systématiques et répétés chez les bovins des troupeaux a permis de préciser la notion de l'évolution en deux phases de la leucose bovine. La première phase, préleucosique, est caractérisée par une hyperleucocytose avec un taux très élevé de lymphocytes. Elle est suivie, après un délai variable, de la seconde phase, clinique ou tumorale.

En Allemagne, Götze et col. [1] ont défini une "clef de leucose" permettant de classer les animaux en plusieurs groupes: normal, suspect et leucosique, en se basant sur le nombre de leucocytes par mm^3 et le pourcentage de lymphocytes, en fonction de l'âge de l'animal. La "clef" de Bendixen [2], au Danemark, ne tient compte que de la numération leucocytaire en fonction de l'âge. Dans ce dernier pays, où la leucose bovine entre dans la catégorie des maladies à déclaration obligatoire, le diagnostic hématologique et la prophylaxie (abattage des animaux leucémiques ou suspects) ont permis une éradication presque complète de la maladie [2, 3].

2. MATERIEL ET METHODES

Nous avons entrepris des examens hématologiques systématiques en commençant par le bétail de la région de Mont-de-Marsan où nous avions observé le plus grand nombre de leucoses (voir chapitre II). Les prélèvements ont été effectués sur deux groupes de bovins.

Le premier groupe comportait 130 animaux au total, répartis dans 16 étables au sein de chacune desquelles était apparu un cas de leucose décelé soit à l'abattoir, soit sur l'animal encore vivant.

Le second groupe, plus faible (50 animaux), était réparti dans 10 étables indemnes de leucose, situées à proximité des fermes touchées, et nous a servi, en quelque sorte, de groupe témoin.

Les numérations globulaires ont été réalisées avec un compteur électronique "Coulter Counter".

Les premiers examens nous ont fourni des nombres de leucocytes par mm^3 qui nous paraissent beaucoup plus proches de ceux observés en Allemagne que des chiffres danois. Aussi avons-nous provisoirement adopté la clef de leucose de Götze *et coll.* (Tableau 1) en attendant qu'une plus grande enquête nous ait fourni des renseignements plus précis sur l'hémogramme normal des bovins en France.

Nous avons effectué un second prélèvement 2 à 4 semaines après le premier examen hématologique, chaque fois que la leucocytose excédait 10.000 par mm^3. Seuls ont été considérés comme leucosiques les animaux dont les deux examens successifs étaient concordants et montraient, selon les normes de Götze, une

Tableau 1. *"Clefs de leucose" proposées par Götze* et coll.

	Nbre de leucocytes par mm³	% de lymphocytes	
Bovins au-dessous	Jusqu'à 12.000	Jusqu'à 65	Normal (N)
de 3 ans	12.000–18.000	65–75	Suspect (S)
	18.000 et plus	75 et plus	Leucose (L)
Bovins au-dessus	Jusqu'à 10.000	Jusqu'à 60	Normal (N)
de 3 ans	10.000–18.000	60–75	Suspect (S)
	18.000 et plus	75 et plus	Leucose (L)

Conclusion: NN ou NS=normal NL ou SS=suspect SL ou LL=leucose

hyperleucocytose avec lymphocytose prédominante.

3. RESULTATS

Sur les 130 bovins du premier groupe (vivant dans des étables où des leucémies avaient été antérieurement constatées), 9 ont été considérés comme "leucémiques".

Ces 9 animaux étaient dispersés dans 6 étables. Sur le plan de ces étables, nous avons fait figurer, d'une part, la place qu'occupaient les animaux antérieurement morts de leucose, et, d'autre part, la place actuelle des 9 vaches à hématologie positive, dépistées au cours de notre enquête. Nous avons été frappés de constater que 4 de ces dernières avaient été les voisines immédiates d'un des animaux morts de leucose (Tableau 2).

Par ailleurs, parmi les 9 animaux chez lesquels nous avons posé le diagnostic de leucose après examen hématologique systématique, une vache était déjà morte 5 semaines après le premier examen avec une infiltration tumorale généralisée que nous avons pu vérifier histologiquement. Elle avait présenté, au premier examen, une hyperleucocytose à 16.900 par mm³ avec des manifestations cliniques à type d'inappétence avec diarrhée. Le deuxième examen avait révélé une leucocytose à 65.000 avec 87% de lymphocytes dont 24% de lymphoblastes.

Parmi les 50 bovins du 2ème groupe (étables voisines sans leucose antérieurement constatée), 1 seul cas de leucémie a été retenu après l'examen hématologique systématique.

4. DISCUSSION

Sur un total de 180 bovins de la région de Mont-de-Marsan, nous avons décelé 10 animaux ayant une hématologie "positive", selon les normes définies par Götze et col. [1], pour le diagnostic de leucose.

De cette étude, se dégagent deux notions:

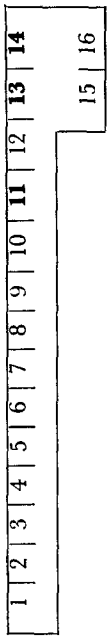
a — la notion d'étable leucosique: en effet 9 sur 10 des leucoses sont apparues dans des étables où 1 ou 2 vaches étaient mortes de leucose au cours des trois années précédentes. Une seule leucose a été observée parmi les 50 animaux vivants dans 10 étables situées dans la même région géographique, mais dans lesquelles aucun cas de leucose n'avait été enregistré. Ce groupe a été considéré comme "témoin", mais nous sommes conscients de sa valeur relative en tant que tel, du fait de sa situation dans la région de Mont-de-Marsan où l'incidence des leucoses est particulièrement élevée.

b — Le fait que, sur les 9 bovins du 1er groupe, 4 aient occupé la place voisine de celle d'une vache morte de leucémie, suggère fortement l'idée d'une éventuelle transmission horizontale de la maladie.

Nous manquons encore du recul nécessaire pour porter un jugement de valeur sur les critères de diagnostic hématologique, puisque ces divers examens systématiques ont été réalisés il y a quelques mois seulement. Il est cependant frappant de constater qu'un des animaux à hématologie positive est déjà mort 5 semaines après le premier examen. Cette évolution aiguë ne semble pas être une exception dans cette région, d'après les résultats de nos premières observations.

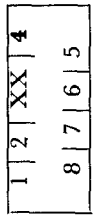
Tableau 2. *Plan des* 3 *étables où les animaux suspects de leucose sont situés à proximité des emplacements des animaux morts de leucose.*

Etable n° 1



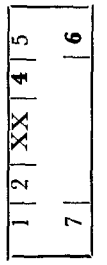
Animal n°	GB/mm³	Lymphocytes %
14	65.000	87
13	15.715	77
11	14.868	80
Autres animaux	Numération et formule normales	

Etable n° 2



4	15.980	89
Autres animaux	Numération et formule normales	

Etable n° 3



4	15.548	87
6	11.260	84
Autres animaux	Numération et formule normales	

Légende:
XX animal antérieurement mort de leucose **14** Animal classé "leucémique"

RESUME

Des examens hématologiques systématiques ont été réalisés sur un ensemble de 180 *bovins de la région de Mont-de-Marsan.*

Ils ont permis de déceler 10 *"leucoses" selon les normes énoncées par Götze et col.*

La répartition de ces leucoses, dans les diverses étables, suggère l'existence d'étables leucosiques et fait discuter l'hypothèse d'une transmission horizontale de la maladie.

SUMMARY

Systematic haematological examinations were performed on 180 *cattle from the Mont-de-Marsan region. They enabled us to discover ten cases of leukosis according to the norms of Götze* et al.

The location of these leukoses in the different stables suggests the existence of "leukaemic stables" and, accordingly, the hypothesis of a horizontal transmission is envisaged.

ZUSAMMENFASSUNG

Systematische Hämatologische Blutuntersuchungen wurden bei 180 *Rinder der Gegend von Mont-de-Marsan durchgeführt. Sie ermöglichten uns nach den Kriterien von Götze et al.* 10 *Leukosen zu entdecken. Die Verteilung dieser Leukosen in den verschiedenen Ställen legt es uns nahe, dass leukämisch verseuchte Stellungen exiztieren könnten. Darum könnte man vermuten, dass die Krankheit sich waagerecht ausbreitete.*

BIBLIOGRAPHIE

1. R. Götze, G. Rosenberger et G. Ziegenhagen, Über Ursache und Bekämpfung der Rinderleukose. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **103,** 121 (1956).
2. H. J. Bendixen, Preventive measures in cattle leukaemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **108,** 1241 (1963).
3. H. J. Bendixen, Leukosis enzootica bovis. Principles of the epidemiology investigations and preliminary results of the Public Control and Eradication Program in Denmark. *Bull. Off. Int. Epiz.* **62,** 675 (1954). (XXXIIème Session Generale.)

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 17–19. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Etude des Leucémies Humaines en Relation avec les Leucoses Bovines

R. FLAMANT*, M. HAYAT† et D. SCHWARTZ†
Groupe d'Etude Comparée des Leucémies Humaine et Bovine (G.E.C.L.E.)‡ Paris (France)

L'ÉPIDÉMIOLOGIE des leucémies humaines suscite actuellement de nombreux travaux [1].

Parmi eux, une observation retient particulièrement l'attention. Les taux annuels de mortalité par leucémies sont en augmentation dans presque tous les pays. Mais cet accroissement concerne surtout les hommes de plus de 55 ans. Il ne paraît pas pouvoir être expliqué uniquement par un biais dû à une amélioration des conditions diagnostiques chez les gens âgés mais semble correspondre à une augmentation véritable de l'incidence. Or, au delà de 55 ans, la forme la plus fréquente est la leucémie lymphocytaire chronique. On est donc conduit à chercher un facteur étiologique susceptible d'expliquer l'accroissement de cette variété de leucémie.

Une explication possible est une relation avec les leucoses animales, en particulier bovines, au sujet desquelles les travaux récents montrent l'extension géographique, et dont la variété humaine qui s'en rapproche le plus est précisément la leucémie lymphocytaire chronique.

C'est dans le domaine de la pathologie géographique qu'on peut chercher des arguments susceptibles d'étayer cette hypothèse d'un rapport entre leucémies humaine et animale.

En France, les seules informations dont on dispose sur la répartition des leucémies sont des données de mortalité.

La comparaison des mortalités par leucémie selon le département, en 1963 et 1964 [2, 3], permet une première constatation (Fig. 1). Il n'existe aucune similitude de répartition d'une année à l'autre. A l'inverse de ce que nous avons observé pour les leucoses bovines§, la distribution des leucémies humaines ne se présente pas en foyers.

Nous avons ensuite rapproché les cartes de répartition des leucémies humaines et des leucoses bovines pour la même année 1964 (carte 2). On ne peut relever aucune concordance entre les deux distributions.

Ces constatations négatives appellent cependant des réserves.

Les données de mortalité utilisées sont très grossières, mélangeant toutes les variétés cytologiques et probablement beaucoup d'autres hémopathies malignes. Or, nous avons vu précédemment que, s'il existait une relation, elle concernerait peut-être exclusivement les leucémies lymphocytaires chroniques.

Par ailleurs, il est peu probable qu'une éventuelle relation entre la pathologie humaine et animale s'extériorise par une confrontation géographique au cours d'une même année d'observation. Tout dépend des temps de

*Section Cancer de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

†Unité de Recherche Statistique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

‡Sa composition est indiquée dans l'article "La Leucose Bovine en France".

§Voir article La Leucose Bovine en France, chapitre II "La Répartition Générale des Leucoses Bovines en France en 1964 et 1965".

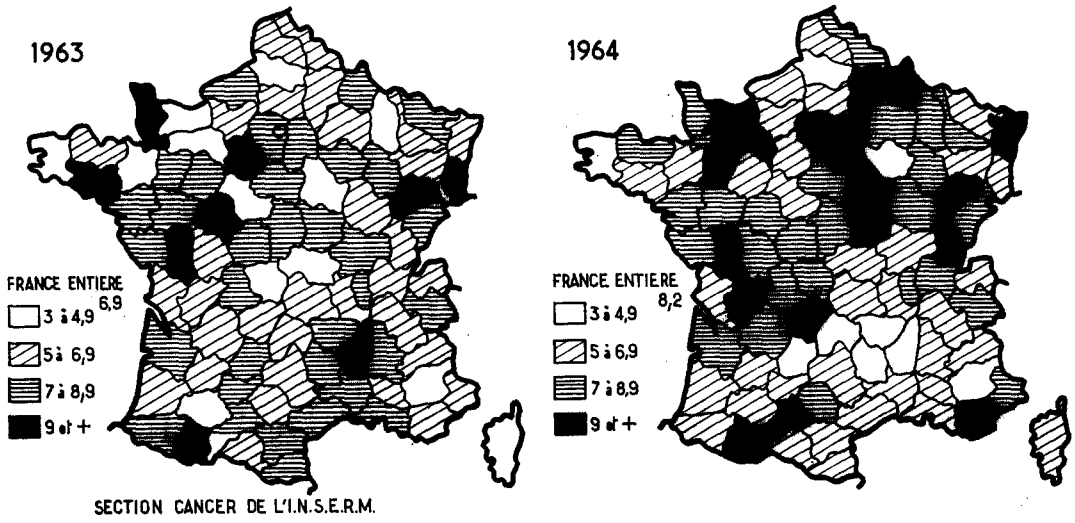


Fig. 1. *Mortalité par leucémie selon le département en* 1963 *et en* 1964.

latence respectifs des affections animale et humaine.

A l'étranger, en particulier aux Etats-Unis et dans les pays nordiques, on dispose, en ce qui concerne la pathologie humaine, de données de morbidité qui sont plus précises.

Aux Etats-Unis, on a constaté que c'était au Minnesota qu'on relevait le taux le plus élevé, à la fois pour les leucoses animales et pour les leucoses humaines [4]. Cependant, dans l'ensemble, il ne semble pas que des arguments décisifs en faveur d'une relation entre leucémies humaine et animale aient été publiés dans le domaine de la pathologie géographique.

Mais là encore, il faut souligner que la séparation entre les différentes variétés de leucémies n'est pratiquement jamais faite.

De ces quelques observations, on peut finalement conclure qu'il n'existe pour l'instant aucun fait précis d'ordre épidémiologique en faveur d'une relation entre leucémies humaines et leucoses bovines. Mais le domaine de recherche est loin d'être épuisé. L'hypothèse avancée nous parait garder toute sa valeur et justifie des travaux plus précis.

C'est la raison pour laquelle deux enquêtes sont en cours d'organisation en France, en coopération entre l'Unité de Recherches Statistiques et la Section Cancer de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, avec le concours des Inspections départementales et régionales de la Santé.

La première est une enquête de morbidité dont le but est de mesurer la fréquence des

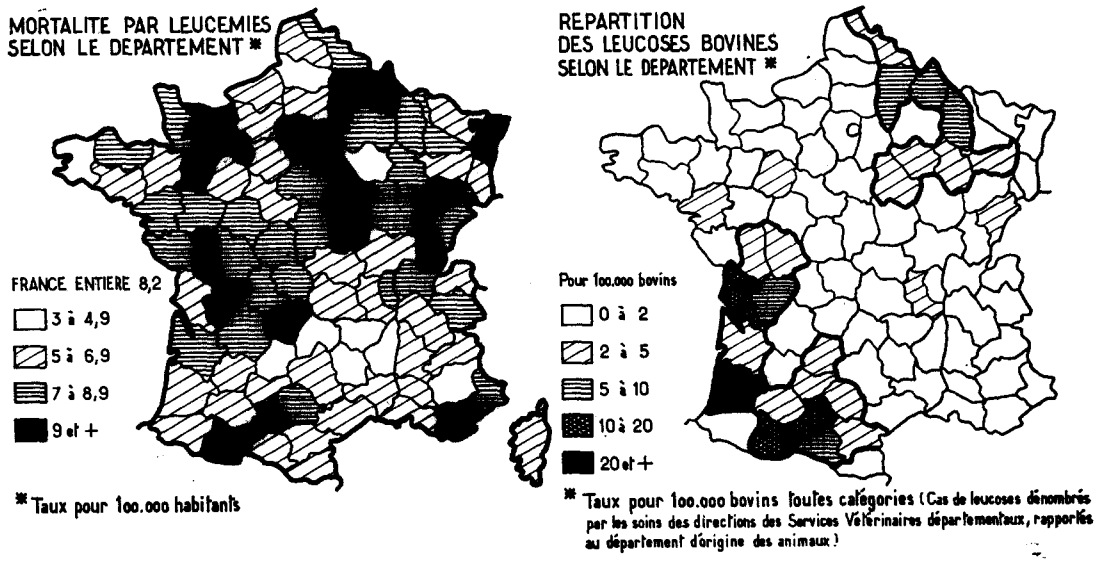


Fig. 2. *Leucémies humaines et leucoses bovines en* 1964.

nouveaux cas de leucémies et hématosarcomes apparaissant dans diverses régions. Celles-ci ont été choisies en fonction de l'existence ou non de foyers de leucose bovine. Un soin tout particulier sera apporté à obtenir les diagnostics les plus précis afin de dresser une cartographie aussi exacte que possible des différentes variétés de leucémies et d'hématosarcomes.

La seconde est une enquête rétrospective dont le but est de comparer des malades atteints de leucémies et d'hématosarcomes à des sujets témoins pour de nombreuses caractéristiques, en particulier les lieux d'habitation et de travail, les habitudes alimentaires etc.

RESUME

Un certain nombre d'arguments, en particulier épidémiologiques, peuvent faire penser à l'hypothèse d'une relation entre les leucémies humaines et les leucoses bovines.

Pour l'instant, la confrontation géographique de la répartition des leucémies humaine et animale n'apporte aucune confirmation de cette relation.

Mais les documents dont on dispose sur les leucémies humaines, notamment en France, sont, dans l'ensemble, assez grossiers et ne distinguent pas les différents types de leucémies et d'hématosarcomes.

Pour obtenir des données plus précises, une enquête de morbidité et une enquête rétrospective ont été entreprises.

SUMMARY

There are certain reasons, based on epidemiology, which suggest that a relation may exist between human leukaemia and the bovine leukoses.

However, at the present, the comparison of distributions of human leukaemia and bovine leukoses fails to confirm such a relation.

On the other hand, the data available on human leukaemia are rather incomplete, especially in France, and do not allow to distinguish the different types of leukaemias and hematosarcomas.

In order to obtain more precise data, an investigation on the morbidity and a retrospective inquiry have been undertaken.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch epidemiologische und auch andere Gründe könnte man daran denken, dass es eine Beziehung zwischen den Menschenleukämien und den Rinderleukosen gäbe.

Diese Beziehung ist jedoch heutzutage durch die geographische Verteilung der Menschen- und der Tierleukämien nicht bestätigt.

Die gegebenen Tatsache über Menschenleukämien sind besonders in Frankreich ziemlich unvollständig und es ist dadurch unmöglich die verschiedenen Leukämieformen und anderen bösartigen Erkränkungen des Blutes und des lymphatischen Systems zu unterscheiden.

Um genauere Tatsachen zu erlangen wurden ein Studium über Morbidität und eine zurückblickende Untersuchung unternommen.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. Hayat et R. Flamant, Aspects actuels de l'épidémiologie des leucémies. *Bull. I.N.S.E.R.M.* **21,** 399 (1966).
2. R. Flamant, L. Maujol et O. Lasserre, La mortalité par cancer en France en 1963. *Bull. I.N.S.E.R.M.* **19,** 911 (1964).
3. R. Flamant, O. Lasserre et L. Maujol, La mortalité par cancer en France en 1964. *Bull. I.N.S.E.R.M.* **20,** 735 (1965).
4. D. K. Sorensen, R. K. Anderson, V. Perman et J. H. Sautter, Bovine lymphocytic leukemia: studies of occurrence and distribution including investigations of familial and environmental factors with supporting clinical, hematologic and pathologic studies, Progress report to the Atomic Energy Commission. (1961).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 21–24. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

A Cytophotometric Study of DNA and Protein Content during Interphase Growth of an Ehrlich Ascites Tumour

B. LEDERER* and W. SANDRITTER†
Department of Pathology, Justus Liebig — Universität Gießen

INTRODUCTION

SEVERAL investigators [1–4] have determined Feulgen—photometrically the increase of DNA during interphase growth, and correlated this increase with a parallel increase in interferometrically measured dry weight. Their studies showed, that DNA synthesis takes place only during a restricted time period (*S*-phase), while the doubling of the dry weight in the whole cell proceeds independently of this period [3–5]. There is as yet no unified understanding regarding the temporal relationship between nuclear protein synthesis and DNA replication, and the results from cytochemical [2] histoautoradiographic [6, 7] and biochemical [8] approaches seem to contradict one another. In the present investigation the DNA, histone and total-protein content for the same cell in the nucleus and cytoplasm of mouse ascites tumour-cells are determined by cytophotometric methods.

METHODS

Smear preparations from an Ehrlich ascites tumour with a hypotetraploid DNA stem line [9] were fixed for 20 min in neutral formalin, rinsed in water and then treated histochemically in the following manner: simultaneous Feulgen–Naphthol yellow staining [10] was carried out. The Feulgen reaction was performed with trichloraceticacid (TCA) so as to avoid an extraction of histone protein [11]. After being photographed the cells were measured cytophotometrically. The DNA content was evaluated by means of Feulgen staining at λ 570 nm. The total protein content by means of Naphthol yellow staining at λ 450 nm with separate measurements in the nucleus and cytoplasm, using a simple cytophotometer for point measurements [12] and an integrating microdensitometer after Deeley [13] for the other measurements. Afterwards, the histone protein content of the same cells was measured cytophotometrically at λ 620 nm following Fastgreen staining at pH 8,2 [14]. The removal of DNA by 90°C 5% TCA, which is required for the Fastgreen procedure, is removing the Feulgen and Naphthol yellow dye too (for further particulars of this method see Lederer and Sandritter [15]).

RESULTS

The cytophotometric measurements illustrated in Figs. 1–3, show the extent to which DNA content is correlated with histone and total protein respectively in the nucleus and cytoplasm. As can readily be seen from the DNA measurements (Fig. 1), the nuclei in our cell population were found in all stages of interphase.

Figure 1 shows a linear correlation of histone protein and total protein in the nucleus to DNA content. Calculation of the appropriate correlation coefficients gives values of $r=0{\cdot}9705$ for Feulgen/Fastgreen and $r=0{\cdot}9041$ for

*Stipendiat der Alexander v. Humboldtstiftung.
†Supported by a Grant of Deutsche Forschungsgemeinschaft.

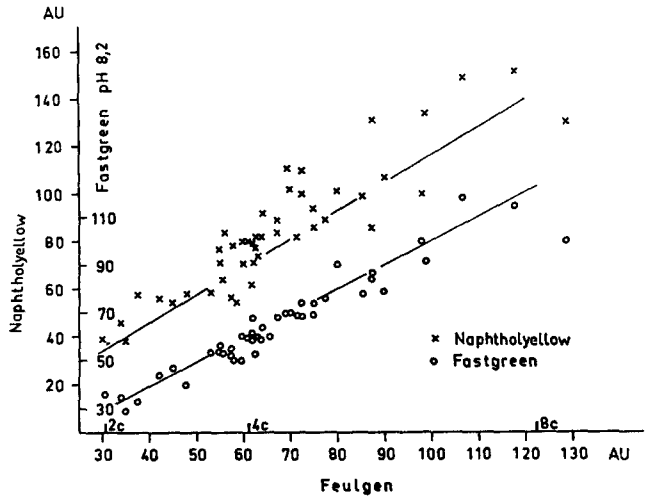


Fig. 1. Correlation of nuclear protein and DNA content. DNA content by means of Feulgen staining. Total nuclear protein by means of Naphthol yellow pH 2·7. Nuclear histone protein by means of Fastgreen pH 8·2. Note the linear correlation between nuclear protein and DNA content. (2c=diploid DNA content, AU=relative dye content in Arbitrary Units).

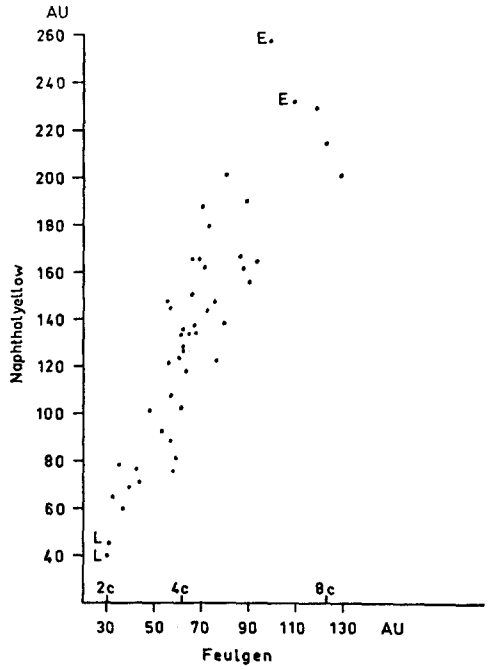


Fig. 2. DNA content and total cellular protein. (E=binucleated cells, L=lymphocytes).

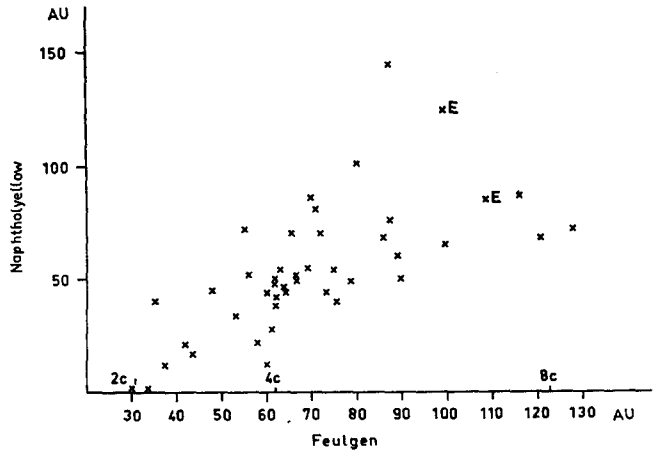


Fig. 3. DNA content and total cytoplasmic protein. (E=binucleated cells).

(nuclear) Naphthol yellow/Feulgen, from which we may infer a simultaneous synthesis of DNA and nuclear protein. The "*y*" intercepts of these correlation lines occur close enough to the origin that nonspecific staining could not have produced false correlation results.

Comparison of the total protein in nucleus and cytoplasm with DNA content (Fig. 2) yields likewise a high Naphthol yellow/ Feulgen correlation ($r=0\cdot8650$). Thus with increasing DNA content in the cell the protein content of the entire cell is also increased confirming the finding of Meek [16].

In Fig. 3 the quantities of cytoplasmic protein and DNA are compared, but a linear correlation of cytoplasmic protein in the cells with DNA is not recognizable ($r=0\cdot6702$), indicating that the high correlation of total protein to DNA may be due to a predominance of the nuclear proteins.

DISCUSSION

The high correlation of protein–DNA values which we found following sequential Feulgen/ Naphthol yellow/Fastgreen staining agree with earlier cytophotometric experiments [11,14, 17]. Rommel [18] found likewise, a good agreement in the distribution of the cell populations in normal and tumour cells with regard to DNA and histone protein content. From these histochemical findings a simultaneous synthesis of DNA and histone was thus inferred. By comparison of Feulgen-photometrically determined DNA content with interferometrically measured nuclear dry weight Seed [2] was able to show a close correlation of nuclear dry weight with DNA content in normal cells, while measurements of tumour cells produced a wider scattering of values indicating to that author a possible characteristic of tumour cells. In contrast to interferometric protein determinations whose several possibilities for error shall not be discussed in this paper, cytophotometric protein determinations with acid dyes depend on the demonstration of reactive groups—in our experiments free amino groups—and are in good agreement with biochemical data [10, 14, 19]. Cytochemical data are not directly comparable to histoautoradiographic findings [6, 7, 20] since with the latter one is able to follow the incorporation of only a single amino acid, and since these results are also too insensitive to ascertain the concomitant qualitative changes during the synthesis phase which may also exert an influence on the incorporation rate of radioactive amino acids. A decisive answer to the question of simultaneous synthesis of DNA and protein, however, may be possible only through experimentation with synchronously growing tissue culture cells, as was suggested by Seed [2] in his most recent paper. In this context it is of interest that Mohberg and Rusch [8] found simultaneous synthesis of DNA and histone protein in synchronously growing slime mould Physarum polycephalum. The temporal independence of total protein synthesis in the cell and DNA replication, which was here ascertained from the broad dissociation of values for cytoplasmic protein and DNA, is in good agreement with previous results in the literature [4, 5].

RESUME

On a utilisé les méthodes cytophotométriques pour déterminer le contenu de l'ADN et des protéines totales et histones des cellules d'une tumeur d'Ehrlich ascitique et on a constaté qu'il existe une corrélation entre le contenu de l' ADN et celui des protéines histones et totales du noyau. On a interprété cette corrélation comme étant la synthèse simultanée de l'ADN et des protéines nucléaires pendant l'interphase. Il n'y a pas de corrélation entre le contenu de l'ADN et celui des protéines cytoplasmiques.

SUMMARY

By means of sequential cytophotometric determinations of DNA, total protein and histone protein from cells of an Ehrlich ascites tumour a high correlation of DNA content with nuclear total protein and histone protein was found, indicating a simultaneous synthesis of DNA and nuclear protein during interphase. There was no correlation between DNA content and cytoplasmic protein.

ZUSAMMENFASSUNG

Mittels aufeinanderfolgender zytophotometrischer Bestimmung von DNS, Gesamtprotein und Histonprotein an Zellen eines Ehrlich Aszites Tumors wurde eine hohe Korrelation des DNS-Gehaltes mit dem Histon- und Gesamtoproteingehalt des Kernes gefunden, wonach eine gleichzeitige Synthese von DNS und Kernproteinen während der Interphase angenommen wird. Es fand sich keine Korrelation des DNS-Gehaltes mit den zytoplasmatischen Proteinen.

REFERENCES

1. J. Seed, The relations between DNA, RNA and protein in normal embryonic cell nuclei and spontaneous tumour cell nuclei. *J. Cell Biol.* **20,** 17 (1964).
2. J. Seed, The synthesis of DNA, RNA and nuclear protein in normal and tumour strain cells. *J. Cell Biol.* **28,** 233 (1966).
3. A. Zetterberg and D. Killander, Quantitative cytochemical studies on interphase growth. *Exp. Cell Res.* **39,** 22 (1965).
4. A. Zetterberg and D. Killander, Quantitative cytophotometric and autoradiographic studies on the rate of protein synthesis during interphase in mouse fibroblasts *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **40,** 1 (1965).
5. W. Sandritter, H. G. Schiemer, H. Kraus and U. Dörrien, Das Wachstum von Einzelzellen in der Gewebekultur. Interferenzmikroskopische Untersuchungen an HeLa Zellen. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7,** 579 (1960).
6. W. G. Niehans and C. P. Barnum, Incorporation of Radioisotope *in vivo* into ribonucleic acid and histone of a fraction of nuclei preparing for mitosis. *Exp. Cell Res.* **39,** 435 (1965).
7. M. Crippa, The rate of ribonucleic acid synthesis during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* **42,** 371 (1966).
8. J. Mohberg and H. Rusch, Isolation of nucleic acid and histones from the plasmodium of physarum polycephalum. *J. Cell Biol.* **23,** 61A (1964).
9. J. Filkuka, G. Schlüter and W. Sandritter, DNS-gehalt und Chromosomenzahl eines pseudodiploiden Ehrlich Aszitestumors. *Europ. J. Cancer.* To be published.
10. A. D. Deitch, Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye Naphthol Yellow S, by tissue sections and by purified proteins. *Lab. Invest.* **4,** 324 (1955).
11. D. P. Bloch and G. C. Godman, A microspectrophotometric study of the synthesis of DNA and nuclear histone. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1,** 17 (1955).
12. W. Sandritter, H. G. Schiemer and H. Schröder, Aufbau und Betrieb eines einfachen Zytophotometers für sichtbares. *Licht. Z. wiss. Mikr.* **63,** 453 (1958).
13. E. M. Deeley, An integrating microdensitometer for biological cells. *J. sci. Instrum.* **32,** 263 (1955).
14. M. Alfert and J. J. Geschwind, Selective staining method for basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **39,** 991 (1953).
15. B. Lederer und W. Sandritter, Sukzedane zytophotometrische Bestimmung von DNS, Histon und Gesamtprotein. *Histochemie* **7,** 288 (1966).
16. E. S. Meek, Quantitative cytochemical analysis of protein and desoxyribonucleic acid in ascites tumour cells. *Brit. J. Cancer.* **16,** 157 (1962).
17. J. Woodard, E. Rasch and H. Swift, Nucleic acid and protein metabolism during the mitotic cycle in *Vicia faba*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9,** 445 (1961).
18. P. Rommel, Über den DNS und Histonproteingehalt von Zellen der Gewebekultur. Inaugural Diss, Frankfurt (1960).
19. N. R. Ringertz and A. Zetterberg, Cytochemical demonstration of histones and protamines. Mechanism and specifity of the alkaline bromphenol blue binding reaction. *Exp. Cell Res.* **42,** 243 (1966).
20. D. McCave, Incorporation of tritium labeled thymidine and lysine into chromosomes of cultured human leukocytes. *J. Cell Biol.* **29,** 209 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 25–28. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Use of a Transplantable Myxosarcoma of the Golden Hamster for Chemotherapeutic Examinations

DIETMAR GERICKE and KLAUS ENGELBART
Farbwerke Hoechst AG., vormals Meister Lucius & Brüning Frankfurt (Main)-Höchst

A CONSIDERABLE number of tumours in golden hamsters have been described in the literature [1–5]. A part of them were spontaneous ones, the others are produced by induction and then transplanted. Since there exists to our knowledge no myxosarcoma among the tumours reported thus far the following observation will be described.

TRANSPLANTATION

For years we have continuously kept a large stock of golden hamsters which were bred within a colony. About 1½ years ago we observed in one animal a swelling in the area of the right cheek pouch — not a rare finding in hamsters, since this area is particularly prone to abscess formation. Since palpation did not suggest an abscess, surgical removal was carried out.

After separation of material for deep-freeze preservation [6], we transplanted the tumour into the left flank by subcutaneous inoculation of tumourbrei in Hank's solution. The transplantation was successful in 90 per cent of the cases without any pre-treatment and irrespective of the animal's sex. The latent period until manifestation of the tumour was 15–18 days in the first five passages and decreased then to 10–12 days. Further passages up to the twenty-sixth inoculation were carried out between day 18 and 25 with the tumour measuring 2–3 cm in diameter. Since then the tumour material has been preserved in liquid nitrogen in our tumour bank.

MORPHOLOGY

The original tumour of the female animal was approximately hazelnut-size. It was situated in the subcutaneous connective tissue of the right neck-shoulder region and partly adhered to the cheek pouch. It was easily dissected but had to be sharply separated from the cheek pouch. The tumour weighed 8·5 g and had a smooth surface, a tough-elastic consistency. The surface of the incision had a fatty appearance of grey colour. After surgery the animal did not suffer any relapse.

Since the fifth passage we observed macroscopic changes consisting of increasing hemorrhage and mucus formation on the incisions surface. Therefore we performed histological examinations of the original material and of the passages 10, 15, 20.

Fixation of the tissue samples was performed in formalin, embedding in paraffin, staining with H.E., PAS, v. Gieson, toluidine blue, cresyl fast violet and alcian blue. In some cases frozen sections were stained with Fat Red 7 B.

Microscopically the original tumour revealed an abundance in cells and mitoses and showed varying structures. Solidly epithelial, spindle or polymorphocellular sarcomatous areas were

found as well as occasional islets of cartilage and myxomatous sections (Fig. 1).

The latter revealed a mucus reaction of varying intensity. In the tumours of the fifth, tenth and twentieth passage only myxomatous structures were still recognizable between sparse collagenous septa (Fig. 2).

The nuclei were of different size and irregularly circumscribed, they contained coarser chromatin structures and small nucleoli. Between the elongated spindle- or star-shaped cytoplasmic appendages, there was a network whose content was weakly eosinophilic. It reacted positively with PAS, cresyl fast violet and alcian blue and on staining with toluidine blue produced metachromasia. These characteristics decreased in strength in inverse proportion to the increasing number animal passages. The cytoplasm of the tumour cells contained fat droplets, mitoses occurred more frequently. On the basis of these morphological properties the tumour represents a myxosarcoma.

BEHAVIOUR TOWARDS CYTOSTATICS AND CLOSTRIDIA

Chemotherapy trials with the transplantation from passages 5, 9, and 23 were carried out simultaneously. Treatment was performed four times on consecutive days, using the dosages known from earlier trials in hamsters [7, 8]. Assessment was made on the basis of the survival time and the tumour weight.

In Table 1 it is demonstrated that cyclophosphamide and Thio-TEPA exerted an inhibitory effect on the tumour (passage 13) which manifested itself mainly in retarded growth and increased survival time. Animals treated with cyclophosphamide, apart from a prolongation of life, also revealed lower mean tumour weight than those treated with Thio-TEPA.

On the whole, this tumour behaved towards alkylating substances and actinomycin C as other hamster tumours in our collection; like these it was practically resistant.

Finally its sensitivity to spores of *Clostridium butyricum* was investigated. By a technique published earlier in detail [9] tumour bearing animals have been injected with 100 ml of spores *i. v.* During observation until death of the animals a maximum lysis of 30 per cent was obtained.

DISCUSSION

Some authors [10–13] have reported about their experiences in chemotherapy of hamster tumours. The sensitivity of the strains used varied very much. The pancreatic tumour No. 1 (Fortner) tested by Sugiura [10] was inhibited strongly by cyclophosphamide and other alkylating agents; it was resistant against

Table 1. *Chemotherapeutic experiments with the hamster myxosarcoma*

Preparation	Dose (mg/kg)	m.t.d.* day 14 (mm)	m.t.d. day 19 (mm)	m.t.d. day 27 (mm)	m.t.d. (mm)	m.s.t.† (days)	t.w.‡ (g)
Controls		18·4	27·6	27·2	41·2	45·5	48·6
Phosphoric acid-N-allyl anilide-diethylene-imide (C 69)	1·428 4×s.c.	18	30	40	42·4	32·4	46·0
N-diethylene-imido-phosphonyl-N'-phenyl-urea (C 73)	1·785 4×s.c.	16	31·2	30	28·2	27·6	34·5
Cyclophosphamide	17·85 4×s.c.	2·0	9·2	28	40·8	55·0	25·3
Actinomycin C	0·0178 4×i.p.	15·2	28·4	44	43·6	38·7	47·5
Thio-TEPA	0·714 4×s.c.	6·8	24·4	36·4	52·8	59·2	61·0
2,3,5-tris-ethylene-imino benzoquinone-(1,4)	0·025 4×s.c.	13·6	28·8	40	44·4	44·5	40·0

*Mean tumour diameter.
†Mean survival time.
‡Tumour weight.

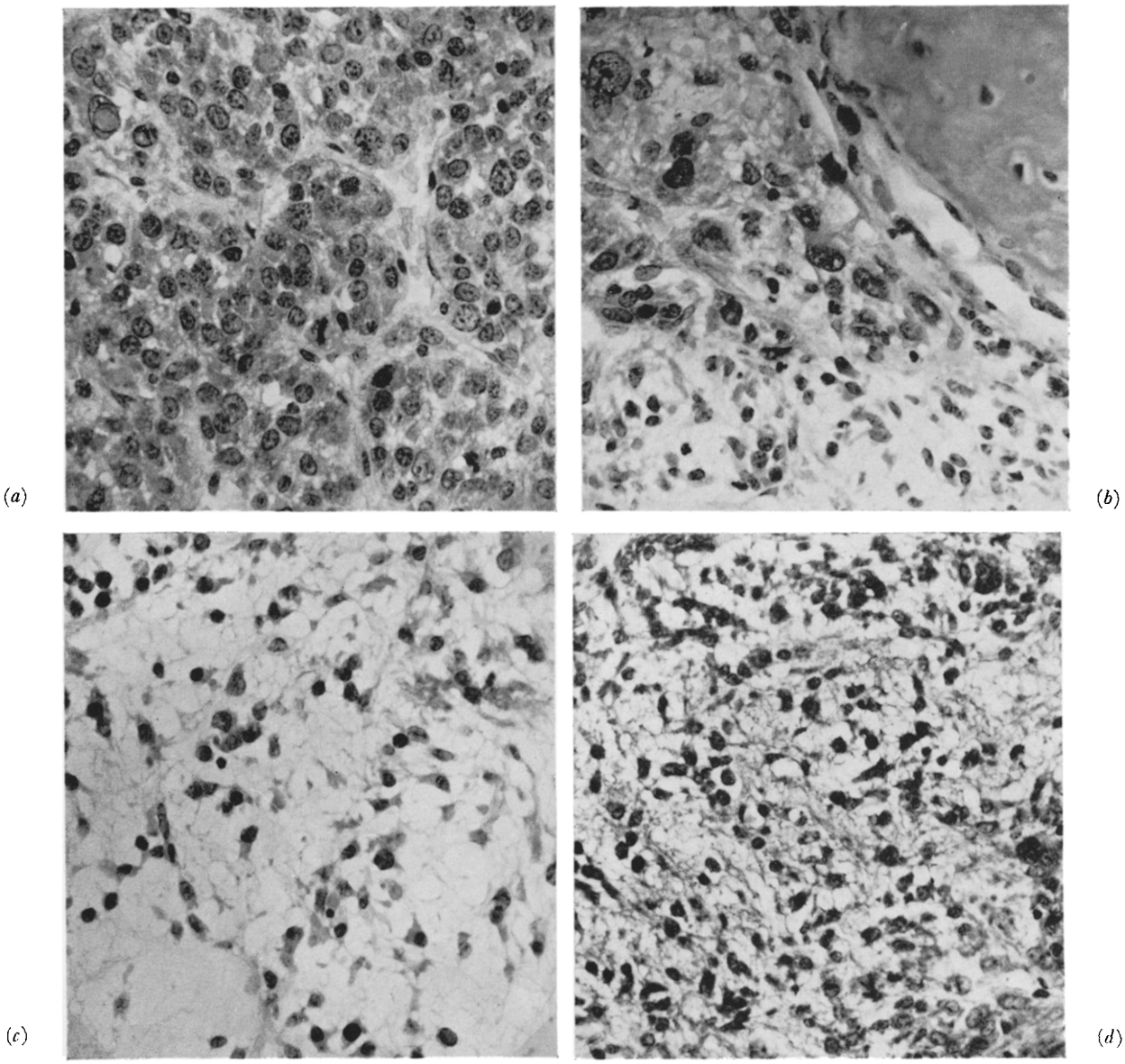
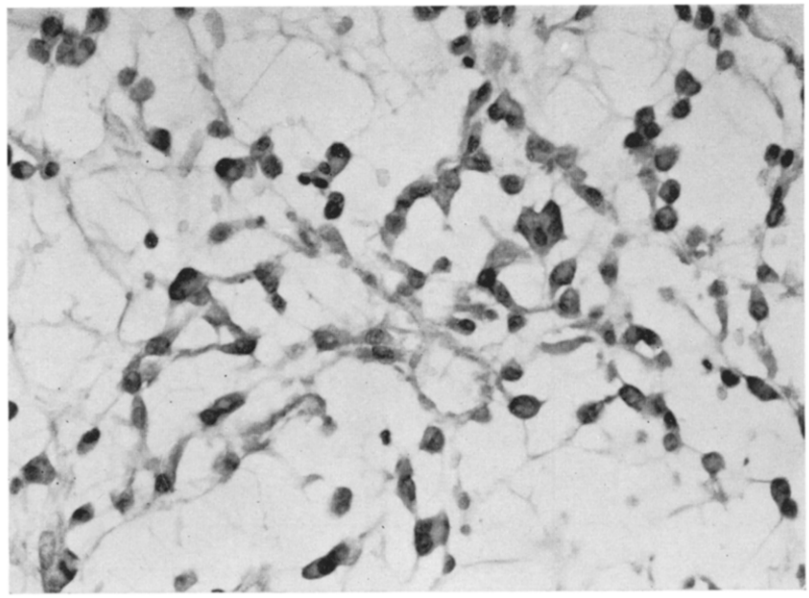


Fig. 1. *Tumour of primary origin.*
(*a*) *the solid-epithelial part* (*H & E*); (*b*) *the chondromatous-polymorphocellular part* (*H & E*); (*c*) *mycomatous parts* (*H & E*); (*d*) *mycomatous parts* (*toluidine blue*). × 350.

(to face p. 26)

(*a*)



(*b*)

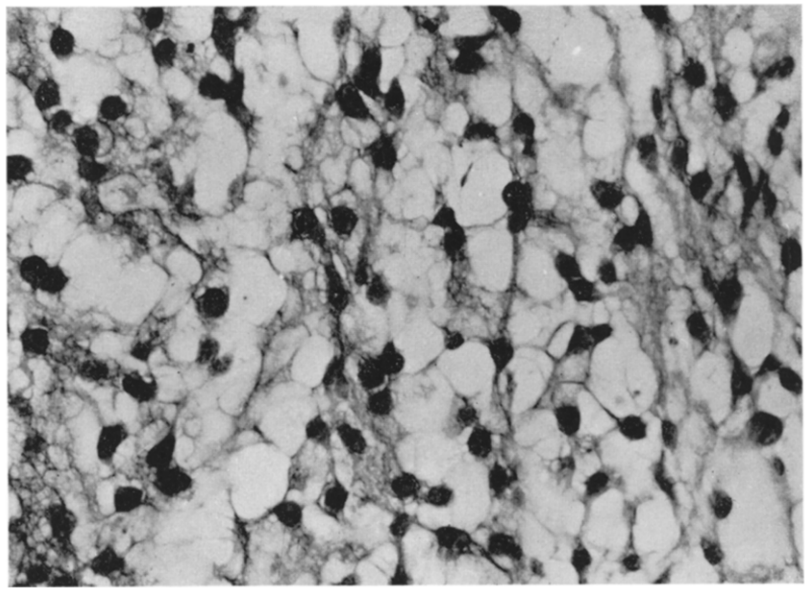


Fig. 2. (*a*) *and* (*b*). *Tumour of the* 20 *passage in hamsters. Myxomatous structures only* (*a*) *H & E;* (*b*) *toluidine blue.* ×350.

actinomycin C.

In contrast to this Crabbs [14] tumour, a transplantable 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene sarcoma is very sensitive against the alkylants (cyclophosphamide, Thio-TEPA, TEM), antimetabolites such as 6-mercaptopurinriboside and antibiotics such as mitomycin C and actinomycin C. In the case of the HAS-1 tumour (Handler), a highly differentiated fibrosarcoma, originally induced by single injection of stainless steel powder, Handler [11] reported that the primary tumour was inhibited under therapy with actinomycin D, Thio-TEPA and sarcolysin. But these compounds did not influence the metastasation.

Thomson *et al.* [12] reported about the sensitivity of the plasmacytoma No. 1 (Fortner) against cyclophosphamide; they observed also in later passages with cyclophosphamide a development of resistance and a cross-resistance against TEM.

In contrast to these findings, the myxosarcoma reported by us demonstrates a relative, so rather low, sensitivity against cyclophophamide and Thio-TEPA only, whereas it is resistant against other alkylating and actinomycin C. Our findings with clostridial spores are different from our own experience with other tumours of the hamster. All the others tested so far, Amelanotic Melanoma (A.Mel. No. 3, A.Mel. No. 4), Renal Carcinoma (R.Ca. No. 1), Hepatoma (Hep. No. 1) (Fortner) were highly sensitive and we observed large lyses up to total lysis. The myxosarcoma is slightly sensitive only in so far as we found only lyses up to 30 per cent.

RESUME

Nous avons observé une tumeur spontanée du hamster doré qui, à l'examen histologique, put être définie comme un myxosarcome, et dont nous donnons la description. L'étude de son comportement, en présence de substances cytostatiques alkylantes et d'actinomycine C, révéla une sensibilité relative au cyclophosphamide et au Thio-TEPA, et une insensibilité presque totale aux spores de Clostridium butyricum.

SUMMARY

A spontaneous myxosarcoma observed in a golden hamster is described. Assessment of its behaviour towards alkylating cytostatics and actinomycin C revealed a relative sensitivity to cyclophosphamide and Thio-TEPA. The tumour was practically insensitive to spores of Clostridium butyricum.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Spontantumor beim Goldhamster beobachtet, der sich histologisch als Myxosarcom erwies. Die Testung gegen alkylierende Cytostatica und Actinomycin C ergab eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Cyclophosphamid und Thio-TEPA. Der Tumor war praktisch unempfindlich gegenüber Sporen von Clostridium butyricum.

REFERENCES

1. E. D. Crabb, Transplantable and transmissible tumours of animals. In: *Atlas of Tumor Pathology*, Sec. XII, Fasc. 40, Washington D.C., (1959).
2. F. Schmidt and Z. Brada, Eine Teilübersicht über in europäischen Laboratorien gehaltene tierische Transplantationstumoren. *Zschr. Versuchstierkunde* **4,** 122 (1964).
3. P. Sträuli and G. Hämmerle, Ueber ein spontanes, transplantables lymphoreticulocytäres Sarkom des Goldhamsters. *Zschr. Krebsforsch.* **63,** 503 (1960).
4. P. Sträuli, Morphogenetische Untersuchungen an einem lymphoreticulocytären Sarkom des Goldhamsters. *Path. et Microbiol. (Basel)* **25,** 301 (1962).
5. J. G. Fortner, *et al.*, Transplantable tumors of the syrian (golden) hamster. I. Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas. II. Tumors of the hemapoietic tissues, genitourinary organs, mammary glands and sarcomas. *Cancer Res.* **21,** 161 (1961).
6. D. Gericke, Some experiences with the preservation of tumor materials in liquid nitrogen. *Europ. J. Cancer* **2,** 285 (1966).

7. D. GERICKE, Ueber die Wirkungs eines Diäthylenimids bei einigen experimentellen Tumoren. II. *Int. Symp. Chemotherpie, Neapel* 1961, III: 94 (1963). Karger, Basel.
8. D. GERICKE, Erfahrungen mit neuren Aethyleniminen. *Neoplasma Bratisl.* **11,** 329 (1964).
9. K. ENGELBART and D. GERICKE, Oncolysis by Clostridia, V. Transplanted tumors of the hamster. *Cancer Res.* **24,** 239 (1964).
10. K. SUGIURA, Experimental chemotherapy of cancer — A report of progress. *Progr. exp. Tumor Res. Basel (New York)* **2,** 332 (1961).
11. A. H. HANDLER *et al.*, Chemotherapy studies on primary tumor grafts and metastases in hamsters and mice. *Acta Un. int. Cancr.* **20,** 176 (1964).
12. J. R. THOMSON, Some observations on the carcinostatic activity of Eponates on Fortner hamster plasmacytoma. *Cancer Chemother. Rep.* **28,** 5 (1963).
13. F. M. SCHABEL Jr., Experimental evaluation of potential anticancer agents. II. Studies on the growth characteristics, metastases and drug response of hamster neoplasms of diverse 'sites of origine'. *Cancer Res.* **21,** 235 (1961).
14. E. D. CRABB, A transplantable 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene sarcoma of the hamster. *Cancer Res.* **6,** 627 (1946).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 29–36. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Die Verteilung von Tris-aethylenimino-benzochinon (Trenimon®) im Organismus der Ratte

P. OBRECHT, J. W. WOENCKHAUS und N. E. FUSENIG
Medizinische Univ.-Klinik Freiburg i/Br.

Die Wirkung eines Zytostatikums ist von seiner Konzentration am Wirkungsort abhängig. Ähnliche Zusammenhänge sind von der antibakteriellen Chemotherapie bekannt. Die vielfach enttäuschende Leistung zytostatischer Massnahmen beim Krebs des Menschen beruht nicht zuletzt darauf, dass es bisher nicht gelingt, ausreichende Wirkdosen an den Tumor heranzubringen, ohne gleichzeitig vitale Organe erheblich mit zu schädigen.

Es erschien uns daher lohnend, am Beispiel des häufig angewandten Zytostatikums und Alkylans Trenimon, wie schon früher für N-Methyl-bis-chloräthylamin (Dichloren®) beschrieben [1] festzustellen, welche Konzentrationen in normalen und neoplastischen Geweben erreicht werden. Die Beurteilung der Ergebnisse liess ferner Einblicke in den Wirkungsmechanismus alkylierender Substanzen vor allem von Trenimon erhoffen. Wir verwendeten zu seinem Nachweis das γ-(Nitro-4-benzyl)-pyridin (=NBP; s.Methode), das alkylierende Substanzen erfasst [2].

METHODE

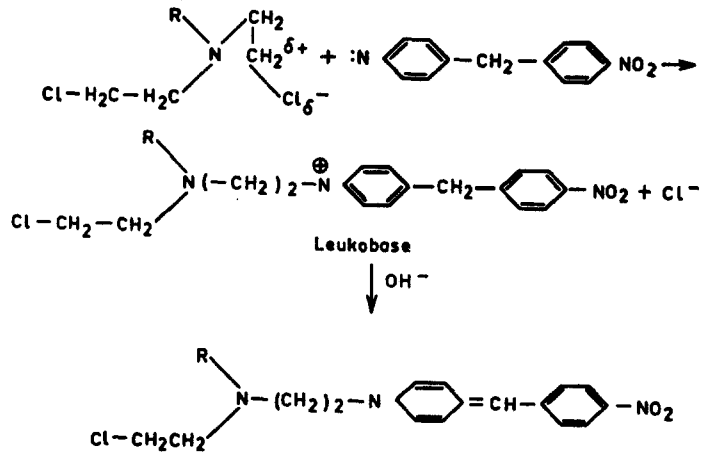
a. Herstellung von NBP

aa. Herstellung von 4-Benzylpyridinnitrat — 20g 4-Benzylpyridin (Fa. Karl Roth, Karlsruhe) werden in 8,4 ml konzentrierter Salpetersäure (d=1,42) und 20 ml Wasser gelöst, abgekühlt (Kältemischung: Methanol-Eis) und 5 Stunden bei −20°C aufbewahrt. Anschliessend wird bei Raumtemperatur abgesaugt und über Phosphorpentoxyd getrocknet. Der Schmelzpunkt des 4-Benzylpyridinnitrates liegt bei 100–105°C.

ab. Herstellung von γ-(Nitro-4-benzyl)-pyridin — Die Herstellung von NBP erfolgte in Anlehnung an Nunn u.Mit. [3]: Zu 20g 4-Benzylpyridinnitrat werden während einer halben Stunde etwa 40 ml eisgekühlte konzentrierte Schwefelsäure zugefügt. Man erwärmt diese Mischung 5 min. lang auf 50°C und giesst sie auf Eis. Unter fortwährender Kühlung (Kältemischung: Eis–Kochsalz; die Temperatur darf nicht über +10°C steigen) wird die Lösung vorsichtig mit 25% Ammoniak alkalisiert. Anschliessend Extraktion mit Äther. Nach 3-stündiger Trocknung über Natriumsulfit wird der Extrakt auf etwa 40 ccm eingeengt, auf eine Kristallisierschale umgegossen, eingedampft (bis auf etwa 15 ml) und das kristallisierte Produkt aus Äther und Petroläther umkristallisiert. Gelbliche Nadeln, Schmelzpunkt 72–73°C.

b. NBP-Reaktion in biologischem Material

Prinzip — NBP eignet sich zum Nachweis von alkylierenden Substanzen [2]. Es reagiert infolge seines freien Elektronenpaares am



Gleichung I. Reaktion alkylierender Substanzen mit γ-(Nitro-4-benzyl)-pyridin (=NBP).

Pyridin-N als nukleophiles Reagens mit den elektrophilen Alkylantien (Gleichung I). Das entstehende Reaktionsprodukt ist im alkalischen Milieu violett und hat eine charakteristische Absorptionsbande bei 565 mμ.

Trenimon wurde jensensarkomtragenden Ratten in einer Dosis von 3,3 mg/kg in die Schwanzvene injiziert. Sofort, 5, 10, 30, 60 min. sowie 1 1/2, 2, 6 und 12 Stunden p.i. liessen wir die Tiere in Nembutalnarkose durch Punktion des rechten Ventrikels ausbluten. Auffangen des Blutes. Abzentrifugieren seiner geformten Bestandteile bei 3000 Upm. Gleichzeitig präparierten wir möglichst schnell Leber, Lunge, Milz, Nieren, Darm, Hoden und Tumor frei. Je lg Organ wurde in Zitronensäure | Phosphat-Puffer (Organ: Puffer = 1: 4) von pH 4,62 im Ultra-Turrax bei 15000 Upm homogenisiert und anschliessend bei 3×10^3 Upm 10 min. lang zentrifugiert. 2 ml des Homogenates bzw. 2 ml Plasma, das exakt auf pH 4,62 eingestellt sein muss und dem 0,5 ml 5%ige NBP-Lösung in Dioxan zugefügt worden waren, erwärmt man 30 min. auf 80°. Bis zum Beginn des Erwärmens waren vom Ende der Injektion an durchschnittlich 20 min. vergangen. Danach rasche Abkühlung im Eisbad und anschliessende Alkalisierung mit 1 ml konzentrierter Piperidinlösung. Bei positiver Reaktion tritt die typische violette Farbe auf. Der entstehende Farbstoff wird rasch mit 6 ml eines wasserfreien Gemisches von Aceton: Essigsäureäthylester (1: 5) ausgeschüttelt. Die Extinktionsmessung erfolgt 4 min. nach Alkalisierung im Photometer Eppendorf bei 546 mμ. An Hand einer Eichkurve kann dann die Menge alkylierender Substanz bestimmt werden.

In derselben Weise wurde die NBP-Reaktion im Urin 1 1/2, 2, 3, 6, 12 und 18 Stunden nach der Injektion von Trenimon durchgeführt.

Da beim Zentrifugieren Trenimon oder seine alkylierungsfähigen Abbauprodukte an das Zentrifugat absorbiert werden können, wurden wiederholte Stichproben mittels der NBP-Reaktion durchgeführt. Sie ergaben stets kaum messbare und daher zu vernachlässigende Mengen an alkylierender Substanz.

Die wiedergegebenen Mengen an alkylierender Substanz sind Durchschnittswerte, denen meist Einzelbestimmungen an 10 Ratten zugrunde liegen (Abb. 2 und 3); sie werden quantitativ meist in nMol ausgedrückt. Wir sind uns dabei bewusst, dass evtl. am Trenimonmolekül stattfindende chemische Veränderungen (s. Diskussion) unberücksichtigt bleiben.

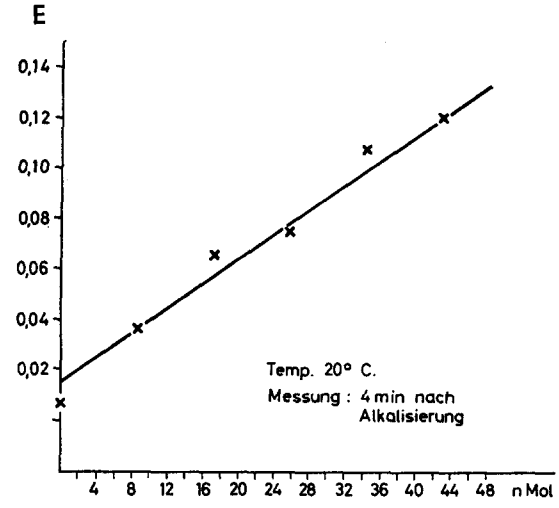


Abb. 1. Eichkurve. Alkylierungsfähigkeit im Serum der Ratte nach Inkubation mit Trenimon®.

c. Bestimmung des Verlustes an Alkylierungsfähigkeit von Trenimon in Organhomogenaten und Körperflüssigkeiten der Ratte

Im Verlauf der Bestimmung alkylierender Substanz in biologischem Material stellte sich heraus, dass schon kurze Zeit nach der Injektion

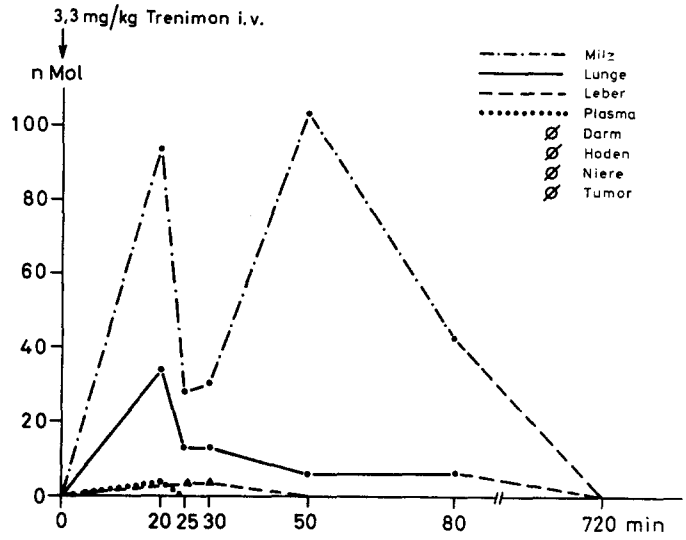


Abb. 2. Alkylierungsfähigkeit in Organhomogenaten und im Plasma der Ratte nach Injektion von 3,3 mg/kg Trenimon® i.v.

von Trenimon nurmehr ein Bruchteil desselben nachweisbar ist. Es ist anzunehmen, dass Trenimon schon sehr früh abgebaut wird (Alkylierung, Hydrolyse) und dabei seine Alkylierungsfähigkeit einbüsst. Um einen Anhaltspunkt für die Abbaugeschwindigkeit von Trenimon in den einzelnen Organen, Blut

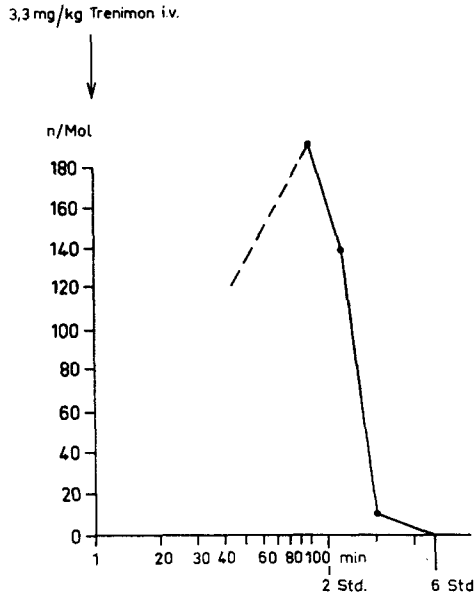


Abb. 3. Alkylierungsfähigkeit im Urin der Ratte nach Injektion von 3,3 mg/kg Trenimon® i.v.

und Urin zu gewinnen, haben wir bei Zimmertemperatur (20°C) jeweils 20 µg Trenimon/ml Organhomogenat bzw. Serum und Urin zugegeben und bestimmten die verbleibende Alkylierungsfähigkeit sofort, 10 min, 1/2, 1, 2, 6 und 12 Stunden (+20 min) nach Addition des Alkylans; dasselbe wurde in Zitratpuffer (pH=4,6) als Kontrolle durchgeführt.

d. Bestimmung des Gehaltes an Restblut in den Organen der Ratte

Zur Vermeidung von Fehlerquellen beim Nachweis von Alkylantien war es erforderlich, den Anteil an Restblut in den einzelnen Organen zu messen, da grössere Blutbeimengungen durch ihren eigenen Gehalt an alkylierender Substanz falschpositive Werte vortäuschen können. Wir bedienten uns hier zu der Cyan-Hb-Methode nach Betke und Mit. [4]: Es wurden jeweils 0,01 ml Organhomogenat mit 5 ml Drabkinscher Lösung versetzt. Aus dem erhaltenen Hb-Wert des Blutes, der bei dem Alter unserer Ratten, entsprechend den Befunden von Reincke [5] etwa 19 g% beträgt, ist auf die Menge des Restblutes in den Organen zu schliessen. Unter Berücksichtigung des Zytostatikum-Gehaltes des Blutes errechnet sich dann die durch das vorhandene Restblut bedingte Zunahme des Alkylans. Dieser Wert belief sich auf maximal 0,5 µg/ml und unterschritt damit die Empfindlichkeitsgrenze der NBP-Reaktion. Die Blutbeimengungen in den Organen konnten daher vernachlässigt werden.

ERGEBNISSE

1. *Eichkurve*

In Abb. 1 ist die Eichkurve der NBP-Reaktion mit Trenimon im Rattenserum wiedergegeben. Die Empfindlichkeit des Nachweises von alkylierender Substanz unter unseren Versuchsbedingungen (s.o.) ist daraus ersicht-

lich. Die untere Empfindlichkeitsgrenze liegt bei etwa 4 nMol.

2. *Nachweis von alkylierender Substanz nach der Gabe des Zytostatikums Trenimon® in Organen und Körperflüssigkeiten der Ratte*

Die gegebene Empfindlichkeit bestimmt die Höhe der Dosis an alkylierendem Zytostatikum, die *in vivo* verabreicht werden muss, damit es im Organismus der Ratte nachweisbar wird. Wie ausgedehnte Vorversuche ergaben, liegt diese bei 3,3 mg/kg Körpergewicht; das entspricht etwa der 10-fachen DL_{50}.

Injizieren wir 3,3 mg/kg Körpergewicht Trenimon i.v., so gelingt es, alkylierende Substanz in einigen Organen der Ratte — mit grossen Schwankungen der Einzelwerte — festzustellen. Die Milz ist unter den untersuchten Organen dasjenige mit der höchsten Konzentration an Alkylans; dann folgen die Lungen (Abb. 2). Die niedrigsten, eben noch messbaren Werte finden sich in Plasma und Leber. In Darm, Nieren, Hoden und Tumor kann keine alkylierende Substanz nachgewiesen werden. Das ist um so auffallender, als das Jensen-Sarkom deutliche Regressionserscheinungen aufwies. Es muss demnach eine ausreichende Menge an Zytostatikum dorthin gelangt sein. Im Darm weisen zytologische und histologische Veränderungen ebenfalls auf einen abgelaufenen zytostatischen Effekt hin [6].

Der Kurvenverlauf der NBP-Reaktion im einzelnen zeigt, dass es nach Verabreichung des Zytostatikums rasch, insbesondere in Milz und Lunge, zu einem Konzentrationsmaximum kommt. Es beträgt zum frühest möglichen Zeitpunkt, d.h. nach höchstens 20 min Einwirkungszeit von Trenimon, in der Milz ca.95 nMol und in der Lunge rund 35 nMol. Die Fähigkeit zu alkylieren nimmt danach in beiden Geweben innerhalb von wenigen Minuten ab, um im Falle der Lungen nach 25 min langsam im Verlauf von 12 Stunden auf nicht mehr messbare Werte zu sinken. In der Milz kommt es dagegen 50 min p.i. zu einem überraschenden zweiten Gipfel, der etwa in Höhe des ersten liegt. Dieser ist sehr steil, so dass 80 min. p.i. nurmehr 43 nMol Alkylans nachweisbar sind. Auf seine Bedeutung soll später eingegangen werden. Nach 12 Stunden wird auch in der Milz die Reaktion negativ, nachdem das Plasma schon nach 40 min. und die Leber 50 min. p.i. frei von alkylierender Substanz sind.

Der in den untersuchten Organen der Ratte wiedergefundene Anteil an alkylierender Substanz berechnet sich auf nicht mehr als 7% der applizierten Dosis Trenimon (s.u.).

Die Höhe der Ausscheidung eines Zytostatikums bzw. an Alkylans im Urin kann Hinweise auf seinen vom Organismus zurückgehaltenen Anteil geben. Wir verfolgten deshalb die Exkretion von alkylierender Substanz im Urin. Sie kommt sehr schnell in Gang (Abb. 3). Schon 1 1/2 Stunden p.i. — frühere Bestimmungen sind wegen der ungenügenden Harnmenge nicht möglich — hat der Urin mit annähernd 190 nMol Alkylans seine maximale Alkylierungsfähigkeit erreicht. Das sind rund 9% der applizierten Dosis Trenimon. Der Kurvenverlauf der NBP-Reaktion fällt dann steil ab Zwei Stunden p.i. sind nur noch geringe Spuren (8,66 nMol) an alkylierender Substanz im Urin nachweisbar.

Die NBP-Reaktion wurde jeweils an einer Probe des nach der Injektion bis zu dem angegebenen Zeitpunkt gelassenen Urin durchgeführt. Die erhaltenen Werte sprechen dafür, dass die alkylierende Substanz im Urin chemischen Veränderungen unterworfen wird, die den raschen Verlust ihrer Alkylierungsfühigkeit zur Folge haben. Der geringe Prozentsatz an alkylierender Substanz, den wir im Organismus der Ratte nach der Gabe von Trenimon wiederfanden, könnte in dieselbe Richtung weisen.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Reaktion von Trenimon bei Zimmertemperatur (20°C) in Organhomogenaten bzw. Plasma und Urin geprüft und mit seinem Verhalten in physiologischer Kochsalzlösung verglichen (Abb. 4). Wir addierten pro ml Homogenat

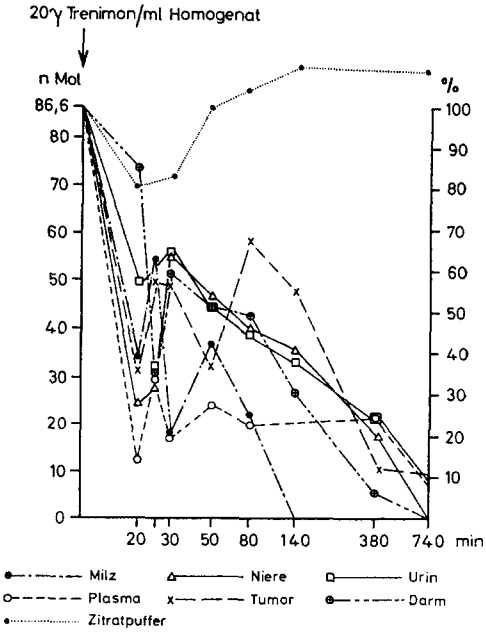


Abb. 4. Alkylierungsfähigkeit in Organhomogenaten, im Plasma und im Urin der Ratte nach Inkubation mit 20 γ/ml Trenimon®. Kontrolle: Zitrat-Puffer, pH 4,62.

der verschiedenen Organe (siehe Methode) 20 µg Trenimon (=80,66 nMol) und verfolgten den Ausfall der NBP-Reaktion in den selben zeitlichen Abständen wie *in vivo*. Es zeigte sich hierbei, dass der Verlust an Alkylierungsfähigkeit innerhalb der ersten 20 min. am grössten ist und etwa 70% beträgt. Die Geschwindigkeit, mit der Trenimon abgebaut wird, ist in den einzelnen Geweben unterschiedlich. Seine Halbwertszeit ist im Plasma mit etwa 12 Minuten am kürzesten. Sie nimmt geringgradig in folgender Reihenfolge zu: Niere, Tumor, Milz, Urin. Im Darm ist sie am längsten, nämlich etwa 25 min.

Aus Abb. 4 ist weiter ersichtlich, dass nach einem initialen Abfall der Alkylans-Konzentration in allen Organen ein vorerst noch unklarer kurzfristger, verschieden starker Wiederanstieg der Alkylierung zu beobachten ist.

Die Kontrolle in physiologischer Kochsalzlösung zeigt nur unerhebliche Schwankungen (s. Diskussion). Sie scheint sich demnach gegenüber den Testproben von Organhomogenaten und Urin hinsichtlich ihrer Alkylierungsfähigkeit verschieden zu verhalten.

DISKUSSION

Der NBP-Reaktion liegt, wie bereits früher beschrieben (s. Methode; Abb. 1) eine Alkylierungsreaktion zugrunde. Sie entspricht chemisch derjenigen, die zwischen alkylierenden Zytostatika und nukleophilen Gruppen, wie organischen und anorganischen Anionen, Amino- und Sulfid-Gruppen, stattfindet. Das NBP konkurriert daher stets mit den Körperbausteinen um das Alkylans und kann nur den Teil von diesem erfassen, der noch nicht alkyliert hat oder metabolisiert wurde und noch alkylierungsfähig ist.

Die Abnahme der Alkylierungsfähigkeit ist in biologischem Milieu, *in vivo* wie *in vitro*, innerhalb der ersten 20 min. nach Verabreichung bzw. Inkubation von Trenimon am stärksten: so betrug die Halbwertszeit von Trenimon im menschlichen Plasma 12 min. Vergleichbare Werte beliefen sich für das sekundäre Nor-HN2 (N,N-bis (2-chloroaethyl)-amin) auf 2 und für das tertiäre HN2 (N,N-bis (2-chloroaethyl)-N-methylamin) auf 9 min. [7].

Es kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht sicher entschieden werden, ob für den schnellen initialen Abbau von Trenimon allein eine Alkylierung oder ein anderer Umwandlungsvorgang, wie z. B. eine Hydrolyse mit Abspaltung der Äthyleniminreste (Zusammenfassung bei [8]) verantwortlich zu machen ist. Der Kurvenverlauf des Inkubationsversuches (Abb. 5) mit steilem Abfall und nachfolgendem Wiederanstieg der Alkylierungsrate lässt es nicht völlig abwegig erscheinen, zwei getrennte Vorgänge anzunehmen:

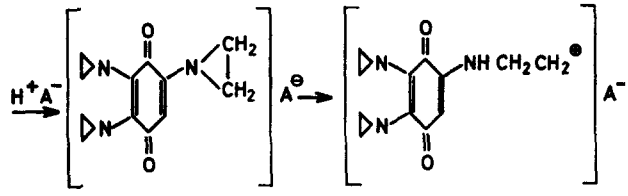
Reaktion 1: Eine schnell innerhalb von 12–25 Minuten, je nach Organ, ablaufende Reaktion, die einen weitgehenden Verlust der Alkylierungsfähigkeit von Trenimon verursacht und
Reaktion 2: einen stärker protrahierten Prozess, der zur Bildung einer Substanz führt, die nur relativ langsam mit den nukleophilen Gruppen des Blutes und der Organe reagiert. Ihre Alkylierungsfähigkeit bleibt über längere Zeit erhalten.

Ad 1: Für die erste, rasche Reaktion von Trenimon ist in Analogie zu den Verhältnissen beim sekundären nor-HN2 eine enzymatische Reaktion durchaus in Betracht zu ziehen. Williamson u. Mit. [7] führen die kurze Halbwertszeit (ca. 2 min.) im Frischblut bei diesem Zytostatikum auf ein Enzym zurück, das in Anwesenheit von CO_2 die Bildung von Carbamat (Gleichung II) katalysiert und substituierte Oxazolidinone entstehen lässt [9, 10].

$$R_2NH + CO_2 \rightleftharpoons R_2NCOO^{\ominus} + H^{+}$$

Gleichung II. Siehe Text.

Die gespannten Äthyleniminringe von Trenimon sind durch Verbindungen mit aciden H-Atomen leicht aufspaltbar [8]. Die entstehenden Säureester des Hydroxyaethylaminochinons (Gleichung III) sind ebenfalls sekun-

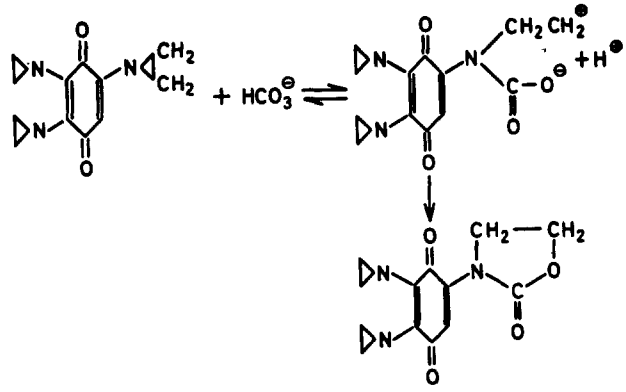


Gleichung III. Siehe Text.

däre Amine. Diese dürften daher auch wie das nor-HN2 mit CO_2 reagieren und über das Carbamat in das entsprechende Oxazolidon übergehen (Gleichung IV).

Die Reaktion von NBP mit Trenimon setzt übrigens gleichfalls die offene Ringform zumindest eines Äthylenimins voraus. Sie ist damit ein indirekter Beweis dafür, dass diese auch *in vivo* auftritt.

Ad 2: Eine Stütze für die zweite, später einsetzende Reaktion, bei der eine alkylierende Substanz entstehen soll, kann insbesondere in der erneuten Zunahme der Alkylierungsfähig-



Gleichung IV. Siehe Text.

keit im Inkubationsversuch, wie auch im Milzhomogenat nach *in vivo*-Applikation von Trenimon erblickt werden. Diese nimmt nur allmählich ab und ist bis zu 12 Stunden, mindestens aber 140 min. lang (Milz) nachzuweisen. Im frischgelassenen Gesamturin wird das Alkylans ebenfalls vergleichsweise nur langsam zerstört. Die Beteiligung eines enzymatischen Vorgangs ist hier eher unwahrscheinlich. Daher spricht gerade das allmähliche Nachlassen der Alkylierungsfähigkeit dafür, dass ein qualitativer Unterschied zwischen der Reaktion 1 und 2 vorliegt und der zweite Vorgang wahrscheinlich eine echte Alkylierung darstellt. Der grosse Unterschied zwischen der Alkylierungskapazität in biologischem Milieu und physiologischer Kochsalzlösung kann ebenfalls in diesem Sinne gedeutet werden. Es könnte sich möglicherweise dabei um die allmähliche Umwandlung eines oder mehrerer Äthylenimine in die offene Ringform handeln.

Ob autolytische Vorgänge ausserdem von Bedeutung sind, in deren Verlauf es zur Abspaltung des Alkylrestes von Körperbausteinen und auf diese Weise zu erneutem Anstieg der Alkylierungsrate kommt, ist zweifelhaft, zumal hinsichtlich des zweiten Milzgipfels *in vivo* solche wohl auszuschliessen sind.

Man könnte ferner beim *in vivo*-Versuch auch an eine wiederholte Zufuhr des Alkylans in die einzelnen Organe denken (s.u.); die isolierte Beteiligung der Milz wäre allerdings etwas ungewöhnlich. Andererseits sind auch bei schwach saurem pH u.U. falsch positive Reaktionen möglich [11]; sie sollten ebenfalls bei dem Versuch, den "zweiten Gipfel" zu erklären, nicht ausser Acht gelassen werden; das gilt natürlich gleichermassen für die beschriebenen Schwankungen der Reaktion in physiologischer Kochsalzlösung.

Die geschilderten Abbauwege von Trenimon können dazu beitragen, unterschiedliche Konzentrationen an Alkylans in den einzelnen Organen zu erklären. In erster Linie dürften hierfür unterschiedliche Aktivitäten des erwähnten enzymatischen Faktors anzuschuldigen sein, die nach Williamson [7] offenbar von Tier zu Tier und auch innerhalb einer Species stark variieren. Ausserdem dürfte die unterschiedliche Anflutung des Alkylans auf dem Blutweg, deren Intensität bekanntlich ebenfalls in den einzelnen Organen verschieden ist, eine weitere Rolle spielen.

Wir verstehen jetzt auch, weshalb in den Organen der Ratte nur noch ein Bruchteil des injizierten Trenimons (etwa 7%) nachgewiesen werden kann. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich die vermuteten Abbauwege von Trenimon experimentell bestätigen lassen.

Anerkennungen — Die Arbeit wurde mit dankenswerter Unterstützung des Badischen Landesverbandes zur Bekämpfung des Krebses durchgeführt.

RESUME

Nous nous sommes basés sur la réaction NBP pour étudier la répartition, la durée de séjour et l'élimination du cytostatique Tri-éthylène-iminobenzochinon (Trenimon®), dans différents organes, et plus particulièrement dans l'urine de rats porteurs d'un sarcome de Jensen. Nous avons ensuite étudié la destruction du Trenimon lors de l'incubation d'organes homogénéisés, du plasma et de l'urine.

Nous avons pu démontrer ainsi les points suivants:

1. *Le processus de destruction du Trenimon se manifeste* in vivo *peu de temps après son administration, et il est le plus marqué durant les vingt premières minutes* (70%). *Le*

demi-temps d'absorption le plus court a été observé dans le plasma, et nos calculs le fixent à 12 *minutes. Aucune accumulation de la substance alkylante n'apparaît dans le sarcome de Jensen lui-même. La teneur en substance alkylante de la rate et des poumons, qui est élevée par rapport à celle de la tumeur, s'explique sans doute par une circulation sanguine plus active dans ces organes.*

2. *L'élimination de la substance alkylante se produit rapidement dans l'urine, en moins d'une heure et demie.*

3. *Tant lors de l'incubation que dans la rate* in vivo, *la propriété alkylante diminue d'abord, avant d'augmenter considérablement.*

L'interprétation de ces observations, d'un point de vue cinétique, semble indiquer, en première approximation, que le Trenimon est impliqué dans deux réactions différentes. La formation d'un dérivé de l'Oxazolidon paraît être une possibilité à considérer.

SUMMARY

On the basis of the NBP reaction, we studied the distribution, the concentratoin in different organs, and the elimination in the urine, of the cytostatic tri-ethylene-iminobenzochinon (Trenimon®) administered to Jensen's sarcoma bearing rats. The destruction of Trenimon by incubation with homogenized organs, or in plasma and urine, was also studied.

The following observations were made:

1. *The destruction of Trenomin* in vivo *begins shortly after its administration and is more marked during the first* 20 *min, reaching the level of* 70 *per cent. The shortest half time for the absorption has been observed in the plasma and was calculated to be* 12 *min. The Jensen's sarcoma does not show any concentration of the alkylating agent. The amount of the alkylating agent in the spleen and the lungs, which is high compared with that of the tumour, can perhaps be explained by a higher blood flow in these organs.*

2. *The elimination of the alkylating agent takes place rapidly in the urine and is complete in* $1\frac{1}{2}$ *hr.*

3. *In the incubation experiments as well as in the spleen* in vivo, *the alkylating activity decreases first and later increases.*

The findings were discussed from a kinetic reaction point of view from which it was concluded, as a first approximation, that Trenimon was involved in two different reactions. The formation of a derivative from Oxazolidon seems possible.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden in der vorliegenden Arbeit Verteilung, Verweildauer und Ausscheidung des Zytostatikums Tris-aethylen-iminobenzochinon (Trenimon®) in Organen bzw. Urin jensensarkomtragender Ratten mit Hilfe der NBP-Reaktion geprüft. Wir untersuchten ferner den Abbau von Trenimon durch Inkubation in Organhomogenaten, Plasma und Urin.

Es konnte folgendes gefunden werden:

1. *Der Abbauvorgang von Trenimon setzt* in vivo *schon bald nach der Verabreichung von Trenimon ein und ist innerhalb der ersten* 20 *Minuten am ausgeprägtesten* (70%). *Die Halbwertszeit von Trenimon war im Plasma am kürzesten und errechnete sich auf* 12 *Minuten. Im Jensen-Sarkom tritt keine Anhäufung von alkylierender Substanz auf. Der in Milz und Lunge vergleichsweise hohe Spiegel kommt wahrscheinlich durch eine grössere Anflutung auf dem Blutweg zustande.*

2. *Die Ausscheidung von alkylierender Substanz im Urin kommt schnell, innerhalb von* 1,5 *Stunden in Gang.*

3. *Sowohl im Inkubationsversuch sowie auch in der Milz* in vivo *nimmt nach anfänglicher Abnahme die Alkylierungsfähigkeit erneut signifikant zu.*

Die Ursache dieses Befundes wird reaktionskinetisch diskutiert, wobei in erster Linie zwei verschiedene Reaktionen von Trenimon in Erwägung gezogen werden. Die Entstehung eines Oxazolidonderivates halten wir für möglich.

LITERATUR

1. P. Obrecht, J. W. Woenckhaus und K. H. Strickstrock, Zum Nachweis von N-Methyl-bis-chloräthylamin (Dichloren®) im Organismus der Ratte durch 4-p-Nitrobenzylpyridin (NBP). *Z. Krebsforsch.* **66,** 151 (1964).
2. J. Epstein, R. W. Rosenthal und R. J. Ess, Use of γ-(4-nitrobenzyl)pyridine as analytical reagent for ethylenimines and alkylating agents. *Analyt. Chem.* **27,** 1435 (1955).
3. A. J. Nunn und K. Schofield, Experiments on the preparation of certain derivatives of 2- and 4-benzylpyridine. *J. chem. Soc.* 583 (1952).
4. K. Betke und W. Savelsberg, Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin. *Biochem-Z.* **320,** 431 (1950).
5. U. Reincke, Uber die Hämatopoese junger Wistar-Ratten. *Arch. exp. Vet.-Med.* **16,** 303 (1962).
6. P. Obrecht, Unveröffentlichte Versuche.
7. C. E. Williamson, J. G. Kirby, J. I. Miller, S. Sass, S. P. Kramer, A. M. Seligman und B. Witten, Enzyme-alterable alkylating agents. IX. The enzymatic transformation of some nitrogen mustards in the presence of carcone dioxide: Implications in respiration. *Cancer Res.* **26,** 323 (1966).
8. W. Gauss, Chemie der Äthylenimino-Chinone. In: *Therapie maligner Tumoren, Hämoblastome und Hämoblastosen.* I. Band, p. 49. Hrgb. F. Meythaler; Stuttgart (1966).
9. H. Arnold und H. Bekel, Die Oxazolidon-Reaktion von 2-Chloroaethylsubstituierten sekundären Aminen. *Arzneimittel-Forsch.* **14,** 750 (1964).
10. H. M. Rauen, Die Bildungsgeschwindigkeiten von N-β-Halogenaethylaziridinen aus Bis-(β-halogenaethyl)-aminen unter physiologischen Bedingungen. *Arzneimittel-Forsch.* **14,** 855 (1964).
11. R. Preussmann, Persönliche Mitteilung (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 37–46. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Clostridial Oncolysis in Man*

R. W. CAREY,† J. F. HOLLAND, H. Y. WHANG, E. NETER and B. BRYANT

Departments of Medicine and Bacteriology, Roswell Park Memorial Institute, New York State Department of Health, Buffalo, New York

INTRODUCTION

THE PROPENSITY of spores of the genus Clostridium (*C.*) to germinate in necrotic tissues is well known. Tetanus and gas gangrene result from successful colonization of necrotic tissue by pathogenic members of this family of organisms. Parker *et al.* [1], in 1947, showed that mice bearing rapidly growing transplantable sarcomas experienced marked lysis of tumor tissues following direct intratumoral inoculation of *C. histolyticum* spores in a calcium chloride suspension. Treatment with penicillin and antitoxin allowed some animals which experienced tumor lysis to survive longer than non-infected tumor controls. Malmgren and Flanigan [2], in 1955, showed that mice bearing spontaneous or transplanted mammary or other carcinomas, and hepatomas, died of tetanus within 48 hr of intravenous injection of *C. tetani* spores, whereas non-tumor bearing control animals remained asymptomatic for 40 days. Microscopic and cultural examination of tissues revealed that vegetative clostridia were exclusively confined to the tumor, indicating that germination was confined there. The authors suggested investigation of localization of spores of non-pathogenic anaerobes in neoplastic tissue.

After observing tumor lysis in animals given *C. tetani* spores in the course of testing antitoxin, Möse and Möse, in Austria, simultaneously conceived the possibility of colonizing tumors with non-pathogenic anaerobes thereby producing oncolysis. In 1959 they reported that the non-pathogenic *C. butyricum* strains M-55 and M-56 localized and germinated in solid Ehrlich tumors and caused lysis [3, 4]. Aerobically grown control strains did not produce lysis. Solid Ehrlich carcinomas softened several days after intavenous spore administration, gradually became fluctuant, and then broke open, discharging brown liquid, in which vegetative clostridia were easily demonstrable. At the time of oncolysis, most mice succumbed to toxemia [5]. Subsequently, Gericke and Engelbart [6], in Germany, and Thiele, Arison and Boxer [7], in the United States, confirmed and extended the observations of Möse and Möse in rodent neoplasms.

Möse and Möse established the lack of human pathogenicity of the M-55 strain of *C. butyricum* by administering spores to themselves. In collaboration with clinical colleagues they initiated a study of the effect of the M-55 strain on patients with neoplastic disease. Through personal communication [8], we learned that they treated some thirty-six patients either intratumorally or intravenously with 10^6 to $1 \cdot 5 \times 10^9$ spores. In general, intravenous spore administration was well tolerated. Characteristically, low to high grade fever occurred for 6 hr after spore injection, low grade fever for 1–3 days, further increase in temperature from day 5 through day 8, at which time softening was observed in some cases. Leukocytosis was observed at times during oncolysis, but was variable. Unequivocal oncolysis was noted in four out of fourteen patients treated by the intravenous route, including two patients with seminoma and two with osteogenic sarcoma. These observations have subsequently been published [9].

*This investigation was supported by Public Health Service Research Grant No. CA-5834 from the National Cancer Institute.

†Present Address: Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts.

Based upon these suggestive results, and the availability of skilled surgical colleagues and of antibiotics for bacterial problems associated with the spore treatment, we undertook to define further in a carefully controlled clinical trial, the phenomenon of clostridial oncolysis in man following intravenous administration of clostridial spores. The results of this study in the United States are reported here because of the relatively more extensive interest and activity with clostridial oncolysis in Europe.

Before embarking upon human trial, we administered spores to mice bearing spontaneous mammary carcinoma and were successful in obtaining oncolysis. We were able to sustain life through the tumor-lytic episode by utilizing extensive supportive treatment with electrolyte solutions, penicillin, and corticosteroids. It was recognized that greater skill in the use of these therapies would attend their use clinically.

In order to evaluate the antibody response of our patients to *C. butyricum*, a sensitive hemagglutination technique was devised. The present paper presents our laboratory and clinical experience and immunologic observations on five patients treated with *C. butyricum* spores.

METHODS

For both laboratory and clinical studies we used the same M-55 strain of *C. butyricum* isolated by Möse and Möse [3, 4] and kindly provided by Dr. George Boxer of the Merck Institute of Therapeutic Research. Each vial contained approximately 1×10^{10} spores.

Retired female breeders of C3H, DBA, AKD2 and Swiss strains of mice, which had developed spontaneous tumors, were individually caged. Spores ($4{\cdot}5–9 \times 10^7$ in 0·2 ml of saline) were administered by intravenous administration. Supportive medications were administered intraperitoneally upon recognition of tumor lysis. Measurement of tumors in two dimensions was performed daily after treatment.

For the demonstration of *C. butyricum* antibodies, a hemagglutination test was devised, based on the procedures used for the demonstration of numerous other bacterial antibodies [10, 11]. *C. butyricum* spores were grown under anaerobic conditions in thioglycollate broth for 18 hr. The culture was centrifuged at 23,500 G for 20 min and the clear supernate used as antigen. Erythrocytes, in a concentration of 2·5% were washed three times with phosphate hemagglutination buffer (pH 7·3; Difco) and then treated with antigen in a dilution of 1:10 for 30 min at 37°C. The treated red blood cells were washed three times to remove unattached antigen. Serum, in serial two-fold dilutions (0·2 ml), was mixed with equal amounts of modified erythrocytes; the mixtures were incubated in a waterbath at 37°C for 30 min, and the resulting hemagglutination was read after centrifugation at 1300 G for 2 min. Unless indicated otherwise, homologous erythrocytes were used: human cells of blood group O for the titration of antibodies in human serum, rabbit erythrocytes for rabbit antiserum, and mouse erythrocytes for mouse antiserum. This bacterial hemagglutinaton test was converted into a hemolytic system by the use of sheep erythrocytes and guinea pig complement.

RESULTS

C. butyricum *oncolysis in mice*

In thirty-three of forty-nine trials with forty-five mice, intravenous injection of *C. butyricum* spores caused tumor lysis. Half the mice (seven of fifteen) survived who were supportively treated with 1–3 ml of polyelectrolyte solution dependent on daily weight loss, containing 10,000 U penicillin and 2 mg streptomycin per ml, and 2 or 3 mg of hydrocortisone. Only one-fourth survived (four of eighteen) if these measures were omitted. Figure 1 shows the clinical course of a mouse which survived oncolysis on one of two occasions. For unexplained reasons, a specific antibody response

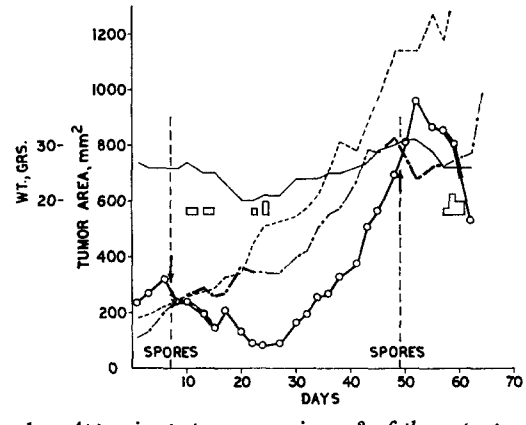


Fig. 1. Approximate tumor area in mm² of three spontaneous adenocarcinomas in CH₃ mice. Measurements made in the two greatest perpendicular axes.

– – – – – – *Control untreated tumor.*

—— – —— *Treated with cortisol, shown in this and next curve with a widened line, 2 mg/day on days 7 through 22 and 46 through 57.*

O——O *A mouse treated with* C. butyricum *spores on days 7 and 49. Cortisol was injected on days 7 through 14 and 57 through 60.*

———— *Weight of spore treated animal.*

□ *Indicates fluid replacement with a polyelectrolyte solution containing penicillin and streptomycin. Unit height indicates 1 ml.*

The tumor became cystic on day 13, ulcerated on day 20 and again became hard and grew after day 27. After retreatment the tumor became cystic on day 50 and ulcerated on day 55.

was not detected in mice after spore treatment or immunization.

Demonstration of C. butyricum *antibodies*

Demonstration of *C. butyricum* antibodies by means of the bacterial hemagglutination test was possible in immunized rabbits and in man. Sera of rabbits which had been immunized intravenously with 2 ml of supernate of the thioglycollate culture of *C. butyricum* in a dilution of 1: 10 on days 1, 3, 8, and 15, were tested with antigenically modified rabbit erythrocytes. It was found that the pre-immunization specimens caused hemagglutination in titers of 1: 10 and the post-immunization specimens in titers ranging from 1: 640 to 1: 2560. The specificity of the reaction was documented by the failure of immune sera to agglutinate, to a significant degree, erythrocytes that had been modified with other unrelated antigens, such as the common antigens of gram-positive and gram-negative bacteria [12, 13]. Furthermore, these immune sera did not agglutinate erythrocytes modified with O antigens of enteric bacteria. Finally, *C. butyricum* cultures specifically removed the antibodies from such antisera.

In the presence of guinea pig complement specific hemolysis occurred with a patient's serum in a titer of 1: 12,800 (Table 1).

Table 1. *Absorption of* C. butyricum *antibody by Krebs* 2 *cancer cells as indicated by lysis of sensitized sheep erythrocytes*

Conditions			
Human antiserum	+	+	+
Inactive complement	+	0	0
Active complement	0	+	+
Pre-incubation of antiserum with antigen-modified Krebs 2 cells	0	0	+
Reciprocal dilutions	Degree of hemolysis		
0			0
50	0	4	
200	0	4	
800	0	4	
1000			0
3200	0	4	
4000			0
12,800	0	3	
16,000			0

1×10^{10}/ml Krebs 2 cancer cells freshly harvested, were washed three times, then incubated 30 min with *C. butyricum* antigen (1: 5), washed three times, and then used for absorption of the active human antiserum. Sheep erythrocytes (2·5%) were treated with antigen in a dilution of 1: 10. The supernatant antiserum was then incubated with sensitized sheep erythrocytes.

Additional studies have revealed that the antisera, in the presence of complement, did not lyse *C. butyricum* vegetative cells. Nor was lysis observed of L-929 fibroblasts or Krebs-2 ascites cells after modification with *C. butyricum* antigens. This failure to observe lysis was not due to lack of attachment of antigen to the cells, for they obsorbed *C. butyricum* antibodies, resulting in prevention of hemolysis of antigenically modified sheep erythrocytes (Table 1).

The question was next explored whether *C. butyricum* antibodies are present in the serum of healthy subjects and of patients with cancer. The results are shown in Fig. 2 and indicate

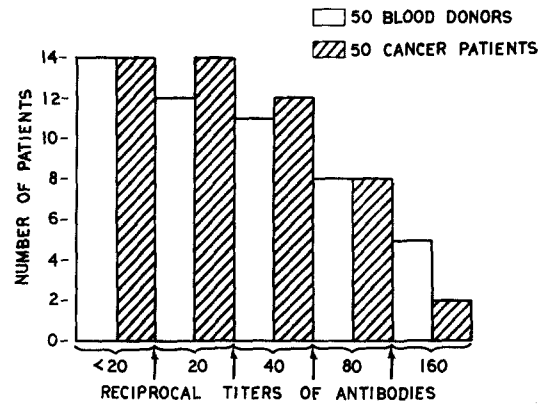


Fig. 2. *Hemagglutination of* C. butyricum-*modified erythrocytes by sera of blood donors and patients with cancer.*

that such antibodies do exist, although the titers are low. There was no significant difference between sera obtained from healthy blood donors and from patients with cancer. It is likely, therefore, that man is being exposed to *C. butyricum* antigen or to a related antigen.

Clinical observations

Spore treatment was undertaken in five patients whose advanced, locally extensive neoplastic disease appeared to be reasonably accessible to drainage. In each instance all established curative and palliative measures had been exhausted. Informed written permission for one or more courses of treatment was given. In each instance approximately 1×10^{10} *C. butyricum* spores of strain M-55, suspended in 100 ml of physiological saline, were given intravenously in a 20 min infusion. Blood specimens for cultural, chemical and antibody studies were obtained prior to and following treatment.

Case reports

Case No. 1: (*Fig.* 3) — This 77-year-old retired clerk had an extensive epidermoid carcinoma of the ethmoid sinuses eroding

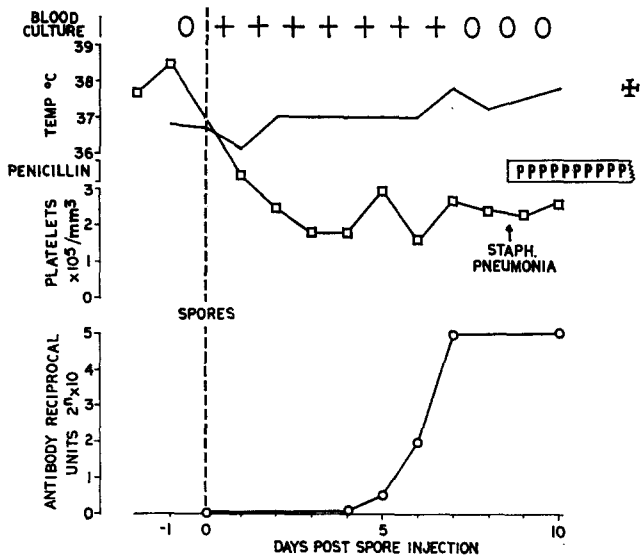


Fig. 3. Clinical course of patient No. 1.
□——□ *Platelets.*

through the face, where a 4·2×2·2 cm mass was present. It was inoperable, and radiotherapy had failed. He required continuous intravenous fluids to sustain life at the onset of treatment. Following spore administration, his temperature did not rise above baseline and he experienced no subjective effects. Anaerobic blood cultures were positive for *C. butyricum* on days 1 through 7. Penicillin G, 20 million units/day, and polymyxin B, 2·5 mg/kg/day, were begun on day 7 because of pneumonia and *Pseudomonas* bacilluria. Subsequent daily blood cultures were sterile until death on day 10. No evidence of oncolysis was seen. A moderate depression of platelet count was observed.

Cultures were taken aseptically at postmortem, and both *C. butyricum* and *Pseudomonas* were grown from virtually all tissues, though vegetative forms of *C. butyricum* were not seen on gram or H and E stains of any organ or the neoplasm. Sections of the neoplasm showed a notable absence of areas of necrosis. The presumed cause of death was incidental terminal *Pseudomonas* sepsis.

Case No. 2: (*Fig.* 4) — This 34-year-old former manager with multiple recurrent and metastic neurosarcomatous tumor nodules and a huge intraabdominal mass had failed to respond to four previous chemotherapeutic agents. Eight hours after spore administration, his temperature rose to 39·2°C and remained close to that level for 72 hr, when right upper quadrant pain, peritoneal signs, ileus, and leukocytosis to 5000/mm³ occurred. Tube decompression and administration of 20 million U of penicillin G and of 300 mg hydro-

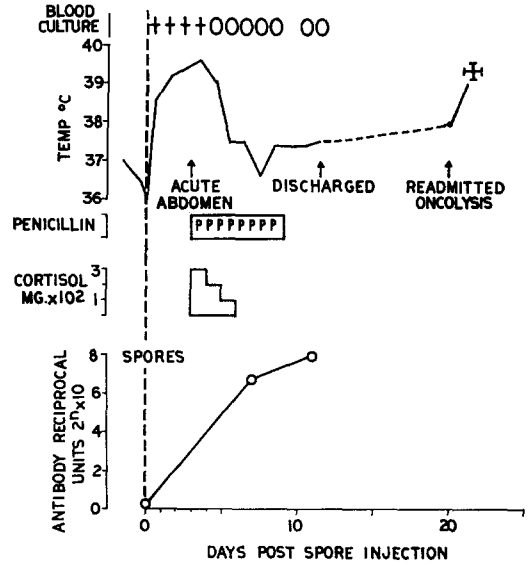


Fig. 4. Clinical course of patient No. 2.

cortisone daily were instituted. Abdominal signs subsided within 48 hr, and the patient became afebrile. Anaerobic blood cultures were positive for *C. butyricum* from days 1 through 4 and negative therafter. By day 11 he was ambulatory, off treatment, and was discharged. There was no change in platelet counts. On day 21 he returned complaining of abdominal pain. There was slight increase in the abdominal mass, although its significance was not clinically appreciated. He died 24 hr after admission. At autopsy a 45×35×28 cm fluctuant abdominal mass was found. It contained 3500 ml of foul-smelling liquid in which gram-positive rods were seen. *C. butyricum* was cultured. The cortex of the lysed mass consisted of a rim of tumor tissue which appeared

viable. Other tumor masses on the extremities and trunk were not lytic.

Case No. 3: (*Fig.* 5) — This 44-year-old housewife had abdominal leiomyosarcoma, arising from the uterus, recurrent after repeated radical surgery and radiation, with pulmonary metastases.

A second spore injection was given on day 85, after a course of radiotherapy to a single large pulmonary nodule given in an attempt to induce necrosis in it. Spore administration was again followed by fever and chills. Platelets fell to a nadir of 70,000/mm³ on day 2 and did not reach pretreatment levels until day 7. Transient leukopenia, to a low of 2950/mm³, occurr-

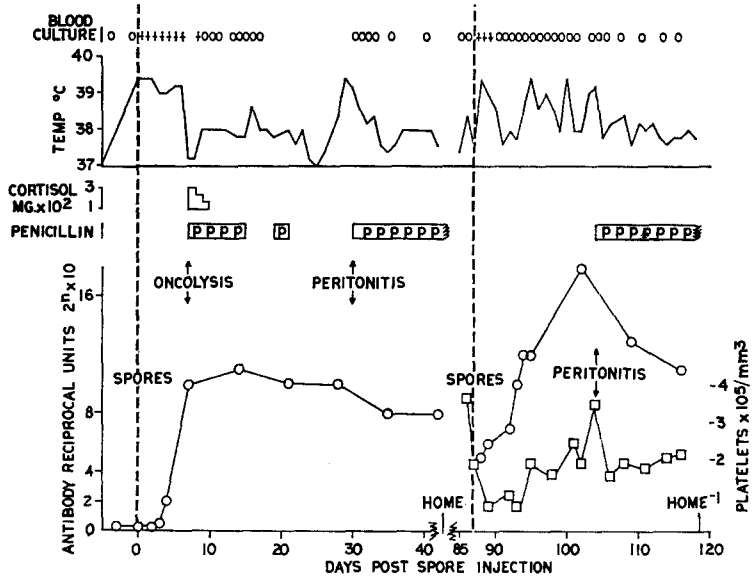


Fig. 5. *Clinical course of patient No.* 3.
□———□ *Platelets.*

One hour after spore administration she had shaking chills and temperature elevation to 39·5°C. Temperature elevation persisted until day 7, when acute tenderness over the abdominal mass developed and X-ray examination revealed the presence of a gas–fluid level within the mass (Fig. 6). Approximately 300 cc of gas and 1500 ml of dark-brown fluid were removed by trocar transabdominally. The fluid had a characteristic foul odor: gram-positive rods and germinating spores were seen, and *C. butyricum* was identified on culture. Drainage was instituted, and 300 mg hydrocortisone/day and 20 million U of penicillin G/day were given. The patient became pain-free and afebrile within 24 hr. Blood cultures became negative after day 8.

There was objective decrease in perpendicular diameters of the tumor mass by 25%, and relief of pre-existent abdominal discomfort. The trocar site healed completely. The pulmonary lesions were unchanged. Platelet counts were stable. After an episode of probable peritonitis on the 29th day, which responded to antibiotic treatment, she was discharged improved on the 46th post-spore day and was able to take up her usual household duties.

ed during the first week. Blood cultures spontaneously became negative on day 91. Peritonitis and fever occurred on day 104 and subsided after penicillin treatment and paracentesis. No more evidence of oncolysis was seen following the second spore injection and the patient was discharged, on penicillin medication, on day 118. The lower portion of Fig. 5 illustrates her antibody response. The extraordinarily high titer of 1 : 2,621,440 was reached after the second spore treatment.

The patient survived 13 months after her initial treatment with spores. There was slow, but continued progression of her neoplasm, which failed to regress after 5-fluorouracil treatment. No clostridia were cultured from tumor or normal tissues at autopsy.

Case No. 4: (*Fig.* 7) — This 76-year-old retired telephone operator with malignant melanoma had massive bilateral axillary metastases and no other known major metastatic foci. Spore injection resulted in a rise in her temperature to the range of 40° in 24 hr. Dyspnea and collapse occurred on day 4 when her temperature rose to 41°. Penicillin G (20 million U) and cortisol (300 mg) were given daily from days 4 to 13 with prompt deferves-

cence and clinical improvement. Blood cultures were positive for *C. butyricum* on days 1 through 5. When fever recurred, cortisol was reinstituted on day 15, followed again with deferves-

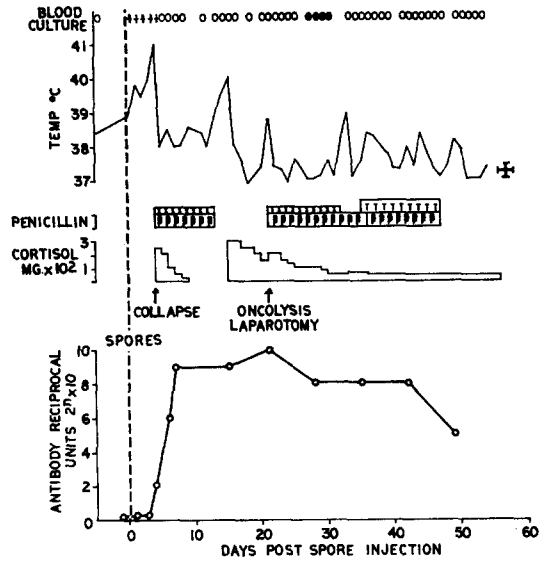


Fig. 7. Clinical course of patient No. 4.
● ● ● ● *Blood cultures positive for Bacterioides.*

cence. Platelet levels were well maintained. On day 20, 7 days after penicillin had been discontinued, acute abdominal pain and peritoneal signs prompted laparotomy; a large tumor mass which was tense and distended was found under the left diaphragm. Aspiration of the mass yielded brown fluid, in which vegetative clostridia were demonstrated. The mass was drained, and recovery from surgery was satisfactory.

Repeated posterior intracostal percutaneous aspirations were performed. On days 29 through 32 blood cultures were positive for *Bacterioides*, and tetracycline was given intravenously. Rapid tumor progression occurred over the chest wall. The patient expired on the 54th post-spore day. At necropsy, some tumor masses were soft and partially lysed, but clostridia were not found by staining or cultural techniques in either melanoma or normal organs.

Case No. 5: (*Fig.* 8) — This 64-year-old retired hospital attendant had undifferentiated sinus carcinoma, metastatic to the right eyelid. He was ambulatory without weight loss. The patient was declined for surgical and radiotherapeutic treatments. He was given two spore injections. Each was followed by brief rise in temperature of 1°C, but was otherwise well tolerated. Blood cultures were positive for 5 days after each injection, and became sterile without chemotherapy. Oncolysis did not occur. The patient requested discharge. Death occurred at home, four months after spore treatment of inanition and bleeding induced by local tumor progression.

During treatment with spores, we obtained daily determinations of electrolytes in all patients. Significant alterations of acid–base equilibrium occurred only in patient 1, who had a low venous pH terminally during his *Pseudomonas* sepsis.

Antibody response of patients

The antibody response of the five patients treated is shown in Fig. 9. Curves 1 through 3 represent the antibody titers of the three patients in whom oncolysis was demonstrated and the two lower curves represent the two subjects with sinus carcinoma who did not sus-

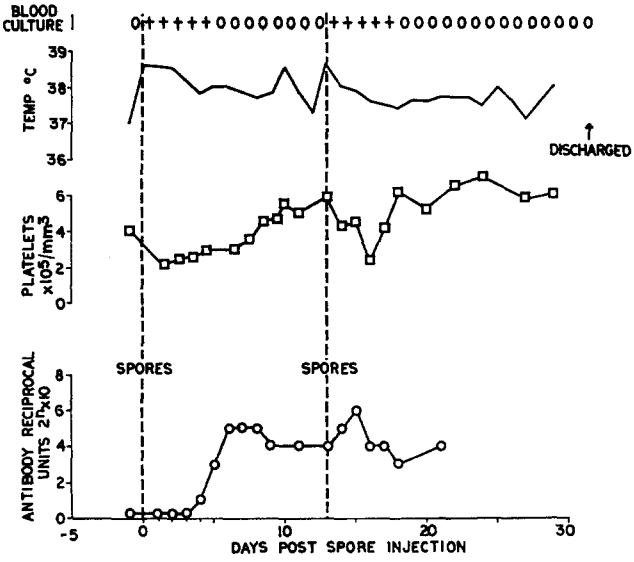


Fig. 8. Clinical course of patient No. 4.

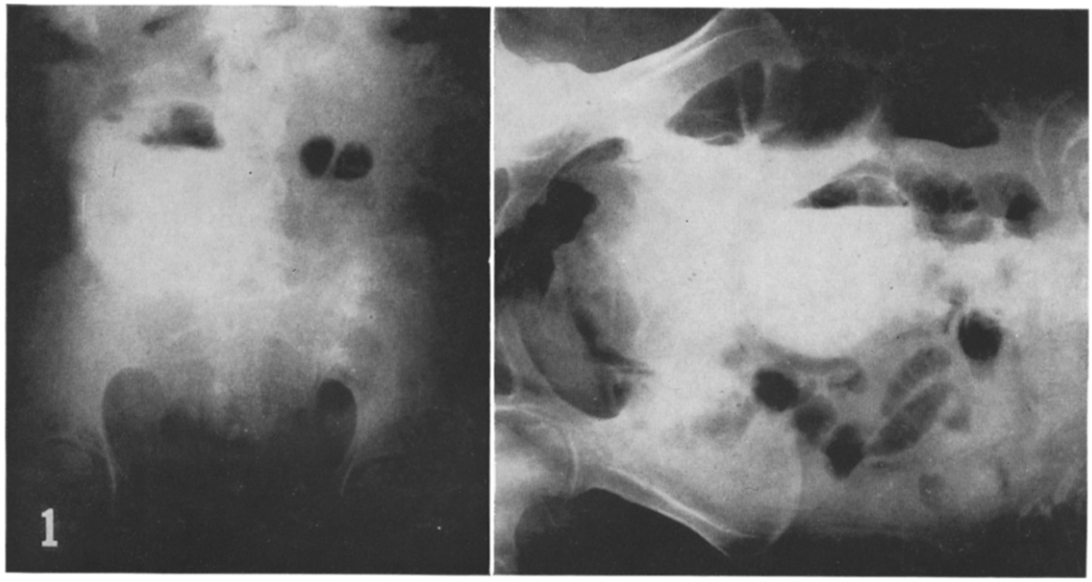


Fig. 6. *Liquified leiomyosarcoma of patient No.* 3 *after direct injection of radiopaque dye.*

(to face p. 42)

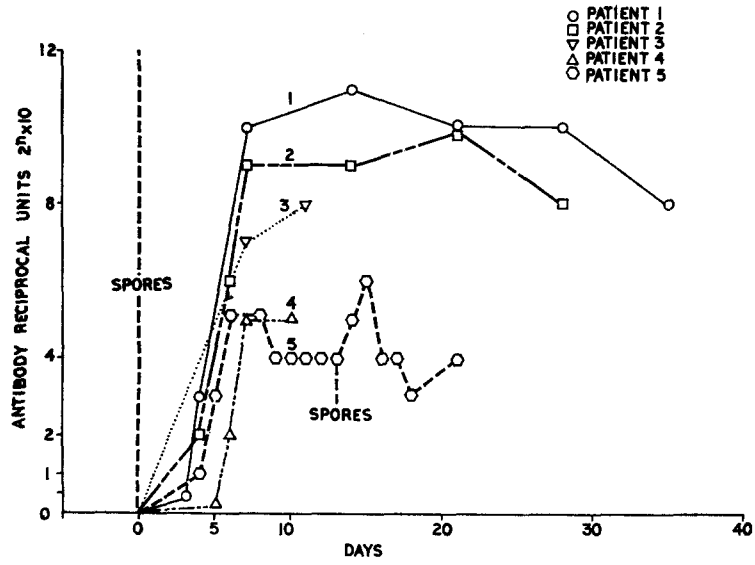


Fig. 9. *Hemagglutinaton of* C. butyricum-*modified erthrocytes by sera of five patients given* 1×10^{10}C. butyricum *spores on six occasions.*

tain clinically apparent oncolysis. Whether the difference in titers between the two groups represents a fundamental difference in host response or merely reflects increased antigen mass by virtue of germination of clostridia in the tumors is uncertain.

DISCUSSION

Methods which exploit qualitative differences between neoplastic and normal tissues are much to be sought in experimental and clinical medicine. Exploitation of the germination of clostridial spores in tumors, but not in normal tissues, was undertaken in the present study as one model approach to the problem. Since previous reports have established that not all tumor masses in an animal respond with oncolysis, we knew from the outset that the model was imperfect. Indeed, small tumors and metastases had been noted to be resistant to oncolysis, whereas large neoplasms were particularly favorable «7». Thus, the qualitative differences in germination of spores are likely to be not a characteristic of neoplastic and normal tissues per se, but related to physiologic and biochemical conditions found within large tumor masses. If the fact that *C. butyricum* is an obligate anaerobe can be used as a defining characteristic, then our clinical experience supports the presence of anaerobic conditions in the center of large human tumor masses. The failure of oncolysis to occur in patients 1 and 5 who had the smallest tumor masses and the failure of smaller metastases in the other three patients to undergo lysis similar to that of large tumor masses is confirmatory. Thus, clostridial oncolysis could not be expected to be successful in seeking out small clusters of tumor cells which enjoy good circulation and nutrition.

The experience with the effects of spores on spontaneous mammary adenocarcinomas of mice provided leads which gave us greater security in our clinical investigation. We expected to be better able to manage fluid, electrolyte and antibiotic problems in man, and indeed this expectation was fulfilled. Essentially the entire spectrum of the mouse experience was reproduced in the five patients studied. Thus, failure to lyse, lysis with death, and lysis with survival when intensive supportive care was provided were observed. The single death occurred in the first patient to undergo tumor lysis which was not recognized, and might well have been avoided with the wisdom of hindsight. One of the five patients enjoyed clinical benefit from the treatment.

Throughout the case descriptions and clinical summaries we have not further defined the significance of a positive blood culture. Indeed, the positive blood culture might have originated from either circulating spores and/or vegetative forms in plasma or leukocytes. It is clear, however, that viable spores and/or vegetative cells were present in patients with negative blood cultures, for *C. butyricum* was cultured at autopsy from essentially all organs in patient 1, and were doubtless the source of delayed oncolysis after 21 days and 20 days in patients 2 and 4. Since penicillin is bactericidal only for the vegetative form, it can be presumed that spores remained in tissues to serve as the source of the delayed oncolysis. The inability of human immunologic mechanisms to destroy all *C. butyricum* spores is also

evident from the antibody studies in blood donors and cancer patients. In patient 3, we maintained long-term penicillin treatment orally as a prophylaxis against unplanned oncolysis, and this was apparently successful.

In order to study the possible relationship between clostridial oncolysis and immune response of the patients, a serologic technique for the demonstration of clostridial antibodies was developed. The hemagglutinatin test and its hemolytic modification proved to be both sensitive and specific, as revealed in tests with *C. butyricum* antisera obtained from rabbits. By means of this method it was then found that *C. butyricum* antibodies are frequently present. although in low titers, in the serum of healthy subjects and of patients with cancer. All five patients treated with spores gave a marked and prompt immune response. It is of considerable interest to note that antibodies were produced in substantially higher titers in the three patients with oncolysis than in the two subjects whose tumors did not lyse. Further studies are needed to determine whether this difference is due to differences in germination and growth of *C. butyricum* in the tumor and, therefore, in antigenic mass.

The possibility was considered that, in line with observations on antigenically modified red blood cells [14, 15], bacterial antigen may become attached to tumor cells and cytolysis may occur in the presence of bacterial antibodies and complement. It has indeed been shown that Krebs 2 carcinoma cells adsorb the soluble antigen of *C. butyricum in vitro* (Table 1). However, cytolysis of these antigenically modified tumor cells could not be demonstrated in the presence of *C. butyricum* antibodies and complement. Antigenically modified Kreb-2 carcinoma cells implanted intraperitoneally in mice which were then treated with *C. butyricum* antiserum, showed unimpaired pathogenicity.

The intravenous injection of spores led to modest but appreciable fall in thrombocytes in three patients. In no instance was this of clinical significance, but it is of interest with respect to elucidation of platelet behavior after introduction of foreign substances in the circulation [16]. In one of the thrombocytopenic patients, leukopenia was also observed.

Our results suggest that clostridial oncolysis is related to bacterial germination and the direct effects of the microorganisms on the tumor rather than to an immunologic mechanism.

Acknowledgements — The authors are indebted to Dr. Myroslaw Hreshchyshyn for gynecologic and Dr. Arnold Mittelman for surgical consultation, and to Mary Ann Bates and Tony DiBlasi for skilled microbiologic assistance.

RESUME

L'activité antinéoplasique du C. butyricum *a été démontrée sur l'adénocarcinome spontané des souris et sur des tumeurs humaines. Parmi les souris montrant l'effet oncolytique du clostridium, l'amélioration de la survie survint chez celles qui reçurent un traitement de support à l'aide d'antibiotiques, de corticostéroïdes et de solutions d'électrolytes.*

Cinq patients furent traités avec 1×10^{10} *spores de* C. butyricum. *Les hémocultures positives envers ce micro-organisme le furent pendant les 4 à 9 jours qui suivirent l'injection. Une oncolyse fut notée chez trois patients au niveau de leurs plus grandes tumeurs, mais non au niveau de leurs plus petites tumeurs. Une amélioration clinique, transitoire, s'est produite dans l'un des cas; il y a eu oncolyse d'une tumeur cliniquement occulte dans un second cas et, chez un troisième patient, oncolyse d'une tumeur qui ne fut pas reconnue cliniquement.*

Un test d'hémagglutination sensible et spécifique fut mis au point afin de mesurer la réponse des patients et d'autres sujets aux anticorps bactériens. De faibles titres d'anticorps furent démontrés chez des donneurs de sang en bonne santé et chez des patients cancéreux. Les cinq patients traités avec les spores développèrent des titres substantiels d'anticorps. Ces titres furent plus élevés chez les trois sujets avec oncolyse que chez les deux patients dont les tumeurs ne furent pas lysées.

L'oncolyse due au clostridium semble liée aux caractéristiques physiologiques et biochimiques des grandes masses tumorales plutôt qu'aux différences qualitatives entre les cellules normales et néoplasiques ou à la cytolyse immunologique et, de ce fait, son utilité clinique est limitée.

SUMMARY

Antineoplastic activity of C. butyricum *has been demonstrated in spontaneous adenocarcinoma of mice and in tumors of man. Improved survival of mice occurred among those undergoing clostridial oncolysis when treated supportively with antibiotics, corticosteroids, and electrolyte solutions.*

Five patients were treated with 1×10^{10} *spores of* C. butyricum. *Blood cultures were positive for this microorganism for* 4–9 *days after injection. Oncolysis occurred in three patients in their largest tumors, but not in their smaller tumors. Spore treatment resulted in transient clinical benefit in one subject, oncolysis of a clinically occult tumor in another, and oncolysis in a third patient which was not clinically recognized.*

A sensitive and specific hemagglutination test was developed to measure the bacterial antibody response of the patients and other subjects. Antibodies in low titers were demonstrated in healthy blood donors and patients with cancer. The five patients treated with spores developed antibodies in substantial titers. These titers were higher in the three subjects with oncolysis than in the two patients whose tumors failed to lyse.

Clostridial oncolysis appears to be related to the physiologic and biochemical characteristics of large tumor masses rather than to qualitative differences between normal and neoplastic cells or to immunologic cytolysis, and thus appears to be of limited, if any, clinical usefulness.

ZUSAMMENFASSUNG

C. butyricum *zeigte eine antineoplastiche Wirkung bei spontanem Adenokarzinom der Maus und bei menschlichen Tumoren. Die Ueberlebensdauer von Mäusen mit Clostridium-induzierter Onkolyse war verlängert, wenn Antibiotica, Korticosteroide und Elektrolyt-Lösungen als adjuvante Therapie gegeben wurden.*

Fünf Kranke erhielten 1×10^{10} *Sporen von* C. butyricum. *Blutkulturen waren* 4 *bis* 9 *Tage nach der Injektion noch positiv für Clostridien. Die Onkolyse trat in den grössten Tumor-Massen dreier Kranken auf, nicht dagegen in kleineren Metastasen der gleichen Kranken. Die Behandlung führte zur vorübergehenden klinischen Besserung eines Kranken, zur Onkolyse eines okkulten Tumors in einem weiteren Kranken und zur klinisch okkulten Onkolyse bei einem dritten Kranken.*

Ein empfindlicher und spezifischer Hämagglutinations-Test wurde entwickelt um die Antikörperbildung der Kranken und unbehandelter Kontrollen zu messen. Niedrige Antiköper-Titer zeigten sich bei gesunden Blut-Spendern und bei Krebs-Kranken. Die 5 *sporenbehandelten Kranken entwickelten erheblich höhere AntikörperSpiegel. Diese Spiegel waren am höchsten bei den drei Kranken mit Onkolyse.*

Onkolyse durch Klostridien scheint von gewissen pathoplysiologischen und biochemischen Eigenschaften grosser Tumor-Massen und nicht von qualitativen Unterschieden zwischen Normalen- und Tumorzellen oder von immunologischer Zytolyse abzuhängen und erscheint deshalb klinisch gegrenzt, wenn überhaupt brauchbar.

REFERENCES

1. R. C. Parker, H. C. Plummber, C. O. Siebenmann and M. G. Chapman, Effect of histolyticus infection and toxin on transplantable mouse tumors. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **66,** 461 (1947).
2. R. A. Malmgren and C. C. Flanigan, Localization of the vegetative form of Clostridium tetani in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res.* **15,** 473 (1955).
3. J. R. Möse, Zur Beeinflussbarkeit verschiedener Tiertumoren durch einen apathogenen Clostridienstamm. *Z. Krebsforsch.* **63,** 447 (1960).
4. J. R. Möse and G. Möse, Onkolyseversuche mit apathogen, anaerogen Sporenbildern am Erhlich-Tumor der Maus. *Z. Krebsforsch.* **63,** 63 (1959).
5. J. R. Möse and G. Möse, Oncolysis by clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Res.* **24,** 212 (1964).

6. D. Gericke and K. Engelbart, Oncolysis by clostridia. II. Experiments of a tumor spectrum with a variety of clostridia in combination with heavy metal. *Cancer Res.* **24,** 217 (1964).
7. E. H. Thiele, R. N. Arison and G. E. Boxer, Oncolysis by clostridia. III. Effects of clostridia and chemotherapeutic agents on rodent tumors. *Cancer Res.* **24,** 222 (1964).
8. J. R. Möse and G. Möse, Experiments on tumor lysis in human tumors with the apathogenic "Clostridium Strain 55." In preparation.
9. J. R. Möse, in: *Proc. 3rd International Congress of Chemotherapy*, Stuttgart, (1963).
10. E. Neter, Bacterial hemagglutination and hemolysis. *Bact. Rev.* **20,** 160 (1956).
11. E. Neter, O. Westphal, O. Luderitz and E. A. Gorzynski, The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **66,** 141 (1956).
12. E. Neter and E. A. Gorzynski, Studies on indirect staphlococcal hemagglutination. *Z. Immun.-Forsch.* **118,** 269 (1959).
13. H. Y. Whang and E. Neter, Immunological studies of a heterogenetic enterobacterial antigen (Kunin). *J. Bact.* **84,** 1245 (1962).
14. C. N. Shumway, V. Bokkenheuser, D. Pollock and E. Neter, Survival in immune and nonimmune rabbits of Cr^{51}-labeled erythrocytes modified by bacterial antigen. *J. Lab. clin. Med.* **62,** 600 (1963).
15. T. Suzuki, E. A. Gorzynski, H. Y. Whang and E. Neter, Hemolysis in immune rabbits of autologous erythrocytes modified with common enterobacterial antigen. *Experientia* **20,** 75 (1964).
16. W. Regelson, The thrombocytopenic and other physiologic effects of heparin and heparinoids: "A macromolecular syndrome?" in: *Medical and Biochemical Hematology*. Ambrus (Editor). Marcel Dekker, Inc., New York (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 47–65. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Etude de l'Effet Immunodépresseur des Composés Chimiques Utilisés en Chimiothérapie Anticancéreuse

J. L. AMIEL, M. SEKIGUCHI, G. DAGUET, S. GARATTINI et V. PALMA

Institut de Cancérologie et d'Immunogénétique, Hôpital Paul-Brousse, Villejuif (Seine), France et Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse†*

L'ETUDE de la dépression des réactions immunitaires par chimiothérapie présente un double intérêt: pratique et théorique.

En expérimentation et chez l'Homme, les enseignements tirés de cette étude peuvent s'appliquer au traitement des maladies par auto-immunisation [1–6]. Ils ont surtout permis le développement des greffes et des transplantations allogéniques; less chimiothérapies immunodépressives ont donné les meilleurs résultats pour prolonger la tolérance de transplants rénaux allogéniques chez le Chien [7, 8]; elles sont, à l'heure actuelle, le procédé le plus utilisé pour conditionner le receveur à de telles transplantations chez l'Homme, et ont donné des résultats au moins partiels dans plusieurs centaines de cas [9]: en expérimentation, les réactions de rejet contre des transplants allogéniques de foie [10 – 12], de poumons [13, 14], de coeur [15] ont pu être déprimés par de tels conditionnements. Ces chimiothérapies se sont également montrées capables, en expérimentation [16–18] et chez l'Homme [19], d'atténuer le syndrome secondaire provoqué par une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques.

L'intérêt théorique de ce genre d'études nous paraît résider dans les enseignements apportés sur le mécanisme même des réactions immunitaires par l'analyse comparative des effets sur ces réactions de drogues dont les différentes modalités d'action sur le métas bolisme cellulaire nous sont connues.

Dans un précédent travail [20], nous avons exposé les conditions qui nous paraissent nécessaires pour mener une étude comparative valable des effets immunodépresseurs de composés chimiothérapiques, antimitotiques ou non; ces conditions sont le contrôle et la standardisation des différentes variables intervenant dans ce type d'expérimentation: le génotype du matériel utilisé, c'est-à-dire l'espèce et la lignée animales, le type du stimulus antigénique, sa voie d'introduction, l'intensité et la durée de ce stimulus, la méthode de mesure des réponses immunitaires, la dose de drogue essayée, sa voie d'administration, la durée du traitement, les rapports chronologiques entre le début et la fin de ce traitement et le début du stimulus antigénique. Chacune de ces variables se révèle en effet capable de modifier l'effet immunodépresseur observé [21]. La méthode de "screening" que nous avons proposée, après des essais menés en utilisant un antimétabolite, la 6-mercaptopurine, et un agent alcoylant, la cyclophosphamide, comporte l'étude chez la Souris des effets sur les réactions immunitaires à trois

*Travail mené grâce à une subvention de la Caisse de la Sécurité Sociale.

†Travail mené grâce à une aide de l'Euratom, Contrat n° 32-64-1-Bio-F.

types de stimuli antigéniques: une protéine hétérologue, un virus, un greffon de peau allogénique, de traitements conduits à des doses ramenées à une fraction infralétale de la DL 50 sur 6 jours. Ces traitements sont prolongés pendant 20 jours, et se commencent ou se terminent au début du stimulus antigénique.

Cette méthode a été depuis appliquée à plusieurs centaines de substances; nous nous proposons de rapporter les résultats qui nous paraissent les plus intéressants, parce que concernant des produits directement applicables en clinique humaine et/ou dont les mécanismes d'action sur le métabolisme cellulaire sont au moins en partie connus. Ces produits sont trois antimétabolites, un antifolique, le Méthotrexate, une antipurine, la 1-isopropyl-4-aminopyrazolo (3,4d) pyrimidine, une antipyrimidine, le 5-fluoro-uracile; trois alcaloïdes de la pervenche, poisons du fuseau, la vincaleucoblastine, la vincristine et la vinleurosine; un antibiotique intervenant sur l'ADN chromosomique et sur la synthèse de l'ADN, la mitomycine C; un antibiotique s'opposant à la formation de l'ARN messager, l'actinomycine D; deux antibiotiques intervenant dans la synthèse protéique, la puromycine et le chloramphénicol; une méthyl-hydrazine, une térephtalanilide, un antimitotique paraissant affecter préférentiellement chez l'Homme les cellules souches myéloïdes [22], le méthylglyoxal-bis (guanylhydrazone); un dérivé non antimitotique, l'acide epsilon-amino-caproïque.

MATERIEL ET METHODES

A. *Les stimuli antigéniques et les tests d'immunisation*

(1) *L'albumine humaine*—Les souris reçoivent 6 injections, un jour sur deux, par voie intradermique, de 0,1 cm^3 d'une solution d'albumine humaine, dont la concentration est de 10 mg par cm^3. Douze jours après la dernière injection du produit, l'immunisation de ces souris est étudiée par la tolérance d'albumine humaine marquée par l'Iode 131*.

La dose injectée par voie veineuse, à chaque souris, est de 30 μC. La clearance de l'antigène est suivie par les mesures quotidiennes de la radioactivité de 0,1 cm^3 de sang circulant, prélevé par ponction du sinus caverneux [23]. La radioactivité est exprimée en pourcentage de celle mesurée à la douzième heure après l'injection de l'albumine marquée, et les pourcentages moyens quotidiens de chaque groupe de souris sont rapportés sur une échelle semi-logarithmique. Le test est considéré comme positif s'il existe une différence d'au moins 48 heures entre les temps nécessaires pour la clearance de 99% de l'albumine injectée dans le groupe témoin immunisé non traité par l'immuno-dépresseur et le groupe expérimental immunisé et traité. Des expériences préliminaires ont en effet montré qu'une telle différence était toujours reproductible.

(2) *Le poliovirus*—Les souris reçoivent 6 injections, un jour sur deux, par voie intradermique, de 0,1 cm^3 d'une solution à 100×10^6 de la dose cytotoxique 50 par cm^2 de virus de la souche 2 MEF_1, cultivé sur cellules KB jusqu'à leur lyse, non filtré et centrifugé 1/4 d'heure à 5000g. L'immunisation est évaluée 12 jours après la dernière injection du produit, par le dosage des anticorps sériques, par la méthode de Lepine et Roger [24]. Les titres d'anticorps sont donnés pour 50 p. 100 de protection. Il a été vérifié qu'il n'existe pas, chez la Souris, d'anticorps naturels contre ce virus.

(3) *Greffons de peau allogéniques*—Un greffon de peau complète, d'une taille de 7 mm sur 7, est prélevé sur la peau de la queue du donneur et placé dans un lit préalablement préparé sur le dos du receveur. La peau greffée est protégée par un pansement adhésif, aucune suture n'est pratiquée. Le pansement est enlevé au septième jour et le greffon examiné quotidiennement par deux observateurs ignorant le groupe expérimental auquel appartient la souris examinée, jusqu'à la nécrose totale de la greffe dont les deux critères sont un aspect noirâtre et la perte totale de sa souplesse. Les résultats sont exprimés en durée de survie des greffons.

B. *Modalités d'administration du produit antimitotique*

Pour chacun des produits, la DL 50, en administration quotidienne pendant 6 jours, est déterminée chez des souris Swiss adultes. Les DL 50 des produits étudiés sont données au tableau I. Les animaux d'expérience reçoivent le 1/6 de cette dose quotidienne pendant 6 jours, puis le 1/12 un jour sur deux pendant 14 jours. La durée totale de la cure est donc de 20 jours.

Le stimulus antigénique, qu'il s'agisse de la première injection d'albumine hétérospécifique ou de virus, ou de la pose du greffon allogénique, se situe soit au premier jour de la cure (cure "après" le stimulus) soit à son vingtième

*Cette albumine est fouruie par le C.I.E.A., Bruxelles. Les caracteristiques de la solution sont les suivantes: solution aqueuse isotonique contenant par cm^3 de 15 à 25mg d'albumine humaine; le taux de marquage est de 1 à 2 atomes d'iode par molécule da proteine. La teneur en iode libre ne dépasse pas 2 p. 100. Le pH de la solution est compris entre 8,5 et 9,5.

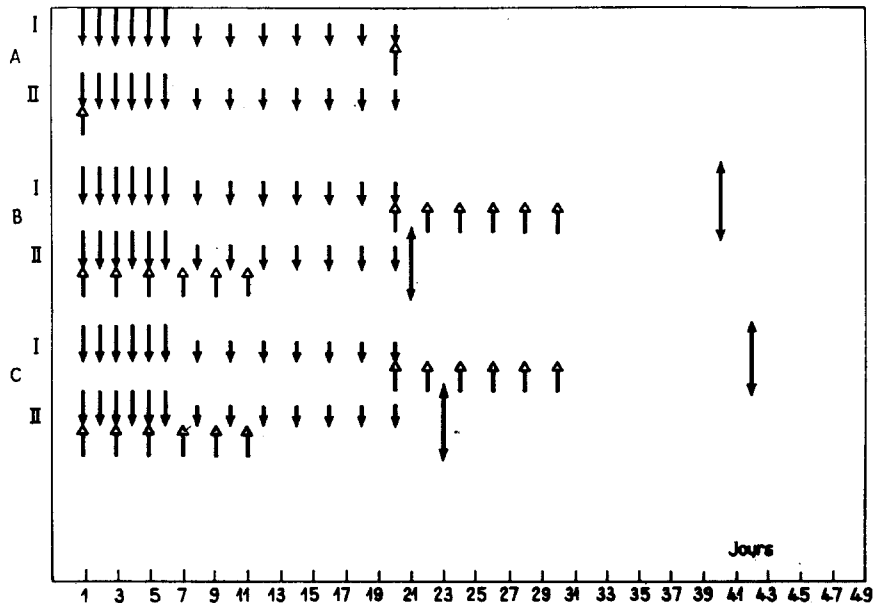


Fig. 1. Schéma des tests utilisés
↓ 1/6 *de la DL* 50 *sur* 6 *jours* ↓ 1/12 *de la DL*50 *sur* 12 *jours un jour sur deux.*
↑ *Stimulus antigénique* ↕ *mesure de la réaction immunitaire*
A, Greffon de peau allogénique; B, albumine humaine; C, poliovirus; I, traitement avant le stimulus; II, traitement après le stimulus.

jour (cure "avant" le stimulus) (Fig. 1). La liste des produits étudiés et leurs doses létales sur 6 jours respectifs sont données au Tableau 1.

C. *Les animaux utilisés*

Pour l'étude de l'immunisation contre l'albumine humaine et le poliovirus, les souris utilisées sont des Swiss âgées de trois mois environ.

Dans les expériences de greffes allogéniques, le premier système utilisé comprend des donneurs adultes AkR (H-2^k) et des receveurs hybrides F1 (CBA×C57Br) (H-2^k× H-2^k); en cas de résultats très positifs un deuxième systéme, incompatible en H-2, est essayé: donneurs DBA/2 (H-2^d), receveurs F1 (CBA× C57Br).

Chacun des groupes, témoins non traités, traités avant le stimulus antigénique, traités après le stimulus antigénique, comporte environ 10 souris.

Tableau 1

Produits utilisés	DL 50 sur 6 jours (dose quotidienne en mg/kg)
6-mercaptopurine (6-MP)	144 mg/kg
Méthotrexate (MTX)	5,56 mg/kg
1-isopropyl-4-aminopyrazolo (3,4,d) pyrimidine (PP)	26 mg/kg
5-fluoro-uracile (5-FU)	58 mg/kg
cyclophosphamide (CP)	255 mg/kg
Vincaleucoblastine (VB)	1,17 mg/kg
Vincristine (VC)	0,945 mg/kg
Vinleurosine (VL)	148 mg/kg
Mitomycine C (MC)	5,3 mg/kg
Actinomycine D (AD)	115 µg/kg
Puromycine (PUR)	100 mg/kg
Chloramphénicol (CPH)	2400 mg/kg
1-méthyl-2-*p*(Isopropylcarbamoyl)benzylhydrazine (MH)	740 mg/kg
2-chloro 4'4"bis(2 imidazolin 2yl)terephtalanilide (PHT)	30 mg/kg
Methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) (M.GAG)	90 mg/kg
Acide epsilon amino-caproïque (AEAC)	>1000 mg/kg

RESULTATS

A. *Effets sur l'immunisation contre l'albumine humaine*

Les résultats sont résumés au Tableau 2; un exemple de résultats positif et négatif est donné sur la Fig. 2.

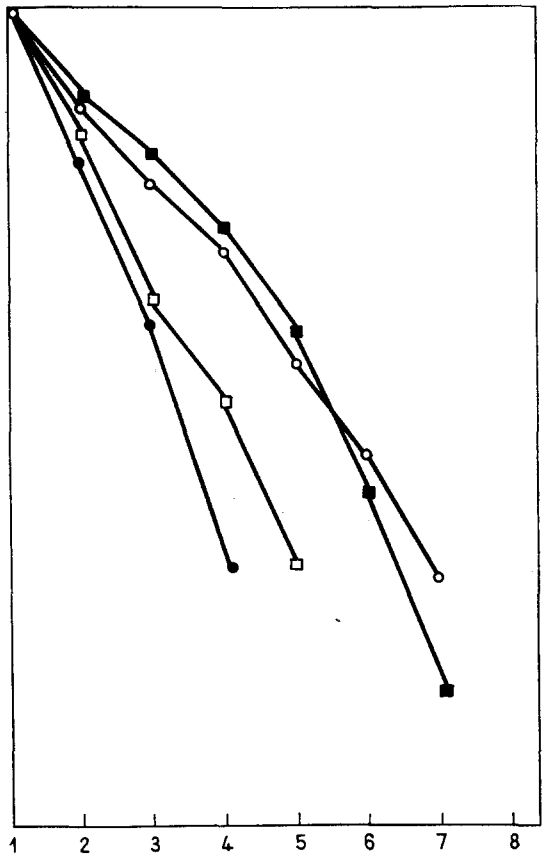


Fig. 2. Exemple des résultats donnés par le test d'immunisation contre l'albumine humaine, le produit utilisé: acide epsilon-amino-caproïque.
Groupe traité avant ●: même courbe que le groupe témoin immunisé □ = résultat négatif.
Groupe traité après ■: même courbe que le groupe témoin non immunisé ○ = résultat positif.
Coordonnées semi-logarithmiques.
En abcisse: temps après l'injection de l'albumine marquée.
En ordonnée: radioactivité sanguine résiduelle moyenne, rapportée à la radioactivité du sang prélevé 12 heures après l'injection de la protéine marquée, et à qui est attribuée la valeur 100.

Les résultats positifs correspondent à un retard de 48 heures au moins du groupe immunisé et traité par rapport au groupe immunisé seulement, pour atteindre une clearance de 99% de la protéine marquée. On voit que l'1-isopropyl-4-aminopyrazolo 3,4,d-pyrimidine, la mitomycine C, la puromycine, sont actives mais seulement lorsqu'elles sont données avant le stimulus antigénique; la cyclophosphamide, l'acide apsilon-amino-caproïque sont actifs, mais seulement lorqu'ils sont donnés après le stimulus antigénique; la vinleurosine, la méthyl-hydrazine, la phtalanilide, sont actives qu'elles soient données avant ou après le stimulus antigénique.

B. *Effets sur l'immunisation contre le poliovirus* 2 *MEF*$_1$

Les résultats sont résumés au Tableau 3.

On voit que la 6-mercaptopurine, le Méthotrexate, la 1-isopropyl-4-aminopyrazolo 3,4,d-pyrimidine, la vincaleucoblastine, la phtalanilide, sont actifs lorsqu'ils sont donnés avant le stimulus antigénique; la cyclophosphamide est active lorsqu'elle est donnée après le stimulus antigénique; la méthyl-hydrazine a une activité non statistiquement valable, qu'elle soit donnée avant ou après le stimulus antigénique; la puromycine est nettement active, qu'elle soit donnée avant ou après le stimulus antigénique.

C. *Effets sur l'immunisation contre un greffon de peau allogénique*

(1) Greffon de peau AkR (H-2^k) sur des receveurs F1(CBA × C57Br) (H-2^k) × (H-2^k).

Les résultats sont résumés au Tableau 4. Un exemple de l'évolution selon le temps des pourcentages de greffons vivants est donné dans la Fig. 3.

(2) Greffon de peau DBA/2 (H-2^d) sur des receveurs F1(CBA × C57Br) (H-2^k) × (H-2^k).

Les résultats très positifs obtenus avec les traitements par la mitomycine C avant la pose du greffon et par la méthyl-hydrazine après la pose du greffon nous ont fait essayer ces deux types de traitement sur la réaction immunitaire à un greffon de peau allogénique en H-2.

Les résultats de ces essais sont résumés dans les Fig. 4 et 5. On voit qu'ils sont totalement négatifs, ce qui confirme que la réaction contre un greffon de peau incompatible en H-2, chez la Souris, est un test trop peu sensible pour être utilisable en "screening " de drogues immuno-dépressives, comme nos premiers essais l'avaient déjà établi [20].

L'ensemble des résultats obtenus avec les 14 corps étudiés est résumé au Tableau 5.

Nous rappelons sur les mêmes tableaux les résultats précédemment obtenus avec la 6-mercapto-purine et la cyclophosphamide, en utilisant les mêmes techniques [20].

DISCUSSION

Les résultats rapportés ci-dessus apportent quelques précisions sur le fonctionnement même des tests adoptés pour étudier les produits immuno-dépresseurs.

Il est tout d'abord confirmé que l'action

Tableau 2. Résultats sur la réaction immunitaire contre l'albumine humaine.

Nom du produit	Produit donné avant le stimulus	Produit donné après le stimulus
6 MP	−	−
MTX	−	−
PP	+	−
5 FU	−	−
CP	−	+
VB	−	−
VC	−	−
VL	+	+
MC	+	−
AD	−	−
PUR	+	−
CPH	−	−
MH	+	+
PHT	+	+
M.GAG	−	−
AEAC	−	+

Les abréviations des noms des produits sont les mêmes que celles données au Tableau 1.
+ = dépression de la réaction: Retard de l'élimination de la protéine marquée par rapport au groupe témoin immunisé non traité $\leqslant 48$ heures.
+ = résultat douteux: Retard de l'élimination de la protéine marquée par rapport au groupe témoin immunisé, non traité = 24 heures.
− = résultat négatif.

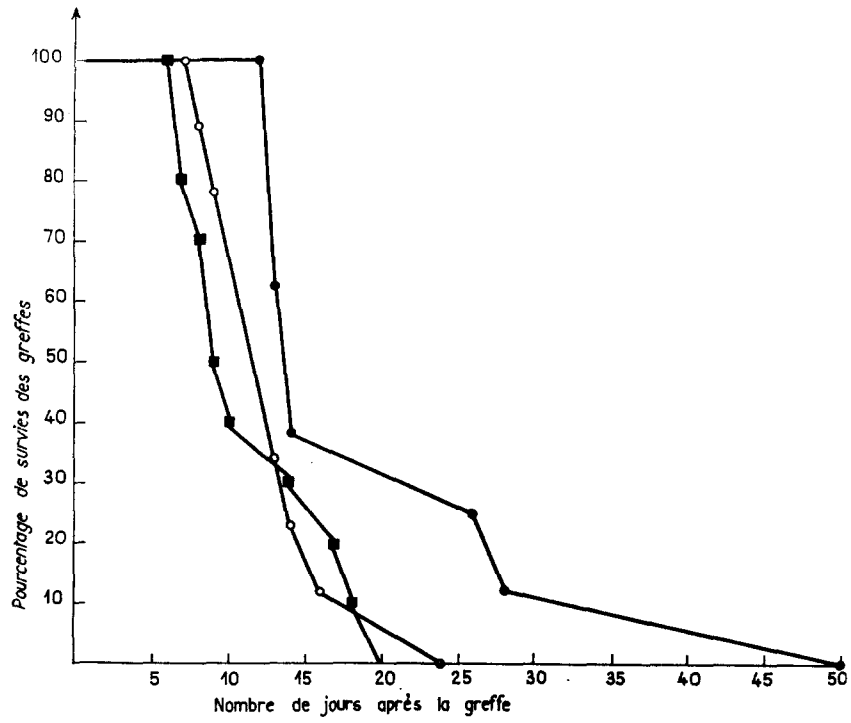


Fig. 3. Exemple des résultats donnés par le test d'immunisation contre un greffon de peau allogénique, donneur AkR (H-2^k), receveurs F1 (CBA × C57Br) (H-2^k × H-2^k).
Produit utilisé: mitomycine C
Résultat négatif avec le produit donné après ■,
Résultat positif avec le produit donné avant ●, *par rapport au groupe témoin* ○.

Tableau 3. Résultats sur la réaction immunitaire contre le poliovirus.

Nom du produit	Produit donné avant le stimulus	Groupe témoin	Produit donné après le stimulus
6 MP	3/11	8/ 9	8/ 9
MTX	1/ 7	8/ 9	6/ 8
P.P.	1/ 8	8/10	7/10
5 FU	8/10	8/10	7/10
CP	8/ 9	8/ 9	2/10
VB	1/ 7	9/10	10/10
VC	8/10	8/10	8/ 9
VL	7/ 9	7/ 9	7/ 9
MC	6/ 9	7/ 9	10/10
AD	7/ 9	6/ 8	9/ 9
PUR	2/ 8	6/ 7	1/10
CPH	10/10	9/ 9	10/10
MH	7/10	10/10	7/10
PHT	0/10	8/10	7/10
M.GAG	6/10	7/10	7/10
AEAC	10/10	8/ 9	10/10

Les abréviations sont les mêmes que celles données au Tableau 1.
Dénominateur: nombre total d'animaux du groupe.
Numérateur: nombre d'animaux immunisés.

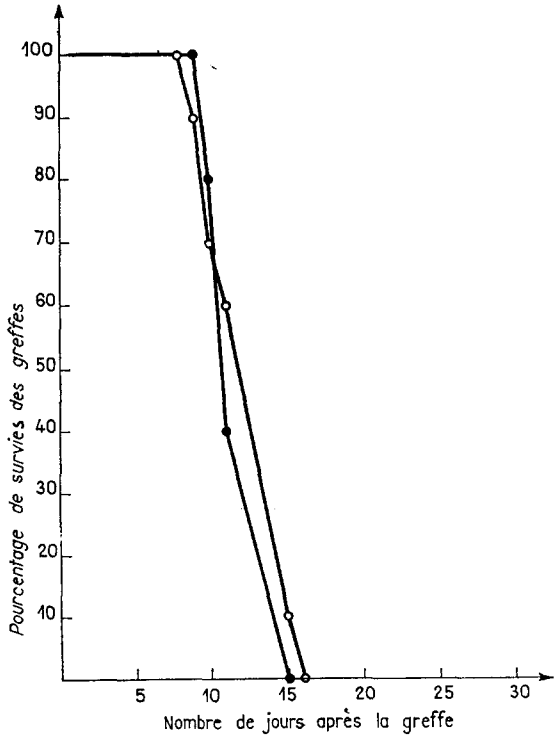


Fig. 4. Essai de dépression de la réjection d'un greffon de peau allogénique en H-2: donneurs DBA/2 (H-2^d), receveurs F1 (CBA × C57Br) (H-2^k × H-2^k). La tolérance du groupe traité par la mitomycine C avant la greffe ● ne paraît pas supérieure à celle du groupe témoin ○.

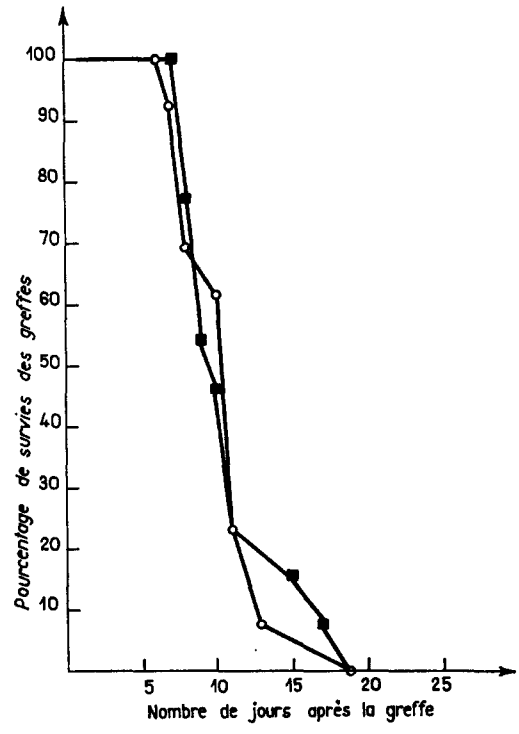


Fig. 5. Essai de dépression de la réjection d'un greffon de peau allogénique en H-2: donneurs DBA/2 (H-2^d); receveurs F1 (CBA × C57Br) (H-2^k × H-2^k). La tolérance du groupe traité par la méthylhydrazine après le greffon ■ ne paraît pas supérieure à celle du groupe témoin ○.

Tableau 4. *Résultats sur la réaction immunitaire contre un greffon de peau allogénique: donneur A^kR (H-2^k), receveurs F1 ($CBA \times C57Br$) (H-$2^k \times H$-2^k)*
Pour chaque groupe sont donnés en jours les durées extrêmes des tolérances et la durée moyenne avec son intervalle de confiance pour $P = 0{,}05$

Nom du produit	Produit donné avant le stimulus	Groupe témoin	Produit donné après le stimulus
6 MP	8; 15,7 ± 3,2; 24	8; 11,7 ± 2,5; 18	8; 16,1 ± 3,5; 25
MTX	10; 11,1 ± 0,8; 13	10; 12,5 ± 1,6; 14	9; 10,0 ± 3,3; 14
P.P.	9; 19,0 ± 6,9; 29	9; 12,6 ± 3,4; 20	9; 13,8 ± 4,7; 22
5 FU	8; 14,5 ± 5,0; 30	7; 15,3 ± 4,5; 25	6; 13,1 ± 5,2; 27
CP	9; 12,5 ± 2,9; 22	8; 11,7 ± 2,5; 18	9; 15,3 ± 1,1; 24
VB	8; 17,6 ± 4,8; 22	8; 13,1 ± 4,8; 22	11; 15,4 ± 4,2; 21
VC	8; 19,6 ± 3,6; 29	8; 10,9 ± 2,4; 15	7; 15,1 ± 3,8; 22
VL	9; 13,0 ± 3,2; 16	9; 13,2 ± 2,5; 18	9; 14,0 ± 3,7; 19
MC	12; 21,4 ± 12,5; 50	7: 13,7 ± 4,3; 25	6; 11,9 ± 4,7; 20
AD	9; 14,0 ± 3,7; 17	8: 9,7 ± 1,3; 12	8; 10,6 ± 1,5; 14
PUR	8; 9,5 ± 0,9; 10	10; 12,5 ± 1,2; 14	10; 12,1 ± 1,6; 14
CPH	9; 12,6 ± 2,8; 19	9; 13,2 ± 2,5; 18	8; 13,2 ± 3,5; 19
MH	9; 13,7 ± 3,3; 26	9; 15,0 ± 2,2; 23	10; 23,2 ± 7,0; 40
PHT	13; 19,0 ± 3,5; 25	8; 13,1 ± 4,8; 22	8; 12,3 ± 3,7; 20
AEAC	10; 16,6 ± 5,4; 23	9; 12,9 ± 4,4; 22	8; 14,0 ± 4,9; 23

Les abréviations des noms des produits sont les mêmes que pour le Tableau 1.

Tableau 5. *Ensemble des resultats obtenus selon le produit, le test utilisé et le moment d'administration du produit par rapport au stimulus antigenique.*

Nom du produit	Administré avant le stimulus			Administré après le stimulus		
	Albumine humaine	Poliovirus	Greffon de peau mmH-2	Albumine humaine	Poliovirus	Greffon de peau
6 MP	−	+	±	−	−	±
MTX	−	+	−	−	−	−
P.P.	+	+	+	−	−	−
5 FU	−	−	−	−	−	−
CP	−	−	+	+	+	+
VB	−	+	±	−	−	−
VC	−	−	+	−	−	±
VL	+	−	−	+	−	−
MC	+	−	+	−	−	−
AD	−	−	±	−	−	−
PUR	+	+	−	−	+	−
CPH	−	−	−	−	−	−
MH	±	±	−	+	±	+
PHT	+	+	+	+	−	−
M.GAG	−	−	−	−	−	−
AEAC	−	−	±	+	−	−

immunodépressive peut être sélective; en effet, pour des fractions équivalentes de leur DL 50, sur 6 jours, certains produits se révèlent être d'efficaces immunodépresseurs, et d'autres sont sans action décelable. Ces résultats apparaissent clairement au Tableau 5; en fait, les produits antimitotiques inefficaces sur les réactions immunitaires, aux doses utilisées, sont la majorité, les conditions techniques des traitements immunodépresseurs ayant été choisies pour se rapprocher le plus possible de celles utilisées ou envisageables chez l'Homme: traitements prolongés, doses initiales relativement fortes, traitement d'entretien à doses plus faibles, doses nettement infralétales. Il en résulte que les doses totales utilisées dans nos tests sont nettement inférieures à celles habituellement utilisées dans les essais d'autres auteurs avec des produits similaires [25–35] ce qui explique certains résultats contradic-

toires, négatifs dans nos tests pour des substances trouvées ailleurs efficaces mais à doses plus élevées et avec d'autres protocoles expérimentaux. Cette limitation à des doses nettement infralétales nous paraît essentielle pour pouvoir reconnaître les substances les plus efficaces dans l'immunodépression et pour essayer d'analyser leur mécanisme d'action.

La variété de sensibilité de chacun des trois stimuli antigéniques apparaît clairement sur le Tableau 5; il semble que les immunisations contre l'albumine humaine et le poliovirus soient des tests en général plus sensibles que l'immunisation contre un greffon de peau allogénique; cependant la nécessité d'associer ces trois tests est confirmée par ces résultats: la pratique de la seule étude des réactions contre l'albumine humaine n'aurait pas mis en évidence l'action immunodépressive de la vincaleucoblastine et de la 6-mercaptopurine, celle de la seule étude des réactions contre le poliovirus, l'action de la mitomycine C, pourtant particulièrement sensible sur la réaction de rejet à un greffon de peau.

Ces résultats confirment enfin qu'un même produit donné, aux mêmes doses, a, sur un même stimulus antigénique, des effets très différents selon qu'il est donné avant ou après le stimulus antigénique.

La période efficace d'administration d'un produit, par rapport à un stimulus antigénique, semble dépendre du produit et non du type du stimulus, comme il apparaît au Tableau 5. Ces résultats suggèrent donc que des cycles d'événements cellulaires comparables déterminent les réactions immunitaires à chacun des trois stimuli antigéniques utilisés, et que chaque produit a son maximum d'efficacité s'il est donné pendant la période où les cellules en cause dans les réactions immunitaires sont à un moment particulier de leur cycle, où leur sensibilité à l'action antimitotique spécifique du produit est maximale.

A partir de ces notions communes nous pouvons essayer d'analyser les résultats obtenus avec chaque type de produits.

Les antimétabolites étudiés comportent une antipurine, la 1-isopropyl-4-aminopyrazolo 3,4,d pyrimidine à laquelle nous joignons la 6-mercaptopurine déjà étudiée, un antifolique le méthotrexate, une anti-pyrimidine, le 5-fluoro-uracile.

Le 5-fluoro-uracile interfère avec la biosynthèse des pyrimidines dans l'ARN [36]; il bloque la 5-méthylation enzymatique du monophosphate de désoxyuridine en monophosphate de thymidine [37]; il s'incorpore dans l'ARN cellulaire. Nos tests d'immunodépression faits avec cette substance sont négatifs, ce qui est en bon accord avec les résultats médiocres obtenus par Berenbaum et Brown [25] avec le 5-fluoro-uracile pour déprimer la production d'agglutinines H anti-salmonelles chez la souris et les résultats négatifs de Powell, Hubay et Holden [38] qui n'obtiennent pas, avec des doses très élevées (20 mg/kg), de prolongation de la tolérance de greffons de peau allogéniques chez le Rat. Ces résultats expérimentaux négatifs peuvent être rapprochés des données de la clinique humaine: le 5-fluoro-uracile se révèle plus efficace sur les tumeurs solides que sur les hématosarcomes et les leucémies [39].

Par contre, la 6-mercaptopurine, la 1-isopropyl-4-aminopyrazolo-3,4,d pyrimidine et le méthotrexate donnent tous trois des résultats positifs, surtout avec le poliovirus comme stimulus antigénique. Ces trois antimétabolites ont comme caractères communs d'interférer dans la synthèse de l'ADN et d'être actifs sur les leucémies expérimentales et humaines. Dans nos expériences, le trait commun à ces trois produits est que leur efficacité est maximale s'ils sont donnés avant le stimulus antigénique: les résultats obtenus si les produits sont donnés après le stimulus antigénique sont à peu près complètement négatifs (Tableau 5).

Comme nous l'avions déjà observé, la cyclophosphamide, aux doses utilisées, n'est active, sur les réactions immunitaires de la souris, que donnée après le stimulus antigénique [20]. Son action est donc nettement différente de celle des agents qui interfèrent avec la synthèse de l'ADN, et il s'agit là d'une propriété commune aux agents alcoylants immunodépresseurs que nous avons étudiés. La limitation de l'activité immunodépressive de la cyclophosphamide à son administration après le stimulus antigénique a été depuis confirmée par Frisch et Davies [40]. A la dose de 60 mg/kg la cyclophosphamide s'est montrée capable de diminuer le production par la souris d'hémagglutinines anti-globules rouges humains, lorsqu'elle est donnée jusqu'à 15 jours après les globules rouges hétérologues; l'efficacité maximale du produit se situe entre la 24ème et la 72ème heure après l'administration de l'antigène, le traitement est inefficace s'il est donné avant l'antigène, ou même, en même temps que lui [40]. Un traitement par la cyclophosphamide du syndrome secondaire lié à la réaction d'un greffon hématopoïétique allogénique contre l'hôte, chez le Singe irradié, s'est également montré efficace même lorsque ce traitement est "tardif," c'est-à-dire commencé au moment de l'apparition de signes cliniques du syndrome

secondaire; par contre, le traitement par l'améthoptérine n'est efficace que donné précocement dans les 4 premiers jours après l'injection du greffon [41].

Les alcaloïdes de la pervenche constituent une importante famille d'antimitotiques. Parmi les nombreux alcaloïdes isolés à partir de Vinca Rosea, la vinblastine [42], la vincristine [43] et la vinleurosine [44], sont remarquables par leur action antitumorale expérimentale [45] et clinique [46–48]. L'action de ces alcaloïdes semble être essentiellement un bloquage des mitoses en métaphase par action sur le fuseau. L'effet de ces alcaloïdes sur les réactions immunitaires a été diversement apprécié. Aisenberg et Wilkes [49] ont pu obtenir chez le Rat une dépression de la production d'anticorps sériques contre l'albumine bovine et une prolongation de la tolérance de greffons de peau allogéniques, en administrant la vinblastine ou la vincristine pendant 21 jours à partir du stimulus antigénique; mais un effet net n'est obtenu que pour des doses importantes (200 mg/kg par jour pour la vinblastine, 50 mg/kg/jour pour la vincristine) et toxiques (près de 50 p. 100 de létalité).

Avec leur système d'immunisation contre l'antigène typhique et de traitement unique deux jours après, Berenbaum et Brown [26] n'obtiennent avec la vincaleucoblastine que des résultats médiocres; Zukoski et coll. [50] n'ont pu prolonger la tolérance à un transplant rénal allogénique chez le Chien en le traitant après la transplantation par la vinblastine buccale.

Nos résultats montrent que les alcaloïdes de la pervenche peuvent être immunodépresseurs; leur activité maximale semble se situer avant le stimulus antigénique, et la réaction à un greffon de peau n'est pas influencée aux doses utilisées.

Quoique de constitutions chimiques très proches, la vinblastine, la vincristine et la vinleurosine ont des activités cliniques contrastées, la vinblastine étant efficace sur la maladie de Hodgkin et les réticulosarcomes [46, 51], la vincristine et, à un moindre degré la vinleurosine, sur les leucémies aiguës lymphoblastiques [47, 52]; cette opposition ne se retrouve pas dans nos tests d'immunodépression chez la Souris; on ne peut extrapoler, de façon sure, la sensibilité cellulaire spécifique constatée chez l'Homme à la Souris; en effet, chez la Souris, les trois alcaloïdes sont actifs sur un même type de leucémie lymphoblastique greffée, la leucémie L 1210, (Mathé, non publié).

La mitomycine C a donné des résultats intéressants: la réaction de rejet du greffon de peau allogénique est particulièrement affectée; le produit est aussi efficace sur la réaction à l'albumine humaine, son activité n'est observée que s'il est donné avant le stimulus antigénique.

Ce fait distingue clairement l'effet de la mitomycine C de celui des agents alcoylants; son mecanisme d'action avait été rapproché de celui de ces agents à partir d'expériences menées sur des microorganismes [53].

Il semble cependant d'après des expériences menées sur des lymphocytes stimulés "in vitro" par la phytohémagglutinine que la mitomycine puisse exercer deux effets, l'un est une inhibition de la synthèse de l'ADN, effet qui avait d'ailleurs déjà été observé sur les microorganismes [54, 55], cet effet ne s'exerce que sur des cellules dans leur phase de synthèse d'ADN (phase S) et non sur des cellules "au repos" comme le sont les petits lymphocytes au début de la culture. Le deuxième effet, qui est d'induire des cassures chromosomiques, est au contraire maximal sur les cellules en G_1 du début de la culture et diminue dans la phase S pour s'annuler en G_2, où les cellules semblent résistantes aux deux effets de la mitomycine [56, 57].

Les effets immunodépresseurs de la mitomycine C s'exercent, comme ceux des antimétabolites 6-mercaptopurine, Méthotrexate) qui interfèrent dans a synthèse de l'ADN, lorsque le produit est donné avant le stimulus antigénique.

Nos résultats confirment sur ce point ceux de Futonaka et coll. [58] qui n'obtiennent une dépression de la production d'anticorps hémolytiques antiglobules rouges du mouton chez la Souris que si la mitomycine C est donnée avant l'antigène; des greffons de tumeurs incompatibles sont également "facilités" par l'administration préalable au receveur de mitomycine C [59, 60].

Il semble donc que l'effet immunodépresseur de la mitomycine C s'exerce par le même mécanisme que celui en cause pour la 6-mercaptopurine et le Méthotrexate, l'inhibition de la synthèse de l'ADN.

L'actinomycine D est un antibiotique dont la combinaison à l'ADN a pour effet de bloquer la synthèse d'ARN messager, sans bloquer la synthèse d'ADN [61]. L'actinomycine D peut bloquer la synthèse d'anticorps *in vitro* [62].

Essayée chez le Rat pour déprimer la production d'hémagglutinines contre des globules rouges hétérologues administrés en même temps que l'antibiotique, l'actinomycine à dose unique de 15 µg/kg paraît prolonger la phase d'induction et retarder de 48

heures l'apparition des anticorps sans en diminuer le taux maximal [63].

Nos résultats confirment ces données. En effet, la seule réaction influencée paraît être celle de rejet du greffon de peau, qui, dans les autres expériences, semble la réaction la moins sensible, mais les méthodes de lecture des trois réactions immunitaires sont telles qu'un court délai dans l'apparition de la réaction immunitaire n'est perceptible que pour ce test, les deux autres tests n'évaluant pas la cinétique des réactions immunitaires, mais seulement leur aboutissement.

La puromycine [64] et le chloramphénicol [65] inhibent la synthèse protéique en bloquant la formation des polypeptides au niveau des polysomes; cependant, alors que la puromycine est active sur les réactions contre le poliovirus et l'albumine humaine, lorsqu'elle est donnée avant le stimulus, et sur la réaction contre le poliovirus, lorsqu'elle est donnée après le stimulus, le chloramphénicol ne donne aucun résultat positif.

Le chloramphénicol est cependant capable d'inhiber la synthèse protéique dans les systèmes acellulaires obtenus à partir de cellules de mammifères [66] et des actions immunodépressives de ce produit ont été rapportées chez le Lapin recevant comme antigène de l'albumine bovine [66, 67] ou des globules rouges de mouton [67], ou un greffon de peau allogénique [66] prolongé avec des doses faibles de chloramphénicol (0,5 mg/kg/j. pendant 14 jours), cependant aucun effet dépresseur n'a été observé lorsque l'antigène est bactérien, Salmonella typhi [67].

Nos résultats négatifs chez la Souris ne contredisent nullement ces données obtenues chez le Lapin; l'importance du facteur génétique dans la sensibilité aux drogues immunodépressives est bien établie [20]. L'effet du chloramphénicol sur la synthèse des anticorps chez l'Homme mérite donc une étude approfondie.

La puromycine, comme d'ailleurs le chloramphénicol, inhibent la synthèsede l'ADN dans les cellules de mammifères en culture [68]. L'effet de la puromycine, qui semble maximal lorsque le produit est donné avant le stimulus antigénique, peut donc s'exercer en raison de cette inhibition de la synthèse de l'ADN.

Les méthyl-hydrazines représentent une nouvelle famille d'agents antimitotiques dont l'efficacité a été récemment démontrée sur des tumeurs expérimentales [69] et humaines [70].

Le mode d'action du produit est encore mal connu; pour Berneis et coll. [71] il serait comparable à l'effet indirect des radiations ionisantes et s'exercerait par la formation de radicaux libres fortement oxydants ou réducteurs, qui entraîneraient la dégradation de l'ADN. Plus récemment, Berneis et coll. [72] ont montré que les radiations ionisantes avaient un effet de sensibilisation à cette dégradation par la méthyl-hydrazine de l'ADN en solution. Cet effet de sensibilisation n'a pu cependant être confirmé *in vivo* par Choquet et coll. [73].

Nous avons déjà signalé l'effet immunodépresseur de la 1-méthyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl) benzyl-hydrazine [21] après les expériences de Bollag [74] montrant que le produit facilitait la croissance d'un greffon tumoral hétérospécifique.

Dans nos tests, l'effet dépresseur, quoique notable si le produit est donné avant le stimulus antigénique, est cependant maximal lorsqu'il est donné après le stimulus; dans ces conditions, une prolongation très marquée de la tolérance à un greffon de peau allogénique est observée. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec ceux de Floersheim [75] montrant qu'une dose de 300 mg/kg/j. après la greffe est nécessaire chez la Souris pour obtenir un effet immunodépresseur aussi net dans une réaction à un greffon allogénique que celui observé avec une dose de 100 mg/kg/j. donnée avant et après la greffe. Nos observations et celles de Floersheim concordent au contraire pour montrer que le produit est efficace avant et après le stimulus antigénique; ces deux actions peuvent être additives comme le montrent les expériences de Floersheim, mais le moment de l'effet maximal ne peut se déterminer que si l'on compare, comme nous le faisons, les effets du produit donné avant ou après le stimulus antigénique, et non pas si l'on compare les effets du produit donné après ou "avant et après" le stimulus antigénique.

Nous avons pu observer les mêmes effets immunodépresseurs avec un deuxième dérivé des méthyl-hydrazines, le bromhydrate de 1-méthyl-2-*p*-allophanoyl-benzyl-hydrazine (Amiel, résultats non publiés).

Les terephtalanilides sont également une nouvelle famille d'antimitotiques dont le mode d'action est encore mal connu; synthétisées dans le but de "bloquer" les phosphatides [76], elles pourraient interférer avec la régulation de la répression et de la dérépression de l'ADN [77] mais aussi inhiber la synthèse protéique [78]; leur activité peut être bloquée par des analogues sulfoniques ou phosphoriques [79].

L'activité immunodépressive de la 2-chloro 4'4"bis (2-imidazolin-2 yl) térephtalanilide a

déjà été signalée par Moldovanu et Miller [80], et par nous-mêmes [81].

Cette action, dans nos, tests semble pouvoir s'exercer avant et après le stimulus antigénique, cependant elle est maximale avant le stimulus antigénique, et affecte dans ces conditions les trois types de stimuli antigéniques.

Burchenal et coll. [82, 83] ont constaté l'existence de résistances croisées de souches tumorales entre l'imidazoline-térephtalanilide d'une part, la mitomycine C et la vincaleucoblastine d'autre part, et l'absence de résistances croisées entre l'imidazoline-térephtalanilide et la cyclophosphamide. Ces données sont en bon accord avec nos résultats sur le type d'activité immunodépressive de ces produits: maximal avant le stimulus antigénique pour l'imidazoline-térephtalanilide, la mitomycine C, la vincaleucoblastine, maximal après le stimulus pour la cyclophosphamide. La concordance de ces résultats suggère l'unicité des mécanismes soustendant les actions antitumorales et immunodépressives de ces différents produits.

La méthyl-glyoxal-bis (guanylhydrazone) dont l'activité antimitotique a été observée initialement par Freedlander et French [84] a un mécanisme d'action encore mal connu; il a été suggéré qu'il pourrait inhiber la phosphorylation oxydative [85], il peut également former des complexes avec l'ADN [86]. Ce produit est surtout actif sur les leucémies aiguës de la lignée myéloïde [22, 87]. Nos résultats avec ce produit sont négatifs, ce qui peut être rapproché de cette efficacité élective sur les cellules myéloïdes. Ces résultats confirment les constatations de Hersh et coll. [88], montrant que le méthyl-glyoxal-bis (guanylhydrazone) est, chez l'Homme, à toxicité comparable, le corps le moins actif pour déprimer les réactions immunitaires [89]; par contre, on a pu obtenir une prolongation, par ce produit, de la tolérance de greffons de peau allogéniques chez la Souris, mais avec des doses de 50 mg/kg par jour, qui sont très supérieures à celles que nous avons utilisées et très supérieures aux doses utilisées en clinique humaine (maximum 4 mg/kg par jour).

L'acide epsilon-amino-caproïque est une lysine désaminée dont l'activité antifibrinolytique, mise en évidence par Okamoto [90], a été largement utilisée depuis en clinique humaine [91].

Une action immunodépressive de ce produit a été suggérée par le constatations de Itoga et Yogo [92] et de Lowney [93] sur l'inhibition par le produit de la réaction à la tuberculine chez l'Homme; depuis, plusieurs réactions immunitaires expérimentales se sont révélées sensibles à l'acide epsilon-amino-caproïque et à ses dérivés: le choc anaphylactique à des protéines hétérospécifiques chez le Lapin et le Cobaye [94], l'encéphalomyélite auto-immune [95], les réactions de rejet d'un greffon de peau allogénique, chez la Souris [95] et chez le Lapin [97], d'un transplant de rein allogénique chez le Chien [98].

Dans toutes ces expériences, toutefois, les doses utilisées par Kg sont beaucoup plus élevées (de l'ordre de 20 fois plus) que celles données chez l'Homme.

Avec nos dosages plus faibles, les résultats observés sont moins nets que ceux rapportés par certains auteurs [97], cependant ils confirment l'activité immunodépressive du produit, qui semble pouvoir s'exercer avant et après le stimulus antigénique.

Cette activité immunodépressive n'a pas encore reçu d'explications satisfaisantes; quoique discrète, comparée à celle d'autres produits comme les méthyl-hydrazines, elle est intéressante puisqu'elle s'obtient avec un produit très peu toxique et non antimitotique à notre connaissance; cette action peut peut-être se rapprocher de l'effet immunodépresseur de surcharges en certains acides aminés naturels; nous avons en effet constaté qu'un traitement aux mêmes doses que celles utilisées pour l'acide epsilon amino-caproique, par la DL lysine, par la DL phénylalanine, la DL thréonine, peut déprimer la réaction immunitaire de la Souris à un poliovirus (Amiel, non publié).

Des essais de ces diverses substances, quelques points peuvent donc être dégagés.

Les substances actives en clinique humaine contre les proliférations des tissus lymphoïdes, réticulo-endothéliales, comme pour la méthyl hydrazine [70] ou la vincaleucoblastine [46], ou lymphoblastiques, comme pour la 6-mercaptopurine, le Méthotrexate, la vinleurosine, [48], sont, à toxicité égale, parmi les plus immunodépressives; par contre, une substance spécifiquement active sur le tissu myéloïde (méthylglyoxal-bis-guanylhydrazone) ou les tumeurs solides (5-fluoro-uracile) ne sont que peu ou pas actives.

Les substances interférant dans la synthèse de l'ADN, comme la 6-mercaptopurine, le Méthotrexate, la pyrazolo-pyrimidine, la mitomycine C, voire la puromycine sont efficaces comme immunodépresseurs, mais leur efficacité maximale se situe nettement avant le stimulus antigénique. Ce fait nous semble important parce qu'il indique nettement que les cellules qui vont intervenir dans des réactions immunitaires de première intention passent, avant leur contact avec l'antigène, par des phases de

synthèse d'ADN (phase S) et ne sont donc pas en G_1 ou G_2 avant le contact avec l'antigène, comme on pourrait le penser en transposant *in vivo* la cinétique de la prolifération cellulaire qu'induisent des stimuli non spécifiques (phytohémagglutinine) ou spécifiques sur les lymphocytes du sang [99].

Tenenbaum et coll. [100] ont pu montrer que la transformation en grandes cellules hyperbasophiles des cellules immunocompétentes allogéniques *in vivo* se faisait aussi bien à partir de lymphoblastes que de lymphocytes.

Une fois l'antigène introduit dans l'organisme, la dépression des réactions immunitaires par les substances interférant dans la synthèse de l'ADN est, aux doses utilisées, à peu près nulle; ces résultats ne signifient évidemment pas que les cellules impliquées dans la réaction immunitaire à un antigène rencontré pour la première fois ne passent pas par la phase S et ne se divisent pas, mais ces divisions ne sont pas suffisamment bloquées par les antimétabolites de la synthèse de l'ADN, peut-être parce que ce bloquage partiel est compensé par un mécanisme d'autorégulation de la synthèse des anticorps [101], peut-être parce que les divisions cellulaires en cause sont trop précoces après l'introduction de l'antigène et se produisent avant qu'un traitement par des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN commencé après le stimulus antigénique ait eu son plein effet aux doses utilisées.

Les produits comme la cyclophosphamide ou la méthyl-hydrazine qui, par leur mécanisme d'action, semblent pouvoir agir sur des cellules en dehors de la phase de synthèse de l'ADN, ont par contre leur maximum d'action après le stimulus antigénique.

Les traitements immunodépressifs peuvent théoriquement être rendus plus actifs, sans accroissement de toxicité, de différentes façons; utilisation de corps à action immunodépressive plus spécifique, utilisation, pour déprimer chaque type donné de réaction immunitaire, de corps spécifiquement actifs contre ce type de réaction, association de produit immunodépressifs, ajustement de la thérapeutique immunodépressive aux différentes phases évolutives de la réaction immunitaire.

La première possibilité, l'utilisation de corps à action immunodépressive spécifique, reste, à l'heure actuelle, à peu près virtuelle; la quasi totalité des produits immunodépresseurs sont aussi des antimitotiques, les dérivés de l'acide epsilon-amino-caproïque constituent une exception, mais nous avons vu que leur action est relativement discrète.

La deuxième possibilité, l'utilisation pour chaque type de réaction immunitaire de produits immunodépressifs spécifiques de cette réaction, ne peut être écartée: nos résultats montrent que les rapports de sensibilité des trois tests varient selon le produit utilisé, il n'y a pas de test qui soit constamment plus ou moins sensible qu'un autre; il n'est cependant nullement démontré qu'il s'agisse bien là de différences qualitatives et non simplement quantitatives.

La troisième possibilité, l'association de produits immunodépresseurs, se heurte tout d'abord à la même difficulté que les associations d'antimitotiques dans le traitement des proliférations malignes: la toxicité cumulative des produits; elle se heurte dans le domaine de l'immunodépression à des difficultés supplémentaires: les différences d'efficacité de chaque produit selon son moment d'administration par rapport au stimulus antigénique. Associer des produits dont les périodes optimales d'activité par rapport au stimulus antigénique sont différentes amène à donner, à chaque moment du traitement, des produits toxiques et peu ou pas efficaces. Associer des produits dont les périodes optimales d'activité sont les mêmes paraît plus logique, mais là encore si les toxicités sont additives, il n'est pas démontré que les activités immunodépressives soient synergiques; elles peuvent être indépendantes ou même antagonistes [102]. C'est ce que suggèrent les résultats cliniques de Hersch et coll. [88]; la dépression immunitaire obtenu chez l'Homme par l'association mercaptopurine, Méthotrexate, vincristine, delta-cortisone, est en fait moindre que celle assurée par la mercaptopurine seule ou le Méthotrexate seul.

Il semble donc que la meilleure possibilité d'augmenter l'efficacité des traitements immunodépresseurs réside dans l'utilisation des produits les plus actifs sur la phase évolutive atteinte par la réaction immunitaire qu'il s'agit de déprimer, ceci peut donc conduire à faire se succéder des produits immunodépresseurs plutôt qu'à les associer.

Il semble donc logique de commencer le traitement avant le stimulus antigénique par des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN, et même de continuer ce traitement tant qu'il n'y a pas de signes montrant l'initiation de la réaction immunitaire; une fois celle-ci déclenchée cependant, le traitement par les inhibiteurs de la synthèse de l'ADN perd beaucoup de son efficacité et il paraît plus logique d'avoir recours à des produits comme la cyclophosphamide ou la méthyl-hydrazine.

Ces traitements successifs sont actuellement à l'étude chez l'animal.

Les résultats obtenus jusqu'ici suggèrent cependant quelques directives pour les traitements immunodépresseurs chez l'Homme. Pour le conditionnement à une transplantation d'organe incompatible, il serait logique de commencer le traitement immunodépresseur par un inhibiteur de la synthèse de l'ADN comme la 6-mercaptopurine, l'Imuran; la mitomycine C serait dans ce groupe le corps le plus efficace, d'après nos résultats, mais son utilisation chez l'Homme est rendue plus difficile par sa toxicité élevée, en particulier digestive [103]. Ce traitement devrait être commencé au moins une semaine avant la transplantation; il pourrait être poursuivi en l'absence de tout signe de réaction contre le transplant allogénique. En cas de "crise" immunologique, il semblerait plus logique d'entreprendre, aussitôt la crise diagnostiquée, un traitement par la cyclophosphamide ou par la méthyl-hydrazine, substance dont nous avons vu les effets très nets en expérimentation et qui n'a encore été que très peu utilisée comme immunodépresseur chez l'Homme.

Dans les greffes de cellules hématopoïétiques allogéniques la situation est plus complexe: deux réactions immunitaires doivent être contrôlées: la réaction du receveur contre le greffon, la réaction du greffon contre l'hôte, et les traitements appliqués ne doivent pas arrêter la restauration myéloïde du receveur par le greffon.

La première réaction, celle du receveur contre le greffon ne semble pas pouvoir être complètement controlée par une chimiothérapie et nécessiter une irradiation totale du receveur à dose élevée, mais un traitement par le 6-(1-méthyl-4-nitro-5-imidazolyl) thiopurine (imuran) commencé une semaine avant la greffe peut être associé à cette irradiation [19].

La deuxième réaction, celle du greffon contre le receveur, est la plus difficile à contrôler, puisque contemporaine de la prolifération cellulaire du greffon qui assure la restauration myéloïde de la chimère [19]; d'après nos résultats expérimentaux, il semble que l'on puisse proposer: (1) un traitement du ou des donneurs de cellules hématopoïétiques par la 6-mercaptopurine ou l'imuran une semaine avant la greffe, encore qu'il soit discutable d'appliquer un traitement antimitotique à un donneur sain; (2) un traitement précoce du receveur immédiatement après la greffe, par un inhibiteur de la synthèse de l'ADN comme le Méthotrexate; (3) un traitement plus tardif, en cas d'initiation d'un syndrome secondaire apparemment dangereux par son apparition précoce ou l'intensité de ses signes cliniques par la cyclophosphamide ou la méthyl-hydrazine.

Les traitements chimiques immunodépresseurs ont fait la preuve de leur efficacité pour prolonger la tolérance à des greffes allogéniques à la fois en expérimentation et chez l'Homme; cette efficacité peut être accrue par une meilleure utilisation des produits déjà disponibles, mais les limites de ces traitements sontévidentes: nous avons vu que les substances immunodépressives les plus efficaces sur la réaction à un greffon de peau allogénique chez la Souris perdent apparemment toute action si l'histo-incompatibilité entre le receveur et le greffon s'accroît (allogénie en H-2); les résultats obtenus en clinique humaine avec les traitements immunodépresseurs semblent donc, en dernière analyse, dépendre étroitement des progrès dans le "choix du donneur" [104].

RESUME

Différents produits, antipurines, antifoliques, antipyrimidines agents alcoylants, alcaloïdes de la pervenche, mitomycine C, actinomycine D, puromycine, chloramphénicol, méthyl-hydrazine, imidazoline térephtalanilide, méthyl-glyoxal-bis (guanylhydrazone), acide epsilon-amino-caproïque, sont étudiés pour leur action immunodépressive chez la Souris, à l'aide d'un test comportant trois stimuli antigéniques différents (albumine humaine, poliovirus, greffon de peau allogénique) et l'administration du produit à une dose infra-létale, rapportée à la dose létale sur 6 jours, par cures de 20 jours se terminant ou commençant le jour du stimulus antigénique.

Les résultats obtenus montrent qu'à toxicité égale, les corps essayés ont des activités immunodépressives très différentes. Les corps qui interfèrent avec la synthèse de l'ADN (antipurines, antifoliques, mitomycine C) sont surtout actifs avant le stimulus antigénique, alors que la cyclophosphamide et la méthyl-hydrazine sont surtout actives après le stimulus antigénique.

Les enseignements apportés par les résultats obtenus sur le mécanisme des réactions immunitaires et les mécanismes d'action des produits utilisés sont discutés. Les indications qui peuvent être tirées de ces résultats pour les traitements immunodépresseurs chez l'Homme,

destinés à obtenir et maintenir la tolérance à des greffons et transplants incompatibles sont envisagées.

SUMMARY

The immuno-depressive effect of several compounds: antipurines, antifolics, antipyrimidines, alkylating agents, periwinkle alcaloids, mitomycin C, actinomycin D, puromycin, chloramphenicol, methylhydrazine, imidazoline terephtalanilide, methyl-glyoxal-bis (guanydrazone), epsilon-amino-caproic acid, has been studied in mice by a test including three different antigenic stimuli (human albumen, poliovirus, graft of allogenic skin). They were administered at an infralethal dose, related to the lethal dose in 6 days. The treatment lasted 20 days, ending or beginning on the antigenic day.

The results show that, at equal toxicity, the different drugs tested have quite different immuno-depressive activities. Those which interfere with the DNA synthesis (antipurines, antifolics, mitomycin C) are particularly active when given before the antigenic stimulus, while cyclophosphamide and methyl-hydrazine are especially active after the antigenic stimulus.

These results are discussed in relation with the mechanism of immuno-suppression by these products. The indications derived from these results concerning immuno-depressive treatments in Man, and destined at obtaining and maintaining tolerance to incompatible grafts and transplants, are considered.

ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Stoffe, wie Folsäure-, Purinbasen- und Pyrimidinbasenantagonisten, alkylisierende Mittel, Vincaalkaloide, Mitomycin C, Actinomycin D, Puromycin, Chloramphenicol, Methylhydrazin, Imidazolin Terephtalanilide, Methyl-Glyoxal-Bis (Guanylhydrazon), Epsilon-Amino-Capronsäure wurden bezüglich ihrer immunodepressiven Wirkung bei der Maus untersucht. Im Rahmen der Tests, um diese Wirkung nachzuweisen, wurden einerseits drei verschiedenen Antigenarten als Stimuli verabreicht (menschliches Albumin, Poliovirus, allogenes Hauttransplantat), andererseits die obenerwenten Wirkstoffe in infraletalen Dosen, die in 6 Tagen die letale Dose erreichen sollten, jeweils in Serien von 20 Tagen gegeben, wobei am ersten oder am letzten Tag dieser Serien die Stimulation durch die Antigene unternommen wurde.

Die Resultate zeigen, dass bei gleicher Toxicität die untersuchten Wirkstoffe sehr verschiendentliche immunodepressive Aktivität aufweisen. Diejenigen, die mit der DNS-Synthese interferieren (Folsäure-, Purinbasenantagonisten, Mitomycin C) sind besonders vor dem Antigenenreiz wirksam, dagegen Stoffe wie Zyklophosphamid und Methylhydrazin wirken hauptsächlich nach der Antigenenstimulation.

Die durch die erreichten Resultaten über den Mechanismus der Immunoreaktionen und über die Wirkung der verwendeten Wirkstoffe gewonnenen Lehren werden diskutiert. Die Hinweise, die durch diese Resultate vermittelt worden sind, könnten für die immunodepressive Behandlung bei den Menschen verwertet werden, um ein dauerhaftes Verbleiben von nichtverträglichen Transplantaten zu erreichen.

BIBLIOGRAPHIE

1. W. Dameshek et R. S. Schwartz, Treatment of certain autoimmune disasese with antimetabolites. A preliminary report. *Trans. Ass. Amer. Phycns.* **73,** 113 (1960).
2. S. L. Lee, L. E. Meiselas, S. B. Zingale et S. M. Richman, Effect of 6-mercaptopurine administration on antibody production and clinical course in systemic lupus erythematosus. Report of a case. *Arthr. and Rheum.* **4,** 56 (1961).
3. F. Milgrom et E. Witebsky, Autoantibodies and autoimmune diseases. *J. Amer. med. Ass.* **181,** 706 (1962).
4. R. Schwartz et W. Dameshek, The treatment of autoimmune hemolytic anemia with 6-mercaptopurine and thioguanine. *Blood* **19,** 483 (1962).
5. F. Georgi, C. G. Honegger, H. P. Rieder et R. Wuthrich, Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis durch ein Cysostaticum der Methyl-hydrazinreihe. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **21,** 381 (1963).
6. M. W. Brandriss, Methotrexate: suppression of experimental allergic encephalomyelitis. *Science* **140,** 186 (1963).

7. R. Y. Calne, G. P. J. Alexandre et J. E. Murray, A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. 5th Tissue Homotransplantation Conference. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* **99,** 743 (1962).
8. R. Y. Calne, *Renal Transplantation,* Vol. 1 Arnold Londres (1963).
9. J. E. Murray, R. Gleason et A. Bartholomay, Second report of registry in human kidney transplantation. *Transplatation* **2,** 660 (1964).
10. A. Sicular, D. A. Dreiling, F. Paronetto et A. E. Kark, Studies of rejection of the homotransplanted canine liver. *Surg. Forum* **14,** 202 (1963).
11. A. Bonilla-Naar et A. Alvarez-Vasquez, New one stage technique for total hepatectomy and homotransplantation of the liver in dogs. *Surgery* **54,** 517 (1963).
12. N. Marcenac, L. Leger, J. C. Patel, J. Y. Neveux, B. Cazes, Y. Chapuis, G. Leroy, A. Patel et G. Lemaigre, Premier bilan de notre expérience de l'homotransplantation hépatique chez l'animal. *Presse Méd.* **72,** 811 (1964).
13. I. W. MacPhee et E. S. Wright, Experimental lung transplantation. *Lancet* **1,** 192, (1964).
14. D. A. Blumenstock, J. A. Collins, H. B. Hechtman, D. Hosbein, E. D. Thomas et J. W. Ferrebee, Late results of homotransplantation of the lung in dogs. *Dis. Chest.* **45,** 484 (1964).
15. D. A. Blumenstock, H. B. Hechtman, J. A. Collins, A. Jaretzki III, J. D. Hosbein, W. King et J. H. Powers, Prolonged survival of orthotopic homotransplants of the heart in animals treated with Methotrexate. *J. thorac. cardiovasc. Surg.* **45,** 616 (1963).
16. A. Dunjic, Absence of secondary disease in rats treated with homologous bone marrow transfusions after administration of "Myleran." *Nature (Lond.)* **198,** 603 (1963).
17. G. Mathe, J. L. Amiel et J. L. Niemetz, Greffe de moelle osseuse après irradiation totale chez des souris leucémiques suivie de l'administration d'un antimitotique pour réduire la fréquence du syndrome secondaire et ajouter à l'effet antilcucémique. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **254,** 3603 (1962).
18. G. Mathe, J. L. Amiel, J. L. Niemetz, Greffe de moelle osseuse après irradiation totale chez des souris leucémiques suivie de l'administration d'un produit antimitotique. *Bull. Org. mond. Santé* **26,** 692 (1962).
19. G. Mathe, M. J. de Vries, L. Schwarzenberg, J. L. Amiel, A. Cattan, M. Schneider, J. L. Binet, M. Tubiana, C. Lalanne, V. Schwarzmann, et R. Nordmann, Les divers aspects du syndrome secondaire compliquant les transfusions de moelle osseuse ou de leucocytes allogéniques chez des sujets atteints d'hémopathies malignes. *Europ. J. Cancer* **1,** 75 (1965).
20. J. L. Amiel, G. Mathe, M. Matsukura, A. M. Mery, G. Daguet, R. Tenenbaum, S. Garattini, C. Brezin et V. Palma, Tests for determination of the effect of antimitotic products on immune reactions. *Immunology* **7,** 511 (1964).
21. J. L. Amiel, C. Brezin, M. Sekiguchi, A. M. Mery, B. Hoerni, S. Garattini, G. Daguet et G. Mathe, Depression des réactions immunitaires par une méthyl-hydrazine. *Rev. franc. Etud. clin. biol.* **9,** 636 (1964).
22. G. Mathe, M. Schneider, A. Cattan, J. L. Ameil et L. Schwarzenberg, Clinical trials with methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) and with N-isopropyl-α-(2-methylhydrazino)-*p*-toluamide in various leukaemias and hematosarcomas. In *Chemotherapy of Cancer, Symp.* Vol. 1. p. 204 Elsevier Plattner, Amsterdam (1964).
23. F. Lapeyraque, Le prélèvement du sang dans le sinus caverneux. *Rev. franc. Etud. clin. biol.* **8,** 195 (1963).
24. F. Lepine, F. Roger et A. Roger, La réaction cinétique de séroneutralisation des virus poliomyélitiques. *Bull Org. mond Santè* **20,** 563 (1959).
25. A. C. Aisenberg, Suppression of immune response by "vincristine" and vinblastine. *Nature (Lond.)* **200,** 484 (1963).
26. M. C. Berenbaum et I. N. Brown, Dose-response relationships for agents inhibiting the immune response. *Immunology* **7,** 65 (1964).
27. J. A. Andre, R. S. Schwartz, W. J. Mitus et W. Dameshek, The morphologic responses of the lymphoid system to homografts. II. The effects of antimetabolites. *Blood* **19,** 334 (1962).
28. A. W. Frish et G. W. Davies, The inhibition of haemagglutinin formation in mice by purine and pyrimidine analogues. *J. Immunol.* **88,** 269 (1961).

29. D. M. Green, The effect of nitrogen mustard on the immunological response of the rabbit I. The effect of nitrogen mustard on the primary response to a bacterial antigen. *Brit. J. exp. Path.* **39,** 192 (1958).
30. J. R. Hoyer et R. M. Condie, Suppression of delayed hypersensitivity in guinea-pigs and rabbits with 6-mercaptopurine. *Fed. Proc.* **21,** 277 (1962).
31. S. R. Humphreys, M. A. Chirigds, E. L. Milstead, N. Mantel et A. Goldin, Studies on the suppression of the homograft response with folic acid antagonist. *J. nat. Cancer Inst.* **27,** 259 (1961).
32. R. J. Janssen, R. G. Marshall, P. J. Gerone, N. F. Cheville et J. H. Convey, Effects of 6-mercaptopurine on the immunological responses of various laboratory animals to variola and vaccinia viruses. *Bact. Proc.* **120** (abstract) (1961).
33. H. C. Maguire et H. I. Maibach, Inhibition of guinea pig anaphylactic sensitization with cyclophosphamide. *J. invest. Derm.* **36,** 235 (1961).
34. R. W. Prichard et D. M. Hayes, The effects of aminopterin on guinea pig tuberculosis. *Amer. J. Path.* **38,** 325 (1961).
35. R. Schwartz et J. Andre, Clearance of proteins from blood of normal and 6-mercaptopurine treated rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* **104,** 228 (1960).
36. C. Heidelberger, N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Pleven et J. Scheiner, Fluorinated pyrimidine, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature (Lond.)* **179,** 663 (1957).
37. L. Bosch, E. Harbers et C. Heidelberger, Studies on fluorinated pyrimidines. V. Effects on nucleic acid metabolism *in vitro*. *Cancer Res.* **18,** 335 (1958).
38. A. Powell, C. A. Hubay et W. D. Holden, A rational screening program for studies in homotransplantation. *Surg. Gynec. Obstet.* **114,** 167 (1962).
39. W. L. Wilson, Chemotherapy of human solid tumors with 5-fluorourcial. *Cancer* **13,** 1230 (1960).
40. A. W. Frisch et G. H. Davies, Inhibition of hemagglutinin synthesis by cytoxan. *Cancer Res.* **25,** 745 (1965).
41. C. N. Muller-Berat, L. N. van Putten et D. W. Van Bekkum, Cytostatic drugs and secondary disease following homologous bone marrow transplantation, extrapolation from the mouse to the primate. *7th Int. Transplantation Conf. N.Y. Academy of Science* (1966).
42. R. L. Noble, C. T. Beer et J. H. Cutts, Further biological activities of vincaleucoblastine, an alcaloid from Vinca Rosea. *Biochem. Pharmacol* **1,** 347, (1958).
43. G. H. Svoboda, Alkaloids of Vinca Rosea linn. IX. Extraction and characterization of leurosidine and leurocristine. *Lloydia* **24,** 173 (1961).
44. G. H. Svoboda, A note on several alkaloids from Vinca rosea linn. I. Leurosine, Virosine and Perivine. *J. pharm. Sci.* **46,** 508 (1957).
45. I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman et J. P. Burnett, Jr., The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res.* **23,** 1390 (1963).
46. G. Mathe, O. Schweisguth, M. Schneider, J. L. Amiel, A. Cattan, L. Schwarzenberg, G. Brule et R. Smadja, Valeur de la vincaleucoblastine dans le traitement de la maladie de Hodgkin et d'autres hématosarcomes et leucémies. Etude portant sur 100 malades. *Sem. Hôp. Paris,* **40,** 320 (1964).
47. G. Mathe, M. Schneider, P. Band, J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, A. Cattan et J. R. Schlumberger, Leurosine sulfate in treatment of Hodgkin's disease, acute lymphoblastic leukaemia, and lymphoblastic lymphosarcoma. *Cancer Chemother. Rep.* **49,** 47 (1965).
48. G. Mathe, M. Schneider, L. Schwarzenberg, A. Cattan, J. L. Amiel, J. R. Schlumberger et O. Gracia, La vincaleucoblastine, la leurocristine et la leurosine dans le traitement des leucémies et hématosarcomes. 1er symposium G.E.C.A. "Les alcaloïdes de vinca rosea en chimiothérapie anticancéreuse," *Paris Excerpta. med. Found.* **106,** 85 (1965).
49. A. C. Aisenberg et B. Wilkes, Studies on the suppression of immune responses by the periwinkle alkaloids vincristine and vinblastine, *J. clin. Invest.* **43,** 2394 (1964).
50. C. F. Zukoski, J. M. Callaway, et W. G. Rhea, Prolongation of canine renal homograft survival by antimetabolites. *Transplantation* **1,** 293 (1963).

51. G. MATHE, O. SCHWEISGUTH, G. BRULE, J. L. AMIEL, A. CATTAN, M. THOMAS et P. ZAMET, Essai de traitement de la maladie de Hodgkin et d'autres affections reticulo-histiocytaires malignes par la vincaleucoblastine. *Presse méd.* **70,** 1349 (1962).
52. G. MATHE, O. SCHWEISGUTH, G. BRULE, C. BREZIN, J. L. AMIEL, L. SCHWARZENBERG, M. SCHNEIDER, A. CATTAN, C. JASMIN et R. SMADJA, Essai de traitement par la leurocristine de la leucémie aiguë lymphoblastique et du lymphoblastosarcome. *Presse méd.* **71,** 529 (1963).
53. J. GREENBERG, J. D. MANDELL et P. L. WOODY, Resistance and cross resistance of Escherichia coli mutants to antitumour agent mytomycin C. *J. gen. Microbiol.* **26,** 509 (1961).
54. S. SHIBA, A. TERAWAKI, T. TOGUSHI et J. KAWAMATA, Studies on the effect of mitomycin C on nucleic acid metabolism in Escherichia coli strain B. *Biken's J.* **1,** 179 (1958).
55. H. S. SCHWARTZ, S. S. STERNBERG et F. S. PHILIPS, Pharmacology of mitomycin C. IV. Effect *in vivo* on nucleic acid synthesis: comparison with actinomycin D. *Cancer Res.* **23,** 1125 (1963).
56. P. C. NOWELL, Mitotic inhibition and chromosomes damage by mitomycin in human leucocyte culture. *Exp. Cell. Res.* **33,** 445 (1964).
57. M. COHEN et M. W. SHAW, Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.* **23,** 386 (1964).
58. H. FUTONAKA, A. GOMIBUCHI, K. FURUKAWA, H. ISHII, M. INOUE et S. SHIN, Effects of anticancer agents on antibody production. *Jap. J. Cancer Clin.* **11,** 10 (1965).
59. B. SOKOLOV et B. MCCONNELL, Host defense and chemotherapy in experimental cancer, In: *VIIIth Int. Cancer Congr.* 22–28 July, Moscow, pp. 323–324. Medgiz, Moscow (1962).
60. F. A. SCHMID et M. SCHMID, Effects of pretreatment with carcinostatic agents on artificial pulmonary metastases. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **3,** 358 (1962).
61. E. REICHE, R. M. FRANKLIN, A. J. SHATKIN et E. L. TATUM, Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. *Science* **134,** 556 (1961).
62. J. W. UHR, Actinomycin D: its effect on antibody formation *in vitro*. *Science* **142,** 1476 (1963).
63. C. J. WUST, C. L. GALL et G. D. NOVELLI, Actinomycin D: effects on immune response. *Science* **143,** 1041 (1964).
64. M. B. YARMOLINSKY et G. DE LA HABA, Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45,** 1721 (1959).
65. D. NATHANS et F. LIPMANN, Amino acid transfer from amino-acyl RNA to protein on ribosomes of *E. coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **47,** 497 (1961).
66. A. S. WEISBERGER, T. M. DANIEL et A. HOFFMAN, Suppression of antibody synthesis and prolongation of homograft survival by chloramphenicol. *J. exp. Med.* **120,** 183 (1964).
67. A. FARHI et A. LAMENSANS, Contribution à l'étude de l'action des antibiotiques sur l'immunité. Action du chloramphénicol sur la production d'anticorps vis-à-vis de germes tués. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **243,** 613 (1956).
68. V. C. SHAH, Autoradiographic studies of the effects on antibiotics, amino acid analogs and nucleases on the synthesis of DNA in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* **23,** 1137 (1963).
69. W. BOLLAG et E. GRUNBERG, Tumour inhibitory effects of a new class of cytotoxic agents: methylhydrazines derivatives. *Experientia (Basel)* **19,** 130 (1963).
70. G. MATHE, L. BERUMEN, O. SCHWEISGUTH, G. BRULE, M. SCHNEIDER, A. CATTAN, J. L. AMIEL et L. SCHWARZENBERG, Methyl-hydrazine in treatment of Hodgkin's disease and various forms of hematosarcoma and leukaemia. *Lancet* **ii,** 1077 (1963).
71. K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER et A. LANGEMANN, The degradation of deoxyribonucleic acid by new tumour inhibiting compounds the intermediate formation of hydrogen peroxide. *Experientia (Basel)* **19,** 132 (1963).
72. K. BERNEIS, W. BOLLAG, M. KOFLER et H. LUTHY, Synergism between ionizing radiation and a cytotoxic methylhydrazine derivative: effect on DNA degradation. *Experientia (Basel)* **21,** 318 (1965).

73. C. Choquet, E. Rosenkovitch, O. Pannenko, M. F. Crochet et I. Florentin, Comparaison des effets de l'association irradiation totale méthylhydrazine, et de l'irradiation totale seule pour l'éradication de la leucémie greffé L1210 traitée par immunothérapie adoptive. *Rev. franç Etud. clin. biol.* **11,** 298 (1966).
74. W. Bollag, Suppression of the immunological reaction by methylhydrazines, a new class of antitumour agents. *Experientia (Basel)* **19,** 304 (1963).
75. G. L. Floersheim, Verlängerte Ueberlebenszeit von Hauthomotransplantaten bei Mäusen durch ein Methylhydrazinderivat. *Experientia (Basel)* **19,** 546 (1963).
76. R. Hirt et R. Berchtold, Biophysikalische Studien mit synthetischem Lecithin als Weg zu neurartigen Chemotherapeutika. *Experientia (Basel)* **17,** 418 (1961).
77. C. J. Kensler, Chemotherapeutic activity of phtalanilide derivatives. An approach to anticodic therapy? *Cancer Res.* **23,** 1353 (1963).
78. M. Ochoa, A. Gellhorn et W. J. Benjamin, Phtalanilide inhibition of protein synthesis in a cell free L 1210 mouse ascites leukaemia system. *Cancer Res.* **24,** 480 (1964).
79. J. H. Burchenal, V. C. Gregg, S. P. Lancaster, R. Hirt, R. Berchtold, R. Fischer et R. Balsiger, Prevention by sulfonic and phosphoric analogs of the terephtalanilide inhibition of leukaemia P815Y *in vitro*. *Cancer Res.* **25,** 469 (1965).
80. G. Moldovanu et D. G. Miller, Effects of phtalanildies on the immune response. In: *IIIe Congr. Int. Chimiothérapie*, Vol. 1. Georg Thenne, Stuttgart (1965).
81. A. M. Mery, J. L. Amiel, G. Daguet, M. Sekiguchi, C. Brezin, I. Florentin, S. Garattini et G. Mathe, Action d'une imidazoline-terephtalanilide sur les réactions immunitaires. *Rev. franç Etud. clin. biol.* **10,** 1066 (1964).
82. J. H. Burchenal, M. S. Lyman, J. R. Purple, V. Coley, S. Smith et E. Bucholz, Therapeutic combination and resistance studies on certain imidazolin phtalanilide derivatives in mouse leukaemia. *Cancer Chemother. Rep.* **19,** 19 (1962).
83. J. H. Burchenal, V. Coley, J. R. Purple, E. Bucholz, M. S. Lyman et W. Kreis, Studies on the mechanism of action of various phtalanilide derivatives by cross resistance and tissue culture. *Cancer Res.* **23,** 1364 (1963).
84. B. L. Freedlander et F. A. French, Carcinostatic action of polycarbanyl compounds and their derivatives II glyoxal bis (guanylhydrazone) derivatives. *Cancer Res.* **18,** 360 (1958).
85. B. C. Pressman, The effects of guanidines and alkyl guanidines on the energy transfer reactions of mitochondria. *J. biol. Chem.* **238,** 401 (1963).
86. A. C. Sartorelli, A. T. Iannotti, B. A. Booth, F. H. Schneider, J. R. Bertino et D. G. Johns, Complex formation with DNA and inhibition of nucleic acid synthesis by methylglyoxal-bis (guanylhydrazone). *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **103,** 174 (1965).
87. E. J. Freireich et E. Frei, III, Clinical studies of intravenous methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) (CH3GAG). *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **3,** 319 (1962).
88. E. M. Hersh, P. P. Carbone, V. G. Wong et E. J. Freireich, Inhibition of the primary immune response in man by antimetabolites. *Cancer Res.* **25,** 997 (1965).
89. E. Mihich, Current studies with methylglyoxal-bis (guanylhydrazone). *Cancer Res.* **23,** 1375 (1963).
90. S. Okamato, Plasmin and antiplasmin. Their pathologic physiology. *Keio J. Med.* **8,** 211 (1959).
91. A. Cattan, L. Schwarzenberg, M. Shneider, J. L. Amiel et G. Mathe, Essai de traitement par l'acide epsilon amino-caproïque de patients atteints de syndromes hémorragiques, en particulier de syndromes liés à une thrombocytopénie. *Presse méd.* **71,** 2037 (1963).
92. G. Itoga et T. Yogo, The inhibitory effect of epsilon amino-caproic acid on the tuberculin reaction. *Keio J. Med.* **8,** 299 (1959).
93. E. D. Lowney, Effects of epsilon-amino-caproic acid on the tuberculin reaction in man. *J. invest. Derm.* **42,** 243 (1964).
94. H. W. Neubauer, Neuere Medikamente zur Behandlung des anaphylaktischen Schocks bei Versuchstieren. *Dermatologica* **126,** 124 (1963).

95. R. WURTHRICH, H. P. RIEDER et G. RITZEL, Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis durch epsilon-aminocapronsäure. *Experientia (Basel)* **19,** 421, (1963).
96. R. W. GILLETTE, A. FINDLEY et H. CONWAY, Prolonged survival of homografts in mice treated with EACA. *Transplantation* **1,** 116 (1963).
97. A. BERTELLI et G. FRONTINO, Protection of the skin homografts by epsilon acetamide caproic acid. *Nature (Lond.)* **197,** 510 (1963).
98. A. BERTELLI, M. BISIANI, L. CERRINI, A. CONFALIONERI, V. LIBRO, E. LODI et M. PROTO, Prolonged survival of kidney homotransplants in dog treated by epsilon acetamide caproic acid. *Nature (Lond.)* **201,** 209 (1964).
99. E. H. COOPER et J. L. AMIEL, La prolifération des lymphocytes humaines *in vitro*. *Rev. franc. Etud. clin. biol.* **10,** 469 (1965).
100. R. TENENBAUM, G. SEMAN, C. CHOQUET et J. LAFUMA, Transformation des cellules souches ganglionnaires et des lymphocytes en cellules hyperbasophiles dans la réaction du greffon contre l'hôte. *Rev. franç. Etud. clin. biol.* **10,** 1071 (1965).
101. K. E. HELLSTROM et G. MOLLER, Immunological and immunogenetic aspects of tumor transplantation. *Progr. Allergy* **9,** 158 (1965).
102. D. SCHWARTZ et P. LAZAR, Notions de synergie et d'antagonisme en médecine et en biologie. *Rev. franç. Etud. clin. biol.* **9,** 592 (1964).
103. T. HATTORI, K. OKADA, M. SEKIGUCHI, K. ASHIKAWA, S. ENDO et Y. ISHIBASHI, Cytoxicity of mitomycin C and the physiologic measures minimizing it. Experimental and clinical studies. *Growth* **27,** 129 (1963).
104. C. BREZIN, M. MATSUKURA, A. M. MERY, M. PAPIERNIK, M. SEKIGUCHI, G. SEMAN et S. SORIEUL, Le choix du donneur, in: *La Greffe des Cellules Hématopoïetiques Allogéniques*, Colloque du C.N.R.S., Paris, 1964, Vol. 1, p. 225. C.N.R.S. Paris (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 67–74. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Changes in the Cellular Composition of Bone Marrow in Mice Irradiated with Different X-ray Doses

J. HAOT*, G. HAUGHTON† and L. REVESZ

Department of Tumour Biology, Karolinska Institute Medical School, Stockholm, Sweden

INTRODUCTION

THE ACUTE lethal effects of X-rays on mammalian organisms can be ascribed to lesions produced in two major biological systems: the intestinal tract and the hematopoietic tissues. The cellular alterations produced in the latter can be estimated by various methods and, since the pioneer work of Heineke [1, 2] in 1904, many authors have studied the cytology and histology of the bone marrow following irradiation and the concomitant changes detected in the peripheral blood. More recently, some workers have used more precise techniques such as measurement of the total number of cells, the mitotic index, the synthesis of DNA, the incorporation of Fe^{59}, the colony forming ability or giant cell formation [3–8]. However, no easy and accurate measurement of the radiolesions inflicted upon the different cellular components has been possible in these previous investigations. The purpose of the present work has been to study the cellular destruction and recovery in bone marrow by a new quantitative method based on a cell size analysis which permits differentiation between different populations [9] of cells.

MATERIAL AND METHODS

The mice used were 2 months old CBA females. They were fed a standard pellet diet and water *ad libitum.*

Bone marrow suspensions

The femurs, cleaned of their flesh, were broken above the knee (ephiphysial cartilage); the upper end was cut off with scissors, a part of the femoral neck being preserved. The bone cavity was washed quantitatively with 1 ml balanced salt solution (BSS) and the suspension containing the entire bone marrow material was then kept in the refrigerator for half an hour. For the counting of cells in the Coulter Counter a further dilution of 1/250 was prepared.

Coulter Counter

A B-model Counter equipped with a particle size-distribution plotter was used; the aperture was 100μ. The aperture current and amplification were fixed in order to discriminate between cells of a volume range varying from 0 to 500 μ^3. This volume range was divided into twenty-five "windows" of approximately 20 μ^3 each. The Counter and the plotter were calibrated with mouse red blood cell suspensions contain-

*On leave from Service d'Anatomie Pathologique, Université de Liège. Present Address : Service d'Anatomie Pathalogique (Professeur E. H. BETZ), 1, rue des Bonnes Villes, Liège (Belgium)

†Present address : Department of Bacteriology and Immunology, University of North Carolina, Chapel Hill.

ing 38×10^3 to 42×10^3 cells/ml. The calibration was adjusted before each set of experiments assuming a mean erythrocyte volume of 43 μ^3. The height of the peaks of the size distribution curve which is proportional to the number of cells passing in the corresponding window was measured in arbitrary units. Base line variation was within two units which represented thus the lowest limit of measurements. After irradiation with heavy doses of X-rays we observed a contamination of the marrow suspensions by red blood cells. The overlapping produced by this contamination was estimated by reference to curves plotted for pure suspensions of erythrocytes.

Irradiation

The conditions of irradiation were: 200 kV, 15 mA, FD 50-cm, filter 0·5 mm Cu. The mice were kept in plexiglass chambers during the irradiation. The doses, measured with a Philips integrating dosimeter, ranged between 50 and 1500 R. The mice were killed after different delays varying from 2 to 48 hr after irradiation for the short term experiments (study of the destructive effects of the X-rays). For the long term experiments (study of the recovery) they were killed between the second and the thirty-fourth day after irradiation. Four to twelve mice were used at every observation period for each dose of X-rays. Control mice received sham irradiation.

RESULTS

Normal bone marrow

The particle size-distribution was studied in the bone marrow from thirty-three control, untreated, animals. A sample of these results is shown in Fig. 1. The high values seen for particles less than 80μ^3 probably represent erythrocytes. Indeed higher amplification resolved these small particles into a curve having the same peak value and shape as can be obtained with a pure suspension of erythrocytes. Two other major size-populations of cells can be distinguished:

(1) A population of smaller cells with a most frequent size in the range 100–120 μ^3. This corresponds very closely with the size of lymphocytes separated from mouse lymph nodes [9].

(2) A second population with a most frequent size in the range 180–200 μ^3.

The heights of the two peaks were relatively constant when the cells in the total bone marrow population in the two femurs of non-irradiated mice were counted: $34{\cdot}1 \pm 1{\cdot}7$ (Standard Error) and $37{\cdot}7 \pm 1{\cdot}3$ (arbitrary units) respectively. In estimating the height of the first peak, a correction was always applied for overlap from the erythrocyte peak, by reference to standard curves plotted for pure suspensions of red blood cells. The value for the second peak was not corrected for overlap, but was checked by counting the total particles within the size range 160–500 μ^3.

Bone marrow of irradiated mice

Two series of measurements were made. In the first, the influence of a wide dose range of X-rays was studied throughout a period of 48 hr following irradiation. In the second series, the effect of a more restricted dose-range was studied over a period of 34 days. In each case, groups of mice were killed at various intervals following irradiation and size-distribution curves plotted for the cell content of the bone-marrow in two femurs. The corrected height

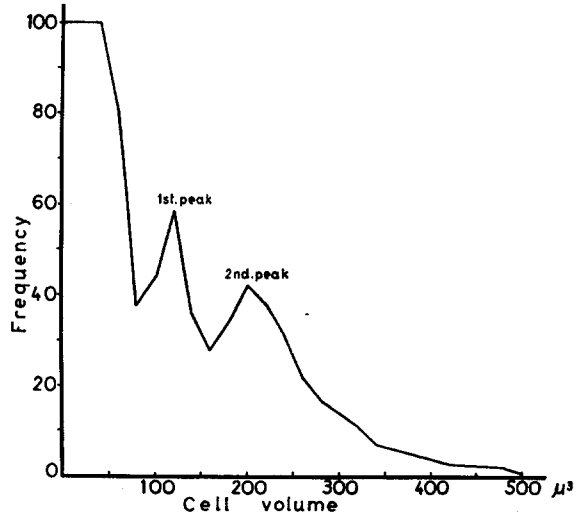


Fig. 1. *Relative distribution of cells of different sizes in one sample of normal mouse bone marrow.*

of the two major peaks was used as an index of the number of cells remaining in each size-population.

A. *Short term experiments*—Results obtained in four to ten repeat measurements are presented in Tables 1 and 2. The data indicate that irradiation with increasing doses results in an increasing depression of the peaks at each time level. The smaller cells of the first peak are clearly more sensitive than the larger cells in the second peak. This is reflected both in the speed with which the depressing effect on the peak height becomes apparent, and in the dose of irradiation required to produce a depression of comparable magnitude. Thus, the first peak is already depressed within 2 hr following a dose of 500 R, and a dose as low as 50 R results in a depression within 6 hr.

In contrast, the larger cells of the second peak were slower to respond and were depressed to a lesser extent by any given dose. Any significant depression with 50 R did not occur before 48 hr, and significant effect at 2 hr was seen only with doses larger than 700 R. From the decrease of the peak height relative to the controls in log units (Fig. 2) it can be calculated that the mean dose which decreases the small cell population by 63 per cent (i.e. reciprocal of the slope constant in log units) after a delay of 48 hr is 72 R, and that which decreases the large cell population has a 2·5 times higher value i.e. 181 R.

B. *Long term experiments.* The object of these experiments was to study recovery for the bone marrow from radiation damage and to compare the kinetics of the recovery of the two size populations of cells.

Results obtained in the dose range 100–400 R from six to twelve repeat measurements are presented in Figs. 3 and 4. It is clear that the two cell populations behave differently. The smaller cells rebound to a value higher than that of normal bone marrow. In our experiment, the peak of this rebound has been observed 11 days after irradiation. Its intensity depends upon the extent of the initial irradiation damage and hence upon the dose. The maximum rebound value attained represents an approximate doubling of the normal population. The results beyond 11 days are consistent with further oscillations about the norm, but are too erratic to be interpreted with any certainty.

The population of larger cells does not show a dose-related overshoot. Recovery seems to be biphasic, an initial rapid recovery, which by 6 days reaches a value varying between 50 and 100 per cent of the normal value, followed by a second, slower, recovery phase starting at about 14 days and complete by 22 days. Between the twenty-second and the thirty-fourth day both populations show only a slight variation about the norm.

DISCUSSION

By use of a particle size distribution plotter attached to a Coulter Model B Counter, it has been possible to distinguish between two major size-populations of cells (other than erythrocytes) present in mouse bone marrow. This discrimination has made it possible to study independently the decrease of the two size populations after X-irradiation. The two populations were found to have different depletion characteristics both with regards to

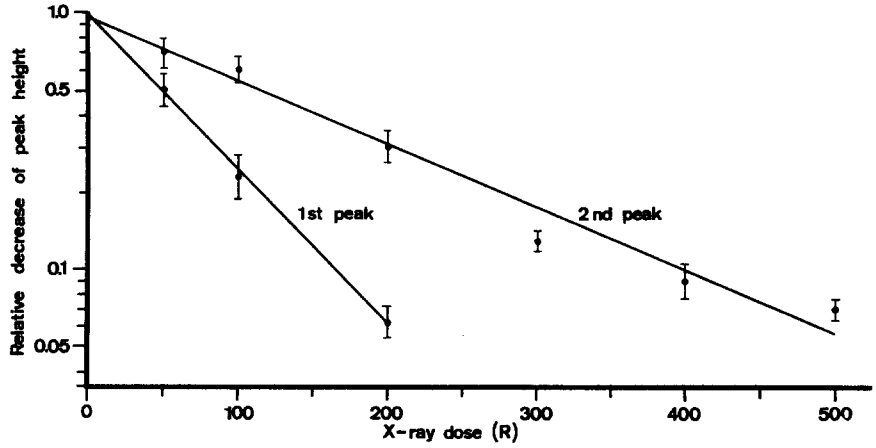


Fig. 2. Decrease of the first and second peak population relative to unirradiated controls 48 hr after treatment of mice with different X-ray doses. The data presented in Table 1 and 2 were used for the computation. The regression lines were calculated by least square analysis and have the equation $y=0\cdot99-0\cdot0061x$ (*first peak*) *and* $y=0\cdot97-0\cdot0024x$ (*second peak*).

Table 1. *Effect of X-irradiation on the first peak population in the bone marrow studied after delays varying from* 2 *to* 48 *hr. The figures indicate the mean peak height* ±*S.E. expressed in arbitrary units calculated from four to twelve repeat measurements. For thirty-three control animals the same value was* 34·1±1·7

X-ray dose (R)	Delay after irradiation (hr)					
	2	4	6	8	24	48
50	—	30·0± 3·1	23·0± 2·4	22·0± 1·1	15·0± 1·6	17·6± 1·4
100	—	21·0± 2·3	15·0± 0·5	10·8± 1·7	6·4± 0·7	7·9± 0·9
200	26·5± 0·5	14·2± 1·7	8·5± 1·1	8·8± 2·1	3·8± 1·0	2·0± 0·4
300	28·5± 0·9	10·2± 1·3	7·1± 0·9	4·2± 1·1	<2	<2
400	27·0± 1·5	12·8± 1·5	6·0± 0·6	<2	<2	<2
500	24·0± 2·0	11·7± 2·2	3·9± 0·7	<2	<2	<2
600	22·8± 3·5	11·8± 1·9	4·2± 0·5	<2	<2	<2
700	12·0± 1·0	10·3± 1·5	3·0± 0·7	<2	<2	<2
800	—	8·7± 1·4	1·5± 0·5	<2	<2	<2
1000	18·0± 1·5	8·5± 1·6	3·8± 0·5	<2	<2	<2
1500	15·2± 1·8	11·4± 1·7	2·7± 0·7	<2	<2	<2

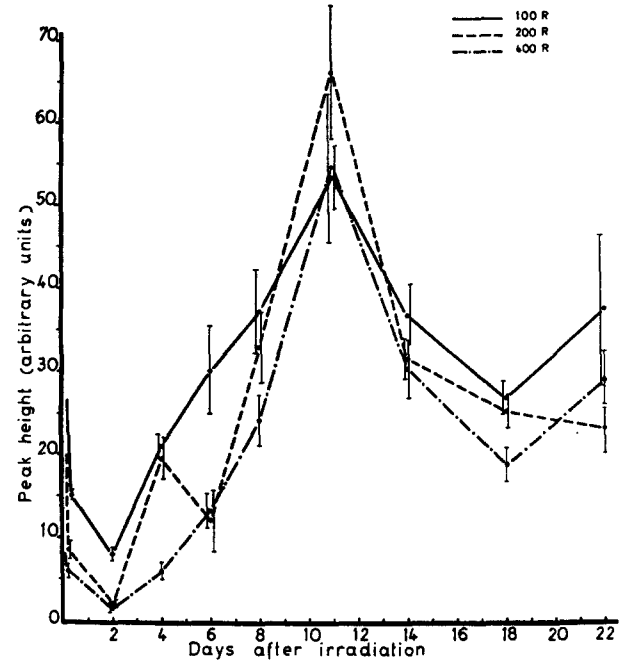


Fig. 3. *Recovery of the first peak population after irradiation with* 100, 200, *and* 400 R. *The mean peak height and its standard error calculated from six to twelve repeat measurements are indicated.*

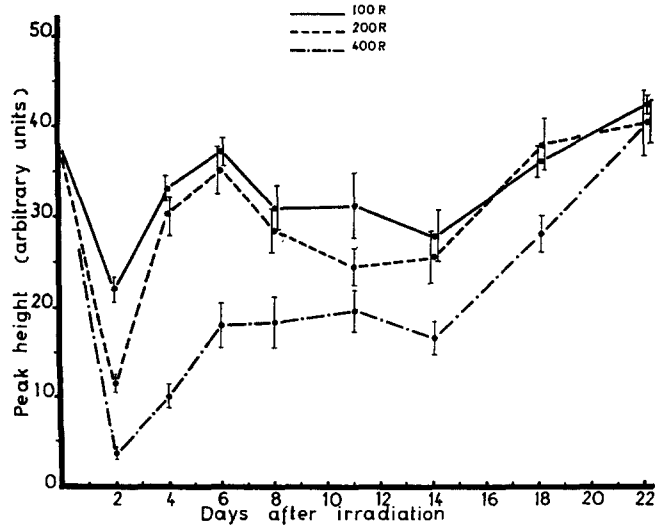


Fig. 4. *Recovery of the second peak population after irradiation with* 100, 200 *and* 400 R.

the immediate response to and recovery from irradiation. The smaller cells, having a most frequent volume about 120 μ^3, are extremely sensitive: 100 R reduce the population to below 50 per cent in 6 hr and 200 R within 4 hr. This rapid response suggests that the disappearance of the cells, whether due to death or migration from the bone marrow, is independent of mitotic arrest. Non-mitotic death following X-irradiation is known for small lymphocytes. The size of the cells prepared from lymph nodes corresponds closely with the size of the smaller cells measured in the bone marrow [9]. The approximately exponential depletion of the small bone marrow cells, an increment of 72 R decreasing the population by 63 per cent at the time of maximal destruction, i.e. 48 hr after irradiation, is in a close agreement with the mean lethal dose of lymphocytes from the spleen (70–78 R) observed in *in vivo* tests [10, 11]. This presents also a suggestive evidence concerning the nature of these smaller cells.

The population of larger cells appears much more resistant to irradiation. At the time of maximal destruction, the decrease of this population also follows an approximately ex-

Table 2. Effect of X-irradiation on the second peak population in the bone marrow studied after delays varying from 2 to 48 hr. The first figures indicate the mean peak height ±S.E. expressed in arbitrary units calculated from four to twelve repeat measurements. The second figures represent the mean of the total number of cells $\times 10^5$ in the second population within the size range 160–500 μ^2. The same value for thirty-three control animals were 37·7±1·30 and 147·9±4·5, respectively

X-ray dose (R)	Delay after irradiation (hr)					
	2	4	6	8	24	48
50	—	32·8± 2·3	33·9± 1·9	31·8± 1·9	33·2± 1·4	27·4± 2·2
	—	127·3± 9·9	127·9± 5·1	131·9± 8·1	132·6± 4·6	116·6± 5·6
100	—	30·2± 1·3	30·1± 1·2	27·5± 0·7	24·0± 2·7	22·0± 1·3
	—	122·3± 4·0	113·0± 4·8	110·4± 6·7	92·8±16·1	97·9± 3·8
200	38·5± 1·5	33·5± 2·8	27·9± 1·1	27·5± 1·3	19·0± 0·3	11·3± 1·0
	145·0± 2·5	133·9± 6·5	108·0± 5·3	109·5± 5·7	66·9± 2·3	53·1± 3·5
300	38·5± 0·5	29·0± 1·5	25·6± 1·1	27·4± 3·0	14·2± 1·4	5·2± 0·2
	147·0± 2·0	112·0± 5·2	102·5± 5·4	104·5±14·0	54·3± 6·6	27·0± 1·0
400	41·0± 2·0	31·8± 1·8	26·1± 1·3	23·1± 1·6	11·8± 1·1	3·5± 0·5
	151·8±12·0	122·0± 6·2	97·8± 3·7	90·6± 4·3	46·3± 4·7	20·0± 2·3
500	37·0± 0·5	31·0± 1·9	24·6± 1·1	22·4± 1·5	15·0± 1·9	2·8± 0·2
	153·3± 2·7	128·0± 7·2	100·0± 3·1	90·1± 5·0	51·7± 5·3	14·0± 0·8
600	35·5± 1·0	28·0± 1·2	26·4± 1·7	21·6± 3·2	11·5± 1·4	<2
	143·3± 3·0	107·5± 3·8	103·5± 4·7	82·7± 8·7	41·1± 3·6	16·2± 1·8
700	31·0± 3·6	28·8± 2·9	22·3± 0·7	19·2± 0·7	10·8± 1·3	<2
	133·9±12·0	109·5±11·2	99·5± 6·6	80·4± 3·8	41·4± 2·7	12·5± 1·8
800	27·5± 1·5	25·0± 2·7	25·0± 4·5	18·0± 1·3	7·5± 1·0	—
	108·0±10·0	99·8± 9·0	79·9± 9·1	74·7± 3·9	28·9± 4·5	—
1000	27·0± 1·5	25·5± 1·9	21·7± 0·8	16·4± 0·7	10·4± 2·0	<2
	115·4± 6·3	100·4± 7·2	82·4± 3·5	71·9± 3·8	38·5± 4·1	9·6± 1·0
1500	31·0± 1·3	30·4± 2·4	20·5± 1·1	15·2± 0·7	7·2± 1·5	<2
	122·1± 6·9	112·7± 2·6	83·3± 5·2	59·2± 1·8	23·1± 4·7	5·9± 0·9

ponential pattern, the dose increment which decreases the population by 63 per cent is however, 181 R in this case. The speed of response of these cells is consistent with death of the cells occurring subsequent to or at the time of mitosis.

Obviously, the over-all sensitivity of the bone marrow will be determined by the composite sensitivity of its subpopulations. Considering that the two major populations studied are present in a roughly 2/3 proportion, the over-all sensitivity of the major part of the bone marrow will be between 70 and 181 R when population decrease is taken as an index of sensitivity. This is in agreement with the mean lethal dose of 124 R found in a recent study [12] by analysis of depletion curves of *all types* of nucleated cells of the bone marrow.

It is not possible, from the data presented, to correlate the two size-populations with the various cytological types and functions present in bone marrow. This topic is being investigated and the findings will be presented separately.

The recovery characteristics of the smaller cells, particularly the overshoot to approximately double the normal level, indicates that the regulation of the population level does not operate internally, but rather through some external feedback mechanism. Such a mechanism could operate through the population level of daughter cells or of emigrant cells in some other tissue (e.g. blood). The recovery, characteristics of the larger cells, by contrast, suggest either that the population level is internally self regulating or that the cells are derived from a different ancestral type, the ancestral population being regulated by the level of the population of daughter cells. The biphasic nature of the recovery of the larger cells further suggests that more than one, and possibly many, cell types are involved.

The great advantage of the technique which we have used is that it permits quantitative, objective *in vivo* study of the radiolesions and recovery of two distinguishable cell populations within a single tissue.

Acknowledgements—This work was supported by grants from the Swedish Cancer Society and the Swedish Medical Research Council. The valuable technical assistance of Miss Christina Svänsson is gratefully acknowledged.

RESUME

L'utilisation d'un compteur électronique de particules, équipé d'un enregistreur permet de mettre en évidence, dans la moelle hématopoïétique de la souris CBA femelle, deux populations de cellules de volume moyen différent. La première est composée de cellules de petite taille dont le volume moyen se distribue aux environs de 120 μ^3*; la seconde est constituée de cellules plus volumineuses se distribuant autour de* 200 μ^3.

Soumises à des doses de rayons X variant de 50 *à* 1500 *R, les deux populations cellulaires ont montré des sensibilités différentes. En effet, des doses faibles entraînent une destruction des "petites" cellules dès les premières heures après l'irradiation; les "grosses" cellules sont en revanche plus radio-résistantes, et des doses de rayons* X *plus importantes sont nécessaires pour produire un effet.*

Dans la moelle en régénération (après des doses de 100 *à* 400 *R), le comportement des deux populations est également différent. Les "petites" cellules régénèrent plus rapidement; au* 11*e jour, leur nombre dépasse largement les valeurs enregitrées dans la moelle normale. Les "grosses" cellules réapparaissent plus lentement et leur régénération semble suivre une courbe biphasique.*

SUMMARY

In the CBA female mice, an electronic particle size distribution analysis (Coulter Counter) permits to discriminate between two bone marrow cell populations; the first, composed of small cell forms a peak at 120 μ^3*; the second contains larger cells with a peak at* 200 μ^3. *After exposures to doses of X-rays varying from* 50 *to* 1500 *R, the two populations show different radiosensitivities. In the small cell population, a destructive effect can be detected during the first post-irradiation hours even with small doses; the large cell population is much more resistant and heavier doses are required to produce an effect.*

During the recovery period, studied after doses from 100 *to* 400 *R, the behaviour of the two populations is also different. The smaller cells rebound to a value higher than that of normal bone marrow within* 11 *days; the recovery of the larger cells seem to be slower and to present a biphasic pattern.*

ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Anwendung eines elektronischen Volumenverteilungszahlgerätes (Coulter Counter) kann man in dem Knochenmark der weiblichen CBA Maus zwei verschiedenen Zellpopulationen unterscheiden: die erste besteht aus kleinen Zellen und bildet einem Gipfelpunkt um 120 μ^3*; die andere enthält grössere Zellen mit einem Gipfelpunkt um* 200 μ^3*. Nach Röntgenbestrahlung mit Dosen von* 50 *bis* 1500 *R zeigen diese Zellpopulationen eine verschiedene Strahlenempfindlichkeit. In der Kleinzellpopulation kann während der ersten Stunde nach der Bestrahlung eine zerstörende Wirkung von sogar schwachen Dosen beobachtet werden. Die Strahlensensibilität der Grosszellpopulation ist deutlich niedriger und höhere Dosen sind nötig um dieselbe Wirkung zu erzeugen.*

Während der Regenerationsphase nach Dosen von 100 *bis* 400 *R ist das Benehmen der beiden Zellpopulationen auch ganz verschieden. Die kleineren Zellen steigen innerhalb* 11 *Tage zu einem Wert zurück, der höher als derjenige des normalen Knochenmarks steht; die Regeneration der grösseren Zellen scheint langsamer und in zwei Phasen zu verlaufen.*

REFERENCES

1. H. Heineke, Experimentelle Untersuchungen über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf innere Organe. *Mitt. Grenzgeb. Med. Chir.* **14,** 21–94 (1904).
2. H. Heineke, Uber die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf innere Organe. *Münch. med. Wschr.* **51,** 785 (1904).
3. T. T. Puck, Cellular aspects of the mammalian radiation syndrome. II. Cell depletion in bone marrow, spleen and thymus of young mice. *Radiat. Res.* **27,** 272 (1966).
4. Z. Karpfel, Changes in the mitotic index, the incidence of chromosomal aberrations and the proportion of mitotic phases in the bone marrow of mice irradiated with different doses of X-rays. *Folia biol.* **7,** 129 (1961).
5. L. G. Lajtha, R. Oliver, T. Kumatori and F. Ellis, On the mechanism of radiation effect on DNA synthesis. *Radiat. Res.* **8,** 1 (1958).
6. S. J. Raum and E. L. Alpen, Residual injury induced in the erythropoïetic system of the rat by periodic exposures to X-radiation. *Radiat. Res.* **11,** 844 (1959).
7. E. A. McCulloch and J. E. Till, The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma irradiation *in vitro* and *in vivo*. *Radiat. Res.* **16,** 822 (1962).
8. H. Lee, Relationship between radiation dose and giant cells in the surviving cell population of mouse marrow as determined by interference microscopy. *Nature, Lond.* **204,** 656 (1964).
9. G. Haughton, J. Haot, L. Revesz and G. Klein, Lymphoma growth *in vivo:* electronic discrimination between tumor and stroma cells. *Science, N.Y.* **150,** 769 (1965).
10. T. Makinodan, M. A. Kastenbaum and W. J. Peterson, Radio-sensitivity of spleen cells from normal and pre-immunised mice and its significance to intact animals. *J. Immunol.* **88,** 31 (1962).
11. F. Celada and R. R. Carter, The radiosensitive nature of homograft rejecting and agglutinin-forming capacities of isolated spleen cells. *J. Immunol.* **89,** 161 (1962).
12. T. T. Puck, Cell turnover in mammalian tissues; use of cell depletion measurements to calculate X-ray reproductive survival curves *in vivo*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **54,** 1797 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 75–77. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Induction Par le 6-Aminochrysène de Rémission du Cancer du Sein en Phase Avancée chez la Femme

GROUPE EUROPEEN DU CANCER DU SEIN*

INTRODUCTION

RUDALI, BUU-HOÏ ET LACASSAGNE, étudiant les propriétés biologiques des dérivés aminés des hydrocarbures polycycliques aromatiques, ont montré que l'un d'entre eux, le 6-aminochrysène (Fig. 1), dépourvu de pouvoir

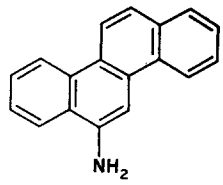


Fig. 1. *Formule du* 6-*aminochrysène.*

cancérigène, était doté de propriétés carcinostatiques sur certains cancers cutanés de la souris, induits par le 20-méthylcholanthrène, ainsi que sur certains adénocarcinomes mammaires spontanés de la souris [1]. Huggins, Grand et Fukunishi montrèrent que le 6-aminochrysène inhibe l'induction de la tumeur mammaire du rat Sprague-Dawley par le 7, 12-diméthylbenz(a)anthracène, et ce sans altération apparente de la fonction ovarienne; ce pouvoir inhibiteur appartient aussi à d'autres hydrocarbures polycycliques aromatiques dont certains sont cancérigènes [2]. Des expériences pratiquées par le Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse GECA mirent en évidence une action frénatrice du 6-aminochrysène sur la croissance d'une tumeur mammaire hormonodépendante de la souris. Bien que Rudali et Buu-Hoï aient découvert une action lymphopéniante de ce composé chez le rat et la souris [3], les diverses études pratiquées montrèrent l'absence de toxicité du 6-aminochrysène.

Ces actions expérimentales du 6-aminochrysène justifient l'étude de son action dans le cancer mammaire avancé de la femme. C'est le résultat de cette étude qui est exposé ci-après.

METHODES

Les méthodes utilisées pour la sélection des malades et l'évaluation des résultats sont celles du protocole pour les essais cliniques du Groupe [4, 5]. Etant donné le but de cette étude, qui consiste à mettre en évidence une action thérapeutique du nouveau composé sans en évaluer complètement les indications, les modifications suivantes ont été apportées aux disposition de ce protocole:

a. les malades préménopausiques ont été traitées sans oophorectomie préalable.

b. les malades traitées antérieurement par des hormones, à condition qu'elles n'aient pas

*Le Groupe Européen du Cancer du Sein comprend les participants suivants avec leurs collaborateurs:

E. Anglesio et A. Calciati, Istituto di Oncologia dell'Ospedale S. Giovanni, Turin, Italie.

M. Dargent et E. Pommatau, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

M. Margottini et G. Jacobelli, Istituto Regina Elena, Rome, Italie.

G. Martz et O. Haab, Kantonsspital, Zurich, Suisse

A. Netter et A. Gorins, Hôpital Necker et Hôpital Tenon, Paris, France.

F. Noeninckx et J. Servais, Hôpital du Stuvcenberg, Anvers, Belgique.

H. Nowakowski et K. Ruhstrat, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hambourg, Allemagne.

H. Tagnon (Coordinateur), M. van Rymenant, A. Coune et J. C. Heuson, Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgique.

H. van Gilse et J. Scheltema, Radio-Therapeutisch Institut, Rotterdam, Pays-Bas.

été administrées sous une forme à action prolongée, ont été admises dans la présente étude pour autant que le traitement précédent fût terminé depuis 3 mois et que l'affection néoplasique ne fût pas actuellement en rémission.

c. l'évolutivité des lésions, avant le début du traitement par le 6-aminochrysène, n'est pas un critère obligatoire; cependant une période d'observation de 3 semaines au moins doit précéder le début du traitement, afin de s'assurer qu'il n'y a pas de rémission objective des lésions due à un éventuel traitement antérieur ou à son arrêt.

Tableau 1. *Groupe Européen du Cancer du Sein. Etude n° IV. Répartition des malades et résultats du traitement. Composé administré:* 6-*aminochrysène,* 2 *grammes par jour, per os.*

Lésion dominante	Préménopausiques	Nombre d'années par rapport à la ménopause				
		Moins de 1	1 à 5	6 à 10	Plus de 10	Total
Locale			1/1	0/3	0/5	1/9
Osseuse		0/2	0/2	0/1	0/4	0/9
Viscérale	0/2	0/1	1/5	0/1	0/5	1/14
Total	0/2	0/3	2/8	0/5	0/14	2/32

Régressions objectives/nombre de malades.

Le 6-aminochrysène est administré per os, à la dose quotidienne de 2 grammes, en 4 prises de 2 comprimés de 250 milligrammes chacun. La durée du traitement est de 6 semaines, période au terme de laquelle l'évaluation de son effet est pratiquée; en cas de rémission, le composé est administré jusqu'à nouvelle progression des métastases. Afin de s'assurer de l'exécution du traitement par les malades, celles-ci sont, dans la mesure du possible, hospitalisées pendant le temps requis.

Les malades n'ayant pas pris le composé, pendant 1 mois au moins, ont été rejetées de la présente étude, à l'exception des cas décédés pendant ce laps de temps, qui ont été considérés comme des échecs.

RÉSULTATS

Le Tableau 1 montre le nombre de malades traitées, leur répartition, et le nombre de rémissions objectives observées. Sur un total de 32 malades traitées et évaluées, deux rémissions objectives ont été observées lors de l'administration du 6-aminochrysène; la première chez une malade ne présentant que des métastases cutanées, l'autre chez une patiente atteinte de lésions cutanées, osseuses et viscérales. Dans le premier cas, la durée de la rémission a été de 6 semaines, le médicament n'étant pas administré plus longtemps; dans le deuxième cas, la rémission a duré cinq mois.

EFFETS SECONDAIRES

Aucune toxicité hématologique ni hépatique n'a été décelée au cours de cet essai.

Des troubles de la repolarisation à l'ECG ont été notés chez 5 malades sur 11, à qui des électrocardiogrammes répétés furent pratiqués pendant le traitement. Chez une malade, les modifications de l'ECG disparurent après l'arrêt du traitement.

Les frottis vaginaux, les taux des gonadotrophines urinaires, des 17 cétostéroïdes et 17 hydroxycorticoïdes urinaires, des 17 hydroxycorticoïdes plasmatiques et de l'iode sanguin lié aux protéines ne se sont pas modifiés au cours du traitement.

Un certain nombre de malades ont présenté des nausées et des vomissements qui furent calmés par l'administration intramusculaire d'atropine; cependant, treize des dix-sept malades qui abandonnèrent le traitement, moins d'un mois après son début, le firent à cause des effets secondaires digestifs.

DISCUSSION

De la présente étude, il résulte que le 6-aminochrysène, administré par voie orale, a produit, chez 2 malades atteintes d'un cancer mammaire en phase avancée, une régression objective des métastases. Les conditions de cet essai ne permettent pas de tirer de conclusion du nombre de rémissions obtenues; le fait intéressant à noter est l'obtention de ces 2 rémissions induites par un dérivé aminé d'un hydrocarbure polycyclique aromatique dépourvu de pouvoir cancérigène, et apparemment de toxicité majeure. Ces effets secondaires digestifs observés sont sans doute dus à une irritation locale provoquée par la présence dans l'estomac d'un composé fort peu soluble. Il est possible que cette faible solubilité du 6-aminochrysène

s'accompagne d'une absorption intestinale peu importante, comme le suggèrent certaines études actuellement en cours. La résorption intestinale pourrait dès lors être très variable selon les malades, et il est concevable que le petit nombre de rémissions observé dans notre étude s'explique par un manque de résorption suffisante chez la plupart des sujets traités. Aussi une nouvelle étude devra-t-elle être entreprise dès l'obtention d'une préparation, actuellement mise au point, permettant d'obtenir une meilleure absorption par voie orale ou parentérale, afin de déterminer, en excluant le facteur digestif, l'efficacité réelle du composé dans la néoplasie mammaire généralisée de la femme.

L'hypothèse que le 6-aminochrysène agisse par une action indirecte hormonale peut être soulevée; en effet, Huggins et Morii ont montré que le 7, 12-diméthylbenz(a)anthracène, qui induit des tumeurs mammaires dans certaines races de rats, provoque une nécrose surrénalienne [6]. Cependant, les études hormonales pratiquées chez un certain nombre de malades traitées ne permettent pas d'invoquer un tel mécanisme d'action du 6-aminochrysène.

Si la nouvelle étude proposée confirme l'utilité de ce composé dans la thérapeutique médicale palliative du cancer mammaire généralisé, et ce sans apparition de nouvelles manifestations toxiques, l'on posséderait un nouvel agent non hormonal qui, au contraire de plusieurs hydrocarbures aromatiques polycycliques et de plusieurs substances actives contre les tumeurs malignes, n'est pas cancérigène.

Remerciement — Nous remercions vivement le Docteur Lambelin de la Firme Continental Pharma de Bruxelles qui nous a fourni le 6-aminochrysène.

RESUME

Deux cas de régression objective des métastases d'une néoplasie mammaire généralisée de la femme ont été obtenus par l'administration par voie orale de 6-aminochrysène, à la dose quotidienne de 2 grammes. Les raisons du choix de ce composé et son intérêt sont exposés.

SUMMARY

Two objective regressions of advanced breast cancer in women have been observed after oral administration of 6-aminochrysene in a daily dose of 2 g.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Fälle einer objektiven Rückbildung der Metastasen einer generalisierten Frauenbrustneoplasie wurden durch eine tägliche perorale Verabreichung von 2 g des 6-Aminochrysens erlangt.

BIBLIOGRAPHIE

1. G. Rudali, N. P. Buu-Hoï et A. Lacassagne, Sur quelques effets biologiques du 6-aminochrysène. *C. P. Acad. Sci. (Paris)* **236,** 2020 (1953).
2. Ch. Huggins, L. Grand et R. Kukunishi, Aromatic influences on the yiels of mammary cancers following administration of 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **51,** 737 (1964).
3. G. Rudali et N. P. Buu-Hoï, Action lymphopénique du 6-aminochrysène. *Rev. Hémat.* **10,** 28 (1955).
4. A. Van Rymenant, A. Coune, H. J. Tagnon et S. Simon, Le traitement hormonal du cancer du sein en phase avancée. Méthodes d'étude: comparaison de la delta-1-testololactone avec le propionate de testosterone. *Acta clin. belg.* **18.** 469 (1963).
5. Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse (GECA): Protocole pour les essais cliniques de traitement des cancers mammaires humains en phase avancée. *Europ. J. Cancer* **2,** 201 (1966).
6. C. Huggins et S. Morii, Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. exp. Med.* **114,** 741 (1961).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 79–80. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Letter to the Editor

Chrysenex® in Experimental Advanced Mammary Cancer

J. GELZER and P. LOUSTALOT
Research Laboratories of the Pharmaceutical Department of CIBA Limited, Base

IT WAS reported several years ago that prolonged oral administration of 6-aminochrysen (Chrysenex®, Continental Pharma) inhibited the growth of cutaneous epitheliomata induced by methylcholanthrene and produced partial regressions of primary mammary adenocarcinomata in mice [1]. In later studies on small rodents substantial leukopenia and splenic atrophy were observed [2].

Upon clinical evaluation it was found that a number of cases with chronic splenomegalies and myelocytic leukemias responded to treatment with Chrysenex® [3]. However, lymphoid leukemias appeared to be resistant and newer results with myeloid leukemias were not unequivocal [4].

Within the framework of the G.E.C.A. as part of a new evaluation program of Chrysenex®, we had the opportunity to study this compound in our standard test system of experimental advanced mammary cancer in mice. Details of this tumor model will be published elsewhere [5]. In brief, C3H and C3Ho mice, obtained from the "International Center for the provision and study of tumor-bearing animals" (Prof. O. Mühlbock, Amsterdam), with single mammary tumors of 5–15 mm average dia. are treated daily during the first week and every other day during the second and third week (except over the weekends), eleven injections being given altogether. Body weights are recorded and tumor sizes calipered at weekly intervals.

In Table 1, we have summarized the results

Table 1. *Inhibition of primary mammary tumors in C3H and C3Ho mice by Chrysenex®*

Drug* (mg/kg i.p.)	No. mice tested	Average body weight change† (g) +/−	Average spleen weight†‡ (mg)	Mortality	Index of tumor growth inhibition
Controls	30	+3·1	182±62	1/30	1·0
3	11	+2·7	180±47	0/11	0·99
10	21	+1·9	198±32	1/21	0·49
30	20	+1·3	165±54	1/20	0·35
110	20	+0·9		0/20	0·04

*Suspended in 2% CMC.
†Determined 3 days after last treatment.
‡$n=10$.

from three separate experiments. It can be seen, that intraperitoneal application of 10 mg/kg Chrysenex® caused an approximately 50% inhibition of tumor growth, and after 100 mg/kg of this drug, there was practically no growth at the end of the three week period of observation. These striking effects were obtained without accompanying lethality and with only very small loss of average body weight. Tumor regression, however, was in no instance observed.

Although the mode of action of Chrysenex® on these primary tumors is not understood at present, our findings appear noteworthy for the following reasons:

(a) Quantitatively, this compound was the strongest tumor inhibitor so far tested in our assay system. The effect of the other two most active preparations (Endoxan®, Natulan®) was always linked with mortality of some of the animals (cf. Ref. [5]).

(b) The antitumor effect on primary tumors appears unique since a series of transplantable rodent tumors in our laboratory [6] and leucemia L 1210 [4] were only weakly inhibited or not influenced at all (see Table 2).

Our findings confirm the earlier observations of Rudali *et al.* [1] although their mammary tumor system and method of evaluation differs basically from that used in these experiments [5].

Table 2. The effect of Chrysenex® on transplantable rodent tumors

Tumor system*	Maximal dose tested (mg/kg i.p.)	Mortality	Average body weight change (g) treated animals/ controls	Maximal growth inhibition (%)
Crocker-Sarcoma 180	300	1/10	−4·8/+1·4	29
Ehrlichsarcinoma (solid form)	300	1/10	−3·3/+3	34
Adenocarcinoma EO 771	100	12/18	−0·1/+2·8	41
Walker Carcinosarcoma 256	300	0/10	−34/+6	21

*cf. Ref. [6].

REFERENCES

1. G. Rudali, N. P. Buu-Hoï and A. Lacassagne, Sur quelques effects biologiques du 2-aminochrysène. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* **236,** 2020 (1953).
2. G. Rudali and N. P. Buu-Hoï, Action lymphopénique du 2-aminochrysène. *Rev. Hémat.* **10,** 28 (1955).
3. R. Hugonot, Place du 6-aminochrysène dans le traitement des leucémies chroniques. 3 *E. Congr. Int. Chimiothérapie.* (1963).
   N. P. Buu-Hoï, Bui-Quoc-Huong, Tran-Lu-Y and Chan-Van-Tuong, Résultats préliminaires d'une tentative de chimiothérapie spécifique les splénomégalies au moyen du 6-aminochrysène. *Chemotherapia* **4,** 31 (1962).
4. G. Mathe, Personal communication.
5. J. Gelzer and P. Loustalot, Biological and chemotherapeutic studies on primary mammary tumors on C3H and C3Ho mice. *Int. J. Cancer* In press.
6. P. Loustalot, P. A. Desaulles and R. Meier, Characterization of the specificity of action of tumor-inhibiting compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **76,** 838 (1958).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 81–82. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Announcements

Co-ordinating Committee for Human Tumour Investigations

THE SECOND International Symposium organised by the Co-ordinating Committee for Human Tumour Investigations will be held by courtesy of the Accademia Nazionale dei Lincei and with the support of the Consiglio Nazionale della Ricerche at "La Farnesina" in Rome (Trastevere) from April 24th to 26th 1967.

The first two days will be devoted to discussions on:

(a) Factors in Human Carcinogenesis. Moderator—Dr. J. Clemmesen.
(b) The Nature of Malignancy. Moderator—Professor H. F. N. Greene.
(c) Biochemical Aspects of Human Cancer. Moderator—Professor F. Bergel.
(d) Tumours of the Uterine Cervix. Moderator—Professor G. Maltoni.

The third day's programme will consist of discussions and presentations of proferred papers on human tumours and techniques applicable to human tumour research. These will be organised by the convenors of the specialised study groups of the Co-ordinating Committee.

The subjects are:

(1) Tissue and Organ Culture and Transplantation.
Convenors—Dr. E. J. Ambrose and Dr. Dorothy Easty.
(2) Biochemistry and Histochemistry.
Convenors—Dr. R. Hess, Dr. C. L. Leese and Dr. Fanny Schapira.
(3) Human Tumour Cytogenetics.
Convenor—Dr. D. T. Hughes.
(4) Cell Proliferation and Growth.
Convenors—Dr. M. F. Rajewsky and Professor F. Bresciani.
(5) Hormone and Control Mechanisms.
Convenor—Dr. G. Bacigalupo.
(6) Local Reaction to Tumours.
Convenor—Professor C. Maltoni.
(7) Immunology.
Convenor—Dr. N. Oker-Blom.
(8) Human Carcinogenesis.
Convenor—Dr. J. Clemmesen.

The Co-ordinating Committee is made up of the following national representatives:

Austria	Prof. Dr. F. Seelich	Vienna
Belgium	Prof. H. J. Tagnon	Brussels
Bulgaria	Dr. Maria Boeva	Sofia
Czechoslovakia	Prof. V. Thurzo	Bratislava
Denmark	Dr. J. Clemmesen	Copenhagen

Eire	Prof. R. A. Q. O'Meara	Dublin
Finland	Dr. N. Oker-Blom	Helsinki
France	Prof. E. Wolff	Paris
Germany (FGR)	Prof. Dr. W. Sandritter	Giessen
Germany (GDR)	Dr. G. Bacigalupo	Berlin
Hungary	Dr. J. Sugar	Budapest
Italy	Prof. C. Maltoni	Bologna
Netherlands	Dr. R. J. G. Willighagen	Lieden
Norway	Prof. L. Kreyberg	Oslo
Roumania	Prof. E. Craciun	Bucharest
Spain	Prof. A. Llombart	Valencia
Sweden	Dr. B. Sylvén	Stockholm
Switzerland	Dr. R. Hess	Basle
United Kingdom	Dr. L. A. Elson	London (Chairman)
U.S.S.R.	Prof. L. F. Larionov	Moscow

Secretary: Dr. Walter Davis, International Agency for Research in Cancer, 16 Avenue Marechal Foch, 69 Lyon 6e, France, to whom general enquiries relating to the work of the Committee and to the Symposium should be addressed.

Attendance will be limited to 200.

International Congress of the Transplantation Society

THE FIRST International Congress of the Transplantation Society (open) will be held in Paris from 27 to 30 June 1967. Programme: Mechanisms of graft rejection; methods of immuno-depression; genetics of transplantation; transplantation antigens; organ transplantation; bone marrow transplantation; cancer as homograft. Co-chairmen: Prof. Ag. J. DAUSSET, Prof. J. HAMBURGER, Prof. G. MATHÉ. Secrétariat: J. DAUSSET, Hôpital Saint Louis, Place du Dr. Fournier, Paris X°,-France.

This Congress will be preceded on 26 June by a *Colloquium on Organ Transplantation* (Prof. J. HAMBURGER, Hôpital Necker, Paris 15°,-France).

Letters to the Editor

BEGINNING with No. 3, the European Journal of Cancer will accept "letters to the Editor" for prompt publication. The length of these short communications should not exceed 750 words including title, authors, bibliography and acknowledgements. They should furnish sufficient data to support their conclusions and conform to the usual standards of the Journal.

Lettres à l'Editeur

A partir du n° 3, le Journal Européen de Cancérologie acceptera, en vue d'une publication rapide, de courtes notes appelées "lettres à l'Editeur". Leur longueur ne doit pas dépasser 750 mots, y compris le titre, les noms d'auteurs, la bibliographie et les autres mentions. Elles devront fournir les données expérimentales ou d'observation nécessaires pour étayer leurs conclusions et se conformer aux instructions applicables aux articles ordinaires.

Briefe an den Herausgeber

Beginnend mit der 3. Folge wird die "Europäische Zeitschrift für Cancerologie" "Briefe an den Herausgeber" für baldige Veröffentlichung annehmen.

Der Umfang dieser kurzen Mitteilungen sollte 750 Worte nicht überschreiten, einschliesslich Ueberschrift, Autoren, Bibliographie und andere Annerkungen. Sie sollten genügend Unterlagen enthalten, um die Schlussfolgerungen zu untermauern und allen übrigen Anforderungen der Zeitschrift entsprechen.

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 83–93. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Etude Clinique et Cytogénétique de 21 Patients Atteints de Leucémie Myéloïde Chronique

Y. KENIS

Service de Médecine et d'Investigation Clinique de l'Institut Jules Bordet, Centre des Tumeurs de l'Université Libre de Bruxelles

et L. KOULISCHER

Centre de Génétique Médicale, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, et Section d'Anthropologie, Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelle

DEPUIS la découverte d'un chromosome marqueur spécifique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) par Nowell et Hungerford [1, 2], désigné sous le nom de chromosome de Philadelphie ou Ph^1 [3], un certain nombre de données cytogénétiques ont été accumulées concernant la LMC. Tout d'abord, le Ph^1, petit acrocentrique du groupe G ayant perdu environ 40% de sa substance [4], ne se retrouve qu'au niveau des cellules sanguines: les cellules de la peau, par exemple, sont normales. La technique choisie pour mettre en évidence le Ph^1 s'est révélée être un facteur important. En effet, les cellules médullaires sont plus fréquemment porteuses du Ph^1 que les cellules trouvées dans le sang circulant [5–8]. Ceci est dû, sans doute, au principe même de la technique de culture du sang périphérique [9], basée sur la stimulation *in vitro* des lymphocytes par la phytohémagglutinine. Il est évident que, dans la LMC, les lymphocytes peuvent être normaux, alors que les cellules d'origine myéloïde ne le sont pas.

Tout en tenant compte de ce facteur technique, il semble possible de distinguer, à l'heure actuelle, deux types principaux de LMC:

—*la LMC avec Ph^1:* le caryotype des cellules atteintes a 46 chromosomes, dont le Ph^1. Il s'agit du type le plus fréquemment observé (de 53 à 100% des cas, suivant les séries);

—*la LMC sans Ph^1:* du point de vue clinique, cette forme est atypique [10, 11]. Le nombre de globules blancs et de plaquettes circulants est plus bas que celui observé chez les malades avec Ph^1; les patients répondent mal au traitement conventionnel, et l'évolution est plus rapidement fatale.

Au cours de la crise blastique, l'image cytogénétique est loin d'être aussi uniforme que celle de la phase chronique. Le caryotype peut rester inchangé, ou, au contraire, présenter un certain nombre d'aneuploïdies non systématisées, avec ou sans le Ph^1. Si la crise peut être jugulée par le traitement, les cellules aneuploïdes diminuent en nombre ou même disparaissent tout à fait [12]; la réponse thérapeutique pourrait dépendre de la forme caryotypique.

Nous avons entrepris l'analyse systématique du caryotype de malades atteints de LMC dans le but d'apporter une contribution permettant d'éclaircir la corrélation éventuelle existant entre la cytogénétique et la clinique.

MATERIEL ET METHODES

1. *Matériel clinique*

Le matériel clinique de cette étude consiste en 21 malades atteints de leucémie myéloïde

chronique ou d'une affection voisine. Treize patients étaient du sexe masculin et 8 du sexe féminin. L'âge au moment du diagnostic variait de 12 à 83 ans. Dans 18 cas, le diagnostic de LMC avait été établi par un examen clinique et par des examens du sang et de la moelle osseuse tout à fait caractéristiques. Dans 1 cas, il s'agissait d'une LMC chez une enfant de 12 ans. Un cas était une leucémie à polynucléaires neutrophiles. Un cas, enfin, présentait plutôt certains caractères d'une métaplasie myéloïde agnogénique; il a été inclus dans cette étude parce qu'un chromosome de Philadelphie était présent dans certaines mitoses. Les cas de métaplasie myéloïde sans chromosome Ph^1 n'ont pas été retenus pour ce travail.

2. *Préparations "directes" de moelle osseuse ("squash")*

Nous avons utilisé la technique décrite par Sandberg *et coll.* [13]. Après le prélèvement, les cellules sont transportées au laboratoire, dans une solution glucosée–saline, puis mises en milieu hypotonique (citrate de sodium 0,44%) pendant 12 minutes et fixées au moyen d'un mélange méthanol: acide acétique dans la proportion 3:1. Avant chaque manipulation, les cellules ont été centrifugées à 1200 rpm et rassemblées en un culot compact permettant d'éliminer le surnageant. Au moment d'analyser les chromosomes, les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans quelques gouttes d'une solution d'orcéine acétique. Une goutte de cette suspension est placée sur une lame porte-objets propre et est écrasée, à l'aide des deux pouces, entre la lame porte-objets et une lame couvre-objets protégée par plusieurs épaisseurs de papier filtre. Un vernis est étendu ensuite sur les bords de la lamelle, de façon à retarder l'évaporation. Les préparations peuvent se conserver de 2 à 5 jours, à 4°C. La coloration des chromosomes est parfois pâle, ce qui oblige à photographier en contraste de phase. Les lames n'étant pas permanentes, chaque mitose retenue pour l'analyse est photographiée.

3. *Incubation à court terme de moelle osseuse*

Les cellules, prélevées stérilement, sont placées dans un flacon contenant 4 ml de milieu composé de sérum humain (30%) et de milieu 199 de Difco (70%). Elles sont alors incubées à 37°C, de 5 à 15 heures. Deux à quatre heures avant la fin de l'incubation, de la Colcémide Ciba est introduite dans le milieu, à la dose de 1 microgramme par ml. Puis les cellules sont traitées en milieu hypotonique, fixées et étalées sur la lame porte-objets suivant la technique employée pour le sang. Elles sont colorées à l'orcéine acétique. Les préparations sont permanentes. Seules les mitoses "convenables", ou intéressantes, sont photographiées pour l'étude du caryotype. Les chromosomes des autres cellules sont comptés à vue. Le nombre de mitoses obtenu après incubation est beaucoup plus important, dans notre laboratoire, que celui obtenu par "squash", et les chromosomes sont plus faciles à observer. D'autre part, certains cas ont montré un nombre anormal de chromosomes dans 92 à 95% des cellules examinées, ce qui paraît exclure une sélection éventuellement *in vitro* en faveur de cellules normales. Aussi employons-nous cette technique en routine.

4. *Culture de sang périphérique*

Nous avons utilisé cette méthode dans un petit nombre de cas, lorsqu'il n'a pas été possible d'obtenir des mitoses à partir des cellules médullaires. Nous avons employé la technique de Moorhead *et coll.* [9], avec adjonction de phytohémagglutinine. Nous avons interprété les résultats avec précaution, les cellules analysées pouvant fort bien être des lymphocytes *normaux*.

D'une façon générale, environ 60% des échantillons de moelle osseuse, quelle que soit la technique employée, ont montré des mitoses permettant l'analyse cytogénétique. Seuls 20% des échantillons de sang ont montré des chromosomes "convenables". Les résultats rapportés ci-dessous concernent 33 analyses effectuées chez 21 malades différents. Le pourcentage de cellules contenant le chromosome de Philadelphie a été établi uniquement sur des cellules bien étalées et favorables à la confection de caryotypes. Un total de 1.104 mitoses, soit un peu plus de 33 mitoses par analyse, ont été observées. La technique d'analyse employée est mentionnée chaque fois dans le tableau d'ensemble des résultats.

5. *Phosphatase alcaline dans les granulocytes*

Nous avons utilisé la méthode histochimique de Kaplow [14] . Les résultats sont exprimés semi-quantitativement: selon l'intensité de la coloration, une valeur de 0 à 4 est attribuée à chaque granulocyte. Le "score" est évalué pour 100 polynucléaires neutrophiles. Les valeurs normales, déterminées dans notre laboratoire, vont de 2 à 78, avec une moyenne de 24. Pour Kaplow, les valeurs normales vont de 2 à 76, avec une moyenne de 22.

RESULTATS

Le Tableau 1 réunit les cas de LMC typiques, en phase chronique, au moment de l'analyse cytogénétique. Treize cas entrent dans cette

Tableau 1

N° Sexe Age	Dates	Durée de l'affection	Traitements antérieurs	Sang			Moelle		Technique	Caryotype								Phosphatase alcaline score/100 granuloc.
				Leuco $\times 10^3$	Pro-myél. (%)	Myélo-blastes (%)	Pro-myél. (%)	Myélo-blastes (%)		<44	44	45	46	47	48	49	Ph¹ (%)	
1	8-8-63	1 mois	néant	43,0	5	2	11,5	6	SQ	—	—	—	32	2	—	—	52	2
M	9-1-64	6 mois	Ibenzméthyzine	15,4	2	1	3	12	SQ	—	—	—	29	2	—	—	54	0
39																		
2	24-6-64	0	néant	72,0	1	1	10	5	SQ	—	—	—	30	1	—	—	90	0
F	8-9-65	15 mois	Ibenzméthyzine	5,5	2	0	4,5	5,5	IM	—	—	3	31	3	—	—	89	14
44																		
3																		
M	4-3-65	0	néant	*183,0	5	1	9,5	2	IM	—	—	1	9	1	—	—	72	0
43																		
4	24-1-63	2 mois	néant	74,0	4	0	14	3	SQ	—	—	2	37	1	—	—	54	0
M	10-12-64	35 mois	Busulfan	36,7	8	0	8,5	2	IM	—	2	3	28	—	—	—	87	0
83																		
5																		
M	26-4-66	2 mois	néant	136,0	2	4	4	0,5	SQ	1	1	6	37	—	—	—	90	2
57																		
6																		
M	17-8-65	1 mois	néant pour LMC (P^{32} pour Vaquez)	43,3	8	4	13	2	IM	—	1	7	40	2	—	—	72	1
76																		
7	15-12-64	15 mois	Busulfan, prednisolone, 6 MP	6,6	3	0	4	3,5	IM	—	—	3	36	1	—	—	82	6
M																		
44	17-6-65	21 mois	6 MP	31,5	0	1	3	2,2	IM	—	1	3	46	—	—	—	90	0
8																		
F	16-3-66	25 mois	Busulfan	148,0	5	3	12	6	SQ	3	—	1	27	—	—	—	80	1
36																		
9																		
M	12-1-65	39 mois	P^{32}, Radiothérapie, 6 MP	60,0	7	4	13,5	7	IM	—	—	2	26	2	—	—	80	3
30																		
10	5-2-63	54 mois	Busulfan	15,5	6	1,5	4	3	SQ	—	—	1	16	3	—	—	50	0
F	23-4-63	56 mois		137,0	11	7	8	3	SQ	—	—	—	16	1	—	—	94	0
17																		
11																		
F	29-1-63	7,5 ans	P^{32}, Busulfan	37,0	3	1	11,5	2	CS	(voir texte)							50	0
49																		
12																		
M	20-9-63	10 ans	Busulfan, 6 MP	6,5	2	4	8	4	SQ	—	—	1	16	—	—	—	64	14
36																		
13																		
F	4-2-65	11 ans	Busulfan	34,6	7	2	8,5	1,5	SQ	—	1	—	28	—	—	1	93	2
31																		

SQ: examen direct de la moelle osseuse ("squash")
IM: incubation da la moelle à court terme
CS: culture de sang

catégorie, et dix-huit analyses ont été pratiquées. Dans 6 de ces cas, le caryotype a été établi au moment du diagnostic, avant tout traitement. Dans 7 cas, l'examen a été fait de 15 mois à 11 ans après le diagnostic. Le nombre modal de chromosomes a toujours été normal. Le chromosome de Philadelphie a été trouvé dans tous les cas (dans 45 à 94% des mitoses; moyenne: 74%). La phosphatase alcaline dans les granulocytes était toujours en très faible quantité ou totalement absente (score de 0 à 14).

Le cas n° 6 est une maladie de Vaquez, traitée pendant 4 ans par du phosphore radioactif. Il a présenté un tableau caractéristique de LMC un an après la dernière administration de P^{32} (102.000 leucocytes par millimètre cube, avec formes jeunes de la granulopoïèse dans le sang; anémie modérée). Du point de vue cytogénétique, ce cas ne se distingue en rien des autres cas de LMC.

Le cas n° 11 était une LMC, diagnostiquée en 1955. La malade a été traitée pendant 7 ans par du P^{32} (129 mc). Elle a reçu ensuite du Myleran, sans effet favorable. L'examen cytogénétique a été fait un mois après l'arrêt du Myleran. Il a mis en évidence toutes les altérations habituellement décrites à la suite d'irradiations: cassures chromatidiennes et chromosomiques, chromosomes dicentriques, fragments acentriques (Fig. 1). Aucun décompte n'a été tenté dans la culture de sang. On a néanmoins noté la présence du chromosome Ph^1 dans 50% des cellules photographiées. On a également remarqué la présence d'une association fréquente des petits acrocentriques, le plus souvent par trois (Fig. 2). Une culture de peau de ce sujet s'est montrée normale à tous points de vue: absence de lésions chromosomiques et absence de Ph^1.

Le cas n° 7 a présenté, dès le début de son affection, une aplasie quasi complète de l'érythropoïèse. Les deux examens cytogénétiques ont montré la présence du chromosome Ph^1 dans 78 mitoses sur 90 métaphases analysées.

A l'exception de ce dernier patient, tous les malades ont répondu favorablement, au moins pendant certaines périodes, au traitement (Myleran: 11 cas; Natulan: 2 cas; P^{32}: 2 cas; radiothérapie: 1 cas). Neuf patients sont encore en vie, de 6 mois à 12 ans après le diagnostic. Les autres patients sont morts de 40 à 126 mois après le diagnostic.

Le Tableau 2 groupe les patients atteints de LMC typique, en phase aiguë myéloblastique au moment de l'analyse cytogénétique. Quatre malades avaient eu une ou plusieurs analyses faites au moment de la phase chronique et appartiennent aussi au groupe précédent. Dans tous les examens, le chromosome Ph^1 était présent (dans 12 à 100% des mitoses; moyenne: 60%). La phosphatase alcaline des granulocytes a été normale dans 1 cas (n° 9), alors qu'elle était très basse, chez ce malade, au cours de la phase chronique.

La deuxième analyse, faite alors que le malade était en crise aiguë, a montré la présence de deux lignées cellulaires, une à 44 et une à 46 chromosomes. Toutes les deux contenaient le chromosome de Philadelphie. Par rapport à l'analyse précédente, une lignée aneuploïde est donc apparue en crise aiguë (Fig. 3).

Dans les trois autres cas (n° 7, n° 10 et n° 12), chez lesquels des analyses cytogénétiques ont été faites successivement en phase chronique et en phase aiguë, il n'y a pas eu de transformation du caryotype. Mais, chez un de ces malades, la phosphatase alcaline des granulocytes est montée à une valeur élevée (score 162) alors qu'elle était basse dans les deux examens précédents (cas n° 7). Parmi les 4 malades étudiés seulement durant la crise blastique (7 analyses), le nombre modal de chromosomes était de 46 dans 3 cas.

Dans le dernier cas (n° 17), lors de la première analyse, on a constaté la présence de deux lignées, l'une à 46 chromosomes, avec, comme seule anomalie, le Ph^1; l'autre à 47 chromosomes avec 2 Ph^1 (Fig. 4). Deux des trois cellules à 48 chromosomes montraient un chromosome du groupe 6–12 en surnombre. Lors de la deuxième analyse, faite quelques jours avant le décès, aucune cellule à 48 chromosome n'a été repérée, mais la lignée à 47 chromosomes semblait manifestement supplanter celle à 46. La phosphatase alcaline des granulocytes était anormalement élevée (score 110).

Sept malades de ce deuxième groupe sont morts, au plus tard quelques semaines après le dernier examen, malgré divers traitements à la 6-mercaptopurine, la prednisolone, la vinblastine ou la vincristine. Un malade est en rémission de la phase aiguë.

Le Tableau 3 réunit 4 cas cliniquement atypiques.

Le cas n° 18 avait une LMC évoluant depuis 2 ans. Au moment de l'examen des chromosomes, il présentait une anémie hémolytique sévère et une thrombocytopénie importante. La moelle osseuse était compatible avec le diagnostic de LMC, sans

Fig. 1. *Mitose provenant d'une culture de sang périphérique de la malade n°* 11. *On remarque des anomalies du type radio-induit: (a) chromosome dicentrique, (b) cassure chromatidienne, (c) fragment acentrique. Cette malade a reçu comme traitement du* P^{32}.

Fig. 2. *Même malade. La plupart des mitoses montraient une association de* 3 *petits acrocentriques dans les cellules dont les chromosomes ne présentaient pas de lésions du type radio-induit.*

(to face p. 86)

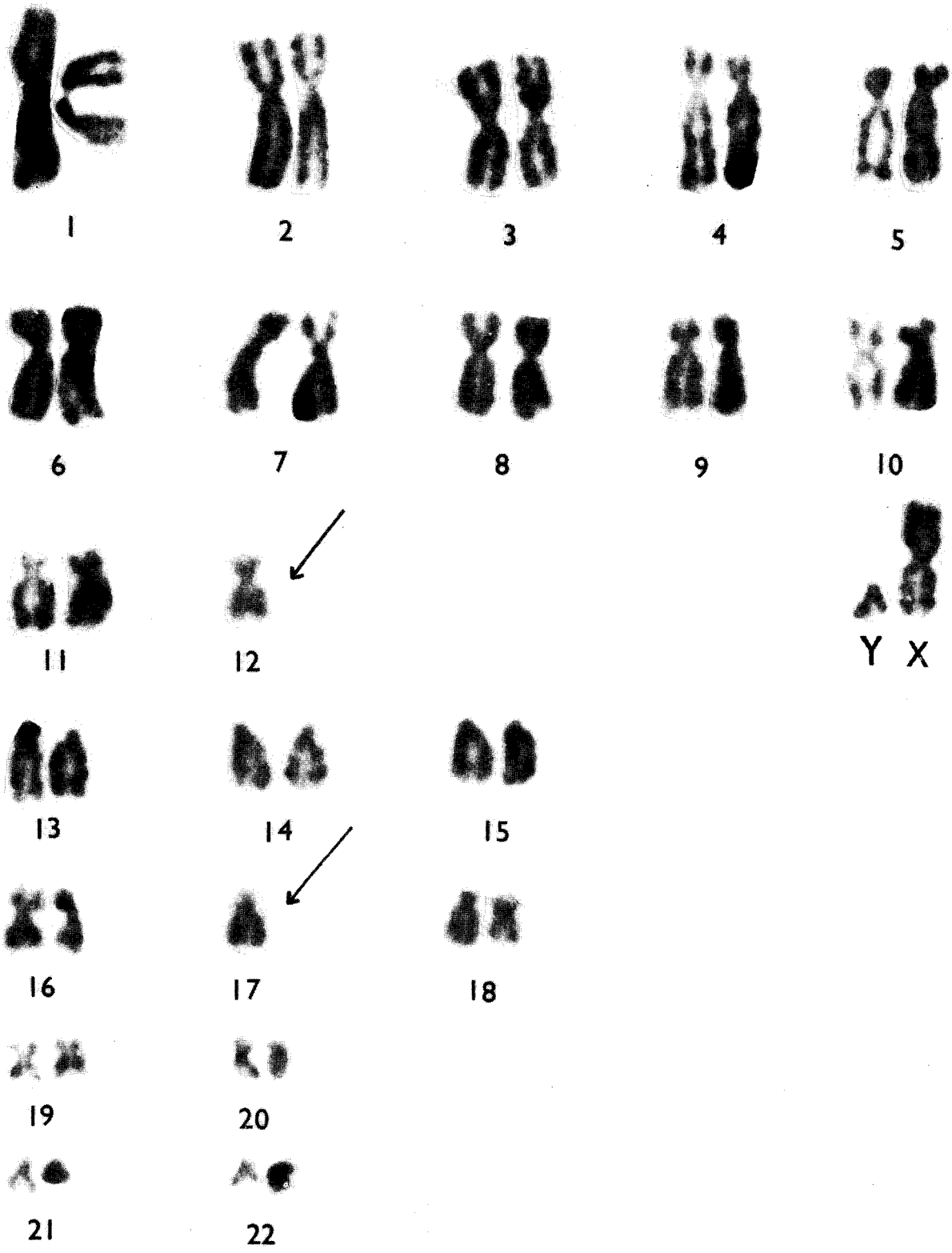


Fig. 3. *Caryotype d'une cellule à* 44 *chromosomes du malade n°* 9. *On note l'absence d'un chromosome* 12 *et celle d'un chromosome* 17, *en même temps que la présence d'un chromosome de Philadelphie.*

Fig. 4. *Mitose à* 47 *chromosomes du malade n°* 17. *Il existe* 2 *chromosomes de Philadelphie. Ils sont désignés par les lettres* Ph^1 *; les autres petits acrocentriques sont désignés; par leur numéro ou leur lettre.*

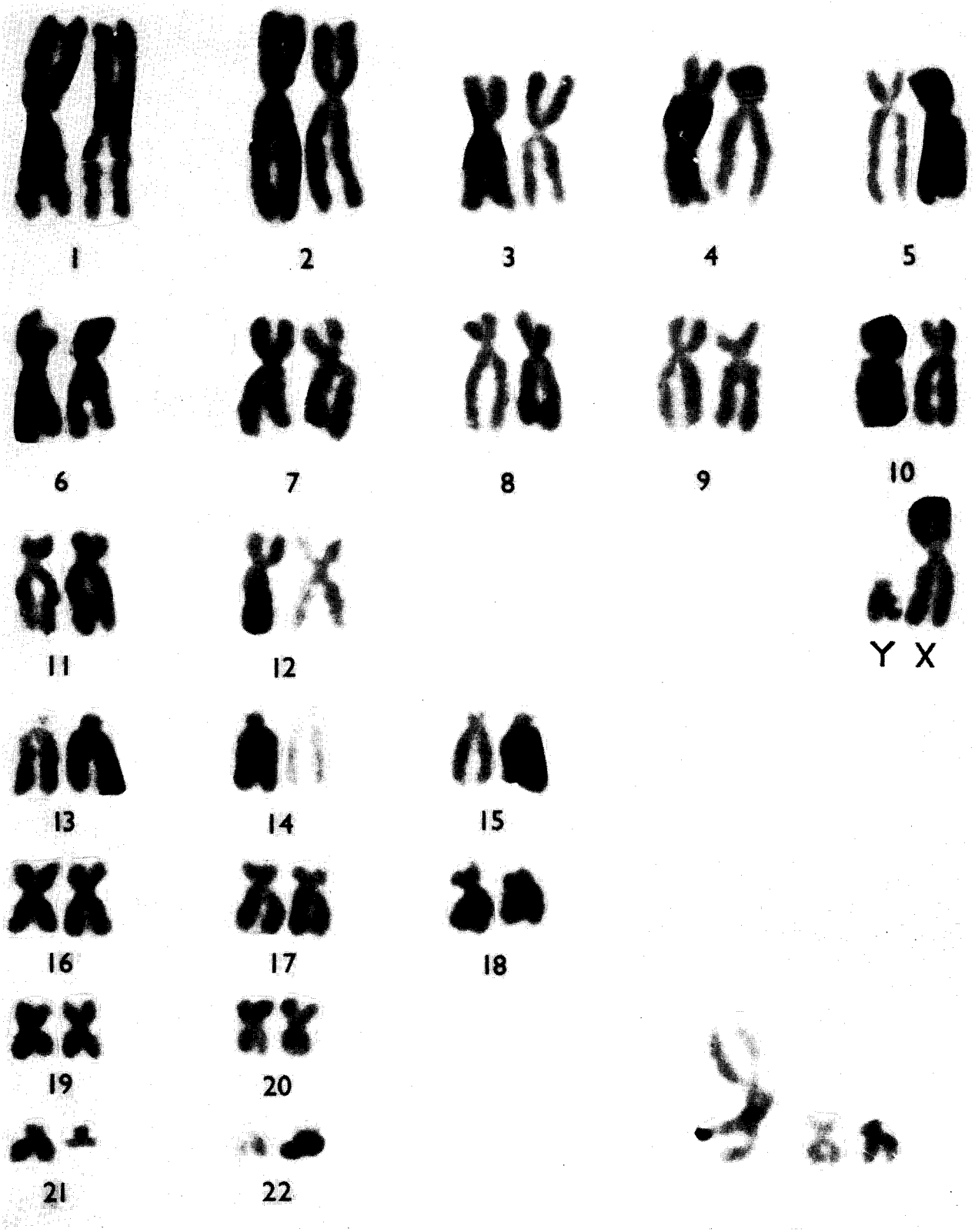


Fig. 5. Caryotype d'une cellule à 49 chromosomes du malade n° 18. On remarque la présence de 3 chromosomes surnuméraires, respectivement de la taille d'un chromosome du groupe A, du groupe F et du groupe G. On remarque en outre la présence d'un chromosome de Philadelphie.

Tableau 2.

N° Sexe Age	Dates	Durée de l'affection	Traitements antérieurs	Sang Leuco $\times 10^3$	Sang Pro-myél. (%)	Sang Myélo-blastes (%)	Moelle Pro-myél. (%)	Moelle Myélo-blastes (%)	Technique	Chromosomes Decompte <44	44	45	46	47	48	49	Ph¹ (%)	Phosphatase alcaline score/100 granuloc.
7	*17-6-65*	*21 mois*	*6 MP*	*31,5*	*0*	*1*	*3*	*2,2*	*IM*	—	*1*	*3*	*46*	—	—	—	*90*	*0*
M	9-11-65	26 mois	6 MP	3,2	0	20	3	27	IM	—	1	2	54	2	1	—	78	162
44																		
9	*12-1-65*	*39 mois*	*P³², Radiothérapie, 6 MP*	*60,0*	*7*	*4*	*13,5*	*7*	*IM*	—	—	*2*	*26*	*2*	—	—	*80*	*3*
M																		
30	23-2-65	40 mois	6 MP	22,8	1	72	0	83	CS	6	**21**	1	11	—	—	1	67	69
10	*23-4-63*	*56 mois*	*Busulfan*	*137,0*	*11*	*7*	*8*	*3*	*SQ*	—	—	—	*16*	*1*	—	—	*94*	*0*
F	13-1-64	65 mois	6 MP	83,0	6	3	20,5	8	SQ	—	1	2	16	2	—	—	57	0
17	5-5-64	69 mois	6 MP, prednisolone	154,0	23	30	26,5	30	SQ	—	1	2	15	1	—	—	57	0
12	*20-9-63*	*10 ans*	*Busulfan, 6 MP*	*6,5*	*2*	*4*	*8*	*4*	*SQ*	—	—	*1*	*16*	—	—	—	*64*	*14*
M	17-2-64	10,5 ans	6 MP, prednisolone	32,0	7	56	0	91,5	CS	—	—	3	68	2	—	—	44	—
36																		
14	14-8-63	3 mois		8,2	0	68	1	71	SQ	—	—	—	11	—	—	—	27	1
M	30-9-63	4 mois		12,9	0	60	6	50,5	SQ	—	—	1	23	—	—	—	12	0
64																		
15	14-8-63	28 mois	P ³²	89,0	7	57	12,5	32,5	SQ	—	1	4	33	—	—	—	39	2
M	23-1-64	33 mois	6 MP, prednisolone	26,0	1	34	6,5	31	SQ	—	1	1	21	1	—	—	54	0
29																		
16																		
F	18-2-64	40 mois	Busulfan, 6 MP	47,0	11	22	9	36	CS	—	1	1	9	—	—	—	80	1
41																		
17	1-6-65	6 mois	Busulfan	107,0	0	72	2	77,5	IM	—	—	—	25	**17**	3	—	100	—
M	7-7-65	7 mois	6 MP, prednisolone	11,9	0	75	0,5	84	IM	—	—	—	6	**28**	—	—	100	110
54														2 chromosomes Ph¹ dans la lignée à 47 chromosomes.				

SQ: examen direct de la moelle osseuse ("squash")
IM: incubation de la moelle à court terme
CS: culture de sang.

transformation myéloblastique. Le tableau hématologique ne s'est pas modifié pendant la période terminale de la maladie, malgré un traitement à la 6-mercaptopurine et à la prednisolone. Le traitement antérieur au Myleran et par irradiation splénique avait cessé d'être efficace. Le malade est mort d'hémorragies digestives 6 semaines après l'examen cytogénétique. On notait une seule lignée aneuploïde à 49 chromosomes (Fig. 5). Le chromosome Ph¹ était visible dans 78% des mitoses. On trouvait un chromosome surnuméraire dans les groupes 6–12, 16–18 et 21–22. Cet homme ayant des enfants et l'examen clinique étant normal, le diagnostic de Klinefelter peut être écarté, sans pour cela exclure comme possibilité que le chromosome surnuméraire du groupe 6–12, parmi les plus grands de ce groupe, ne soit un chromosome X. Le taux de phosphatase alcaline dans les granulocytes était normal ou légèrement supérieur à la normale (score 62 à 101).

Le cas n° 19 était une leucémie myéloïde chronique chez une enfant de 12 ans. Une analyse chromosomique a montré un nombre modal de 47. Les cellules à 47 chromosomes avaient 2 chromosomes de Philadelphie. Le taux de phosphatase alcaline des granulocytes était anormalement élevé (score 156 à 204). La patiente a mal répondu au traitement par le Myleran et la 6-mercaptopurine et elle est morte un an après le diagnostic.

Le cas n° 20 était une malade âgée de 66

Tableau 3

N° Sexe Age	Dates	Durée de l'affection	Traitements antérieurs	Sang Leuco $\times 10^3$	Sang Pro-myél. (%)	Sang Myélo-blastes (%)	Moelle Pro-myél. (%)	Moelle Myélo-blastes (%)	Technique	Chromosomes Decompte <44	44	45	46	47	48	49	Ph¹ (%)	Phosphatase alcaline score/100 granulo
18 M 50	8-12-64	24 mois	Busulfan, radiothérapie	20,7	5	5	6,5	5	IM	—	—	—	1	1	2	**46**	78	62
19 F 12	21-2-65	0	néant	40,0	0	1	1,6	1,6	IM	—	—	1	3	**30**	1	—	85	204
20 F 66	21-12-64	8 ans?	transfusions	22,0	2	1	9,5	1,5	IM	—	—	3	47	—	—	—	12	1
21 M 63	8-10-64	2 mois	néant	85,0	0	0	0,5	0,5	SQ	—	—	2	21	—	—	—	39	303

SQ: examen direct de la moelle osseuse ("squash")
IM: incubation de la moelle à court terme
CS: culture de sang.

ans, traitée 10 ans avant l'examen cytogénétique par mastectomie et radiothérapie (dose profonde 3600 r) pour un carcinome du sein. Une anémie avec thrombocytémie (jusqu'à 1.000.000 de plaquettes par mm³) a été mise en évidence à partir de 1958, soit 4 ans après l'irradiation. En 1962, la moelle osseuse montrait une augmentation de la granulopoïèse et une érythroblastopénie. La biopsie osseuse n'a pas montré de myélofibrose, mais une abondance anormale de mégakaryocytes. La rate n'était pas augmentée de volume. En 1963 et 1964, les leucocytes ont varié entre 15.000 et 22.000 par mm³. L'anémie s'était accentuée. Des formes jeunes étaient constamment présentes dans le sang et le myélogramme était inchangé. L'analyse cytogénétique a mis en évidence la présence non équivoque d'un petit acrocentrique dans 12% des mitoses. La phosphatase alcaline dans les granulocytes a toujours été basse. De 1958 à 1964, la malade n'avait été traitée que par des transfusions de sang.

Le cas n° 21 était une leucémie à polynucléaires neutrophiles. Pendant les 10 semaines qui ont précédé l'examen des chromosomes, la leucocytose a varié de 69.000 à 172.000 par mm³, avec un pourcentage de polynucléaires neutrophiles de 78 à 97,5%. Le pourcentage de formes jeunes de la granulopoïèse a varié de 2 à 19% (le plus souvent entre 2 et 6%) avec une prédominance des métamyélocytes. La moelle osseuse était semblable au sang, mais elle contenait de nombreux mégakaryocytes, et l'érythropoïèse était très faible. Les chromosomes de 23 cellules ont pu être comptés. Le nombre modal était de 46 chromosomes. Trente-neuf pour cent des cellules montraient un Ph¹. La phosphatase alcaline des granulocytes a toujours été très élevée (score 219 à 303). Aucune infection ni tumeur n'a pu être mise en évidence.

DISCUSSION

Nous avons pu mettre en évidence le chromosome de Philadelphie dans tous nos cas de LMC, aussi bien au cours de la transformation myéloblastique terminale qu'au cours de la phase chronique, au début de l'affection, et plus de 10 ans après le diagnostic, lors de poussées évolutives et lors de rémissions quasi complètes. Contrairement à d'autres auteurs [8, 10, 11], nous n'avons pas observé de cas de LMC-Ph¹ négative. Dans le cadre des syndromes myéloprolifératifs, tous nos cas sans chromosome Ph¹ pouvaient aisément être classés, en fonction des données de la clinique et de l'hématologie, en métaplasies myéloïdes ou en maladies de Vaquez. Par contre, l'un des cas repris dans ce

travail avait plusieurs caractéristiques de la métaplasie myéloïde (anémie, leucocytose modérée, thrombocytémie, évolution de longue durée sans traitement, mais pas de myélofibrose), et avait néanmoins le chromosome Ph¹ dans un faible pourcentage de mitoses. Heath et Moloney [15] et Tough *et coll.* [16] ont décrit deux cas très semblables, (y compris la thrombocytémie). Les premiers auteurs classent leur malade comme "un cas inhabituel de syndrome myéloprolifératif".

Comme Kemp *et coll.* [17], nous avons décrit un cas de LMC-Ph¹ positive, survenant après une affection répondant à tous les critères de la maladie de Vaquez [18]. Ces cas peuvent donc être tout à fait semblables aux LMC apparaissant *de novo*. Deux de nos cas, en plus du précédent, avaient reçu des doses importantes de radiations ionisantes (cas n° 12 et n° 20), plusieurs années avant l'apparition de la LMC. Des cas semblables ont été décrits, avec chromosome Ph¹ [3, 6] ou sans chromosome Ph¹ [6, 10].

L'enfant atteinte de LMC possédait le chromosome Ph¹, comme ceux de Fortune [19], Reisman [20, 21] et Teplitz [22].

Lors des transformation aiguës, comme la plupart des auteurs [7, 8, 12, 23], nous avons observé, dans le sang ou dans la moelle, la persistance du chromosome de Philadelphie, même dans les cellules des lignées aneuploïdes. La persistance de cette anomalie chromosomique dans la majorité des mitoses de la moelle, même lorsque celle-ci contenait presque exclusivement des cellules blastiques, indique, à notre avis, que la transformation aiguë de la LMC est bien due à une prolifération des myéloblastes leucémiques, et non à une leucémie aiguë surajoutée.

Notre expérience semble indiquer que la transformation myéloblastique ne peut pas être prévue, de façon constante, par l'examen cytogénétique. Si une aneuploïdie peut apparaître durant cette période [8, 13, 23], il peut arriver aussi que la présence du chromosome Ph¹ reste la seule anomalie jusqu'au décès. Dans notre série, l'aneuploïdie n'a été observée que dans 2 cas sur 8, au cours de la crise aiguë, dont une fois avec 2 chromosomes Ph¹ [24]. Un autre exemple d'aneuploïdie (cas n° 18) a été mis en évidence, lors de la période terminale de la maladie, mais en l'absence d'une transformation myéloblastique.

Nous avons trouvé, contrairement à Bernard *et coll.* [25] et Gringold *et coll.* [26], le chromosome Ph¹ dans un cas typique de leucémie à polynucléaires neutrophiles. Nous pensons qu'il s'agit du premier cas décrit dans la littérature. On peut se demander si les cas sans Ph¹ n'étaient pas des réactions leucémoïdes.

On a voulu trouver une relation entre la cytogénétique et le taux de certaines enzymes. On a montré que le taux de la phosphatase alcaline des granulocytes était augmenté chez les mongols [27–29]. Or, celle-ci est diminuée dans la LMC [30–31]. Il semblerait donc exister un lien entre le chromosome 21 et la teneur en phosphatase alcaline: le gène déterminant cette teneur se trouverait sur le chromosome 21. Présent 3 fois au lieu de 2, il y aurait une surcharge enzymatique; présent 1 fois au lieu de 2, il y aurait une diminution du taux d'enzymes. On a cependant montré que la phosphatase alcaline, dans la LMC, peut augmenter en phase aiguë [23, 29], lors d'une rémission [32, 33], ou lors d'une infection intercurrente [34], alors même que l'on peut constater la persistance du Ph¹. Nous avons, en effet, trouvé un taux de LAP bas ou nul dans tous les cas de LMC, en phase chronique, chez l'adulte, y compris dans le cas comportant seulement 12% de cellules Ph² positives. Le taux était un peu plus élevé, mais encore inférieur à la moyenne, lors d'une rémission. Dans 3 cas sur 8, le taux était normal, ou trop élevé, lors d'une poussée aiguë. Le taux était augmenté dans les deux cas possédant 2 chromosomes Ph¹ (la LMC chez l'enfant et dans une crise aiguë). Par contre, nous avons aussi trouvé un taux très élevé dans la leucémie à polynucléaires, avec un seul chromosome Ph¹, et en l'absence de signes d'infection. Il est donc amplement démontré qu'il n'existe pas une relation simple entre le chromosome 21 et la teneur en phosphatase alcaline des granulocytes. Ces observations doivent être rapprochées de celles de Mellman *et coll.* [35] qui ont montré que, non seulement la LAP et la galactose-l-phosphate-uridyl-transférase ont un taux plus élevé que la normale dans les leucocytes des trisomiques 21, mais aussi la phosphatase acide et la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, alors que l'on sait que le gène controlant cette dernière enzyme se trouve sur le chromosome X. Il semble donc que l'analyse enzymologique ne puisse démontrer une localisation génique précise sur un autosome, mais reflète plutôt altération du leucocyte lui-même.

CONCLUSION

L'analyse cytogénétique peut apporter des précisions utiles au diagnostic des syndromes myéloprolifératifs. La mise en évidence du chromosome de Philadelphie, associé à une augmentation de la leucocytose et à une prédominance de la granulopoïèse dans la

moelle, définit la leucémie myéloïde chronique vraie, entité clinique caractérisée par une survie moyenne de plusieurs années et par une réponse favorable aux traitements. Par contre, l'absence du chromosome Ph^1 ne permet pas de distinguer, parmi les syndromes myéloprolifératifs, la métaplasie myéloïde agnogénique—dont l'évolution est relativement bénigne et très longue—et la "leucémie myéloïde chronique atypique, Ph^1-négative" de Sandberg, dont l'évolution est au contraire rapide, et qui est habituellement résistante aux traitements.
Nous serions tentés de réserver l'appellation de leucémie myéloïde chronique aux seuls cas de "leucémie" avec chromosome Ph^1, même lorsque le tableau clinique ou hématologique est incomplet et atypique.

Si l'analyse cytogénétique permet de dissocier, en groupes mieux définis et plus restreints, certaines affections hématologiques, elle permet aussi, assez paradoxalement, de renforcer la thèse—basée sur des observations cliniques—qui affirme la parenté des affections rangées sous la dénomination de syndrome myéloprolifératif. En effet, la présence du chromosome de Philadelphie dans des cas de LMC survenant après une longue période d'évolution sous forme de maladie de Vaquez, dans des cas ressemblant cliniquement à la métaplasie myéloïde, dans la leucémie à polynucléaires neutrophiles, dans la leucémie à éosinophiles [36, 37], peut être interprétée comme un argument supplémentaire en faveur de la connexion de ces diverses maladies.

RÉSUMÉ

1. *Les auteurs ont établi le caryotype de* 18 *malades adultes atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC). Trente-et-une analyses cytogénétiques ont été pratiquées. Le chromosome de Philadelphie a été observé dans tous les cas (dans* 12 *à* 100% *des mitoses, moyenne* 69%), *aussi bien lors de la phase chronique que lors de la phase aiguë. Le nombre modal était de* 46 *chromosomes chez les* 13 *patients en phase chronique, et chez* 6 *patients en phase aiguë. Une aneuploïdie était présente, lors de la transformation myéloblastique, chez* 2 *malades. Un troisième malade avait un nombre modal de* 49, *quelques semaines avant le décès, sans qu'il y ait de transformation myéloblastique. Ce patient avait une anémie hémolytique et une thrombocytopénie intense.*
2. *Un cas de LMC chez une enfant de* 12 *ans montrait la présence de* 2 *chromosomes de Philadelphie dans la majorité des mitoses de la moelle osseuse.*
3. *Un cas de leucémie à polynucléaires neutrophiles avait un caryotype semblable à celui de la LMC, c'est-à-dire avec, comme seule anomalie, la présence du* Ph^1.
4. *Dans un cas, avec des caractéristiques cliniques et hématologiques semblables à celles de la métaplasie myéloïde (anémie, leucocytose modérée, thrombocytémie, évolution de* 8 *années sans traitement), le chromosome* Ph^1 *était présent dans* 12% *des mitoses.*
5. *La détermination semi-quantitative de la phosphatase alcaline dans les granulocytes, selon la méthode de Kaplow, a été pratiquée chez tous les malades, en même temps que l'analyse cytogénétique. Elle était très abaissée chez tous les malades atteints de LMC typique, en phase chronique. Elle était un peu plus élevée, mais encore inférieure à la normale, chez deux malades en rémission. Elle était normale ou élevée chez* 3 *malades en transformation myéloblastique. Dans un de ces cas, on notait la présence de* 2 *chromosomes* Ph^1 *dans la majorité des cellules. La phosphatase alcaline dans les granulocytes était aussi très supérieure à la normale dans le cas de LMC de l'enfant, ou* 2 *chromosomes* Ph^1 *étaient également présents. Elle était augmentée dans le cas de leucémie à polynucléaires et elle était presque nulle dans le cas ressemblant à une métaplasie myéloïde.*

SUMMARY

1. *Thirty-one cytogenic studies were performed on* 18 *patients with chronic myelogenous leukaemia (CML). The* Ph^1 *chromosome was found in each case (in* 12–100% *of the mitoses, mean* 69%) *in the chronic phase as well as during the acute transformation. The modal number of chromosomes was* 46 *for the* 13 *patients in chronic phase and for* 6 *patients during the myeloblastic crisis. Aneuploidy was present in* 2 *cases in the blastic phase. In another patient, the modal number was* 49, *a few weeks before death, without*

acute myeloblastic crisis. The patient had secondary haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia.

2. *In a* 12*-year-old girl with CML, there were* 2 *Ph*^{1} *chromosomes in* 85% *of the mitoses.*

3. *In one case of chronic neutrophilic leukaemia, there was a karyotype with a modal number of* 46 *chromosomes and the Ph*^{1} *chromosomes was present in* 31% *of the mitoses.*

4. *In one case with the clinical and haematological characteristics of agnogenic myeloid metaplasia (anaemia, mild leukocytosis, thrombocythemia, survival of* 8 *years without treatment), the Ph*^{1} *chromosome was found in* 18% *of the mitoses.*

5. *The leukocyte alkaline phosphatase (LAP) activity was studied by the method of Kaplow in all cases. It was low in all the patients with typical CML in the chronic phase. It was slightly higher, but still below the median, in* 2 *patients in complete remission. It was normal or high in three cases during the acute blastic crisis. In one of these,* 2 *Ph*^{1} *chromosomes were present in the majority of the mitoses. In addition the LAP was high in the case of CML in a girl who also showed* 2 *Ph*^{1} *chromosomes. The LAP score was extremely high in the case of chronic neutrophilic leukaemia.*

ZUSAMMENFASSUNG

1. *Die Karyotypen von* 18 *erwachsenen Kranken mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) wurden untersucht und* 31 *cytogenetische Analysen wurden durchgeführt. Das Chromosom von Philadelphia (Ph*^{1}*) wurde in allen Fällen (in* 12 *bis* 100% *der Mitosen, also durchnittlich in* 69%*) sowohl während der chronischen als auch während der akuten Phase gefunden. Die modale Anzahl der Chromosomen beträgt* 46 *bei den* 13 *Patienten, die sich in der chronischen Phase befanden, und bei* 6 *Patienten in der akuten Phase ihrer Krankheit. In* 2 *Kranken wurde eine Aneuploidie während der myeloblastischen Umwandlung festgestellt. In einem dritten Kranken ohne myeloblastische Umwandlung beträgt die modale Anzahl der Chromosomen einigen Wochen vor dem Tod* 49*. In diesem Patient lagen gleichzeitig eine hämolytische Anämie und eine übermässige Thrombocytopenie vor.*

2. *Die CML wurde bei einem* 12*-jährigen Kind durch die Anwesenheit zweier Ph*^{1} *Chromosomen in der Mehrheit der Mitosen des Knochenmarks charakterisiert.*

3. *Der Karyotyp eines Falles von chronischen Leukämie mit reifen neutrophilen Granulocyten glich dem der CML: das Ph*$^{1-}$ *Chromosom war die einzige Anomalie.*

4. *In einem Fall mit klinischen und hämatologischen Zeichen einer myeloischen Metaplasie (Anämie, mässige Leukocytose, Thrombocytopenie, Bestehen der Krankheit seit* 8 *Jahren ohne Behandlung) war das Ph*$^{1-}$ *Chromosom in* 12% *der Mistosen anwesend.*

5. *Die alkalische Phosphatase der Granulocyten wurde nach Kaplows Methode in allen Kranken halbquantitativ festgestellt; zu derselben Zeit wurden diese Patienten cytogenetisch geprüft. Während der chronischen Phase der Krankheit war die alkalische Phosphatase in den Granulocyten sehr gering, in allen Kranken mit typischer CML. Sie war ein wenig höher, jedoch unter dem normalen Wert, in den Kranken in Remission. Sie war normal oder hoch in* 3 *Kranken während der myeloischen Umwandlung. In einem dieser Fälle wurden* 2 *Ph*$^{1-}$ *Chromosomen in der Mehrheit der Zellen gefunden. Die alkalische Phosphatase in den Granulocyten übertraf der Normale in der CML des Kindes mit* 2 *Ph*$^{1-}$ *Choromosomen. Auch in der Leukämie mit reifen neutrophilen Granulocyten war sie erhöht. In dem Fall, der einer myeloische Metaplasie glich, war sie fast Null.*

BIBLIOGRAPHIE

1. P. C. Nowell and D. A. Hungerford, A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132,** 1497 (1960).
2. P. C. Nowell and D. A. Hungerford, Chromosome studies on normal and leukemic leukocytes. *J. nat. Cancer Inst.* **25,** 85 (1960).
3. A. G. Baikie, W. M. Court Brown, K. E. Buckton, D. G. Harnden, P. A. Jacobs and I. M. Tough, A possible specific chromosome abnormality in chronic myeloid leukaemia. *Nature (Lond.)* **188,** 1165 (1960).

4. G. T. Rudkin, D. A. Hungerford and P. C. Nowell, DNA contents of chromosome Ph¹ and chromosome 21 in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **144,** 1229 (1964).
5. A. A. Sandberg, T. Ishihara, L. H. Crosswhite and T. S. Hauschka, Comparison of chromosome constitution in chronic myelocytic leukemia and other myeloproliferative disorders. *Blood* **20,** 393 (1962).
6. I. M. Tough, W. M. Court Brown, A. G. Baikie, K. E. Buckton, D. G. Harnden, P. A. Jacobs and J. A. Williams, Chronic myeloid leukaemia: Cytogenetic studies before and after splenic irradiation. *Lancet* **ii,** 115 (1962).
7. P. H. Fitzgerald, A. Adams and F. W. Gunz, Chronic granulocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *Blood* **21,** 183 (1963).
8. D. E. Speed and S. D. Lawler, Chronic granulocytic leukaemia. The chromosomes and the disease. *Lancet* **i,** 403 (1964).
9. P. S. Moorhead, P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips and D. A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* **20,** 613 (1960).
10. S. Krauss, J. E. Sokal and A. A. Sandberg, Comparison of Philadelphia chromosome-positive and -negative patients with chronic myelocytic leukemia. *Ann. Intern. Med.* **61,** 625 (1964).
11. J. H. Tjio, P. P. Carbone, J. Whang and E. Frei, The Philadelphia chromosome and chronic myelogenous leukemia. *J. nat. Cancer Inst.* **36,** 567 (1966).
12. W. M. Court Brown and I. M. Tough, Cytogenetic studies in chronic myeloid leukemia. *Advanc. Cancer Res.* **7,** 351 (1963).
13. A. A. Sandberg, T. Ishihara, T. Miwa and T. S. Hauschka, The *in vivo* chromosome constitution of marrow from 34 human leukemias and 60 non-leukemic controls. *Cancer Res.* **21,** 678 (1961).
14. L. S. Kaplow, A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* **10,** 1023 (1955).
15. C. W. Heath, Jr. and W. C. Moloney, The Philadelphia chromosome in an unusual case of myeloproliferation disease. *Blood* **26,** 471 (1965).
16. I. M. Tough, P. A. Jacobs, W. M. Court Brown, A. G. Braikie and E. R. D. Williamson, Cytogenetic studies on bone-marrow in chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **i,** 844 (1963).
17. N. H. Kemp, J. L. Stafford and R. Tanner, Chromosome studies during early and terminal chronic myeloid leukaemia. *Brit. Med. J.* **1,** 1010 (1964).
18. L. Koulisher, Y. Kenis and J. Henry, Transformation of Polycythemia Vera in Ph¹-positive chronic myelogenous leukemia. (To be published).
19. D. W. Fortune, F. J. W. Lewis and R. H. Poulding, Chromosome pattern in myeloid leukaemia in a child. *Lancet* **i,** 537 (1962).
20. L. E. Reisman and J. M. Trujillo, Chronic granulocytic leukaemia of childhood: clinical and cytogenetic studies. *J. Pediat.* **62,** 710 (1963).
21. L. E. Reisman, M. Mitani and W. W. Zuelzer, Chromosome studies in leukemia. I. Evidence for the origin of leukemic stem lines from aneuploid mutants. *New Engl. J. Med.* **270,** 591 (1964).
22. R. L. Teplitz, R. B. Rosen and M. R. Teplitz, Granulocytic leukaemia, Philadelphia chromosome and leucocyte alkaline phosphatase. *Lancet* **ii,** 418 (1964).
23. F. Hammouda, D. Quaglino and F. G. J. Hayhoe, Blastic crisis in chronic granulocytic leukaemia. Cytochemical, cytogenetic and autoradiographic studies in four cases. *Brit. Med. J.* **1,** 1275 (1964).
24. J. de Grouchy, C. de Nava et G. Bilski-Pasquier, Duplication d'un Ph¹ et suggestion d'une évolution clonale dans une leucémie myéloïde chronique en transformation aiguë. *Nouv. Rev. Franç Hémat.* **5,** 69, (1965).
25. J. Bernard, J. Tanzer, M. Boiron, J. P. Levy, M. Ripault et P. Harel, Un cas de leucémie à polynucléaires neutrophiles. Etude cytochimique et chromosomique. *Nouv. Rev. Franç Hémat.* **4,** 253 (1964.)
26. N. Gringold, C. Dulgheru Oproiu and N. Comanescu, Cytochemical and cytogenetic findings in chronic neutrophilic leukaemia of mature cell type. *Lancet* **ii,** 1123 (1964).
27. A. A. Alter, S. L. Lee, M. Pourfar and G. Dobkin, Studies of leukocyte alkaline phosphatase in mongolism: a possible chromosome marker. *Blood* **22,** 165 (1963).

28. S. TRUBOWITZ, D. KIRMAN and B. MASEK, The leucocyte alkaline phosphatase in mongolism. *Lancet* **ii,** 486 (1962).
29. M. J. KING, E. M. GILLIS and A. G. BAIKIE, Alkaline phosphatase activity of polymorphs in mongolism. *Lancet* **ii,** 1302 (1962).
30. M. WACHSTEIN, Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal blood and marrow cells. *J. Lab. Clin. Med.* **31,** 1 (1946).
31. W. N. VALENTINE and W. S. BECK, Biochemical studies on leukocytes. I. Phosphatase activity in health, leukocytosis and myelocytic leukemia. *J. Lab. Clin. Med.* **38,** 39 (1951).
32. J. B. BLOCK, P P. CARBONE, J. J. OPPENHEIM and E. FREI, III, The effect of treatment in patients with chronic myelogenous leukemia. Biochemical studies. *Ann. Intern. Med.* **59,** 629 (1963)
33. E. XEFTERIS, W. J. MITUS, I. B. MEDNICOFF and W. DAMESHEK, Leukocyte alkaline phosphatase in busulfan-induced remissions of chronic granulocytic leukemia. *Blood* **18,** 202 (1961).
34. R. B. ROSEN and R. L. TEPLITZ, Chronic granulocytic leukemia complicated by ulcerative colitis: elevated leukocyte alkaline phosphatase and possible modifier gene deletion. *Blood* **26,** 148 (1965).
35. W. J. MELLMAN, F. A. OSKI, T. A. TEDESCO, A. MACIERA-COELHO and H. HARRIS, Leucocyte enzymes in Down's syndrome. *Lancet* **ii,** 674 (1964).
36. G. L. KAUER, Jr. and R. L. ENGLE, Jr., Eosinophilic leukaemia with Ph^1-positive cells. *Lancet* **ii,** 1340 (1964).
37. H. GRUENWALD, K. A. KIOSSOGLOU, W. J. MITUS and W. DAMESHEK, Philadelphia chromosome in an eosinophilic leukemia. *Amer. J. Med.* **39,** 1103 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3. pp. 95–101. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Chemotherapy of two Morphologically Similar Human Tumors Growing in the Cheek Pouch of the Golden Hamster: H. Ad. No. 1 and GW—39*†

DAVID M. GOLDENBERG and SIEGFRIED WITTE

Cancer Research Laboratory, Department of Medicine, University Clinics, University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Federal Republic of Germany

OF PRIMARY concern in the design of preclinical screening systems for anticancer agents is the choice of tumor systems which may be reliable in predicting antineoplastic activity in man. Acknowledging possible differences in metabolic pattern, pathogenesis, and host-effects between animal and human cancer, it seemed desirable to us to design a chemotherapy model utilizing transplanted *human* tumors [1, 2], for this could at least provide us with cancer material both genetically [3–7], immunologically [2, 7–9], and biologically [10, 11] resembling human cancer. If, in addition, it were possible to obtain more than one transplantable human tumor from the same body site and with a similar microscopic morphology, then perhaps the chemotherapeutic sensitivity of this particular *type* of cancer could be determined.

Such an approach has become possible with the establishment of two serially transplantable human bowel tumors, GW-39 [12] and GW-77 [1]. Including Toolan's H.Ad.No.1 tumor [13], three heterotransplantable human tumors of the same histopathology are now available, thus raising the question: How similar are these tumor systems in their responsiveness to anticancer agents, i.e. can a tumor "type-specificity" to such agents be advocated? Thus, this preliminary report is concerned with comparing the responses of H.Ad.No.1 and GW-39 to several cancer chemotherapeutic agents of current clinical interest.

MATERIALS AND METHODS

The transplantation history, microscopic morphology, and human antigenicity of H.Ad.No.1 and GW-39 have been reported [2, 7, 12, 13]. Both are bowel tumors described as dedifferentiated adenocarcinomas, and containing signet-ring cells and much mucoid production. Alveolar complexes and tubular-like formations can also be seen in the case of GW-39.

H.Ad.No.1 and GW-39 tumors (17–20 days old) were removed from the cheek pouches of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), homogenized by hand, and suspended in physiological saline supplemented with penicillin and streptomycin; 0·1 ml of a 20 per cent tumor

*Supported in part by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft.*
†Abstract presented at the Ninth International Cancer Congress, Toyko, 1966.

suspension (w/v) was injected into each cheek pouch of both male and female hamsters weighing 45–60 g. No host-conditioning was required, so that extraneous drug effects could be avoided. The animals were fed commercial animal food, supplemented with biweekly rations of carrots and water *ad libitum*.

The convenience of observing the tumor *in situ* by merely everting the cheek pouch of the anesthetized animal (hexobarbital anesthesia, 100 mg/kg body weight, interaperitoneally) permitted the continuous taking of data over a period of 3 weeks. An external tumor volume measurement was adopted, by measuring the tumor's length, width, and depth with calipers. Commencing on day 7–8 after transplantation, measurements were recorded three times weekly until the conclusion of the experiment, usually several days after the end of therapy. For purposes of toxicity studies, however, the tumor-bearing animals were observed for at least another 10 days thereafter. Since even untreated animals sometimes died during the experimental period, drug-induced toxicities were determined by subtracting spontaneous mortality in the control group from that occurring in the treated group of hamsters.

Intraperitoneal therapy with the various agents employed was instituted on 7 consecutive days, starting on the day of the second tumor measurement. All substances were obtained in their commercial forms* and diluted with physiological saline to a concentrated stock solution, which was stored in the refrigerator and from which the necessary quantity was rediluted daily; in some cases, fresh solutions were prepared daily. Such dilutions were made so that the single daily dose was administered in a volume of 10 ml per kg of body weight.

Most experiments consisted of three treatment groups of eight to ten hamsters and a group of ten to twelve control animals. Each compound's maximum tolerated dose (LD_{10}) regimen was repeated at least 2 to 3 times for each tumor system, thus providing fairly reliable ranges of inhibition.

Chemotherapeutic effect was determined by comparing the growth patterns of treated and control groups of tumors. Instead of merely comparing absolute tumor volumes or weighing the tumors in each group at the conclusion of an experiment, we chose to plot the mean increase in tumor size of each group following the first tumor measurement, expressing each subsequent measurement as a simple multiple (referred to as "growth-factor") of this initial tumor size. In comparing the control tumors with those treated, the mean growth factors ($\pm$ standard error of the mean) for each recording day were then plotted on semilog paper, thus depicting each group's growth rate. The percentage of inhibition due to therapy was then computed by comparing the growth factors for each group one day after the last injection. A complete account of this testing method has been presented elsewhere [14, 15].

*Cytosine arabinoside was made available as test substance No. AC 1075 by Heinrich Mack Nachf., Illertissen (Bayern).

RESULTS

Although both tumor systems were tested by two experimenters, one for each, Table 1 demonstrates that the effects of the eight compounds employed were reasonably similar for H.Ad.No.1 and GW-39. Inhibition ranges have been included in order to show the variability of the mean percentages of inhibition for the experiments performed for each agent. At equitoxic doses (maximum tolerated dose) of the alkaylting agents, Cytoxan and Trenimon were approximately equal in effectiveness, whereas Azetepa was poorer in cytostatic action. The order of increasing effectiveness among the antimetabolites was cytosine arabinoside, Methotrexate and 5-fluorouracil. Actinomycin C appeared to be the most active agent tested against these two intestinal tumors, delaying their proliferation by up to 75 per cent. Proresid (ethyl hydrazide derivative of podophyllic acid) is difficult to include in this comparison, since good tumor inhibition was achieved at very high, yet completely non-toxic doses. This might be considered additional support for the "human" nature of these neoplasms, since the Syrian hamster has been known to have a genetically transmitted resistance to certain alkaloids [16, 17]. Nevertheless, at a dosage closer to one expected to yield low toxicity in the hamster (based upon extrapolation from other animal toxicity data), Proresid proved to be almost as effective as Cytoxan, Trenimon and fluorouracil [18].

A more vivid expression of cancerostatic action in these experiments can be obtained by examining the individual growth curves for each experimental group. Four such examples are presented in Figs. 1–4, for cytosine arabinoside, Cytoxan, Methotrexate and Sanamycin, respectively. As can be seen, growth retardation is certainly not impressive, being negligible for cytosine arabinoside and maximal for Sanamycin; nevertheless, the tumors do continue to increase in size in spite of therapy. By use of such diagrams, one is not restricted to any

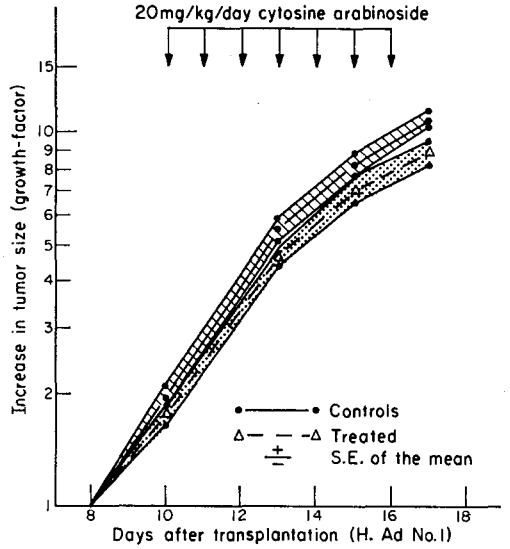


Fig. 1. *Effect of cytosine arabinoside on growth rate of H.Ad.No.*1 *Each tumor group's rate of growth is determined by recording the mean multiples by which the tumors have increased in size since the first recording day, which is then set as* 1, *on semilog paper.*

particular cut-off day on which to determine inhibition percentages, for these can be seen to alter with time. The inhibition ranges in Table 1 have only been included here in order to make comparisons between the effects of different compounds on these two tumor systems more feasible.

DISCUSSION

The use of these human tumors in the hamster for cancer chemotherapy appears to fulfil a number of criteria specified by Stock [19] for such *in vivo* assays: (1) high percentage of tumor takes (here 90–100 per cent), (2) rapid and uniform rate of growth, (3) differential sensitivity to potential antitumor agents, and (4) repeatable results. Consequently, they are particularly suitable objects for evaluating anticancer action.

In the experiments described here, a series of compounds was tested for antitumor activity against the human tumors H.Ad.No.1 and GW-39 growing in the cheek pouch of unconditioned golden hamsters. As both colon tumors are of similar histopathology and with a very similar growth pattern, although derived from different patients and propagated in xenogenic hosts for different lengths of time, our findings seem to support the supposition that a degree of type-specificity exists for such cancerostatic agents. Yet, differences between the compounds tested could be

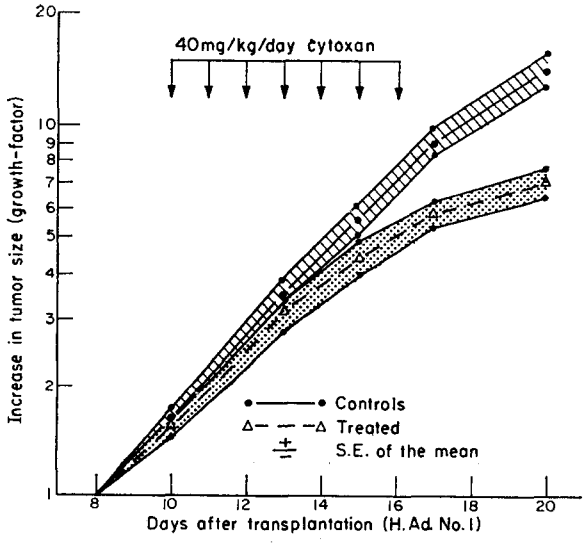


Fig. 2. *Effect of Cytoxan on growth rate of H.Ad.No.*1.

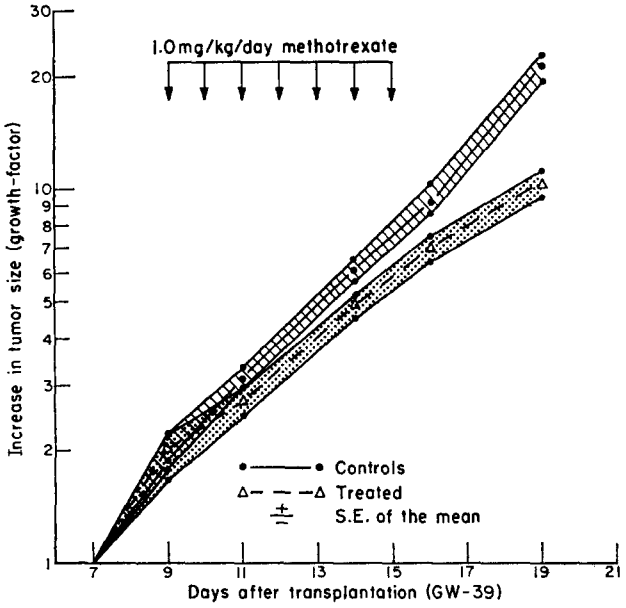


Fig. 3. Effect of Methotrexate on growth rate of GW-39.

demonstrated within each tumor system, with inhibition of growth rate ranging from an insignificant 10 per cent in the case of cytosine arabinoside to a maximum of 75 per cent for actinomycin. Nevertheless, the question must also be posed whether such similarities between these two tumor systems are merely the result of a metabolic peculiarity of the hamster host — human tumor system employed. Chemotherapy studies of other tumor types have shown that this is not the case [20, 21]. In our own laboratory, we have recently succeeded in propagating a human ovarian carcinoma, GW-127, in the golden hamster, and have completed preliminary screening which indicates that this tumor system has a different pattern of sensitivity to the compounds reported here than found for H.Ad.No.1 and GW-39 [22]. Upon performing additional testing with our third colon tumor, GW-77, the "colon-type" response seen with the other two bowel tumors was confirmed [D. M. Goldenberg and S. Witte, unpublished data].

Of what clinical value is such information? Firstly, we have seen that maximum tolerated doses of the substances tested produced at best a temporary slowing of tumor growth; complete regression could not be attained, thus agreeing, for the most part, with the clinical situation. Secondly, actinomycin appears to have, among the various agents tested, the greatest antitumor activity for the two neoplasms studied, even

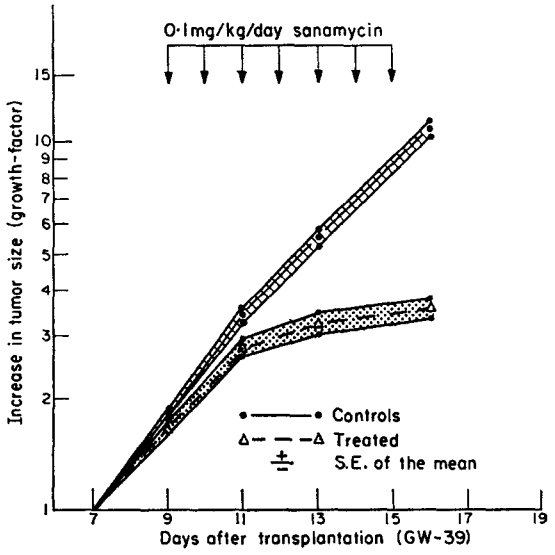


Fig. 4. Effect of Sanamycin (actinomycin C) on growth rate of GW-39.

Table 1. *Comparison of therapeutic effectiveness of several anticancer agents against H.Ad.No.*1 *and GW-*39

Compound	Maximum tolerated dose (mg/kg/day × 7)	Inhibition range at therapy-end (%)	
		H.Ad.No.1	GW-39
Azetepa	3·5	26–33	27–32
Cytoxan	40·0	28–40	32–38
Trenimon	0·06	32–36	33–39
Fluorouracil	20·0	33–39	34–46
Methotrexate	1·0	18–23	20–30
Cytosine arabinoside	20·0	12–18	15–24
Proresid (SP-1)*	250·0	49–53	48–54
Actinomycin C (Sanamycin)	0·1	67–75	68–74

*No toxicity obtained for Proresid at this dosage level.

more so than 5-fluorouracil, which has been reported to be clinically active in the treatment of gastro-intestinal cancer [23]. Accordingly, our results with these human colon tumors has encouraged us to re-evaluate the effects of actinomycin on this type of cancer clinically. Finally, it would appear that the great diversity in response to chemotherapy between patients with similar neoplastic diseases is not merely due to the heterogenous nature of the tumors themselves, which appear to react fairly similarly after removal from the cancer patient, but perhaps more so to various host–tumor relationships. Of course, it is also conceivable that those colon tumors which have reached the stage of being heterotransplantable are composed of tumor cell populations with very similar chemotherapeutic sensitivity.

RESUME

*La transplantation en série de tumeurs humaines, chez des animaux de laboratoire, a permis d'établir une nouvelle méthode d'évaluation préclinique d'agents antitumoraux. Bien que la plupart des animaux porteurs de tissus hétérologues nécessitent un certain degré de conditionnement de l'hôte, les deux lignées tumorales H.Ad.No.*1 *et GW-*39 *croissent de manière uniforme et prévisible dans l'abajoue de hamsters non conditionnés. On a comparé la sensibilité chimiothérapique de ces deux lignées tumorales, car, bien que toutes deux soient originaires de malades différents et aient été transplantées chez des hôtes hétérologues pendant des périodes différentes, elles proviennent toutes deux du côlon et se ressemblent fort au point de vue histologique. On a ainsi testé huit composés carcinostatiques, à la dose maximum tolérée, sur les tumeurs H.Ad.No.*1 *et GW-*39 *; ce sont l'Azetepa, le Cytoxan, le Trenimon le fluoro-uracile, le Méthotrexate, la cytosine arabinoside, le Proreside et l'actinomycine C. Tous ces agents n'eurent qu'un effet temporaire sur la croissance de la tumeur; l'actinomycine s'est révélée l'agent le plus actif, et la cytosine arabinoside fut la substance la moins active. Bien que l'on puisse démontrer une action différente de ces divers composés dans chacune des deux lignées tumorales, ils répondirent de facon pratiquement similaire à chacun des agents utilisés; on peut donc supposer qu'il existe un degré de spécificité pour de tels médicaments anticancéreux. Nous proposons donc d'utiliser ces deux lignées de tumeurs humaines, de même que notre nouvelle lignée de tumeur du côlon, la GW-*77, *comme dernière étape des tests chimiothérapiques précliniques pour le cancer généralisé de l'intestin.*

SUMMARY

*The serial transplantation of human tumors in laboratory animals has contributed another preclinical model for the evaluation of potential antitumor agents. Although most animals bearing such xenogenic tissues require some degree of host-conditioning, both H.Ad.No.*1 *and GW-*39 *tumor lines grow in a predictable and uniform manner in the cheek pouch of unconditioned hamsters. A comparison of the chemotherapeutic sensitivity of these two tumor systems has been undertaken, because although both are derived from different patients and have been carried in heterologous hosts for different lengths of time, they are both derived from the colon and are very much alike histopathologically. Thus, eight*

carcinostatic compounds have been tested at their maximum tolerated doses against H.Ad.No.1 and GW-39: Azetepa, Cytoxan, Trenimon, fluorouracil, Methotrexate, cytosine arabinoside, Proresid and actinomycin C. None of these agents had more than a temporary inhibitory effect on tumor growth-rate; actinomycin was the most effective and cytosine arabinoside the least effective substance. Although a differential response could be demonstrated to these compounds in each of the two tumor systems, both responded fairly similarly to each of the agents employed, thus supporting the supposition that a degree of type-specificity for each anticancer drug exists. The use of these two human tumor systems, as well as our most recent colon tumor line, GW-77, as a late-stage preclinical chemotherapy test for disseminated intestinal cancer is proposed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Serientransplantation menschlicher Tumoren in Laboratoriumstiere stellt ein Testmodell dar zur Erfassung tumorhemmender Wirkungen. Die Tumorstämme H.Ad.No.1 und GW-39 wachsen in der Backentasche von Goldhamstern gut reproduzierbar und einförmig, ohne daß eine Vorbehandlung der Wirtstiere wie bei den meisten immunologisch fremden Gewebsüberpflanzungen notwendig ist. Beide Tumoren stammen vom Colon und besitzen grosse histopathologische Ähnlichkeit. Aus diesen Gründen haben wir diese beiden Tumor-Systeme für vergleichende chemotherapeutische Empfindlichkeitsprüfungen verwendet, obwohl sie von verschiedenen Patienten abstammen und unterschiedlich lange in den heterologen Wirtstieren gehalten werden. Wir haben die folgenden cytostatischen Substanzen an diesen Tumoren mit maximal verträglichen Dosen untersucht: Azetepa, Endoxan, Trenimon, Fluoruracil, Methotrexate, Cytosinarabinosid, Proresid und Actinomycin C. Es konnte jeweils nur ein begrenzter Hemmeffekt auf das Tumorwachstum beobachtet werden, wobei Actinomycin am wirksamsten und Cytosinarabinosid am wenigsten wirksam war. Beide Tumor-Systeme reagierten ziemlich gleichmässig auf die geprüften Substanzen, während deutliche Wirkungsunterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen bestanden. Hieraus wurde auf eine gewisse Typenspezifität der Cytostatika geschlossen. Auf Grund der Ergebnisse eignen sich die beiden Humantumor-Systeme, die inzwischen durch einen neuen Colontumor-Stamm (GW-77) erweitert wurden, als kliniknahe Testobjekte für Chemotherapie-Versuche an intestinalen Tumoren.

REFERENCES

1. D. M. Goldenberg, Die Verwendung einiger neuer Human-Tumorstämme in der experimentellen Krebsforschung. 1. Teil. *Arch. Geschwulstforsch.* In press.
2. D. M. Goldenberg, Die Verwendung einiger neuer Human-Tumorstämme in der experimentellen Krebsforschung. 2. Teil. *Arch. Geschwulstforsch.* In press.
3. M. Galton, P. B. Goldman and S. F. Holt, Karyotypic and morphologic characterization of a serially transplanted human choriocarcinoma. *J. nat. Cancer Inst.* **31,** 1019 (1963).
4. H. B. Haley and A. N. Stroud, Constancy of chromosome karyotype in human tumors H.Ad.No.1 and H.Ep.No.3 maintained in laboratory animals. *Cancer Res.* **24,** 639 (1964).
5. A. Levan, Chromosome studies on some human tumors and tissues of normal origin grown *in vivo* and *in vitro* at the Sloan-Kettering Institute. *Cancer* **9,** 648 (1956).
6. C. P. Miles, Chromosomes of some heterotransplanted human tumors. I. H.Emb.Rh.No.1, H.S.No.1, and ME 1. *J. nat. Cancer Inst.* **34,** 103 (1965).
7. D. S. Yohn, W. McD. Hammon, R. W. Atchison and B. C. Casto, Serial heterotransplantation of adrenocarcinoma No. 1 in the cheek pouch of unconditioned adult Syrian hamsters. *Cancer Res.* **22,** 443 (1962).
8. L. Korngold, The distribution of human tissue antigens in five human tumors grown in rats or hamsters. *Cancer Res.* **16,** 956 (1956).
9. L. Korngold and R. Lipari, Tissue antigens of human tumors grown in rats, hamsters and eggs. *Cancer Res.* **15,** 159 (1955).
10. D. M. Goldenberg, S. Witte and E. Müller, Ueber fortgesetzte Transplantation eines menschlichen Ovarialcarcinoms im syrischen Goldenhamster. *Z. Krebsforsch.* **67,** 221 (1965).
11. R. Hertz, Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **102,** 77 (1959).

12. D. M. GOLDENBERG, S. WITTE and K. ELSTER, GW-39: A new human tumor serially transplantable in the golden hamster. *Transplantation* **4,** 760 (1966).
13. H. W. TOOLAN, Permanently transplantable human tumors maintained in conditioned heterologous hosts: H.Chon.No.1, H.Ep.No.4, and H.Ad.No.1. *Cancer Res.* **17,** 418 (1957).
14. D. M. GOLDENBERG, S. WITTE, B. HINDRINGER and G. HARTMANN, Zur experimentellen Chemotherapie eines menschlichen Adenocarcinoms in der Backentasche des Goldhamsters: Die Wirkung von Actinomycin C. *Arzneimittel-Forsch.* **16,** 808 (1966).
15. D. M. GOLDENBERG, S. WITTE, H. WÜST and H. GOLDENBERG, Effect of actinomycin C on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of a human adenocarcinoma growing in a heterologous host. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1965), 524. American Society for Microbiology (1966).
16. M. W. ORSINI and B. PANSKY, The natural resistance of the golden hamster to colchicine. *Science* **115,** 88 (1952).
17. C. L. TURBYFILL and A. L. SONDERWALL, Sensitivity of hamster to colchicine. *Science* **126,** 749 (1957).
18. D. M. GOLDENBERG and S. WITTE, Die Wirkung von Proresid auf überpflanzte menschliche Tumoren des Darmtraktes. 2. *Rothenburger Gespräch.* Schattauer-Verlag, Stuttgart. In press.
19. C. C. STOCK, Studies in experimental cancer chemotherapy. *Curr. Res. Cancer Chemother.* **3,** 1 (1955).
20. G. W. WOOLLEY, Chemotherapy of transplantable human tumors in the hamster. *Cancer Res.* (Suppl.) **22,** 34 (1962).
21. G. W. WOOLLEY, J. J. HARRIS, P. C. MERKER, J. E. PALM and M. N. TELLER, Steroid effects on heterologously-transplanted human tumors. In: *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer,* p. 307. G. PINCUS and E. P. VOLLMER (Editors). Academic Press, New York (1958).
22. D. M. GOLDENBERG and S. WITTE, In preparation.
23. C. HEIDELBERGER and F. J. ANSFIELD, Experimental and clinical use of fluorinated pyrimidines in cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **23,** 1226 (1963).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 103–109. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Fine Structural Alterations of Yoshida Ascites Hepatoma cells following treatment with L-Erythro-α,β-Dihydroxybutyraldehyde

MARIA BASSI

Centro di Microscopia Elettronica, Politecnico di Milano, and Istituto di Patologia Generale, Università di Milano, Milano, Italy

INTRODUCTION

SEVERAL researches have shown that a number of aliphatic aldehydes act as carcinostatic agents [1–6], probably on account of their capacity of inhibiting amino acid incorporation into protein [7–10]. One of these aldehydes, L-erythro-α, β-dihydroxybutyraldehyde (DIBA) was shown to possess a marked carcinostatic and carcinolytic activity at concentrations which are non-toxic to the tumour-bearing animals, and was therefore selected for further studies. [11].

Microscopical observations on Yoshida ascites hepatoma cells treated with DIBA have shown that this substance induces marked nuclear alterations, leading to nuclear rhexis and cell death [12]. It seemed therefore interesting to study the morphology of these cells with the electron microscope, in an attempt to discover early modifications in the cell structure and to follow their progressive evolution towards cell death.

METHODS

Twenty Wistar albino rats of either sex, weighing about 170 g, were used in these experiments. They were fed "ad libitum" on a diet of commercial rat pellets and received tap water. Approximately 10^7 cells of Yoshida hepatoma (AH-130) were inoculated intraperitoneally and maintained in ascitic form by intraperitoneal transplantation. Five days after the injection, they were subjected to the following treatments [11]:

—ten animals were subjected to a 4 hr intraperitoneal infusion with 10 ml of a 0·14 M solution of DIBA, made isotonic with NaCl. This solution was injected by means of a low flow infusion apparatus.

—ten animals were subjected to a 4 hr intraperitoneal infusion with 10 ml of saline.

For electron microscopy, 0·3 ml of ascitic fluid were drawn with a syringe from the peritoneal cavity of the animals at different time intervals: just before the treatment, at the end of it, and respectively 2, 4, 6, 24 and 48 hr after the end of it.

The samples were put immediately into ice-chilled centrifuge tubes containing 6 ml of 2·5% glutaraldehyde (Eastman Organic) Chemicals) in 0·15 M phosphate buffer, pH 7·3, and fixed for 15 min at +4°C. Then, by centrifuging and resuspending the samples at each step of the procedure, they were washed in phosphate buffer, post-fixed in phosphate-

buffered 1% OsO_4, dehydrated in ethanol, and the final pellet was embedded in Araldite [13]. When in absolute ethanol, the samples were impregnated with uranyl acetate in semisaturated solution. Ultrathin sections were obtained with an LKB Ultrotome, mounted on grids coated with carbon-stabilized celloidin film, stained with lead citrate [14], and examined in a Siemens Elmiskop 1 A at an accelerating voltage of 80 kV. Micrographs were taken at magnifications of 5000–30000 and enlarged photographically as necessary.

RESULTS

Untreated cells

The ultrastructure of Yoshida ascites hepatoma cells has already been described by Bairati [15]. However, since the fixative used in the present study differs from those used in previous works, additional informations on the sub-microscopic structures have been recorded and will be reviewed.

At low magnification, the cells appear either isolated or assembled in groups of two or three (Fig. 1); they are roundish, with irregular contours due to the presence of a number of cytoplasmic projections (microvilli). At the site of contact between two cells, the adjacent plasma membranes fuse to form a junctional complex, where only two of the usual junctional structures are recognizable, i.e. the zonulae occludens and adhaerens [16]. The cytoplasm is dense and contains a large number of ribosomes, mitochondria, flattened profiles of the endoplasmic reticulum, a well developed Golgi apparatus, dense bodies of undetermined nature (possibly lysosomes), and bundles of filaments.

At higher magnification (Fig. 2), the ribosomes appear often aggregated in irregular clusters or associated in coiled structures. The maximum observed length of these structures is about 2500 Å (Fig. 2, inset).

The endoplasmic reticulum, composed of flattened sacs, has a random disposition in the cytoplasm and shows long segments devoid of ribosomes. In these regions free particles, larger than ribosomes, are visible, and might be tentatively interpreted as glycogen particles.

The Golgi complex is much developed, and is composed of several stacks of flattened sacs and a great number of small vesicles.

Mitochondria have irregular, roundish or elongated shapes and a clear matrix; their internal membranes have variable lengths and are arranged either transversally or along the longer axis of the mitochondrion. Dense matrix granules are inconspicuous.

In the cytoplasm are often seen filaments, about 60 Å in diameter and of indeterminate length. They occur in small, variously oriented bundles, which thicken around the nucleus and often seem to wrap it completely (Fig. 3). The cytoplasm surrounding the fibrous whorls is sometimes particularly rich in clustered ribosomes.

The nucleus (Fig. 4) is large and often deeply lobated; chromatin is sometimes finely dispersed, sometimes more prominent adjacent to the nuclear membrane. Perichromatin granules are often visible. The nucleolus is generally voluminous, of reticular appearance.

DIBA-treated cells

The sequence of alterations induced in Yoshida ascites hepatoma cells by DIBA treatment can be traced as follows: at first, formation of long cytoplasmic extrusions at the periphery of the cells, and appearance of a strongly electron-opaque substance in the Golgi vesicles; next, mitochondrial alterations, with increase in matrix density and dilatation of the intracristal spaces, leading to mitochondrial disruption; then nuclear changes, with chromatin clumping and final nuclear rhexis.

The first morphological alterations are the formation of long cytoplasmic extrusions (Fig. 5) and the appearance of a strongly electron-opaque substance in the Golgi complex (Figs. 6 and 7).

The cytoplasmic extrusions appear at the end of the perfusion, and tend to disappear after 2 hours. Later, they are no longer visible. They contain hyaloplasm, sometimes also ribosomes, but never other cell organelles. The free extremities of such extrusions tend to fuse and form large, electron-lucid vacuoles at the periphery of the cells.

The electron-opaque substance appears in a few cells at the end of the treatment, and is present in all the cells 2 hr later. It begins to fill only a few Golgi vesicles (Fig. 6), then it extends to many more elements (Fig. 7). This substance has a great affinity for osmium tetroxide and is homogeneous.

At this stage, in a few cells the number of coiled polysomes seems increased (Fig. 6); however, since this finding is not at all constant it will not be discussed here.

Then the aspect of mitochondria changes: their matrix becomes very dense and the intracristal spaces dilate (Fig. 7). Glutaraldehyde is known to induce profound alterations of the mitochondrial matrix. However, the constant appearance of mitochondrial alterations in DIBA-treated cells and their absence in paired-fixed controls rule out the possibility that the

Keys to symbols

ER = *endoplasmic reticulum*	*M* = *mitochondria*
F = *filaments*	*N* = *nucleus*
G = *Golgi complex*	*n* = *nucleolus*
L = *lysosomes*	

All figures are of Yoshida ascites hepatoma cells.

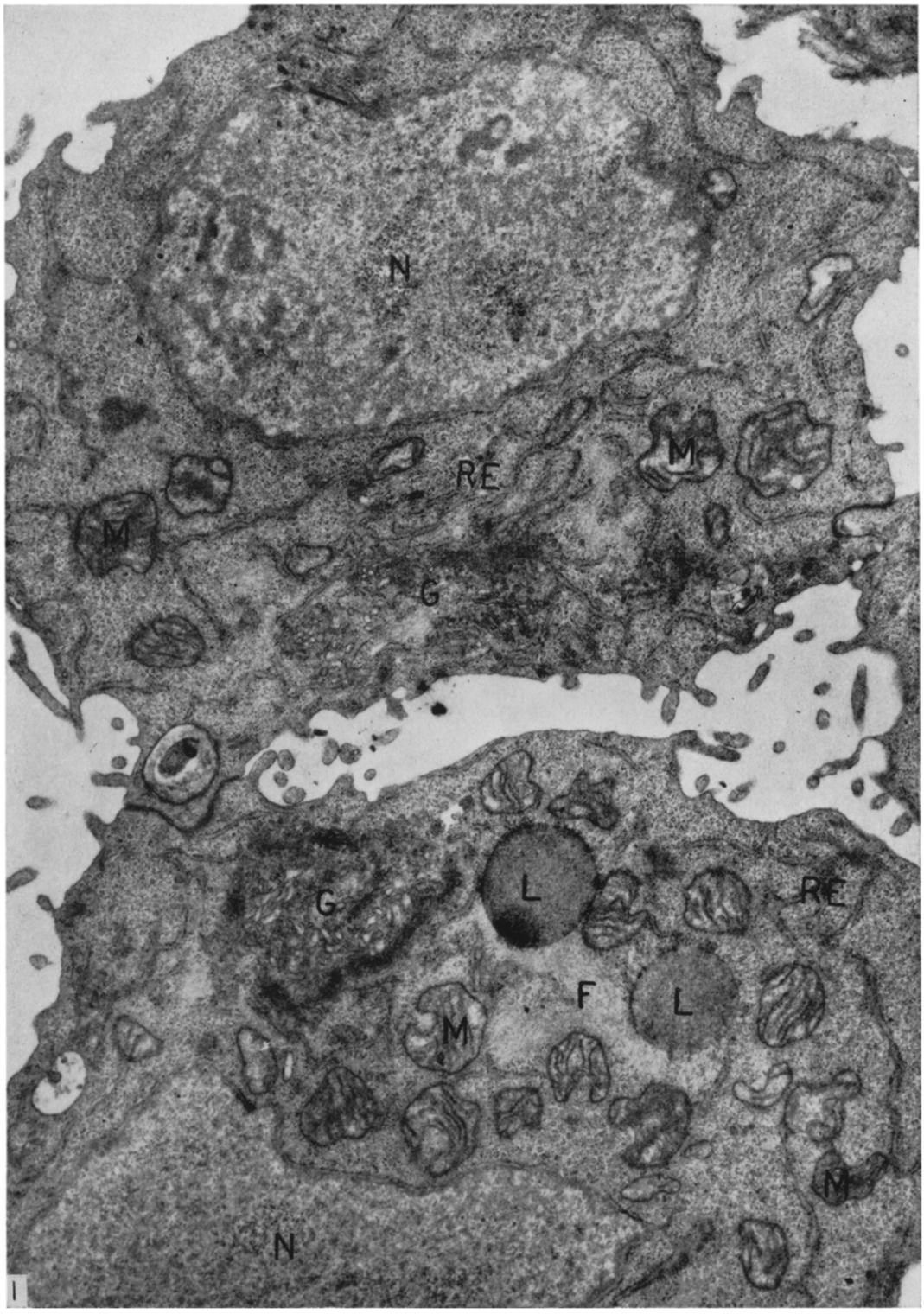


Fig. 1. *Two untreated cells in close contact. The cell membranes form a number of microvilli, and at the sites of contact they fuse to form junctional complexes. The cytoplasm contains irregularly shaped mitochondria, a few flattened profiles of the endoplasmic reticulum, a well developed Golgi apparatus, many ribosomes and bundles of filaments. In the lower cell the filaments contact two lysosome-like structures. The nuclei show finely dispersed chromatin.* 15,000×.

(to face p. 104)

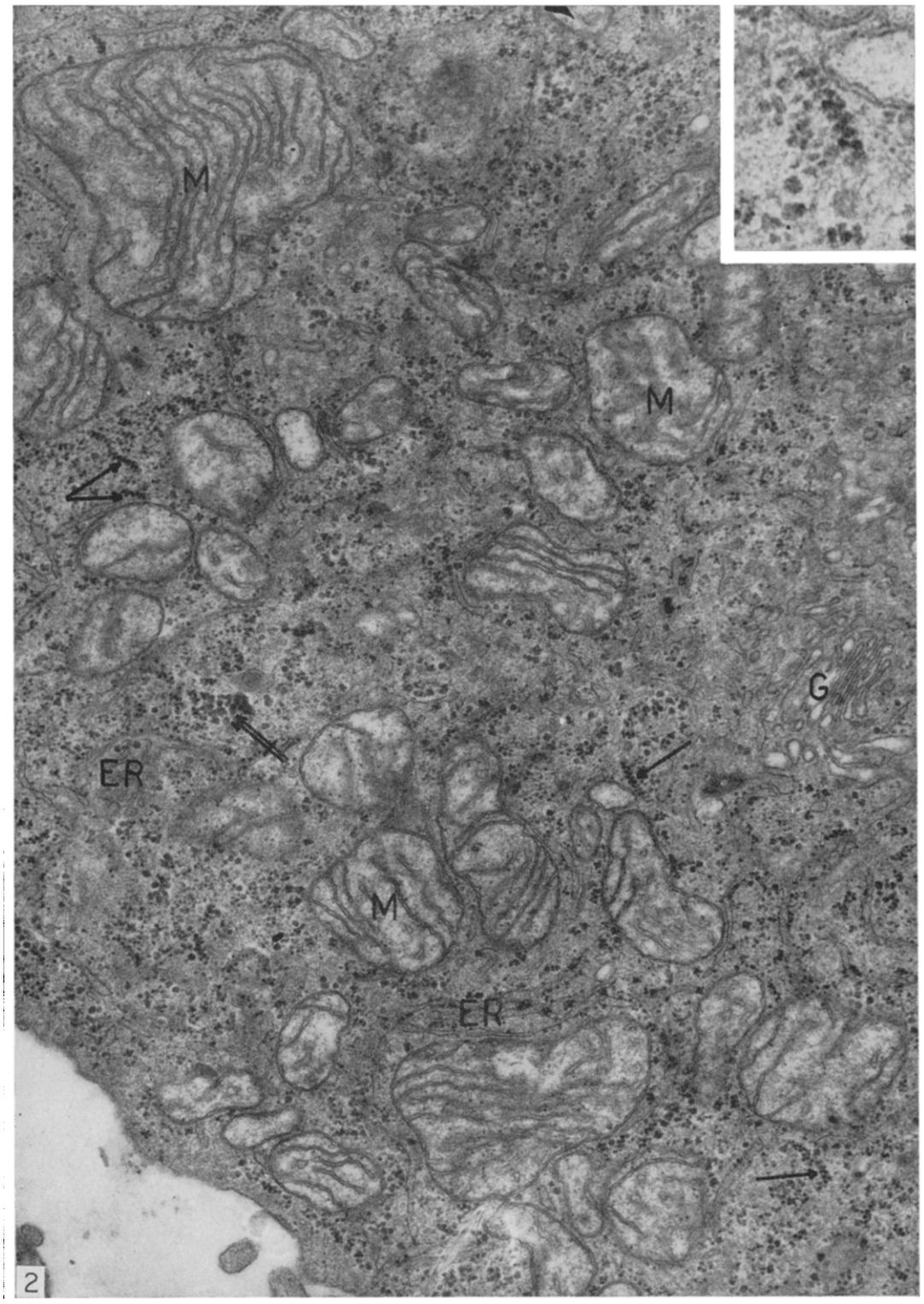


Fig. 2. Untreated cell. The mitochondria vary in size and shape, and show a clear matrix and variously oriented "cristae." A number of ribosomes associated in coiled structures is visible in the cytoplasm (arrows). Many segments of the endoplasmic reticulum are devoid of ribosomes. Close to them free particles, larger than ribosomes, are visible, and might represent glycogen particles (double arrow). 30,000×. *Inset: a coiled polysome, measuring about* 2,500 Å *in length.* 80,000×.

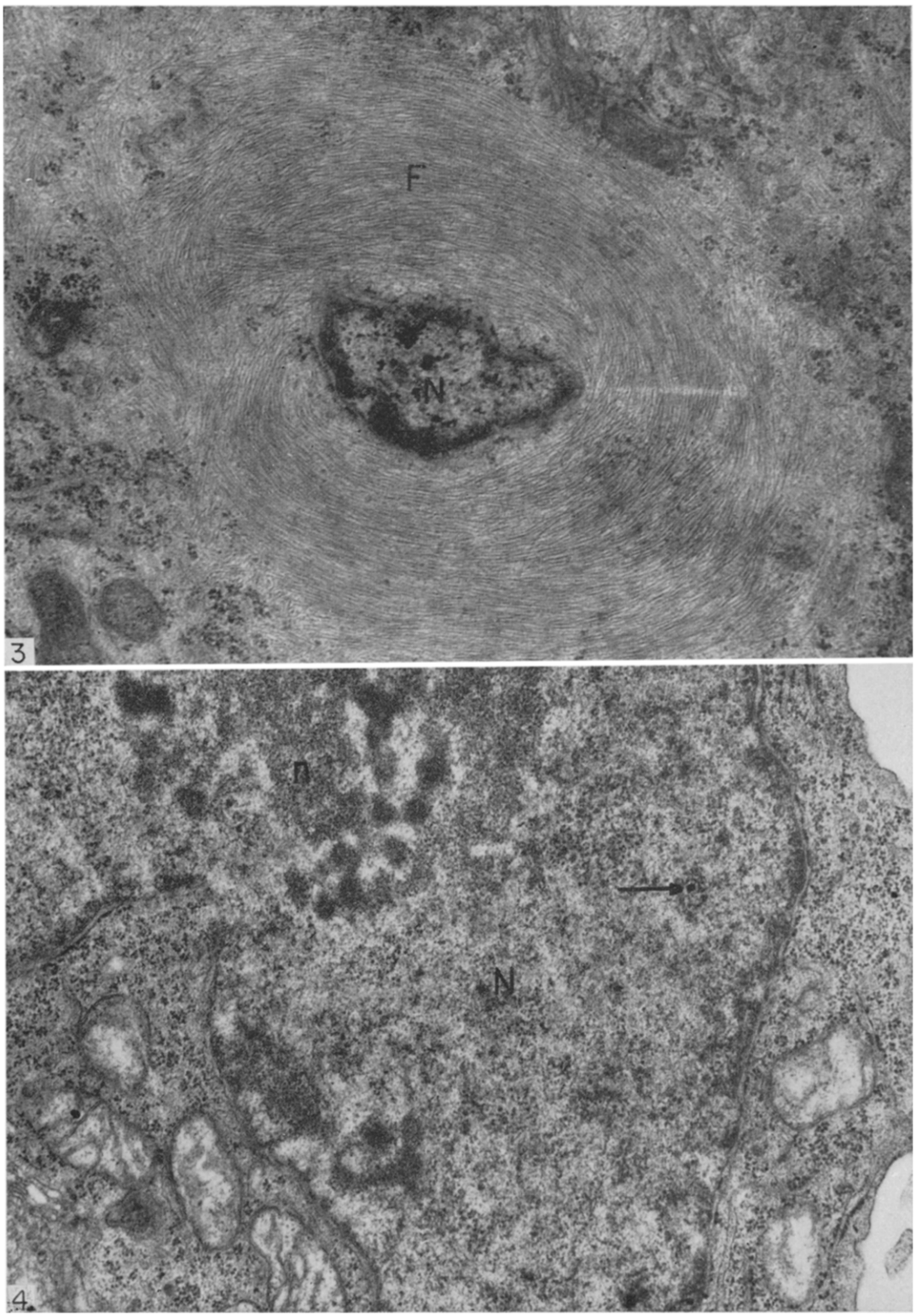


Fig. 3. Untreated cell. This section cuts the nucleus at one pole, and shows that it is completely wrapped by a thick bundle of filaments. The surrounding cytoplasm is particularly rich in clustered ribosomes. 30,000×.

Fig. 4. Untreated cell. The nucleus is lobated, with chromatin somewhat more prominent adjacent to the nuclear membrane. The nucleolus is large, of reticular appearance. One perichromatin granule is visible (arrow). 25,000×.

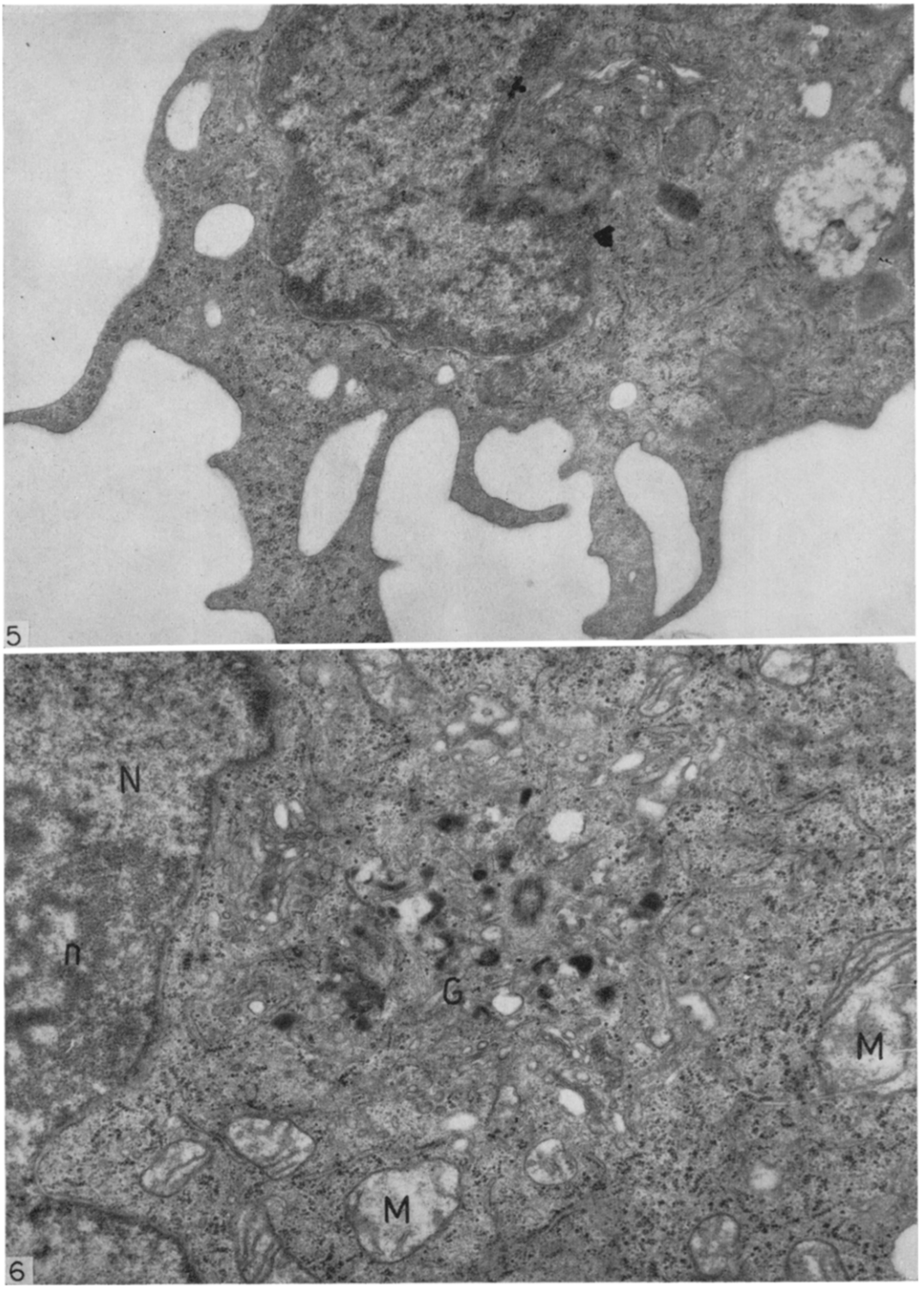


Fig. 5. *Treated cell, at the end of the treatment. The cytoplasm forms long extrusions, some of which contain only hyaloplasm. These extrusions tend to fuse their free extremities, thus forming large vacuoles at the cell periphery. The aspect of the cell is otherwise normal.* 20,000 ×.

Fig. 6. *Treated cell, 2 hr after the end of the treatment. A few elements of the Golgi complex contain an electron-opaque substance. Mitochondria retain their normal appearance. One centriole and a great number of polysomes are visible.* 20,000 ×.

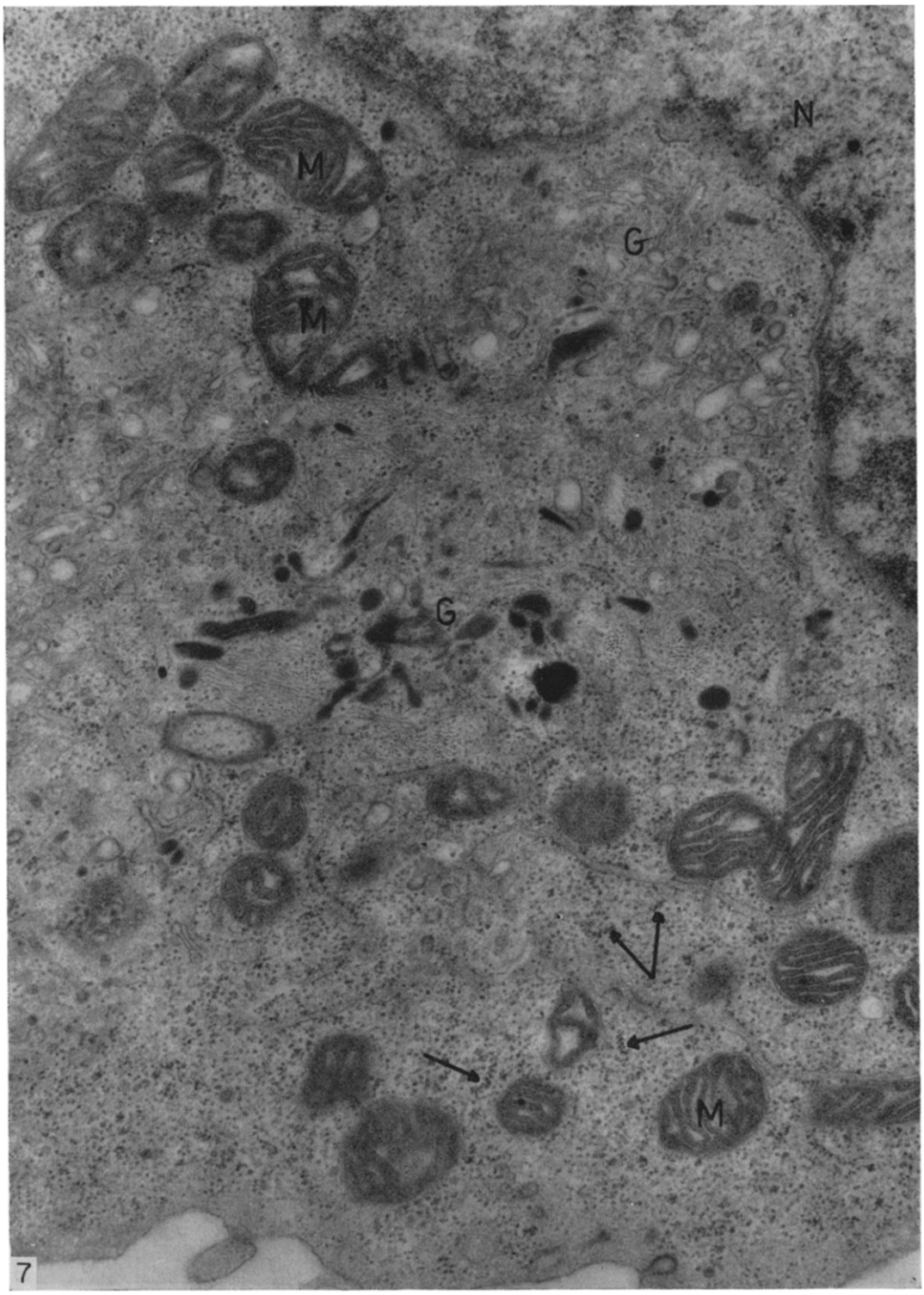
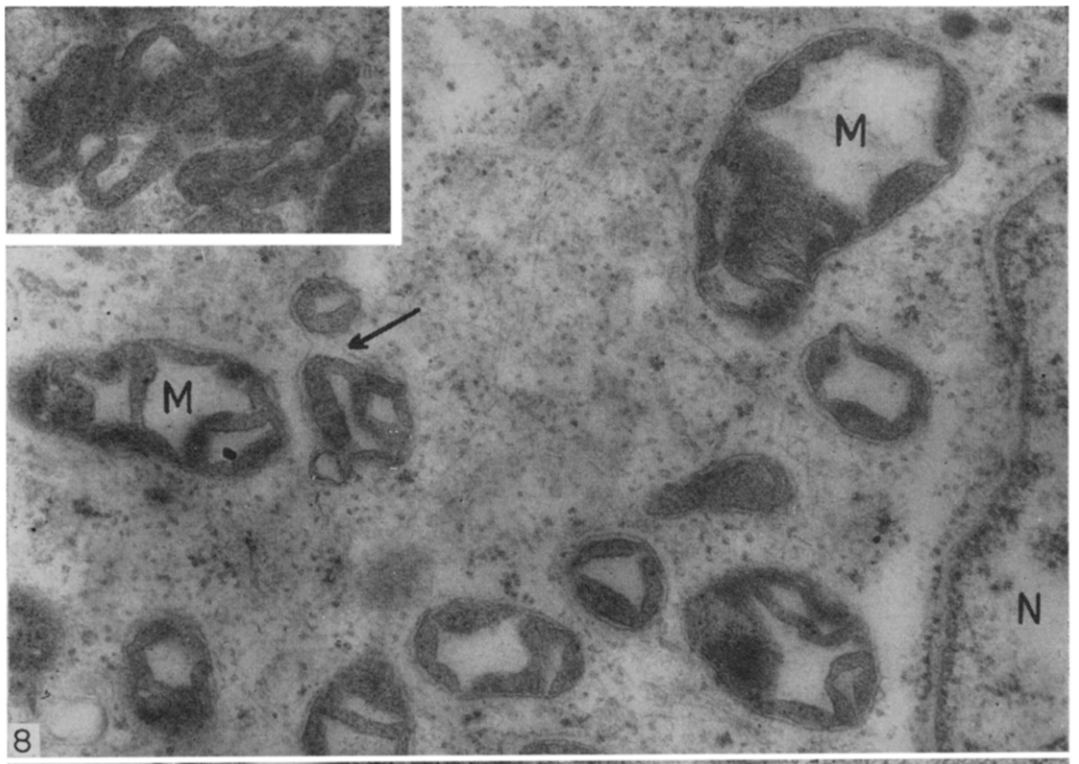


Fig. 7. Treated cell, 2 hr after the end of the treatment. Many Golgi elements are filled with an electron-opaque substance, and the mitochondria show denser matrix and clearer intracristal spaces. Thin bundles of filaments are visible in the Golgi region. Coiled polysomes are visible in the cytoplasm (arrows). 30,000×.



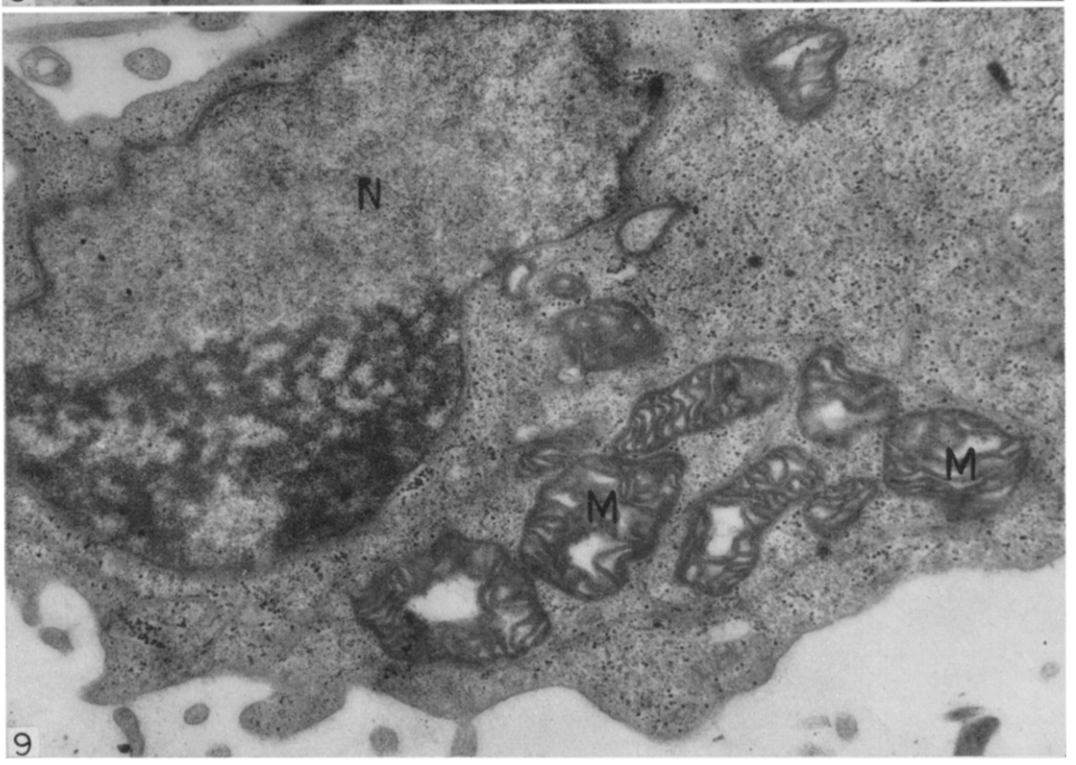


Fig. 8. *Treated cell, 4 hr after the end of the treatment. Mitochondria contain star-shaped empty spaces; the mitochondrial matrix clumps in dark bands at their periphery. The space between outer and inner membranes remains unchanged, and there is no obvious variation in mitochondrial size. Arrow points to a mitochondrion that is presumably undergoing fragmentation.* 44,000×. *Inset: a mitochondrion that has lost its outer membrane and resembles a loose skein.* 44,000×.

Fig. 9. *Treated cell, 4 hr after the end of the treatment. Chromatin clumps at one pole of the nucleus. Mitochondria have the usual altered appearance.* 15,000×.

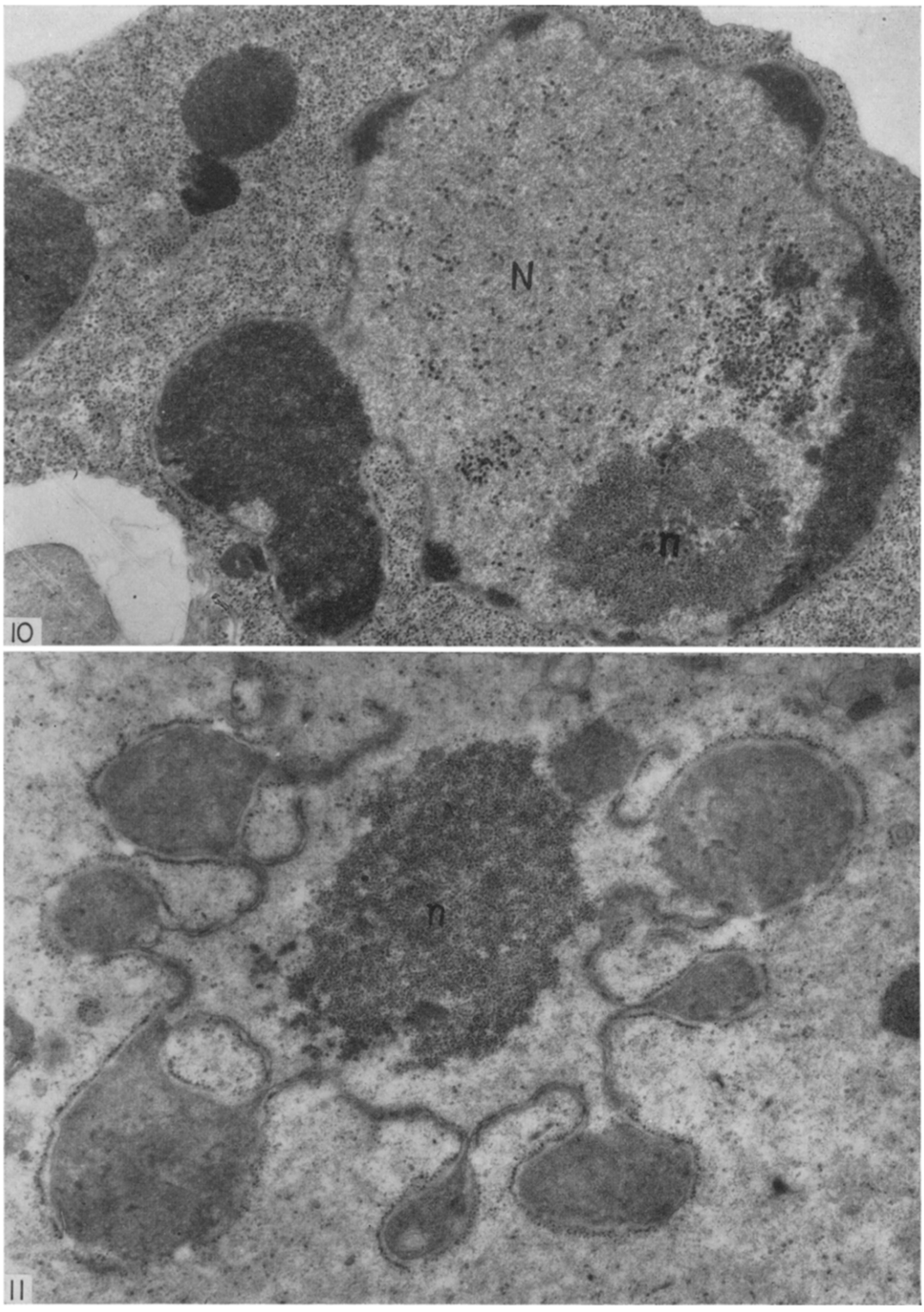


Fig. 10. *Treated cell, 4 hr after the end of the treatment. Chromatin is clumped at the periphery of the nucleus; interchromatin granules tend to aggregate in groups in the nucleoplasm. The nucleolus is more compact, and its RNA granules are somewhat more prominent.* 22,000×.

Fig. 11. *Treated cell, 4 hr after the end of the treatment. The nuclear membrane encircles the single chromatin masses and ruptures, so that the nuclear sap mixes with the cytoplasmic content. A large nucleolus is still present.* 22,000×.

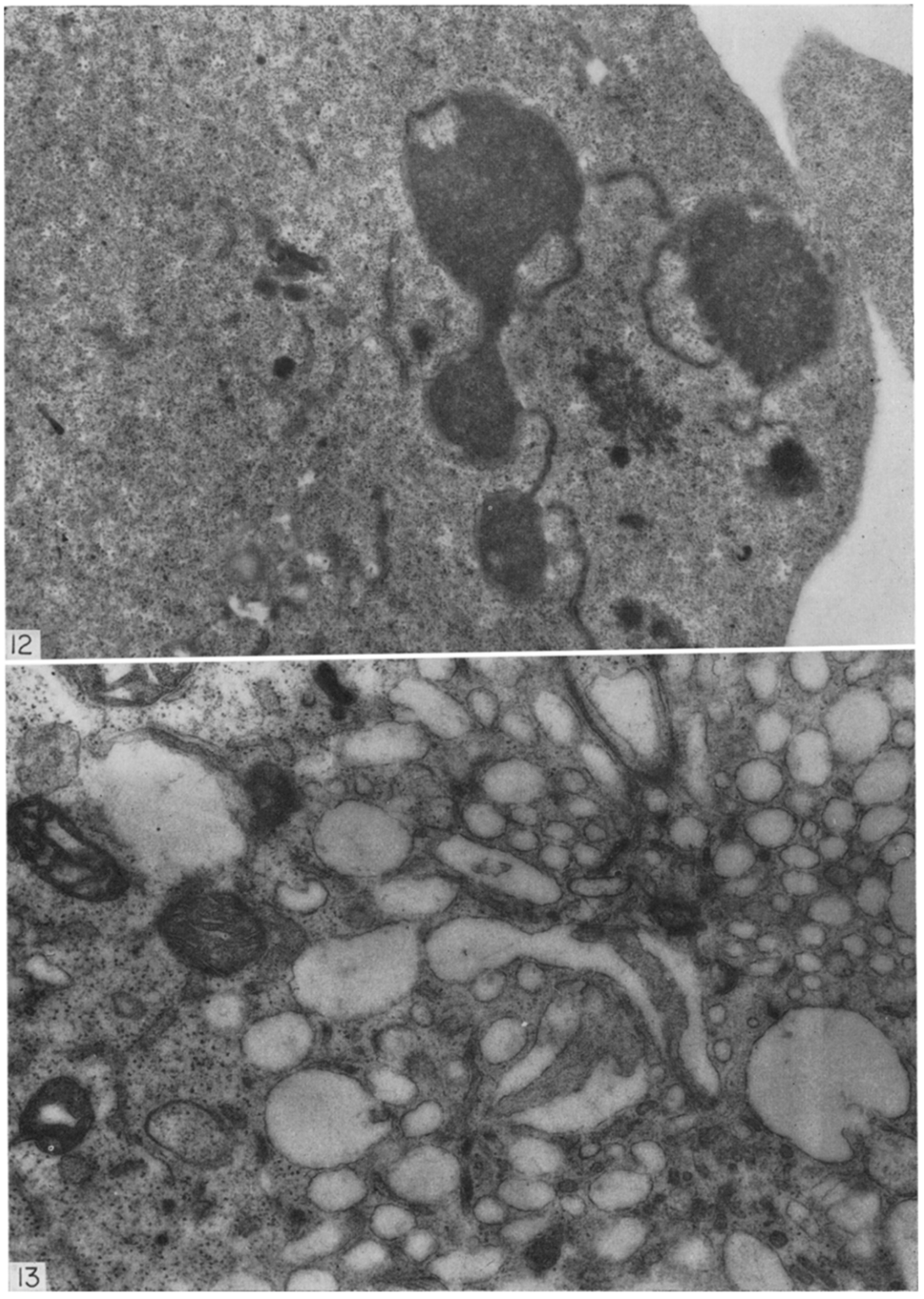


Fig. 12. *Treated cell*, 6 *hr after the end of the treatment. The cytoplasm contains only nuclear remnants and free ribosomes. Note the strong osmiophilia of the fragments of the nuclear membrane. Mitochondria have totally disappeared. Microvilli have also disappeared, and the cell membrane is distended.* 15,000×.

Fig. 13. *Treated cell*, 6 *hr after the end of the treatment. Broad vacuolation of the cytoplasm, where a few altered mitochondria are still visible.* 25,000×.

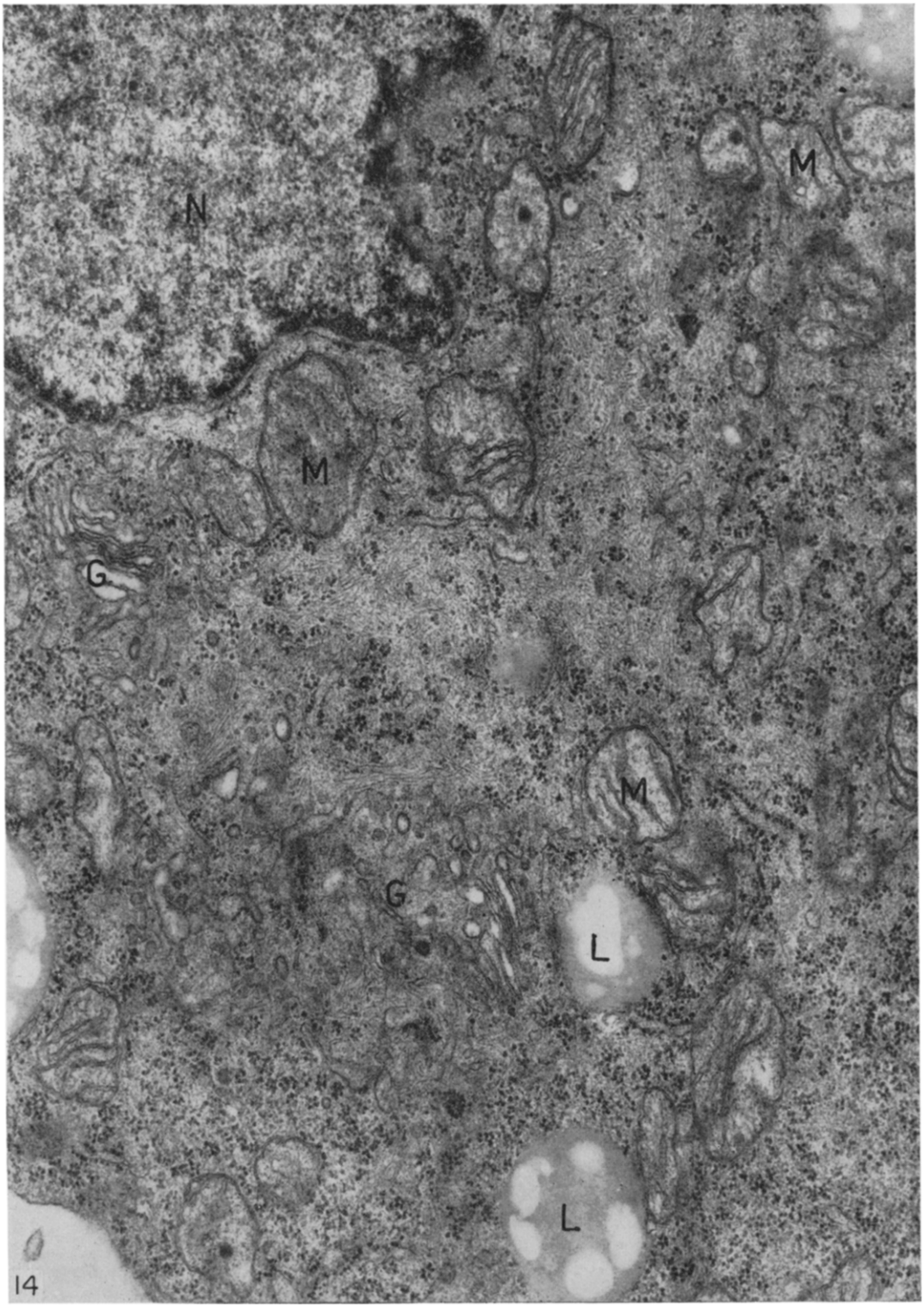


Fig. 14. *Cell treated with saline, 4 hr after the end of the treatment. No alterations are visible, and the cell retains its normal aspect* 30,000 ×.

observed changes may be due to the action of the fixative. The mitochondrial changes come second to the appearance of the dark substance in the Golgi elements: they begin 2 hr after the end of the treatment and are present in all the cells 4 hours after the end of it. With the progressing of the lesion, a dramatic reorganization of the foldings of the inner mitochondrial membrane is seen, with formation of large, star-shaped empty spaces inside the mitochondria, and clumping of the matrix in dark bands at their periphery (Fig. 8). The outer membrane keeps its normal appearance, and there is no obvious decrease in total mitochondrial volume; moreover, the space between outer and inner membranes remains unchanged at the periphery of the mitochondria, notwithstanding the diminution of the whole membrane-bound matrical mass. Later, the mitochondrial external membrane dissolves, and the mitochondria assume the aspect of loose skeins; then they break up into fragments, which gradually disappear, leaving large cytoplasmic areas completely devoid of these organelles (Fig. 12).

After the cytoplasmic alterations, also nuclear alterations appear. First chromatin clumps at the periphery of the nucleus (Fig. 9), then the interchromatin granules become separate and tend to aggregate in groups in the nucleoplasm (Fig. 10). The nucleolus does not seem markedly affected: it becomes more compact and its RNA granules become more prominent (Figs. 10 and 11). Later, the nuclear membrane encircles the single chromatin masses and then it ruptures (Fig. 11), so that the nuclear sap mixes with the cytoplasmic content, and the interchromatin granules and nucleolus become free in the cytoplasm. Often, at this stage, the nuclear membrane is more osmiophilic than normal. Nuclear alterations begin in a few cells as soon as 2 hr after the end of the treatment, and affect nearly all cells 4 hr after the end of the treatment.

When nuclear alterations begin, polyribosomes disappear from the cytoplasm, while free ribosomes remain always in great number. At this stage, many cells show broad cytoplasmic vacuolation, which extends from the cell border to the Golgi region (Fig. 13). The cell membrane becomes distended, microvilli disappear, and the cells are transformed into roundish bodies full of ribosomes, with no other organelles except a few nuclear remnants (Fig. 12).

The cells present in the samples taken 6 hr after the end of the treatment are invariably all so deeply damaged, as to render any possibility of recovery extremely unlikely. Some cells, however, seem to escape the action of the drug. In fact, very few cells are present in the ascitic fluid both 24 and 48 hr after the end of the treatment, but they have a perfectly normal appearance.

Control cells, i.e. cells treated with saline, keep their normal aspect throughout the whole experiment (Fig. 14).

DISCUSSION

For a satisfactory discussion of the observed ultrastructural changes, good information on the concomitant biochemical changes would be necessary. The available data demonstrate an inhibition of protein synthesis [7–10], but since biochemical information is on the whole scanty, morphological interpretation is tentative. However, it seems of interest to have succeeded in tracing a chronological sequence of morphological lesions: first the Golgi complex is affected, second the mitochondria, and third the nucleus. This sequence might provide a basis to direct future biochemical research.

The modifications induced in the cell surface, such as the formation of long cytoplasmic extrusions, are probably not specific, since they have been observed also in Ehrlich ascites tumour cells following treatment with a number of different substances [17]. They might be due to variations in the surface tension at the boundary between cell membrane and surrounding medium. Occasional and aspecific seems also to the formation of large vacuoles at the cell periphery, by fusion of the extrusions' ends; it seems in no way related to an increased pinocytosis [18], since the number of pinocytotic vesicles present in the inner cytoplasmic regions is not increased.

All the other alterations seem to be peculiar to the action of DIBA.

The nature of the substance that fills the Golgi elements remains obscure: whether it derives from an accumulation of lipids, from a strong condensation of the usual Golgi content, or from the deposition of a new substance elaborated in the Golgi complex under the action of DIBA, can not be decided at present. Anyway, even if it cannot be ascertained what kind of reactions take place in the Golgi complex under the action of DIBA, it can be affirmed that this organelle is the first target hit by the drug.

The degenerative changes undergone by mitochondria do not seem to resemble any of the mitochondrial alterations found in different pathological conditions [19]. Generally, an increase of the matrix density was found either in enlarged mitochondria following storage of foreign materials [20], or in shrunken mito-

chondria, as a consequence of the concentration of their content [21–23]. In our case, the mitochondrial volume does not seem to change. To the increase of matrix density corresponds a diminution of the density of the intracristal spaces, as if there was a passage of substance from the intra- to the intermembranous compartments, or, more likely, a passage of water in the opposite direction. The aspect of these mitochondria is partially comparable to that of mitochondria after active removal of Ca^{++} and Mg^{2} [24] or of ADP-activated phosphorylating mitochondria [25], where extrusion of water is known to take place [26, 27]. The mitochondrial changes following treatment with DIBA might be due to a simple redistribution of ions or metabolites within the mitochondrial compartments, or to a damage of the inner membrane, with changes in its molecular components and loss of capacity to regulate water efflux. It would be interesting to know whether these changes are due to a direct action of DIBA, or if this action is mediated by the substance(s) elaborated by the Golgi complex. The fact that mitochondrial alterations always begin after the appearance of the electron-opaque substance in the Golgi elements can be tentatively taken as a support to the latter view; however, one can not rule out the possibility that a longer time must elapse before the damage induced by DIBA in the mitochondria becomes patent. At variance with what seems to happen in most other cells, both in normal and pathological conditions [28–33], the process of mitochondrial disruption seems to take place by simple fragmentation and subsequent dissolution of the fragments in the cytoplasm, without formation of autophagic vacuoles.

In the nucleus, chromatin appears deeply affected, while the nucleolus retains a relatively normal appearance. This might represent the morphological basis of a derangement in DNA and RNA synthesis at the chromatin level [34–37], while nucleolar RNA remains unchanged. Subsequent alterations, such as rupture of the nuclear membrane and nuclear fragmentation, are most likely the consequence of chromatin damage. On the other hand, nuclear alterations might not be directly related to the action of the drug, but might represent only a stage in cell death, brought about by the impairment or suppression of mitochondrial function.

The disappearance of polyribosomes from the cytoplasm is a consequence of the derangement of nuclear RNA synthesis and may explain the diminution of cytoplasmic protein synthesis.

The final picture of swollen, rounded cells with marked cytoplasmic vacuolation is the usual aspect of cells undergoing necrosis [38–40].

It is not possible to establish why the cells present in the ascitic fluid both 24 and 48 hr after the end of the treatment are apparently undamaged. It seems that the lesion is of the "all-or-none" type, since no recovering cell was seen at whatsoever time. One may guess that the surviving cells are descendants either of genetically resistant cells or of cells that during the treatment were hidden in some abdominal recess, and were therefore not reached by a sufficient amount of the drug.

Acknowledgements — The author thanks Prof. E. Ciaranfi for suggesting this research, Drs. A. Perin and A. Arnaboldi for treating the animals, and Miss N. Barbieri for valuable technical assistance.

This research was supported in part by a grant of the C.N.R. National Centre of Experimental Medicine.

RESUME

Vingt rats de souche Wistar, porteurs de l'hépatome ascitique de Yoshida, ont été soumis à une infusion intrapéritonéale, avec une solution d'aldéhyde L-érythro-α, β-dihydroxybutyrique. Pour l'examen des cellules tumorales au microscope électronique, on a prélevé des échantillons de liquide ascitique avant et à la fin du traitement, ainsi que 2, 4, 6, 24 *et* 48 *heures après la fin de celui-ci.*

Les premières altérations des cellules tumorales apparaissent à la fin du traitement; elles se manifestent par la formation de longues excroissances cytoplasmiques à la périphérie des cellules et par l'apparition d'une substance très dense à l'intérieur des vésicules de Golgi.

Après ces premières altérations, on constate que la matrice mitochondriale devient très dense et que l'espace intracristal se dilate; ensuite le membrane mitochondriale extérieure disparaît et les mitochondries se fragmentent. Ces altérations sont très évidentes 2 *et* 4 *heures après la fin du traitement.*

Enfin, on observe des altérations nucléaires: la chromatine se condense à la périphérie du noyau, tandis que les granules interchromatiniens se groupent dans le nucléoplasme.

Ensuite, la membrane nucléaire se fragmente et le contenu du noyau se disperse dans le cytoplasme. Les cellules présentent alors les caractéristiques de la nécrose.

Les cellules présentes dans le liquide ascitique, 24 ou 48 heures après la fin du traitement, sont très peu nombreuses et apparemment normales.

SUMMARY

Yoshida ascites hepatoma-bearing Wistar rats were subjected to peritoneal infusion with a solution of L-erythro- α, β-dihydroxybutyraldehyde. For the examination of the tumour cells, samples of the ascitic fluid were taken at the following intervals: just before and immediately after the treatment, and then respectively 2, 4, 6, 24 and 48 hr after the end of it.

The first changes in Yoshida ascites hepatoma cells appear at the end of the treatment. They are: formation of long cytoplasmic extrusions at the periphery of the cells and appearance of an electron-opaque substance in the Golgi vesicles.

Subsequent changes are: condensation of the mitochondrial matrix and dilatation of the intracristal spaces, followed by disruption of the mitochondrial outer membrane and fragmentation of the mitochondria. These changes are most evident both 2 and 4 hr after the end of the treatment.

Then nuclear alterations follow, with chromatin clumping, separation of the interchromatin granules, rupture of the nuclear membrane and nuclear fragmentation.

Finally, the cells undergo necrosis.

The cells present in the ascitic fluid respectively 24 and 48 hr after the end of the treatment are very few and have a normal aspect.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwanzig Wistar albino Ratten, Träger von Yoshida-Ascites-Hepatom, wurden einer intraperitonealen Infusion mit einer Lösung von L-Erythro- α, β-dihydroxybutyraldehyd unterworfen. Für die elektronenmikroskopwidsche Untersuchung der Hepatomzellen wurden Proben der Ascites-Flüssigkeit vor und am Ende der Infusion entnommen, wei auch 2, 4, 6, 24 und 48 Stunden nach dem Ende der Infusion.

Die ersten Veränderungen der Hepatomzellen erscheinen am Ende der Infusion: sie bestehen in der Bildung langer Cytoplasma-Ausstülpungen an der Zellperipherie und im Auftreten einer sehr dunklen Substanz in den Golgi-Bläschen.

Nach diesen ersten Veränderungen wurde beobachtet, dass die mitochondriale Matrix sehr dunkel wird und die Intramembranräume sich ausdehnen. Dann verschwindet die Aussenmembran der Mitochondrien, und die Mitochondrien zersplittern. Diese Veränderungen sind sehr deutlich 2 und 4 Stunden nach dem Ende der Infusion.

Schliesslich wurden Kernveränderungen beobachtet: das Chromatin kondensiert sich an der Kernperipherie, und die interchromatinen Granulationen gruppieren sich im Kernplasma. Darauf zerreisst die Kernmenbran und der Kerninhalt tritt in das Cytoplasma ein. Die Zellen zeigen dann die charakteristischen Merkmale der Nekrose.

In den 24 und 48 Stunden nach dem Ende der Infusion entnommener Proben sind die Zellen spärlich und vollkommen normal.

REFERENCES

1. A. Furst, B. L. Freedlander, F. A. French, H. Gross and D. Demsher, β-Ethoxy-α-ketobutyraldehyde (kethoxal) as a carcinostatic agent in mouse tumours. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **2,** 204 (1957).
2. F. A. French and B. L. Freedlander, Carcinostatic action of polycarbonyl compounds and their derivatives. I. 3-Ethoxy-2-ketobutyraldehyde and related compounds. *Cancer Res.* **18,** 172 (1958).
3. O. Warburg, K. Gawehn, A. W. Geissler and S. Lorenz, Ueber Heilung von Mäuse-Ascites-Krebs durch D-und L-Glycerinaldehyd. *Z. klin. Chem.* **1,** 175 (1963).

4. H. G. Petering, H. H. Buskirk and G. E. Underwood, The anti-tumour activity of 2-keto-3-ethoxybutyraldehyde bis(thio-semicarbazone) and related compounds. *Cancer Res.* **24,** 367 (1964).
5. G. Bruns, W. Jungstand and H. Knöll, Zur Wirkung des DL-Glycerinaldehyds auf das Ehrlich-Ascites-Carcinom der weissen Maus. *Naturwissenschaften* **51,** 560 (1964).
6. E. Ciaranfi, L. Loreti, A. Borghetti and G. G. Guidotti, Studies on the anti-tumour activity of aliphatic aldehydes—II. Effect on survival of Yoshida ascites hepatoma bearing rats. *Europ. J. Cancer* **1,** 147 (1965).
7. E. Ciaranfi and A. Fonnesu, Sui rapporti fra metabolismo energetico e incorporazione di aminoacidi nelle proteine delle cellule di tumori-ascite. *Atti Accad. Lincei, Rend.* **32,** 835 (1962).
8. G. G. Guidotti, La gliceraldeide, un nuovo inibitore delle sintesi proteiche. *Tumori* **49,** 303 (1963).
9. G. G. Guidotti, A. Fonnesu and E. Ciaranfi, Inhibition of amino acid incorporation into protein of Yoshida ascites hepatoma cells by glyceraldehyde. *Cancer Res.* **24,** 900 (1964).
10. G. G. Guidotti, L. Loreti and E. Ciaranfi, Studies on the anti-tumour activity of aliphatic aldehydes—I. The mechanism of inhibition of amino acid incorporation into protein of Yoshida ascites hepatoma cells. *Europ. J. Cancer* **1,** 23 (1965).
11. E. Ciaranfi, personal communication.
12. A. Perin, personal communication.
13. J. H. Luft, Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol* **9,** 409 (1961).
14. E. S. Reynolds, The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. cell Biol.* **17,** 208 (1963).
15. A. Bairati, Jr., Submicroscopic structure of Yoshida ascites hepatoma. *Cancer Res.* **21,** 989 (1961).
16. M. G. Farquhar and G. E. Palade, Junctional complexes in various epithelia. *J. cell Biol.* **17,** 375 (1963).
17. M. Ratzenhofer and J. Zangger, Cytotoxische Effekte an Krebszellen. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **48,** 120 (1964).
18. H. Holter, Pinocytosis. *Int. Rev. Cytol.* **8,** 481 (1959).
19. Ch. Rouiller, Physiological and pathological changes in mitochondrial morphology. *Int. Rev. Cytol.* **9,** 227 (1960).
20. H. Gansler and Ch. Rouiller, Modifications physiologiques et pathologiques du condriome. *Schweiz. Z. allg. Path.* **19,** 217 (1956).
21. H. David, *Submikroskopische Ortho- und Pathomorphologie der Leber.* Akademie Verlag, Berlin (1964).
22. M. Wachstein and M. Besen, Electron microscopy of renal coagulative necrosis due to DL-serine, with special reference to mitochondrial pycnosis. *Am. J. Pathol.* **44,** 383 (1964).
23. T. Suzuki and F. K. Mostofi, Electron microscopic studies of acute tubular necrosis. Early changes in proximal convoluted tubules of the rat kidney following subcutaneous injection of glycerin. *Lab. Invest.* **15,** 1225 (1966).
24. C. C. Harris and Ch. Leone, Some effects of EDTA and tetraphenylboron on the ultrastructure of mitochondria in mouse liver cells. *J. cell Biol.* **28,** 405 (1966).
25. C. R. Hackenbrock, Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. *J. cell Biol.* **30,** 269 (1966).
26. C. A. Price, A. Fonnesu and R. E. Davies, Movements of water and ions in mitochondria. *Biochem. J.* **64,** 754 (1956).
27. A. L. Lehninger, Reversal of thyroxine-induced swelling of rat liver mitochondria by adenosine triphosphate. *J. biol. Chem.* **234,** 2187 (1959).
28. T. P. Ashford and K. R. Porter, Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. cell. Biol.* **12,** 198 (1962).
29. A. B. Novikoff and E. Essner, Cytolysomes and mitochondrial degeneration. *J. cell Biol.* **15,** 140 (1962).
30. H. Moe and O. Behnke, Cytoplasmic bodies containing mitochondria, ribosomes, and rough surfaced endoplasmic membranes in the epithelium of the small intestine of newborn rats. *J. cell Biol.* **13,** 168 (1962).
31. Z. Hruban, H. Swift, F. W. Dunn and D. E. Lewis, Effect of β-3-furylalanine on the ultrastructure of the hepatocytes and pancreatic acinar cells. *Lab. invest.* **14,** 70 (1965).

32. J. L. E. Ericsson and W. H. Glinsmann, Observations on the subcellular organization of hepatic parenchymal cells. I. Golgi apparatus, cytosomes and cytosegresomes in normal cells. *Lab. Invest.* **15,** 750 (1966).
33. W. H. Glinsmann and J. L. E. Ericsson, Observations on the subcellular organization of hepatic parenchymal cells. II. Evolution of reversible alterations induced by hypoxia. *Lab. Invest.* **15,** 762 (1966).
34. E. D. Hay and J. P. Revel, The fine structure of the DNA component of the nucleus. An electron microscopy study utilizing autoradiography to localize DNA synthesis. *J. cell Biol.* **16,** 29 (1963).
35. J. L. Sirlin, Facts and speculations on the function of nuclear components. In: *The Cell Nucleus*, pp. 35–48. J. S. Mitchell (Editor), Academic Press, New York (1960).
36. J. H. Rho and J. Bonner, The site of ribonucleic acid synthesis in the isolated nucleus. *Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* **47,** 1611 (1961).
37. S. Karasaki, Electron microscopic examination of the sites of nuclear RNA synthesis during amphibian embryogenesis. *J. cell Biol.* **26,** 937 (1965).
38. B. F. Trump, P. J. Goldblatt and R. E. Stowell, An electron microscopy study of early cytoplasmic alterations in hepatic parenchymal cells of mouse liver during necrosis "in vitro" (autolysis). *Lab. Invest.* **11,** 986 (1963).
39. M. Bassi and A. Bernelli-Zazzera, Ultrastructural cytoplasmic changes of liver cells after reversible and irreversible ischemia. *Expt. Molec. Path.* **3,** 332 (1964).
40. G. Majno, Death of liver tissue. A review of cell death, necrosis and autolysis. In: *The Liver Morphology, Biochemistry, Physiology*, pp. 267–313. Ch. Rouiller (Editor), Academic Press, New York (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 111–124. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Transport d'Agents Cytostatiques par les Protéines Plasmatiques

—I Pénétration de la Sérumalbumine dans les Cellules Tumorales

J.-C. CEROTTINI et H. ISLIKER

Institut de Biochimie, Université de Lausanne, et Institut Suisse de Recherches Expérimentales sur le Cancer (Lausanne)

INTRODUCTION

L'EFFICACITÉ de la chimiothérapie antitumorale est limitée par l'apparition d'effets secondaires toxiques aux doses thérapeutiques des agents cytostatiques actuellement connus. L'augmentation de l'index thérapeutique d'un médicament antitumoral peut être réalisée par l'accroissement de la concentration de cet agent dans le tissu tumoral. Cette modification de la distribution d'un médicament implique la notion de "transporteur" doué d'une grande affinité pour le tissu tumoral, et susceptible d'être lié à un médicament. Parmi les transporteurs possibles, certaines protéines plasmatiques représentent un matériel intéressant à étudier, car leur accumulation dans certaines tumeurs animales a déjà été signalée.

Plusieurs auteurs ont suggéré que la sérumalbumine pouvait pénétrer dans les cellules tumorales sans hydrolyse préalable en acides aminés [1–4]. Toutefois, l'étude quantitative de cette pénétration a donné lieu à des résultats contradictoires qui nous ont incité à réexaminer le comportement de la sérumalbumine dans différents systèmes tumoraux *in vitro* et *in vivo*. La présente étude indique que l'absorption préférentielle de la sérumalbumine ne semble pas être une caractéristique générale des cellules tumorales. Cependant, l'accumulation de cette protéine, dans diverses tumeurs solides, permet d'envisager l'étude de son utilisation comme véhicule d'un agent cytostatique.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Les animaux utilisés proviennent de l'élevage de l'Institut Suisse de Recherches Expérimentales sur le Cancer (Lausanne) et comprennent des souris A/Sn et DBA/2 et des rats BD 4 et Wistar.

Tumeurs

a. *Sarcome de Yoshida* — cette tumeur est entretenue par transplantation sous-cutanée à des rats BD 4. La forme ascitique s'obtient par injection intrapéritonéale de cellules tumorales recueillies par dilacération d'un fragment de tumeur solide. Par la suite, la transplantation de la forme ascitique s'effectue par injection intrapéritonéale d'environ 1.10^7 cellules ascitiques.

b. *Tumeur induite par le virus polyome* — la tumeur C 27 est entretenue par transplantation sous-cutanée à des souris A/Sn. Les études *in vitro* s'effectuent sur des cultures primaires

obtenues après traitement à la trypsine de tumeurs solides: la suspension cellulaire est versée dans des tubes de Leighton, munis de lamelles, et est cultivée dans du milieu Eagle contenant 10% de sérum de veau. Le nombre de cellules mises en culture dans un tube varie entre 5 et 8.10^5.

c. *Mastocytome* — les cellules du mastocytome de souris (lignée cellulaire P-815-X2) sont cultivées dans le milieu et selon la méthode décrite par Schindler [5]. La forme solide s'obtient par injection sous-cutanée de 1.10^6 cellules à des souris DBA/2.

Protéines

a. *La sérumalbumine humaine* — (SAH) est livrée sous forme lyophilisée par le Laboratoire Central de la Croix-Rouge Suisse (Berne). *L'albumine de rat* et *l'albumine de souris* sont préparées selon la méthode de Cohen et Gordon [6].

b. *Les γG-globulines humaines* proviennent du Laboratoire Central de la Croix-Rouge Suisse (Berne).

Les γG-globulines de rat sont préparées par précipitation du sérum par le sulfate d'ammonium (concentration finale 40%), suivie d'une chromatographie sur colonne de DEAE–cellulose (Whatman, Balston Ltd), équilibrée avec le tampon phosphate de sodium 0,01M, pH 7,4. La fraction éluée avec le même tampon est constituée par des γG-globulines, de mobilité électrophorétique lente, qui ne forment qu'un seul arc de précipitation dans la région gamma 2 lorsqu'elles sont soumises à une immunoélectrophorèse en présence de sérum de mouton anti-sérum total de rat.

Iodation

Les procédés de marquage décrits par McFarlane [7] et par Bocci [8] ont été utilisés. L'iode radioactif, stérile et sans entraîneur (IBS 3), provient du Radiochemical Centre (Amersham) et de l'Institut Fédéral de Recherches en Matière de Réacteurs (Würenlingen). L'excès d'iode libre est éliminé par passage de la solution radioactive sur une colonne échangeuse d'ions (Amberlite IR-4B forme OH) ou de Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala). Le pourcentage d'iode soluble dans l'acide trichloracétique ne dépasse pas 2%. Le nombre d'atomes d'iode introduits par molécule de protéine est compris entre 0,5 et 1. La radioactivité est mesurée dans un compteur à cristal Nuclear Chicago (modèle C 120–1).

Marquage des protéines par un fluorochrome

Les méthodes de Rinderknecht [9] et de Marshall et coll. [10] ont été utilisées. Les protéines ont été marquées par l'isothiocyanate de fluorescéine ou l'isothiocyanate de lissamine rhodamine (Calbiochem, Los Angeles).

La méthode de préparation des anticorps spécifiques anti-SAH et leur marquage par l'isothiocyanate de fluorescéine a été décrite ailleurs [11].

Absorption de l'albumine par les cellules tumorales in vitro

a. *Cellules ascitiques du sarcome de Yoshida* — Sept jours après la transplantation intrapéritonéale de la forme ascitique de cette tumeur, les rats BD 4 reçoivent par voie intrapéritonéale 5 ml de milieu Eagle, contenant 10% de sérum de veau et 5 unités d'héparine par ml. Sous narcose à l'éther, la cavité abdominale est ouverte et le liquide ascitique aussitôt prélevé est centrifugé. Le culot est lavé deux fois avec du milieu Eagle sans héparine. La concentration en cellules, après décompte à l'hémocytomètre, est ajustée à 5.10^6 cellules/ml avec ce même milieu. Des aliquots de 0,1 ml de la suspension cellulaire sont répartis dans des tubes Leighton, contenant 0,9 ml de milieu Eagle et 5 mg de protéine fluorescente (albumine humaine, albumine ou γG-globuline de rat). Après incubation à 37°C pendant des temps variables, la viabilité des cellules est contrôlée par la méthode de Shrek [12]. Si les préparations présentent moins de 2% de cellules colorées, elles sont lavées deux fois avec du tampon phosphate salin, ajustées à une concentration de 1.10^5 cellules/ml et centrifugées sur lame dans des tubes spéciaux construits selon la description de Eriksson [13]. Après séchage à l'air, les préparations sont montées sous lamelle avec de la glycérine tamponnée et examinées au microscope à fluorescence.

La lecture est faite en chambre noire au microscope Zeiss adapté pour la fluorescence avec un condensateur à fond noir. La source lumineuse est une lampe Osram HBO 200, le filtre d'excitation BG 12 est utilisé en accord avec les filtres d'arrêt 47–65.

Les photographies sont prises avec un film Ektachrome High Speed, le temps de pose variant entre 2 et 6 minutes.

b. *Cellules de la tumeur C 27* — Lorsque les cellules se sont attachées au verre, le milieu est changé et les cultures sont utilisées 24 heures plus tard. Le milieu est remplacé par 1 ml de milieu Eagle contenant 10% de sérum de veau et 5 mg de protéine conjuguée à un fluorochrome. L'incubation a lieu à 37°C et dure 1, 6 ou 24 heures. Après ce laps de temps, les lamelles sont rincées 3 fois dans du tampon phosphate salin et montées sur lame avec de la

glycérine tamponnée.

Lors de l'étude par immunofluorescence, les cultures sont traitées de la même manière, mais la protéine ajoutée au milieu Eagle n'est pas marquée par un fluorochrome. L'incubation terminée, les lamelles sont lavées et fixées dans l'éthanol 95%, pendant 2 minutes. Après rinçage, les préparations sont mises en contact, pendant 30 minutes, à 37°C avec quelques gouttes de la solution d'anticorps fluorescents.

Les lamelles sont lavées et montées sur lame. Le contrôle de la spécificité de la réaction est effectuée de la façon suivante: (a) les cultures sont incubées avec des γG-globulines humaines; puis, après fixation, avec les anticorps anti-SAH fluorescents; (b) après incubation avec la SAH, les cellules sont mises en contact avec des γG-globulines normales de lapin fluorescentes.

c. *Cellules du mastocytome de souris* — Une quantité de 0,1 ml de SAH fluorescente à 4% est ajoutée à 3,9 ml de milieu contenant environ 1.10^5 cellules. Après incubation pendant 6 ou 24 heures, les cellules sont récoltées par centrifugation, étalées sur lame en frottis minces et séchées à l'air. Les préparations sont examinées au microscope à fluorescence après montage sous glycérine tamponnée.

Si le milieu est additionné de SAH non fluorescente, les frottis, après séchage à l'air, sont fixés dans l'éthanol 95% pendant 2 minutes, et traités de la même façon que les cellules de la tumeur C 27.

Autoradiographies

La sérumalbumine humaine est marquée par I^{125} (New England Nuclear Corporation) selon la méthode à la Chloramine T [8]. L'activité spécifique de la protéine radiomarquée est d'environ 5 mC/mg. Une quantité de 10 µg de SAH-I^{125} est ajoutée à 1 ml de milieu Eagle sans sérum dans les tubes de Leighton renfermant les cellules ascitiques du sarcome de Yoshida ou les cellules de la tumeur C 27. L'incubation dure 1, 6 et 24 heures à 37°C, et est suivie de trois lavages avec une solution de SAH à 1%. Les cellules ascitiques sont centrifugées sur lame, alors que les lamelles qui supportent les cellules de la tumeur C 27 sont montées sur lame avec du baume d'inclusion. Les lames sont recouvertes de l'émulsion Kodak NTB-2 pendant 2 mois, développées, fixées et colorées à l'hémalun à travers le film.

Distribution de l'albumine in vivo

Dix jours après l'injection sous-cutanée de 1.10^6 cellules du mastocytome P-815-X2, 12 souris DBA/2 reçoivent par voie intraveineuse 0,1 ml d'une solution de SAH à 1% marqueé par I^{131} (activité spécifique: 5–30 µC/mg). Pour éviter la fixation thyroïdienne de l'iode libéré sous l'action de désiodases, l'eau de boisson des souris est additionnée d'iodure de potassium à 0,1% depuis 48 heures avant l'injection, et pendant la durée de l'expérience. Vingt minutes avant le sacrifice, qui a lieu 1, 6 et 24 heures après l'injection, les souris reçoivent, par voie intrapéritonéale, 0,3 ml d'une solution d'héparine à 500 U/ml. Sous une légère narcose à l'éther, une quantité de 0,025 ml de sang est prélevée dans le plexus rétro-orbitaire à l'aide de pipettes calibrées et hémolysée dans 2 ml d'eau distillée. La peau est réclinée après incision médiane longitudinale. Le sternum est sectionné au-dessus de l'appendice xyphoïde et un large volet thoracique est enlevé, permettant de sectionner la veine cave inférieure à quelques mm au-dessus du diaphragme et d'introduire dans le ventricule gauche une fine aiguille reliée par un tube de polyéthylène à une seringue de 10 ml. La perfusion s'effectue avec 30 ml de NaCl 0,15M. Après prélèvement, les organes sont lavés et pesés, et leur radioactivité est mesurée après digestion dans 2 ml de NaOH 10% à 100°C. Le même type d'expérience est répété avec de l'albumine de souris marquée par I^{131} (activité spécifique: 20 µC/mg). La distribution de l'albumine homologue est également étudiée chez les souris A/Sn au dixième jour de la transplantation sous-cutanée de la tumeur C 27.

Cinq rats BD 4, porteurs d'un sarcome de Yoshida au dixième jour de transplantation sous-cutanée, reçoivent, par voie intraveineuse, 5 mg/100 g d'albumine de rat marquée par I^{131} (activité spécifique: 10 µC/mg) et sont sacrifiés 24 heures plus tard. La perfusion et la mesure de la radioactivité des organes s'effectuent de la manière décrite ci-dessus.

Localisation de l'albumine in vivo

Quatre souris A/Sn, au dixième jour de transplantation de la tumeur C 27, reçoivent, par voie intraveineuse, 10 mg de SAH, et sont sacrifiées 8 heures plus tard par perfusion intracardiaqué de NaCl 0,15M. Les principaux organes sont prélevés immédiatement et traités selon la méthode de Sainte-Marie [14]. Après réhydratation dans la série descendante des alcools, les préparations sont lavées dans du tampon phosphate salin et incubées dans une chambre humide avec quelques gouttes de la solution d'anticorps anti-SAH fluorescents, pendant 30 minutes, à température ambiante. Après lavage, les lames sont montées dans de la glycérine tamponnée avant l'examen au micro-

scope à fluorescence.

Chaque coupe de tissu, immédiatement adjacente à une coupe traitée par les anticorps fluorescents, sert de contrôle et est incubée avec des γG-globulines normales de lapin marquées par la fluorescéine. De plus, des coupes de tissu de souris injectées avec du NaCl 0,15M à la place de la SAH sont incubées avec des anticorps anti-SAH fluorescents.

Le même genre d'expérience est répété chez les souris DBA/2 et les rats BD 4.

RESULTATS

a. Absorption de l'albumine in vitro

L'étude de l'absorption de l'albumine par des cellules tumorales a porté sur trois systèmes *in vitro*, dont les modes de croissance présentent des caractéristiques très différentes.

Les cellules ascitiques du sarcome de Yoshida survivent pendant plusieurs jours dans le milieu utilisé, mais ne prolifèrent pas si le nombre initial de cellules mises en culture est de l'ordre de 5.10^5 par ml de milieu. Les cellules de la tumeur C 27, incubées en concentration semblable, s'attachent rapidement au verre et se multiplient à un rythme irrégulier, mais généralement lent. Les cellules du mastocytome P-815-X2 ne s'attachent pas au verre et ont un temps de génération compris entre 10 et 12 heures.

— *Cellules ascitiques du sarcome de Yoshida* — Lorsque les cellules ont été maintenues, pendant plusieurs jours, dans le même milieu, l'adjonction d'albumine fluorescente s'accompagne d'une intense fluorescence diffuse de toute la cellule. Si le milieu est changé plus souvent, il n'est toutefois pas rare de trouver des cellules dont le cytoplasme et le noyau sont totalement dépourvus de fluorescence, alors que la membrane cellulaire est soulignée par un liséré fluorescent qui occupe presque tout le pourtour de la cellule. Pour éviter ces réactions qui traduisent une lésion cellulaire, il est nécessaire d'utiliser les cellules dès leur prélèvement dans la cavité péritonéale. Dans ces conditons, la plupart des cellules incubées avec l'albumine fluorescente ne présentent pas de fluorescence; en revanche, un petit nombre de cellules, qui constitue 1 à 5% de la population, renferme des granulations fluorescentes localisées à une région du cytoplasme (Fig. 1). Cette image est présente après 1 heure d'incubation et ne se modifie pas lors d'une incubation prolongée.

Il n'apparaît pas de différence entre albumine hétérologue ou homologue fluorescentes. Des résultats similaires s'obtiennent également avec des γG-globulines humaines ou de rat conjuguées à la fluorescéine.

Comme la charge électrique d'une protéine est modifiée lors de la conjugaison à la fluorescéine, nous avons répété ces expériences à l'aide d'albumine humaine marquée par I^{125}. L'examen des autoradiographies a permis de constater que 5% des cellules contiennent un nombre de grains beaucoup plus élevé que le milieu environnant. Les grains n'ont pas de localisation cellulaire particulière (Fig. 2).

Le milieu utilisé ne présente peut-être pas les conditions nécessaires à l'absorption des protéines par les cellules tumorales. Aussi avons-nous injecté les protéines fluorescentes directement dans la cavité péritonéale des rats porteurs du sarcome ascitique. Le même phénomène a été constaté: environ 5% des cellules absorbent une quantité relativement grande de conjugués fluorescents, alors que les autres cellules ne présentent pas de fluorescence décelable.

— *Cellules de la tumeur C* 27 — Lors de l'incubation des cellules en présence d'albumine marquée par la fluorescéine, nous avons constaté un effet toxique très intense: les cellules se rétractent, prennent une forme globulaire et se détachent du verre. Plusieurs conjugués, préparés à partir de lots différents de fluorochrome, présentent la même toxicité alors que les cultures de cellules incubées avec l'albumine non fluorescente ont un aspect semblable à celui des cultures de contrôle.

Lorsque l'albumine est marquée par la lissamine rhodamine, les cellules semblent également altérées, dans une moindre mesure toutefois. A côté de cellules parfaitement étalées, au cytoplasme transparent, se trouvent des cellules rétractées, avec un cytoplasme granuleux, ou même globulaires avec de nombreuses vacuoles cytoplasmiques; seules ces cellules renferment des ponctuations flourescentes, groupées autour du noyau (Fig. 3).

Afin d'éviter l'effet toxique des conjugués, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence directe. Lorsque les cellules, incubées pendant 6 heures dans le milieu Eagle contenant 10% de sérum de veau et 5 mg/ml de sérumalbumine humaine, sont mises en contact, après fixation, avec une solution d'anticorps antisérumalbumine humaine fluorescents, elles ne présentent pas d'image de pénétration intracellulaire de la protéine. L'incubation dans le milieu sans sérum s'accompagne du même résultat. La diminution de la densité de la population

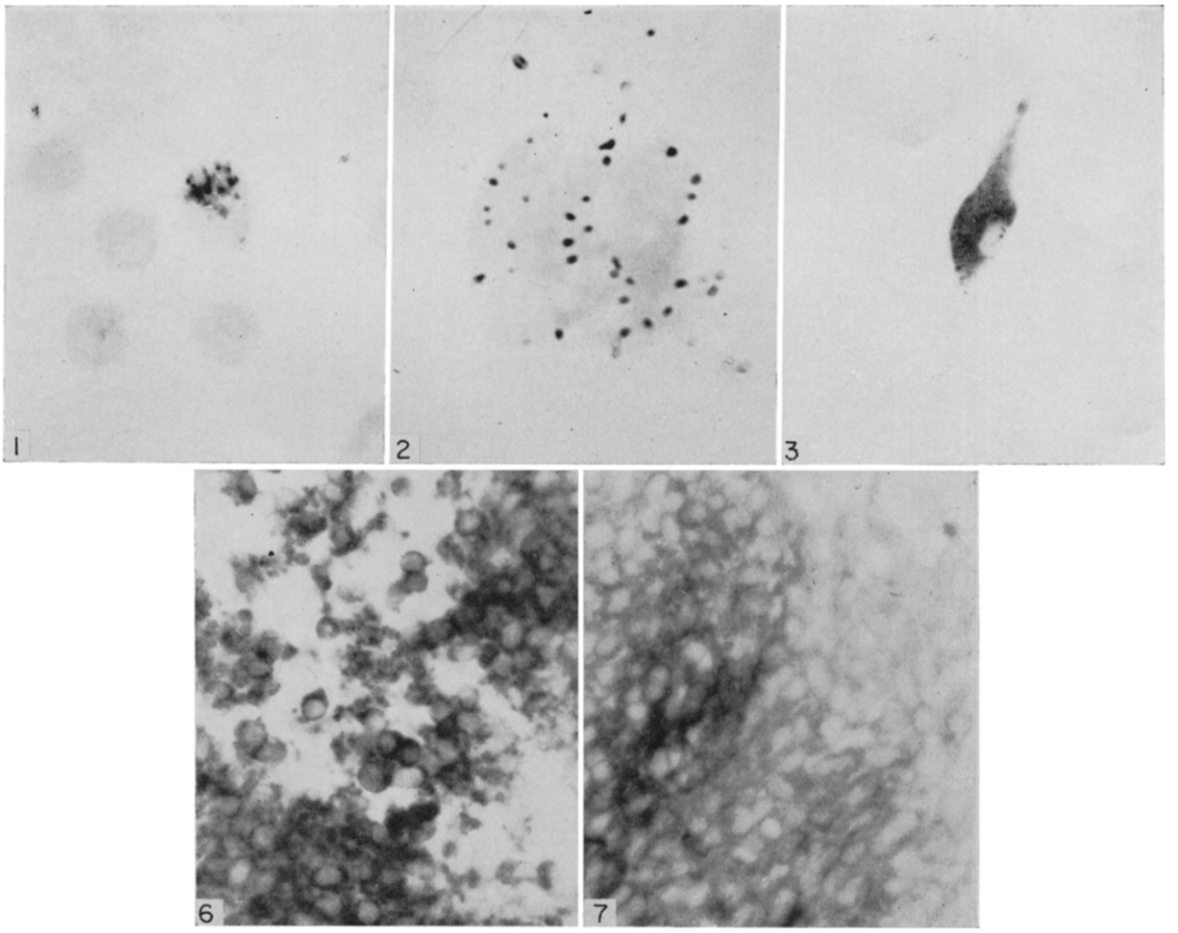


Fig. 1. *Absorption de l'albumine humaine fluorescente par les cellules ascitiques du sarcome de Yoshida* in vitro.
Image au microscope à fluorescence de cellules ascitiques fraîchement prélevées et incubées pendant une heure avec de l'albumine humaine fluorescente. La plupart des cellules ne présentent pas de fluorescence et sont à peine visibles. La cellules située au centre de la figure a absorbé la protéine, visible sous la forme de granulations noires localisées à une région du cytoplasme. Environ 300×.

Fig. 2. *Absorption de l'albumine humaine marquée par* I^{125} *par les cellules ascitiques du sarcome de Yoshida* in vitro.
Image autoradiographique d'une cellule ayant absorbé la protéine radiomarquée. Le nombre de grains correspondant à l'aire cellulaire est nettement plus élevé que dans le milieu environant. Environ 2.000×.

Fig. 3. *Absorption de l'albumine humaine marquée par la rhodamine par les cellules de la tumeur C* 27 in vitro.
Image au microscope à fluorescence d'une cellule ayant absorbé la protéine marquée, visible sous la forme de granulations noires dans le cytoplasme. Environ 300×.

Fig. 6. *Localisation de l'albumine dans la tumeur C*27 .
L'image au microscope à fluorescence représente une coupe de tumeur C 27, *transplantée chez la souris A/Sn, prélevée huit heures après l'injection i.v. de* 10 *mg de sérumalbumine humaine. La protéine, mise en évidence par immunofluorescence directe, apparaît en foncé sur la figure. Dans les régions nécrosées, l'albumine est parfois visible dans le cytoplasme cellulaire, sous la forme de croissants foncés. Environ* 200×.

Fig. 7. *Idem*
Dans les régions non nécrosées, l'albumine est située dans le milieu interstitiel, où elle délimite les contours cellulaires. Environ 200×.

(to face p. 114)

cellulaire n'entraine pas d'absorption décelable de la protéine par les cellules tumorales.

L'examen des autoradiographies des préparations incubées avec l'albumine marquée par I^{125} démontre également que les cellules de la tumeur C 27 n'absorbent pas de quantité appréciable d'albumine dans les conditions expérimentales utilisées.

— *Cellules du mastocytome P-815-X2* — Un effet toxique des conjugués fluorescents a été également constaté. La figure 4 présente les résultats du test de toxicité, obtenus avec deux conjugués d'albumine marqués par des quantités différentes de fluorescéine. Une expérience de contrôle démontre que la concentration cellulaire est trois fois plus élevée que la concentration initiale, après 24 heures d'incubation dans le milieu additionné de 2 mg/ml de sérumalbumine humaine. Le facteur de multiplication cellulaire atteint la même valeur lorsque le milieu renferme, en plus de l'albumine, 0,025 mg/ml de FITC libre. Une dose dix fois plus forte de FITC libre n'entraîne pas de diminution notable de la multiplication cellulaire. En revanche, l'adjonction au milieu de 1 mg/ml de sérum-albumine fluorescente s'accompagne d'un effet toxique manifeste, car aucune cellule n'est décelable 24 heures plus tard. La dilution du conjugué à plus de 1 : 5 permet d'obtenir un facteur de multiplication cellulaire supérieur à 2. La quantité de fluorescéine fixée sur la protéine ne semble pas jouer un rôle important, car la toxicité de deux conjugués, dont l'un possède 5 fois plus de fluorescéine que l'autre, ne dépend que de la concentration protéique.

L'examen par immunofluorescence directe des frottis de cellules incubées avec de l'albumine non fluorescente révèle que les cellules du mastocytome n'absorbent pas une quantité appréciable de cette protéine, quand bien même leur temps de génération, très court, doit nécessiter un apport azoté intense et rapide.

b. *Distribution de l'albumine* in vivo

Notre étude porte sur la distribution de l'albumine dans les principaux organes des animaux porteurs de la forme solide des tumeurs étudiées *in vitro*. Pour faciliter la comparaison entre les trois types de tumeurs, la distribution de l'albumine est mesurée chez les animaux au moment où le poids de la tumeur correspond à 10–15% du poids du corps.

— *Souris porteuses du mastocytome P-815-X2*. Le tableau 1 montre que, 24 heures après l'injection intraveineuse de l'albumine humaine radio-marquée, le pourcentage de la radioactivité injectée par gramme de tumeur atteint 0,89, tandis que les organes normaux étudiés renferment en moyenne 0,33% de la radio-activité injectée par gramme de tissu. Parmi les organes normaux, la rate a un pouvoir de fixation relativement élevé qui ne diffère pas de celui de la tumeur de façon significative ($p>0{,}05$). En revanche, le foie contient à peine plus de 1 o/oo de la radioactivité injectée par gramme de tissu. Les poumons, l'intestin (représenté par des portions de l'iléon et du côlon ascendant) et le muscle (prélevé dans la région fémorale) ont un pouvoir de fixation assez semblable. La perfusion des reins présente une certaine difficulté qui peut expliquer la variabilité des résultats concernant cet organe.

Comme le mode de préparation de l'albumine humaine par fractionnement à l'alcool du sérum peut provoquer une dénaturation de la protéine, nous avons étudié la distribution de l'albumine homologue après l'avoir isolée du sérum de la façon la plus ménageante possible. La fixation dans les organes des albumines homologue et hétérologue est comparée 24 heures après l'injection intraveineuse des protéines radio-marquées (Fig. 5). Les seules différences significatives concernent le foie et la rate; dans ce dernier organe, le pourcentage de la radioactivité injectée par gramme de tissu est environ deux fois plus faible après l'injection de l'albumine de souris. La fixation tumorale est semblable dans les deux cas, mais le rapport entre la radioactivité par gramme de tumeur et la radioactivité moyenne par gramme de tissu normal s'élève de 2,7 à 4,4 lorsque l'albumine homologue est injectée à la place de l'albumine humaine (Tableau 1).

— *Souris porteuses de la tumeur C 27* — La Fig. 8 montre que la radioactivité présente dans les organes normaux 24 heures après l'injection est très semblable à celle de la sixième heure. Par contre, la radioactivité intratumorale augmente dans ce même laps de temps et atteint 1,7% de la quantité injectée par gramme de tumeur. Lorsque la radioactivité de la tumeur est rapportée à celle des organes normaux, le rapport passe de 1,8 après 1 heure, à 3,2 après 6 heures et atteint 4,4 après 24 heures.

Par comparaison avec les résultats obtenus chez les souris DBA/2, les valeurs de radioactivité des organes normaux sont très semblables (Tableau 1). Les fixations splénique et hépatique de l'albumine de souris sont cependant plus élevées chez les

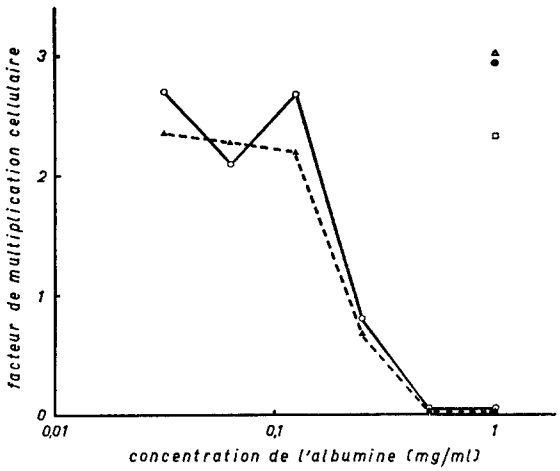


Fig. 4. Effet toxique de l'albumine fluorescente sur les cellules du mastocytome P-815-X2 en culture. Les cellules du mastocytome, au nombre de 1×10^5*, sont mises en culture dans 3,9 ml de milieu* [5]*, auquel est ajouté 0,1 ml de fluorescéine conjuguée à l'albumine humaine (FITC-SAH). En abscisse: concentration de l'albumine, en mg par ml de milieu. En ordonnée: rapport de la concentration cellulaire après 24 heures d'incubation à la concentration cellulaire au début de l'expérience. Préparations testées: conjugué FITC-SAH (1 mole FITC par mole SAH) ○; conjugué FITC-SAH (5 moles FITC par mole SAH) ▲; albumine humaine △; albumine humaine+FITC (0,025 mg/ml) ●; albumine humaine+FITC (0,05 mg/ml) □.*

souris A/Sn et atteignent les mêmes valeurs que celle de l'albumine humaine chez les souris DBA/2. La différence la plus importante concerne la radioactivité intratumorale qui est deux fois plus élevée dans la tumeur C 27 que dans le mastocytome P-815-X2.

— *Rats porteurs du sarcome de Yoshida* — Le pourcentage de la radioactivité injectée par gramme de tissu est déterminé 24 heures après l'injection intraveineuse d'albumine de rat. Les résultats sont analogues à ceux obtenus chez les souris. Le foie ne présente qu'une fixation très faible, alors que la radioactivité est deux fois plus élevée dans les poumons, l'intestin et le muscle, et atteint 1% dans la rate et le rein. Quant à la tumeur,

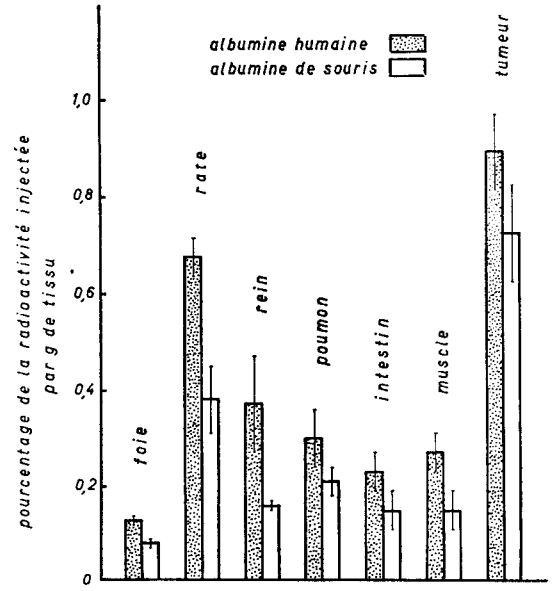


Fig. 5. Distribution de l'albumine marquée par I^{131}*, homologue ou hérérologue, dans divers organes de souris DBA/2 porteuses du mastocytome P-815-X2.*

Les souris, au dixième jour de transplantation sous-cutanée de 1 million de cellules de mastocytome, reçoivent par voie intraveineuse 1 mg d'albumine de souris radiomarquée (activité spécifique: 20 μC/mg) ou 1 mg d'albumine humaine radiomarquée (activité spécifique: 10 μC/mg) et sont sacrifiées 24 heures après l'injection. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de la radioactivité injectée par gramme de tissu mouillé perfusé. Les traits verticaux représentent l'erreur moyenne de la moyenne, calculée sur les résultats de 4 animaux.

Tableau 1. *Distribution de l'albumine radiomarquée dans les organes de souris porteuses de tumeurs*

Organe	Mastocytome P-815-X2		Tumeur C 27
	SAH	SAS	SAS
Foie	0,13±0,01	0,08±0,01	0,26±0,07
Rate	0,67±0,04	0,38±0,07	0,70±0,03
Rein	0,37±0,10	0,16±0,01	0,59±0,13
Poumon	0,30±0,06	0,21±0,03	0,19±0,04
Intestin	0,23±0,02	0,15±0,02	0,24±0,05
Muscle	0,27±0,04	0,15±0,04	0,28±0,05
Tumeur	0,89±0,08	0,72±0,010	1,67±0,32
Tumeur / Organes normaux	2,7	4,4	4,4

Les souris, porteuses du mastocytome P-815-X2 ou de la tumeur C 27 au dixième jour de transplantation sous-cutanée, reçoivent, par voie intraveineuse, 1 mg de protéine radiomarquée et sont sacrifiées 24 heures après l'injection. Les protéines marquées par I-131 (activité spécifique: 5–30 μC/mg) sont la sérumalbumine humaine (SAH) et la sérumalbumine de souris (SAS). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de la radioactivité injectée par gramme de tissu±l'erreur moyenne de la moyenne (nombre d'animaux par expérience: 4).

elle renferme 3% de la radioactivité injectée par gramme de tissu. Le rapport entre la radioactivité de la tumeur et celle des organes normaux est très semblable à celui obtenu chez les souris, puisqu'il est de 4,4.

c. *Localisation de l'albumine* in vivo. Cette étude a donné des résultats semblables, quelle que soit la tumeur solide étudiée. Huit heures après son injection, l'albumine a une localisation extravasculaire, d'autant plus apparente que les animaux sont abondamment perfusés avant l'excision des organes. La fluorescence est surtout visible dans le tissu conjonctif lâche: elle est particulièrement intense dans le chorion cutané. Dans le foie, il est impossible de mettre en évidence la présence de la protéine injectée alors que l'albumine se retrouve dans les cellules endothéliales des sinusoïdes ou dans les macrophages de la pulpe rouge splénique. Dans le cortex rénal, ni les glomérules, ni les cellules tubulaires ne présentent de fluorescence. L'albumine est visible dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins du poumon ou dans les macrophages de la paroi alvéolaire.

Dans la tumeur, la répartition de la fluorescence est inhomogène: certaines régions sont totalement dépourvues de protéines fluorescentes, alors que la région entourant certains vaisseaux présente une vive fluorescence. L'examen au microscope à fluorescence ne permet pas d'identifier avec certitude le type de cellules présentes dans cette région, mais il semble qu'il s'agisse surtout de macrophages. On note également une forte fluorescence dans les foyers de nécrose, où la protéine est disposée en foyers ou, de façon diffuse, dans le cytoplasme des cellules tumorales (Fig. 6). Dans les autres régions, l'albumine est détectable dans le tissu interstitiel où elle délimite les membranes cellulaires, mais le cytoplasme des cellules tumorales ne présente pas de fluorescence visible (Fig. 7).

DISCUSSION

Le problème de la nutrition des tumeurs a fortement capté l'attention des chercheurs, car le contraste impressionnant entre la croissance tumorale et la cachexie des cancéreux suggère que le tissu tumoral non seulement utilise de façon prioritaire les aliments exogènes, mais est susceptible d'extraire des tissus de l'hôte les éléments nécessaires à sa croissance [15, 16].

Au cours de l'étude de ce véritable parasitisme, plusieurs auteurs ont constaté que certaines tumeurs présentent une concentration élevée en protéines plasmatiques. Selon Busch et coll. [2], la sérumalbumine pénètre par pinocytose à l'intérieur des cellules tumorales sans hydrolyse extracellulaire préalable: l'importance de ce phénomène est tel qu'une tumeur solide peut capter par 24 heures 1.030 mg de protéines plasmatiques par gramme de protéines tumorales. La démonstration par immunofluorescence de la pénétration de protéines sériques dans les cellules de certaines tumeurs transplantables chez la souris et le rat a confirmé, dans une certaine mesure, les résultats obtenus par des méthodes isotopiques [17, 18]. Toutefois, des études microscopiques

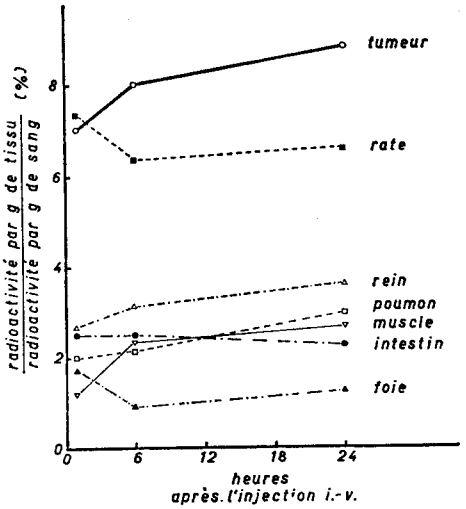


Fig. 8. Distribution de l'albumine de souris marquée par I^{131} dans divers organes de souris A/Sn porteuses de la tumeur C 27.
Les souris, au dixième jour de transplantation sous-cutanée de la tumeur C 27, recoivent par voie intraveineuse 1 mg d'albumine de souris radiomarquée (activité spécifique: 20 μC/mg) et sont sacrifiées 1, 6 et 24 heures après l'injection. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de la radioactivité injectée par g de tissu mouillé perfusé.

détaillées ont démontré que l'adsorption des protéines sur les sites intracellulaires de cellules endommagées ou sur les fragments de membrane de cellules détruites est beaucoup plus élevée que sur la surface des cellules intactes [19–21]. Il se peut donc que la très forte fixation *in vivo* de protéines radiomarquées par le tissu tumoral soit due surtout à une adsorption sur les cellules nécrosées. Ce phénomène pourrait expliquer les résultats contradictoires obtenus *in vitro*, où seulement 100.000 molécules d'albumine peuvent pénétrer dans une cellule tumorale en 2 heures, ce qui représente moins de 2,5 mg par gramme de protéines tumorales, par 24 heures [21, 22].

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* ne permettent pas de conclure à une absorption importante des protéines du milieu dans lequel sont cultivées les cellules tumorales. Afin de tester le pouvoir de pinocytose par différents types de cellules tumorales, nous avons choisi trois systèmes particuliers. Le sarcome de Yoshida est une tumeur ascitique qui ne prolifère pas en culture lorsque la concentration cellulaire dépasse $5 \cdot 10^5$ cellules/ml. Considérée pendant longtemps comme réticulo-endothéliale, l'origine de ce sarcome a été récemment mise en doute, et une origine épithéliale n'est pas exclue [23].

Les résultats de l'incubation des cellules ascitiques avec des protéines fluorescentes ont tout d'abord permis de préciser la nécessité d'un contrôle rigoureux de la viabilité cellulaire. Les cellules endommagées présentent soit une fluorescence diffuse du cytoplasme et du noyau, soit une adsorption intense des protéines fluorescentes à leur surface; ces images, signalées par d'autres auteurs [21, 24, 25] sont pratiquement absentes lorsque les cellules sont étudiées aussitôt après leur prélèvement. Dans ces conditions, 1 à 5% de la population renferment des granulations fluorescentes localisées à une région du cytoplasme, alors que les autres cellules ne présentent pas de fluorescence décelable. Un comportement semblable a déjà été signalé [24–26], mais les auteurs ne peuvent conclure si le faible pourcentage des cellules à pouvoir pinocytaire dérive des cellules normales qui contaminent le liquide ascitique ou représente une population cellulaire tumorale capable d'absorber une grande quantité de protéines. Grâce à l'examen autoradiographique des cellules ascitiques incubées en présence d'albumine marquée par I^{125}, nous avons déterminé que les cellules qui fixent la protéine sont bien des cellules tumorales. Mais il est impossible de vérifier si ces cellules ne présentent pas une activité pinocytaire à la suite d'une légère détérioration [27]. Quoi qu'il en soit, il est évident que la grande majorité des cellules n'absorbe pas de quantité appréciable de protéines. Les résultats sont qualitativement semblables après incubation avec de l'albumine ou des γG-globulines, homologues ou hétérologues, ou après injection des protéines fluorescentes dans la cavité péritonéale des animaux porteurs de la tumeur.

L'influence de la prolifération cellulaire sur la pinocytose a été étudiée avec la tumeur C 27, induite par le virus polyome. L'incubation, en présence d'albumine fluorescente, s'est accompagnée d'un effet toxique dont nous ignorons la cause. Le remplacement de la fluorescéine par la rhodamine a permis de constater que les cellules en voie de dégénérescence présentent une pinocytose relativement importante; cette constatation est à mettre en rapport avec les résultats démontrant l'absorption de la lipase du germe de blé par les cellules rénales en culture [28]: or, la préparation enzymatique contient une phospholipase cytotoxique, de telle sorte que la pinocytose induite par cette protéine est probablement associée à son activité enzymatique sur la surface cellulaire et à la mort de la cellule qu'elle provoque par la suite [26].

Lorsque le pouvoir de pinocytose des cellules C 27 est étudié par immunofluorescence, l'albumine humaine ne semble pas pénétrer à l'intérieur des cellules; cette constatation est confirmée par l'étude autoradiographique. L'incubation dans le milieu sans sérum ou la réduction de la densité cellulaire n'entraînent pas de stimulation de la pinocytose.

La vitesse de croissance cellulaire ne semble pas un facteur essentiel, car les cellules du mastocytome P-815-X2, bien que caractérisées par un temps de génération cellulaire très court (10–12 heures), n'absorbent pas de quantité appréciable de protéine *in vitro*. Ces résultats sont à interpréter en fonction des limites de la méthode d'immunofluorescence. La détection d'une protéine par les anticorps fluorescents nécessite tout d'abord une concentration protéique suffisante; l'accessibilité des déterminants antigéniques et leur intégrité sont également des conditions essentielles. Il est donc impossible d'exclure la pénétration d'une petite quantité d'albumine dans les cellules tumorales *in vitro*, mais ce phénomène ne semble pas être une propriété inhérente aux cellules tumorales. Au vu de l'ensemble des résultats connus à ce jour, il apparaît plutôt que la faculté d'absorber des protéines *in vitro* est une fonction propre à certains types de cellules, normales ou tumorales; il n'est pas exclu cependant que des méthodes plus sensibles ne révèlent le caractère plus général de la pinocytose de petites quantités de protéine par les cellules en culture.

Le comportement des cellules tumorales *in vitro* ne peut être appliqué sans autre considération à celui des tumeurs solides. L'étude de la distribution de l'albumine radiomarquée, chez les animaux porteurs de tumeurs, a montré que le pourcentage de la radioactivité injectée par gramme de tumeur augmente notablement au cours des 24 heures qui suivent l'injection intraveineuse de la protéine. Ce phénomène doit être assez général, puisqu'il s'est manifesté dans trois tumeurs d'origine très différente. Comme la radioactivité présente dans les organes normaux ne subit pas de modification importante entre la sixième et la vingt-quatrième heure, il en résulte que le rapport entre la radioactivité tumorale et celle des organes normaux ne cesse d'augmenter pendant ce laps de temps. Il est intéressant de noter que la valeur de ce rapport est très semblable dans les trois systèmes étudiés.

La fixation tumorale des albumines hétérologue et homologue est semblable, mais la radioactivité splénique des souris injectées avec l'albumine humaine est plus élevée que celle des souris ayant reçu de l'albumine de souris. Ce résultat est probablement à mettre en rapport avec la méthode de préparation de l'albumine humaine, plus drastique que celle utilisée pour préparer l'albumine de souris.

La valeur absolue de la fixation tumorale de l'albumine est difficilement comparable aux résultats obtenus dans des recherches analogues [2, 29–31], car l'expression des résultats varie d'un auteur à l'autre. La plupart de ces études font cependant état d'une radioactivité trois à cinq fois plus élevée dans la tumeur que dans les organes normaux.

La fixation tumorale de l'albumine peut expliquer la diminution du taux sérique de cette protéine que l'on rencontre souvent chez les animaux porteurs de tumeurs ou les cancéreux [32]. Toutefois, les données contradictoires concernant la cinétique de l'épuration sanguine de l'albumine chez les animaux porteurs de tumeurs ou les cancéreux [33, 34] ne permettent pas de juger l'importance de la diminution de la synthèse protéique ou de l'augmentation du catabolisme dans la genèse de l'hypoalbuminémie.

Dans la tumeur, l'albumine a une distribution inhomogène: fortement concentrée dans le voisinage des vaisseaux, la protéine est plus rare dans les autres régions. Sa localisation est essentiellement extracellulaire, sauf dans les régions de nécrose où le cytoplasme des cellules est fréquemment fluorescent. Il s'ensuit que les cellules tumorales n'absorbent pas l'albumine en quantité décelable par la technique utilisée.

Des résultats semblables ont été signalés par plusieurs auteurs [35, 36], mais il n'est pas exclu que certaines cellules tumorales puissent absorber des protéines *in vivo* [17, 18, 37].

Comme la pénétration intracellulaire de l'albumine n'est pas évidente, on peut se demander quelle est la raison de l'accumulation de la protéine dans la tumeur elle-même. Un premier facteur à considérer est la perméabilité des capillaires sanguins: il est possible que la diffusion extravasculaire des protéines sériques soit favorisée dans les tumeurs. Selon Day [38], les tumeurs manquent souvent d'une circulation artériolo-veineuse adéquate, nécessaire aux mécanismes d'échange liquidien entre milieux intra- et extravasculaire: la tumeur se comporterait comme une éponge, le liquide interstitiel augmentant par défaut de diffusion vers le milieu intravasculaire. Par comparaison avec le sort des protéines dans les organes normaux, qui regagnent indirectement la circulation sanguine en empruntant les voies lymphatiques, l'explication de l'accumulation des protéines dans le tissu tumoral est peut-être à rechercher dans le blocage ou l'inefficacité des capillaires lymphatiques chargés de draîner les protéines du milieu interstitiel. Il est possible également que les fibres du stroma tumoral présentent une affinité particulière pour les protéines [35].

Quelle que soit l'explication, la quantité de protéine accumulée dans le tissu conjonctif tumoral est en rapport direct avec le poids de la tumeur, mais ne dépend pas de sa vitesse de croissance [38]. La plupart des protéines sériques obéissent à cette règle, mais il est évident que la concentration intratumorale de l'albumine est plus élevée que celle des γG-globulines, étant donné sa faculté plus grande de traverser les capillaires sanguins. Il semble toutefois que l'accumulation tumorale de l'albumine présente une certaine spécificité, car le rapport entre la radioactivité tumorale et celle des organes normaux est un peu plus élevé avec l'albumine qu'avec la γG-globuline radiomarquée [30].

L'accumulation des protéines dans le tissu tumorale a été observée principalement dans les tumeurs transplantables. Elle ne semble pas évidente dans certains hépatomes [39], mais les données concernant les tumeurs spontanées font actuellement défaut. Chez l'homme, l'accumulation de protéines sériques a été signalée dans certaines tumeurs [40]. La fixation de l'albumine et des γG-globulines radiomarquées a été mesurée dans une série de tumeurs après excision chirurgicale [41]. Le pourcentage de la radioactivité injectée par gramme de tissu est semblable dans la tumeur et le tissu normal dont elle dérive, mais il faut noter que la radioactivité est mesurée dans les tissus non perfusés.

Même si l'albumine ne pénètre pas dans les cellules tumorales. elle peut constituer une source d'acides aminés pour la tumeur. Il est probable qu'une concentration locale d'enzymes protéolytiques existe dans le tissu interstitiel tumoral: une forte activité de cathepsine a été constatée dans le tissu périphérique du carcinome de Walker [43], alors que des cellules tumorales peuvent libérer des enzymes protéolytiques *in vitro* [43]. La présence de telles enzymes dans le milieu intercellulaire tumoral [44] est étayée par la constatation que, une heure après l'injection intraveineuse d'albumine humaine marquée par I^{131} à des souris porteuses d'épendymoblastome, 64% de la radioactivité présente dans la fraction non particulaire de la tumeur sont solubles dans l'acide trichloracétique [31]. Cette dégradation protéique est aussi rapide que celle qui intervient au niveau du foie après injection d'albumine dénaturée [45].

Un autre mécanisme d'utilisation de l'albumine par les tumeurs a été proposé: les produits terminaux du catabolisme protéique seraient des dérivés d'acides aminés susceptibles d'être réincorporés directement dans la synthèse des protéines cellulaires [46, 47]. La découverte dans la fraction mitochondriale de l'hépatome de Novikoff d'un système enzymatique capable de dégrader l'albumine *in vitro* [48] indique que le catabolisme de cette protéine peut être intracellulaire. Cette importante constatation implique également que, suivant la rapidité de l'hydrolyse, la protéine ne peut être mise en évidence à l'intérieur des cellules à l'aide de méthodes basées sur l'intégrité de la molécule protéique.

On comprend aisément que l'accumulation tumorale de l'albumine ait suggéré l'utilisation de cette protéine comme transporteur d'agents cytostatiques [2, 49–53]. Le médicament peut être fixé à la protéine par une liaison chimique. Comme il doit être libéré de son support protéique pour exercer son activité, il est nécessaire de recourir à une liaison susceptible d'être scindée au moment opportun [51]. Une autre possibilité consiste à utiliser un médicament capable d'être fortement adsorbé par l'albumine. Dans ce cas, l'administration d'une dose juste suffisante pour saturer l'albumine *in vivo* s'accompagnerait peut-être d'une diminution des effets secondaires toxiques [51].

Les résultats de notre propre étude font l'objet d'autres communications [50, 54], mais il apparaît que la fixation de quelques molécules de médicament sur une molécule d'albumine suffit à modifier la distribution de la protéine dans les organes normaux [50, 52, 53, 55]. C'est pourquoi il nous semble que plusieurs

points essentiels sont à étudier avant tout essai thérapeutique. L'un d'eux a trait à l'induction de la pinocytose chez les cellules animales, car les conditions dans lesquelles les cellules répondent à divers agents inducteurs sont loin d'être clairement définies. Parmi les substances qui stimulent la pinocytose de certains types de cellules, il faut noter l'insuline [56], le glucose [57], les histones et les composés polyazotés tels que la polylysine et la protamine [58]. Ces divers résultats, trop fragmentaires, ne permettent pas de déterminer si un inducteur agit sur toutes les cellules. Un autre point important à considérer est la quantité d'albumine dégradée par jour, car il est évident qu'un médicament fixé à cette protéine est libéré lors de l'hydrolyse de cette dernière. Lorsque l'on sait que 25 mg d'albumine sont catabolisés par jour chez une souris de 25 g [59], on conçoit que l'endroit où la protéine est dégradée présentera une concentration relativement élevée de médicament, si le conjugué est catabolisé de la même manière que la protéine native. Le lieu de dégradation des protéines sériques n'est pas encore défini avec précision [60, 61]: l'intestin grêle semble responsable du catabolisme de deux tiers de la quantité d'albumine dégradée par jour, l'estomac d'un dixième ou moins [62]. Quinze pour cent du catabolisme interviennent dans le foie [6, 63], alors que ni le rein [64], ni le système réticulo-endothélial [65, 66] ne semblent participer à la dégradation de l'albumine.

En conclusion, l'ensemble de nos observations met en évidence la complexité du problème du transport des agents anticancéreux par les protéines sériques. Les obstacles essentiels à l'emploi de cette voie thérapeutique sont liés à la faible accumulation des protéines dans le tissu tumoral d'une part, et à la phagocytose de ces protéines par les éléments du système réticulo-endothélial à la suite de leur couplage chimique à des médicaments d'autre part.

Remerciements — Les auteurs remercient vivement les Docteurs T. Brunner, R. Schindler et N. Odartchenko, de l'Institut Suisse de Recherches Expérimentales sur le Cancer (Lausanne), et les Docteurs G. Magnenat et J. C. Jaton, de l'Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne, de leur précieuse collaboration. Ils expriment également leur reconnaissance à Madame B. Cerottini et à Mademoiselle A.-L. Peitrequin, dont l'aide technique a été très appréciée.

RESUME

Quelques aspects des différents problèmes soulevés par l'utilisation des protéines sériques comme transporteurs d'agents antitumoraux ont été étudiés.

La pénétration intracellulaire de la sérumalbumine a été suivie dans trois systèmes in vitro. *A l'aide de protéines fluorescentes ou marquées par I^{125}, et de la méthode d'immunofluorescence, il a été démontré qu'un faible pourcentage des cellules ascitiques de la tumeur de Yoshida absorbe des protéines* in vitro. *Les cellules de la tumeur C 27, induite par le virus polyome, ou les cellules du mastocytome P-815-X2 ne présentent pas ce phénomène* in vitro, *lorsque l'intégrité cellulaire est rigoureusement contrôlée.*

Lorsque la distribution de l'albumine radiomarquée est suivie dans certains organes des souris ou des rats porteurs de la forme solide des trois tumeurs citées plus haut, la concentration intratumorale de la protéine augmente au cours des vingt-quatre premières heures et atteint une valeur quatre à cinq fois plus élevée que dans les organes normaux étudiés. Dans la tumeur, l'albumine a une localisation essentiellement extra-cellulaire. Répartie de façon inhomogène, la protéine est présente dans les régions qui entourent certains vaisseaux et dans les foyers de nécrose, où sa situation est quelquefois intra-cellulaire.

Les obstacles essentiels à l'emploi des protéines comme transporteurs d'agents cytostatiques sont passés en revue.

SUMMARY

Certain plasma proteins have been shown to be taken up more rapidly by tumors than by normal tissues. The possibilities to use such proteins as vehicles for cytostatic agents have been investigated.

The intracellular penetration of serum albumin has been studied in three systems. Using fluorescent proteins or proteins labeled with I^{125}, it has been shown that a small percentage of ascites cells of a Yoshida tumor will absorb albumin in vitro. *In contrast, the cells of the tumor C 27 induced by polyoma virus or the cells of the mastocytoma P-815-X2 do not show this phenomenon* in vitro *as long as the integrity of the cells is maintained and rigorously controlled.*

When the distribution of I^{125}-labeled albumin is studied in certain organs of tumour-bearing mice or rats (solid form of the 3 tumours mentioned above), the intratumoral concentration of the protein increases during the first 24 hr to reach values which are 4 to 5 times higher than those obtained in normal organs. The albumin taken up by the tumor has essentially an extracellular localization. It is distributed in a non-homogeneous manner, essentially at the proximity of certain vessels and in necrotic areas. In the latter its location may also be intracellular.

The main difficulties inherent to methods which propose proteins as vehicles of cytostatic agents for therapeutic purposes are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Bestimmte Serumeiweisse haben die Eigenschaft, sich in Tumoren in höherem Masse anzureichern als in normalen Geweben. Die Möglichkeiten, solche Eiweisse als Träger von Cytostatika für therapeutische Zwecke zu verwenden, wurden untersucht.

Die intrazelluläre Aufnahme von Serumalbumin wurde an Hand dreier Systeme in vitro *verfolgt. Mit Hilfe von fluoreszierenden oder I^{125}-markierten Eiweissen und der Methode der Immunofluoreszenz konnte gezeigt werden, dass ein geringer Anteil der Ascites-Zellen eines Yoshida-Tumors Proteine* in vitro *fixiert. Die Zellen eines durch Polyoma-Virus induzierten Tumors (C 27), sowie die Zellen des Mastocytoms P-815-X2 nehmen* in vitro *keine Proteine auf, vorausgesetzt, dass die Integrität der Zelle gewahrt ist.*

Die Verteilung von I^{125}-markiertem Albumin wurde in bestimmten Organen von Tumor-tragenden Mäusen oder Ratten (solide Formen der drei obgenannten Tumoren) untersucht. Die intratumorale Konzentration des Eiweisses nimmt im Laufe der ersten 24 Stunden zu, und erreicht einen Wert, der die Konzentration in normalen Organen um das 4-bis 5-fache übersteigt. In diesen Versuchen zeigt das injizierte Albumin im Tumor eine vorwiegend extrazelluläre Verteilung. Das Eiweiss befindet sich vor allem in der Nähe bestimmter Gefässe, sowie in nekrotischen Bereichen. In den letzteren kann seine Lokalisierung auch intrazellulär sein.

Die Hauptschwierigkeiten, die sich einer Therapie mit an Eiweissen gekuppelten Cytostatika entgegensetzen, werden diskutiert.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. L. Babson et T. Winnick, Protein transfer in tumor-bearing rats. *Cancer Res.* **14,** 606 (1954).
2. H. Busch, E. Fujiwara et D. C. Firszt, Studies on the metabolism of radioactive albumin in tumor-bearing rats. *Cancer Res.* **21,** 371 (1961).
3. H. Busch et H. S. N. Greene, Studies on the metabolism of plasma proteins in tumor-bearing rats. *Yale J. Biol. Med.* **27,** 339 (1955).
4. H. Busch, S. Simbonis, C. D. Anderson et H. S. N. Greene, Studies on the metabolism of plasma proteins in tumor-bearing rats. II. Labeling of intracellular particulates of tissues by radioactive albumin and globulin. *Yale J. Biol. Med.* **29,** 105 (1956).
5. R. Schindler, M. Day et G. A. Fischer, Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine *in vitro*. *Cancer Res.* **19,** 47 (1959).
6. S. Cohen et A. H. Gordon, Catabolism of plasma albumin by the perfused rat liver. *Biochem. J.* **70,** 544 (1958).
7. A. S. McFarlane, Efficient trace-labeling of proteins with iodine. *Nature (Lond.)* **182,** 52 (1958).
8. V. Bocci, Efficient labeling of serum proteins with I^{131} using chloramine T. *Int. J. appl. Radiat.* **15,** 449 (1964).
9. H. Rinderknecht, Ultra-rapid fluorescent labeling of proteins. *Nature (Lond.)* **193,** 167 (1962).
10. J. D. Marshall, W. C. Eveland et C. V. Smith, Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody technic with a modification of its application. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **98,** 898 (1958).
11. J. C. Cerottini et T. Webb, Preparation and use of specifically purified antibodies for immunofluorescent labeling. *Acta Histochem.* (sous presse).
12. R. Schrek, A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Am. J. Cancer* **28,** 389 (1936).

13. O. ERIKSSON, Method for cytological detection of cancer cells in blood. *Cancer* **15,** 171 (1962).
14. G. SAINTE-MARIE, A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* **10,** 250 (1962).
15. G. COSTA, Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. *Progr. exp. Tumor Res. (Basel)* **3,** 321 (1963).
16. J. F. HENDERSON et G. A. LE PAGE, The nutrition of tumors: a review. *Cancer Res.* **19,** 887 (1959).
17. S. COHEN, S. M. BEISER et K. H. HSU, Immunohistochemical study of the uptake of serum proteins by neoplastic liver cells. *Cancer Res.* **21,** 1510 (1960).
18. T. GHOSE, R. C. NAIRN et J. E. FOTHERGILL, Uptake of proteins by malignant cells. *Nature (Lond.)* **196,** 1108 (1962).
19. A. H. COONS, E. H. LEDUC et M. M. KAPLAN, Localization of antigens in tissue cells. VI. The fate of injected foreign proteins in the mouse. *J. exp. Med.* **93,** 173 (1951).
20. R. E. MANCINI, O. VILAR, J. M. DELLACHA, O. W. DAVIDSON, C. J. GOMEZ et B. ALVAREZ, Extravascular distribution of fluorescent albumin, globulin and fibrinogen in connective tissue structures. *J. Histochem. Cytochem.* **10,** 194 (1962).
21. H. RYSER, The measurement of I^{131} serum albumin uptake by tumor cells in tissue culture. *Lab. Invest.* **12,** 1009 (1963).
22. H. RYSER, J. C. AUB et J. B. CAULFIELD, Studies on protein uptake by isolated tumor cells. II. Quantitative data on the absorption and uptake of I^{131} serum albumin by Ehrlich ascites tumor cells. *J. Cell Biol.* **15,** 437 (1962).
23. T. YOSHIDA, H. ISAKA et H. SATOH, Problems of the origin of Yoshida sarcoma *Arzneimittel-Forsch.* **14,** 735 (1964).
24. H. HOLTZER et S. HOLTZER, The *in vitro* uptake of fluorescein labeled plasma proteins. I. Mature cells. *C.R. Lab. Carlsberg* **31,** 373 (1960).
25. E. MOELLER et G. MOELLER, Quantitative studies of the sensitivity of normal and neoplastic mouse cells to the cytotoxic action of isoantibodies. *J. exp. Med.* **115,** 527 (1962).
26. G. C. EASTY, M. M. YARNELL et R. D. ANDREWS, The uptake of proteins by normal and tumour cells *in vitro*. *Brit. J. Cancer* **18,** 354 (1964).
27. D. THOMASON et R. SCHOFIELD, The uptake of ^{131}I-tagged protein by Ehrlich ascites tumour cells. *Exp. Cell Res.* **24,** 457 (1961).
28. D. H. CORMACK, G. C. EASTY et E. J. AMBROSE, Interaction of enzymes with normal and tumour cells. *Nature (Lond.)* **190,** 1207 (1961).
29. R. HIRAMOTO et W. J. NUNGESTER, Penetration of serum globuline into mouse tumors. *Cancer Res.* **18,** 27 (1958).
30. R. G. LONG, J. G. MCAFEE et J. WINKELMAN, Evaluation of radioactive compounds for the external detection of cerebral tumors. *Cancer Res.* **23,** 98 (1963).
31. J. L. MEGO et J. D. MCQUEEN, The uptake of labeled proteins by particulate fractions of tumor and normal tissues after injection into mice. *Cancer Res.* **25,** 865 (1965).
32. R. W. BEGG, Tumor-host relations. *Adv. Cancer Res.* **5,** 1 (1958).
33. J. HRADEC, Metabolism of serum albumin in tumor-bearing rats. *Brit. J. Cancer* **12,** 290 (1958).
34. J. L. STEINFELD, I^{131} albumin degradation in patients with neoplastic diseases. *Cancer* **13,** 974 (1960).
35. G. C. EASTY, The uptake of fluorescent labeled proteins by normal and tumour tissues *in vivo*. *Brit. J. Cancer* **18,** 368 (1964).
36. M. R. KRIGMAN et E. E. MANUELIDIS, Distribution of fluorescent tracers in heterologously transplanted intracerebral tumors. *Cancer Res.* **24,** 1749 (1964).
37. C. H. TATOR et J. OLSZEWSKI, Factors responsible for the distribution of radioactivity in a mouse glioma and brain after injection of radio-iodinated human serum albumin (RIHSA). *Cancer Res.* **26,** 1569 (1966).
38. E. D. DAY, Vascular relationships of tumor and host. *Progr. exp. Tumor Res. (Basel)* **4,** 57 (1964).
39. E. D. DAY, J. A. PLANINSEK et D. PRESSMAN, Localization of radioiodinated antibodies in rats bearing tumors induced by N-2-fluorenylacetamide. *J. nat. Cancer Inst.* **25,** 787 (1960).
40. W. RAPP, S. B. ARONSON, I. KUSHNER, P. BURTIN et P. GRABAR, Les antigènes de la muqueuse gastrique cancéreuse humaine. *IVth Int. Symp. Immunopathology.* P. GRABAR et P. MIESCHER (Editors). Schwabe, Basel (1966).

41. E. D. Day et A. Ozarda, Extent of nonspecific background localization of radioiodinated serum proteins in human tumor and normal tissues. *J. nat. Cancer Inst.* **23,** 1477 (1959).
42. G. Benz et F. E. Lehmann, Das Verhalten gewebseigener Proteasen aus normalen und malignen Geweben der Ratte. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **17,** 380 (1959).
43. B. Holmberg, On the *in vitro* release of cytoplasmic enzymes from ascites tumor cells as compared with strain L cells. *Cancer Res.* **21,** 1386 (1961).
44. B. Sylven et I. Bois-Svensson, On the chemical pathology of interstitial fluid. I. Proteolytic activities in transplanted mouse tumors. *Cancer Res.* **25,** 458 (1965)
45. J. L. Mego et J. D. McQueen, The uptake and degradation of injected labeled proteins by mouse liver particles. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **100,** 136 (1965
46. N. W. Penn, The requirement for serum albumin metabolism in subcellular fractions of liver and brain. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **37,** 55 (1960).
47. N. V. Penn, Metabolism of the protein molecule in a rat-liver mitochondrial fraction. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **53,** 490 (1961).
48. N. W. Penn, The catabolism of added serum albumin by a mitochondrial fraction from the Novikoff hepatoma. *Cancer Res.* **22,** 388 (1962).
49. F. Bergel, J. A. Stock et R. Wade, Peptides and macromolecules as carriers cytotoxic groups. *Biological Approaches to Cancer Chemotherapy*, p. 125. Academic Press, New York (1961).
50. J. C. Cerottini et H. Isliker, Etude des possibilités d'utilisation de la sérum-albumine comme transporteur d'agents antitumoraux. *Helv. physiol. Acta* **24,** C13 (1966).
51. H. Isliker, J. C. Cerottini, J. C. Jaton et G. Magnenat, Specific and non-specific fixation of plasma proteins in tumors. *Chemotherapy of Cancer*, p. 278. P. A. Plattner (Editor). Elsevier, Amsterdam (1964).
52. J. L. Mego et J. D. McQueen, The uptake of As^{74}-labeled arsonoazoproteins in tissues of tumor-bearing mice. *Cancer Res.* **23,** 523 (1963).
53. W. C. Starbuck et H. Busch, Effects of hydroxyethylation on the uptake of rat albumin by tissues of the tumor-bearing rat. *Cancer Res.* **22,** 1206 (1962).
54. J. C. Cerottini et G. Magnenat, Resultats a publier.
55. J. C. Jaton, J. C. Cerottini et H. Isliker, Cinétique de l'épuration sanguine et distribution chez la souris de médicaments fixés à des protéines. *Helv. Physiol.* **23,** C97 (1965).
56. R. J. Barnett et E. G. Ball, Metabolic and ultrastructural changes induced in adipose tissue by insulin. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8,** 83, (1960).
57. H. Wrba, Die Wirkung von Glucose auf die Aufnahme von hochmolekularen Partikeln durch Tumorzellen *in vitro*. *Z. Krebsforsch.* **63,** 415, (1960).
58. H. Ryser et R. Hancock, Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. *Science* **150,** 501 (1965).
59. J. L. Fahey et A. G. Robinson, Factors controlling serum γ-globulin concentration. *J. exp. Med.* **118,** 845 (1963).
60. F. B. Armstrong, S. Margen et H. Tarver, Plasma proteins. VII. Site of degradation of serum albumin. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **103,** 592 (1960).
61. S. Fleischer, A. Litze, H. Walter et F. Haurowitz, Conversion of serum proteins into tissue proteins. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **101,** 860 (1959).
62. J. Wetterfors, The normal passage of serum-albumin into the gastrointestinal tract and its role in the catabolism of albumin. *Acta med. scand.* **176,** 787 (1964).
63. A. H. Gordon, The catabolic rate of albumin doubly labeled with ^{131}I and ^{14}C in the isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* **82,** 531 (1962).
64. S. Rosenfeld, J. Katz et A. L. Sellers, Effect of nephrectomy on ^{131}I-albumin turnover in the dog. *J. Lab. clin. Med.* **59,** 381 (1962).
65. T. Freeman, A. H. Gordon et J. H. Humphrey, Distinction between catabolism of native and denatured proteins by the isolated perfused liver after carbon loading. *Brit. J. exp. Path.* **39,** 459 (1958).
66. G. J. Thorbecke, M. Sebestyen, B. Benacerraf et H. Green, Influence of reticulo-endothelial blockade on the turnover rate of homologous plasma proteins in mice. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 99, 439 (1958).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 125–137. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Chemotherapy of Tumours Transplanted Intracerebrally*

R. ROSSO, M. G. DONELLI, I. REYERS-DEGLI INNOCENTI and S. GARATTINI
Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" Via Eritrea, 62, Milano, Italy

INTRODUCTION

PREVIOUS work reported a different sensitivity to chemotherapy of a tumour transplanted in different sites [1]. Continuing along that line of studies, a method to transplant tumours into the brain was recently described [2].

A uterine epithelioma (T^8 Guérin) [3] in rats and Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma in mice [4] were found particularly suitable for a rapid growth, proportional to the number of cells transplanted intracerebrally.

The present paper is intended to summarize the effect of various chemotherapeutic agents on these intracerebral tumours and for comparison on the same tumours transplanted subcutaneously or intraperitoneally.

MATERIALS AND METHODS

Male Sprague-Dawley rats of the average weight of 150 ± 10 g and female Swiss mice (20 ± 2 g) were used. The animals had free access to food (Diet ALAL 56 of Alal Firm) and water during the experiments. All animals were kept at a room temperature of 22°C with a relative humidity of 60 per cent in cages of Makrolon (cm $20 \times 26 \times 13$ for ten mice) (cm $47 \times 25 \times 15$ for six rats). The technique for transplanting the tumours of rats and mice intracerebrally has been previously described [2–4].

In the rat, the tested tumour was the uterine epithelioma T_8 of Guérin maintained in our strains of rats subcutaneously in the solid form for more than 150 passages. In the mouse, the tumour tested were Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180, maintained in ascites form for more than 200 passages. The number of cells was determined with a Coulter Counter mod. D; the volume was 0·01 ml for intracerebral transplantation and 0·2 ml for subcutaneous and intraperitoneal transplantation.

Three schedules of treatment were followed: administration of drugs started 10 min before the intracerebral transplantation of the tumour or 4 or 7 days later and was usually performed intraperitoneally, daily, for 6 days or intracerebrally in a single dose.

The doses used for each drug represent given fractions of the LD_{50}, calculated after 6 days of treatment and are reported in the Tables. In some experiments the whole LD_{50}, calculated as above mentioned, was administered i.p. only for two successive days.

The LD_{50} of the drugs under test are summarized in Table 1. The count of leucocytes was performed the day following the last treatment by means of an electronic counter (Coulter Counter Ltd.).

The increase of survival time was the main parameter used to evaluate the effect of treatment for animals bearing an intracerebral or an intraperitoneal tumour. In the animals bearing a subcutaneous tumour the effect of drugs was evaluated mainly by weighing the tumour.

RESULTS

(1) *Efficacy of 1-methyl-1-nitrosourea (MNU)*

Table 2 reports the efficacy of different doses

*This work was supported by Euratom (Contract 040-65-I-BIOI) and by Consiglio Nazionale delle Ricerche (Contract No. 115/1134/1000).

Table 1. LD50 *of the various antitumoural drugs in rats and mice*

Compound	Source	LD50 mg/kg i.p. × 6 days	
		Rat	Mouse
Actinomycin D	CCNSC	0·05	0·11
Cytoxan	Asta-Werke	48	255
DL-Sarcolysine	CCNSC	12·6	12·6
D.O.N.	CCNSC	0·45	—
Mannitol mustard	Medimpex	30·0	80·0
N,N bis (2-chloroethyl) glycine HCl	CCNSC	5·4	—
Methotrexate	CCNSC	1·02	5·56
Vinblastine	Lilly	0·34	1·17
Vincristine	Lilly	—	0·94
Vinleurosine	Lilly	3·85	—
1-Methyl-1-nitrosourea (MNU)	CCNSC	53·0	48·0
1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)	CCNSC	22·7	66·0
Hydroxyurea	GECA	>500	>500
Ethylcarbamate	CCNSC	>500	>500
N-methyl-N-nitroso-N-nitroguanidine (MNG)	CCNSC	—	28·7
N-buthyl-N-nitroso-guanidine (BNG)	Fluka	—	300
N-nitroso-p-toluen-sulphonamide (NTS)	Montecatini	—	450
Urea	Erba	—	>1000

of MNU, representing various fractions of the LD50 (see Table 1), given at different times before or after the transplantation of both Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma into the brain. MNU shows a well reproducible increase of the survival time even when a high number of cancer cells is transplanted intracerebrally. MNU was effective, although to a lesser extent, also on an uterine epithelioma (T_8 Guérin) transplanted into the brain (Table 8). In contrast with these results, MNU was inactive or only slightly active on the survival time of Sarcoma 180 or Ehrlich carcinoma transplanted subcutaneously (Table 6) or intraperitoneally (Table 7).

Decreasing the inoculum to 100,000 cells the survival time of animals bearing Sarcoma 180 in the ascites form was prolonged by the treatment with MNU. However, this effect was evident only when the treatment started 10 min before or 4 days after the transplantation. For comparative purposes, MNU was also given to animals implanted subcutaneously with Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma (Table 5), and uterine epithelioma (Table 9). The tumour weight was not affected by this treatment when the number of cells implanted was according to standard methods. However, when the number of cells decreased the growth of the subcutaneous tumour in the control animals was slow, scattered and unpredictable.

(2) *Efficacy of MNU analogs*

Several compounds structurally related to MNU were tested either on Sarcoma 180 or Ehrlich carcinoma transplanted intracerebrally. Table 3 shows that urea, ethylcarbamate, methylnitrosonitroguanidine (MNG), buthylnitrosoguanidine (BNG), N-nitroso p-toluensulphonamide (NTS) are inactive while hydroxyurea was only slightly effective. The bischloroethyl derivative of MNU (BCNU) was quite active on the intracerebral Sarcoma 180.

(3) *Efficacy of known antitumoural drugs*

None of the tested drugs including Cyclophosphamide, DL-Sarcolysine, Mannitol mustard, Actinomycin D, Methotrexate, Vinblastine and Vincristine given at 1/6 of the LD50 showed any effect either on the intracerebral Sarcoma 180 or Erhlich carcinoma (Table 4). In contrast, as it is well known, cyclophosphamide and DL-Sarcolysine were able to decrease the growth of both tumours transplanted subcutaneously (Table 5) or intraperitoneally (Table 7). DL-Sarcolysine showed a marked effect on the growth of uterine epithelioma transplanted subcutaneously (Table 9), but only a moderate effect on the same tumour transplanted intracerebrally (Table 8).

DISCUSSION

The experimental results obtained in this investigation demonstrate that the sensitivity of tumours to chemotherapy may change in relation to the site of transplantation. 1-Methyl-1-nitrosourea (MNU) shows, in fact, a clear effect in different experimental conditions, in decreasing the survival time of tumours

Table 2. Effect of different doses and schedules of treatment with MNU on the survival time of mice bearing an intracerebral Sarcoma 180 or Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	%Leucocytes relative to controls at the end of treatment	*p*	Survival time (days+S.E.) Controls	Survival time (days+S.E.) Treated	% Increase of survival time	*p*
Sarcoma 180	1,000,000	16	6	1*			10·1±0·3	15·0±0·9	48	<0·01
		16	6	4				9·9±0·3	—	NS
		16	6	7				11·0±0·3	9	NS
		8	6	1*				13·9±0·5	31	<0·01
		8	6	4				13·1±0·5	30	<0·01
		8	6	7				10·8±0·6	7	NS
		4	6	1*				12·0±0·4	19	>0·01 <0·02
		4	6	4				11·1±0·5	10	NS
		4	6	7				9·9±0·5	—	NS
Sarcoma 180	100,000	48	2	1			13·5±0·4	17·8±1·8	32	<0·01
		48	2	4	69±3	>0·01 <0·02		15·7±0·6	16	<0·01
		48	2	7				15·0±0·9	11	<0·01
		16	6	1*	27±2	<0·01	15·9±0·4	21·1±1·5	32	<0·01
		16	6	4	35±2	<0·01		17·8±0·8	11	>0·02 <0·05
		16	6	7	43±7	<0·01		18·2±0·6	14	<0·01
		8	6	1*	47±2	<0·01		18·5±0·6	16	<0·01
		8	6	4	60±6	>0·01 <0·02		19·3±0·8	21	<0·01
		8	6	7	64±7	=0·02		19·3±1·2	21	<0·01
		4	6	1*	80±5	NS		17·9±0·4	12	>0·01 <0·02
		4	6	4	69±10	=0·02		18·5±0·5	16	<0·01
		4	6	7	70±6	>0·02 <0·05		17·8±0·5	11	<0·01
Sarcoma 180	1,000	48	2	1			22·6±0·6	31·3±3·4	38	<0·01
		48	2	4				24·8±1·7	10	NS
		48	2	7				24·8±1·7	10	NS
		16	6	1*			23·2±0·6	31·0±2·5	33	<0·01
		16	6	4				29·3±0·9	26	<0·01
		16	6	7				28·4±1·1	22	<0·01
		8	6	1*				30·9±0·8	33	<0·01
		8	6	4				26·5±0·9	14	=0·02
		8	6	7				24·9±1·7	7	NS
		4	6	1*				26·5±0·9	14	>0·02 <0·05
		4	6	4				26·1±0·8	12	NS
		4	6	7				25·3±0·5	9	=0·05
Ehrlich carcinoma	100,000	16	6	1*	31±2	<0·01	14·4±0·3	21·1±0·3	46	<0·01
		16	6	4	57±5	<0·01		17·7±0·7	22	<0·01
		16	6	7	32±2	<0·01		15·9±0·7	10	NS
		8	6	1*	48±3	<0·01		19·1±0·7	32	<0·01
		8	6	4	87±5	NS		18·8±0·6	30	<0·01
		8	6	7	58±5	<0·01		18·0±0·4	25	<0·01

(*Continued on next page*)

(*Continued from previous page*)

		4	6	1*	78±6	=0·01		17·1±0·5	18	=0·05
		4	6	4	90±1	NS		16·6±0·6	15	NS
		4	6	7	75±10	NS		16·4±0·6	13	=0·02
Ehrlich carcinoma	1,000	16	6	1*	31±2	<0·01	24·3±0·9	26·1±1·2†	7	NS
		16	6	4	41±3	<0·01		37·4±2·9†	53	<0·01
		16	6	7	37±1	<0·01		30·5±1·3	25	<0·01
		8	6	1*	51±3	=0·02		37·2±1·0	53	<0·01
		8	6	4	53±3	<0·01		30·3±0·8	24	<0·01
		8	6	7	62±2	>0·02 <0·05		27·3±1·0	12	>0·01 <0·02
		4	6	1*	74±5	NS		36·7±1·8	51	<0·01
		4	6	4	73±2	>0·02 <0·05		27·0±0·7	11	NS
		4	6	7	72±1	>0·02 <0·05		28·8±1·2	18	>0·01 <0·02

*10 min before transplantation.
†Marked decrease of body weight.
Each experimental group is represented by at least 10 animals.

Table 3. Effect of different analogs of MNU on the survival time of mice bearing an intracerebral Sarcoma 180 or an Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	Survival time (days+S.E.) Controls	Survival time (days+S.E.) Treated	% Increase of survival time	*p*
Sarcoma 180	100,000	BCNU	22	6	1*	15·3±0·6	20·1±0·8	31	<0·01
			22	6	4	14·7±0·6	21·5±1·3	46	<0·01
			22	6	7	14·9±0·5	22·5±1·2	51	<0·01
			11	6	1*	15·3±0·6	16·9±0·2	10	>0·01 <0·02
			11	6	4	14·7±0·6	19·0±0·6	29	<0·01
			11	6	7	14·9±0·5	16·7±0·9	12	NS
		Ethyl carbamate	500	6	1*	15·3±0·6	14·1±0·4	—	NS
			500	6	4	14·7±0·6	16·0±0·5	8	NS
			500	6	7	14·9±0·5	15·1±0·5	1	NS
		Hydroxyurea	500	6	1*	15·3±0·6	16·0±0·5	5	NS
			500	6	4	14·7±0·6	17·9±0·3	21	<0·01
			500	6	7	14·9±0·5	15·4±0·5	3	NS
		Urea	1000	6	1*	13–5±0·4	14·0±0·5	3	NS
			1000	6	4		14·2±0·5	5	NS
			1000	6	7		14·8±0·6	9	NS
		NTS	150	6	1*	15·5±0·3	14·5±0·8	—	NS
			150	6	4		14·6±0·3	—	NS
			150	6	7		15·0±0·5	—	NS
Ehrlich Carcinoma	100,000	MNG	9·5	6	1*	11·9±0·5	12·9±0·4	8	NS
			9·5	6	4	13·9±0·3	13·4±0·5	—	NS
			9·5	6	7	14·4±0·5	14·7±0·7	2	NS
			4·7	6	1*	11·9±0·5	12·6±0·3	5	NS
			4·7	6	4	13·9±0·3	13·5±0·3	—	NS
			4·7	6	7	14·4±0·5	15·0±0·6	4	NS
		BNG	100	6	1*	12·9±0·3	12·9±0·5	—	NS
			100	6	7		13·7±0·5	6	NS
			100	6	4		12·0±0·5	—	NS
			50	6	1*		12·8±0·3	—	NS
			50	6	7		13·7±0·4	6	NS
			50	6	4		12·4±0·3	—	NS
		Urea	1000	6	1*	14·5±0·8	14·1±0·6	—	NS
			1000	6	7		14·3±0·5	—	NS
			1000	6	4		13·5±0·5	—	NS

*10 min before transplantation.
Each experimental group is represented by at least 10 animals.

Table 4. Effect of different antitumoural drugs on the survival time of mice bearing an intracerebral Sarcoma 180 or an Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	Survival time (days+S.E.) Controls	Survival time (days+S.E.) Treated	% Increase of survival time	*p*
Sarcoma 180	100,000	Cyclophosphamide	42·5	6	1*	13·3±0·6	14·9±0·4	12	NS
			42·5	6	4		14·0±0·7	10	NS
			42·5	6	7		14·5±0·5	9	NS
		DL-Sarcolysine	2·1	6	1*	13·5±0·5	13·9±0·4†	3	NS
			2·1	6	4		15·0±0·6	2	NS
			2·1	6	7		13·8±0·7	2	NS
		Actinomycin-D	0·02	6	4	13·0±0·2	13·0±0·4	—	NS
		Mannitol mustard	26·6	6	4	13·9±0·4	14·7±0·5	6	NS
			13·3	6	4		14·7±0·4	6	NS
		Methotrexate	0·92	5	4	14·7±0·2	15·1±0·6	3	NS
		Vinblastine	0·19	6	4	13·0±0·2	11·8±0·5	—	NS
		Vincristine	0·16	6	4		12·0±0·4	—	NS
Ehrlich Carcinoma	100,000	Cyclophosphamide	42·5	6	1*	14·7±0·4	14·5±0·5	1	NS
			42·5	6	4		15·6±0·5	6	NS
			42·5	6	7		15·7±0·6	7	NS
		DL-Sarcolysine	2·1	6	1*	13·8±0·5	14·0±0·5†	1	NS
			2·1	6	4		14·5±0·5	5	NS
			2·1	6	7		14·8±0·6	7	NS
		Mannitol mustard	26·6	6	4	13·9±0·3	13·7±0·2	4	NS
			13·3	6	4		13·3±0·4	7	NS

*10 min before transplantation.
†Marked decrease of body weight.
Each experimental group is represented by at least ten animals.

(Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma in mice and uterine epithelioma — T_8 of Guérin in rats) transplanted intracerebrally, while it is only slightly active on the same tumours transplanted subcutaneously or intraperitoneally. On the whole, the intracerebral implanted tumours are much more sensitive to MNU even if the comparison is made with the case of the ascites tumour, when MNU was injected intraperitoneally. Less unexpected was the fact that known antitumoural drugs such as cyclophosphamide and DL-Sarcolysine, although effective on the subcutaneous or ascites tumours, lose their efficacy on the same tumours transplanted into the brain.

The efficacy of MNU in brain localization of neoplastic forms has been shown by Goldin's group [5] by using intracerebrally implanted leukemia L 1210. However, in these studies MNU was more effective on the L 1210 transplanted intraperitoneally.

A limited number of studies was carried out with some compounds related to MNU. Only the bis-chloroethylamino-derivative of MNU showed a clear efficacy on cerebral tumours (Sarcoma 180). However, it is known that this drug is effective also on Sarcoma 180 transplanted subcutaneously.

Compounds which may be able to produce diazomethane, such as NTS and MNG, were not effective, suggesting that MNU probably was not active through that mechanism. It is not known, at the present time, whether MNU accumulates in the cerebral tissue.

A possible tropism for the cerebral tissues is suggested by the liposolubility of MNU [6] and by recent experiments carried out by Druckrey's group [7]. The latter authors have been able to show that neural tumours were produced even after a single injection of MNU. Other compounds related to MNU maintained the carcinogenetic properties, but not for the neural tissue.

The fact that an ascites form was not sensitive to MNU even when the drug was injected intraperitoneally, may suggest the possibility that MNU prolongs the survival time of animals bearing an intracerebral tumour, not for a direct effect on the cancer cells but for a yet unknown action on the host mechanism of defense.

Table 5. Effect of different antitumoural drugs on tumour growth of mice bearing a subcutaneus Sarcoma 180 or Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	% Spleen weight relative to controls (14 days after transplantation)	% Leucocytes relative to controls (14 days after transplantation)	Tumour weight after 14 days (g) Controls	Tumour weight after 14 days (g) Treated	% Inhibition	p
Sarcoma 180	5,000,000	MNU	48	2	1	94±10		0·663 ±0·141	0·226 ±0·041†	66	<0·01
			48	2	4	36±4	22±5		0·495 ±0·146†	26	NS
			48	2	7	36±4			0·490 ±0·139	27	NS
			16	6	7	41±4	43±3	0·625 ±0·094	0·512 ±0·094†	19	NS
			8	6	7	58±1	87±7		0·711 ±0·152†	+11	NS
			4	6	7	80±8	88±7		0·630 ±0·125	+1	NS
		Cytoxan	85	6	7	10±1	25±5	0·616 ±0·110	0·218 ±0·030	65	<0·01
			42·5	6	7	39±6	62±7		0·363 ±0·051	42	=0·02
		DL-Sarcolysine	4·2	6	7	47±6	78±11		0·376 ±0·073	39	=0·02
			2·1	6	7	59±5	10±9		0·541 ±0·094	13	NS
Sarcoma 180	100,000	MNU	48	2	1	68±8		0·095 ±0·069 (8)	0·067 ±0·033 (8)	30	NS
			48	2	4	38±5			0·032 ±0·011 (16)†	67	NS
			48	2	7	56±10			0·042 ±0·029 (25)	56	NS
			16	6	1*	71±9		0·205 ±0·045 (8)	0·184 ±0·023 (8)†	11	NS

			16	6	4	59±6		0·037 ±0·016 (33)	0·072 ±0·014 (50)†	+94	NS
			16	6	7	31±2		0·278 ±0·043 (16)	0·103 ±0·028 (66)	63	NS
			8	6	1*	77±7		0·205 ±0·045 (8)	0·202 ±0·028	2	NS
			8	6	4	69±12		0·037 ±0·016 (33)	0·129 (75)	+248	
			8	6	7	53±5		0·278 ±0·043 (16)	— (100)		—
			4	6	1*	97±9		0·205 ±0·045 (8)	0·220 ±0·029 (8)	+10	NS
			4	6	4	102±5		0·037 ±0·016 (33)	0·121 (75)	+227	—
			4	6	7	72±6		0·278 ±0·043 (16)	0·136 (83)	52	—
Ehrlich Carcinoma	5,000,000	MNU	16	6	7	35±4	65±10	0·679 ±0·085	0·560 ±0·079†	18	NS
			8	6	7	56±6	69±7		0·544 ±0·056†	20	NS
			4	6	7	88±7	109±16		0·560 ±0·070	18	NS
		Cytoxan	85	6	7	25±3	38±7	0·946 ±0·191	0·389 ±0·090†	59	<0·01
			42·5	6	7	49±2	75±8		0·503 ±0·092	46	=0·02
		DL-Sarcolysine	4·2	6	7	40±6	82±6		0·822 ±0·110	13	NS
			2·1	6	7	51±9	108±10		0·912 ±0·151	4	NS

*10 min before transplantation.

†Marked decrease of body weight.

Each experimental group is represented by twelve animals.

Between brackets is reported the percentage of animals which did not show tumour.

Table 6. Effect of MNU on survival time of mice bearing subcutaneously Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	Survival time (days±S.E.)* Controls	Survival time (days±S.E.)* Treated	% Increase of survival time	p	Remarks
Sarcoma 180	5,000,000	MNU	48	2	1	44·2 ±3·3 (60)	27·4 ±4·1	—	—	Toxic deaths 6/10
			48	2	4		34·6 ±3·6‡	—	—	Toxic deaths 3/10
			48	2	7		40·4 ±3·9‡	—	—	Toxic deaths 4/10
			16	6	1†	39·0 ±2·0 (20)	35·2 ±3·2‡	—	—	
			16	6	4		42·1 ±3·0 (10)	8	NS	
			16	6	7		46·5 ±2·8 (10)	19		
			8	6	1†		40·5 ±3·6 (10)	4	NS	
			8	6	4		33·5 ±2·3 (10)	—	—	
			8	6	7		37·0 ±3·0 (10)	—	—	
			4	6	1†		41·7 ±3·1 (10)	7	NS	
			4	6	4		40·8 ±3·6 (10)	4	NS	
			4	6	7		38·2 ±3·2 (10)	—	—	
Sarcoma 180	100,000	MNU	48	2	1	41·5 ±— (80)	36·6 ±7·4‡	—	—	Toxic deaths 3/10
			48	2	4		36·1 ±7·6 (10)	—	—	Toxic deaths 4/10
			48	2	7		44·2 ±7·3 (50)	6	NS	Toxic deaths 5/10

*The animals were observed for a period of 60 days.
†10 min before transplantation.
‡Marked decrease of body weight.
Each experimental group is represented at least by 12 animals
Between brackets is reported the percentage of animals which did not show tumour.

Table 7. Effect of different drugs on the survival time of mice bearing an ascites form of Sarcoma 180 or an Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	Survival time (days+S.E.)		% Increase of survival time	p	Remarks
						Controls	Treated			
Sarcoma 180	1,000,000	MNU	48	2	1*	21·9 ±0·9	21·3 ±1·3	—	NS	4/12 toxic deaths; 1/12 survivors
			48	2	4		27·7 ±0·9	+26·4	<0·01	
			48	2	7		24·0 ±0·9	+9·5	>0·02 <0·05	
			16	6	4	22·6 ±1·0	20·3 ±2·1†	—	NS	
			8	6	4		21·2±0·7	—	NS	
			4	6	4		22·2±0·6	—	NS	
			85	6	4	22·1 ±0·8	29·0 ±0·5†	+40·8	<0·01	
			42·5	6	4		22·3 ±0·5	+0·9	NS	
		Cytoxan	4·2	6	4		29·1 ±0·7†	+31·6	<0·01	
			2·1	6	4		28·0 ±0·3	+26·6	<0·01	
		DL-Sarcolysine	48	2	1	24·6 ±0·6	17·7 ±4·0†	—	NS	7/12 toxic deaths; 2/12 survivors
			48	2	4		30·2 ±3·7†	+22·7	NS	2/12 toxic deaths
Sarcoma 180	100,000	MNU	48	2	7		28·4 ±1·7	+15·4	=0·02	

[*Table 7, continued overleaf*

Table 7 (continued). Effect of different drugs on the survival time of mice bearing an ascites form of Sarcoma 180 or an Ehrlich carcinoma

Tumour	Number of cells	Drug	Dose (mg/kg./i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	Survival time (days+S.E.)		% Increase of survival time	*p.*	Remarks
						Controls	Treated			
			16	6	1*	29·9±0·3	39·0 ±2·3	+30·4	<0·01	1/12 survivors
			16	6	4	25·6±0·8	35·5 ±1·8†	+38·6	<0·01	
			16	6	7	23·2±0·9	17·1 ±2·4†	—	NS	8/12 toxic deaths
			8	6	1*	29·9±0·3	37·3 ±3·4	+24·7	<0·01	1/12 survivors
			8	6	4	25·6±0·8	34·6 ±1·9	+35·1	>0·01 <0·02	
			8	6	7	23·2±0·9	16·8 ±1·5	—	NS	9/12 toxic deaths
			4	6	1*	29·9±0·3	37·9 ±4·0	+26·7	<0·01	1/12 survivors
			4	6	4	25·6±0·8	26·9 ±1·2	+5·0	NS	
			4	6	7	23·2±0·9	23·0 ±1·1	—	NS	1/12 toxic deaths
			16	6	1*	22·2±1·1	23·5 ±1·5†	+5·8	NS	
Ehrlich Carcinoma	1,000,000	MNU	8	6	4		22·4 ±0·5	+0·9	NS	
			4	6	7		22·5±0·6	+13·5	NS	
			85	6	4	22·7±0·8	20·6 ±0·3	+30·3	<0·01	
		Cytoxan	42·5	6	4		20·4 ±0·6	—	NS	
			4·2	6	4		28·3 ±0·8†	+24·6	<0·01	
		DL-Sarcolysine	2·1	6	4		29·3 ±0·4	+29·0	<0·01	

*10 min before transplantation.

†Marked decrease of body weight.

Each experimental group is represented by at least 12 animals.

Table 8. *Effect of various antitumoural drugs on the survival time of rats bearing intracerebrally the uterine epithelioma T_8 of Guérin (dilution with buffer* 1 : 5)

Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	% Leucocytes in respect of controls	Survival time (days+S.E.)		% Increase of survival time	*p*
					Controls	Treated		
MNU	8·8	6	1*	71	10·9±0·4	15·8±1·2	45	<0·01
	8·8	6	4	47	15·8±0·8	19·3±1·2	22	<0·02
	8·8	6	7	94	13·5±0·4	14·3±0·6	6	NS
DL-Sarcolysine†	2·1	6	1*	23	10·9±0·4	16·3±1·1	49	<0·01
	2·1	6	4	19	15·8±0·8	17·0±0·1	7	NS
	2·1	6	7	30	13·5±0·4	15·2±0·8	12	NS
Mannitol	5	6	1*	74	10·9±0·4	13·4±0·5	23	<0·01
mustard	5	7	4	63	15·8±0·8	15·3±1·1	—	NS
	5	6	7	52	13·5±0·4	14·3±1·0	6	NS
DON†	0·07	6	1*	52	10·9±0·4	11·4±0·6	4	NS
	0·07	6	4	70	15·8±0·8	15·8±0·7	0	NS
	0·07	6	7	40	13·5±0·4	13·4±0·5	—	NS
MTX	0·17	6	4	76	15·8±0·8	14·2±0·7	—	NS
	0·17	6	7	99	13·5±0·4	13·2±0·4	—	NS
Glycine mustard	1	6	1*	78	10·9±0·4	13·0±0·2	19	NS
	1	6	4	60	15·8±0·8	15·8±0·6	0	NS
Vinblastine	0·05	6	1*	78	10·9±0·4	12·6±0·8	15	NS
	0·05	6	4	83	15·8±0·8	16·2±1·1	3	NS
	0·05	6	7	—	13·5±0·4	14·4±0·9	7	NS
Vinleurosine	0·65	6	1*	79	10·9±0·4	11·3±0·6	4	NS
	0·65	6	4	—	15·8±0·8	15·4±1·1	—	NS
	0·65	6	7	—	13·5±0·4	15·2±1·0	12	NS
BCNU	3·8	6	1*	45	10·9±0·4	11·0±0·3	3	NS
	3·8	6	4	69	15·8±0·8	16·7±0·9	5	NS
	3·8	6	7	—	13·5±0·4	14·3±1·0	7	NS

*10 min before transplantation.
†Marked decrease of body weight
Each experimental group is represented at least by 10 animals.

Table 9. Effect of different antitumoral drugs on the growth of uterine epithelioma T_8 of Guérin transplanted subcutaneously

Drug	Dose (mg/kg/i.p.)	Number of doses	Day of the first treatment	% Leucocytes in respect of controls (At the end of treatment)	% Spleen weight in respect of controls (At the end of treatment)	Tumour weight (g±S.E.) Controls	Tumour weight (g±S.E.) Treated	% Inhibition	p	Remarks
MNU	8·8*	6	14	89·3±7·1	91·7±9·1	30·15±2·68	29·12±4·05	3	NS	—
DL-Sarcolysine	2·1*	6	14	33·5±8·1	70·5±6·1		4·63±1·31	85	<0·01	—
Mannitol mustard	5	6	14	75·6±7·6	96·4±5·2		25·98±3·70	4	NS	—
DON	0·07	6	14	60·4±12·1	91·9±6·3		28·20±5·29	7	NS	Toxic deaths 30%
MTX	0·17	6	14	66·5±9·6	94·6±6·1		20·71±3·90	31		—
Glycine mustard	1	6	14	65·5±11·1	97·2±10·4		34·91±5·71	+16	—	Toxic deaths 50%
Vinleurosine	0·65	6	14	123·1±19·1	100·0±13·2	42·93±5·18	40·03±5·42	8	NS	—
CNU	3·78	6	14	80·2±11·2	69·7±6·9		28·88±4·01	33	NS	—

*Marked decrease of body weight.
Each group is represented at least by 10 animals.

The reported results show the importance of testing substances related to MNU for their possible effect on tumours transplanted intracerebrally, and they suggest the need to use, even in the primary screening, tumours implanted in other sites than the common subcutaneous or intraperitoneal ones.

RESUME

On a étudié la sensibilité à la chimiothérapie de différentes tumeurs du rat ou de la souris implantées à des endroits différents, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intracérébrale, ou encore intrapéritonéale.

Les résultats obtenus montrent, par exemple, que la 1-méthyl-1-nitriso-urée (MNU) a un effet préférentiel sur les tumeurs implantées dans le cerveau, tandis que le cyclophosphamide et la DL-*Sarcolisine sont plus efficaces sur les tumeurs implantées par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.*

SUMMARY

An extensive study has been carried out on the sensitivity to chemotherapy of different mouse or rat tumours transplanted in different sites, subcutaneously, intracerebrally or intraperitoneally.

The results obtained show, for instance, that 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) has from a quantitative point of view a preferential effect on tumours implanted in the brain, while cyclophosphamide and DL-*Sarcolysine were more effective on tumours implanted subcutaneously or intraperitoneally.*

ZUSAMMENFASSUNG

Die chemotherapeutische Empfindlichkeit von verschiedenen Ratten-oder Mäusetumoren, die entweder subkutan oder intrazerebral oder intraperitoneal implantiert sind, wird ausführliche studiert.

Die angegebenen Ergebnisse zeigen dass die antitumorale Wirksamkeit der 1-Methyl-1-nitroso-urea zieht die intrazerebrale Lage vor, während Cyclophosphamide und DL-*Sarcolysine niehr wirksam gegen subkutane oder intraperitoneale Geschwülste sind.*

REFERENCES

1. E. Trabucchi and S. Garattini, Ricerche su alcuni antimitotici: interferenze su particolari prassi metaboliche e attività nei confronti del tumore di Walker trapiantato in sedi diverse. I. *Symp. Antimitotics, Sanremo*, p. 55, June (1955).
2. R. Rosso, V. Palma and S. Garattini, A model of a cerebral tumour for studies in cancer chemotherapy. *Experientia* **22,** 62 (1966).
3. R. Rosso and V. Palma, Chimiothérapie d'un nouveau type de tumeurs cérébrales. *Rev. franç. Etud. clin. biol.* **11,** 404 (1966).
4. M. G. Donelli, R. Rosso and S. Garattini, Selective chemotherapy in relation with the site of tumour transplantation. *Int. J. Cancer* (in press).
5. A. Goldin, J. M. Venditti, J. A. R. Mead and J. P. Glynn, Antileukemia activity of hydroxyurea and other urea derivatives. *Cancer Chemother. Rep.* **40,** 57 (1964).
6. F. M. Schabel, T. P. Johnston, G. S. McCaleb, J. A. Montgomery, W. Russell Laster and H. E. Skipper, Experimental evaluation of potential anticancer agents. VIII. Effects of certain nitrosoureas on intracerebral L 1210 Leukemia. *Cancer Res.* **23,** 725 (1963).
7. H. Druckrey, S. Ivankovic and R. Preussmann, Selective Eizaugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-methyl-N-nitroso-harnstoff. *Z. Krebsforsch.* 66, 389 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 139–142. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Tumoren im Vormagen des chinesischen Hamsters nach Diäthylnitrosamin-Behandlung. Ein Beitrag zur Frage der Organotropie eines Karzinogens

U. MOHR, K. PIELSTICKER, O. WIESER und V. KINZEL
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle Pathologie

BEI ALLEN bisher untersuchten Tierarten entstehen nach Behandlung mit Diäthylnitrosamin (DÄNA) Tumoren [1]. Die Lokalisation dieser Neubildungen ist abhängig von Dosierung und Applikationsart des Karzinogens [2]. Auch Organdisposition und Lebensalter [3] des Versuchstieres sind von Bedeutung. Beim Goldhamster zeigt DÄNA im Gegensatz zu seiner Wirkung bei der Ratte eine hohe Tumorausbeute im Respirationstrakt; bei Ratten und einigen anderen Tierarten entstehen vorwiegend Lebertumoren [1, 3–6, 8].

Um zu klären, ob zoologische Verwandtschaftsbeziehungen der Versuchstiere für die Organdisposition von Bedeutung sind, wurde die vom Goldhamster bekannte Versuchsanordnung (subcutane Karzinogen-Applikation) am chinesischen Hamster wiederholt. Während Ratte und Maus der Unterfamilie Murinae angehören, sind Goldhamster (Mesocricetus auratus) und chinesische Hamster (Cricetulus griseus) in der Subfamilie Cricetinae zusammengefaßt.

MATERIAL UND METHODE

Die Untersuchung umfaßte 132 männliche und weibliche chinesische Hamster eigener Züchtung. Das Alter war beim Versuchsbeginn durchschnittlich 3 Monate, das Gewicht 26 Gramm. Jedes Tier erhielt einmal wöchentlich subcutan 2 mg DÄNA (1/4 ml einer 0, 8% igen Lösung). Diese Dosis entspricht 77 mg/kg Körpergewicht. Die Tiere erhielten Preßfutter (Hope Farms) und Wasser ad libitum; Haltung in Makrolon-Käfigen zu je 10 Tieren. Bei der nach Spontantod (3–22 Wochen nach Behandlungsbeginn) durchgeführten Sektion wurden Trachea, Lunge, Oesophagus, Magen, Leber, Nieren, Nebennieren, Milz und Herz entnommen und histologisch untersucht.

ERGEBNISSE

Als häufigste Veränderung fanden sich multiple Papillome des Vormagens, insgesamt bei 82% der behandelten Tiere (Tabelle I). Der meist ektatisch vergrößerte Vormagen zeigte diffuse, stecknadelkopf- bis linsengroße Tumoren von weißlich-grauer Farbe und mäßig derber Konsistenz (Abb. 1).

Histologisch bestehen sie aus einem zell- und faserarmen, aber gefäßreichen Stroma, das von mehrschichtigem, verhornendem Plattenepithel überzogen wird. In den oberflächlichsten Zellschichten erkennt man intensiv angefärbte, basophile Keratohyalinkörnchen. In den

Tabelle 1. *Veränderungen am tracheobronchialephitel, Oesophagus und Vormagen in Abhängigkeit von der Behandlungs dauer*

Anzahl der Tiere	Behandlungs-dauer in Wo.	Metaplasie an Bronchus oder Trachea	Papillome am Oesophagus	Papillome am Vormagen
1	3	1	—	1
2	4	—	—	1
1	5	—	—	—
1	7	1	—	1
6	8	2	—	5
12	9	6	3	8
13	10	8	2	10
15	11	7	1	13
18	12	10	3	17
14	13	8	6	10
17	14	10	4	13
9	15	5	6	9
8	16	8	2	7
7	17	5	5×	6
3	18	1	2×	2
4	19	1	4	4
1	22	—	1×	1
132		73 (55%)	39 (30%)	108 (82%)

*Bei jeweils einem Tier fanden sich gleichzeitig Papillome in der Mundhöhle.

basalen Epithelschichten einiger Papillome zeigen sich neben Mitosen, Hyperchromasie und geringe Polymorphie der Kerne. Der Aufbau ist insgesamt regelmäßig, die Basalmembran erhalten. Diese Tumoren wurden von uns als gutartige Plattenepithelpapillome angesehen (Abb. 2 und 3).

Die Papillome im Oesophagus des chinesischen Hamsters gleichen makroskopisch und mikroskopisch den Veränderungen im Vormagen, erreichen jedoch nur in seltenen Fällen die Größe der Magentumoren.

Nach längerer Behandlung fanden sich bei 3 Tieren multiple, ebenfalls stark verhornte Papillome der Mundhöhle, die histologisch den Tumoren im Vormagen bzw. Oesophagus entsprachen.

Herdförmige Metaplasien im Bereich des Epithels der Atemwege (Bronchus, Trachea) zeigten 55% der untersuchten Tiere. Das Flimmerepithel war dabei entweder durch spindelförmige Epithelzellen oder durch geschichtetes, z. T. verhorntes Plattenepithel ersetzt. In der Lungenperipherie fanden wir bei 3 Tieren Bronchusadenome.

Beim Vergleich der Befunde mit den Ergebnissen bie der Ratte interessierten besonders die Veränderungen der Leber. Anfänglich beobachtete (Behandlungsdauer 3–8 Wochen) Blutungen, herdförmige Parenchymnekrosen, fein-, mittel- oder grobtropfige Verfettung und perivasculäre Rundzelleninfiltrate wurden nach etwa 10 Wochen dauernder Behandlung von einer Vermehrung kollagener Fasern, knotigen Parenchymregeneraten und Wucherungen der Gallengangsepithelien abgelöst. Cirrhosen sahen wir nur bei 10 Tieren, nach einer Behandlung von mehr als 10 Wochen. Die Veränderungen entsprechen dann weitgehend dem portalen Typ, doch ist wegen der breiten Narbenfelder gelegentlich die postnekrotische Zirrhoseform nicht auszuschließen. Hepatome oder hepatozelluläre Karzinome wurden nicht beobachtet.

Herzmuskelnekrosen, Blutungen und mäßige Parenchymverfettung in Niere und Nebenniere waren häufig. Sie wurden als toxisch bedingt angesehen.

DISKUSSION

Beim Goldhamster wird nach Behandlung mit DÄNA das Flimmerepithel der Trachea durch Plattenepithel ersetzt. Gleiche Veränderungen zeigen in einem hohen Prozentsatz auch die chinesischen Hamster. Beim Goldhamster ist die Metaplasie an der Trachea bzw. an den Bronchien formalgenetisch als Vorstufe eines Papilloms (Trachea) bzw. Karzinoms (Bronchien) aufzufassen. Trotz starker Metaplasie im Bereich des Respirationstraktes wurden beim chinesischen Hamster in keinem Fall vergleichbare Veränderungen gefunden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß bei chinesischen Hamstern gegenüber dem Goldhamster eine längere Latenzzeit für die Entstehung dieser Tumoren besteht. Die Ursache der Epithle-

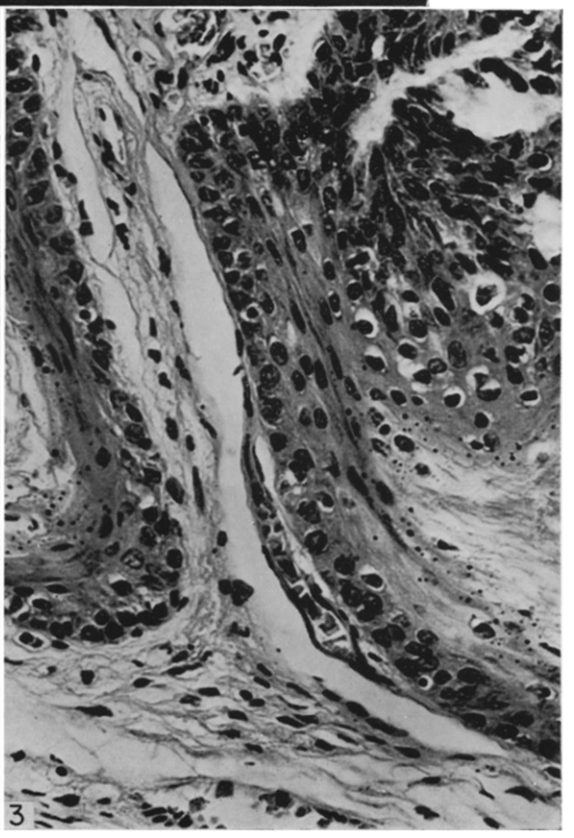


Abb. 1. *Rechts normaler Magen, links multiple Papillome im Vormagen nach Behandlung mit DÄNA.*

Abb. 2. *Verhorntes Papillom im Vormagen* (*HE*, 120×)

Abb. 3. *Ausschnitt von der Basis eines Papilloms: klare Abgrenzung des Epithels gegen das darunterliegende Bindegewebe* (*HE*, 400×).

(to face p. 140)

metaplasie ist nicht unbedingt im Karzinogen zu suchen, umsomehr, als diese Veränderung meist von Entzündungen in Form von Tracheitis, Bronchitis oder Peribronchitis begleitet war. Bekanntlich tritt die Fehlregeneration bei entzündlichen Epithelschäden auf, ohne zwangsläufig zu einer echten Neubildung zu führen. Die bei beiden Hamsterarten zunächst ähnlichen Veränderungen am Respirationstrakt haben möglicherweise verschiedene Ursachen. Eine gleiche Reaktion verwandter Tierarten auf das gleiche Karzinogen ist aus diesen Befunden nicht abzuleiten. In 3 Fällen beobachtete Bronchusadenome liegen möglicherweise noch im Bereich der Spontanrate, die bei diesen selten verwendeten Versuchstieren bisher nicht bekannt ist.

Beide Tierarten unterscheiden sich demnach in ihrer Organdisposition gegenüber DÄNA. Vergleichbar ist aber die Morphologie der Neubildungen. In beiden Fällen entstehen primär gutartige Tumoren mit grundsätzlich gleichem Aufbau, aber in verschiedenen Organen. Die Unterschiede sind durch die jeweilige Matrix bestimmt. Dieser Beobachtung messen wir wegen der nahen Verwandtschaft der Tiere eine gewisse Bedeutung zu, da bei den zur Unterfamilie Murinae gehörenden Spezies Ratte und Maus, ebenso wie bei Meerschweinchen und Kaninchen, nach Behandlung mit DÄNA fast ausschließlich bösartige Tumoren in der Leber auftreten. Die histologische Struktur ist von Spezies zu Spezies verschieden [1, 3].

Ob die Papillome Vorstadien maligner Tumoren darstellen, wie Druckrey [9] dies für die nach Methylnitroso-Harnstoff-Behandlung entstandenen Papillome im Vormagen der Ratte annimmt, ist nicht zu entscheiden. Die ersten neoplastischen Veränderungen fanden sich bereits drei Wochen nach Behandlungsbeginn beim chinesischen Hamster; auch nach 22 Wochen wurde kein malignes Wachstum beobachtet.

Druckrey [9] und Mitarbeiter fanden bei der Ratte nach Karzinogen-Behandlung ein unterschiedliches Verhalten von Oesophagus und Vormagen; während Methylnitroso-Harnstoff, unter Aussparung des Oesophagus, Tumoren des Vormagens erzeugte, fanden sich nach Behandlung mit Dialkylnitrosaminen Oesophagus Karzinome ohne Tumoren im Vormagen. Demgegenüber entstanden bei unseren Versuchen in drei Fällen gleichzeitig Papillome in Mundhöhle, Oesophagus und Vormagen. Dieser Befund spricht für die einheitliche Reaktion des gesamten oberen Verdauungstraktes auf die Behandlung mit DÄNA. Die Frage nach der Toxizität eines Karzinogens stellt sich durch den Nachweis von Blutungen, Verfettungen und Parenchymnekrosen, wie sie in verschiedenen Organen, z.B. in Leber, Niere, Nebenniere und Herzmuskel gefunden wurden. Magee [10] verwies 1963 bei Dimethylnitrosamin auf die Korrelation zwischen der toxischen und der Karzinogenen Wirkung in der Leber. Zwei Gründe veranlassen uns, diese Überlegung erneut aufzugreifen. Einerseits ist die Entstehung des menschlichen Leberkarzinoms fast ausschließlich an einen entzündlichen oder toxischen Vorschaden der Leber gebunden, andererseits zeigten sich beim Goldhamster und beim chinesischen Hamster Tumoren zunächst nur in anderen Organen. Der vorhandene Leberschaden ist als Basis für eine spätere Hepatom- bzw. Karzinomentstehung in diesem Organ zwar denkbar, eine echte Organotropie für die Leber, d.h. die gesetzmäßige Entstehung von Lebertumoren nach Behandlung mit DÄNA ist aber für beide Hamsterarten zweifelhaft. Dagegen ist bekannt, daß in Abhängigkeit von der Dosis zumindest bei der Ratte DÄNA-induzierte Hepatome ohne lichtmikroskopisch nachweisbaren Leberschaden (Dystrophie, Zirrhosen) entstehen, so daß hier die Hepatotropie wahrscheinlich ist. Diaethanolnitrosamin — ein Oxydationsprodukt von DÄNA — zeigt trotz fehlender Lebertoxizität bei allen behandelten Tieren eine Karzinogene Wirkung [11]. Dieser Befund spricht gegen die Annahme, die Hepatomentstehung sei an eine toxische Vorschädigung der Leber gebunden. Bei Substanzen, wie DÄNA mit toxischen und karzinogenen Wirkungen, ist es gerade bei Lebertumoren schwierig, ihre Entstehung jeweils der einen oder anderen Komponente zuzuordnen, zumal auch die Kombination beider Wirkungen denkbar ist.

RESUME

Trois à 22 *semaines après l'application de diéthylnitrosamine (injection hypodermique, à raison de* 2 *mg par semaine) à des Hamsters chinois (Cricetulus griseus), des papillomes kératinisés multiples sont apparus dans le renflement sus-diaphragmatique de l'œsophage* (82%) *et dans l'œsophage lui-même* (30%). *L'importance de l'affinité phylogénétique, pour la localisation des tumeurs induites (disposition des organes), et la relation entre l'organotropie et la toxicité d'un carcinogène sont discutées.*

SUMMARY

Three to 22 weeks after treatment with diethylnitrosamine (2 mg subcutaneously once a week) chinese hamsters developed multiple keratinized papillomas in the forestomach (82%) and in the oesophagus (30%). The influence of zoological relationship upon the localisation of tumors, produced by treatment with a particular carcinogen (organ specificity) in different species, and the connexion between the organotropy of a carcinogenic compound and its toxicity is discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Drei bis 22 Wochen nach Behandlung von chinesischen Hamstern mit Diäthylnitrosamin (2 mg/Woche, subcutan) zeigten sich multiple, verhornte Papillome im Vormagen (82%) und im Oesophagus (30%). Diskutiert wurden einerseits die Bedeutung zoologischer Verwandtschaftsbeziehungen für die Lokalisation der nach Karzinogenbehandlung entstehenden Tumoren (Organidisposition) und andererseits der Zusammenhang zwischen der Organotropie eines Karzinogens und seiner Toxizität.

LITERATUR

1. C. Thomas und D. Schmähl, Vergleichende morphologische und toxikologische Untersuchungen an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Hund zur Prüfung der cancerogenen Wirkung und Organotropie des Diäthylnitrosamins. *Virchows Arch. path. Anat.* **340,** 122–136 (1965).
2. H. Druckrey, D. Schmahl, W. Dischler und A. Schildbach, Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung. *Naturwissenschaften* **49,** 217–228 (1962).
3. H. J. Rapp, J. H. Carleton, C. Crisler and E. M. Nadel, Induction of malignant tumors in the rabbit by oral administration of diethylnitrosamine. *J. Nat. Cancer Inst.* **34,** 453–458 (1965).
4. K. M. Herrold, Epithelial papillomas of the nasal cavity. *Arch. Path.* **78,** 189–195 (1964).
5. K. M. Herrold and L. J. Dunham. Induction of tumors in the syrian hamster with diethylnitrsosamine (N-Nitrosodiethylamine). *Cancer Res.* **23,** 773–777 (1963).
6. W. Dontenwill und U. Mohr, Carcinome des Respirationstraktes nach Behandlung von Goldhamstern mit Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* **64,** 305–312 (1961).
7. W. Dontenwill, U. Mohr und M. Zagel, Über die unterschiedliche Lungencarcinogene Wirkung des Diäthylnitrosamins bei Hamster und Ratte. *Z. Krebsforsch,* **64,** 499–502 (1962).
8. M. G. Argus and C. Hoch-Ligeti, Induction of maligant tumors in the guinea pig by oral administration of diethylnitrosamine. *J. Nat. Cancer Inst.* **30,** 533–551 (1963).
9. H. Druckrey, D. Steinhoff, R. Preussmann und S. Ivankovic, Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. *Z. Krebsforsch.* **66,** 1–10 (1964).
10. P. N. Magee, Mechanism of biological action of dimethylnitrosamine. Vortrag gehalten auf der ersten Konferenz über N-Nitroso-Verbindungen und Lactone, Hamburg, September 1963. Wissenschaft. Forschungsstelle im Verband der Cigarettenindustrie (1964).
11. D. Schmähl, Diskussionsbemerkung zum Vortrag Magee [10].

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 143–147. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Depressive Action of Serum of Partially Hepatectomized Rats on Tumour Cells *in vitro*

HEINRICH WRBA and MANFRED VOLM
German Cancer Research Center, Department of Experimental Pathology, Heidelberg, Germany

INTRODUCTION

BLOOD serum of partially hepatectomized rats shows a definite inhibitory effect on explanted tumors [9]. On the addition of serum obtained 24 and 48 hr after hepatectomy, the formation of lactic acid was found to be significantly inhibited in the ascites form of Walker carcinoma in the rat [10]. Significant deviations have been found also in oxygen turnover. In addition we found an increase in catalase activity in serum of partially hepatectomized rats [7]. Further experiments were designed to study the action of catalase on oxygen consumption and lactic acid formation in this experimental setting.

MATERIAL AND METHODS

Two-thirds resection of the liver of female Sprague–Dawley rats weighing about 150 g was performed in the usual manner. Blood was obtained by cardiac puncture at various intervals after surgery. Sera of at least five animals were mixed to ensure optimal utilization and to reduce individual variations. Serum from untreated animals of the same litter was used as control. Ascites tumor cells of Walker carcinoma were taken out on the third day after transplantation. The cells were sedimented for 2 min at 150 g, washed with physiological saline, centrifuged again and finally diluted to $4{\cdot}5\times10^7$ cells per ml with saline solution.

Oxygen consumption was determined with the Warburg apparatus, carbon dioxide being absorbed by 10% KOH. Six tenths of 1 ml of the cell suspension in saline solution was mixed with 1·4 ml of serum (giving a dilution of 70% serum). The experiments were performed at 37°C in the ordinary atmosphere. After 4-hr incubation the cells were sedimented and the L-lactate concentration in the medium was estimated enzymatically. Catalase activity was measured by the manometric method at 37°C. Catalase in crystalline suspension was obtained from Boehringer of Mannheim (No. Kat-I-15674).

RESULTS

1. *Action of serum from partially hepatectomized rats on oxygen consumption*

Cell suspensions of Walker carcinoma to which serum from partially hepatectomized rats, obtained 18, 30 and 72 hr after surgery, was added showed significant differences in oxygen consumption as compared with suspensions in serum of untreated animals (Tables 1 and 2). During the first hour after the addition of serum oxygen consumption of the cells in serum from partially hepatectomized rats was significantly raised, and thereafter decreased.

Table 1. *Action of rat serum, 30 hr after partial hepatectomy on the oxygen consumption of cells of Walker ascites carcinoma during 4-hr incubation (n, no. of experiments; ±=standard deviations)*

Hours after serum addition	A Serum of untreated rats $n=5$	B Serum of rats 30 hr after partial hepatectomy $n=5$	Deviation B from A (%)
0–1	124±5	140±2	+13 $p<0{\cdot}001$
1–2	126±3	111±5	−12 $p<0{\cdot}005$
2–3	129±5	110±4	−15 $p<0{\cdot}001$
3–4	112±3	96±3	−14 $p<0{\cdot}001$

Table 2. *Action of rat serum, 72 hr after partial hepatectomy on the oxygen consumption of cells of Walker ascites carcinoma. Conditions and symbols as in Table* 1

Hours after serum addition	A Serum of untreated rats $n=4$	B Serum of rats 72 hr after partial hepatectomy $n=4$	Deviation B from A (%)
0–1	147±3	162±2	+10 $p<0{\cdot}001$
1–2	149±5	136±4	−9 $p<0{\cdot}01$
2–3	133±6	127±2	−5 $p>0{\cdot}05$
3–4	131±4	120±2	−8 $p<0{\cdot}005$

With serum obtained 18 hr after surgery the values were only slightly lower than those of Table 1 (30 hr after surgery). When serum obtained 72 hr after surgery was used, deviations were still significant but less marked (Table 2).

2. *Action of serum from partially hepatectomized rats on lactate formation*

At the same time intervals the formation of lactate was inhibited by serum from partially hepatectomized rats (Table 3). Since the lactic acid content of the sera varied greatly, lactic acid in each serum was determined prior to the experiment and was duly taken into account. This yielded clear-cut differences. There was a parallel between the decrease in oxygen turnover and the decrease in lactate formation in tumors in serum from partially hepatectomized rats.

3. *Action of catalase on oxygen consumption and lactate formation*

Catalase activity is known to be enhanced in serum from partially hepatectomized rats [7] with enzyme activity raised by a factor of 10 between 18 and 48 hr after surgery. Therefore it became interesting to test the action of catalase on ascites tumor cells. Calibration showed that the catalase activity of serum from partially hepatectomized rats is roughly equivalent to 20 µg of crystallized catalase per millilitre. Hence this amount of catalase was added to normal serum of untreated animals

Table 3. *Action of serum of partially hepatectomized rats on the formation of* L-*lactate by cells of Walker ascites carcinoma during 4-hr incubation at 37°C. Values in* mg%. *Each value is the mean of five experiments*

A Serum of untreated rats $n=5$	Hours	B Serum of rats after partial hepatectomy $n=5$	Deviation B from A (%)
74±2	18	53±2	−28 $p<0{\cdot}001$
73±2	30	52±1	−29 $p<0{\cdot}001$
78±2	72	67±3	−14 $p<0{\cdot}02$

and the effect of this serum was compared with that of serum devoid of catalase. The serum containing catalase produced a significant inhibition of oxygen consumption (Table 4). A lowering of lactate formation was faintly indicated but not significant. Wrba and associates [8] have shown that serum from partially hepatectomized rats stimulates liver explants.

Catalase in the serum may cause certain deviations, but the action of serum from partially hepatectomized rats on tumor cells is not due to catalase.

DISCUSSION

The stimulant action of serum from partially hepatectomized rats on liver cell cultures, and

Table 4. *Effect of serum from untreated rats with* 20 µg/ml *of catalase added on the oyxgen consumption of cells of Walker ascites carcinoma. Conditions and symbols as in Table* 1

Hours after serum addition	A Serum of untreated rats $n=6$	B Serum of untreated rats with 20 µg/ml of catalase added $n=6$	Deviation B from A (%)
0–1	150±8	138±8	−8 $p<0{\cdot}05$
1–2	137±3	128±5	−7 $p<0{\cdot}01$
2–3	127±4	116±6	−7 $p<0{\cdot}005$
3–4	110±3	102±5	−7 $p<0{\cdot}01$

When liver homogenate was placed in the Warburg vessels, serum with added catalase effected a slight increase in oxygen consumption though this was not statistically significant.

The action of serum from partially hepatectomized rats on liver cultures is unimpaired by heating of serum to 100°C for 5 min as we have found before [8]. Therefore we heated serum obtained 24 hr after partial hepatectomy and determined catalase activity after heating. However, it was found that catalase is inactivated as early as 5 min after heating to 50°C (Table 5). But when serum thus heated was used in the Walker cell experiments, the significant inhibition of lactate formation persisted (Table 7b).

Hydroxylamine has a specific inhibitory action on catalase [3]. Despite complete inhibition of serum catalase by 5×10^{-4}m hydroxylamine chloride, the decrease in both oxygen consumption and lactate formation persisted (Tables 6 and 7a).

the depressive effect of such serum on tumor explants and ascites tumor cells have been described repeatedly [9, 10]. Our experiments show that in Walker ascites carcinoma cells in rats an inhibition of lactic acid formation was found, standing out more clearly when the initial lactic acid content of the serum was taken into account. Serum from partially hepatectomized animals also inhibited oxygen consumption after an initial rise. This effect could not be attributed to hydrogen peroxide degradation as a result of increased catalase activity, since the inhibition by serum from partially hepatectomized rats persisted even after inactivation of catalase (Table 6).

Table 5. *Catalase activity of serum from partially hepatectomized rats after heating at different temperatures*

Temperature	Controls	50	75	100
Catalase activity/min	120	10	3	5

In vivo studies on the relationship between tumor growth and liver regeneration have yielded contradictory results. Paschkis and associates [5] showed that the growth of Morris hepatoma and Walker carcinoma was enhanced in hepatectomized rats, whereas other tumors were not affected. Paschkis [6] assumed that

Table 6. Effect of rat serum with 5×10^{-4} m *hydroxylamine chloride on the oxygen consumption of cells of Walker ascites carcinoma. Mean values of a typical parallel determination.*

Hours after serum addition	A Serum of untreated rats +hydroxylamine	B Serum 24 hr after hepatectomy +hydroxylamine	Deviation B from A (%)
0–1	107±6	102±6	−5
1–2	104±3	79±7	−24
2–3	94±1	65±7	−31
3–4	104±1	72±1	−31

Table 7. Effect of sera on lactate formation by cells of Walker ascites carcinoma after heating to 50°C *and addition of hydroxylammonium chloride. Incubation* 4 *hr at* 37°C. *Values in* mg%. *Mean values of three experiments in each case.*

		A Serum of untreated rats	B Serum of rats 24 hr after partial hepatectomy	Deviation B from A (%)
(a)	$+5 \times 10^{-4}$m hydroxylamine	75±3	55±4	−27 $p<0{\cdot}025$
(b)	Heated for 5 min at 50°C	69±2	44±2	−36 $p<0{\cdot}01$

general growth stimulants are released during the regeneration of liver.

We found increased catalase activity in serum from partially hepatectomized rats. It is known that catalase plays a special part in tumor growth and that catalase activity is lowered in tumors. Apart from the increase in aerobic glycolysis this is in fact the only enzymatic finding which may be called a sort of law in view of its constancy and the great number of confirmations [4]. Generally speaking, the greater the drop in liver catalase, the faster is the growth of the tumors. There are indications of a parallelism between catalase depression and animal resistance to tumors [1]. It is likewise a fact of interest that tumor homogenates and cancerogenic substances can inhibit catalase [2]. We studied the action of catalase on Walker ascites tumor cells but the only effect observed was a significant reduction of oxygen consumption. The obvious suspicion is that the added catalase diverts oxygen. But this point is weakened by the fact that the inhibition persists longer than would be expected in an enzymatic reaction. The true cause of the action of serum from partially hepatectomized rats is perhaps to be sought in a synergism of various factors of which the effect shown by us may be but one component.

RESUME

1. *Le sérum de rats, partiellement hépatectomisés, a une action inhibitrice, après une stimulation initiale sur la respiration* in vitro *de cellules d'ascite du carcinome de Walker. On trouve une inhibition comparable dans la formation d'acide lactique. Cet effet se manifeste* 18, 30 *et* 72 *heures après hépatectomie partielle.*

2. *L'activité de la catalase est augmentée, dans le sérum, après hépatectomie. Bien que la catalase ait une action inhibitrice, l'effet inhibiteur persiste encore après la suppression de l'effet de la catalase. L'action du sérum d'animaux hépatectomisés peut être expliquée par un synergisme de différents facteurs.*

SUMMARY

1. *Serum of partially hepatectomized rats inhibits, after initial stimulation, the oxygen consumption of Walker ascites carcinoma cells* in vitro. *A parallel inhibition is seen in lactic acid formation. The effect was observed with serum obtained* 18, 30 *and* 72 *hr after surgery.*
2. *At certain intervals after surgery, catalase activity, is increased in the serum of partially hepatectomized rats. The influence of catalase on oxygen consumption and lactate formation was studied. Although catalase may induce inhibition, the inhibitory effect persists even after inactivation of catalase. Several synergistic factors seem to be involved in the specific action of serum from partially hepatectomized animals.*

ZUSAMMENFASSUNG

1. *Serum teilhepatektomierter Ratten hemmt im Vergleich zum Serum unbehandelter Tiere nach anfänglicher Stimulierung den Sauerstoffverbrauch der Zellen des Walker-Ascites-Carcinoms* in vitro. *Eine parallele Hemmung findet auch bei der Milchsäurebildung statt. Diese Wirkung fand sich bei* 18, 30 *und* 72 *Std. nach Teilhepatektomie.*
2. *Die Katalase-Aktivität wird zu bestimmten Zeiten nach der Operation im Serum teilhepatektomierter Ratten erhöht. Der Einfluß der Katalase auf Sauerstoffumsatz und Lactatbildung wurde geprüft. Katalase vermag zwar Hemmungen auszulösen, doch ist auch nach Ausschaltung der Katalasewirkung der Hemmeffekt noch erhalten. Die entscheidende Ursache für die Wirkungen des Blutserum teilhepatektomierter Tiere muß im Zusammenwirken mehrerer synergistischer Faktoren begründet sein.*

REFERENCES

1. D. H. Adams, The mechanism of the liver catalase depressing action of tumors in mice. *Br. J. Cancer* **4,** 183 (1950).
2. D. H. Adams and F. J. Roe, The action of some chemical substances on mouse liver catalase activity *in vivo*. *Br. J. Cancer* **7,** 509 (1953).
3. E. Boyland and E. Gallico, Catalase poisons in relation to changes in radiosensitivity. *Brit. J. Cancer* **6,** 160 (1952).
4. J. P. Greenstein, *Biochemistry of Cancer.* Academic Press, New York (1954).
5. K. E. Paschkis, A. Cantarow, J. Stasney and J. H. Hobbs, Tumor growth in partially hepatectomized rats. *Cancer Res.* **15,** 579 (1955).
6. K. E. Paschkis, Growth-promoting factors in tissues: A review. *Cancer Res.* **18,** 981 (1958).
7. M. Volm and H. Wrba, Katalase-Aktivität im Serum teilhepatektomierter Ratten. *Naturwissenschaften* **53,** 228 (1966).
8. H. Wrba, H. Rabes, M. Ripoll-Gomez and H. Ranz, Die stoffwechselsteigernde Wirkung von Serum teilhepatektomierter Tiere auf Leberkulturen. *Exp. Cell Res.* **26,** 70 (1962).
9. H. Wrba and H. Rabes, The action of serum from partially hepatectomized rats on explants of liver and tumors. *Cancer Res.* **23,** 1116 (1963).
10. H. Wrba, H. Rabes and A. Georgii, Zur Frage einer spezifischen Wirkung von Blutserum teilhepatektomierter Tiere auf Tumoren. *Naturwissenschaften* **52,** 165 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 149–157. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Zur Wechselwirkung zwischen explantierten Mammatumoren und Gonaden in der Konfrontationskultur*

H. H. PETER, H. WRBA und H. RABES
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle Pathologie und Pathologisches Institut der Universität München

MALIGNE Tumoren zeigen verschiedene Abstufungen zwischen absoluter Autonomie und hormoneller Abhängigkeit des Wachstums. Besonders die Ergebnisse von Huggins [1] haben klargestellt, daß maligne Tumoren in der Stufenleiter ihrer malignen Entdifferenzierung hormonabhängig bleiben können und daß Hormone, selbst in geringen Konzentrationen, das Krebswachstum zu beeinflussen vermögen. Für bestimmte Tumorarten haben sich aus dieser Erkenntnis therapeutische Konsequenzen ergeben. Die klinische Erfahrung zeigte jedoch, daß beim Mammakarzinom das androgene Hormon nur bei einem Teil der Fälle Remissionen im Krebswachstum erzeugte, in anderen Fällen dagegen eher eine Stimulierung des Tumorwachstums bewirkte. Versuche durch Bestimung des Geschlechtschromatins oder durch Chromosomenanalysen eine Auswahl oestrogen-abhängiger oder androgensensibler Geschwülste zu treffen, blieben ohne therapeutisch brauchbare Auswirkung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an explantierten Mammakarzinomen die Wirkung der beiden gegensätzlichen Hormone biologisch zu klären.

MATERIAL UND METHODE

Die explantierten Karzinome entstammen Operationspräparaten der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. F. Linder).†

Ovarien und Hoden für die Konfrontation wurden unmittelbar vor Beginn des Versuches von ca. 300 g schweren Sprague-Dawley-Ratten gewonnen.

Die Methode der Konfrontationskultur ist von uns mehrfach modifiziert worden und wird jetzt in der zuletzt beschriebenen Weise durchgeführt [2]. Das frisch aus dem Operationssaal kommende Präparat wird unter sterilen Bedingungen mit Irislanzetten in Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten, mit dem vom Versuchstier gewonnenen Ovar bzw. Hoden wird auf gleiche Weise verfahren. Aus einem Überschuß von etwa 200 Gewebestücken werden Gruppen von jeweils 18 Explantaten gleichen Gesamtgewichtes zusammengefaßt. Die beiden Konfrontationsgefäße werden in der beschriebenen Weise durch ein Membranfilter (Typ MF 100) mit einer Porenweite von 800–1000 mμ und einem Durchmesser von 5 cm gegeneinander abgetrennt. Die beiden Kulturkammern werden mit jeweils 10 ml des Nährmediums beschickt (80% TCM, 20% Phosphatpuffer, 30–60γ Streptomycin/ml). Als Kontrollansatz dient dabei die Konfrontation Tumor gegen Tumor, während in den Versuchsgruppen Tumorgewebe gegen Ovar und

*Die Arbeit wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

†Herrn. Dr. OTT Assistent an der Chirurgischen Klinik sie für die Beschaffung der Operationspräparate an dieser Stelle gedankt.

Tumor gegen Testes inkubiert werden. Die Explantation erfolgt über 20 Stunden bei 37°C unter leichter Schüttelbewegung, um ein Anhaften der Explantate an der Glaswand zu verhindern. Nach Beendigung dieser Einwirkungszeit werden die Explantate in frisches, vorgewärmtes Medium umgesetzt, welches radioaktive Substanz enthält. Dieser Ansatz wird für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei inkorporieren die Explantate entsprechend ihrer aktuellen Stoffwechselsituation radioaktiv markierte Substanz. Durch Zugabe eiskalter Phosphatpufferlösung wird dann die Stoffwechseltätigkeit des Systems gestoppt, die Explantate werden dreimal gewaschen, die Spülflüssigkeit wird überprüft und ist bei der dritten Spülung frei von nachweisbarer Aktivität. Die Gewebestücke werden auf eine rückstandsfrei verbrennbare Filterpapierscheibe gebracht und zur Trockengewichtsbestimmung bei 70°C bis 80°C getrocknet. Zur Aktivitäts-Verbrennungssystem nach Kalberer und Rutschmann [3] in Sauerstoffatmosphäre verbrannt. Die Verbrennungsgase werden in einer Vorlageflüssigkeit aufgefangen und 8 ml davon nach Zusatz eines aliquoten Teils eines flüssigen Scintillators im Scintillationsspektrometer (Packard-Tricarb) gemessen. Für die Messung von H_3-Aktivitäten hat sich besonders der Dioxan-Scintillator bewährt [4]. Die Meßausbeute liegt bei 22 bis 25% der inkorporierten Aktivität. Für die Messung von C-14-markierten Verbindungen wurde als Vorlage ein Methanolaethanolamin-Gemisch verwendet und Toluolscintillator zugesetzt. Die Meßrate beträgt hier ca. 50% der wirklichen Zerfälle. Die Meßergebnisse wurden in Impulse min/mg Trockengewicht des Tumorgewebes umgerechnet.

ERGEBNISSE

Die zeitliche Begrenzung für die Durchführung eines Versuches erlaubt es nicht, für jedes Tumorpräparat mehr als maximal je 4 Kontroll-, Ovar- und Hodenansätze gleichzeitig durchzuführen.

Um die Streubreite der Methode festzustellen, wurde zunächst ein Operationspräparat — es handelte sich dabei um einen Fall von Mastopathie — in Konfrontation gegen Hoden in 2 Gruppen von je 4 Ansätzen untersucht (Tabelle I). Es ergibt sich bei beiden Gruppen eine Standardabweichung $S\bar{x}$ vom Mittelwert $\bar{x}$ von etwa 5%.

Es wurden bisher 13 maligne und 4 benigne Tumoren der Mamma mit Ovar und Hoden konfrontiert. Die Ergebnisse dieser Konfrontationsversuche sind in den Tabellen II und III zusammengestellt.

Die Höhe der gemessenen Impulsrate ist das Ergebnis der Einwirkung komplexer Faktoren und hängt außer von der zugesetzten Aktivitätsmenge von anderen Größen ab. Die Vitalität, der Zellreichtum und die Einheitlichkeit des explantierten Gewebes sowohl auf der Tumorseite als auch auf seiten der Gonaden stehen dabei im Vordergrund. Unter sonst gleichen Bedingungen bauen zellreiche Tumoren naturgemäß wesentlich höhere Aktivitäten ein als zellarme, faserreiche Gewebe (Abb. 1). Die geringste Incorporation von markierten Verbindungen zeigen erwartungsgemäß scirrhöse Karzinome auf dem Boden einer Mastopathia chronica cystica fibrosa (Tabellen I, II 7, 8, 9 und III 1).

Tabelle I. Bestimmung der Streubreite der Konfrontationsmethode anhand von 2×4 gleichen Konfrontationsansätzen von Mammagewebe gegen Rattenhoden, Imp/min/mg Trockengewicht nach Zusatz von 1 µC H_3-Thymidin/ml

Name Krbl.-Nr. Alter	Histologischer Befund	Konfrontation Tumor-Hoden	$\bar{x}\pm s\bar{x}$
E.L. 4347 70	10096/66: Mastopathia chronica fibrosa cystica, keine Malignität	1. 56 2. 60 3. 64 4. 52	58±2,8
		1. 62 2. 51 3. 65 4. 57	59±3,1

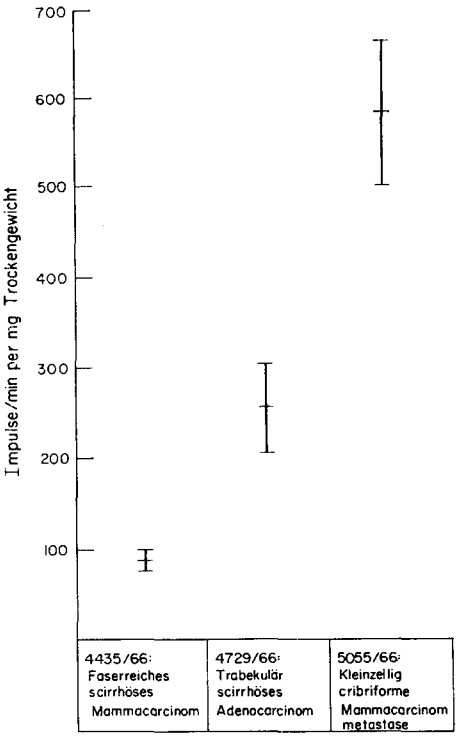


Abb. 1. *Abhängigkeit des C* 14-*Glycineinbaus* (1 µC/*ml*) *vom Zellreichtum der inkubierten Tumoren. Es wurden nur die jeweiligen Tumor-Tumor-Konfrontationen berücksichtigt.*

DISKUSSION

Unter Anwendung der sogenannten Konfrontationskultur gelingt es *in vitro* die Wechselwirkung zwischen explantierten Organen zu bestimmen. So war es möglich, die Abhängigkeit endokriner Organe voneinander unter biologischen Bedingungen zu messen [5]. Der entscheidende Vorteil der Verwendung radioaktiv markierter Substanz als Indikator für die biologische Wirkung liegt darin, daß sich dabei meßbare Werte für eine Stoffwechselbeeinflussung ergeben. Die Gültigkeit dieser Beziehung ist an verschiedenartigen Systemen der Organexplantation untersucht und bestätigt worden [6]. Bei der Verwendung von Organen, die Geschlechtshormone produzieren, liegt ein weiterer Vorteil unseres gewählten Versuchsansatzes darin, daß eine Bestimmung der biologischen Wirkung von Steroidhormonen an Systemen *in vitro* kaum unter physiologischen Bedingungen möglich ist. Infolge ihrer schlechten Wasserlöslichkeit ist es immer notwendig, irgendwelche Hilfsmechanismen heranzuziehen um die Hormone im Nährmedium zu lösen. Bei der von uns geübten Methode zum Nachweis der Wirkung schwer löslicher Steroidhormone *in vitro* Blutserum von Tieren zu verwenden, die hohe Dosen des zu untersuchenden Hormones erhalten hatten, ist die Frage der quantitativen Bestimmung der wirksamen Substanz nicht geklärt [7].

Andererseits ist bei der üblichen Verwendung von Zwischenlösungsmitteln um Steroidhormone in wässerige Lösung zu bringen damit zu rechnen und teilweise auch bewiesen, daß die verwendeten Hilfssubstanzen biologische Effekte verursachen, die in ihrer Auswirkung nicht zu übersehen sind. Daher bietet nach unserer Auffassung die direkte Gegenüberstellung und Bestimmung der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Organen in unserer Versuchsanordnung den Vorteil, daß in einem weitgehend physiologischen System die humorale Wirkung hormonwirksamer Gewebe auf lebendes Tumormaterial untersucht werden kann.

Im Gegensatz zu den zahlreichen *in vitro* verwendeten Testsystemen kann hier angenommen werden, daß bei der kurzzeitigen Explantation eines Organes zumindest an seiner Oberfläche Veränderungen der Reaktion gegenüber beeinflussenden Faktoren nicht eintreten. Für Langzeitkulturen ist mit verschiedenen Methoden erhärtet, daß eine grundsätzliche Änderung der vorhandenen Gewebe im Sinne einer Eigenschaftswandlung nach sehr verschiedener Richtung möglich ist. Besonders ist dabei in Rechnung zu setzen, daß sich Resistenz und Empfindlichkeit gegen chemische Faktoren und humorale Agentien ändern. Die Stoffwechselverhältnisse in der Konfrontationskultur entsprechen in Zusammansetzung und Konzentration der kritischen Faktoren weitgehend den Verhältnissen *in vivo*. Es ist mit Hilfe der kurzzeitigen Explantationen unserer Methode möglich, Indifferenz, Hemmung oder Stimulation der in Beziehung zueinander tretenden Explantate zu studieren.

Schon in früheren Versuchsreihen hatten sich dabei direkte Beziehungen zwischen explantiertem, hormonabhängigem Tumormaterial und dem entsprechenden endokrinen Organ ergeben [8, 9]. Die weitere Untersuchung des Verhaltens explantierter Mammakarzinome unter der Wirkung von Sexualorganen schien uns deswegen wichtig, weil dabei möglicherweise eine Auswahl des klinisch wirksamen Prinzipes denkbar wäre. Dabei ist die Tatsache, daß das Steroidhormon in physiologisch gelöster Form vorliegt, von entscheidender Bedeutung gegenüber der Untersuchung der direkten Einwirkung des chemisch definierten Hormones.

Die Verwendung von artunterschiedlichen endokrinen Organen für das Studium dieser Beziehung spielt keine Rolle. Eine gegenseitige

Tabelle II. Vergleichende Zusammenstellung des histologischen Befundes, der BARR-Körperauszählung und der Konfrontationsergebnisse bei 13 *Mammakarzinomen.*
n gibt die Anzahl der durchgeführten Konfrontationen a 18 *Tumorexplantate an, P die Probilitas einer signifikanten Abweichung von den Tumor-Tumor-Konfrontationen Die Höhe der Einbauquote hängt außer von der Vitalität und dem Zellreichtum der verwendeten Gewebe auch von der zugesetzten Menge radioaktiver Substanz ab. Im Rahmen der Versuchsserie mußte das Optimum an zuzusetzender Aktivität* (5 µ*C/ml einer wässerigen* H^3*-Thymidinlösung von* 1, 9 *C/mM) erst bestimmt werden. Bei den histologisch vergleichbaren Tumoren* 6, 10, 11, 12 *wurde daher* H^3*-Thymidin in steigenden Mengen zugesetzt* (1, 2, 5, 10 µ*C/ml). Bei C-*14*-Verbindungen wurde jeweils die Aktivität von* 1 µ*C/ml verwendet*

Name Krbl.-Nr. Alter	Histologischer Befund*	Geschl. Chromatin- Befund†	Impulse/min/mg Trockengewicht nach Konfrontationskultur								Isotop (µC/ml)
			Tumor gegen Tumor		Tumor gegen Ovar			Tumor gegen Hoden			
			$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	P	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	P	
1 M.R. 1867 52	4435/66: Scirrhöses Mammaka, infiltrierend wachsend, faserreich, hyalin skleros. Bindegewebesstroma	pos. (weibl.)	89±10,6	2	95±0,7	2	>0,05	120±18,3	2	>0,05	C^{14} Glycin 1 µC
2 E.D. 2071 67	4729/66: Trabekuläres und scirrhöses Adenokarzinom der Mamma	pos. (weibl.)	257±49,4	3	248±4,2	2	>0,05	180±20,4	2	>0,05	C^{14} Glycin 1 µC
3 H.W. 2132 47	5055/66: Metastase von teils kleinzellig scirrhös, vorwiegend cribriformem Mammaka rechts	—	582±85,5	3	583±34,5	2	>0,05	761±88,7	2	>0,05	C^{14} Glycin 1 µC
4 H.W. 2132/ 2773	5767/66: Milchgangska links, Fibrose, epitheliale Zapfen, Milchgänge ausfüllendes Karzinom	pos. (weibl.)	1421±48	4	1328±27,6	3	>0,05	971±119,5	3	<0,01	H^3 Glycin 5 µC
5 T.B. 2467 59	5811/66: Typisches, solides Milchgangskarzinom, teilweise tubulär infiltrierende Formationen	pos. (weibl.)	1006±120	4	1059±164	3	>0,05	1530±83,3	3	<0,01	H^3 Glycin 5 µC

6 E.B. 4012 55	9430/66: Scirrhöses Mammaka ausgedehnte kleinzellige Infiltrate, Hyalinose, Vernarbung	pos. (weibl.)	100±4	4	83±5,2	3	<0,05	77±1,1	3	<0,005	H^3 Thymidin 1 µC
7 B.B. 4627 77	10806/66: Scirrhöses Mammaka, Mastopathia chr. fibr. cyst., breites faserreiches Bindegewebesstroma	pos. (weibl.)	45±3,5	4	43±9,2	2	>0,05	55±5,7	3	>0,05	H^3 Thymidin 1 µC
8 S.S. 4940 45	11546/66: Scirrhöses wenig differenziertes Adenoka. Mastopathia chr. fibrosa cystica	pos. (weibl.)	78±14,0	4	83±22,4	3	>0,05	96±19,5	3	>0,05	H^3 Thymidin 2 µC
9 E.K. 5324 70	12552/66: Scirrhöses Mammaka. faserreich, kernarm, verquollen, Mastopathia chronica fibrosa cystica	pos. (weibl.)	36±1,0	4	35±4,6	3	>0,05	46±1,7	3	<0,005	H^3 Thymidin 2 µC
10 A.S. 5406 72	12810/66: Scirrhöses, teils undifferenziertes Mammaka, solide Tumorstränge	neg. (männl.)	112±8,5	4	109±8,6	3	>0,05	90±0	3	<0,05	H^3 Thymidin 2 µC
11 S.L. 6065 59	13963/66: Scirrhöses Mammaka. kleinzellig diffus ausgebreitet, tubulär, hyalin verquollen	pos. (weibl.)	321±15,0	4	251±16,1	3	<0,025	276±2,9	3	<0,05	H^3 Thymidin 5 µC
12 H.S. 5682 64	13192/66: Scirrhöses undifferenziertes Mammakrazinom	pos. (weibl.)	1161±95	4	1350±353	3	>0,05	778±34,5	3	<0.02	H^3 Thymidin 10 µC
13 H.K. 2243 44	5153/66: Scirrhöses undifferenziertes Mammakaschmale, solide Stränge, bindegewebesreiches Stroma	pos. (weibl.)	282±65	4	196±88	4	>0,05	62±21	4	<0,001	C^{14} Guanin 1 µC

*Die histologischen Diagnosen stammen aus dem pathologischen Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. W. Doerr).

†Herrn Dr. U. Bleyl, wiss. Ass. am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg sei an dieser Stelle besonders für die Überlassung der Geschlechtschromatinbefunde gedankt.

Tabelle III. Die Konfrontationsbefunde von 4 benignen Mammatumoren im Vergleich mit ihrer histologischen Diagnose

Name Krbl.-Nr. Alter	Histologischer Befund	Impulse/min/mg Trockengewicht nach Konfrontationskultur								Isotop µC/ml
		Tumor gegen Tumor		Tumor gegen Ovar			Tumor gegen Hoden			
		$\bar{x}\pm s\bar{x}$	n	$\bar{x}\pm s\bar{x}$	n	P	$\bar{x}\pm s\bar{x}$	n	P	
1 R.V. 4055 46	9516/66: Fibroadenoma mammae, Mastopathia chronica fibrosa cystica, faserreich, gut diff. Drüsen	48±3	4	93±49,4	3	>0,05	62±2,3	3	<0,02	H^3-Thymidin 1 µC
2 P.S. 3094 16	7196/66: Adenofibrosis mammae virilis (Gynäkomastie) zylindrisch, gleichmäßige Drüsenschläuche	142±26	2	139±51,6	3	>0,05	150±3,6	3	>0,05	H^3-Thymidin 1 µC
3 P.S. 3094 16	s.o.	158±7,0	2	165±79,4	2	>0,05	209±34,5	2	>0,05	H^3-Glycin 1 µC
4 B.S. 2860 66	6486/66: Chronisch granulierende tuberkuloide Mastitis, Langhans und Epitheloidzellen, Tuberkel, Vernarbung	469±26,5	4	870±96,4	3	<0,02	416±25,8	3	>0,05	H^3-Glycin 2 µC

Sensibilisierung der Explantate ist unter den Bedingungen in der Kultur in dieser kurzen Zeit naturgemäß nicht möglich. Die Wirkung der Sexualhormone ist artunspezifisch, so daß die Verwendung artfremder endokriner Organe geeignet erscheint.

In der Tat ergibt die histologische Untersuchung der konfrontierten Explantate bei der Beendigung des Versuches eine weitgehende Vitalität der Randzone. Dieser Bereich entspricht dabei dem Bezirk der Explantate innerhalb der sogenannten Grenzschichtdicke für die Sauerstoffdiffusion [10].

Überwiegend ergeben sich unter der Einwirkung von Testes auf das explantierte Mammakarzinon signifikante Abweichungen vom Bezugswert der Tumor-Tumor-Konfrontation: 6 der 13 Mammakarzinome zeigen bei Konfrontation gegen Hoden eine signifikante Einbauhemmung (Tabelle II 4, 6, 10, 11, 12, 13), 2 eine signifikante Stimulierung (Tabelle II 5, 9). Bei zwei Tumoren wird außer einer signifikanten Hemmung durch Testes auch eine solche durch Ovar gefunden (Tabelle II 6, 11). Fünf Karzinome zeigen keinerlei signifikante Einbauänderung bei Konfrontation gegen Ovar oder Hoden (Tabelle II 1, 2, 3, 7, 8). Durchschnittlich ist die Streuung für ein gegebenes Präparat bei Konfrontation gegen Hoden geringer als bei Konfrontation gegen Ovar.

Eine Übereinstimmung der Ergebnisse unserer Methode mit den Befunden der Geschlechtschromatinbestimmung nach BARR ist nicht gegeben. Chromatinpositive Tumoren sollten bei der Gegenüberstellung mit Hoden eine Hemmung zeigen, geschlechtschromatinnegative Tumoren dagegen eine Stimulierung ergeben. Von 11 geschlechtschromatinpositiven Karzinomen werden jedoch nur 6 durch Testes gehemmt, 5 dagegen in ihrer Stoffwechselaktivität gesteigert. 1 chromatinnegatives Karzinom wird durch Konfrontation mit Hoden gehemmt.

Auch eine Beziehung zwischen dem Alter der Patientinnen und damit der Funktion ihrer Gonaden einerseits und dem histologischen Befund konnte aus unseren bisherigen Versuchen nicht abgeleitet werden. Die Betrachtung einzelner Ergebnisse liefert indessen interessante Befunde. Auch hier findet sich wieder ein Hinweis dafür, daß jeder Tumor sozusagen als Individuum zu betrachten ist. Im Falle der Tumoransätze (Tabelle II 3 und 4) handelt es sich um Präparate der gleichen Patientin. Es fanden sich bei ihr unterschiedliche primäre Karzinome der rechten und linken Mamma. Beide Karzinome konnten mit Hilfe der Konfrontation in Kultur untersucht werden und es ergab sich dabei im Falle des ersten Karzinoms (Tabelle II 3) eine Stimulierung durch die Konfrontation gegen Testes, beim zweiten Karzinom (Tabelle II 4) dagegen eine signifikante Hemmung unter gleichen Bedingungen.

Bei einer Anzahl von gutartigen Veränderungen der Mamma (Tabelle III) finden sich ebenfalls bemerkenswerte Hinweise für eine biologische Gültigkeit unserer Aussagen. Bei einer rezidivierenden Gynäkomastie eines 16-jährigen männlichen Patienten brachte weder die Verwendung von H 3-Thymidin noch die Bestimmung der H 3-Glycin Inkorporation signifikante Unterschiede bei der Konfrontation gegen Ovarien und Hoden (Tabelle III 2, 3).

Der einzig deutliche signifikante Förderungseffekt unter der Einwirkung von weiblichen Gonaden in unserer Versuchsreihe ergab sich bei einer erst nach dem Kulturansatz als chronisch tuberkuloide Mastitis erkannten Veränderung (Tabelle III 4).

Ein benignes Fibroadenom ergab eine signifikante Stimulierung bei der Konfrontation mit Hoden (Tabelle III 1).

Die Regellosigkeit der Reaktion nach der Einwirkung von Gonaden *in vitro* hinsichtlich der Proteinsynthese und der Nukleinsäurensynthese an explantierten Mammatumoren liefert einen Hinweis dafür, daß die Reaktionsweise der Geschwulst auf ein humorales Prinzip nur im biologischen Versuch bestimmt werden kann. Es ergibt sich daraus die Möglichkeit, mit Hilfe eines Ansatzes der unserer Konfrontationskultur entspricht, schon an der Probebiopsie die zu erwartende Reaktion auf ein Hormon zu bestimmen. Eine entscheidende Schwierigkeit für eine möglicherweise sich ergebende praktische Anwendung unserer Methode ist darin zu sehen, daß ein großer experimenteller Aufwand mit der Durchführung einer solchen Konfrontationskultur und der Auswertung der Inkorporation markierter Verbindungen verbunden ist. Es wird daher unser Ziel sein, in weiteren Versuchen möglichst eine Vereinfachung der geübten Methode unter Verwendung von Probebiopsien zu erreichen.

RESUME

Dix-sept tumeurs du sein humain, dont 13 *malignes et* 4 *bénignes, ont été étudiées* in vitro, *par une méthode basée sur la culture contiguë des explants tumoraux et de fragments de gonades, afin de déceler une dépendance hormonale. Après une explantation de* 20 *heures,*

les tumeurs sont incubées dans un milieu de culture contenant des acides aminés radioactifs et de la thymidine marquée. En présence de fragments de testicules, les cultures montrent, le plus souvent, une inhibition significative de l'incorporation. Une stimulation significative se produit dans 2 cas. En présence de fragments d'ovaires, les résultats sont moins évidents. On trouve parfois aussi une dépendance hormonale dans les tumeurs bénignes.

Il n'y a aucune relation entre les effets trouvés in vitro, *d'une part, et l'estimation de la chromatine sexuelle, l'âge du malade, et l'histologie de la tumeur, d'autre part.*

SUMMARY

Thirteen malignant and 4 benign human mammary tumours have been studied in vitro *by a method based on the contiguous culture of the tumour explants and of fragments of male and female gonads, in order to detect a possible hormone-dependence. Twenty hours after explantation, labelled thymidine or amino acids were added to the medium. Cultures in the presence of testicular fragments resulted mostly in a significant decrease of the incorporation of labelled substance by the tumour explants. In two cases, a significant stimulation occurred. In the presence of ovarian fragments, the results were less significant. Several benign tumours were also hormone-dependant.*

The results do not suggest any relation with sex chromatin diagnosis of mammary carcinoma, neither with the patient's age, nor with histological findings.

ZUSAMMENFASSUNG

Explantate von 13 bösartigen und 4 gutartigen Tumoren der menschlichen Mamma wurden mit männlichen und weiblichen Gonaden 20 Stunden in vitro *konfrontiert. Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung, ob eine humorale Abhängigkeit der Tumoren in diesem System nachweisbar wird. Nach 20 Studen wurde den Explantaten aktive Substanz in Form von markierten Aminosäuren oder markiertem Thymidin angeboten. Bei der Konfrontation gegen Testes zeigt die Mehrzahl der Karzinome eine signifikante Hemmung des Einbaues an radioaktiver Substanz. In zwei Fällen trat eine signifikante Steigerung der Aktivität auf. Die Ergebnisse der Konfrontation mit Ovarien sind weniger eindeutig. Auch bei gutartigen Tumoren fand sich z.T. Abhängigkeit von Sexualhormonen.*

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ergeben hinsichtlich der Reaktion des Tumormaterials keinen Zusammenhang mit der Bestimmung des Geschlechtschromatins, dem Alter des Patienten oder dem histologischen Aufbau der Geschwulst.

LITERATUR

1. Ch. Huggins, Hormonabhängige Geschwülste klinisch und experimentell. *Verh. Ges. Sch. Naturforsch. Ärzte* **100,** 195 (1959).
2. H. Rabes und H. Wrba, Nukleinsäuresynthese der Leber verschiedener Funktionszustände *in vitro* und in der Konfrontationskultur. *Exp. Cell Res.* **39,** 669 (1965).
3. F. Kalberer und J. Rutschmann, Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigen organischem Probematerial mittels des Flüssigkeitsscintillationszählers. *Helv. Chim. Acta* **44,** 1956 (1961).
4. F. Newton Hayes, Solutes and solvents for liquid scintillation counting. *Packard Technical Bulletin* **1,** 1963.
5. H. Rabes und H. Wrba, Zur quantitativen Bestimmung der Wirkung humoraler Faktoren auf explantierte Organe. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **46,** 344 (1962).
6. H. Wrba und H. Rabes, Zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen explantierten Organen mit Hilfe von Konfrontationsröhrchen. *Exp. Cell Res.* **26,** 493 (1962).
7. U. Mohr, H. Rabes und H. Wrba, Zum Nachweis der Wirkung schwerlöslicher Substanzen an explantierten Geweben. *Naturwissenschaften* **52,** 38 (1964).
8. H. Rabes und H. Wrba, Wechselbeziehungen zwischen Organen und Tumoren in Konfrontationskulturen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **47,** 275 (1963).

9. H. WRBA, Wachstumskontrolle und Krebskrankheit. Sonderdruck aus *Aktuelle Probleme aus dem Gebiet der Cancerologie* Symposion anläßlich des 75. Geburtstages von K.-H. BAUER (1966).
10. H. WRBA, H. RABES, K.-F. MERKER und P. DOERR, Zur Bedeutung des O_2-Partialdruckes für die quantitative Bestimmung des Einbaues von radioaktiv markierten Verbindungen in Organexplantate. *Exp. Cell Res.* im Druck.

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 159–161. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Les Neuromyopathies Paranéoplasiques

J. HILDEBRAND

Service de Médecine Interne et d'Investigation Clinique, Institut Jules Bordet
Centre des Tumeurs de L'Université Libre de Bruxelles

Les atteintes du système nerveux, survenant chez les malades cancéreux en l'absence de métastases, ont été décrites dès le début de ce siècle. Cependant, c'est l'observation de Denny-Brown qui a suscité l'intérêt actuel pour les neuromyopathies paranéoplasiques. En 1948, cet auteur a rapporté deux cas de neuropathies périphériques, à prédominance sensitive, chez des malades atteints d'un cancer bronchique à petites cellules [1]. Denny-Brown n'a pu établir la pathogénie des lésions qu'il avait observées. Malgré le grand nombre de travaux qui, depuis cette publication, ont été consacrés aux neuromyopathies paranéoplasiques les problèmes pathogéniques qu'elles soulèvent restent non résolus, et leur relation avec le cancer demeure obscure.

Le terme "paranéoplasique" peut être compris de deux manières: ou bien, le cancer est la cause immédiate et spécifique de ces manifestations, comme c'est le cas par exemple, pour le syndrome de Cushing apparaissant chez des malades atteints de cancer bronchique à cellules à grains d'avoine; ou bien, il désigne des complications fréquement rencontrées chez les cancéreux, mais qui ne sont pas le résultat d'une action directe et spécifique de la néoplasie comme, par exemple, les infections.

Le cas de la leuco-encéphalopathie multifocale progressive illustre bien cette dernière conception. Cette forme d'encéphalite ne se rencontre pas exclusivement chez les cancéreux [2], et son étiologie virale a été récemment démontrée [3]. Ici, l'atteinte neurologique témoigne d'une sensibilité particulière des malades atteints de lyphomes aux infections virales. Le déterminisme de cette encéphalopathie n'est donc pas différent de celui du zona, affection neurologique d'origine virale fréquemment rencontrée dans les lymphomes. L'infection méningée par le Cryptococcus Néoformans, associée dans un tiers des cas à la maladie de Hodgkin, constitue un autre exemple de la susceptibilité du système nerveux des cancéreux à certaines infections.

Comme l'infection, les carences alimentaires peuvent favoriser l'apparition des lésions neurologiques chez les cancéreux. Certaines observations plaident en faveur d'un tel mécanisme dans la pathogénie d'un certain nombre de neuropathies périphériques de malades cancéreux [4, 5].

A cette conception s'oppose celle qui voudrait faire jouer au cancer un rôle plus direct et plus spécifique dans la genèse des neuromyopathies paranéoplasiques. A l'appui de cette thèse, on pourrait faire état de la mise en évidence d'anticorps actifs contre les neurones dans le sérum des patients atteints de la neuropathie sensitive de Denny-Brown [6, 7]. Il pourrait s'agir dans ce cas d'une action antigénique spécifique de la tumeur maligne. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que l'apparition de ces anticorps peut être la conséquence et non la cause de la destruction des cellules nerveuses.

D'autres objections peuvent être formulées contre l'hypothèse d'une action directe du tissu néoplasique sur l'appareil neuromusculaire.

Tout d'abord, l'évolution clinique des neuromyopathies paranéoplasiques paraît indépendante de celle du cancer qu'elles accompagnent. En effet, la gravité et la fréquence de ces

affections ne paraissent pas être en rapport avec la durée d'évolution ou l'extension des lésions néoplasiques [8]. En outre, la neuropathie ne répond pas toujours favorablement à l'ablation chirurgicale de la tumeur. Enfin, l'atteinte neurologique ou neuro-musculaire peut se manifester parfois plusieurs années avant que le diagnostic de cancer ait pu être posé. Ce manque de parallélisme entre l'évolution clinique de ces deux affections rend improbable la responsabilité directe du cancer dans ces atteintes neuro-musculaires, comme la production d'une substance neurotoxique ou l'utilisation, par la tumeur, de facteurs nécessaires au métabolisme de la cellule nerveuse.

D'autre part, les diverses formes de neuromyopathies dites paranéoplasiques ont toutes été observées en l'absence de cancer. Par conséquent, seule l'étude de la fréquence des atteintes nerveuses et musculaires des patients cancéreux peut démontrer que l'association n'est pas l'effet du simple hasard. De tels travaux doivent tenir compte d'un certain nombre de critères:

(1) Il faudrait tout d'abord que, dans chaque cas, les facteurs étiologiques autres que le cancer soient étudiés. Ce sont, entre autres, le diabète, l'éthylisme, la chimiothérapie anticancéreuse [9], l'antibiothérapie [10, 11], la corticothérapie ou les carences alimentaires [12].

(2) Un examen anatomo-pathologique devrait venir confirmer l'absence d'infiltration métastatique dans tous les cas de neuromyopathies dites paranéoplasiques. En pratiquant de telles vérifications chez 17 cancéreux atteints de polynévrite, Boudin a trouvé que, dans 9 cas, elles pouvaient être attribuées à des métastases [13].

(3) Enfin, on ne devrait considérer comme affection paranéoplasique que celle apparaissant en présence d'un cancer. De nombreux auteurs incluent, dans ce cadre, des atteintes nerveuses et musculaires dont l'installation précède, parfois de plusieurs années, la découverte de la néoplasie. On peut admettre que, dans certains cas, la tumeur, de taille réduite, échappe pendant longtemps à nos moyens d'investigation. Mais est-il probable qu'il en soit souvent ainsi?

Jusqu'à ce jour, de nombreux travaux consacrés au problème des neuromyopathies paranéoplasiques n'ont pas tenu suffisament compte de ces critères. Et si leurs résultats mettent l'accent sur la fréquence des atteintes neurologiques et musculaires chez les cancéreux, en revanche, le rôle joué par la néoplasie dans leur pathogénie demeure inconnu. Nous croyons utile d'insister sur ce dernier point, car c'est une interprétation erronée de ces études qui a fait naître, chez un grand nombre de cliniciens, l'idée que le cancer pouvait être la cause directe des lésions neuro-musculaires. Une telle action des tumeurs malignes est sans doute possible, mais elle n'a pas été établie.

Actuellement, nous manquons d'arguments pour considérer le cancer comme directement responsable des atteintes neuro-musculaires, au même titre que le diabète ou certaines carences vitaminiques. En absence de toute action spécifique de la tumeur sur le tissu nerveux ou musculaire, les affections néoplasiques peuvent causer des syndromes neuro-musculaires en favorisant les infections et les carences, ou encore en nécessitant l'utilisation des drogues neurotoxiques.

C'est à ces mécanismes aspécifiques que Brain et Adams [14] recommandent de songer en premier lieu, lorsqu'on est en présence d'une affection neurologique ou musculaire chez un patient atteint de cancer.

RESUME

Cet article a pour objet l'analyse du rôle joué par le cancer dans la pathogénie des neuropathies et myopathies paranéoplasiques.

Cette dernière appellation peut avoir deux significations différentes; elle peut désigner;

(a) Soit des complications non spécifiques du cancer. Dans le cas, les neuropathies et les myopathies paranéoplasiques reconnaîtraient des mécanismes pathogéniques divers.

(b) Soit des lésions résultant d'un effet direct et spécifique du tissu tumoral. Une telle action de la tumeur maligne n'a jamais été mise en évidence. Les études statistiques consacrées à ce problème, qui ne tiennent pas compte d'un certain nombre de critères, ne la démontrent pas, et l'indépendance de l'évolution clinique du cancer et des neuromyopathies qui l'accompagnent la rendent peu probable.

SUMMARY

The subject of this paper is to examine the role played by cancer in the pathogenesis of the so-called carcinomatous neuropathies and myopathies.

This last nomenclature can have two different meanings:

(a) Either a non-specific complication of cancer. In this case, carcinomatous neuromyopathies would have various pathogenic factors.

(b) Or lesions which result from a direct and specific action by the tumoral tissue. Such an effect of malignant tumors has never been demonstrated. Statistical studies devoted to this problem do not take into consideration a certain number of criteria and do not show such an action. The independence of the clinical evolution of the cancer and the associated neuromyopathies make this last hypothesis unlikely.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit ist der Bedeutung maligner Tumoren für die Pathogenese paraneoplastischer Neuropathien und Myopathien gewidmet.

Mit dieser letzteren Bezeichnung können zwei verschiedene Dinge gemeint sein:

(a) Eine unspezifische Komplikation eines Krebsleidens. In diesem Falle kommen verschiedene pathogenetische Mechanismen für die Entstehung einer paraneoplastischen Neuropathie oder Myopathie in Frage.

(b) Eine Läsion als Ergebnis einer direkten und spezifischen Einwirkung von Tumorgewebe. Eine solche Einwirkung ist nie nachgewiesen worden. Statistische Untersuchungen, die sich mit diesem Problem befassen und die eine Anzahl von Kriterien ausser acht lassen, liefern keinen Beweis dafür, und der unabhängige klinische Verlauf des tumoralen Grundleidens und der begleitenden Neuro- oder Myopathie weist auf die geringe Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens hin.

BIBLIOGRAPHIE

1. D. Denny-Brown, Primary sensory neuropathy with changes associated with carcinoma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **II,** 73 (1948).
2. E. P. Richardson, Jr., Progressive multifocal leuco-encephalopathy. In: *The Remote Effects of Cancer on the Nervous System*, p. 7. Brain and Norris (Editors). Stranton & Grune, (1965).
3. G. M. Zu Rhein and M. Chou, Particles resembling Papova viruses in human cerebral demyelinisating disease. *Science* **148,** 1477 (1965).
4. P. L. van de Hart, Carcinoma complicated by proximal motor neuropathy due to vitamin B deficiency. *Brit. med. J.* **I,** 606 (1954).
5. J. Hildebrand and C. Coërs, The neuromuscular function in patients with malignant tumors. *Brain* In press.
6. P. C. Wilkinson, Serological findings in carcinomatous neuropathy. *Lancet* **ii,** 1301 (1964).
7. P. C. Wilkinson and J. Jeromski, Immunofluorescent detection of antibodies against neurones in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain* **88,** 529 (1965).
8. B. P. Croft and M. Wilkinson, Incidence of neuropathy in carcinoma. *Brain* **88,** 427 (1965).
9. J. Hildebrand et C. Coërs, Etude clinique, histologique et électrophysiologique des neuropathies associées au traitement par la Vincristine. *Europ. J. Cancer* **1,** 51 (1965).
10. N. G. Gold et A. P. Richardson, Jr., An unusual case of neuromuscular blockade seen with therapeutic blood levels of Colistin methanesulfonate (Coly-mycin). *Am. J. Med.* **41,** 316 (1966).
11. A. M. Walter and L. Heilmeyer, *Antibiotica-Fibel*, p. 39. Georg Thieme, Stuttgart (1965).
12. G. B. Phillips, M. S. Victor, R. D. Adams and C. S. Davidson, A study of the nutritional defect in Wernicke's syndrome. The effect of purified diet, thiamine and other vitamins on the clinical manifestations. *J. clin. Invest.* **31,** 859 (1952).
13. G. Boudin, Les polynévrites d'un cancer. *Bull. Acad. nat. Méd. (Paris)* **149,** 229 (1965).
14. W. R. Brain and R. D. Adams, Epilogue: A guide to the classification and investigation of neuromuscular disorders associated with cancer. In: *The Remote Effects of Cancer on the Nervous System*, p. 216. Brain and Norris (Editors). Stranton and Grune (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 163–164. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Letter to the Editor

Attempts to Use Albumin as a Carrier of L-Phenylalanine Mustard*

BØRGE LARSEN

Cancer Research Institute Radiumstationen, Aarhus C, Denmark

IN VIEW of the apparent increase in the affinity of tumor cells for serum albumin [1], the use of albumin as a possible carrier of cytotoxic groups into the tumor cells has often been suggested [2]. Serum albumin is considered to be remarkable in its capacity to form complexes with a great number of organic compounds, and the question arose if it was possible to form albumin complexes with L-phenylalanine mustard, which still maintained the tumortoxic properties of this mustard.

In the present study, L-phenylalanine mustard was incubated with albumin at 37°C, 20°C and 4°C, and at the effect of the reaction products on the survival time on mice carrying a leukaemic tumor was compared to the effect of L-phenylalanine mustard given alone.

In order to rule out unspecific immunological reactions, albumin isolated from C3H/A mice was used. The preparation was performed with precipitation of the serum globulins in 10 vol. of 1% trichloroacetic acid in 96% v/w ethanol at 4°C. The albumin which was contained in the supernatant proved, after dialysis, to be without contamination from other serum proteins shown by paper electrophoreses and immunoelectrophoresis.

*Aided by grants from the Anders Hasselbalch Anti-Leukaemia Foundation, Carl Schepler and Wife's Bequest, the Irma Foundation, and the Danish Cancer Society.

Incubation of 35 mg L-phenylalanine mustard with 130 mg mouse albumin at pH 7 for 36 hr at 37°C resulted in an albumin complex, which after gelfiltration on Sephadex G.25, contained eight L-phenylalanine mustard groups per mole of albumin. This was determined by protein analyses and u.v. spectrophotometry at 262 mμ where L-phenylalanine mustard and its hydrolysis products have an absorption maximum. Electrophoretically this albumin complex migrated very similar to albumin. Incubation at 20°C for 18 hr at pH 7 of 100 mg L-phenylalanine mustard with 170 mg mouse albumin gave after dialysis a product which had the same characteristics as the 37°C reaction product. Finally incubation for 24 hr at 4°C was performed of a mixture containing 11 moles of L-phenylalanine per mole of albumin. In this case no significant binding could be demonstrated with paper electrophoresis.

The leukaemic tumor, N.J.A. which has been used in this study is thoroughly described by Olsen [3]. C3H/A mice in groups of ten inoculated intraperitoneally with 10^5 NJA tumor cells have a survival time of 10–13 days with a standard deviation <1 day. If L-phenylalanine mustard is administered in dosages of 2 mg/kg/day by ten daily i.p. injections beginning the fifth day, the average survival time will very consistently be increased by 5 days.

Table 1. *Increase in survival time of C3H/A mice following ten injections*

Treatment*	Treatment levels (mg/kg/day i.p.) L-phenylal. mustard	alb.	Increase in medium survival time over controls (%)
L-Phenylalanine mustard	2·0	—	40
Mouse-albumin	—	50	7†
Mouse-albumin/ L-phenylalanine m. 4°C	2·0	50	40
Mouse-albumin/ L-phenylalanine m. 20°C	2·0	50	3†
Mouse-albumin/ L-phenylalanine m. 37°C	2·0	50	2†
Hydrolysed L-phenylalanine mustard 5 min at 100°C	2·0	—	5†

*Treatment was begun on the fifth day after i.p. leukaemic inoculation and continued for 10 days.

†Not significantly different from controls.

Table 1 shows the results after treatment of two series of experiments with ten animals in each group, and it is seen that the albumin complexes produced after incubation with L-phenylalanine mustard at 20°C and 37°C was as inactive as hydrolyzed L-phenylalanine mustard, whereas incubation at 4°C with albumin did not alter the cytotoxic effect of this mustard. Similar results were obtained in experiments where bovine albumin was substituted for mouse albumin.

In conclusion, albumin does not prove to meet the requirements of being a carrier for L-phenylalanine mustard. Reactions with albumin at 20° and 37°C result in the formation of not cytotoxic complexes containing hydrolysed L-phenylalanine mustard. This may also happen *in vivo* as suggested by Cohn [4]. Therefore if the apparently increased affinity of the tumor tissue for albumin should be used as a means to increase the selectivity of cytotoxic compounds by attaching such compounds to albumin, less chemically reactive compounds than L-phenylalanine mustard may be explored for this purpose.

REFERENCES

1. H. Busch, E. Fujiwara and D. C. Firszt, Studies on the metabolism of radioactive albumin in tumor-bearing rats. *Cancer Res.* **21,** 371 (1961).
2. H. Busch, *An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell.* p. 353 Academic Press, New York (1962).
3. K. Olsen, A spontaneous transplantable C3H mouse leucosis (NJA). *Acta path. microbiol. scand.* **61,** 195 (1964).
4. P. Cohn, The distribution of radioactivity in tissues of the rat following the administration of a nitrogen mustard *Brit J. Cancer* **11,** 258 (1957).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 165–166. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Letter to the Editor

The Effect of Antiserum on the Metastasis of Ascites Cells as a Function of Time*

H. KRÖGER, E. STUTZ, M. ROTHER and S. NIEHOFF
Biochemisches Institut und Klinisches Strahlen-Institut, University of Freiburg (Germany)

PREVIOUS experiments have shown that the metastasis of ascites cells from the Yoshida sarcoma can be prevented to 60%, if antiserum against the tumor (produced in rabbits) and 6-mercaptopurine (6-MP) are given simultaneously [1]. In this paper our earlier results were confirmed with a larger number of rats, and, moreover, we show the dependence upon time of the effect demonstrated. The method was not changed [1].

Figure 1 suggests strongly the significance of a combined injection of antiserum and 6-MP in order to inhibit the development of the metastasis. Simultaneous administration of ascites cells from the Yoshida sarcoma and antiserum plus 6-MP results in an about 80%

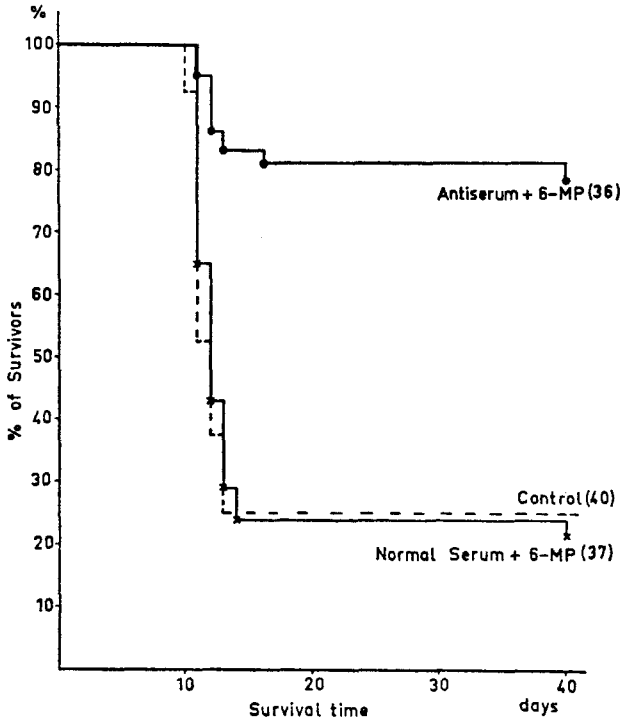


Fig. 1. *Influence of normal rabbit serum and antiserum against the Yoshida sarcoma, both plus* 6-*mercaptopurine* (6-*MP*), *on the metastasis of ascites cells from the tumor in rats.*

Directly before intravenous administration of the ascites cells (5×10^5 *cells*), 0,5 *ml of serum or antiserum* (*intravenously*) *and* 0,5 *ml* 6-*MP of a solution* 1 *mg/ml* (*subcutaneously into the groin*) *were injected. Equal amounts of serum and* 6-*MP were given on days*, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 *and* 13.

Number of rats between brackets.

*Supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

survival of rats. Among the control animals and the animals given normal rabbit serum only 20% survive the 40-day period.

The results concerning the dependence upon time between tumor application and injection of antiserum plus 6-MP are shown in Fig. 2. A difference of 24 hours between the administration of ascites cells and the first injection of antiserum plus 6-MP still results in about 70% survival. With increasing time between application and injection of antiserum plus 6-MP survival decreases. Thus, the rate of survival is dependent on the time elapsing between the injection of the ascites cells and the beginning of the therapy.

We like to conclude that the formation of solid Yoshida sarcomas can only be prevented for a limited period. The rapid growth of the tumour within 96 hr does no longer allow the antiserum to penetrate the tumour completely.

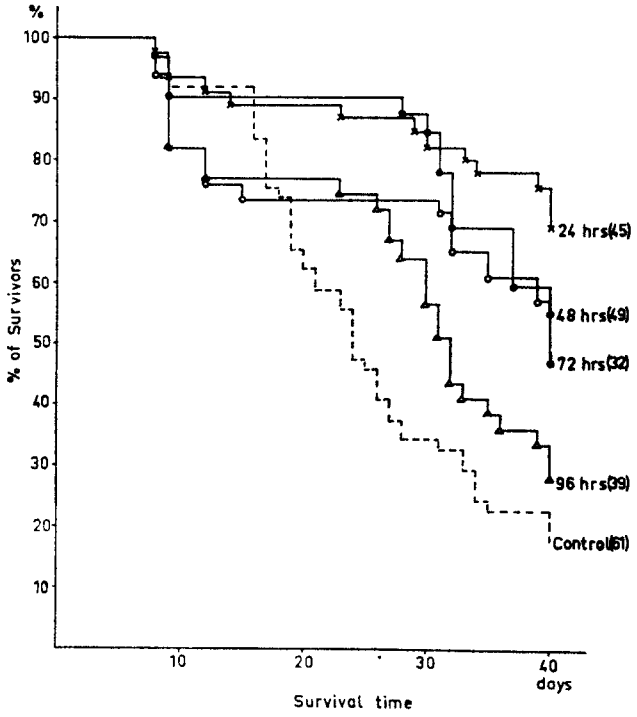


Fig. 2. Influence of antiserum against the Yoshida sarcoma plus 6-mercaptopurine (6-MP) on the metastasis of ascites cells from the tumour in rats, in dependence upon time.

The first injection of antiserum plus 6-MP was done at the periods of time indicated after the application of the ascites cells.

For details see Fig. 1.

REFERENCE

1. H. Kröger, E. Stutz, M. Rother and S. Niehoff, The influence of antiserum on the metastases of ascites cells from the Yoshida sarcoma, *Experientia* **22**, 300 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 167. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Announcement

IIIe Symposium International sur la Recherche Comparée dans les Leucémies, Paris 11–13 Juillet 1967

SYMPOSIUM organisé sous les auspices du "WORLD COMMITTEE FOR COMPARATIVE LEUKEMIA RESEARCH" — Comité d'organisation: H. Drieux, M. Boiron, A. Parodi.

Principaux sujets traités:

11 Juillet — Interaction entre cellules et virus oncogènes RNA.
— Progrès dans le domaine des virus leucémogènes.

12 Juillet — Leucémies bovines: Etiologie; Epidémiologie; Pathologie et diagnostic.

13 Juillet — Leucémies canines et félines.
— Leucémies humaines.

Pour tous renseignements et inscriptions, s'adresser:
Professeur Ag. A. Parodi: Ecole Vétérinaire — Alfort — 94
Professeur Ag. M. Boiron: Institut de Recherches sur les Leucémies Hôpital Saint-Louis — Paris Xe

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 169–181. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Un Essai Thérapeutique Clinique sur l'Irradiation des Cancers Amygdaliens par Faisceaux de Photons ou d'Electrons de 20 MeV

R. FLAMANT, E. MALAISE, J. DUTREIX, M. HAYEM, B. PIERQUIN, M. TUBIANA et A. DUTREIX*

ON A DISCUTÉ, dans de nombreux articles [1, 2], au cours de ces dernières années, les avantages thérapeutiques des faisceaux d'électrons par rapport aux faisceaux de rayons X de même énergie. Dans d'autres articles, on a comparé les effets radiobiologiques d'irradiations effectuées par électrons ou photons [3, 4]. Cependant, le problème de l'efficacité thérapeutique relative des électrons par rapport aux photons reste posé. Il nous a semblé qu'une réponse à cette question ne pouvait être apportée que par un essai comparatif.

Nous avons choisi de comparer l'effet thérapeutique immédiat de doses égales de radiations délivrées par ces deux rayonnements sur les cancers de l'amygdale, en prenant pour test d'efficacité la régression du volume tumoral au cours de l'irradiation. Cette localisation a été choisie en raison de sa fréquence et de la facilité avec laquelle on peut suivre l'évolution du volume tumoral.

1. MATERIEL ET METHODE

L'essai a été effectué à l'Institut Gustave Roussy de novembre 1962 à avril 1964, soit pendant une période de 17 mois.

a. *Définition de la maladie et choix des malades*

Nous avons retenu, pour l'essai, des malades atteints d'épithéliomas épidermoïdes de la loge amygdalienne proprement dite et de la région péri-amygdalienne (piliers, sillon glosso-amygdalien, lésion amygdalo-vélaire).

Ont été exclus de l'essai: les malades ayant reçu un traitement spécifique avant leur venue à l'Institut Gustave Roussy; les cancers de l'amygdale associés à une autre localisation cancéreuse, dans la mesure où cette dernière empêchait d'effectuer la radiothérapie sur l'amygdale dans les conditions prévues; certains malades jugés au-delà de toute possibilité thérapeutique, mais pour lesquels une irradiation à titre "psychologique" était souhaitable.

b. *Technique de traitement*

Au moment où l'essai a été effectué, le protocole de traitement des cancers de l'amygdale était le suivant:

*Travail du Département des Radiations (Chef de département: M. TUBIANA) de l'Institut Gustave Roussy (Directeur: P. DENOIX) et de l'Unité de Recherches Statistiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Directeur: D. SCHWARTZ).

L'équipe chargée de cet essai était ainsi composée: Coordinateurs: E. P. MALAISE et R. FLAMANT. Médecins examinateurs: J. DUTREIX, M. HAYEM, et B. PIERQUIN. Dosimétrie: A. DUTREIX. Radiobiologie Clinique: M. TUBIANA et A. WAMBERSIE. Analyse statistique: S. GUEGUEN.

Nous sommes reconnaissants au Dr. Y. CACHIN, Chef de l'Unité d'Oto-rhino-laryngologie, et au Dr. D. CHASSAGNE, radiothérapeute, de leur aide et de leurs conseils.

(1) irradiation de la tumeur amygdalienne et des chaînes ganglionnaires par radiothérapie transcutanée jusqu'à la dose de 4500 rads en 6 semaines (3 séances hebdomadaires de 250 rads).

(2) 15 à 30 jours après la fin de l'irradiation transcutanée, celle-ci est complétée par une curiethérapie interstitielle par fils d'iridium 192, adaptée à l'importance du reliquat tumoral qui reçoit ainsi un complément de dose de 4500 rads.

(3) un curage ganglionnaire homolatéral peut, selon le cas, être effectué à la fin de la radiothérapie.

Deux catégories thérapeutiques furent constituées selon une répartition au hasard: l'une correspondant à une irradiation par faisceau de photons de 21 MeV, l'autre par faisceau d'électrons de 20 MeV. Pour chaque type d'irradiation, on choisit le mode d'irradiation le mieux adapté aux caractéristiques du faisceau. Les isodoses, représentées sur la Fig. 1,

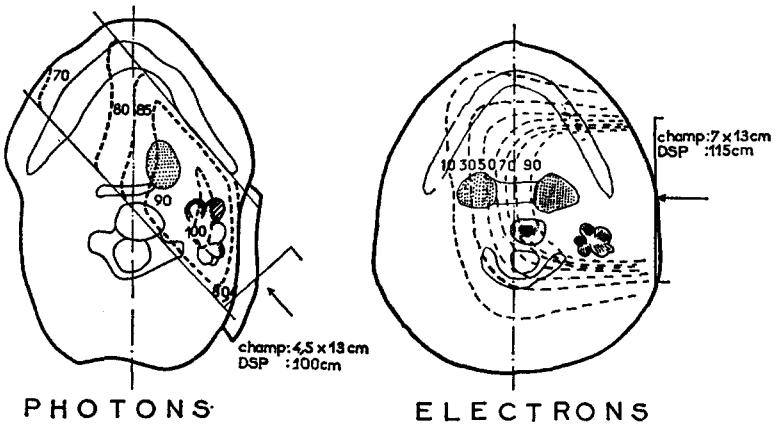


Fig. 1. *Technique de traitement utilisé avec le faisceau de photons de* 21 *MeV et celui d'électrons de* 20 *MeV.*

sont calculées pour un milieu homogène équivalent-eau. Pour les photons, la technique comportait un champ oblique postérieur d'environ 4,5 × 13 cm avec une DSP de 100 cm, irradiant simultanément la tumeur et les ganglions jugulo-carotidiens. Le débit était de 45 rads/min. Pour les électrons, on utilisa un champ latéral d'environ 7 × 13 cm avec une DSP de 115 cm. Ledébit était de 200 rads/min.

Les dimensions des champs sont évidemment adaptées aux conditions de chaque malade, en particulier en cas de volumineuse adénopathie.

c. *Dosimétrie*

Le protocole prévoyait, pour les électrons et les photons, des doses égales par séance, et trois séances de 250 rads "tumeur" par semaine. Il convient de préciser successivement:

la méthode de mesure de la dose en "rads"; la manière dont est définie la "dose tumeur"; enfin, l'écart entre le schéma thérapeutique prévu d'une part et les doses réellement délivrées par séances et le rythme des séances d'autre part.

(1) *La méthode de mesure de la dose en "rads."* Au début de l'essai, on ne disposait pas à l'Institut Gustave Roussy de dosimètre étalonné pour les photons et les électrons de 20 MeV. Dans ces conditions, les moniteurs du Bétatron ont été étalonnés par comparaison avec une chambre d'ionisation Baldwin en admettant pour cette chambre les mêmes coefficients d'étalonnage pour les électrons et les photons que pour le ^{60}Co, cette façon de procéder étant d'ailleurs courante à l'époque. En réalité, les comparaisons effectuées ultérieurement par dosimètre chimique au $FeSO_4$ ont donné, pour les électrons et les photons, des coefficients d'étalonnage (en rads) par unité de lecture de 0,93 et 0,98, si on admet pour G des valeurs égales, respectivement, à 15, 17 [5] et 15,50 [6]. Il en résulte une différence systématique de 5% entre les doses délivrées par les électrons et les photons. Si, au lieu d'adopter des valeurs de G égales à 15,50 et 15,17, on admet une valeur de G constante (15,45) pour les électrons et photons de haute énergie, comme le fait l'A.I.E.A. de Vienne, la différence systématique entre les doses délivrées par les électrons et les photons est plus importante et atteint 7%.

2. *La définition de la "dose-tumeur."* Il n'est évidemment pas possible de délivrer une dose homogène à la totalité du volume-cible ni d'obtenir une distribution identique de la dose au niveau du volume tumoral et péri-tumoral avec les deux techniques de traitement.

La "dose-tumeur" a été définie comme la

dose minimale à la limite du volume-cible. Dans le cas des photons, elle correspond à l'isodose 90%; les tissus situés à l'intérieur du volume-cible reçoivent donc une dose comprise entre la dose-tumeur indiquée et cette dose augmentée de 10%.

Dans le cas des électrons, la dose-tumeur correspond à l'isodose 80%, les tissus situés à l'intérieur du volume-cible reçoivent donc une dose comprise entre la dose tumeur indiquée et cette dose augmentée de 20%.

3. *Fluctuations dans les doses-tumeur par séance et dans le rythme des séances.* Les fluctuations du débit des faisceaux du Bétatron expliquent que les doses reçues par les tissus ne soient pas toujours égales à celles que l'on aurait désiré délivrer. Dans le cas des photons, l'écart moyen est nul; dans celui des électrons, la dose délivrée est en moyenne de 2% inférieure à celle prévue. Cette différence de 2% s'ajoute à celle due aux erreurs d'étalonnage.

D'autre part, les nécessités de l'entretien de l'appareil et les jours fériés ont modifié quelque peu le rythme prévu des séances: pour les électrons, on a donné en moyenne 2,9 séances par semaine au lieu de 3,0 pour les photons.

En conclusion, si on tient compte, d'une part, des erreurs systématiques liées à l'étalonnage des dosimètres et, d'autre part, des fluctuations sur les doses réelles par séance, on obtient respectivement pour les électrons et les photons, des doses moyennes par séance de 230 et 246 rads au lieu des 250 rads initialement prévus (Tableau 1). De plus, ces séances ont été délivrées avec un rythme légèrement plus faible pour les électrons que pour les photons (2,9 séances par semaine au lieu de 3,0) (Tableau 2).

Tableau 1. *Dose moyenne par séance*

	Doses prévues (rads)	"Doses" délivrées (lectures dosimètres)	Facteur d'étalonnage du dosimètre	Dose délivrée (rads)
Electrons	250	246	0,93	230
Photons	250	250	0,98	246
Rapport	1	0,98	0,95	0,93

Tableau 2. *Nombre moyen de séances*

	Nombre moyen de séances par semaine	
	prévu	donné
Electrons	3	2,9
Photons	3	3,0
Rapport	1	0,967

d. *Appréciation des effets*

Le critère essentiel est la *régression* de la tumeur amygdalienne dont l'évolution repose sur un jugement global du clinicien qui risque toujours d'être subjectif. Cet inconvénient n'aurait pas été grave si l'on avait pu réaliser une observation "à l'aveugle"; mais celle-ci était rendue difficile par l'existence, dès la troisième semaine de traitement, de réactions cutanées différentes selon le mode de radiothérapie.

Pour remédier à cette difficulté, on s'efforça de rendre plus quantitative et objective l'évaluation de l'extension tumorale. La région amygdalienne fut "découpée" en un certain nombre de zones; à chacune d'elles correspondait un nombre plus ou moins important de cases selon son importance topographique (Fig. 2). L'extension tumorale était ainsi reproduite selon une cartographie anatomique, le nombre de cases envahies constituant un mode d'appréciation analytique et relativement objective de la tumeur.

De plus, pour supprimer, dans la mesure du possible, le coefficient personnel d'interprétation, les examens furent faits par 3 observateurs jugeant indépendamment l'un de l'autre: deux radiothérapeutes et un oto-rhino-laryngologiste. Chaque observateur faisait un bilan initial avant la mise en route du traitement, puis un examen chaque semaine et un bilan en fin de traitement. Lors de chaque consultation, il commençait par remplir la partie analytique, indépendamment de toute information sur les examens antérieurs. Puis il consultaut les feuilles précédentes de son dossier personnel et exprimait un jugement global sous la forme d'un "pourcentage d'extension tumorale," apprécié par rapport à l'état initial posé, égal à 100% (Fig. 2).

Les réactions cutanée et muqueuse furent également consignées.

e. *Mode d'analyse des données*

1. *Interprétation des informations recueillies.*

Nom et Prénom du Malade.....
Nom du Médecin .....
N° du Dossier..... ☐☐ ☐☐☐☐
Date de l'Examen ..... ☐☐ ☐☐☐☐

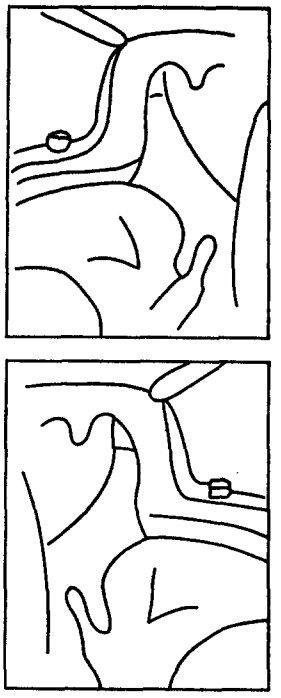
I — Analyse de l'extension nulle 0, oui 1, impossible à préciser X

A — Zone amygdalienne

Amygdale	☐☐
Zone sous-amygdalienne	☐
Pilier antérieur	☐☐☐
Pilier postérieur	☐☐☐
Fossette sus-amygdalienne	☐
Sillon glosso-amygdalien	☐☐☐
Hémi-voile mobile	☐☐☐

B — Structures avoisinantes

Voile opposé	☐
Voûte palatine	☐
Gencive supérieure	☐
Cavum	☐☐
R.B.M.I.	☐☐
Commissure inter-maxillaire	☐
Gencive inférieure	☐
Plancher	☐
Zone de jonction	☐
Langue mobile	☐☐
Hémi-base de langue	☐☐☐
Base de langue opposée	☐
Vallécule	☐
Carrefour et sinus piriforme	☐☐
Paroi latérale et postérieure de l'oropharynx	☐☐



II — Extension tumorale en % ..... ☐☐

Fig. 2. Extrait de la fiche codifiée concernant la mesure de l'extension tumorale.

On traça, pour chaque cas et chaque observateur, une courbe d'évolution de l'extension tumorale.

Comme les examens de surveillance n'avaient pas toujours été faits chaque semaine par les trois médecins, on a été conduit à éliminer un certain nombre de cas pour chaque observateur et, même pour certains calculs, à ne tenir compte que de deux observateurs, le troisième n'ayant effectué qu'un nombre insuffisant d'observations.

2. *Interprétation statistique.* Les tests statistiques habituels n'ont pas toujours pu être utilisés étant donné le petit nombre de cas et le fait que les caractères ne se distribuaient pas selon une loi normale. On a donc eu recours à des tests non paramétriques faisant appel à la notion de classement des caractères étudiés vis-à-vis les uns des autres.

2. RESULTATS

Pendant la période de l'essai, 133 malades atteints de cancer de l'amygdale se sont présentés à l'Institut Gustave Roussy, 41 cas ont été inclus dans l'essai: 22 cancers ont été traités par photons et 19 par électrons. La description de ce groupe en fonction des différentes caractéristiques cliniques est donnée dans le Tableau 3.

La majorité des malades est constituée par des hommes (37 sur 41). Les deux sièges les plus fréquents sont la loge amygdalienne et le pilier antérieur. Une adénopathie clinique existe dans 76% des cas.

a. *Comparabilité des malades traités par photons et par électrons*

Les deux catégories de malades, répartis au hasard entre les deux modes d'irradiation, sont comparables pour toutes les caractéristiques séméiologiques notées lors du bilan initial (Tableau 3). Les quelques différences enregistrées sont dans les limites de fluctuations d'échantillonnage.

b. *Comparabilité des médecins observateurs*

Nous avons cherché s'il existait des différences de jugement entre les trois observateurs en ce qui concernait l'appréciation de l'extension tumorale, tant qualitative que quantitative. Deux des médecins jugent de façon identique. Le troisième a une cotation plus basse et considère, en général, la tumeur comme moins

Tableau 3. Description du groupe de malades

		Photons	Electrons	Total
Nombre de malades		22	19	41
Sexe	Hommes	19	18	37
	Femmes	3	1	4
Age		59 ans	61 ans	60 ans
Localisation	Loge amygdalienne	8	9	17
	Pilier antérieur	10	5	15
	Pilier postérieur		1	1
	Sillon glosso-amygdalien	4	1	5
	Voile		1	1
	Point de départ non précisé		2	2
Côté	Droit	8	10	18
	Gauche	14	9	23
Aspect macroscopique dominant	Végétation	10	9	19
	Ulcération	7	5	12
	Infiltration	5	4	9
	Non déterminé	0	1	1
Extension de la tumeur (répartition en T selon le syst. TNM)	T1 T2	6	5	11
	T3 T4	16	14	30
Adénopathie cliniquement perceptible	Acune	5	5	10
	Homolatérale	10	16	26
	Controlatérale	1	1	2
	Bilatérale	3	0	3

étendue. Mais dans l'ensemble, les courbes d'évolution de l'extension tumorale des trois observateurs sont en bonne concordance.

c. *Comparaison des malades traités par photons et par électrons*

Les comparaisons ont été faites pour chaque observateur indépendamment puis en les regroupant par 2 ou 3 puisque, comme nous l'avons vu, leurs observations sont comparables.

1. *Pourcentage de tumeur résiduelle* (Tableau 4).

Tableau 4. Evolution du pourcentage de tumeur résiduelle sous traitement par rapport à la tumeur primitive (100%)

Durée du traitement (jours)		9e (%)	19e (%)	28e (%)	37e (%)
Observateur n° 1	P	86	60	38	28
			+	++	
	E	94	85	68	49
Observateur n° 2	P	94	70	51	36
	E	91	81	69	54
Moyenne des 2 premiers observateurs	P	90	65	47	33
			+	+	
	E	91	82	66	49
Moyenne des trois observateurs	P	90	65	48	32
			+	+	
	E	91	81	65	47

P, photons; E, electrons.
Signification: + $p = p,05$
+ $p = 0,02$
++ $p = 0,01$

Les valeurs "extension turmorale en %" (Fig. 2) ont permis de tracer, pour chaque malade, les 3 courbes de régression tumorale, au cours du temps, appréciée par chaque observateur.

On a déduit, pour chaque observateur, la courbe moyenne relative à la série "Photons" et à la série "Electrons."

Les résultats obtenus pour les différents observateurs sont comparés dans le Tableau 4.

Si les différences sont les plus nettes pour l'observateur n° 1, elles sont dans le même sens pour l'observateur n° 2. Un jugement d'ensemble est donné à la dernière ligne, établi en prenant pour chaque malade la moyenne des trois observateurs. Ces données sont illustrées sur la Fig. 3 où l'on voit les deux courbes diverger nettement dès le 9e jour.

Au 9e jour, il n'existe pratiquement aucune différence. Après la deuxième semaine, la proportion de tumeur résiduelle est plus petite pour la catégorie photons que pour la catégorie électrons. Les différences sont nettement significatives après 19 jours et 28 jours. Après 37 jours, les différences restent du même ordre bien que non significatives, mais il faut tenir compte d'une diminution des effectifs, les examens faits le 37e jour étant moins nombreux que ceux faits aux périodes précédentes.

Au 37e jour, les pourcentages de tumeur résiduelle sont de 32% pour les photons et de 47% pour les électrons.

La régression à 50% est, d'après les courbes de la Fig. 3, obtenue au 27e jour du traitement pour la série "photons" et au 36e jour pour la série "électrons"; le rapport entre ces durées d'irradiation est égal à 0,75 (Fig. 3).

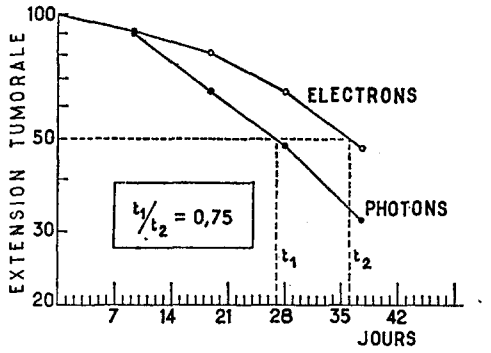


Fig. 3. Evolution en fonction de la durée de traitement du volume tumoral.

2. *Etude analytique de l'extension*

Nous avons étudié séparément la région amygdalienne et les structures avoisinantes.

La première comparaison porte sur la diminution du nombre de zones envahies dans chacune des 2 régions amygdaliennes et avoisinantes (Tableau 5).

La régression est plus importante pour la catégorie "photons" que pour la catégorie "électrons", mais les différences ne paraissent pas très importantes. Cette comparaison qui porte sur la différence entre l'extension au départ et l'extension sous traitement ne tient pas compte de l'importance de l'extension initiale: or, la diminution des zones envahies a d'autant plus de chance d'être nette que la tumeur était plus étendue au départ.

Nous avons donc fait une seconde comparaison en considérant cette fois la décroissance relative, c'est-à-dire la diminution rapportée au volume initial. Pour cela, nous avons étudié

Tableau 5. Evolution sous traitement du nombre moyen de zones envahies

Durée de traitement (en jours)		9e	19e	28e	37e
A. *Région amygdalienne*					
Observateur n° 1	P	0,1	1,0	2,1	2,3
	E	0,6	0,5	1,7	3,0
Observateur n° 2	P	0,3	1,7	2,9 $p = 0,10$	4,3
	E	0,2	0,4	1,4	3,0
B. *Région avoisinante*					
Observateur n° 1	P	0,4	1,0	1,5 $p = 0,10$	1,7
	E	*	0,2	0,5	1,2
Observateur n° 2	P	0,5	0,8	1,3	2,2
	E	*	1,5	0,6	1,2

*Il semble qu'il n'y ait pas de diminution de zones envahies.
P, photons; E, electrons.
Significations: + $p = 0,05$
+· $p = 0,02$

le pourcentage de zones envahies au départ (Tableau 6). D'une façon générale, la proportion de zones envahies est plus petite pour la catégorie "électrons". Il existe trois différences significatives dont une nette le 28e jour pour l'observateur n° 1 en ce qui concerne les structures avoisinantes.

paré la survie des deux groupes de malades (Tableau 7). Les différences ne sont pas significatives.

3. DISCUSSION

Cette étude a mis en évidence une différence entre la vitesse des régressions tumorales obser-

Tableau 6. *Evolution sous traitement du pourcentage de zones envahies**

Durée du taitement (en jours)		9e (%)	19e (%)	28e (%)	37e (%)
A. *Région amygdalienne*					
Observateur n° 1	P	100	78	50	47
	E	100	100	76 +	64
Observateur n° 2	P	97	75	45	35
	E	100	100 +	84	55
B. *Région avoisinante*					
Observateur n° 1	P	89	75	32	17
	E	100	100	75 ++	57
Observateur n° 2	P	85	70	45	25
	E	97	100	63	75

*Les pourcentages donnés sont les valeurs médianes (les chiffres observés se répartissent en nombre égal de part et d'autre de la valeur médiane).
P, photons; E, electrons.
Significations: + $p = 0{,}05$
++ $p = 0{,}01$

Ce second mode de comparaison apporte donc des résultats plus positifs que le premier. Les résultats ainsi obtenus confirment ceux trouvés pour le pourcentage de tumeur résiduelle. On peut conclure, en ce qui concerne l'extension tumorale, qu'à durée égale de traitement, la régression sous photonthérapie est significativement plus importante que sous électronthérapie.

3. *Signes d'intolérance*

Nous avons d'abord étudié l'intensité de la réaction en prenant le degré le plus fort noté au cours des examens de surveillance. Il n'existe aucune différence significative.

Puis nous avons tenu compte du moment d'apparition des signes d'intolérance. Une seule différence significative au seuil de 5% est constatée. Elle concerne l'observateur n° 2 qui constate une radiomucite homolatérale plus précoce dans la catégorie "électrons" que dans la catégorie "photons". Les deux catégories de malades ne diffèrent donc guère en ce qui concerne les signes d'intolérance si ce n'est une radiomucite homolatérale un peu plus importante en électronthérapie.

4. *Survie*

A titre indicatif, bien que ce critère n'ait pas été retenu au départ de l'essai, nous avons com-

Tableau 7. *Survie des* 2 *catégories de malades*

	Taux de survie à		
	9 mois (%)	1 an (%)	18 mois (%)
Photons	86	71	57
Electrons	74	59	52

vées chez des patients traités soit aux électronss soit aux photons. C'est ainsi que les durées des traitements nécessaires pour obtenir une même régression de 50% du volume tumoral sont dans un rapport de 0,75.

Il convient d'emblée de souligner que l'efficacité biologique relative* (EBR) des deux rayonnements n'est pas la seule différence en cause entre ces deux modalités thérapeutiques. En effet, pour une même valeur de la "dose

*L'efficacité biologique relative (RBE des auteurs anglo-saxons) de 2 rayonnements se définit comme le rapport de doses nécessaires pour provoquer un même effet biologique, toutes choses restant par ailleurs égales [7]. Elle est essentiellement liée au mode de transfert de l'énergie à la matière, et sa variation dépend, de façon étroite, du transfert énergie linéaire (TEL). Les TEL de faisceaux d'électrons et de photons de même énergie n'ont pas été établis avec une précision suffisante pour permettre de savoir s'il existe entre eux une différence significative.

tumeur," la distribution de la dose, au niveau des régions tumorales et surtout péritumorales, est assez différente (voir plus haut). Cette disparité, liée à la "qualité" des rayonnements, était acceptée dès le début de l'étude puisqu'on se proposait de comparer les résultats de deux modalités thérapeutiques, ce qui impliquait non seulement une différence d'EBR mais également une différence dans la distribution de la dose au niveau des volumes irradiés.

A cette disparité reconnue et acceptée, s'en sont ajoutées d'autres. Les insuffisances des methodes d'étalonnage dont nous disposions au début de l'essai ont introduit, comme nous l'avons vu, une différence systématique d'environ 5% entre les "doses-tumeurs" délivrées par séance au moyens des photons et des électrons. Cette différence a été accentuée par les fluctuations dans les doses réelles délivrées par séance. En conséquence, les doses par séance ont été respectivement de 246 et 230 rads (soit une différence de 7%). De plus, le nombre moyen de séances par semaine a été également différent (3,0 et 2,9) soit une différence de 3%.

Il faut essayer d'évaluer l'influence de cette disparité des doses dans le temps avant de déduire de cette étude une indication sur l'efficacité des deux modalités thérapeutiques.

Le rôle de la dose par fraction et du rythme de traitement ne peut être évalué avec certitude que si l'on connaît la relation entre la dose et la proportion de cellules survivantes. Lorsque celle-ci est ignorée, ce qui est le cas, il faut avoir recours à des modèles de populations cellulaires. Une fois admises certaines valeurs pour les paramètres n et Do*, on peut calculer le taux de survie cellulaire obtenu pour chacun des deux traitements fractionnés que nous avons effectués et en déduire, en particulier, le rapport des durées de traitement correspondant à un taux de survie cellulaire donné. Ce problème de l'application des modèles de populations cellulaires à l'étude de la régression tumorale a été discuté par Fowler et Stern [8].

L'application d'un modèle théorique à l'étude clinique de la régression de la tumeur amygdalienne repose sur deux hypothèses: on admet, d'une part, que la masse tumorale est constituée d'une population cellulaire homogène et, d'autre part, que, quelles que soient les modalités thérapeutiques, un pourcentage égal de régression tumorale à un instant donné correspond à un pourcentage égal de cellules tuées. Ces hypothèses paraissent d'autant plus raisonnables qu'il s'agit au départ de groupes de tumeurs comparables, et que les durées des traitements nécessaires pour obtenir le taux de régression considéré (50%) sont du même ordre.

Si on admet, par exemple, pour le paramètre Do la valeur 150 rads, et pour n la valeur 3, on calcule que pour des traitements fractionnés comportant respectivement 246 et 230 rads par séance, les doses totales nécessaires pour tuer une même proportion de cellules sont dans un rapport de 0,95 (Fig. 4). En considérant non plus le rapport des doses totales mais celui du nombre de séances, on obtient: $0{,}95 \times 230/246 = 0{,}89$ (Fig. 5).

Enfin, en tenant compte du rythme légèrement différent (en moyenne 3,0 et 2,9 séances par semaine) réalisé pour les photons et les électrons, on obtient, pour les durées d'irradiation aboutissant à la même proportion de cellules survivantes, un rapport de: $0{,}89 \times 2{,}9/3{,}0 = 0{,}86$ (Fig. 6).

En conséquence, dans la mesure où on admet la validité des modèles de populations cellulaires pour suivre la régression tumorale et les valeurs $n = 3$ et $Do = 150$ rads, les différences dans l'importance et le rythme des séances, indépendamment de tout autre facteur entraînent un rapport de 0,86 entre les durées des traitements aux photons et aux électrons pour un même pourcentage de régression tumorale.

---

*Des expériences effectuées tant *in vitro* qu'*in vivo* ont montré que, si on expose une population cellulaire homogène à des doses croissantes de radiations ionisantes, la courbe représentant la fraction de cellules survivantes présente un "épaulement" suivi d'une partie exponentielle. La pente de la partie exponentielle est habituellement définie par la valeur de Do: dose qui réduit la fraction de survivants à 0,37, L'extrapolation en coordonnées semi-logarithmiques à la dose zéro de la partie exponentielle de la courbe définit la valeur du "nombre d'extrapolation" n..

D'autre part, pour un traitement "fractionné", on doit tenir compte du rôle important joué par les phénomènes de restauration intracellulaire [9]. Si deux séances d'irradiation sont séparées par un intervalle de plus d'une vingtaine d'heures, on retrouve pour la seconde séance la même courbe de survie et le même épaulement que pour la première dose totale égale; une irradiation effectuée en séances est donc moins efficace [9].

Au point de vue théorique, on peut obtenir une courbe de survie superposable aux courbes expérimentales en assimilant la cellule à un modèle à "n cibles," la mort de la cellule exigeant la destruction de la totalité des cibles et chaque cible pouvant être détruite par "un coup."

Le nombre de cibles correspond au nombre d'extrapolation "n". Les phénomènes de restauration intracellulaire pourraient par exemple consister pour une cellule lésée à réparer ses $n-1$ "cibles" détruites.

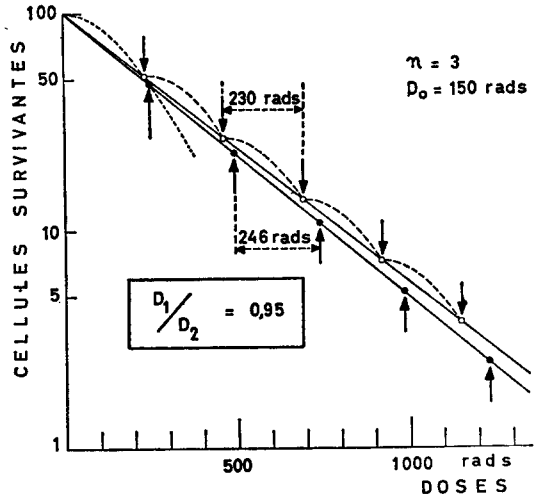


Fig. 4. *Pourcentage de cellules survivantes en fonction de la dose après une irradiation fractionnée quand la dose par séance est de* 230 *rads et quand elle est de* 246 *rads. On admet pour les populations cellulaires considérées un nombre d'extrapolations* $n = 3$, *et une dose léthale moyenne* $D_0 = 150$ *rads.*

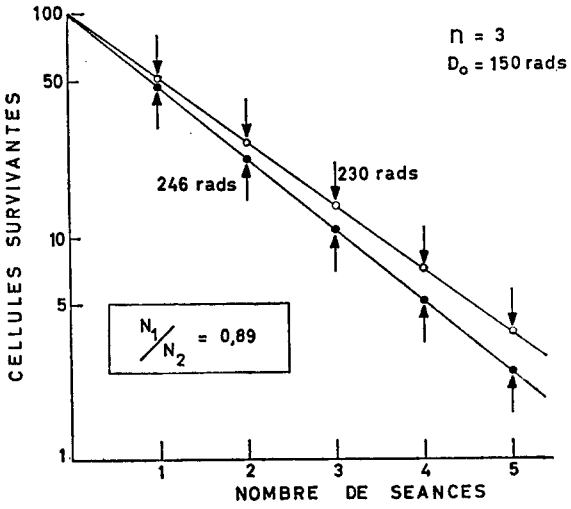


Fig. 5. *Pourcentage de cellules survivantes en fonction du nombre de séances se plaçant dans des conditions identiques à celles de la Fig.* 2.

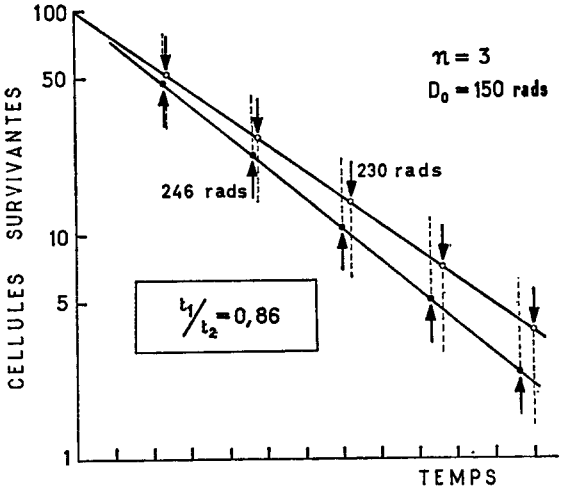


Fig. 6. *Pourcentage de cellules survivantes en fonction de la durée de traitement pour la même population cellulaire que dans les Figs.* 2 *et* 3 *et en considérant de plus que le nombre de séances est de trois par semaine pour la population irradiée à la dose de* 246 *rads/séance, et de* 2,9 *par semaine pour la population irradiée à la dose de* 230 *rads/séance.*

Pour rechercher si les différences entre les régressions tumorales constatées restent significatives, il faut donc multiplier les temps par 0,86 en ce qui concerne les électrons. C'est-à-dire que 20 jours de traitement aux électrons deviennent équivalents à 17,2 jours de traitement aux photons et, qu'afin de rendre la comparaison valable, il faut comparer le volume tumoral résiduel, après 20 jours de traitement aux électrons, au volume tumoral après 17 jours de traitement aux photons. Pour les observations effectuées sur chaque malade par les 3 lecteurs, on a introduit ce facteur de correction dans le calcul du pourcentage de tumeur résiduelle. Dans ces conditions, la différence entre photons et électrons n'est plus significative ($p = 0{,}16$ au 19e jour et $p = 0{,}33$ au 28e jour).

On peut se demander si ces conclusions resteraient valables en choissisant pour les paramètres n et *D*o d'autres valeurs. La plupart des résultats expérimentaux sont compatibles avec une valeur de *D*o comprise entre 110 et 180 rads. Quant aux valeurs de n, elles varient dans de plus larges limites; des valeurs allant de 1 à 10 et même davantage ont en effet été publiées. Nous avons repris les calculs précédents pour les valeurs de *D*o égales à 110, 150 et 180 rads et pour des valeurs de *n* égales à 2, 3 et 8, qui paraissent des limites raisonnables. Ces calculs montrent que la valeur de *D*o n'est pas critique, mais le paramètre "n" a beaucoup plus d'importance. Toutefois, quelles que soient les valeurs adoptées pour les paramètres n et *D*o, les différences entre les rapports prévus par le calcul théorique et le rapport 0,75 observé (Tableau 8) ne peuvent plus être considérées comme significatives.

Tableau 8. *Rapport des durées de deux traitements fractionnés conduisant à un même taux survie cellulaire*

*D*o (rads)	*n*			
	1	2	3	8
110	0,90	0,88	0,87	0,80
150	0,90	0,88	0,86	0,76
180	0,90	0,88	0,85	0,74

Les doses par fraction (246 et 230 rads) et le rythme des fractions (dans le rapport 30 à 29) sont ceux de notre étude clinique. Le calcul a été effectué en considérant différentes valeurs des paramètres *n* et *D*o pour la population de cellule tumorale étudiée.

Ainsi, les différences dans les doses par séance et le rythme des séances pourraient suffire à expliquer les différences observées dans les régressions tumorales obtenues au moyen des électrons et des photons. Toutefois, il est intéressant de discuter l'influence éventuelle d'autres facteurs, en particulier l'étalement, l'hétérogénéité, la distribution de la dose au niveau du volume tumoral et péritumoral et enfin l'EBR.

L'étalement du traitement correspondant à une réduction de 50% de l'extension tumorale a été différent pour les photons (27 jours) et les électrons (36 jours). L'influence de cette différence d'étalement s'additionne à celle du fractionnement que nous venons de discuter. Les expériences de Fowler et Stern semblent montrer que son importance est faible comparée à celle du fractionnement (rapport d'importance de 1 à 6 pour la gamme d'étalement considérée). On peut estimer que l'étalement plus long dans le cas des électrons correspond à une réduction de dose de l'ordre de 2 à 3%.

Toujours en ce qui concerne le facteur temps, il faut enfin noter que les débits n'ont pas été semblables pour les électrons et les photons (débits moyens respectivement de 200 et 45 rads/min). Dans l'état actuel de nos connaissances, ces différences de débits ne paraissent pas avoir de signification.

La distribution des doses ayant été calculée en milieu homogène équivalent-eau, il faut vérifier dans quelle mesure l'écran constitué par le maxillaire ne réduit pas la dose à l'amygdale dans le cas des électrons. Cette possibilité a été évoquée par plusieurs auteurs [10–15]. En particulier, Boone et coll. [11], travaillant avec un faisceau d'électrons de 18 MeV ont montré *in vivo* que la présence du maxillaire réduit d'environ 10% la dose au niveau de l'amygdale. On peut également songer à une perturbation dans la répartition des doses, due aux cavités aériques: dans le cas présent, la cavité buccale et le rhino-pharynx. Certes, une telle cavité perturbe essentiellement la dose en aval de la cavité, région où il n'y a pas de lésions. Cependant, nous avons montré, ainsi que plusieurs auteurs, qu'une telle cavité pouvait également modifier la dose sur les parois latérales.

Afin d'étudier l'influence possible de ces facteurs, des mesures ont été effectuées *in vivo*, avec une chambre endocavitaire Philipps glissée dans le sillon gingivo-lingual jusqu'au niveau du pilier antérieur. Les mesures ont donné des doses égales à celles attendues à la même profondeur (3 cm) dans un milieu homogène équivalent-eau.

D'autres mesures ont été effectuées dans un fantôme d'eau près de la surface duquel on avait introduit un maxillaire humain injecté de plastique sous vide. Elles ont montré que l'introduction du maxillaire décalait les isodoses de 5 mm vers l'entrée du fantôme. Ceci a pour

effet de ramener l'isodose 80% de 7 à 6,5 cm de profondeur. Or, des mensurations des diamètres transverses biangulo-maxillaires ont été faites chez 15 de nos malades; l'épaisseur moyenne a été de 12,3 cm, avec un minimum de 10 cm et un maximum de 13,5 cm (chez un sujet porteur d'une grosse adénopathie). L'isodose 80% au niveau de laquelle la "dose tumeur" a été définie atteint donc la ligne médiane et englobe par conséquent la totalité de la tumeur dans la mesure où celle-ci ne dépasse pas la ligne médiane, ce qui fut le cas pour les malades que nous avons eus à traiter. Un sous-dosage d'une portion de la tumeur ne peut donc être retenu pour expliquer les différences de régression tumorale observées.

La disparité dans la distribution des doses est vraisemblablement un facteur plus important pour expliquer une différence d'efficacité entre les deux modalités thérapeutiques comparées. En effet, les caractéristiques de chacun des deux rayonnements ne permettent pas de réaliser dans le volume tumoral une distribution de la dose identique par les deux types de traitement. D'autre part, bien que dans les deux cas la dose intégrale soit voisine, la configuration et le volume des tissus irradiés sont différents; avec les électrons, la région tumorale est entourée de toute part d'une zone où la dose diminue lentement lorsque l'on s'écarte de la tumeur. Dans le cas des photons, un volume tissulaire cylindrique reçoit une dose pratiquement égale à celle reçue par la tumeur, mais à l'extérieur de ce volume, les tissus ne sont que peu irradiés.

Or on sait que, dans le cas des tissus sains, les réactions varient en fonction de l'importance et de la distribution des volumes irradiés. Bien qu'elle n'ait jamais été démontrée, cette influence ne peut être rejetée *a priori* dans le cas des tumeurs.

Une différence d'EBR entre les électrons et les photons pourrait enfin être invoquée. On ne peut certes pas exclure une différence d'EBR sur les tissus tumoraux *in vivo*, mais cette hypothèse paraît peu vraisemblable, et elle est inutile. En effet, des expériences récentes effectuées dans notre laboratoire, non seulement sur des micro-organismes [3, 4] mais aussi sur des mammifères, ont confirmé l'égalité des efficacités biologiques des électrons et des photons de 20MeV (Wambersie et Coll., expériences en cours de publication), et l'absence de variation de l'EBR en profondeur pour les électrons [4].

CONCLUSION

Pour expliquer les différences dans les régressions tumorales observées chez les patients traités aux électrons ou aux photons, il faut tenir compte d'abord des doses plus faibles par séance et du rythme légèrement plus lent réalisés dans le cas des électrons. Ces différences ont été "amplifiées" par le jeu des phénomènes de restauration intracellulaire, et elles peuvent être rendues responsables de la plus grande partie des différences observées dans les régressions tumorales. Ce travail souligne donc l'importance du facteur temps et celle d'une dosimétrie précise puisqu'une différence relativement faible de dose est amplifiée par la répétition des séances.

En ce qui concerne l'EBR, les résultats de cette étude clinique sont compatibles avec une EBR de 1 des électrons par rapport aux photons de même énergie, valeur qui a été observée au cours d'expériences radiobiologiques réalisées dans le laboratoire.

Au point de vue méthodologique, ce travail démontre la possibilité de suivre quantitativement l'évolution de la taille d'une tumeur sous traitement, et d'utiliser cette régression pour comparer l'efficacité immédiate de deux types de traitement. C'est ainsi que, dans ce cas particulier, une différence relativement faible d'efficacité thérapeutique par séance a pu être mise en évidence par l'observation d'un nombre limité de malades. Il faut souligner l'intérêt d'un essai thérapeutique rigoureusement contrôlé pour mettre en évidence un tel résultat.

RESUME

Un essai clinique a été entrepris pour comparer l'effet thérapeutique immédiat, sur les cancers de l'amygdale, de l'irradiation par photons de 21 *MeV et par électrons de* 20 *MeV. Il a porté sur* 22 *cas traités par photons et* 19 *cas traités par électrons.*

La constatation d'une régression tumorale moins importante avec les électrons qu'avec les photons peut s'expliquer par l'administration de doses plus faibles par séance et par un rythme légèrement plus lent.

En ce qui concerne l'efficacité biologique relative (EBR), les résultats de cette étude clinique sont compatibles avec une EBR de 1 *des électrons par rapport aux photons de même énergie, valeur qui a été observée au cours d'expériences radiobiologiques réalisées dans le laboratoire.*

Les auteurs mettent également en évidence un certain nombre de problèmes méthodologiques qui se sont posés au cours de cet essai, et exposent les solutions qui y ont été apportées.

SUMMARY

A clinical study has been carried out in order to compare the immediate effects of 21 *MeV photon and* 20 *MeV electron irradiation on cancer of the tonsil. Twenty-two patients were treated by photons and nineteen by electrons.*

A smaller regression was observed with electrons than with photons and this was explained by the administration of lower doses at each sitting and by a slower rhythm of administration.

The results of this clinical study are compatible with a relative biological effectiveness of 1 *for the electrons as compared with photons of same energy: this value has been observed in radiobiological experiments carried out in this laboratory.*

ZUSSAMMENFASSUNG

In einer klinisch-therapeutischen Untersuchung an Tonsillentumoren wurde der unmittelbare therapeutische Effekt von Photonenbestrahlungen mit 21 *MeV mit demjenigen von Elektronenbestrahlungen mit* 20 *MeV verglichen.* 22 *Patienten wurden mit Photonen und* 19 *mit Elektronen behandelt.*

Die Feststellung, dass die Tumorregression unter Elektronenbestrahlung weniger beträchtlich war als unter Photonenbestrahlung, kann durch die kleinere Strahlendosis pro Sitzung und durch etwas längere Intervalle erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser klinischen Prüfung sind vereinbar mit einer relativen biologischen Wirksamkeit der Elektronen von 1 *bezogen auf Photonen der gleichen Energie — eine Grösse, die sich aus radiobiologischen Laborversuchen ergeben hat.*

Die Autoren erörtern auch eine Anzahl methodologischer Probleme, die sich im Verlaufe dieser Untersuchung gestellt haben, und erläutern die Lösungen, de sie dafür gebracht haben.

BIBLIOGRAPHIE

1. C. Botstein et R. J. Schulz, Experience with high energy electron beam therapy. *Progr. Radiat. Ther.* **3,** 27 (1965).
2. A. Zuppinger, Quelques considérations sur la radiothérapie par les électrons accélérés, *Ann. Radiol.* **4,** 455 (1961).
3. A. Wambersie, A. Dutreix, J. Dutreix et M. Tubiana, Depth dose curves determined by ionization, film density, ferrous sulphate and survival rate of E. Coli bacteria and diploid yeast using a 20 MeV electron beam. In: *Symposium on High-Energy Electrons, Montreux,* 1964, p. 140. A. Zuppinger et C. Poretti (Editors). Springer, Berlin (1965).
4. A. Wambersie, A. Dutreix, J. Dutreix, J. Lellouch, E. Moustacchi et M. Tubiana, Efficacité biologique relative d'un faisceau d'électrons de 20 MeV en fonction de la profondeur. *Int. J. Radiat. Biol.* **10,** 261 (1966).
5. J. Geisselsoder, K. Koepke et J. S. Laughlin, Calorimetric determination of Absorbed Dose and G Fe^{3+} of the Fricke Dosimeter with 10 MeV and 20 MeV Electrons. *Radiat. Res.* **20,** 423 (1963).
6. R. J. Shalek, W. K. Sinclair et J. C. Calkins, The relative biological effectiveness of 22 MevpX-rays, cobalt-60 gamma rays and 200 kevp X-rays. II. The use of the ferrous sulfate dosimeter for X-ray and gamma ray beams. *Radiat. Res.* **16,** 344 (1962).
7. Report of the RBE subcommittee to the I.C.R.P. and I.C.R.U. (1962). *Hlth Phys.* **9,** 357 (1963).
8. J. F. Fowler et B. E. Stern, Dose-time relationships in radiotherapy and the validity of cell survival curve models. *Brit. J. Radiol.* **36,** 163 (1963).
9. M. M. Elkind et H. Sutton, Radiation response of mammalian cells grown in culture. *Radiat. Res.* **13,** 556 (1960).
10. P. R. Almond and M. L. M. Boone, The effects of sternum upon the central axis depth dose curves for high-energy electrons. *Radiology* **86,** 148 (1966).
11. M. L. M. Boone, E. H. Crosby et R. J. Shalek, Skin reaction and tissue heterogeneity in electron beam therapy, Part II. *In vivo* dosimetry. *Radiology* **84,** 817 (1965).

12. G. BREITLING et K. H. VOGEL, Dosisverteilung bei der Bestrahlung in homogener Medien mit schnellen Elektronen. *Strahlentherapie* **122,** 321 (1963).
13. J. S. LAUGHLIN, A. LUNDY, R. PHILLIPS, F. CHU et A. SATTAR, Electron-beam treatment planning in inhomogeneous tissue. *Radiology* **85,** 524 (1965).
14. R. LOEVINGER, C. J. KARZMARCK et M. WEISSBLUTH, Radiation therapy with high-energy electrons. Part I. Physical consideration, 10–60 MeV. *Radiology* **77,** 906 (1961).
15. O. NETTELAND, Isodose measurement in inhomogeneous matter. In: Symposium on High-Energy Electrons, p. 116. A. ZUPPINGER and C. PORETTI (Editors). Springer, Berlin (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 183–191. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Chromosome Studies in Glial Tumours

INGER-LISE HANSTEEN*
Department of Clinical Research, The Royal Marsden Hospital and The Institute of Cancer Research, London S.W.3

INTRODUCTION

THE PRIMARY aim of this investigation was to study the chromosome complement of glial tumours by a "direct" method in order to avoid any selection effects of culture on the dividing cells. Glial tumours were chosen because they were readily available. Mitotic figures have been seen in routine histological sections of these tumours [1], but there are only a few chromosome studies reported in the literature [1–3].

It was soon discovered that the mitotic yield from most tumours was very low using the "direct" method. In order to obtain as much information as possible in each case an attempt was made to obtain a larger number of mitoses by various tissue culture techniques. Ideally the results obtained by the different methods should be compared in each tumour, but this was not possible because not all methods were successful in each case.

MATERIAL

Sixteen tumours were studied and, of these, five yielded no analysable mitoses. Among the remainder were some tumours with a low mitotic yield, but they have been included in order to show the effects of prolonged culture. Most of the tumours were astrocytomas of different degrees of malignancy. There was a tendency towards a higher mitotic yield from the more malignant tumours. Two cases of secondary carcinoma and one of cerebral infarction are reported.

*Present address: Universitetet i Oslo, Institutt for Generell og Eksperimentell Patologi, Rikshospitalet, Oslo, Norway.

METHODS

Direct method

During the operation part of the tumour was removed and immediately placed in the culture medium, TC 199. Colchicine, 1 μg per ml culture medium, was added 1–4 hr later. The delay in adding colchicine was due to transport difficulties. The specimens were then processed as described by Martineau [4]. The fragments were in some cases minced by hand, later with the machine described by Boyse [5] for making cell suspensions.

Cell suspensions

Cell suspensions were cultured in 50-ml "Falcon" plastic culture flasks or in Leighton tubes on cover-slips. The cultures were kept from 1 to 7 days; 0·25% trypsin (Difco 1 : 250 in Hanks' B solution) was used for resuspending the cells. The cell suspensions were then treated as a direct preparation.

Plasma clot culture

Fragments of tumours were also cultured in plasma clots in Leighton tubes and prepared for chromosome study according to the method described by Lejeune *et al.* [6], only slightly modified. Various combinations and proportions of tissue culture media have been tried, namely TC 199, TC 109, human pooled serum

foetal calf serum and chicken embryo extract. The best cultures were observed with a mixture of calf serum, human pooled serum and TC 199 in proportions 1·5: 1·5: 7. The temperature has also been varied, but 37°C proved most satisfactory. Growth occurred, but no mitoses were found when lower temperatures were used.

Organ culture

Fragments of tumours were cultured on solid medium with chicken embryo mesonephrons as described by Wolff and Wolff [7]. The medium consisted of 2% Difco Bacto Agar in Hanks' solution, calf serum and chicken embryo extract in proportions 7: 3: 3. Cultures were tried with and without wrapping the explants in vitelline membrane. No difference in the yield of mitoses was found. Cultures were kept from three days to three weeks. After the culture period the explants were put in the machine for making cell suspensions and processed according to the direct method. As the quantity of the material available varied, only some of these methods were employed for each tumour. The details are shown in the Tables.

Blood culture

A modification of the technique of Moorhead, Nowell, Mellman, Battips and Hungerford [8] was used for peripheral blood cultures.

Histology

Histological examinations were in each case made at the hospital of attendance.

RESULTS

Astrocytoma, malignancy grade 4–3.

Case 1

Female, aged 55. Three months after the operation her condition slowly deteriorated.

Pathological report. The biopsy consisted of fragments of a poorly differentiated Astrocytoma, malignancy grade 4–3.

Chromosomes. Of a total of 217 mitoses, 142 were polyploid and 75 near diploid. Of 108 cells karyotyped, none had a normal female chromosome complement. As shown in Table 1, the chromosome number varied with a definite peak at 48, and another peak at 96. The same chromosome rearrangements were found in 41 of the 43 cells analysed with the chromosome number of 48. The rearrangements included the loss of one chromosome in the D group, a gain of two chromosomes in the E group, and a gain of one chromosome in the F group [9].

The 18 cells analysed with 96 chromosomes showed the exact doubling of the 48 chromosome pattern including doubling of the extra chromosomes.

The hyperdiploid cell line was predominant in the part of the tumour minced by hand (50 mitoses of a total of 63 counted), and the hypertetraploid line in the part minced by machine (129 mitoses of 154 counted). This could mean that different areas of the tumour were dominated by cells with different chromosome constitutions.

The cells with chromosome numbers between 55 and 78 were considerably rearranged in different ways, and did not conform to the triploid pattern.

One cell should be mentioned separately, because this was the only cell found in the present study which contained "Minutes" as described by Cox *et al.* [10] and Lubs and Salmon [1] in their cases.

In the presence of a distinct cell line the question arises whether the amodal cells are broken ones or whether they represent true heterogeneity within the tumour. There are two observations which favour the theory that these cells are real tumour variants: there was considerable stability in the number of F and G group chromosomes in cells around the higher mode while some near diploid cells had six D group chromosomes.

Case 2

Male, aged 34. A Magnascan was performed the day before the operation. In this and other cases where Magnascan was used 400 μc of Hg 203 labelled Neohydrin were injected into the patients. The patient died 8 months after the operation.

Pathological report. Histology revealed an Astrocytoma, malignancy grade 4–3, where nuclear pleomorphism, hyperchromasia and mitotic activity were all prominent.

Chromosomes. Five polyploid and 4 diploid cells were found in the direct preparation and 4 polyploid and 16 diploid cells after 3 days of

Table 1. *Chromosome numbers in Astrocytoma, Malignancy grade* 4–3
Case 1

No. of chromosomes	40–47	48	50–89	90–95	96	97
No. of cells karyotyped	11	43	17	18	18	1

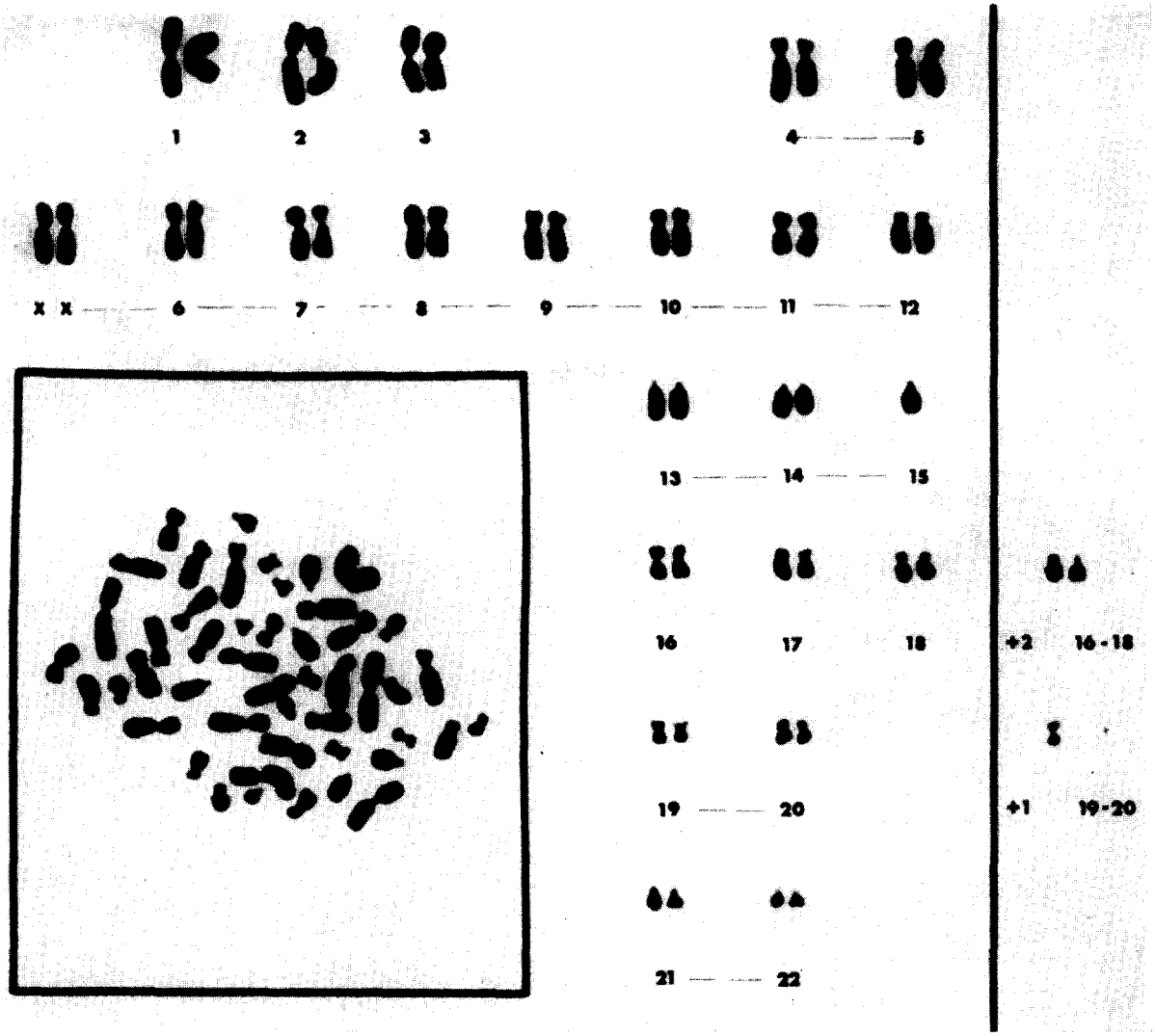


Fig. 1. *Case* 1. *Stem-line cell with* 48 *chromosomes and rearrangements.*

(to face p. 184)

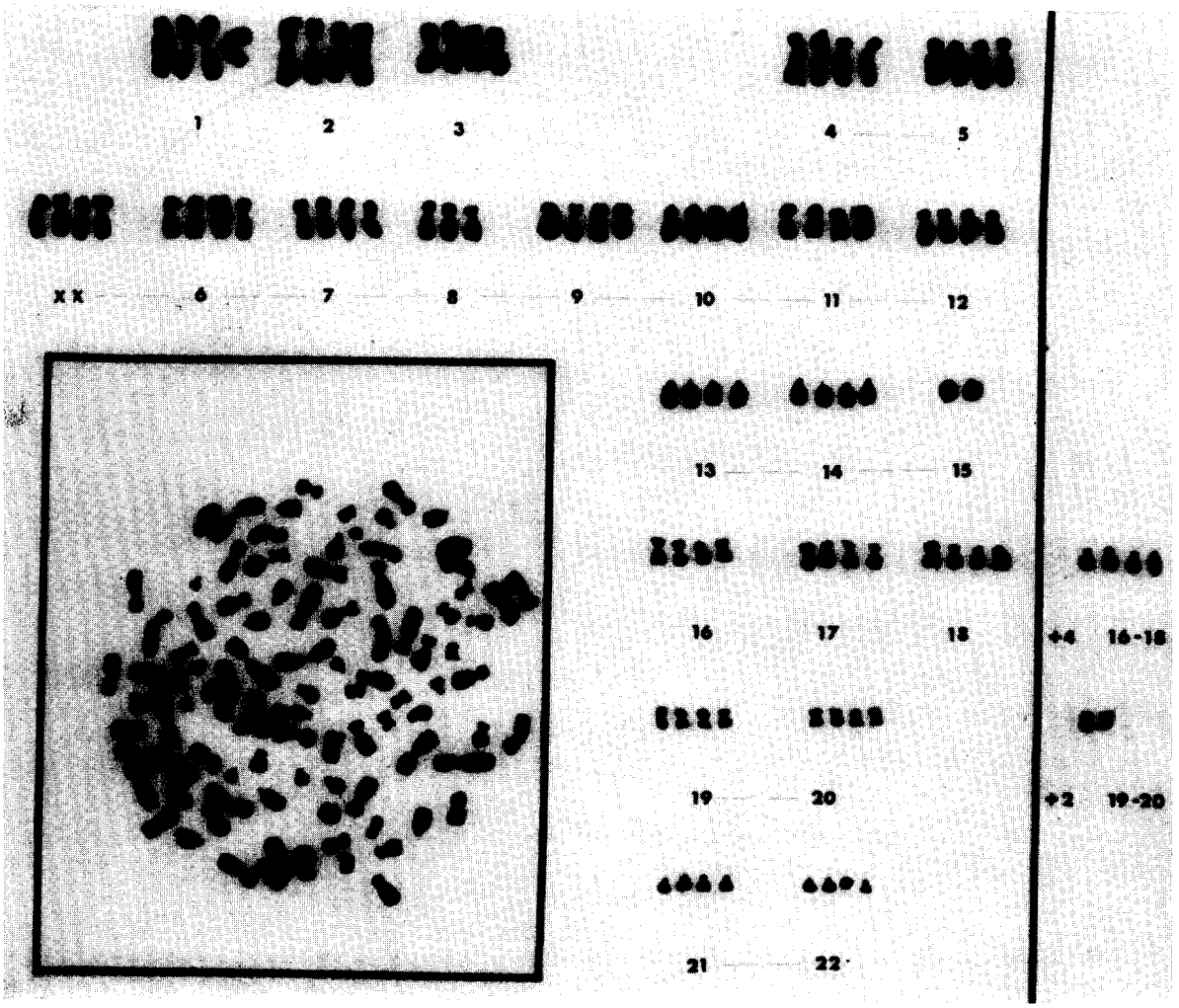


Fig. 2. Case 1. Cells with 96 chromosomes and doubling of the pattern.

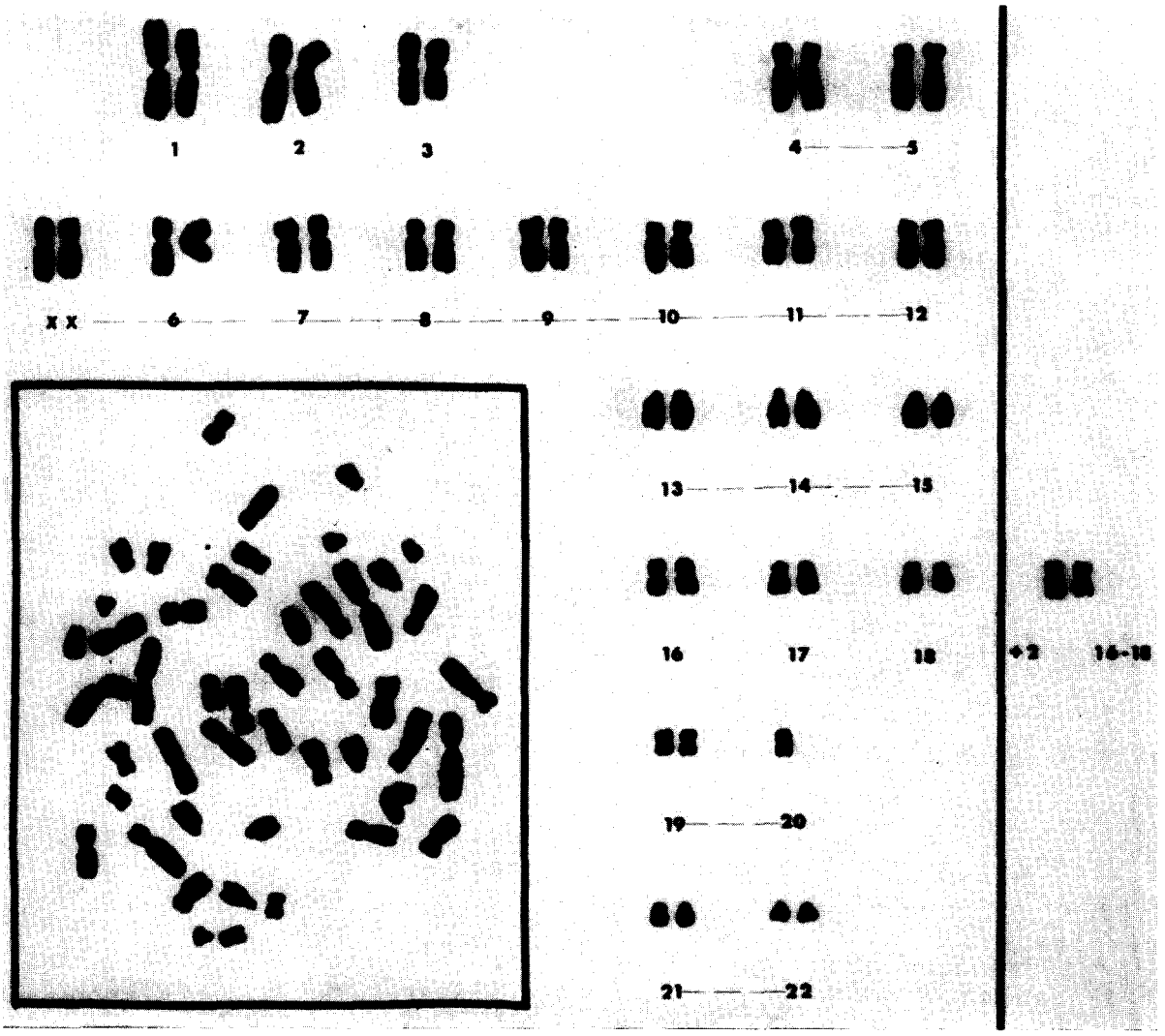


Fig. 3. *Case* 3. *Cell with* 47 *chromosomes and rearrangements.*

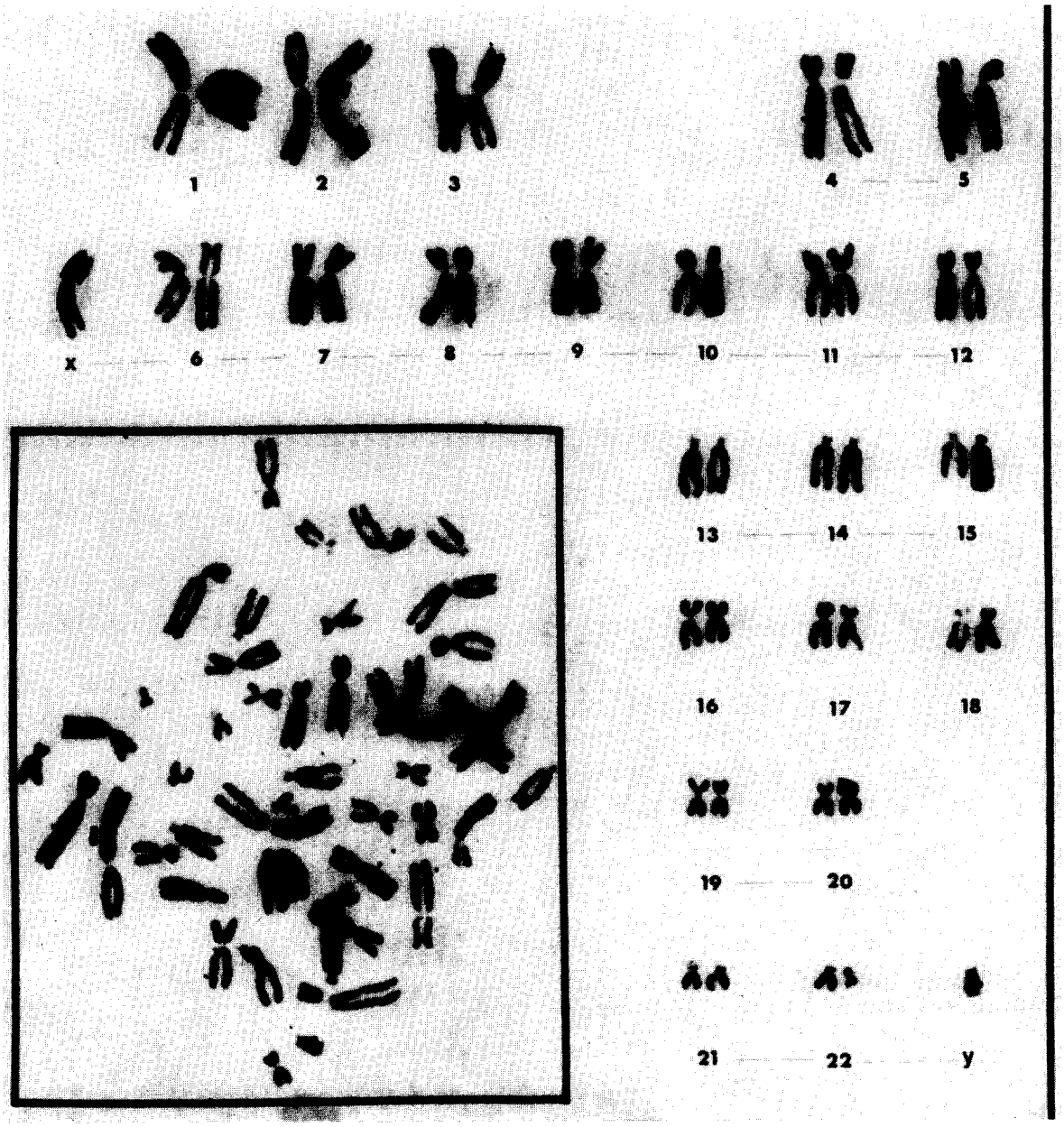


Fig. 4. *Case* 6. *Cell showing deletion of one G-group chromosome.*

culture. The analysed cells are shown in Table 2. Most of the cells contained fragments including some of those with an otherwise normal male complement. The loss of one C group chromosome and the gain of one E group chromosome seemed to be confined to the cultured cells.

Astrocytoma, malignancy grade 3.

Case 3

Female, aged 64. A Magnascan was performed the day before the operation.

Pathological report. Poorly differentiated Astrocytoma, malignancy grade 3, with some small foci of calcification.

Case 4

Female, aged 53. A Magnascan was performed on the day of operation. The patient was alive and well 5 months after the operation.

Pathological report. Astrocytoma, malignancy grade 3.

Chromosomes. Most of the cells from both direct and cultured preparations were in the diploid range although no normal female diploid karyotypes were obtained until the fourteenth day of culture. Most cells showed a loss of a D chromosome and a gain of a G chromosome, while there was a general tendency towards gain in C group chromosomes and loss of E group chromosomes. Two polyploid cells only with dissimilar karyotypes were found (Table 3).

Table 2. *Chromosome numbers and rearrangements in Astrocytoma, malignancy grade* 4–3
Case 2

Method	Days in culture	No. of cells	No. of chromosomes	Marker, fragment	A	B	C	D	E	F	G
Direct	0	1	92	3 frag.	+6	+4	+12	+7	+6	+8	+3
method		1	91	4 frag.	+6	+3	+15	+6	+6	+4	+5
		1	46	1 frag.							
		1	46								
Cell	3	1	88		+4	+4	+15	+5	+6	+4	+4
suspension		1	48	2 frag.					+1	+1	
		1	46								
		1	46	1 frag.							
		1	46	2 frag.							
		1	46				−1		+1		
		1	46	1 frag.			−1		+1		
		1	46	2 frag.			−1		+1		
		1	45	2 frag.			−1	−1	+1		
		1	45	2 frag.				−1			
		1	45	1 frag.			−1				
		1	45	1 frag.			−2		+1		
Total No. of cells		16									

Chromosomes. A variation in the chromosome number and rearrangements were found both in the direct preparation and in the preparations from the different cultures.

Cells with 47 chromosomes were found in all the preparations (34 of 54 cells analysed). Some of these cells had an extra, slightly larger, 17–18 chromosome (18 of 34 cells), while others appeared to have two extra E group chromosomes and one F group chromosome was missing (15 of 34 cells). Abnormal cells were present even after 14 days in culture. Some of the cells with a chromosome number less than 47 could possibly be broken cells that really conformed to the pattern.

Polyploid cells were rare in this tumour.

Case 5

Male, aged 62. A Magnascan was performed. The patient died 6 months after the operation.

Pathological report. The tumour was an Astrocytoma, malignancy grade 3.

Chromosomes. Six of the nine mitoses found were analysable. Their most notable feature was a marker chromosome present singly in the hyperdiploid cells and in duplicate in the hypertetraploid cell. The marker resembled a No. 2 chromosome (Denver classification) with most of its short arms deleted. A normal No. 2 chromosome was invariably missing from the A group. Only the hypertetraploid cell contained

fragments (Table 3).

Case 6

Male, aged 66. He died a month after the operation.

Pathological report. Microscopy showed a typical Astrocytoma, malignancy grade 3, with extensive areas of necrosis.

Chromosomes. A tiny metacentric marker chromosome was found in all the cells except the one with 56 chromosomes, including 6 cells with a normal male complement in which the marker replaced a G group chromosome. Attempts to ascertain whether this anomaly was constitutional rather than one acquired by the tumour were unsuccessful (Table 3).

Table 3. *Chromosome numbers and rearrangements in Astrocytoma, malignancy grade* 3 *Case* 4, *Case* 5, *Case* 6

Method	Days in culture	No. of cells	No. of chromosomes	Marker, fragment	A	B	C	D	E	F	G
Case 4											
Direct	0	1	94		+6	+5	+21	+4	+3	+4	+5
method		1	47					−1	+1		+1
		1	46					−1			+1
		1	46				+1	−1	−1		+1
		1	46				+2	−1	−2		+1
		1	46			−1	+2	−1	−1		+1
		1	46		−1		+3	−1	−2		+1
		1	46			−1	+1	−2			+2
		1	45		−1		+2	−2	−1		+1
		1	44		+1		−1	−3			+1
Plasma clot	8	1	47				−3	+1	+2		+1
+mesonephrons		2	46					−1			+1
		1	46				+1	−2			+1
	14	1	92		+6	+4	+17	+5	+6	+4	+4
Plasma clot	8	1	47								+1
−mesonephrons		1	46					−1			+1
		1	46				+1	−1			
	14	1	46					−1			+1
		4	46								
Total No. of cells		23									
Case 5											
Direct	0	1	93	2 M		+4	+19	+6	+6	+4	+6
Method				2 frag.							
		2	50	1 M	−1		+3	−2	+1	+1	+1
		2	49	1 M	−1		+3	−2		+1	+1
		1	49	1 M	−1		+3	−2	+1		+1
Total No. of cells		6									
Case 6											
Cell	7	1	56			+2	+5	+1	+2		
suspension		6	46	1 M							−1
		1	45	1 M				−1			−1
		1	45	1 M					−1		−1
		2	43	1 M		−1	−1				−2
		1	43	1 M			−1			−1	−2
		1	43	1 M	−1		−1		−1		−1
Total No. of cells		13									

Case 7 and Case 8

Another two cases of Astrocytoma, malignancy grade 3, were examined, one male and one female. The direct preparations were unsuccessful. Plasma clot cultures were maintained for over a month, but mitoses were not obtained until 9 days after initiation and these were exclusively normal diploid cells. Very few polyploid cells were found. It is likely that the mitoses derived from normal fibroblasts selected in culture rather than from tumour cells.

Secondary carcinoma.

Case 9

Female, aged 49. A Magnascan was performed the day before the operation. Death occurred 4 months after the operation.

Pathological report. An undifferentiated secondary carcinoma, composed of large masses of polyhedral cells. Mitotic figures were numerous. No clear indication of primary site.

Chromosomes. The rearranged cells were mainly found after 8 days in culture (Table 4). They contained one or two marker chromosomes. The largest marker, M^1, resembled the chromosomes in the B group except for having quite extended long arms. The second marker, M^2, looked like a D group chromosome, but was bigger.

Of a further 12 cells counted but not analysed, seven contained 44 chromosomes and five 46 chromosomes. There was thus a predominance of cells with 44 chromosomes at eight days. At fourteen days no marker chromosomes were found and five out of eight cells were normal, again indicating selection of non-tumour cells after prolonged plasma clot culture.

No polyploid cells were seen.

Case 10

Male, aged 54. A Magnascan was performed 5 days before the operation. The patient died of bronchopneumonia 3 months after the operation.

Pathological report. The tumour was a malignant large-celled tumour. It was probably epithelial in origin, representing an anaplastic secondary carcinoma. The site of the primary tumour was unknown.

Chromosomes. Four mitoses were found in the direct preparation. Two, with 64 and 61 chromosomes respectively, were not analysed. The remaining 2 cells were considerably rearranged, but had an almost identical chromosome pattern (Table 4). These cells with a high number of chromosomes seemed to be lost in culture. Only one was found after 3 days in culture, but was unfortunately unanalysable. The rest of the cells from the cultures were normal or had random losses of chromosomes suggestive of breakage of the cells and of selection in culture.

Cerebral infarction

Case 11

Male, aged 52. Eight months after the operation symptom free, no abnormal signs.

Pathological report. The evidence for this being a glioma was poor, and there was a strong possibility that the whole lesion might be one of cerebral infarction with subsequent microglial proliferation. The nature of the tumour was uncertain.

Chromosomes. The direct preparation was unsuccessful. After 9 days of culture approximately 50% of the cells had a normal male complement while 50% contained 45 chromosomes with a missing G group chromosome. On morphological grounds the lost chromosome seemed to be the Y. One cell was found with 48 chromosomes with one extra C, one extra F, a missing G and a marker chromosome. This last resembled a D group chromosome, but was larger. Mitoses were reported in the histological sections and both diploid and tetraploid cells were seen in the direct preparations, but they were impossible to analyse. The culture itself grew rapidly. Only mitoses with 46 chromosomes were obtained from a peripheral blood culture from the patient.

DISCUSSION

A scarcity of mitoses presented a problem in most of the cases described in this study. When the mitotic rate was low the culture methods did increase the number of mitoses available for study, particularly where short-term cultures were used. This was also found by Walker *et al.* [11] for plasma clot cultures, and Roller *et al.* [12] noticed better survival in organ culture at four days than later. Socolow *et al.* [13] found stability in the karyotype over a short period of time, whilst variation in chromosome constitution in long-term cultures was demonstrated by Auersperg [14] and Ishii [15].

It must be appreciated, however, that the chromosomal constitution of cells growing successfully in tissue culture might not be representative of the tumour cells growing *in vivo*. For example, near diploid cells may have an advantage over polyploid cells in culture [16]. The "direct" method, sampling as it does the *in vivo* population, is always to be preferred. From the results of the present study it is not possible to recommend a particular culture method, except that the time in culture should

Table 4. Chromosome numbers and rearrangements in secondary carcinomas Case 9, Case 10

Method	Days in culture	No. of cells	No. of chromosomes	Marker	A	B	C	D	E	F	G
Case 9 Direct method	0	0									
Plasma clot	8	1	46								
		1	46	M_1		−1					
		1	46	M_1, M_2		−1		−1			
		1	45					−1			
		3	44	M_1, M_2	−1	−1	−1	−2		+1	
		1	44	M_1	−1	−1	−1	−2		+1	+1
		1	43	M_2	−1		−1	−3		+1	
	14	1	47								+1
		5	46								
		2	45		−1						
Total No. of cells		17									
Case 10 Direct method	0	1	61		+2	+1	+9	−3	+3	+2	+1
		1	61		+2	+1	+10	−4	+3	+2	+1
Cell suspension as blood culture	3	1	46								
Plasma clot	9	5	46								
		1	45				−1				
		1	45							−1	
Total No. of cells		10									

be as short as possible.

The six cases of Astrocytoma studied in detail displayed different abnormalities. A few common features could, however, be detected. The modal number of chromosomes was within the diploid range and few polyploid cells were observed except in Case 1.

Changes in groups C and E occurred in five cases; in groups D and G in three cases. Van Steenis [17] found that the chromosome groups involved in the rearrangements in cases of breast, ovary and gastric tumours were mainly groups C, D and G. He found, however, a more consistent gain in the C group and loss in the D and G groups than found in the present investigation.

Histologically 4 of the tumours were classified as malignancy grade 3 and two (Cases 1 and 2) as malignancy grade 4–3. Case 1, the most adequately studied, had a prominent 48 cell line, whilst cells with double this complement were dominant in another part of the tumour. Erkman and Conen [3] reported 6 cases with a wider variation in chromosome number than in the present investigation, but these include two cases of Astrocytoma, malignancy grade 4, with dominant near diploid lines. That dominance of a cell line with a stable karyotype may be a factor contributing to tumour growth, has been discussed by Sandberg *et al.* [18].

In Case 2, only a few mitoses were obtained by the "direct" method so it was impossible to establish the presence of a clone initially. However, the short-term culture revealed five cells with a common anomaly. Fragments were present in most of the cells in this patient. The question arises whether these were intrinsic to the tumour or due to the pre-operative injection of radioactive mercury. In 2 other of the 6 cases injected at varying times before operation, fragments were observed. Of the 5 cases not investigated by Magnascan, fragments were seen in only one cell (Case 1) and these were "Minutes".

Marker chromosomes were not a feature of all

the Astrocytomas, but they were found in Cases 5 and 6. These anomalous chromosomes were of different morphology in each case.

No correlation was found between the two cases of Secondary carcinoma, one being pseudo-diploid with marker chromosomes, the other near triploid. Chromsome analyses of primary and metastatic tumours reported in the literature demonstrate a development from the diploid range in the primary tumours towards polyploidy with rearrangements in the metastases [19, 20].

Case 11, histologically classified as a benign lesion, showed equal numbers of cells with 45 and 46 chromosomes. The cells at 46 appeared to be normal diploid male ones, whilst those at 45 had probably lost a Y chromosome. This apparent mosaicism was confined to the tumour material, peripheral blood culture being normal. The loss of a Y chromosome from bone marrow cells, in otherwise phenotypically normal males, has been described in chronic granulocytic leukaemia [21].

The aneuploidy observed in cultured lymphocytes from elderly males has also been attributed to loss of a Y chromosome [22].

Can the chromosomal findings be related to the degree of malignancy of a tumour? Ishihara *et al.* [23] found that the most malignant tumours they studied showed no great difference from the normal karyotype, whilst tumours with marked structural changes and marker chromosomes were less malignant. They concluded that no definite correlation could be detected between the chromosome constitution and the histology of the tumour. Makino *et al.* [24] came to the same conclusions on similar material. Schiødt [25] concluded from a follow-up study of 650 mammary carcinomas that grading of malignancy by histological examination does not lead to accurate prognosis in every case. The estimated three-year survival rate for Astrocytomas, malignancy grade 1, is 62%, for grades 2 and 3 about 15% and for grade 4 only 4% [26].

Atkin [27] has found that for some uterine tumours prognosis is related to ploidy. The relationship is specific for the histological type of tumour, but appears unrelated to degrees of differentiation in the squamous-cell type. Wakonig-Vaartaja and Hughes [28] have found different chromosome distributions in dysplasia, and carcinoma of the cervix respectively.

No simple correlation between the histological grading and the chromosomal constitution of the Astrocytomas has been found in the present study and the series is too small for any conclusions regarding prognosis to be drawn. It remains possible that the chromosomal constitution of a tumour may eventually prove to be a finer prognostic tool than the histological classification.

Acknowledgements — The work was performed in the Chromosome Laboratory of the Clinical Research Department under the supervision of Dr. S. D. LAWLER and was supported in part by a grant from the National Institutes of Health, No. NB 04374.

I wish to express my thanks to the Department of Neurosurgery, Atkinson Morley's Hospital for help with specimens and case records, and to Professor T. CRAWFORD and Dr. R. CROMPTON of St. George's Hospital for the histological reports, to Dr. G. EASTY for advice on the culture techniques and to Mrs. M. MARTINEAU for criticising the manuscript.

RESUME

Le complément chromosomique a été étudié par différentes méthodes dans dix cas de tumeurs cérébrales et dans un cas d'infarctus cérébral. L'étude du caryotype a démontré une différence de contenu chromosomique parmi les cellules de la même tumeur, et entre les différentes tumeurs. Des chromosomes marqueurs ont été retrouvés dans trois cas. Le nombre de chromosomes, dans tous les cas d'astrocytome, était voisin de 46, et le plus souvent les remaniements portaient sur les groupes C et E. Un cas avec une lignée souche est remarquable par un nombre important de mitoses. Le nombre de chromosomes d'un carcinome secondaire était presque diploïde et, dans un autre cas, presque triploïde. La moitié des cellules de l'infarctus cérébral a perdu un chromosome G (probablement Y), tandis que l'autre moitié présentait un caryotype normal.

SUMMARY

The chromosome complement of ten cases of glial tumour and one of Cerebral infarction were investigated by various methods. The karyotype varied from case to case, and within each case. Marker chromosomes were seen in three cases. Common features in the cases of Astrocytoma were a near diploid modal number of chromosomes, and the involvement of the chromosomes of groups C and E in the rearrangements in most of the cases. One case was remarkable because its mitotic yield was high and it showed a distinct stem line. The chromosome number in one

case of secondary carcinoma was near diploid, in the other near triploid. In the case of cerebral infarction half the cells had lost a G group chromosome, probably a Y, almost all the other cells were normal.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Bild der Chromosome in zehn Fällen von glia-Tumor und einem Fall von cerebraler Infarktion ist durch verschiedene Methoden untersucht geworden. Das Bild der Chromosome variierte von Fall zu Fall und auch binnen jedem Fall. Marker-Chromosome wurden in drei Fällen bemerkt. Durchgehende Züge bei den Fällen von Astrocytoma waren eine fast diploide Anzahl der Chromosome und ein Eindringen von den Chromosomen der Gruppen C und E bei dem Wiederaufbau in den meisten Fällen. Ein Fall war bemerkenswert wegen der hohen Zahl der Mitosen und zeigte eine markierte Zellenlinie. Die Zahl der Chromosome bei einem Fall von sekundären Carcinoma war fast diploid, bei dem anderen fast triploid. Die Hälfte der Zellen bei dem Fall von cerebraler Infarktion hatte ein Chromosom der Gruppe G, wahrscheinlich ein Y, verloren, fast alle andere Zellen waren normal.

REFERENCES

1. H. J. Lubs, Jr. and J. H. Salmon, The chromosomal complement of human solid tumours. II. Karyotypes of glial tumours. *J. Neurosurg.* **22,** 160 (1965).
2. A. I. Spriggs, M. M. Boddington and C. M. Clarke, Chromosomes of human cancer cells. *Brit. med. J.* **2,** 1431 (1962).
3. B. Erkman and P. E. Conen, Chromosome constitution of 14 human malignant tumours. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **5,** 17 (1964).
4. M. Martineau, A similar marker chromosome in testicular tumours. *Lancet ii,* 839 (1966).
5. E. A. Boyse, A method for the production of viable cells suspensions from solid tumours. *Transplant. Bull.* **7,** 100 (1960).
6. J. Lejeune, R. Turpin and M. Gautier, Technique de culture de fibroblastes pour analyse chromosomique. *Rev. franç. Etud. clin. biol.* **5,** 406 (1960).
7. E. Wolff and E. Wolff, Le rôle du mésonéphron de l'embryon de Poulet dans la nutrition de cellules cancéreuses. II. Etude par la méthode de la membrane vitelline. *J. Embryol. exp. Morph.* **9.** 678 (1961).
8. P. S. Moorhead, P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips and D. A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20,** 613 (1960).
9. K. Patau, Alphabetical grouping of chromosomes. *Am. J. hum. Genet.* **12,** 250 (1960).
10. D. Cox, C. Yuncken and A. I. Spriggs, Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood. *Lancet ii,* 55 (1965).
11. D. G. Walker, M. M. Lyons and J. C. Wright, Observations on primary short-term cultures of human tumours. A second 5-year study. *Europ. J. Cancer* **1,** 265 (1965).
12. M. R. Roller, S. P. Owen and C. Heidelberg, Studies on organ cultures of human tumours. *Cancer Res.* **26,** 626 (1966).
13. E. L. Socolow, E. Engel, L. Mantooth and J. B. Stanbury, Chromosomes of human thyroid tumours. *Cytogenetics (Basel)* **3,** 394 (1964).
14. N. Auersperg, Long-term cultivation of hypodiploid human tumour cells. *J. nat. Cancer Inst.* **32,** 135 (1964).
15. S. Ishii, Chromosome studies on human bone tumours *in vivo* and *in vitro*. *Gann* **56,** 251 (1965).
16. R. Baserga, The relationship of the cell cycle to tumour growth and control of cell division: A review. *Cancer Res.* **25,** 581 (1965).
17. H. van Steenis, Chromosomes and cancer. *Nature (Lond.)* **209,** 819 (1966).
18. A. A. Sandberg, T. Ishihara, T. Miwa and T. S. Hauschka, The *in vivo* chromosome constitution of marrow from 34 human leukemias and 60 non-leukemic controls. *Cancer Res.* **21,** 678 (1961).
19. M. Maeda, T. Tabata and H. Saito, Chromosomes of human tumours. VI. A comparative chromosome survey of the primary and its secondary tumours. *Wakayama Med. Rep.* **9,** 225 (1965).

20. G. RABOTTI, Ploidy of primary and metastatic human tumours. *Nature* (*Lond.*) **183,** 1276 (1959).
21. D. E. SPEED and S. D. LAWLER, Chronic granulocytic leukaemia. The chromosomes and the disease. *Lancet i,* 403 (1964).
22. P. A. JACOBS, M. BRUNTON, W. M. COURT BROWN, R. DOLL and H. GOLDSTEIN, Change of human chromosome count distribution with age: Evidence for a sex difference. *Nature* (*Lond.*) **197,** 1080 (1963).
23. T. ISHIHARA, Y. KIKUCHI and A. A. SANDBERG, Chromosomes of twenty cancer effusions: Correlation of karyotypic, clinical and pathological aspects. *J. nat. Cancer Inst.* **30,** 1303 (1963).
24. S. MAKINO, M. D. SASAKI and A. TONOMURA, Cytological studies of tumours. XL. Chromosome studies in fifty-two human tumours. *J. nat. Cancer. Inst* **32,** 741 (1964).
25. T. SCHIØDT, *Breast Carcinoma. A Histologic and Prognostic Study of* 650 *Follow-up Cases.* Munksgaard, Copenhagen (1966).
26. J. W. KERNOHAN and G. P. SAYRE, Tumours of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology, Section X-F35-22 (1952).
27. N. B. ATKIN, The chromosomal changes in malignancy; an assessment of their possible prognostic significance. *Brit. J. Radiol.* **37,** 213 (1964).
28. R. WAKONIG-VAARTAJA and D. T. HUGHES, Chromosomal anomalies in dysplasia, carcinoma-*in-situ* and carcinoma of cervix uteri. *Lancet* **ii,** 756 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 193–201. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Observations Cytogénétiques dans la Maladie de Vaquez*

L. KOULISCHER†, J. FRÜHLING‡ et J. HENRY‡

Les études cytogénétiques, faites au niveau des cellules souches de sujets leucémiques, ont montré, d'une part, que seule la leucémie myéloïde chronique présente une aberration chromosomique spécifique: le chromosome de Philadelphie ou Ph 1 [1]; d'autre part, que des lignées aneuploïdes peuvent apparaître lors de l'installation de formes aiguës de leucémie [2]. Il est cependant difficile, à l'heure actuelle, de déterminer le rôle de l'aneuploïdie dans l'évolution du processus malin. L'étude cytogénétique de cellules, dans des états "précancéreux", se révèle alors intéressante, dans la mesure où elle permet de démontrer la corrélation, ou l'absence de corrélation, entre l'apparition d'une lignée aneuploïde et la transformation ultérieure en leucémie.

Certains états pathologiques rendent cette étude possible. Ils ont été décrits comme "préleucémiques", parce qu'ils sont *susceptibles* de dégénérer en leucémie aiguë; tel est, par exemple, le cas de divers désordres myéloprolifératifs [3], ou de certaines formes d'anémie aplastique, d'anémie sidéroachrestique [4], ou de thrombocytopénie idiopathique [5]; ces états permettent de contribuer à préciser le rôle exact de l'aneuploïdie dans l'installation d'une leucémie éventuelle.

Parmi les désordres myéloprolifératifs, on connaît, depuis longtemps, la tendance de la polycythémie essentielle — ou maladie de Vaquez — à se transformer en leucémie, le plus souvent de forme aiguë. On a incriminé le traitement par ^{32}P comme facteur leucémogène primaire. Cependant, Huff *et al.* [6] considèrent la maladie de Vaquez comme une prolifération de globules rouges de nature néoplasique; le traitement au ^{32}P ne serait pas responsable de cette évolution, mais il permettrait, par une prolongation de la survie, l'apparition d'une leucémie. Diverses statistiques semblent confirmer cette hypothèse [7–10]. Osgood [11] a montré récemment que, pour les malades traités au ^{32}P, le risque élevé de présenter une leucémie aiguë n'est pas une fonction linéaire de la dose reçue, mais semble former partie intégrante de la maladie.

Au point de vue chromosomique, la grande majorité des cas de maladie de Vaquez sont normaux [12–14]. On note toutefois, sporadiquement, la présence d'anomalies du caryotype; l'interprétation de ces anomalies est parfois difficile, soit que le malade ait reçu, au préalable, de fortes doses de ^{32}P [13, 15], soit qu'il s'agisse d'une évolution maligne que rien encore ne laissait prévoir au moment de l'analyse cytogénétique [12]. Dans un cas au moins de maladie de Vaquez, la présence d'un chromosome de Philadelphie a été notée longtemps avant l'apparition d'une symptomatologie clinique de leucémie myéloïde chronique [12, 16]. Cependant, dans une série récente concernant 43 malades [17], la proportion de polycythémiques, avec aberrations chromosomiques au niveau des cellules de la moelle osseuse, est fort élevée: 13 cas seulement ne

*Cette étude a été effectuée, en partie, dans le cadre du contrat Euratom-Université Libre de Bruxelles—Université de Pise, (026-63-4 BIAC).

†Centre de Cytogénétique Médicale et Service d'Anthropologie et de Génétique Médicale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

‡Service de Radiothérapie de l'Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

montrent pas d'anomalies. Parmi les autres, 16 cas (4 non traités et 12 traités) montraient, à côté de cellules normales, des cellules avec anomalies aspécifiques; 11 cas permettaient d'observer des lignées aneuploïdes; enfin, 3 cas, au stade terminal de la maladie, montraient des anomalies multiples du caryotype, évoquant une leucémie. Six cas ont été notés comme présentant la même anomalie: une délétion d'un chromosome du groupe F; il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de déterminer s'il s'agit là d'une anomalie spécifique. Les auteurs soulignent que la proportion de cellules anormales du point de vue cytogénétique est nettement plus élevée dans leur série que dans d'autres; une des causes possibles, d'après eux, serait l'altération "naturelle" due à l'âge. Malheureusement, l'état cytogénétique de la moelle osseuse de sujets normaux âgés n'est pas connu comme celui des lymphocytes [18].

Nous croyons intéressant de rapporter ici les résultats d'analyses cytogénétiques effectuées chez 9 malades présentant une polycythémie vraie, dans le but de contribuer à une meilleure connaissance du caryotype au cours de cette affection; nous avons joint à cette étude celle d'une malade présentant une thrombocythémie essentielle que l'analyse ferrocinétique a permis de classer dans le groupe des maladies myéloprolifératives.

1. OBSERVATIONS CLINIQUES

Les examens hématologiques pratiqués au moment du diagnostic sont repris au Tableau 1. Les examens confirmaient la polycythémie, cliniquement évidente chez les 9 premiers malades. Dans le 10e cas, il s'agissait donc d'une thrombocythémie essentielle, affection rare que nous pensons pouvoir classer dans le même groupe.

Dans le Tableau 2, nous avons groupé les résultats des analyses effectuées au moment de l'étude cytogénétique. Il faut remarquer que les cas 8 et 9 étaient, à ce moment, transformés, l'un en leucémie myéloïde chronique, l'autre en leucémie aiguë.

2. METHODES CYTOGENETIQUES

Deux techniques ont été utilisées à partir de cellules de moelle osseuse:

(*a*) *Technique "directe"*

Les cellules séjournent 1 hr dans une solution glucosée–saline contenant 1 µg de colcémide par ml. Après traitement hypotonique, elles sont fixées et mises en suspension dans une solution d'orcéine acétique. Avant l'observation microscopique, elles sont écrasées entre lame et lamelle ("squash"). Les préparations ne sont pas rendues permanentes. Toutes les mitoses retenues pour les numérations chromosomiques sont photographiées.

(*b*) *Technique d'incubation* in vitro

Les cellules séjournent de 5 à 20 hr dans un milieu composé de TC 199 (70%) et de sérum humain (30%). Trois heures avant la fin de l'incubation, 1 µg de colcémide par ml. est

Tableau 1. *Données hématologiques au moment du diagnostic de polycythémie*

Cas N°	Globules rouges ($\times 10^6$)	Hémoglobine (g/100 ml)	Globules blancs	Plaquettes	Ponction sternale (Erythropoïèse/granulopoïèse)	Rate
1.	8,04	19,9	18.700	502.000	0,58	++
2.	8,40	19,8	15.300	339.000	0,59	++
3.	7,36	20,6	11.100	331.000	0,94	++
4.	8,10	24,7	8.500	151.000	0,72	+
5.	6,93	17,9	11.800	316.000	0,50	++++
6.	8,36	21,3	9 100	211.000	—	+++
7.	7,50	21,4	4 400	359.000	1,11	+
8.	8,80	18,8	5 600	—	—	++
9.	8,70	19,9	8 000	—	1,20	+
10.	4,59	13,5	17.300	600.000 720.000	1,00	—

Rate: —=non palpable
+=2 travers de doigts
++=2 à 4 travers de doigts
+++=4 à 6 travers de doigts
++++=6 travers de doigts sous rebord costal

Tableau 2. Données hématologiques et ferrocinétiques au moment de l'analyse cytogénétique

Cas N°	Date d'analyse (mois/année)	Durée d'évolution depuis le diagnostic	Traitements antérieurs (mc ^{32}P)	Globules rouges ($\times 10^6$)	Hémoglobine (g/100 ml)	Globules blancs	Plaquettes ($\times 10^6$)	Ponction sternale (Erythropoïèse/ granulopoïèse)	Rate	Volume globulaire (ml/kg)	$T\frac{1}{2}$ ^{59}Fe (min)	Turnover du fer globulaire (mg/kg/jour)	$T\frac{1}{2}$ ^{51}Cr (jours)	Remarques
1.	2/65	—	—	8,04	19,9	18·700	5,02	0,58	++	50,0	29	0,58	29	Vaquez floride. 20 mc ^{32}P. Rémission depuis nov. 65.
2.	3/65	—	—	8,40	19,8	15·300	3,39	0,59	++	72,2	21	1,84	27	Vaquez floride. 17 mc ^{32}P. Rémission depuis nov. 65.
3.	3/65	—	—	7,36	20,6	11·100	3,31	0,94	++	54,4	18	1,47	28	Vaquez floride.
	8/65	5 mois	11	6,23	18,9	4500	1,64	0,30	+	37,2	126	0,48	23	Rémission depuis sept. 65.
4.	3/65	4 mois	10	6,60	18,0	4400	1,04	0,14	—	30,8	214	0,16	23	Rémission depuis mars 65.
5.	12/65	10½ ans	25	4,57	12,9	12·800	2,13	0,24	++++	39,8	40	1,66	25½	Métaplasie myéloïde avec érythropoïèse inefficace très importante.
6.	4/66	9 ans	92	6,85	18,5	19·500	1,10	0,69	+++	55,9	13	1,00	27	En 1957: 200r (Rx) sur la rate +600 mg de Myleran. Depuis 64. Vaquez résistant au ^{32}P.
7.	6/66	—	—	7,50	21,4	4400	3,59	1,11	+	44,8	26	1,38	37	Vaquez floride.
8.	8/65	5 ans	30	4,50	13,9	102·000	0,46	0,02	+++	23,2	48	0,79	24	Vaquez transformée en leucémie myéloïde chronique.
9.	3/65	8 ans	20	3,1	9,2	1900	1,26	0,17	—	40,4	132	0,41	21	Vaquez transformée en leucémie aiguë.
10.	8/65	—	—	4,59	13,5	17·300	6,00 7,20	1,00*	—	45,6	31	2,76	23	Thrombocythémie essentielle Erythropoïèse active, en grande partie inefficace.

*Moelle très riche en mégakaryocytes.

ajouté au milieu. Les cellules sont ensuite traitées de la même façon que les cellules sanguines par la méthode de Moorhead *et al.* [19]. Les préparations sont permanentes. Les mitoses retenues pour l'analyse sont repérées, et le tiers d'entre elles est photographié.

Nous croyons utile de faire un bref commentaire à propos des techniques utilisées. Il arrive que la technique "directe" ne montre pas de mitoses convenant à l'analyse cytogénétique. L'incubation à court terme permet alors soit d'en obtenir, soit d'en augmenter considérablement le nombre. Notre expérience personnelle nous a montré qu'il n'y avait pas de sélection en faveur des cellules normales; en effet, certains cas de leucémie, étudiés selon ette technique, ont montré 100% de cellules aneuploïdes [20]. Nous pensons, comme Sandberg *et al.* [21] notamment, que la technique directe est bien à même de refléter l'état de la moelle *in vivo;* mais nous croyons que l'incubation à court terme n'altère pas l'image cytogénétique médullaire au point qu'il faille rejeter cette technique, si utile dans certains cas.

3. RESULTATS

Pour les 10 cas, un total de 372 mitoses ont été comptées au cours de 11 analyses. Dans 2 cas, moins de 10 cellules ont été observées, mais, dans l'un des 2 cas, une analyse cytogénétique ultérieure a permis d'examiner 36 mitoses bien étalées. Les numérations chromosomiques sont présentées au Tableau 3.

Cas 8

Il s'agit d'un malade âgé de 71 ans, souffrant de maladie de Vaquez depuis 1960, traité à plusieurs reprises par ^{32}P, avec des rémissions de longue durée (Fig. 1). En juin 1964, le taux d'hémoglobine est de 22, 5 g%, la leucocytose de 7700, et le taux des plaquettes de 140.000 par mm^3; le volume globulaire est de 56 ml/kg, la sidérémie est de 76, 4 µg%. Une épreuve au ^{59}Fe confirme la récidive clinique: le T1/2 ^{59}Fe est de 30 min., et le turnover du fer plasmatique de 0,75 mg/kg/jour; la captation érythrocytaire maximale du ^{59}Fe est de 96% après 13 jours, le turnover du fer érythrocytaire est de 0,71 mg/kg/jour; la survie globulaire, évaluée par la méthode des hématies marquées au ^{51}Cr, est normale ($T\frac{1}{2}$ ^{51}Cr=26 jours). La rate dépasse le rebord costal de 4 travers de doigts. A la suite d'un traitement au ^{32}P (4+4 mC), une nouvelle rémission apparaît 4 mois plus tard: 14,5 g% d'hémoglobine, 7300 leucocytes et 328.000 plaquettes. Le volume globulaire est de 28 ml/kg; la rémission est confirmée par l'étude de l'érythropoïèse: $T\frac{1}{2}$ ^{59}Fe de 118 min., sidérémie de 152 µg%, turnover du fer plasmatique de 0,41 mg/kg/jour, concentration érythrocytaire maximale de 71% et turnover du fer érythrocytaire de 0,29 mg/kg/jour. La durée de vie des globules rouges est inchangée. Sept mois plus tard, le patient présente des signes cliniques de transformation en leucémie myéloïde chronique: 13,9 g% d'hémoglobine, 46.000 plaquettes et 102.000 leucocytes. La formule leucocytaire montre 3% de myéloblastes, 16% de promyélocytes, 11% de myélocytes, 21% de métamyélocytes, 7% de polynucléaires non segmentés, 28% de polynucléaires segmentés, 1% d'éosinophiles, 3%

Tableau 3. *Distribution des nombres chromosomiques*

N°	Date	Technique	Nombre de chromosomes 43	44	45	46	47	48	49	Total des mitoses	Remarques
1.	2/65	SQ	—	—	3	24	—	—	—	27	—
2.	3/65	SQ	—	—	—	14	1	1	—	16	—
3.	3/65	SQ	—	—	—	5	1	—	—	6	—
	8/65	IM	—	—	—	33	3	—	—	36	—
4.	3/65	IM	—	—	—	9	—	—	—	9	—
5.	12/65	IM	—	1	2	46	1	—	—	50	—
6.	4/66	IM	—	—	2	31	1	—	—	34	—
7.	6/66	IM	—	—	1	96	3	—	—	100	Nombreuses cassures Phl+
8.	8/65	IM	—	1	7	40	2	—	—	50	Phl+
9.	3/65	IM	2	12	1	7	2	—	—	24	1 lignée à 44 et 1 à 46.
10.	8/65	IM	—	—	—	18	1	—	1	20	—

SQ=squash.
IM=incubation de moelle à court terme.

Le nombre modal le plus fréquent des chromosomes est de 46. Dans 7 cas, le caryotype était normal et ne justifie aucun commentaire (cas 1 à 6 et 10). Trois cas ont retenu plus particulièrement notre attention, et nous en donnons une brève description.

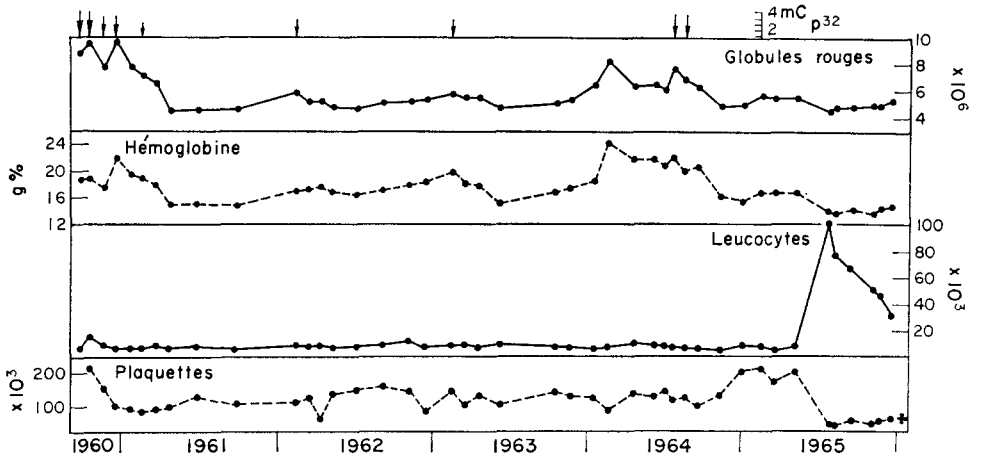


Fig. 1. *Cas* 8. *Résultats hématologiques au cours de* 5 *ans d'observation.*

de basophiles, 6% de lymphocytes et 4% de monocytes. L'indice d'activité phosphatasique leucocytaire est de 2 sur 100 cellules, taux semi-quantitatif très bas, caractéristique de la leucémie myéloïde chronique. (Pour les autre cas, l'indice d'activité phosphatasique oscille entre 30 et 173 sur 100 cellules). Le volume globulaire est de 23 ml/kg. La rate dépasse de 7 cm le rebord costal. L'étude de l'érythropoïèse montre un T ½ ^{59}Fe de 48 min. et un turnover du fer plasmatique de 1,51 ml/kg/jour. La concentration érythrocytaire maximale est de 52% après 11 jours, et le turnover du fer érythrocytaire de 0,79 mg/kg/jour. La durée de vie des globules rouges reste dans les limites de la normale. Ces chiffres témoignent d'une profonde altération de l'érythropoïèse en l'absence de polycythémie [22]. Le myélogramme confirme le diagnostic de leucémie myéloïde chronique. Cinquante mitoses de cellules médullaires ont été observées: 40 d'entre elles montraient le nombre normal de 46 chromosomes, 7 montraient 45 chromosomes; 2 cellules avaient 47 chromosomes, et 1 en avait 44. On constate, dans une certaine proportion de cellules à 45 et 46 chromosomes, la présence d'un chromosome de Philadelphie (Fig. 2); au total, 72% des cellules examinées sont Ph1 positives. Toutefois, il n'a pas été possible de mettre en évidence une lignée à 45 chromosomes; en effet, dans les caryotypes de ces cellules, manquait 1 chromosome différent de mitose à mitose; il convient cependant de souligner que l'écart du nombre modal normal nous paraît important; il n'est pas habituel et est caractéristique des leucémies. Le diagnostic cytogénétique de leucémie myéloïde chronique confirme donc l'état clinique du patient.

En résumé, il s'agit d'un patient dont la maladie de Vaquez évolue depuis au moins 5 ans et qui, après plusieurs traitements par ^{32}P ayant entraîné des rémissions de longue durée, présente une transformation de la maladie en leucémie myéloïde chronique. L'étude cytogénétique, à ce moment, a démontré la présence d'un chromosome Ph1.

Cas 9

Il s'agit d'une patiente de 72, ans dont la maladie de Vaquez évoluait depuis 8 ans. La maladie avait été traitée par ^{32}P, à plusieurs reprises, et le traitement avait amené plusieurs rémissions. En août 1964, 1 mois après administration de ^{32}P, le taux d'hémoglobine reste à 18,3 g%, et la leucocytose est de 4300 avec une formule normale; le taux des plaquettes est de 108.000. Le myélogramme montre un rapport érythropoïèse/granulopoïèse abaissé (0,17); le volume globulaire est de 40 ml/kg. L'étude de l'érythropoïèse au moyen de ^{59}Fe montre déjà une rémission de l'affection: le T½ ^{59}Fe est de 132 min., et le turnover du fer plasmatique est de 0,81 mg/kg/jour; la concentration érythrocytaire maximale est de 50% après 13 jours, et le turnover du fer érythrocytaire est de 0,41 mg/kg/jour. La survie globulaire, évaluée par la méthode des hématies marquées au ^{51}Cr, est légèrement raccourcie (T ½ ^{51}Cr: 21 jours). La rémission périphérique apparaît en 1 mois.

Six mois plus tard, la patiente est admise à l'Institut Bordet, atteinte d'une pneumopathie bilatérale. A ce moment, les examens hématologiques montrent 9,2 g% hémoglobine, 2% de réticulocytes, 126.000 plaquettes et 1900 globules blancs. La formule leucocytaire est la suivante: 2% d'érythroblastes, 2% de myélocytes, 42% de métamyélocytes, 31% de polynucléaires non segmentés, 11% de polynucléaires segmentés, 9% de lymphocytes et

3% de monocytes.

L'indice d'activité phosphatasique des leucocytes est de 16 sur 100 cellules. Dans la moelle osseuse, on trouve 14,5% de myéloblastes et de cellules souches, 14% de promyélocytes, 17,5% de myélocytes, 5% de métamyélocytes, 8% d'érythroblastes. La malade décède 8 jours après l'hospitalisation, présentant un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë. Pendant ce séjour, une étude cytogénétique de la moelle osseuse a pu être pratiquée. Vingt-quatre mitoses, convenant à l'analyse chromosomique, ont été observées chez cette malade. Il existe 2 nombres modaux: 44 et 46. Les cellules à 46 chromosomes ont un caryotype normal. Dans les cellules à 44 chromosomes (Fig. 3), on note l'absence constante d'un chromosome du groupe A (sans doute un n° 3) et d'un chromosome du groupe C (sans doute un n° 12). La malade est décédée peu après l'analyse cytogénétique. A l'examen post-mortem, la moelle osseuse montrait un grand nombre de cellules souches, et, bien que l'on n'ait pas noté d'infiltration leucémique de la rate ni du foie, le diagnostic de leucémie aiguë a été posé.

En résumé, il s'agit d'une patiente dont la maladie de Vaquez, traitée depuis 8 ans par ^{32}P, s'est transformée en leucémie aiguë. L'étude cytogénétique montre les altérations du caryotype connues dans cette affection.

Cas 7

Il s'agit d'une patiente de 74 ans, dont la maladie de Vaquez paraît d'évolution récente, et n'a jamais été traitée précédemment. En juin 1966, le taux d'hémoglobine est de 21,4g%, la leucocytose de 4440 (avec une formule normale), et le taux des plaquettes de 359.000 /mm^3. La rate est palpable en inspiration profonde. Le volume globulaire est de 44,8 ml/kg. Une épreuve au ^{59}Fe confirme le diagnostic de polycythémie: le T $\frac{1}{2}$ ^{59}Fe est de 26 min., et le turnover du fer plasmatique de 1,38 mg/kg/jour; la concentration érythrocytaire maximale est de 100% après 6 jours, et le turnover du fer érythrocytaire est de 1,38 mg/kg/jour. La survie globulaire, évaluée par la méthode des hématies marquées au ^{51}Cr, est normale (T $\frac{1}{2}$ ^{51}Cr: 37 jours). L'indice d'activité phosphatasique, dans les leucocytes, montre une valeur normale: 30 sur 100 cellules. Une étude cytogénétique des cellules de la moelle osseuse est faite avant tout traitement, et les chromosomes de 100 mitoses ont été comptés. Cette étude montre que 15% des cellules examinées ont des lésions du même type que celles provoquées par les radiations: cassures chromatidiennes, rétrécissements chromatiques, fragments acentriques. On note en outre la présence au, niveau d'un chromosome du groupe C, d'un rétrécissement secondaire de la partie distale des bras longs (Fig. 4), et la présence, dans 10% des cellules examinées, d'un chromosome G avec délétion; morphologiquement, ce chromosome est identique au chromosome de Philadelphie (Fig. 5). Rien, dans l'état clinique ou l'analyse médullaire, ne permet de suspecter le développement d'une leucémie myéloïde chronique ou d'une transformation leucémique aiguë. Un traitement par ^{32}P est entrepris, et la malade est actuellement en rémission de son affection.

En résumé, il s'agit d'une patiente, dont la maladie de Vaquez est d'évolution récente et n'a reçu aucune thérapeutique précédemment. Cependant, l'étude cytogénétique montre des altérations du caryotype du type radio-induit et la présence d'un chromosome Ph1 dans 10% des cellules examinées.

4. DISCUSSION

Dans cette série de 9 cas de maladie de Vaquez, 6 cas, pour lesquels 178 mitoses ont été comptées, sont normaux du point de vue cytogénétique. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune anomalie spécifique ressemblant à celle décrite pour un chromosome du groupe F chez 6 malades de Kay *et al.* [17]. Il est intéressant de souligner qu'il n'a pas été possible de démontrer d'anomalies chromosomiques systématiques, même après traitement prolongé au ^{32}P; le malade n°6 a reçu, par exemple, 92 mC de ^{32}P en 8$\frac{1}{2}$ ans, et son caryotype est absolument normal. Il est possible que l'étude des lymphocytes de ce malade aurait montré plus d'aneuploïdies, à cause de leur durée de vie très longue [17].

Trois malades présentent des anomalies du caryotype. Chez l'un de ces 3 malades (cas n°9), il s'agit de l'apparition d'une lignée aberrante à 44 chromosomes: un chromosome du groupe A et un chromosome du groupe C manquent, de façon constante, dans ces cellules hypodiploïdes. Les observations cliniques et anatomopathologiques ont montré que la maladie de Vaquez de cette patiente s'était transformée en leucémie aiguë. Il n'est pas étonnant dès lors de constater, au niveau de la moelle osseuse, l'apparition d'une lignée aneuploïde; en effet, il s'agit là d'un phénomène fréquent dans les leucémies aiguës.

Chez les 2 autres malades ayant un caryotype anormal, on note la présence d'un chromosome à morphologie identique au chromosome de Philadelphie. L'un des 2 patients présente

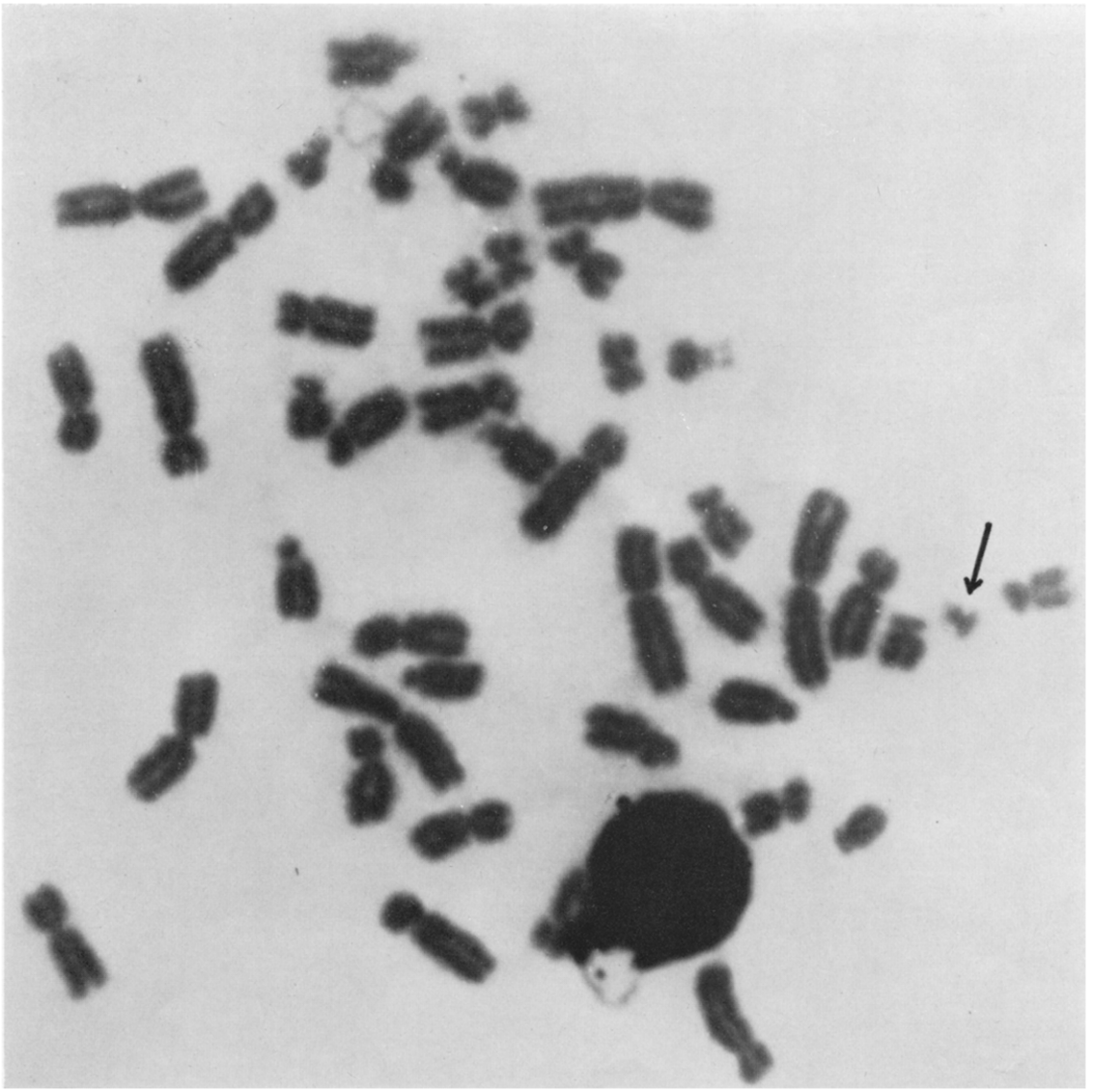


Fig. 2. Cas 8. La flèche désigne le chromosome de Philadelphie caractéristique de la leucémie myéloïde chronique.

(to face p. 198)

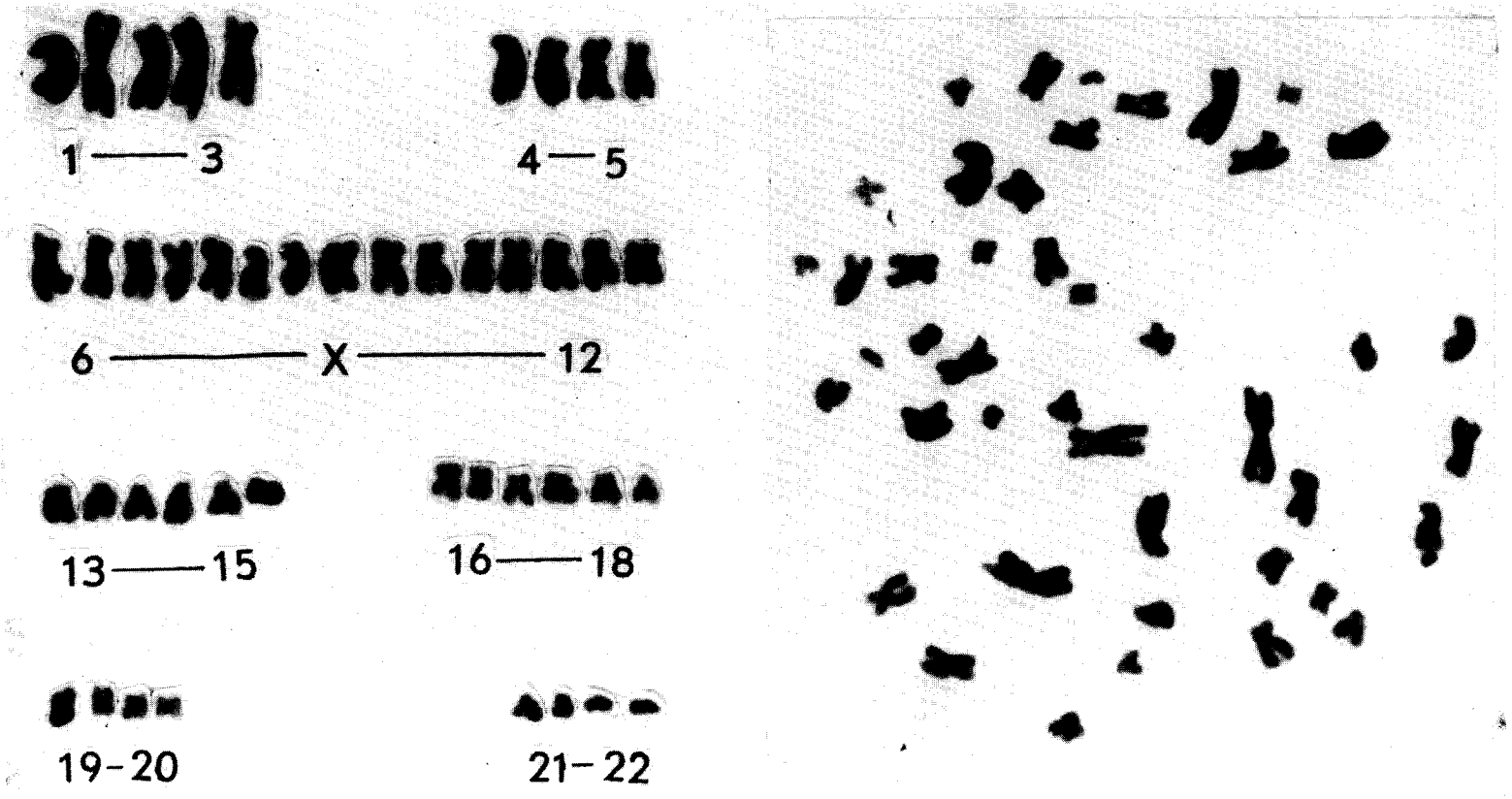


Fig. 3. *Cas* 9. *Caryotype d'une cellule de la lignée à* 44 *chromosomes. On note l'absence d'un chromosome du groupe* 1–3 *et d'un chromosome du groupe* 6–12. *Des anomalies, variables de mitose à mitose, ont en outre été observées. Dans la mitose ci-dessus, on remarque la condensation d'un chromosome du groupe* 13–15 *qui n'a pas été retrouvée dans les autres cellules caryotypées.*

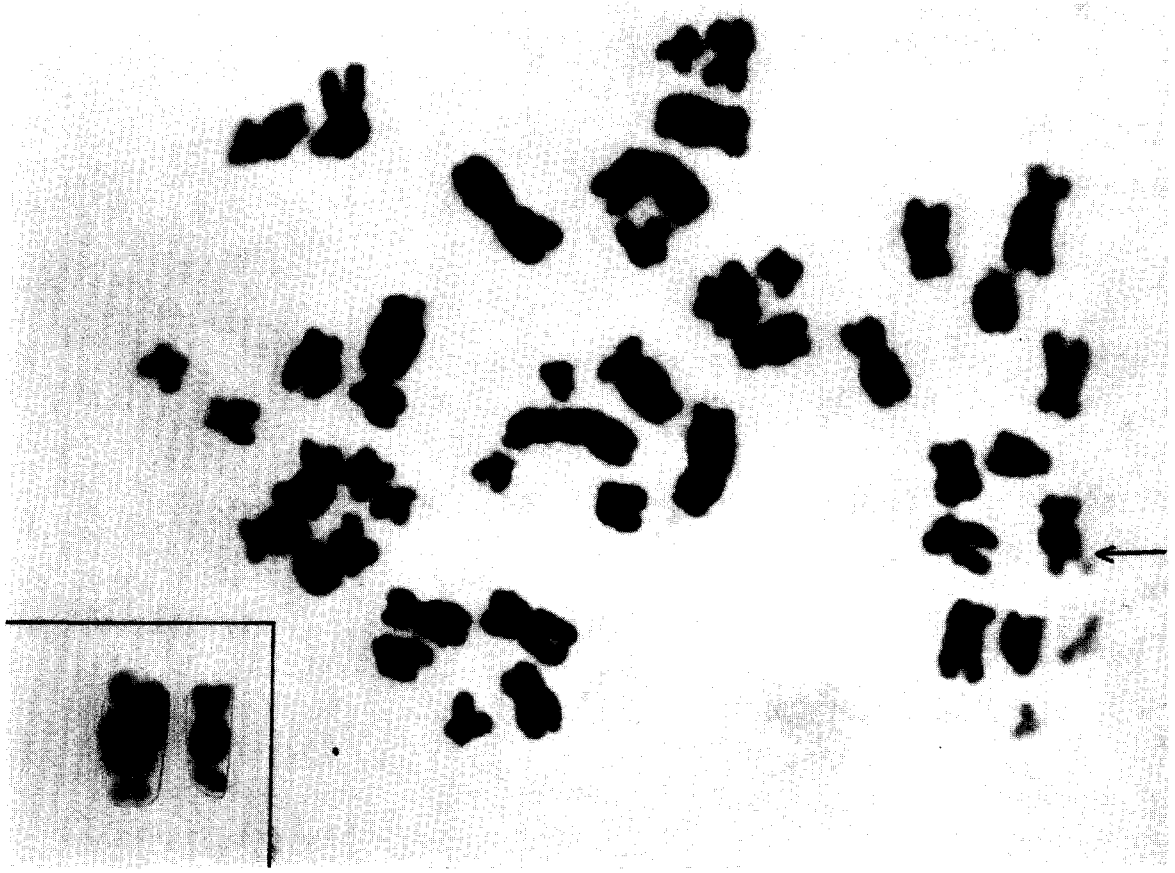


Fig. 4. *Cas* 7. *On remarque le rétrécissement secondaire juxta-terminal d'un chromosome du groupe* 6–12, *indiqué par la flèche. Deux autres chromosomes de ce groupe, présentant la même anomalie et provenant de mitoses différentes du même sujet, sont représentés dans le coin inférieur gauche.*

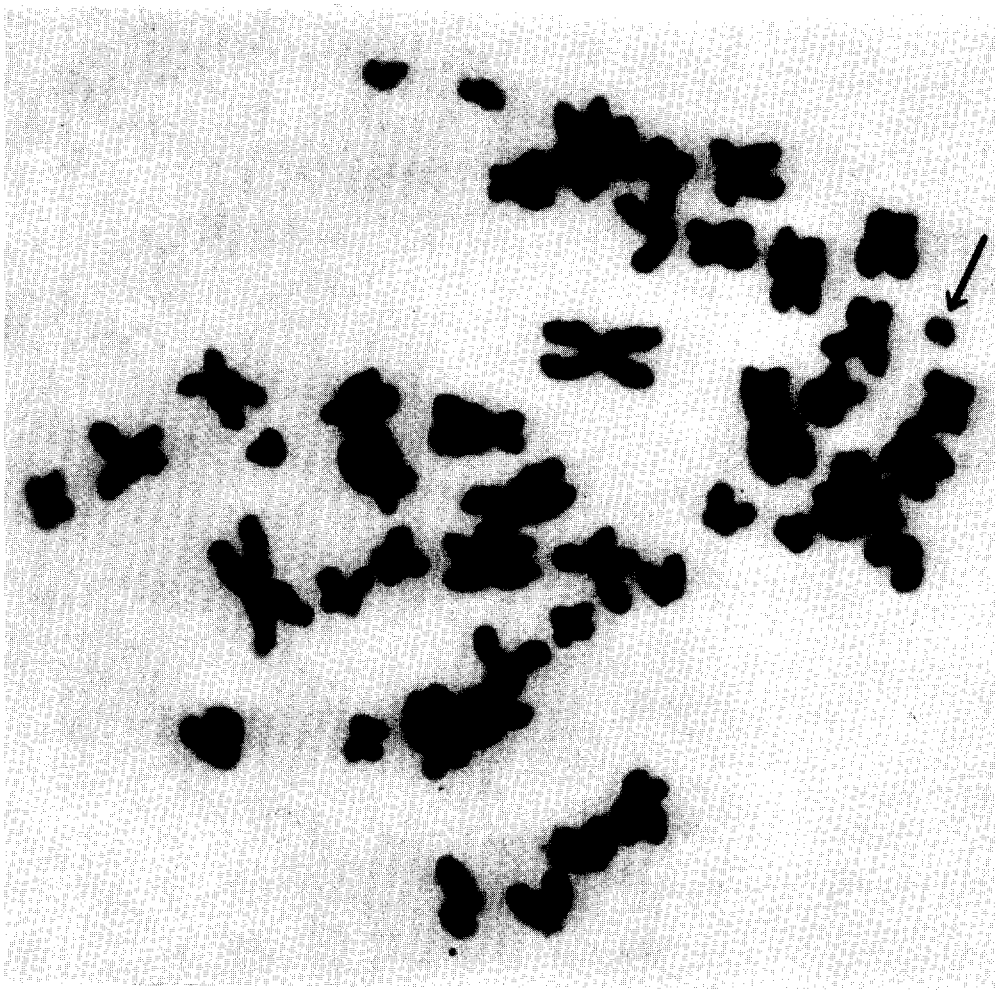


Fig. 5. *Cas* 7. *Mitose à* 47 *chromosomes. La flèche indique un petit acrocentrique ayant perdu la plus grande partie de ses bras longs. Ce chromosome, qui représente pour nous un Ph*1, *est présent dans* 10% *des cellules examinées, chez cette patiente sans symptomatologie clinique de leucémie myéloïde chronique.*

effectivement, du point de vue clinique, une leucémie myéloïde chronique (LMC), et ce cas démontre que la maladie de Vaquez peut se transformer en cette affection avec la présence du chromosome Ph1. Goh et Swisher [3] envisageaient cette possibilité, sans l'avoir cependant observée; Kemp *et al.* [16] ont eu l'occasion d'étudier un patient avec Ph1, apparu avant toute symptomatologie clinique de LMC. Au moment de la première analyse et de la découverte de ce chromosome Ph1, le malade ne présentait plus un tableau hématologique caractéristique de la maladie de Vaquez, mais il ne présentait pas encore de signes de LMC [12]. Ce cas est particulièrement important du point de vue étiologique, et il semble confirmer l'étroite corrélation existant entre la délétion des bras longs d'un chromosome 21 et l'installation d'une leucémie myéloïde chronique. La délétion précède la symptomatologie, et elle serait donc proche des facteurs *primaires* déclenchant la LMC. D'autres cas avec Ph1 sans LMC ont été rapportés par Kemp *et al.* [16] et par Tough *et al.* [23]; la symptomatologie clinique était essentiellement celle d'un désordre myéloprolifératif (polyglobulie ou thrombocytose essentielle). Le cas n°7 de la présente série se rapproche de ceux-là. Il s'agit cliniquement d'une maladie de Vaquez confirmée par l'étude ferrocinétique, sans symptomatologie de LMC, mais avec un chromosome de Philadelphie (Ph1). On note, en outre, la présence de nombreuses cassures et de multiples rétrécissements chromosomiques, avec une localisation préférentielle au niveau de la partie distale des bras longs d'1 chromosome C. L'avenir nous apprendra si la maladie de Vaquez, présentée par cette malade, se transformera en LMC. Si c'était le cas, et si, par conséquent, il se confirmait que l'apparition du chromosome Ph1 précède de plusieurs mois, voire de plusieurs années, l'installation clinique d'une LMC, l'analyse cytogénétique deviendrait un examen essentiel dans les désordres myéloproliferatifs pouvant se transformer en LMC.

RESUME

Les chromosomes des cellules médullaires de 9 *patients atteints de maladie de Vaquez et d'un cas de thrombocythémie essentielle ont été étudiés. Dans* 7 *cas, le caryotype était normal, ce qui confirme les études antérieures, faites dans cette maladie. Deux cas étaient transformés cliniquement en leucémie; la cytogénétique a confirmé, pour l'un, le diagnostic de leucémie myéloïde chronique avec Ph*1*, pour l'autre, celui de leucémie aiguë avec une lignée aneuploïde à* 44 *chromosomes. Un troisième cas présentait un nombre modal de* 46*;* 15% *des cellules montraient des lésions chromosomiques, semblables à celles observées après irradiation, et* 10% *des cellules, le chromosome de Philadelphie; l'évolution ultérieure de ce cas permettra de préciser le rôle étiologique éventuel du Ph*1 *dans l'installation d'une LMC.*

SUMMARY

A cytological study has been made of the chromosomes of bone marrow cells obtained from 9 *patients suffering from polycythemia vera and from a patient with essential thrombocythemia. The karyotypes were normal in* 7 *cases, as found in previous studies of these diseases. In* 2 *cases, however, there was clinical evidence of leukemic transformation and cytogenetic examination confirmed the diagnosis of chronic myeloid leukemia with Ph*1 *in the first case, and of acute leukemia with an aneuploid line of* 44 *chromosomes in the second case. The remaining case exhibited a modal chromosome count of* 46 *with chromosome lesions resembling those observed after irradiation in* 15% *of the cells and the Philadelphia chromosome in* 10%*. Further examination of this last case might enable one to determine the aetiological role of the Philadelphia chromosome in the induction of chronic myeloid leukemia.*

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden cytogenetische Untersuchungen an Knochenmarkszellen von 9 *Kranken mit Polycythämia vera und von einer Patientin mit essentieller Thrombocythämie, durchgeführt. In* 7 *Fällen was der Karyotyp normal; dies bestätigt, was in früheren Arbeiten bezüglich dieser Krankheit bereits festgestellt worden ist. Bei* 2 *Kranken lag klinisch eine Umwandlung in eine Leukämie vor; die cytogenetische Untersuchung bestätigte bei*

einem die Diagnose einer chronischen myeloischen Leukämie mit einem Chromosom Ph1, bei dem anderen das Bestehen einer akuten Leukämie mit einer aneuploiden Linie von 44 Chromosomen. Ein dritter Fall zeigte eine modale Anzahl von 46 Chromosomen; 15% der Zellen weisen die gleichen chromosomalen Veränderungen auf, die man nach Bestrahlung beobachten kann. Das Chromosom Ph1 wurde bei 10% der Zellen beobachtet. Die weitere Entwicklung dieses Falles wird uns erlauben die eventuelle ätiologische Rolle des Chromosoms Ph1 beim Auftreten einer chronischen myeloischen Leukämie zu bestätigen.

BIBLIOGRAPHIE

1. P. L. Nowell et D. A. Hungerford, A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **137,** 1497 (1960).
2. L. E. Reisman, W. W. Zuelzer et R. I. Thompson, Further observation on the role of aneuploidy in acute leukemia. *Cancer Res.* **24,** 1448 (1964).
3. K. O. Goh, et S. N. Swisher, Specificity of the Philadelphia chromosome. Cytogenetic studies in cases of chronic myelocytic leukemia and myeloid metaplasia *Ann. intern. Med.* **61,** 609 (1964).
4. W. Dameshek, Sideroblastic Anaemia: Is this a Malignancy? *Brit. J. Haemat.* **11,** 52 (1965).
5. I. D. Rowley, R. K. Blaisdell et L. O. Jacobson, Chromosome studies in preleukemia — I. Aneuploidy of group C chromosomes in 3 patients. *Blood* **27,** 782 (1966).
6. R. L. Huff, T. G. Hennessy, R. G. Austin, B. M. Roberts et J. H. Lawrence, Plasma and red cell iron turnover in normal subject and in patients having various hematopoietic disorders. *J. clin. Invest.* **29,** 1041 (1950).
7. J. H. Lawrence, *Polycythemia.* Grune & Stratton, London (1955).
8. M. M. Wintrobe (Ed.), *Clinical Hematology.* Lea & Febiger, Philadelphia (1961).
9. M. Tubiana, G. Vallee, M. Boiron et R. Perez, Le devenir des polyglobulies essentielles traitées par le phosphore radio-actif. A propos d'une série de 310 cas. *Nouv. Rev. franc. Hémat.* **1,** 445 (1961).
10. L. Szur et S. M. Lewis, The hematological complication of polycythemia vera and treatment with radioactive phosphorus. *Brit. J. Radiol.* **39,** 122 (1966).
11. E. E. Osgood, Polycythemia vera. Age relationship and survival. *Blood* **26,** 243 (1965).
12. N. H. Kemp, J. L. Stafford et R. K. Tanner, Cytogenetic studies of polycythemia vera. *5th Congress European Soc. of Hematology,* Vienna 1961, p. 92, Karger, Basel (1962).
13. P. C. Nowel et D. A. Hungerford, Chromosome studies in human leukemia — IV. Myeloproliferative syndrome and other atypical myeloid disorders. *J. nat. Cancer Inst.* **29,** 911 (1962).
14. H. Braunsteiner, G. Rothenbucher et B. Schobner, Kann eine Polycythemia vera in eine chronisch-myeloische übergehen? *Med. Klin.* **59,** 614 (1964)
15. W. D. Macdiarmid, Chromosome changes following treatment of polycythemia with radioactive phosphorus. *Quart. J. Med.* **39,** 133 (1965).
16. N. H. Kemp, J. L. Stafford et R. K. Tanner, Chromosome studies during early and terminal chronic myeloid leukemia. *Brit. med. J.* **1,** 1010 (1964).
17. H. E. M. Kay, S. D. Lawler et R. E. Millard, The chromosomes in polycythemia vera. *Brit. J. Haemat.* **12,** 507 (1966).
18. P. A. Jacobs, M. Brunton, W. M. Court-Brown, R. Doll, H. Goldstein, Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex difference. *Nature* **197,** 1080 (1963).
19. P. S. Moorhead, P. S. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battinger, et D. A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cuttered from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* **20,** 613 (1960).
20. Y. Kenis et L. Koulischer, Etude clinique et cytogénétique de 21 patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Europ. J. Cancer* **3,** 83 (1967).
21. A. A. Sandberg, T. Ishihara, L. H. Crosswhite et T. S. Hauschka, Chromosomal dichotomy in blood and marrow of acute leukemia. *Cancer Res.* **22,** 748 (1962).

22. J. A. HENRY, Etude des modifications de l'érythropoïèse dans la maladie de Vaquez traitée par le phosphore radioactif. *Acta. clin. belg. Suppl.* **2,** 1 (1966).
23. I. M. TOUGH, P. A. JACOBS, W. M. COURT-BROWN, A. G. BAIKIE et E. R. D. WILLIAMSON, Cytogenetic studies on bone marrow in chronic myeloid leukemia. *Lancet* **1,** 844 (1963).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 203–207. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Etude de Clones Derivés d'une Lignée Cellulaire Chroniquement Infectée par le Virus de Rauscher

A. GERALDES*, J. PERIES, M. THOMAS, C. BERNARD et M. BOIRON

Laboratoire d'Hématologie Expérimentale
Institut de Recherches sur les Leucémies
Hôpital Saint-Louis, Paris Xe

La lignée cellulaire JLS V5, obtenue par Wright et Lasfargues [1, 2] à partir d'une culture mixte de rate et de thymus de souris BALB/c, infectée par la suite *in vitro* par le virus de Rauscher, possède trois caractéristiques remarquables: (a) Elle produit de façon continue des quantités massives de virus de Rauscher. Ce fait a été établi par bio-essai [2, 3], par microscopie électronique [4, 5], par immunofluorescence [2, 6], et toutes les cellules semblent produire le virus. (b) Aucun interféron n'est détecté dans les surnageants de culture [7], bien que les cellules JLS V5 soient tout à fait capables de répondre, par une production d'interféron, à un virus inducteur (Virus de Newcastle par exemple). (c) Le virus de Rauscher obtenu est faiblement leucémogène par comparaison avec le virus extrait du sang de souris leucémique [2, 8, 9], comme le démontre en particulier la numération des particules au microscope électronique couplée avec le bio-essai [8].

Les deux premiers caractères suggèrent que l'interaction des cellules JLS V5 avec le virus de Rauscher réalise un état d'équilibre (steady-state) [10], c'est-à-dire un système défini par le fait que le virus se multiplie dans toutes les cellules sans déterminer d'effets cytopathogènes, et sans qu'il y ait production par les cellules de substances antivirales.

Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons isolé certains clones dérivés de la lignée JLS V5, et étudié leurs caractéristiques, en ce qui concerne plus spécialement la production de virions, le pouvoir leucémogène du virus obtenu, la production de substances antivirales, l'induction d'une interférence virale hétérologue.

MATERIEL ET METHODES

La lignée JLS V5 est entretenue dans un milieu de Eagle (EBM), additionné de 10% de sérum de veau décomplémenté. Huit clones (C_7, C_{7A}, C_9, C_{10}, C_{12}, C_{15}, C_{19}, C_{20}) ont été obtenus à partir de la lignée mère par la technique de Lwoff [11] sous paraffine liquide, dans des gouttes de EBM additionnées de 10^5 cellules KB par ml, préalablement irradiées par les RX (2500 r).

Le nombre de cellules clonables par la technique décrite ci-dessus est d'environ 40%. Les clones obtenus ont été examinés par contraste de phase, après coloration par le May-Grunwald-Giemsa, et soumis à une analyse caryotypique. Leur capacité de former des colonies sur surface de plastique et sur verre (plating efficiency) a été étudiée. Enfin, elles ont été greffées à des séries de souris BALB/c de 20 jours, à raison de 10^6 cellules et de 51×0^6 cellules par animal.

*Adresse actuelle du Dr. Geraldes: Fundaçao Calouste Gulbenkian, Centro de Biologia, Oeiras, Portugal.

Adresser les demandes de tirés à part au Dr. M. Thomas, Laboratoire d'Hématologie Expérimentale, Institut de Recherches sur les Leucémies, Hôpital Saint-Louis, Paris Xe.

Examen au microscope électronique

Il a été effectué sur le surnageant de culture (100 ml) de chacun des clones et de la lignée mère, recueilli 48 hr après la mise en culture, et concentré 100 fois par la méthode de Moloney [12]. On a utilisé la technique du contraste négatif de Brenner et de Horne [13].

Bio-essai

Le surnageant, prélevé et concentré de la même manière, a été testé pour son pouvoir leucémogène chez la souris BALB/c de 30 jours, par la méthode de pesée des rates, déjà décrite [3, 8]. Nous désignons par dose efficace 50 (DE 50_{28}) la dose de virus calculée par la méthode de Reed et Muench qui provoque une splénomégalie d'au moins 150 mg chez 50% des souris inoculées et sacrifiées 28 jours plus tard.

Recherche d'interféron

Environ 3×10^6 cellules des différents clones ont été ensemencées dans des flacons de 250 ml en présence de 30 ml de milieu EBM+10% de sérum de veau. Le surnageant de 2 flacons pris au hasard a été recueilli chaque jour entre 2 et 8 jours après le début de la culture. Il a été centrifugé à 3500 tours/min, pendant 5 minutes, et dialysé, pendant 24 hr, contre un tampon HCl-KCl pH 2; puis, contre un tampon phosphate pH 7. La recherche d'interféron a été effectuée sur cellules embryonnaires de souris BALB/c infectées avec le virus de la stomatite vésiculaire (VSV, souche Indiana), selon la technique décrite par Gresser et Enders [14], en utilisant des doses variées de VSV (100, 50, 25, 12 DECP/50). Une solution témoin d'interféron, provenant de souris infectées par le virus West Nile, a été préparée selon la méthode de Finter [15]. Cette solution a servi de contrôle pour les différentes expériences.

Recherche d'une interférence virale hétérologue

Des titrations parallèles du virus VSV ont été réalisées sur la lignée JLS V5, les clones C_7, C_{19} et C_{20} et des cellules embryonnaires de souris BALB/c. La lecture a été effectuée 3 jours plus tard, et les titres infectieux ont été exprimés en DECP 50/ml selon la méthode de Karber.

RESULTATS

La morphologie des cellules des différents clones s'est révélée sensiblement identique à celle de la lignée JLS V5: cellules d'aspect fusiforme, sans inclusions nucléaires ou cytoplasmiques, réparties de façon désordonnée, souvent s'entrecroisant entre elles, et poussant de façon très rapide les unes sur les autres.

L'analyse caryotypique révèle la polyploïdie de tous les clones obtenus, sans montrer la présence de marqueurs spécifiques.

Le "plating efficiency", calculé sur 3 clones, a fourni les chiffres respectifs de 17,5; 20,5; 22,5%, du même ordre de grandeur que celui de la lignée mère (20–25%).

La greffe des cellules clonées à la souris BALB/c est possible à condition d'utiliser un nombre relativement élevé de cellules (5×10^6); même dans ce cas, elle n'est positive que chez 10 à 20% des animaux, après un délai moyen de 15–20 jours.

Les résultats des examens pratiqués sur le surnageant de culture des différents clones, par comparaison avec la lignée JLS V5, sont résumés dans le Tableau 1. Ils démontrent que tous les clones sont producteurs de virus, dont le pouvoir leucémogène est comparable à celui de la lignée JLS V5, et que, par ailleurs, aucune substance de type interféron ne semble être produite par les clones.

L'absence d'interférence hétérologue vis-à-vis du virus de la stomatite vésiculaire a pu être démontrée au niveau des trois clones testés, comme le montre le Tableau 2.

DISCUSSION

Les faits ci-dessus rapportés démontrent que, dans l'ensemble, les clones étudiés se comportent comme la souche originelle JLS V5: (a) Tous les clones produisent d'abondantes particules virales dans le surnageant, comme le démontre la microscopie électronique, et dont l'inoculation à l'animal provoque une splénomégalie érythroblastique du type de la maladie de Rauscher. (b) Aucun interféron n'est détecté dans les surnageants de culture, et aucune interférence virale hétérologue n'est mise en évidence.

Plusieurs problèmes sont soulevés par ces constatations. En premier lieu, le fait que tous les clones produisent le virus de Rauscher semble confirmer l'hypothèse qui tend à faire de la lignée JLS V5 un exemple d'interaction cellules-virus de type "steady-state". Dans ce type d'infection permanente, en effet, toutes les cellules produisent du virus, comme le prouvent les études précédemment effectuées avec le virus de la rage [16], des oreillons [17] et du polyome [18]. Une restriction doit néanmoins être faite, car le clonage pourrait avoir sélectionné uniquement les cellules productrices de virus. Toutefois, cette éventualité est rendue peu vraisemblable par le fait que le pourcentage des cellules clonables est élevé. De

Tableau 1. *Résultats des examens pratiqués sur le surnageant de culture des cellules JLS V5 et des différents clones*

Cellules en culture		Présence de virions au microscope électronique	DE $50_{(28)}$ par ml*	Recherche d'interféron
JLS V5†	1	+	86	Négative
	2	+	50	id.
	3	+	200	id.
	4	+	68	id.
	5	+	200	id.
	6	+	160	id.
	7	+	360	id.
	8	+	140	id.
	9	+	630	id.
Clones	C_7	+	80	id.
	C_{7A}	+	40	id.
	C_9	+	500	id.
	C_{10}	+	80	id.
	C_{12}	+	1260	id.
	C_{15}	+	31	id.
	C_{19}	+	250	id.
	C_{20}	+	630	id.

*Le surnageant de culture a été concentré par la technique de Moloney. Le pellet viral a été resuspendu en tampon citrate pH 6,4 à une concentration de × 100. Le titre a été déterminé sur ce concentré. Pour la définition de la DE $50_{(28)}$ voir page 3.
†Neuf cultures différentes ont été testées.

plus, la production de virus par toutes les cellules de la lignée JLS V5 est bien établie par la microscopie électronique [4] et l'immunofluorescence [6]. Un autre caractère des états dits de "steady-state" est l'absence de réponse cellulaire à l'infection virale sous forme d'élaboration de substances de type interféron. Cette caractéristique se retrouve au niveau des clones, et elle pourrait expliquer pourquoi il n'existe pas non plus d'interférence virale hétérologue.

Tableau 2. *Etude de la multiplication du virus de la stomatite vésiculaire sur cellules d'embryon de souris, cellules JLS V5, et cellules de* 3 *clones provenant de JLS V5*

Cellules cultivées	Titre infectieux du virus de la stomatite vésiculaire DECP/50 p.ml*
Cellules d'embryon de souris	$10^{,575}$
JLS V5	10^6
C_7	$10^{5,75}$
C_{19}	10^6
C_{20}	$10^{5,75}$

*Les expériences ont été réalisées en double — Les chiffres cités représentent la moyenne de ces 2 expériences. DECP/50=Dose effet cytopathogène 50 déterminée par la méthode de Karber.

Le fait qu'un virus de type leucémique est capable d'établir *in vitro*, avec les cellules JLS V5, un état d'équilibre menant à une production continue de virus sans désordre apparent de la morphologie et de la cinétique cellulaire est un fait important, tant sur le plan théorique que pratique. La virémie intense et permanente que présentent les souris leucémiques pourrait être expliquée si un tel type d'interaction cellules-virus se retrouvait également *in vivo*.

En second lieu, le virus produit par les différents clones est, dans l'ensemble, peu infectieux, quand on le compare à celui extrait du plasma de souris leucémiques. Cette diminution d'infectiosité apparente est du même ordre, quand on compare la lignée JLS V5 et les clones. Toutefois, aucune numération au microscope électronique n'ayant été faite sur les virions présents dans le surnageant des clones il est difficile de conclure quant à la "qualité" du virus formé dans ces conditions.

On peut noter cependant qu'un des clones $C_{(12)}$ produit un virus dont le titre leucémogène est nettement plus élevé que celui des autres clones et de la lignée JLS V5. Des titrations répétées sont en cours pour savoir si ce caractère est stable et peut être défini comme génétiquement lié aux cellules de ce clone.

Il est également intéressant de souligner que, dans le cadre de l'expérimentation décrite,

aucun des clones étudiés ne produit un virus totalement dénué de pouvoir leucémogène. L'hypothèse selon laquelle le faible pouvoir leucémogène de la lignée JLS V5 serait dû à un mélange de cellules produisant respectivement du virus infectieux et non infectieux peut donc être écartée.

Remerciements — Nous remercions Melles A. Hampe et M. Canivet pour la collaboration qu'elles nous ont apportée dans ce travail.

RESUME

Huit clones, dérivés de la lignée cellulaire JLS V5 chroniquement infectée par le virus de Rauscher, ont été isolés et étudiés en ce qui concerne la production de virions, le pouvoir leucémogène du virus obtenu, la production de substances antivirales, et l'induction d'une interférence virale hétérologue.

Les résultats obtenus démontrent que, dans l'ensemble, les clones se comportent comme la souche originelle, et semblent confirmer l'hypothèse qui tend à faire de la lignée JLS V5 un exemple d'interaction virus-cellules du type "steady-state".

SUMMARY

Eight clones derived from the JLS V5 cell line, which is chronically infected by Rauscher virus, were isolated and studied with regards to the production of virions, the leukemogenic activity of the virus obtained, the production of antiviral substances and the induction of an heterologous viral interference.

The results obtained demonstrate that the behaviour of the isolated clones is grossly similar to that of the original JLS V5 cell line, which seems to confirm the hypothesis leading to make the JLS V5 cell line an example of virus-cell interaction of the "steady-state" type.

ZUSAMMENFASSUNG

Acht Cloni des Zellstamms JLS V5, der mit dem Rauscher-Virus chronisch infiziert ist, wurden isoliert und auf folgende Wirkungen untersucht: Produktion von Viruspartikeln, Leukämie-erzeugende Aktivität des erhaltenen Virus, Synthese antiviraler Substanzen und Induktion einer heterologen viralen Interferenz.

Aus den Resultaten geht hervor, dass, im grossen Ganzen, die Cloni sich gleich verhalten wie der ursprüngliche Zellstamm. Die Hypothese, der Stamm JLS V5 bilde ein Beispiel "für die zwischen Virus und Zelle bestehende Wechselwirkung vom "steady-state" Typus, schient dadurch bestätigt zu werden.

BIBLIOGRAPHIE

1. B. S. Wright et J. C. Lasfargues, Multiplication of the Rauscher leukemia virus in a mixed culture of mouse spleen and thymic cells. *Proc. Amer. Cancer Res.* **5,** 70 (1964).
2. B. S. Wright et J. C. Lasfargues, Long-term propagation of the Rauscher murine leukemia virus in tissue culture. *J. nat. Cancer Inst.* **35,** 319 (1965).
3. C. Bernard, D. Silvestre, J. Tanzer, J. Peries et M. Boiron, Analyse d'une lignée cellulaire produisant de façon continue le virus leucémique de Rauscher *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **40,** 513 (1965).
4. D. Silvestre, J. P. Levy, C. Bernard et M. Boiron, Etude au microscope électronique d'une souche cellulaire chroniquement infectée par le virus de Rauscher. *J. Microscopie* **4,** 705 (1965).
5. R. F. Ziegel, R. L. Tyndall, T. E. O'Connor, E. Teejer et B. X. Allen, Observations on the morphology of a murine leukemia virus (Rauscher) propagated in tissue culture. *Conf. Murine Leukemia, Philadelphia* (Oct. 1965); to be published in *Nat. Cancer Inst. Monograph*, 1966.
6. Documents personnels non publiés.

7. J. Peries, M. Boiron et M. Canivet, Recherche d'une production d'interféron et d'une interférence virale hétérologue dans une lignée cellulaire chroniquement infectée par le virus de Rauscher. *Ann. Inst. Pasteur* **109,** 595 (1965).
8. J. P. Levy, D. Silvestre, J. C. Leclerc et M. Boiron, Quantitative electron microscope investigations on Rauscher virus. *Virology* **29,** 681 (1966).
9. G. Barski et K. J. Youn, Immunisation against Rauscher mouse leukemia with tissue culture material. *Science* **149,** 751 (1965).
10. R. Dulbecco, Characteristics of virus-cell complexes. *Amer. J. Med.* **38,** 669 (1965).
11. A. Lwoff, R. Dulbecco, M. Vogt et M. Lwoff, Kinetics of the release of poliomyelitis virus from single cells. *Virology* **1,** 128 (1955).
12. J. B. Moloney, Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigation. *J. nat. Cancer Inst.* **24,** 933 (1960).
13. S. Brenner et R. W. Horne, A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. biophys. Acta* **34,** 103 (1959).
14. I. Gresser et J. F. Enders, Alteration of cellular resistance to Sindbis virus in mixed cultures of human cells attributable to interferon. *Virology* **16,** 428 (1962).
15. N. B. Finter, A rich source of mouse interferon. *Nature (Lond.)* **204,** 1114, (1964)
16. M. V. Fernandes, J. N. Tadeusz et H. Koprowski, Endosymbiotic relationships between animal viruses and host cells. A study of rabies virus in tissue culture. *J. exp. Med.* **120,** 1099 (1964).
17. D. J. Walker et H. C. Hinze, A carrier state of mumps virus in human conjunctive cells. II. Observations on intracellular transfer of virus and virus release. *J. exp. Med.* **116,** 751 (1962).
18. D. J. Hare et H. R. Morgan, Polyoma virus and L cell relationships. II. A curable carrier system not dependent on interferon. *J. nat. Cancer Inst.* **33,** 765 (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 209–215. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Les Aberrations Chromosomiques Observées dans les Cellules Sanguines Humaines Irradiées *in vitro* avec des flux Différents d'Electrons Rapides (35 MeV)*

(Implications Radiothérapiques Eventuelles)

W. FEREMANS

Service de Radiothérapie, Institut Bordet, Bruxelles
Laboratoire de Cytogénétique, Université de Bruxelles

INTRODUCTION

DANS ce travail, nous avons tenté de préciser le rôle éventuel joué par le flux de radiation dans l'apparition des aberrations chromosomiques observées au niveau de cellules sanguines humaines irradiées *in vitro* au moyen d'électrons de haute énergie.

Les expériences déjà anciennes de Lea [1], confirmées par celles plus récentes de Bell et Baker [2], ont montré que la vitesse à laquelle est distribuée une dose déterminée de radiations conditionne indubitablement la fréquence de certains types d'aberrations chromosomiques. Ainsi, le nombre d'aberrations ne nécessitant qu'une seule lésion ("one hit" lesion des Anglo-Saxons) ne dépend pas du flux des radiations dont le TEL (transfert d'énergie linéaire) est bas; au contraire, les aberrations nécessitant au moins deux lésions ("two hit" lesion) ont une fréquence qui augmente avec l'intensité du rayonnement de TEL bas.

Alors que la plupart des travaux antérieurs ont été pratiqués avec des rayons X ou des rayons gamma, nous avons utilisé les électrons rapides de 35 MeV dont le TEL est de 0,28 keV/μ. Les doses utilisées ont été de 200 et 400 r, délivrées en une fois, avec des flux variant entre 10 r/min et 450 r/min.

MATERIEL ET METHODE

Des cellules sanguines humaines provenant d'un sujet sain de 39 ans, de sexe masculin, ont été cultivées selon la méthode de Moorhead [3] durant une période de 72 hr.

Dix échantillons de cette culture ont été irradiés à la 55e heure avec des électrons de 35 MeV émis par un bétraton†; cinq d'entre eux reçurent 200 r à raison de 10, 50, 100, 250 et 450 r/min respectivement, les cinq autres cultures recevant 400 r, aux mêmes flux que les précédentes. Un échantillon non irradié a permis la détermination du taux moyen d'aberrations spontanées.

Chaque culture, après addition de colchicine et de solution hypotonique, a été arrêtée à la 72e heure, soit 17 hr après l'irradiation. Les frottis, obtenus à partir des culots de centrifugation, ont été séchés à l'air, colorés à l'orcéine, et enfin examinés.

Dans chacune des cultures, nous avons obtenu un nombre variant entre 80 et 200 cellules en métaphase, suffisamment bien étalées pour permettre une analyse du caryotype. Chaque mitose a été photographiée. L'examen visuel direct et l'examen des clichés photographiques ont permis, dans chaque cas, de faire le relevé du nombre et du type des aberrations chromosomiques observées.

*Communication présentée au "*3rd Congr. Radiation Research*" (Cortina d'Ampezzo, 1966).

†Asclépitron Brown Boveri.

Nous avons classé les aberrations, suivant en cela Bender [4], selon qu'elles étaient du type à 1 coup ("one hit") ou à 2 coups ("two hit"). Cette distinction réside dans la différence existant dans la courbe dose/effet entre ces deux types d'aberrations: la fréquence des lésions à 1 coup, telles les délétions chromatidiennes (et aussi peut-être isochromatidiennes)*, ainsi que les délétions chromosomiques, augmente linéairement en fonction de la dose; la fréquence des lésions dites à 2 coups ou plus ("two hit" et "multihit"), comme les échanges, les translocations, les di- et tricentriques et les chromosomes en anneau, est proportionnelle au carré de la dose [4].

Un certain nombre d'aneuploïdies, de polyploïdies et d'endoréduplications ont été également relevées.

Les lésions achromatiques (gaps) n'ont pas été retenues comme aberrations; elles étaient d'ailleurs très rares.

type chromosomique et du type chromatidien. Dans quelques cas, les deux types coexistaient dans la même cellule comme cela a déjà été signalé [5].

Le Tableau 1 nous apporte globalement les résultats enregistrés; il est à remarquer que le nombre de lésions dites à 2 coups a été soustrait de celui des lésions dites à 1 coup, parce que l'on a considéré que chaque fragment acentrique compté pouvait résulter d'une lésion de type à 2 coups.

Dans la Fig. 1, nous avons exprimé le pourcentage d'aberrations du type à 1 coup et du type à 2 coups en fonction des divers flux utilisés. Il apparaît très nettement que le pourcentage des lésions du premier type est indépendant du flux, alors que la pourcentage des lésions du second type révèle au contraire une dépendence avec un apparent maximum d'efficacité à 100 r/min.

On ne peut cependant mieux comparer ces

Tableau 1. *Tableau donnant globalement l'ensemble de nos résultats expérimentaux*

Dose	Flux (r/min)	Nb. de cell.	Aneuploïdies	Lésions à "1 coup"	Lésions à "2 coups"	Endoréduplications	Polyploïdies	Cassures
200	10	100	4	41	10	0	1	61
200	50	80	0	37	8	0	1	53
200	100	85	3	30	21	2	1	72
200	250	127	2	53	21	1	2	95
200	450	102	1	51	14	0	0	79
400	10	98	1	99	9	0	2	117
400	50	99	1	88	30	1	0	148
400	100	95	2	77	65	0	0	207
400	250	103	1	89	53	0	0	195
400	450	178	7	158	88	1	1	334

RESULTATS

(a) *Les cultures témoins*

Nos cultures témoins présentaient un taux de 23 cassures par 1000 cellules. Il s'agissait toujours d'aberrations de type chromatidien du groupe des lésions à 1 coup; 1 polyploïdie et 2 endoréduplications furent observées sur 1000 mitoses examinées.

(b) *Les cultures irradiées*

Les aberrations observées étaient à la fois du

taux différents d'aberrations chromosomiques qu'en utilisant les coefficients proposés par Lea [1]. Si l'on rapporte ces coefficients par rapport aux divers flux, nous obtenons 4 diagrammes (Fig. 2a, b, c, d) qui mettent clairement en évidence le fait, déjà signalé plus haut, qu'il existe un incontestable effet d'intensité pour les aberrations de type à 2 coups, cet effet étant inexistant pour les lésions de type à 1 coup; l'intervalle statistique choisi a été de 1σ et 2σ.

Enfin, nous pouvons encore exprimer le dommage chromosomique dû aux irradiations en calculant le nombre de ruptures chromosomiques par cellule et par röntgen. Exprimées graphiquement (Fig. 3), les valeurs ainsi obtenues en fonction des divers flux confirment les conclusions précédemment émises, mais d'une manière statistique moins rigoureuse.

*Il est impossible de différencier les délétions isochromatidiennes des délétions chromosomiques de type NUpd; dans ces dernières, en effet, le fragment acentrique ne présente pas de réunion (NU) ni proximale (p) ni distale (d). Nous avons donc considéré que les aberrations isochromatidiennes étaient des lésions à 1 coup, bien qu'il soit possible que ceci ne corresponde pas totalement à la réalité. Quoi qu'il en soit, leur fréquence relativement faible n'a guère pu influencer le taux d'aberrations relevé ici.

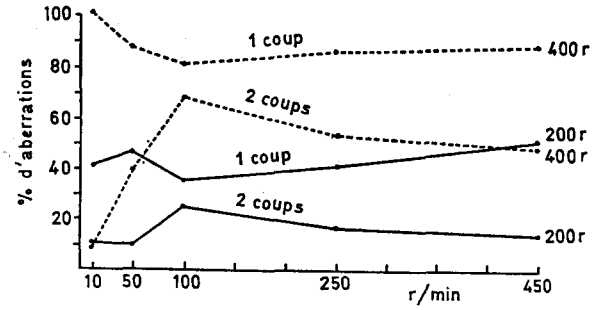


Fig. 1. *Diagramme donnant le pourcentage d'aberrations chromosomiques du type à* 1 *coup et du type à* 2 *coups, en fonction du flux de la radiation pour les doses* 200 *r et* 400 *r.*

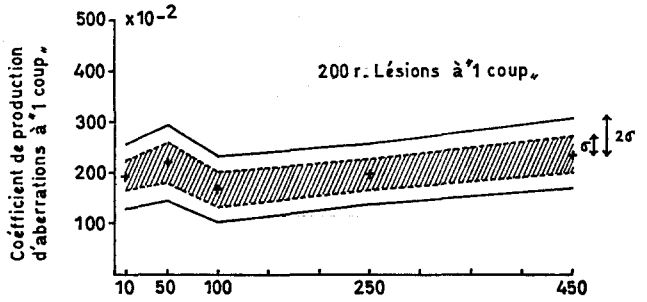


Fig. 2*a. Diagramme représentant les valeurs du coefficient de production d'aberrations du type à* 1 *coup en fonction du flux de radiations pour la dose* 200 *r. La variation statistique autour des valeurs calculées a été représentée* (1σ *et* 2σ). *Les lésions chromosomiques du type à* 1 *coup sont indépendantes du flux de radiations.*

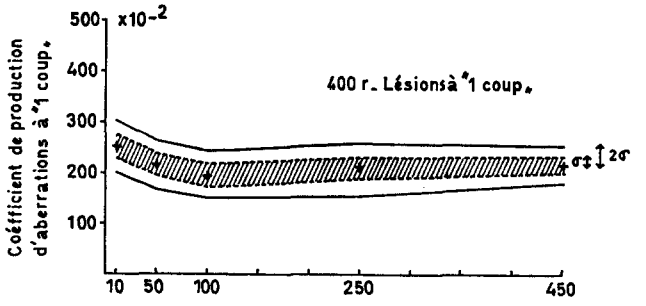


Fig. 2*b. Diagramme identique à celui de la figure n°* 3*a, mais pour la dose de* 400 *r. Conclusion similaire.*

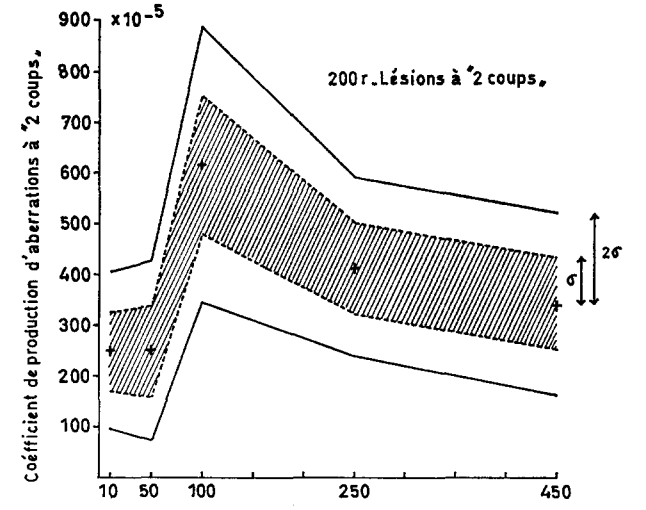


Fig. 2*c. Diagramme représentant les valeurs du coefficient de production d'aberrations du type à* 1 *coup en fonction du flux de radiations pour la dose* 200 *r. La variation statistique autour des valeurs calculées a été représentée* (1σ *et* 2σ). *Pour une variation statistique de* 1σ, *les lésions chromosomiques du type à* 2 *coups sont plus fréquentes pour un flux de* 100 *r/min.*

DISCUSSION

(a) *Cinétique de la population cellulaire utilisée*

Des travaux récents [6], il ressort que les cultures de sang humain ne comportent plus à la 55e heure, temps choisi pour l'irradiation, de cellules au même stade de développement. La population est devenue hétérogène; ainsi, elle contient aussi bien des éléments se trouvant encore au stade S (synthèse) précédant la première division que d'autres déjà au stade de la deuxième division (M_2).

Parfaitement conscient de cette hétérogénéité, nous nous sommes donc attaché à irradier notre matériel pratiquement au même moment; aussi le seul paramètre qui ait pu jouer est le flux. Que ce dernier soit responsable directement du type d'aberrations observé, ou qu'il soit responsable de modifications dans le déroulement de la mitose (retard, protraction) provoquant des taux différents d'anomalies chromosomiques, nous l'ignorons; mais, quoi qu'il en soit, le flux apparaît comme un facteur dont il faut tenir compte lors d'une irradiation aiguë par des électrons rapides.

(b) *Mécanisme de l'aberration chromosomique*

Il s'agit là d'un des problèmes les plus passionnants à l'ordre jour des recherches radiobiologiques actuelles.

Deux théories s'affrontent: l'une proposée par Sax [7] et plus tard par Lea [8]; l'autre, beaucoup plus récente, avancée par Revell [9] et reprise par Neary [10].

Pour Sax, les discontinuités observées au niveau des chromatides, après irradiation, correspondent à des ruptures non cicatrisées produites au moment du passage de la radiation ionisante au niveau du filament chromatidien. La quantité d'énergie nécessaire pour produire une cassure serait de l'ordre de 600 eV pour le matériel utilisé (Tradescantia), ce qui correspond à une vingtaine d'ionisations. La théorie se ramène à expliquer la cassure du chromosome par le passage d'une grande quantité d'énergie dans une grande cible.

Revell [9] proposa, sur la base d'une expérimentation intéressante, une autre théorie qui fut appelée l'hypothèse de l'échange ("exchange hypothesis"); selon cette théorie, le chromo-

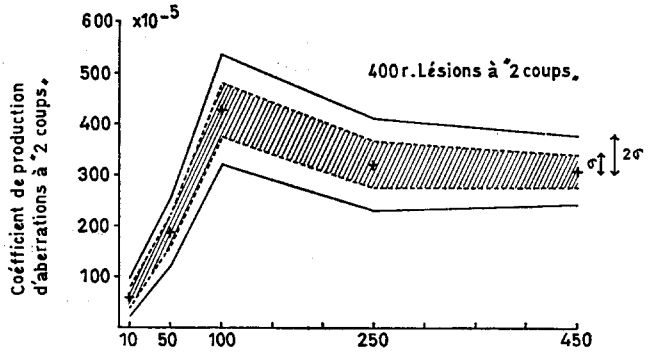


Fig. 2d. Diagramme identique à celui de la figure n° 3c, mais pour la dose de 400 r. Pour une variation statistique de 2σ, il apparait que les lésions chromosomiques du type à 2 coups sont plus fréquentes pour un flux de 100 r/min.

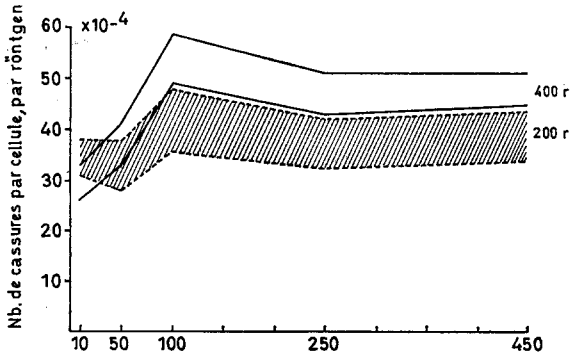


Fig. 3. Diagramme indiquant les variations du nombre de cassures chromosomiques par cellule et par röntgen pour les doses 200 r et 400 r en fonction du flux de radiations. La hauteur de la courbe indique la variation statistique autour de la valeur calculée. Pour la dose 400 r, le nombre de cassures par cellule et par röntgen est statistiquement plus élevé pour les flux de 100 r/min et plus.

some subit, au passage de la radiation, des ruptures en certains de ses points. Si ces lésions sont suffisamment voisines l'une de l'autre, il se produit un échange entre les zones rompues ("intrachange") ce qui se traduit, à la métaphase, par une image de cassure.

Adoptant l'hypothèse de l'échange, Neary, Savage et Evans [11] ont montré que des cassures pouvaient être produites avec des rayons X de 1,5 KeV et que, dans ces conditions, tout se passait comme si une petite quantité d'énergie était efficace au niveau d'une seule macromolécule d'ADN. La cassure du chromosome ("one hit lesion") résulterait, dès lors, d'un échange survenant entre deux zones lésées au sein d'un même chromosome, au moment où celui-ci est à l'état de filament flexueux; le dicentrique et l'échange chromatidien ("two hit lesion") proviendraient de l'union survenant entre deux zones lésées appartenant à des chromosomes différents ("extrachange"). Cette théorie s'appuie à la fois sur des éléments expérimentaux et sur un modèle mathématique [10]; elle a le mérite de faire la liaison entre la morphologie des aberrations chromosomiques et la radiochimie de l'ADN.

(c) *Rôle éventuel du flux*

Quel que soit le mécanisme responsable de la production des aberrations chromosomiques, il reste évident que les lésions classées dans la catégorie à 2 coups nécessitent toujours deux conditions: l'existence simultanée de deux lésions intéressant chacune un chromosome différent, et la proximité dans l'espace de ces lésions, telle que l'échange puisse s'établir.

Les radiations de TEL bas comme les rayons X, les rayons γ, les électrons de haute énergie, ont une densité d'ionisation faible; aussi, le passage de la radiation provoque-t-il des altérations relativement dispersées, et les chances de trouver en même temps deux lésions primaires voisines touchant des chromosomes différents sont d'autant plus grandes que la dose de radiation est donnée plus rapidement. On comprendra, dès lors, que l'on est en droit de s'attendre à une efficacité plus grande d'un flux élevé dans la production d'aberrations à 2 coups.

Dans la théorie de Sax, les cassures de chromatides sont produites presque instantanément et évoluent soit vers le maintien, soit vers la cicatrisation. L'effet du flux dans une irradiation aiguë est donc aisé à comprendre à la condition d'admettre que les zones lésées restent "ouvertes" pour que puissent se réaliser de nouvelles combinaisons pendant une période estimée, suivant les cas, de 3 minutes à plus de 60 minutes.

Les travaux récents d'Evans [12] mettent en doute l'hypothèse selon laquelle les aberrations se produisent instantanément: l'irradiation créerait, au sein des macromolécules chromosomiques, des lésions instables subsistant pendant plusieurs heures, évoluant soit vers la cicatrisation parfaite, soit vers la cicatrisation défectueuse reconnaissable morphologiquement sous la forme d'une lésion achromatique (gap). Si une telle hypothèse se révélait exacte, et les raisons de l'accepter sont nombreuses, comment expliquer un éventuel effet du flux dans une irradiation aiguë comme celle que nous avons utilisée? Nous voyons deux explications possibles. En premier lieu, nous pouvons imaginer qu'après le passage de la radiation ionisante tout se passe comme si les aberrations latentes se comportaient comme de véritables cassures; les lésions primaires touchant des chromosomes différents pourraient contracter, à ce stade, une ébauche d'échange et resteraient suffisamment voisines pour donner finalement des aberrations du type à 2 coups. Les deux théories, celle de Sax et celle de Revell, seraient, en ce cas, bien plus proches l'une de l'autre dans leur conception, remarque déjà exprimée par Evans lui-même [13]. L'autre explication fait intervenir un nouveau mécanisme qui serait un retard survenant dans le déroulement normal de la synthèse de l'ADN [14], retard qui ne serait pas identique aux divers flux utilisés. Ainsi, les cellules fixées 17 heures après irradiation se trouveraient à des stades différents, et les taux d'aberrations relevés ne seraient pas comparables.

Quelle que soit la nature intime du mécanisme d'action du flux, les résultats enregistrés démontrent que ce facteur n'est pas négligeable. Cette conclusion nous semble intéressante, même avec la réserve évoquée plus haut, à savoir que l'expérience a porté sur une population hétérogène de cellules sanguines à divers stades de la division.

Sur un plan pratique, le rôle du flux doit donc être retenu; les bétatrons utilisés dans les centres anticancéreux permettent l'utilisation d'électrons rapides émis sous des flux qui sont, dans une certaine mesure, contrôlables. Rien actuellement n'autorise à préconiser un flux faible ou un flux élevé. Mais si, d'une part, il est prouvé que les hautes intensités entraînent un pourcentage plus élevé de lésions de type à 2 coups, et si, d'autre part, il est admis que de telles lésions chromosomiques compromettent davantage le devenir des cellules qui en sont porteuses, on peut supposer qu'il y a

intérêt à utiliser des flux élevés (100 r/min et plus). Assurément, il est dangereux d'assimiler les cellules cancéreuses aux cellules normales en ce qui concerne leur réponse aux irradiations; mais, faute de disposer d'études expérimentales récentes portant sur les aberrations chromosomiques radio-induites des cellules néoplasiques, nous croyons digne d'intérêt d'attirer l'attention sur cet aspect particulier de l'électronthérapie.

Quant au maximum d'efficacité apparent observé avec 100 r/min, il s'expliquerait par le fait que les flux élevés déterminant l'apparition d'un grand nombre de cellules contenant plusieurs lésions de type à 2 coups, ou à plusieurs coups, provoqueraient leur mort. Ces cellules échapperaient ainsi au décompte et les taux d'aberrations seraient apparemment inférieurs à ceux enregistrés avec 100 r/min.

(d) *Polyploïdies et endoréduplications*

Nous insistons, par ailleurs, sur l'existence d'un certain nombre de polyploïdies, d'endoréduplications et d'aneuploïdies dont le nombre très petit ne permet pas une analyse statistique comparative dans nos divers groupes expérimentaux. Leurs fréquences respectives sont cependant élevées, ce qui est compatible avec certaines observations antérieures [15].

CONCLUSION

Pour étudier le rôle joué par le flux dans l'action biologique des électrons, nous l'avons fait varier dans le cas de deux valeurs de dose, 200 r et 400 r. Ceci ne nous permet pas de préjuger des réponses expérimentales que fourniraient les valeurs supérieures ou inférieures. Les doses que nous avons choisies sont celles qui se rapprochent le plus des doses unitaires utilisées habituellement en radiothérapie, notre but étant de pouvoir tirer des enseignements utilisables en thérapeutique à partir de l'expérimentation biologique. Nos résultats suggèrent que l'intensité de la radiation intervient dans la production d'aberrations chromosomiques; ils permettent donc de penser qu'elle peut jouer un rôle dans les actions thérapeutiques.

Remerciements — Je remercie le Professeur S. Simon, chef du service de radiothérapie de l'Institut Bordet, ainsi que le Professeur Fr. Twiesselmann, titulaire de la chaire de génétique à la Faculté de Médecine de Bruxelles, pour les conseils, les encouragements, et l'aide qu'ils ont bien voulu m'apporter dans la réalisation de ce travail.

Ma reconnaissance va également à Madame L. Defrise-Gussenhoven, chef de travaux à la Faculté des Sciences de l'Université, qui a bien voulu se charger de l'analyse statistique de nos résultats expérimentaux, et au Docteur L. Koulischer, du département de cytogénétique, pour l'assistance apportée à la mise en culture de notre matériel expérimental.

Enfin, que Madame M.-M. Verriest, infirmière au service de radiothérapie, trouve ici l'expression de ma gratitude pour sa collaboration technique à l'irradiation des cultures.

RESUME

Des cellules sanguines humaines, cultivées in vitro, *ont été irradiées à la* 55*e heure, au moyen d'électrons de* 35 *Mev.*

Cinq échantillons de culture reçurent 200 *r sous un flux de* 10, 50, 100, 250 *et* 450 *r/min respectivement;* 5 *autres échantillons furent irradiés dans les mêmes conditions avec* 400 *r.*

Les aberrations chromosomiques de type à 1 *coup ne montrèrent aucune dépendance par rapport au flux; par contre, le taux des aberrations de type à* 2 *coups montra une dépendance statistiquement valable par rapport à l'intensité d'irradiation.*

SUMMARY

Human blood cells harvested in vitro *were irradiated at the 55th hour with* 35 *MeV electrons.*

Five samples of cultures received 200 *r at different dose rates of respectively* 10, 50, 100, 250 *and* 450 *r/min; 5 other samples were irradiated in the same conditions with* 400 *r. One hit chromosomial aberrations were not dose rate dependent whereas 2 hit aberrations were related to dose rate.*

ZUSAMMENFASSUNG

In vitro *kultivierte menschliche Zellen wurden in der* 55. *Stunde einer Elektronenbestrahlung mit* 35 *MeV ausgesetzt.*

Fünf Zellproben erhielten je 200 *r bei einer Bestrahlungsintensität von* 5, 10, 100, 250 *bzw.* 450 *r/Min. Fünf weitere Zellproben erhielten unter den gleichen Bedingungen eine Gesamtdosis von* 400 *r.*

Die Chromosomenaberrationen vom Ein-Treffer-Typ schienen völlig unabhängig von der Bestrahlungsintensität aufzutreten, während der Anteil von Aberrationen vom Zwei-Treffer-Typ statistisch signifikant von der Bestrahlungsintensität abhängig war.

BIBLIOGRAPHIE

1. D. E. Lea, *Action of Radiation on Living Cells.* Cambridge University Press (1955).
2. A. G. Bell et D. G. Baker, Irradiation-induced chromosome aberrations in normal human leucocytes in culture. *Can. J. Genet. Cytol.* **4,** 340 (1962).
3. P. S. Moorhead, P-C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips et D. A. Hungerford, Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20,** 613 (1960).
4. M. A. Bender, Chromosome breakage *in vitro. Mammalian Cytogenetics and Related Problems in Radiobiology*, pp. 87–107. Pergamon Press, Oxford (1964).
5. E. H. Chu, N. H. Giles et K. Passano, Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X rays. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **47,** 830 (1961).
6. M. S. Sasaki et A. Norman, Proliferation of human lymphocytes in culture. *Nature (Lond.)* **202,** 714 (1966).
7. K. Sax, Induction by X-rays of chromosome aberrations in Tradescantia microspores. *Genetics* **23,** 494 (1938).
8. D. E. Lea et D. G. Catcheside, Induction by radiation of chromosome aberrations in Tradescantia. *J. Genet.* **44,** 216 (1942).
9. S. Revell, The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc. R. Soc.* **B150,** 563 (1959).
10. G. J. Neary, Chromosome aberrations and the theory of RBE. I. General considerations. *Int. J. rad. Biol.* **9,** 477 (1965).
11. G. J. Neary, J. R. K. Savage et H. J. Evans, Chromatid aberrations in Tradescantia pollen tubes induced by monochromatic X-rays of quantum energy 3 and 1·5 KeV. *Int. J. rad. Biol.* **8,** 1 (1964).
12. H. J. Evans, Repair and recovery from chromosome damage induced by fractionated X-ray exposures. *3rd Int. Congr. Radiation Research.* Cortina d'Ampezzo (1966).
13. H. J. Evans, Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Int. Rev. cytol.* **13,** 221 (1962).
14. D. Scott et H. J. Evans, X-ray induced chromosome aberrations at different stages in the cell cycle of Vicia Faba. *3rd Int. Congr. Radiation Research.* Cortina d'Ampezzo (1966).
15. W. Feremans, Comparaison des effets obtenus sur les chromosomes de cellules sanguines humaines irradiées *in vitro* au moyen de rayons X, des rayons gama du Cobalt 60 et des électrons de haute énergie. *Europ. J. Cancer* **2,** 279 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 217–225. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Sur Quelques Caractères de la Maladie Spontanée des Souris SJL/J

G. RUDALI et M. R. MOGUL*

Laboratoire de Génétique de l'Institut du Radium, Fondation Curie, Paris

DEPUIS quelques années, une nouvelle lignée de souris devient disponible pour les biologistes: la lignée SJL/J [1]. Créée au Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory, Bar Harbor, Maine (Etats-Unis), le caractère essentiel de ces souris est leur tendance à présenter une maladie spontanée qui a été comparée à certaines formes de la maladie de Hodgkin de l'espèce humaine. Etant donné que l'affection de ces souris semble représenter le premier modèle animal ressemblant par certaines traits à la maladie de Hodgkin, il nous a paru particulièrement intéressant de faire son étude expérimentale.

Les géniteurs dont on a développé la lignée à Paris appartenaient à la génération F 33 de Bar Harbor et furent reçus il y a trois ans environ. A partir des quatre sœurs et des deux frères que nous avons reçus, on a développé un élevage qui atteint actuellement la génération F 10. Les souris qui ont servi à notre travail provenaient des cinq premières générations de notre laboratoire.

CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Les souris SJL/J sont des albinos de taille moyenne. Leur reproduction est satisfaisante: des portées de 10 et 11 souriceaux sont fréquentes. Le cannibalisme est rare. La stérilité spontanée est exceptionnelle. Les femelles deviennent assez tôt fécondables, en moyenne vers le 47e jour. Mais il est à noter que les couples deviennent plus précocement stériles que dans la plupart des autres lignées.

Cependant, nous n'avons pas encore cherché à établir si ce fait procède des femelles ou des mâles. Le Tableau 1 indique quelques données issues de nos observations.

Les mâles ont une forte tendance à devenir batailleurs à partir de l'âge de 3 mois environ. Les batailles, souvent meurtrières, se déroulent uniquement entre mâles. De cette sorte, il nous est difficile de laisser en cohabitation, dans la même cage, plusieurs mâles, sans enregistrer en quelques heures une mortalité importante, ou du moins de grosses lésions cutanées avec leur cortège d'infections. La castration supprime la combativité.

Les géniteurs originaux, ainsi que leurs descendants jusqu'a ce jour, étaient toujours en

Tableau 1. *Quelques caractères généraux de souris femelles SJL/J en comparaison avec celles de quatre autres lignées*

Lignées	Age en jours 1e fécond.	Age en jours dernière fécond.	Poids moy. en g.	Stérilité p. 100
SJL/J	47,3	208	22,4	3
C57BL	50,3	251	24,7	5
XVII/G	51,7	286	26,1	2
AkR	51,6	/	35,4	3
R III	47,1	/	23,2	3

*Boursière du Gouvernement français. Adresse permanente: Indian Cancer Research Center, Parel, Bombay, Inde.

parfaite santé. Aucune épidémie et aucun phénomène pathologique infectieux particulier n'ont été observés au cours des trois dernières années. En dehors des lymphomes, qui font l'objet principal de ce travail, aucune tumeur ne survint chez les animaux de l'élevage général restés en simple observation durant toute la vie: ni tumeurs mammaires, ni adénomes pulmonaires, ni tumeurs des glandes sexuelles, ni ostéomes. En revanche, de nombreuses souris mortes après l'âge de 6 mois, avec ou sans signes de lymphomes, eurent des néphroscléroses et parfois des reins polykystiques. L'amyloïdose du foie, de la rate et des reins est également fréquente chez les souris vieillissantes.

LES LYMPHOMES

De nombreuses souris présentent spontanément, vers l'âge de 10 mois, des adénopathies généralisées. Chez les 200 souris ayant servi à nos statistiques, 109 eurent cette maladie (54,5%). Les adénopathies sont nettement plus fréquentes chez les femelles que chez les mâles. Le Tableau 2 indique que cette différence est hautement significative. Il n'en est pas de même de la différence des survies. La Fig. 1 montre, à l'aide d'un histogramme, les survies par tranche d'âge (mois) des souris ayant eu des lymphomes.

Tableau 2. *Lymphomes spontanés de souris SJL/J*

Sexes	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survies moy. des tumorales en jours
Femelles	131	92	70	388
Mâles	69	17	25	334

Les examens systématiques des animaux ont montré que, dans presque tous les cas, la lésion initiale se trouve apparemment au niveau du ganglion mésentérique. La survie moyenne des souris à partir du jour où l'adénopathie mésentérique devient palpable est de 3 mois et demi.

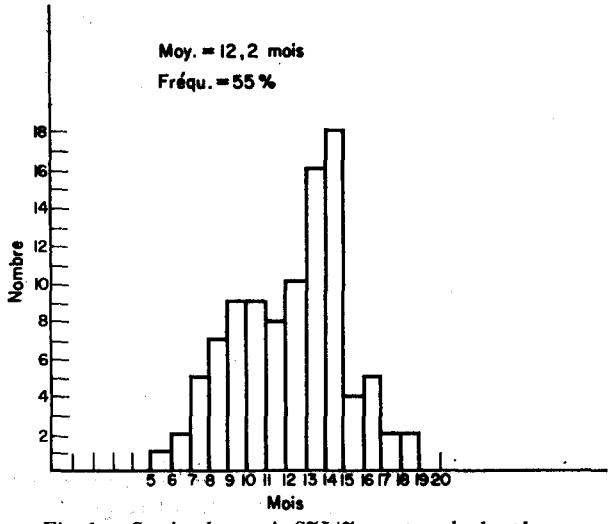


Fig. 1. *Survies des souris SJL/J ayant eu des lymphomes.*

1. *Caractères macroscopiques*

L'affection des souris SJL/J est avant tout d'origine intra-abdominale et se distingue ainsi des leucoses des souris Ak, qui sont pratiquement toujours à point de départ thymique, ou celles des C58 qui débutent, habituellement dans les ganglions superficiels.

Les premières lésions apparaissent au niveau du ganglion mésentérique. Dans des stades plus avancés, on note un envahissement des plaques de Peyer (souvent très volumineuses), puis des ganglions lombaires et surrénaliens, et, assez tardivement, de ceux des territoires superficiels. Le thymus reste longtemps indemne, mais, dans 70% des cas généralisés, il est augmenté de volume et peut alors atteindre les mêmes dimensions que dans les leucoses lymphoïdes des souris Ak. On observe alors les troubles respiratoires habituels à ces sortes de tumeurs, avec leur cortège de cyanose et d'anémie manifeste. La rate est la plupart du temps normale d'aspect et de taille, du moins au début. Mais, même dans les cas de lésions généralisées, les envahissements spléniques massifs sont rares. Les lésions hépatiques macroscopiques se présentent sous la forme de micronodules blancs ou jaunâtres, parsemant la surface de l'organe. La Fig. 2 montre une souris SJL/J atteinte de lésions typiques.

Les tumeurs ont l'aspect des hématosarcomes murins en général. Les adénopathies sont souvent énormes, surtout en l'absence d'envahissement du thymus. Les ganglions ont parfois 10 à 15 mm de diamètre. Leur couleur est jaunâtre, comme dans les leucoses lymphoïdes. Aucune chloroleucémie n'a été observée.

2. *Caractères microscopiques*

Afin d'éviter d'éventuelles confusions, les lésions des souris SJL/J seront désignées par le terme, assez impropre il est vrai, mais généralement accepté, de "lymphomes", en voulant désigner par là, non pas une origine lymphoblastique, mais ganglionnaire.

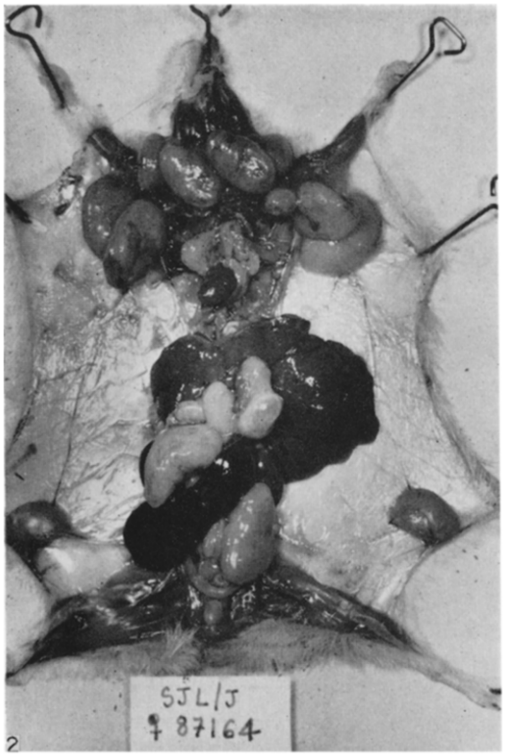


Fig. 2. *Souris femelles SJL/J avec des lésions typiques. A noter le faible envahissement du thymus et l'importance des adénopathies intra-abdominales.*

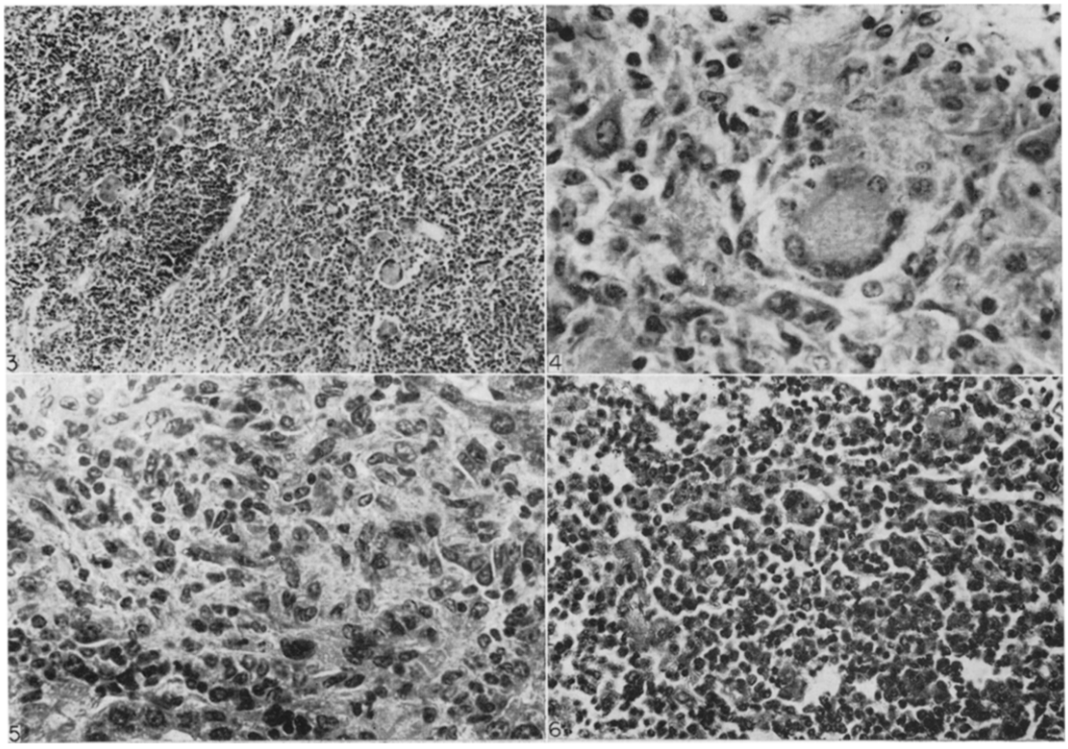


Fig. 3. *Thymus à un faible grossissement.* ×150. *A noter la présence de nombreuses cellules géantes à noyaux multiples.*

Fig. 4. *Cellule géante multinucléée dans une plaque de Peyer.* ×400.

Fig. 5. *Nodule tumoral au niveau du foie d'une souris avec des adénopathies considérables. A noter le polymorphisme cellulaire.* ×400.

Fig. 6. *Lésion tumorale typique d'une souris SJL/J atteinte de la maladie spontanée. Partiecorticale du thymus.* ×360.

(to face p. 218)

Ces lésions sont, la plupart du temps, des lésions à aspect de reticulosarcomes à prédominance histiocytaire et plasmocytaire. Elles sont rarement diffuses, mais se présentent sous la forme de nodules assez bien circonscrits. C'est le cas, en particulier, au niveau du foie, ou les plages tumorales, souvent juxta-vasculaires, alternent avec des zones de parenchyme glandulaire parfaitement normal. De même, au niveau des ganglions ou de la rate, on voit qu'au début les cellules tumorales forment des nodules à dimensions limitées, avant d'envahir la totalité de l'organe. Ces lésions se distinguent donc de celles qu'on observe dans les leucoses lymphoïdes des souris, où l'envahissement est diffus.

A un faible grossissement, ces nodules se présentent comme des plages uniformes, assez basophiles. Cependant, même au faible grossissement, on découvre, dans certains nodules, l'élément cellulaire qui semble être typique pour ces tumeurs: la cellule de Langhans. Ces cellules, souvent énormes, contiennent parfois une cinquantaine de noyaux (Fig. 3 et 4), disposés en couronne, et entourant un cytoplasme central, homogène et éosinophile. D'autres nodules sont totalement dépourvus de cellules de ce type. C'est surtout dans le ganglion mésentérique et dans le thymus que leur présence est constante. On n'a jamais observè, a leur proximité, de zones de caséification ou de nécrose, comme c'est le cas dans les follicules tuberculeux.

A un grossissement plus fort, on note que les tumeurs, en apparence homogènes, sont d'une architecture polymorphe. Si la trame est bien de nature réticulo-histiocytaire, l'envahissement par les cellules myéloïdes, mais surtout lymphoïdes et plasmocytaires, est constant, quoique parfois discret dans des viscères glandulaires comme le foie ou les reins. On trouve souvent des nodules dans les ovaires. Les surrénales, en revanche, restent indemnes.

La malignité des lésions nous paraît être assez limitée. Les mitoses typiques ou atypiques sont rares. Les monstruosités véritables sont exceptionnelles. Les Figs. 4–6 montrent les caractères histologiques essentiels de ces lymphomes.

Environ 14,7% (16 souris) des adénopathies avaient l'aspect de lymphoblastomes ressemblant en tous points à ceux qui surviennent chez les souris Ak. Deux autres avaient l'aspect de myéloblastomes.

3. *Caractères biologiques*

Les greffes — Vingt-trois animaux porteurs de grosses lésions macroscopiques ont été sacrifiés, et des fragments tumoraux, provenant de ganglions, du thymus et de la rate, ont été implantés, chaque fois, à 2 ou 3 souris isologues, âgées de 6 à 7 semaines.

Une seule de ces tumeurs a pu être transmise par la suite. Mais son examen histologique révéla qu'il s'agissait, non pas de la lésion du type habituel mais d'une leucose lymphoïde. Dans tous les autres cas, on n'a pas observé un développement tumoral local au cours d'une observation de 3 â 12 mois. Il est à noter cependant que parmi les 51 souris négatives de cette expérience, 30, c'est-à-dire 59%, eurent par la suite une, maladie généralisée. La survie moyenne de ces animaux avec des lymphomes fut de 270 jours, c'est-à-dire notablement moins longue qu'habituellement. Certains de ces lymphomes survinrent 3 à 4 mois après la greffe, c'est-à-dire à l'âge de 150 jours. On peut donc se demander si on doit considérér ces cas, en dépit de l'absence d'une tumeur locale, comme effectivement négatifs.

Recherche d'un facteur viral — On a préparé, à partir de tissus tumoraux provenant de 26 souris différentes, des extraits acellulaires selon la technique de Gross [2] qui sert depuis une dizaine d'années à nos propres expériences [3–5] Les extraits ainsi obtenus furent injectés à des souriceaux âgés de 12 à 24 hr, appartenant aux lignées suivantes: C57BL, AkR et SJL/J. La plupart des lymphomes apparus dans ces expériences furent greffés à des souris isologues afin de rechercher leur malignité.

Tableau 3. *Lymphomes de souris C57BL ayant reçu à la naissance un extrait acellulaire SJL/J*

Traitement	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survies moy. en jours (lymphomes)
Extrait	48	1	2	423
Témoins	25	1	4	398

Les Tableaux 3–5 montrent qu'aucune activité cancérigène ou leucémigène n'a pu être mise en évidence. Il nous semble donc improbable qu'un virus oncogène puisse être impliqué dans l'étiologie des lymphomes des souris SJL/J.

Essais d'accélération du syndrome SJL/J — Outre

Tableau 4. Leucémies de souris AkR ayant reçu à la naissance un extrait acellulaire SJL/J

Traitement	Nombre de souris	Nombre de leucémies	Leucémies p. 100	Survie moy. des leucém. en jours
Extrait	21	15	71	306
Témoins	20	16	80	349

Tableau 5. Lymphomes de souris SJL/J surinfectées à la naissance avec un extrait acellulaire SJL/J

Traitement	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survie moy. en jours (lymphomes)
Extrait	23	12	52	343
Témoins	22	12	54	377

la tentative d'accélération à l'aide d'extraits acellulaires provenant de tissus tumoraux SJL/J, on a essayé de modifier les latences ou les fréquences à l'aide de trois moyens:

(a) l'injection à la naissance d'un virus leucémigène d'activité connue;

(b) des irradiations répétées avec des rayons X, soit à partir de la naissance, soit à partir de l'âge de 30 jours.;

(c) l'administration quotidienne *per os* de méthylcholanthrène, au cours des trois premières semaines de la vie.

(a) Dans ces expériences, on a utilisé deux sortes de virus: D'une part le "passage G" de notre laboratoire [6]. Ce passage, qui contient le virus de Gross est similaire au "passage A" de cet auteur [7]. Il est actif pour les souris de la plupart des lignées jusqu'à présent étudiées [8]. D'autre part, un virus provenant à l'origine (1959) d'une chloroleucémie C57BL essentiellement myéloïde mise à notre disposition par Graffi* [9]. En fait, au cours des cinq dernières années, et pendant les passages successifs séparés sur des souris C57BL, XVII/G et RIII, les leucoses induites par ce virus ont changé leurs caractères. Actuellement, quelle que soit l'origine des souris, le passage de cet extrait produit invariablement des leucoses à cellules lymphoïdes ou à cellules-souches (Stemmzellen). Il est surinfectant pour les souris AkR et produit dans toutes les lignées des leucémies en deux à trois mois, chez 100% des animaux.

Les Tableaux 6 et 7 montrent les résultats obtenus. Il est à noter que toutes les leucoses précoces furent de la variété lymphoïde et transmissibles par des greffes cellulaires.

(b) Dans cette expérience, nous avons administré, selon une technique déjà décrite [10], quatre fois 175 r, à une semaine d'intervalle. Les irradiations furent commencées, soit à la naissance, soit à l'âge de 30 jours. Le Tableau 8 montre que la plupart des adénopathies observées chez les irradiées à partir de la naissance eurent de courtes latences. Toutes

Tableau 6. Lymphomes de souris SJL/J ayant reçu à la naissance le "passage" G

Traitement	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survie moy. en jours (lymphomes)
Passage G	19	13	68	170
Témoins	20	10	50	338

Tableau 7. Lymphomes de souris SJL/J ayant reçu à la naissance le virus de Graffi

Traitement	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survies moy. en jours (lymphomes)
Virus Graffi	37	37	100	63
Témoins	19	11	58	348

*Nous profitons des circonstances pour remercier le Professeur Graffi d'avoir mis à notre disposition le virus qui fut utilisé dans ces expériences.

celles qui purent être greffées ont provoqué des tumeurs malignes locales, en quelques jours (Fig. 7).

Chez les souris qui furent irradiées à partir de l'âge de 30 jours, les latences furent pratiquement les mêmes que chez les témoins. Cependant, sur les 14 lymphomes observés, 3 furent incontestablement d'origine lymphoblastique pure. Les autres avaient la structure polymorphe habituelle.

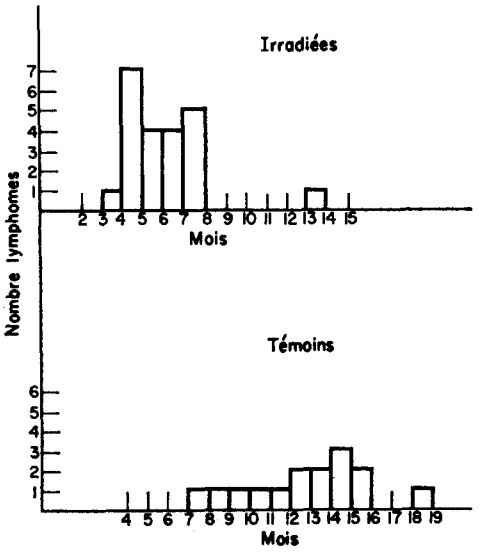


Fig. 7. Lymphomes de souris SJL/J irradiées depuis la naissance avec des rayons X et ceux des témoins.

pulmonaire, spontanément tardive et faible [11] et aussi la cancérogenèse mammaire des souris femelles RIII vierges [7].

Des mères SJL/J qui venaient de mettre bas une portée, reçurent pendant 20 jours, tous les jours, un gavage avec 0,5 mg de méthylcholanthrène. Le Tableau 9 montre les résultats obtenus dans cette expérience. Il semble, d'après ce tableau, que l'hydrocarbure, dans nos conditions, ne modifie pas la genèse habituelle des lymphomes. Mais en fait, 50% des adénopathies peuvent être considérées comme des lésions anormalement précoces. L'histologie de ces dernières a montré qu'il s'agissait là aussi de leucoses lymphoblastiques. Chaque fois que la greffe a été effectuée (cinq cas), elle était suivie d'un développement tumoral et d'adénopathies à distance. Les adénopathies tardives étaient, dans 16 cas sur 25, des réticulo-histiocytomes à envahissement plasmocytaire. Sept furent de structure lymphoïde et deux de nature indéterminée.

Il convient de noter également dans cette série la haute fréquence des tumeurs pulmonaires. Certaines de ces tumeurs furent observées chez des souris mortes avant l'âge de six mois.

DISCUSSION

Des souris de la lignée SJL/J ont servi à une

Tableau 8. Lymphomes de souris SJL/J ayant reçu 4×175 de rayons X

Traitement	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survies moy. en jours (lymphomes)
Irradiées depuis la naissance	34	22	65	179
Irradiées depuis l'âge de 30 jours	27	14	52	391
Témoins	29	15	51	381

(c) Du méthylcholanthrène a été administré à des souriceaux SJL/J par l'intermédiaire du lait maternel. On a montré qu'un tel traitement provoque chez les souris XVII/G une accélération importante de l'oncogenèse

série d'observations et d'expériences destinées à préciser la nature histologique des lésions et les facteurs étiologiques éventuels qui déterminent, chez 55% des animaux, des adénopathies généralisées, accompagnées d'infiltra-

Tableau 9. Lymphomes de souris SJL/J ayant reçu (per os) *du methylcholanthrene depuis la naissance*

Traitement	Nombre de souris	Nombre de lymphomes	Lymphomes p. 100	Survies moy. en jours (lymphomes)	Autres tumeurs
Gavées	81	44	54	320	31 T. pulmonaires (38%) 1 hépatome 1 carcinome gastrique
Témoins	84	45	53	391	0

tions du foie, de la rate, du thymus et des ovaires.

Une question qui nous a particulièrement préoccupés au cours de ces recherches était la similitude éventuelle de cette maladie avec certaines formes de la maladie de Hodgkin de l'espèce humaine.

La maladie de Hodgkin correspond, comme c'est bien connu, à un terme général qui englobe une série d'affections souvent fort diverses par leur aspect histologique, leur symptomatologie clinique et leur évolution [12–15, 17] et à laquelle un nombre considérable de mises au point fut consacré dans le passé. Lukes et Butler, dans une étude récente [18], qui fut remarquablement analysée par Rappaport et collab. [15], ont distingué six formes histologiques principales. Si on adopte sa classification, avec toute la circonspection nécessaire à une transposition de l'Homme à la Souris, on est autorisé à assimiler la lésion des souris SJL/J aux formes histiolymphocytaires qui furent décrites par divers auteurs sous des appellations variées. L'absence de cellules de Reed-Sternberg ne doit pas faire rejeter, à priori, ces lésions du groupe de la série hodgkinienne. Il suffit de se souvenir que, dans la monographie de Dunn [19], cet auteur a également identifié le type "B" de la souris comme une maladie hodgkinienne malgré l'absence de cellules de Sternberg. Il est, en revanche, peu probable que les cellules géantes des lésions des souris SJL/J, manifestement du type Langhans puissent être assimilées à la variété sternbergienne, dont elles ne possèdent aucun des caractères cytologiques.

Nous avons admis que les tumeurs SJL/J ne sont pas constituées par des cellules biologiquement malignes, dans le sens strict du terme. En effet, l'impossibilité de transmettre ces nodules par des greffes montre que le pouvoir prolifératif des cellules qui constituent la trame fondamentale de ces lymphomes est faible. D'ailleurs la croissance relativement lente des lésions chez les animaux atteints de la maladie spontanée, avec des survies parfois très longues (2 à 4 mois) à partir du moment où les premières adénopathies sont détectées, milite également en faveur de cette conception.

Un tel argument est, cependant, également impropre pour dénier aux lésions des souris SJL/J un lien, aussi lâche soit-il, avec la maladie de Hodgkin. Il est bien connu qu'il existe des formes cliniques de cette dernière qui sont d'une bénignité évidente ou du moins d'une évolution si lente, pouvant demander des décennies, qu'on est parfaitement autorisé à les considérer comme des tumeurs non malignes. De plus, l'extraordinaire et unique diversité morphologique qu'on observe dans les maladies de Hodgkin — Wallhauser [20] a trouve dans la littérature plus de 50 dénominations différentes — font que la discussion sur la nature inflammatoire ou non cancéreuse de certaines formes de la maladie de Hodgkin est loin d'être close. Il n'est donc pas exclu que la maladie des souris SJL/J puisse servir de modèle animal pour les recherches sur la lymphogranulomatose humaine.

L'origine virale de ces lésions est, pour le moment, improbable. Malgré des tentatives réitérées, il ne nous a pas été possible de transmettre cette maladie à des souris C57BL ou AkR à l'aide de préparations acellulaires. De même, les tentatives de surinfection se sont soldées par des échecs, en ce sens qu'elles n'ont pas provoqué un phénomène d'accélération. Il convient d'ajouter que quelques examens de tissus ganglionnaires normaux de souris âgées de 5 à 6 mois ou d'animaux d'un an avec de nombreuses tumeurs n'ont pas révélé la présence de corpuscules viraux. De même, nous ne sommes pas partenu à accélérer le processus pathologique par l'administration d'une série d'agents exogènes, à partir de la naissance: virus de Gross, virus de Graffi, rayons X ou méthylcholanthrène. Ces facteurs oncogènes ont provoqué, comme chez des souris d'autres lignées, des leucémies lymphoïdes et des tumeurs pulmonaires.

Un fait remarquable est le développement de lymphomes précoces généralisés chez des souris ayant été greffées avec des tumeurs spontanées. Chez ces souris, l'implant s'est résorbé en apparence sans laisser de trace. Il nous semble peu probable que ces lymphomes à latences courtes procèdent d'un mécanisme du type "greffe cellulaire".

En fait, nous n'avons pas d'argument logique à proposer pour les expliquer, à moins d'invoquer, en dépit de nos résultats, l'intervention d'un virus peu virulent ou trop dilué dans les cellules pour sa mise en évidence à l'aide d'extraits, ou les examens directs en microscopie électronique qui furent faits.

Il est possible, en effet, que le cytoplasme des cellules greffées qui posséderaient un virus puisse manifester, lors de sa lyse, une activité bien plus marquée qu'un extrait dont la préparation expose l'agent à de nombreux aléas.

En somme, ces lymphomes des souris SJL/J semblent appartenir effectivement à la vaste famille des maladies de Hodgkin. Leur origine virale nous semble actuellement improbable. On doit donc admettre, à défait de mieux, et en

attendant d'autres recherches qui pourraient clarifier le problème, que le facteur étiologique principal de cette maladie est un déséquilibre constitutionnel du système réticulo-histiocytaire, tout en déplorant l'ambiguïté de ce terme. Il est vraisemblable, cependant, qu'un jour les recherches montreront que le facteur héréditaire que nous venons d'évoquer n'est qu'un terme d'attente, comme ce fut le cas, jadis, pour d'autres tumeurs murines spontanées, tels les adénocarcinomes mammaires ou les leucémies lymphoïdes.

Remerciements — Les examens au microscope électronique furent effectués par le Professeur M. Bessis et Mademoiselle Vinzent auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

RESUME

1. *Les souris SJL/J présentent dans* 55% *des cas environ des lymphomes spontanés, après des latences de* 10 *mois environ. Ces lésions, à aspect de réticulo-histiocytoses, ne sont pas transmissibles par des greffes cellulaires.*

2. *Des extraits acellulaires préparés à partir de lésions avancées, n'ont pas provoqué un phénomène d'accélération chez les souris SJL/J les ayant reçus à la naissance. Ces mêmes extraits ne provoquent pas, chez les souris C57BL ou AkR, la maladie réticulo-histiocytaire. Des examens au microscope électronique n'ont pas montré la présence de virus dans les tissus non encore tumoraux ou dans les lésions avancées.*

3. *Les souris SJL/J sont très sensibles à l'action des virus leucémigènes Gross et Graffi qui produisent des leucoses lymphoïdes greffables chez ces animaux après, deux à cinq mois de latence.*

4. *L'irradiation de ces souris, à partir de la naissance, n'augmente pas la fréquence et ne raccourcit pas la latence de la maladie habituelle, mais provoque des leucoses lymphoïdes greffables. Les irradiations similaires, commencées à l'âge de* 30 *jours, ne semblent pas modifier notablement la fréquence et la latence normales.*

5. *L'administration de méthylcholanthrène* per os, *par l'intermediaire du lait maternel à partir de la naissance, provoque l'apparition de nombreuses leucémies lymphoïdes à coutre latence (avant l'âge de* 5 *mois), de même que des tumeurs pulmonaires.*

6. *Ces résultats sont discutés en essayant de déterminer les degrés de similitude ou du moins d'analogie de ces lésions avec celles de la maladie de Hodgkin de l'espèce humaine.*

SUMMARY

1. *Fifty-five per cent of SJL/J mice develop spontaneous lymphomas after an approximate latent period of* 10 *months. These are lesions of the reticulum cell and hystocytic type. and they are not transmissible by cellular grafts.*

2. *Cell-free extracts, prepared from advanced lesions, did not produce the phenomenon of acceleration in SJL/J mice that had received them at birth. The same extracts did not produce any reticulo-histocytic disease in C57BL or AkR mice. Electron microscopic examinations did not reveal the presence of viruses in the not yet malignant tissues or in advanced lesions.*

3. *SJL/J mice are very responsive to the action of Gross and Graffi leukaemogenic viruses inducing lymphoid leukaemias which can be transmitted by grafting to these animals after a latent period of* 2 *to* 5 *months.*

4. *Irradiation of these mice, from birth, does not increase the frequency nor shorten the latency of the usual disease, but it induces graft transmissible lymphoid leukaemias. Similar irradiations, given at age* 30 *days, do not seem to modify notably the normal frequency and latency.*

5. *The oral administration of methylcholanthrene, by means of maternal milk, produces lymphoid leukaemias with a short latency (before age* 5 *months) as well as pulmonary tumours.*

6. *These results are discussed in relation to a possible similarity, or at least of an analogy, of these lesions with those of human Hodgkin's disease.*

ZUSAMMENFASSUNG

1. *Rund* 55% *der SJL/J-Mäuse weisen, wenn sie ein Alter von ungefähr* 10 *Monaten erreicht haben, Spontanlymphome auf. Diese Tumoren, die dem Aussehen nach an Retikulohistiozytosen erinnern, sind durch zelluläre Transplantate nicht übertragbar.*

2. *Zellfreie Extrakte aus solchen Lymphomen in fortgeschrittenem Stadium wurden SJL/J-Mäusen bei der Geburt injiziert. In der Folge wurden keine Akzelerations-phänomene hervorgerufen. Bei C57BL- oder AkR-Mäusen bewirken diese Extrakte keine retikulohistiozytäre Erkrankung. Mit elecktronenmikroskopischen Untersuchungen konnten weder in den noch nicht neoplastisch veränderten Geweben noch in den fortgeschrittenen Tumoren Viren festgestellt werden.*

3. *SJL/J-Mäuse sind sehr empfindlich gegenüber den leukämogenen Viren von Gross und Graffi, die bei diesen Tieren nach einer Latenzzeit von zwei bis fünf Monaten eine transplantable lymphatische Leukose hervorrufen.*

4. *Die Bestrahlung solcher Mäuse von Geburt an erhöht die Häufigkeit der Lymphome nicht und kürzt auch die Zeitspanne bis zu deren Auftreten nicht ab, hingegen ruft sie transplantable lymphatische Leukosen hervor. Gleichartige Bestrahlung vom* 30. *Lebenstag an scheint auf die Häufigkeit und den Zeitpunkt des Auftretens der Lymphome auch keinen nennenswerten Einfluss zu haben.*

5. *Die orale Verabreichung von Methylcholanthren von Geburt an, auf dem Weg über die Milch des Muttertieres, bewirkt bei einem hohen Prozentsatz der Jungtiere frühzeitig (vor dem sechsten Lebensmonat) auftretende lymphatische Leukämien und Lungentumoren.*

6. *Bei der Diskussion dieser Befunde wird versucht, den Grad der Aehnlichkeit oder doch wenigstens der Vergleichbarkeit der beschriebenen Läsionen mit denen des Morbus Hodgkin beim Menschen zu bestimmen.*

BIBLIOGRAPHIE

1. E. D. Murphy, Replica of Hodgkin's disease in SJL/J mice. *Ros. B. Jackson Mem. Lab., Ann. Report* **34,** 26 (1962/63).
2. L. Gross, "Spontaneous" leukemia developing in C 3H mice following inoculation, in infancy, with Ak-leukemic extracts, or Ak-embryos. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **76,** 27 (1951).
3. G. Rudali, J. F. Duplan et R. Latarjet, Latence des leucoses chez des souris Ak injéctees avéc un extrait leucémique acellulaire Ak. *C.R. Acad. Sci., Paris* **247,** 837 (1956).
4. G. Rudali, J. F. Duplan et R. Latarjet, Leucémogénèse chez des souris AkR, injectées à la naissance avec un extrait leucémique aqueux isologue. *Bull. Cancer* **44,** 440 (1957.)
5. G. Rudali et P. Jullien, Etude du "facteur de résistance maternelle" contre les leucémies spontanées ou provoquées par un extrait leucémique. *C.R. Acad. Sci., Paris* **253,** 1229 (1961).
6. P. Jullien et G. Rudali, Isolement et entretien par surinfections successives (passage G) d'un agent leucémigène de souris AkR, régulièrement actif. *C.R. Acad. Sci., Paris* **250,** 1588 (1960).
7. L. Gross, Development and serial cell-free passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **94,** 767 (1957).
8. G. Rudali, Résultats inédits.
9. A. Graffi, H. Bielka et F. Fey, Leukämieerzeugung durch ein filtriebares Agens aus malignen Tumoren. *Acta Haemat.* **15,** 145 (1956).
10. P. Jullien et G. Rudali, Leucoses précoces apparaissant chez les souriceaux et les jeunes adultes AkR exposés aux rayons X. *Bull. Cancer* **51,** 147 (1964).
11. G. Rudali, N. Yourkovski et L. Julliard, Influence de l'hérédité sur l'oncogénèse pulmonaire spontanée et provoquée chez les souris. *Bull. Cancer* **49,** 270 (1952).
12. P. J. Dawson et C. V. Harrison, A clinicopathological study of benign Hodgkin's disease. *J. clin. Path.* **14,** 219 (1961).
13. R. J. Lukes, Relationship of histologic features to clinical stages in Hodgkin's disease. *Amer. J. Roentgenol.* **90,** 944 (1963).
14. C. V. Harrison, Benign Hodgkin's disease. *J. Path. Bact.* **64,** 513 (1952).
15. H. Rappaport, W. J. Winter et E. B. Hicks, Follicular lymphoma. A reevaluation of its position in the scheme for malignant lymphoma, based on a survey of 253 ccases. *Cancer* **9,** 792 (1956).
16. C. J. E. Wright, The benign form of Hodgkin's disease (Hodgkin's paragranuloma). *J. Path. Bact.* **80,** 157 (1960).
17. R. J. Lukes et J. J. Butler, The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* **26,** 1063 (1966).

18. H. RAPPAPORT, Discussion on : The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* **26,** 1082 (1966).
19. Th. B. DUNN, Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice. *J. nat. Cancer Inst.* **14,** 1281 (1954).
20. A. WALLHAUSER, Hodgkin's disease. *Archs Path.* **16,** 522 et 672 (1933).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 227–233. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

The Covalent Binding of Metabolites of Tritiated 2-Methyl-4-dimethylamino-azobenzene to Rat Liver Nucleic Acids and Proteins, and the Carcinogenicity of the Unlabelled Compound in Partially Hepatectomised Rats

G. P. WARWICK

Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research, Royal Cancer Hospital, Fulham Road, London S.W.3

INTRODUCTION

FOLLOWING a single intraperitoneal injection of [^{3}H]-4-dimethylaminoazobenzene into male Albino or Hooded rats, radioactive metabolites combine covalently with liver nucleic acids and proteins [1–4]. The present investigation was undertaken to determine whether covalent binding of radioactive metabolites of [^{3}H]-2-methyl-4-dimethylaminozaobenzene to liver nucleic acids and proteins also occurred when the compound was administered to rats, thus allowing comparison of a liver carcinogen and a structurally related compound reported not to be carcinogenic [5]. The results of these binding studies prompted the second investigation reported in this paper, the testing of the 2-methyl derivative (2-methyl-DAB) for possible carcinogenic action in rats which had undergone partial hepatectomy or treatment with carbon tetrachloride to promote mitosis in the liver.

MATERIALS AND METHODS

[^{3}H]-2-*methyl*-4-*dimethylaminoazobenzene*

[^{3}H]-Aniline hydrochloride (generally distributed, specific radioactivity approximately 16 mc/mg) was obtained from the Radiochemical Centre, Amersham, Bucks., England. The compound (210 mg) was diazotised using sodium nitrite (120 mg) and concd. HCl (0·5 ml). Dimethyl-*m*-toluidine (0·25 ml) in ethanol (2·5 ml) was added at 0–5°C, and after a few minutes the mixture was treated with an excess of solid sodium acetate. After standing at room temperature for a few minutes only, the mixture was extracted 3 times with benzene. The dry benzene solution (Na_2SO_4) was percolated through two columns of alumina and the rapidly moving orange fraction was collected. The benzene was removed under reduced pressure and the azo dye was recrystallised three times from ethanol. The long red needles (175 mg) had m.p. 64–66°, not depressed on admixture with an authentic sample of the unlabelled compound. Paper chromatography [1] followed by scanning (using a Model 1620B, Nuclear Chicago Corp., Des Plaines, Ill., U.S.A.) showed the product to be radiochemically pure and to have an *Rf* value similar to the authentic dye. The specific radioactivity of the product was 8·4 mc/mg (approx. 2C/mM).

For the animal experiments the material was diluted with the unlabelled derivative so that the specific radioactivity was about 1 mc/mg. The radioactive compound was relatively stable in the solid state, but after every 2 to 3 weeks it was passed down a column of alumina and recrystallised from ethanol to remove any products of radiodecomposition which may be formed.

Assay of radioactive samples

Samples of DNA, RNA and protein were assayed for radioactivity as described earlier [1], with the exception that larger aliquots (0·5 ml) were taken for assaying radioactive DNA and RNA, and protein samples were often dissolved in tetraethylammonium hydroxide directly in the glass counting vials prior to adding scintillator.

Animals for radioactive compound administration

Male Albino rats weighing 150–200 g were maintained on a 10% protein diet as described previously [1].

[^{3}H]-2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene specific radioactivity 1 mc/mg was administered by intraperitoneal injection in a single dose of 150 mg/kg in arachis oil (1 ml/100 g body weight). Three animals were used to determine each value shown in Figs. 1 and 2.

Animals for testing the possible carcinogenicity of 2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene

The animals used were male Hooded rats weighing about 150 g at the commencement of the experiment. The azo dye was mixed at a level of 0·06% with the 10% protein diet described earlier [1]. All animals were fed the dye diet for 12 months and were then fed rat cake for 2 months. All animals were fed for 1 week on the 10% protein diet alone prior to commencement of dye feeding.

Two boxes (20 animals) were maintained on the dye diet for the whole of the experimental period, while other animals were treated either with carbon tetrachloride or were subjected to partial hepatectomy.

(a) *Carbon tetrachloride treatment*

The ten animals in one box were treated with carbon tetrachloride (1 ml/kg body weight, in an equal volume of arachis oil) by stomach tube under light anaesthesia, on the day on which dye feeding commenced. The ten animals in a second box were fed the dye diet for 4 weeks prior to the carbon tetrachloride administration

(b) *Partial hepatectomies*

The ten animals in one box were submitted to partial hepatectomy (kindly performed by Dr. A. J. S. Davies of this Institute) and were immediately placed on the dye diet, while the ten animals in a second box were submitted to partial hepatectomy after 4 weeks' dye feeding.

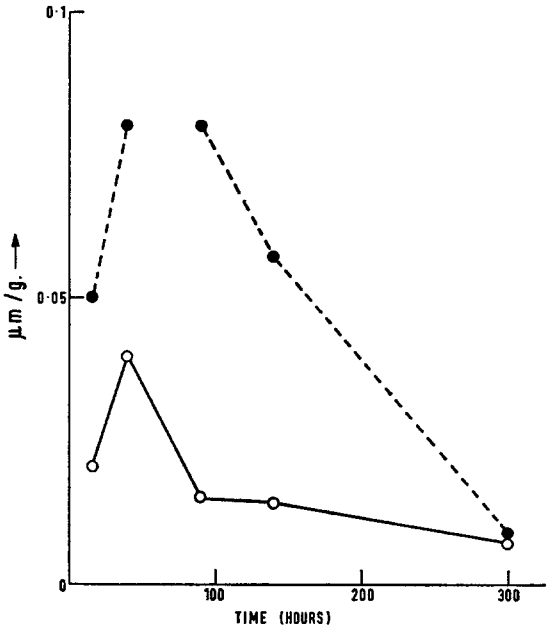


Fig. 1. Binding of radioactivity from [^{3}H]-2-methyl-4-dimethylaminoazobenezne to DNA and ribosomal RNA of male Albino rat liver following a single intraperitoneal injection of 150 mg/kg. Each point represents the average level of binding in at least two animals expressed as micromoles of drug per gram of DNA or RNA. ●=RNA; ○=DNA.

RESULTS

Binding to liver DNA and r-RNA

After 17 hr radioactive metabolites from the dye were covalently bound to both liver r-RNA

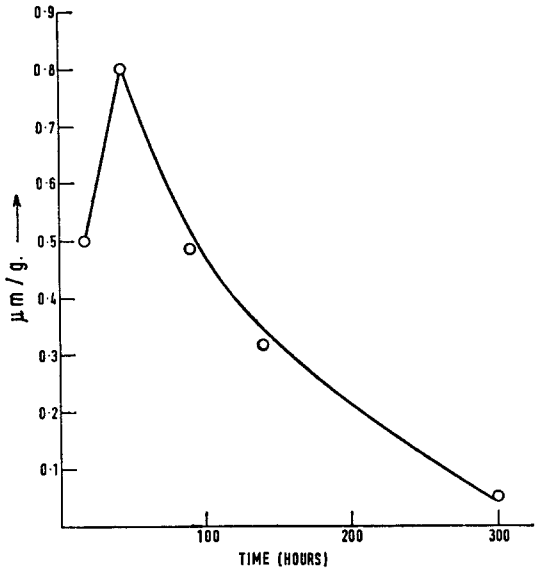


Fig. 2. Binding of radioactivity from [^3H]-2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene to the cytoplasmic proteins of male Albino rat liver following a single intraperitoneal injection of 150 *mg/kg. Each point represents the average level of binding in at least two animals expressed as micromoles of drug per gram of protein.*

and DNA. Methods similar to those described earlier [1] were used to establish that the radioactivity present was not due to the incorporation or exchange of tritium into the natural bases, or to the adsorption of radioactive material of low molecular weight.

For DNA the maximum binding of radioactivity (0·04 µm/g) occurred at about 40 hr. There was then a drop of over 50% in the specific radioactivity of the DNA during the following 50 hr, followed by a less rapid drop to 0·007 µm/g i.e. 20% of the maximum value during the next 200 hr (Fig. 1).

For ribosomal RNA the maximum level of binding of radioactivity occurred between 40 and 90 hr (Fig. 1). At these times the level of binding was 0·079 µm/g. The level of binding rapidly decreased so that at 300 hr it was only 0·009 µm/g.

Binding to liver cytoplasmic protein

For cytoplasmic protein the maximum level of binding occurred at about 40 hr (0·79 µm/g). There was then a rapid decrease so that at 300 hr the level was 0·054 µm/g, a drop of nearly 70% (Fig. 2).

2-methyl-DAB together with partial hepatectomy

(a) *Dye feeding commenced on day of hepatectomy* —Four animals survived until the end of the experiment, and all showed macroscopic evidence of tumour formation. The tumours were typical hepatomas (see Figs. 3 and 4 for gross and histological appearance). Various tumour foci were present, although no cholangiomas were found. The remaining liver showed a very disturbed histological appearance with a depleted level of parenchymal cells and evidence of fatty changes.

(b) *Dye feeding continued for* 30 *days prior to partial hepatectomy and followed by further feeding* —Six animals survived until the end of the experiment, and four showed macroscopic evidence of tumour formation. The histological appearance of the hepatomas and the surrounding liver tissue was similar to that seen in Fig. 4.

2-methyl-DAB feeding alone

There was no evidence of tumour formation in any of the eighteen animals which survived the term of the experiment. The livers were not normal histologically and there was evidence of depleted parenchyma, moderate degenerative changes, but no obvious dilation of intrahepatic biliary passages.

2-methyl-DAB feeding in conjunction with carbon tetrachloride treatment

None of the animals in either group presented gross or histological evidence of tumour formation. In general the livers appeared similar to those fed the dye diet alone.

DISCUSSION

The maximum levels of binding of radioactive metabolites from the dye to rat liver DNA, r-RNA and cytoplasmic protein were 0·038 µm/g, 0·079 µm/g (or possibly greater), and 0·79 µm/g. For tritiated butter yellow in the same species the levels were 0·014 µm/g,

Table 1. *Comparison of the levels of binding of radioactive metabolites of DAB and 2-methyl-DAB to Albino and Hooded rat liver DNA, ribosomal RNA, and cytoplasmic proteins at various times after single intraperitoneal injections. The results are expressed as micromoles of drug per gram of macromolecule*

Compound	Species	DNA	r-RNA (max)	Protein (max)
Butter yellow	Albino rat	0·014 (max) 0·014 (300 hr)	0·114	0·54
Butter yellow	Hooded rat	0·02 (max) 0·009 (1 week to 3 months)	0·24	0·52
2-methyl-DAB	Albino rat	0·039 (max) 0·007 (300 hr)	0·079	0·79

0·114 μm/g, and 0·54 μm/g [1]. At 300 hr however the levels of binding to DNA were 0·014 μm/g for butter yellow and 0·007 for the 2-methyl derivative. In the hooded rat the maximum level of binding of radioactive metabolites of butter yellow to liver constituents was 0·02 μm/g for DNA, 0·24 μm/g for r-RNA, and 0·52 μm/g for cytoplasmic protein [3, 4]. The value for DNA dropped to 0·009 μm/g by 1 week, and then remained almost constant for 3 months [3, 4]. Comparison of the levels of binding of two drugs in the same species, or of the same drug in different species is thus complicated by the time course of the binding and the rate of removal of radioactive material. Thus for DNA the maximum level of binding of radioactive metabolites from the 2-methyl derivative was about three times greater than for butter yellow and yet by 300 hr there was twice as much radioactivity associated with the DNA of butter yellow treated rats as with the DNA from rats treated with the 2-methyl analogue (0·014 μm/g compared with 0·007 μm/g). These results are summarised in Table 1.

The rate of binding of the radioactive metabolites from 2-methyl-DAB, r-RNA and protein differed from the rate of binding of butter yellow metabolites since maximum binding occurred later (between 40 and 90 hr) with the former compound.

While the maximum level of binding of radioactivity of liver DNA and to liver cytoplasmic protein was higher after administration of the 2-methyl derivative than after butter yellow, the maximum level of binding to liver ribosomal RNA appeared to be considerably lower. This may be significant in view of the apparent correlation between carcinogenic activity and the level of r-RNA binding discussed earlier [1, 2].

Despite these differences in binding levels when comparing butter yellow and its 2-methyl derivative, no obvious explanation for the inactivity of the latter as a liver carcinogen was apparent. The possibility remained however that the compound was able to initiate the carcinogenic process but lacked the ability to stimulate the complex stage of promotion. It has now been well established [6–8] that during butter yellow carcinogenesis and acetylaminofluorene carcinogenesis a stage is reached in which groups of cells undergo rapid mitosis leading to a general hyperplastic state in the liver. Until this stage is reached tumours will not develop. The need for one or more cell divisions has been suggested to be necessary to complete the process of cell transformation in *in vitro* systems [9, 10].

Very relevant is the suggestion of Maini and Stitch [11] who showed that 2-methyl-DAB as well as DAB, was able to cause potential damage to chromosomes, as manifested by frank chromosome abnormalities in regenerating liver cells following partial hepatectomy in animals treated with the compound months earlier, and was able to retard the rate of liver regeneration [12]. Butter yellow was also able to cause these effects but the two compounds differed in that the 2-methyl derivative was not able to stimulate the necessary cell division in the liver to complete the carcinogenic change and to allow the necessary processes of selection to occur. The work of Laws [13] further supported the importance of cell division in the carcinogenic process since when the livers of animals treated with acetylaminofluorene were stimulated to mitosis by partial hepatectomy early in the feeding period the latent period

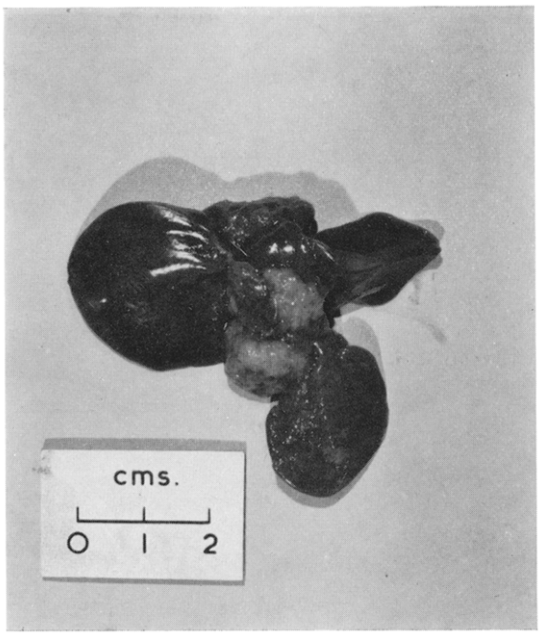


Fig. 3. Liver and tumour removed from a rat fed 2-methyl-DAB from the day of partial hepatectomy.

Fig. 4. Section (H & E) of a hepatoma induced in animals fed 2-methyl-DAB from the day of partial hepatectomy.

(to face p. 230)

could be considerably reduced.

In view of the results of the binding studies, indicating a high level of reaction with DNA, r-RNA and protein, as for DAB and of others emphasising the importance of cell division in carcinogenesis, the carcinogenicity of 2-methyl-DAB was tested in partially hepatectomised rats. The results of Laws [13] suggested the selection of day one of feeding, for carrying out one set of partial hepatectomies. An arbitrary time of 30 days was chosen for carrying out hepatectomies on a second set of animals.

The fact that hepatomas appeared in the partially hepatectomised animals supports the concept that liver carcinogenesis is a greater than one stage process, and that metabolite binding, to say DNA in Go cells, is not sufficient in itself to bring about the production of hepatomas. Cell division, whether this is provoked by a direct effect of the carcinogen on the cell, or by a regenerative process stimulated by the death of surrounding cells, or in this case by partial hepatectomy, is also an essential requirement.

These results and those of Laws [13] and others suggest also that an essential requirement in the carcinogenic process may be that the carcinogen or its reactive metabolite must combine with appropriate cellular sites at some critical stage during the cell division cycle. Hence the need for cell division in the process of cancer promotion may be (a) to allow the carcinogen interaction to occur at the appropriate time during the division cycle, (b) to enable completion of the cell transformation, and (c) to enable processes of selection to operate. A further possibility for consideration is that variation in enzyme levels during the regenerative phase may lead to a level of binding of dye metabolites to macromolecules different from that in resting liver cells.

Maini and Stitch [12] have suggested that various factors must be operative before a compound will be a liver carcinogen. These include the ability of the compound to provoke chromosome abnormalities in dividing cells, and to provoke cell division. By carrying out partial hepatectomies on animals which had been treated previously with 2-methyl-DAB they established that it provoked mitotic abnormalities in a manner very similar to DAB itself [11]. They suggested that it was not a carcinogen because it failed to provoke proliferation of damaged liver cells.

Since 2-methyl-DAB metabolites react quantitatively with liver DNA, RNA and proteins in a manner similar to DAB itself, it is still not possible to determine which centre of reaction is critical for the establishment of the first stage (initiation) of carcinogenesis. Since the establishment of a situation in which chromosome abnormalities occur in dividing liver cells appears to be a necessary criterion for carcinogenesis [11], then the direct interaction of carcinogen metabolites with DNA may be of great significance in the initial establishment of such lesions. As pointed out by Warwick and Roberts [3, 4] metabolites from DAB remain associated with liver DNA but not with any other site in the cell for months after a single injection of the compound. The chromosome abnormalities observed by Maini and Stitch [11] in the dividing liver cells of partially hepatectomised animals months after treatment with DAB and 2-methyl-DAB, may thus result from the presence of such chemical lesions in DNA.

It would now seem of importance to study further the problem of tumour promotion in liver, or more specifically those phenomena which lead to the situation in which damaged liver cells will divide at a rate in excess of normal.

Other compounds which have been shown to be not carcinogenic for liver, or have borderline carcinogenicity, are being investigated by the techniques of cellular binding and partial hepatectomy described in this paper. Experiments are also being carried out to determine whether 2-methyl-DAB treatment is essential during the period of liver regeneration. In addition the carcinogenicity tests reported in this paper are being repeated using larger numbers of animals.

Acknowledgements — This investigation has been supported by grants to the Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital) from the Medical Research Council, the British Empire Cancer Campaign for Research and by the Public Health Service Research Grant No. CA-03188-10 from the National Cancer Institute, U.S. Public Health Service. I wish to thank Sir Alexander Haddow, F.R.S., and Professor L. A. Elson for their interest and encouragement, Miss R. Sayer and Mr. A. Coldman for assistance in preparing the diets, Dr. A. J. S. Davies for carrying out the partial hepatectomies and Drs. R. L. Carter and P. E. Hughes for help in interpreting the histological sections.

RESUME

L'article décrit la préparation du composé [^{3}H]-2-*méthyl*-4-*diméthylaminoazobenzène. Les degrés maximum de liaison des métabolites radioactifs de ce composé avec l'ADN du foie du rat, l'ARN ribosomal et les protéines cytoplasmiques s'élevèrent respectivement à* 0,039

μm/g, 0,079 μm/g et 0,79 μm/g, après une injection intrapéritonéale unique de 150 mg par kg. Le taux de décroissance de la radioactivité liée a été étudié.

Le 2-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène a produit des hépatomes chez les 8/10 des animaux partiellement hépatectomisés, soit le jour de l'administration du produit, soit 30 jours plus tard. On continua l'administration du colorant durant 12 mois, et les animaux furent tués après 14 mois. Aucune tumeur n'apparut chez les animaux témoins, non plus que chez les animaux ayant reçu uniquement le produit, ou chez ceux qui ont reçu le produit et ont été traités concuremment au tétrachlorure de carbone.

SUMMARY

The preparation of [^{3}H]-2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene is described. The maximum levels of binding of radioactive metabolites from the compound to rat liver DNA, ribosomal RNA and cytoplasmic proteins were 0·039 μm/g, 0·079 μm/g and 0·79 μm/g following a single intraperitoneal injection of 150 mg/kg. The rate of decrease of bound radioactivity was studied.

2-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene produced hepatomas in 8/10 animals partially hepatectomised either on the day dye feeding commenced or 30 days after dye feeding commenced. Dye feeding was continued for 12 months and animals were killed after 14 months. No tumours appeared in control animals, in animals fed the dye alone, or in animals fed the dye and treated with carbon tetrachloride.

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wird die Herstellung von [^{3}H]-2-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol beschrieben. Die Höchstmengen radioaktiver Metaboliten dieser Verbindung, die nach einer einmaligen intraperitonäalen Injektion von 150 mg/kg an Rattenleber-DNA, Ribosomen-RNA und Zytoplasmaproteinen gebunden wurden, waren 0,039 μm/g bzw. 0,079 μm/g bzw. 0,79 μm/g. Die Abnahmegeschwindigkeit der Radioaktivität der Substrate, die solche Metaboliten gebunden hatten, wurde untersucht.

2-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol rief bei 8/10 partiell hepatektomierter Tiere ein Hepatom hervor; der Eingriff wurde entweder an dem Tag vorgenommen, an dem mit der Verfütterung des Farbstoffs begonnen wurde, oder 30 Tage danach. Die Farbstoffverfütterung wurde über 12 Monate fortgeführt und die Tiere nach 14 Monaten getötet. Bei unbehandelten Vergleichstieren traten keine Tumoren auf, ebensowenig wie bei solchen, die den Farbstoff allein erhielten und solchen, die gleichzeitig mit dem Farbstoff gefüttert und mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden.

REFERENCES

1. J. J. Roberts and G. P. Warwick, The covalent binding of metabolites of dimethylaminoazobenzene, ß-naphthylamine and aniline to nucleic acids *in vivo*. *Int. J. Cancer* **1,** 179–96 (1966).
2. J. J. Roberts and G. P. Warwick, Covalent binding of 4-dimethylaminophenylazo-^{3}H-benzene (butter yellow) metabolites with liver ribosomal RNA: the dissociation of the binding mechanism from the orotic acid incorporating system. *Int. J. Cancer* **1,** 573–578 (1966).
3. G. P. Warwick and J. J. Roberts, The covalent binding of metabolites of [^{3}H] dimethylaminoazobenzene to rat liver deoxyribonucleic acid: absence of repair during three months. *Biochem. J.* **100,** 62P (1966).
4. G. P. Warwick and J. J. Roberts, The covalent binding of butter yellow metabolites to rat liver DNA, persistence of the lesion. *Nature, Lond.* **213,** 1206 (1967).
5. J. A. Miller and C. A. Baumann, The carcinogenicity of certain azo dyes related to p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **5,** 227 (1945).
6. E. L. Opie, Mobilization of basophile substance (ribonucleic acid) in the cytoplasm of liver cells with the production of tumours by butter yellow. *J. exp. Med.* **84,** 91 (1946).
7. R. Daoust and F. Molnar, Cellular populations and mitotic activity in rat liver parenchyma during azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.* **24,** 1898 (1964).
8. A. K. Laird and A. D. Barton, Cell growth and the development of tumours. *Nature (Lond.)* **183,** 1655 (1959).

9. H. KAPROWSKI, F. JENSEN, A. GIRADI and I. KOPROWSKA, Neoplastic transformation. *Cancer Res.* **26,** 1980 (1966).
10. G. J. TODARO and H. GREEN, Cell growth and the initiation of transformation by S.V.40. *Proc. nat. Acad. Sci.* **55,** 302 (1966).
11. M. M. MAINI and H. F. STITCH, Chromosomes of tumor cells. II. Effect of various liver carcinogens on mitosis of hepatic cells. *J. nat. Cancer Inst.* **26,** 1413 (1961).
12. M. M. MAINI and H. F. STITCH, Chromosomes of tumor cells. III. Unresponsiveness of precancerous hepatic tissues and hepatomas to a mitotic stimulus. *J. nat. Cancer Inst.* **28,** 753 (1962).
13. J. O. LAWS, Tissue regeneration and tumour development. *Brit. J. Cancer* **13,** 669 (1959).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 235–236. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Letter to the Editor

Cell Loss in Malignant Tumours in Man

S. B. REFSUM d.y. and P. BERDAL

Institutt for Generell og Eksperimentell Patologi, Oslo Universitet, Norway and Rikshospitalets ore-nese halsavdeling, Oslo, Norway

ALTHOUGH it is well known that there can be a cell loss in malignant tumours, there exists today no satisfying method to measure this loss. Tumour growth can, however, be defined as the increase in mass (weight, volume) of the tumour, i.e. the net gain of cell proliferation over cell loss. The cell loss can therefore be calculated indirectly by comparison of the actual growth and the rate of cell proliferation in the tumour.

Growth is often measured as the time needed to double the mass of the tumour. By repeated X-ray examinations of primary and metastatic lung tumours and colon tumours the doubling time has been found to be from 6–8 days in fast growing tumours and more than 300 days in slowly growing tumours. The average is about 60 days (see Steel and Lamerton [1]).

The rate of cell proliferation in tumours has usually been measured by means of tritiated thymidine and autoradiography in order to calculate the number of cells in DNA synthesis at the time of injection. As sequential biopsies are necessary to calculate the rate of cell proliferation on the basis of the labelling index, most of the experiments have been performed *in vitro* with tissue cultures of the tumour [2–4] and only a few *in vivo* [5].

With stathmokinetic methods mitoses can be blocked in the metaphase. By counting the relative number of arrested mitoses in a biopsy taken at a given time after the injection of the drug, the relative number of cells entering mitosis per unit of time can be calculated, i.e. the rate of cell proliferation [6, 7].

We have measured the rate of cell proliferation in 61 human tumours by giving i.v. injection of 10 mg of demecolcine (Colcemid CIBA), to the patients 3–4 hr prior to a biopsy, and without seeing any untoward effects of the drug. The tumours were mostly epidermoid carcinomas from laryngeal, maxillary and oral tumours (Table 1). Mitoses among an average

Table 1. *Tumour localisation*

Tumours	Number of patients
Laryngeal	32
Maxillary	13
Oral	11
Other	5

of about 23,000 tumour cells were counted from each patient. The results are shown in Table 2.

The clinical doubling time in any particular tumour has been found to be more or less constant [8, 9], indicating an exponential growth pattern, although this is disputed by some authors [1, 10]. Provided the tumour growth is exponential and the cell loss proportional to the cell mass in the proliferating and in the non-

Table 2. Rate and range of cell proliferation in different tumours

	Number of patients	Number of arrested mitoses per 1000 cell/hr
Epidermoid carcinomas	46	12·36 (2·7–27·8)
Salivary gland carcinomas	5	7·13 (3·0–16·0)
Undifferentiated tumours	5	12·38 (8·9–19·6)
Other tumours	5	5·34 (2·7– 9·4)
	Average:	11·48

proliferating compartments of cells, we can use the following equation:

$$M = M_0\, 2t/T,$$

where M is the present mass and M_0 is the mass at the time $t=0$. The doubling time (T) can be expressed in the following equation:

$$T = \frac{\ln 2}{R-L}$$

where R is the rate of cell proliferation and L is the rate of cell loss. With a clinical doubling time (T) of 60 days and an average of cell rate proliferation (R) of 11·48 cells per 1000 cells/hr, the average cell loss (L) must be 11·00 cells per 1000 cells/hr, or 96% of the cell renewal, provided significant influences from diurnal or other rhythmic variations can be excluded. As the rate of cell proliferation is calculated from the total cell population, these calculations are independent of the fraction of cells able to divide in the population.

If there is no cell loss, $L=0$, the doubling time can be expressed as:

$$T = \frac{\ln 2}{R}$$

In our material the doubling time can be calculated to range from 1·0–10·8 days with an average of only 2·6 days, if there was no cell loss going on in the tumours. The relative "slow" growth of malignant tumours can therefore only be explained by a high rate of cell loss in the tumours.

Tumour growth must be looked upon as dependent on the process of cell proliferation and cell loss, where changes in any of them can result in profound alterations in the clinical rate of tumour growth. The cancer problem is not only why cancer cells proliferate uncontrolled, but also why so many of these cells die or escape from the tumour via blood, lymph or from the surface, so early after they have been formed, and especially why a few of the cells escape this cell loss and participate in the clinical growth of the tumour.

Acknowledgement — The authors wish to thank research engineer R. Bjerknes for the mathematical calculations.

REFERENCES

1. G. G. Steel and L. F. Lamerton, The growth rates of human tumours. *Brit. J. Cancer* **20,** 74 (1966).
2. W. Oehlert, P. Dormer and R. Lesch, Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese in überlebenden Tumorgewebe des Menschen. *Beitr. Path. Anat.* **128,** 467 (1963).
3. G. G. Steel and J. P. M. Bensted, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours—Critical appraisal of methods and theoretical considerations. *Europ. J. Cancer* **1,** 275 (1965).
4. M. F. Rajewsky, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours — II. *Europ. J. Cancer* **1,** 281 (1965).
5. H. A. Johnson, W. E. Haymaker, J. R. Rubini, T. M. Fliedner, V. P. Bond, E. P. Cronkite and W. L. Hughes, A radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after the *in vivo* uptake of tritiated thymidin. *Cancer* **13,** 636 (1960).
6. O. J. Eigsti and P. Dustin, Jr., *Colchicine.* Iowa State College Press, Ames, Iowa, U.S.A. (1955).
7. E. Frei, III, J. Wang, R. B. Scoggins, E. J. Van Scott, D. P. Rall and M. Ben, The stathmokinetic effect of vincristine. *Cancer Res.* **24,** 1918 (1964).
8. K. Breur, Growth rate and radiosensitivity of human tumours — I. *Europ. J. Cancer* **2,** 157 (1966).
9. S. Welin, J. Youker and J. S. Spratt, The rates and pattern of growth of 375 tumours of the large intestine and rectum observed serially by double contrast enema study (Malmo technique). *Amer. J. Rad. Therap. Nucl. Med.* **90,** 673 (1963).
10. A. K. Laird, Dynamics of tumour growth. *Brit. J. Cancer* **18,** 490 (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 237–238. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Lettre à l'Editeur

Mise en Evidence dans les Cancers Renaux d'un Antigène non présent dans le Rein Normal Humain

Ph. DRUET et P. BURTIN
Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer 94-*Villejuif*

La mise en évidence d'antigènes dans les tumeurs humaines est un domaine encore fort mal connu. Nous nous sommes attachés à l'étude des antigènes du cancer du rein.

Nous disposions de 10 reins cancéreux (9 épithéliomes à cellules claires, un néphroblastome); 17 reins d'adultes décédés d'une maladie non cancéreuse ou d'un cancer non rénal, prélevés au cours d'autopsies précoces; de reins de foetus expulsés entre 3 et 7 mois de gestation.

Ces organes ont été extraits par broyage en tampon phosphate pH 7,4, ou dans l'acétone à −10°C. Des extraits d'autres organes adultes ou foetaux ont également été préparés.

Des lapins ont été immunisés avec les extraits de tumeur rénale. Les immunsérums ont été épuisés avant l'emploi par le plasma humain normal (50 mg/ml) et par des extraits de l'organe désiré (50 mg de protéine/ml).

Cinq antisérums antitumeur rénale épuisés ont donné en immunoélectrophorèse une ligne de précipitation avec les extraits de tumeur rénale. Cette ligne commence au réservoir de départ qu'elle entoure puis migre vers l'anode en décrivant une double courbure de mobilité α2 (Fig. 1).

Cet antigène a été retrouvé dans 9 reins cancéreux sur 10 (Tableau 1). Il n'a été retrouvé que dans 4 reins histologiquement non cancéreux sur 17 (Tableau 1). Il est important de noter que 3 de ces 4 reins provenaient de sujets morts d'un cancer non rénal, le diagnostic du dernier n'est pas connu. L'antigène est retrouvé inconstamment et peu abondant dans le rein foetal.

D'autres organes ont été testés: la rate d'adulte normal le contient. Il n'a pas été décelé pour l'instant dans le foie normal, mais a été trouvé dans 3 foies de sujets morts de néphroblastome. Le foie foetal en contient en grande quantité. Cet antigène a été dénommé, pour cette raison, α2 hépatique ou α2H [1].

Puisque l'α2H est retrouvée dans la rate adulte, il est exclu qu'il s'agisse d'un antigène jusqu'alors étranger à l'organisme et produit par la cellule cancéreuse dont l'acide nucléique aurait été modifié par un agent extérieur. Il ne s'agit pas non plus d'un antigène du rein normal modifié par la nécrose (toujours présente), car il y aurait tout de même une identité partielle avec un antigène du rein normal.

Restent deux hypothèses:

(1) Puisque ce même antigène est présent dans le rein foetal et non dans le rein adulte, il est possible que sa sécrétion soit normalement réprimée dans le rein à l'état adulte et déréprimée au cours du cancer. A l'état normal, la synthèse pourrait d'ailleurs ne pas être totale-

Tableau 1. *Recherche de l'α2H dans les extraits rénaux*

	α2H		Total	
	+	−		
Reins cancéreux				
Epithélioma à cellules claires	8	1	9	10
Néphroblastome	1		1	
Reins non cancéreux — malades morts de:				
Maladie non cancéreuse	0	5	5	17
Cancer non rénal	2	5	7	
Hémopathie maligne	1	2	3	
Cause inconnue	1	1	2	

ment réprimée, mais les quantités d'α2H produites seraient alors trop faibles pour être détectées.

(2) l'α2H pourrait être sécrétée par le foie (ou un autre organe) et stockée par le rein cancéreux ou non. A l'appui de cette hypothèse viennent les constatations suivantes: on trouve en quantités appréciables de l'α2H dans du rein normal de sujets ayant un autre cancer, et aussi dans le foie de cancéreux. L'α2H peut donc être trouvée dans des organes où elle n'est peut-être pas synthétisée. La dérépression se produirait alors dans un organe non directement frappé par le cancer.

Les données de la littérature, sur ce sujet, sont peu nombreuses. Abelev [2] et Stanislawski [3] ont invoqué aussi la dérépression pour expliquer l'apparition, au cours de l'hépatome expérimental de la souris et du rat, d'un antigène présent chez l'embryon et non chez l'animal adulte.

Gold et Freedman [4–5], von Kleist et Burtin [6] ont trouvé, dans les tumeurs coliques humaines, un antigène, présent dans la tumeur et dans l'intestin foetal, mais absent du colon normal adulte.

En ce qui concerne les cancers du rein, aucun travail systématique n'a été fait.

Nairn et coll. [7] ont immunisé une patiente atteinte de cancer du rein avec un extrait d'une autre tumeur rénale. Des anticorps précipidtants sont apparus dans le sérum,mais l'antigène correspondant n'a pas été étudié.

Nous ponsons avoir mis en évidence un antigène commun à certains organes et au rein cancéreux, absent du rein normal. Il ne s'agit pas d'un néo-antigène. Des travaux sont en cours pour tenter de l'isoler.

BIBLIOGRAPHIE

1. P. Burtin, S. von Kleist et D. Buffe, Etude immunoélectrophorétique des protéines du sérum foetal humain. *Bull Soc. Chim. Biol.* (à paraître).
2. G. I. Abelev, Study of the antigenic structure of tumors *Acta Un. Int. Cancr.* **19,** 80 (1963).
3. M. Stanislawski Birengwajg, C. Frayssinet et P. Grabar, Embryonic antigens in liver tumors in rats *Arch. Immun. Therap. Exp.* **14,** 730 (1966).
4. P. Gold et J. O. Freedman, Demonstration of tumor specific antigens in humain colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. exp. Med.* **121,** 439 (1965).
5. P. Gold et J. O. Freedman, Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. exp. med.* **122,** 467 (1965).
6. S. von Kleist et P. Burtin, Mise en évidence dans les tumeurs coliques humaines, d'antigènes non présents dans la muqueuse colique de l'adulte normal. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **263,** 1543 (1966).
7. R. C. Nairn, S. Philip, T. Ghose, I. B. Porteous et J. B. Popmergill, Production of a precipitin against renal cancer. *Brit. med. J.* **1702,** (1963).

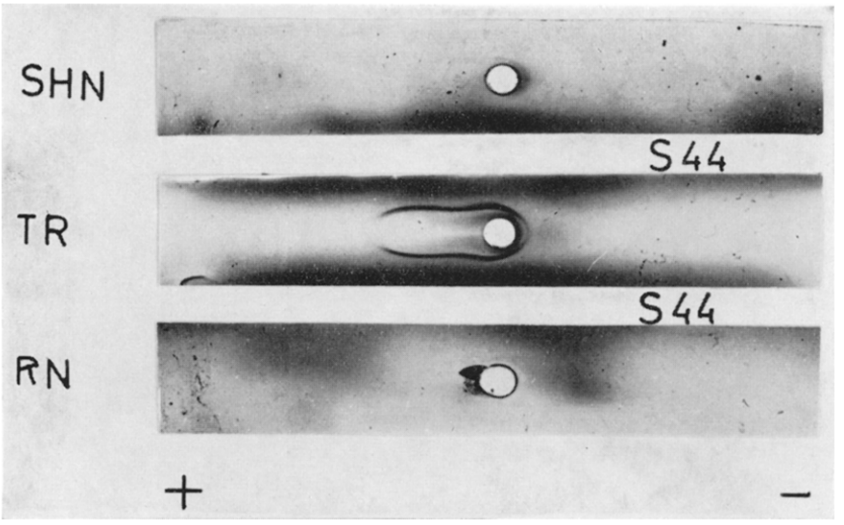


Fig. 1. *Analyse immunoélectrophorétique:*
— au centre: d'un extrait de tumeur rénale (TR)
— en haut: de sérum humain normal (SHN)
— en bas: d'un extrait de rein normal (RN)
L'immunsérum S44 est un immunsérum antitumeur rénale absorbé par le SHN et le rein normal.

(to face p. 238)

Europ. J. Cancer Vol. 3, p. 239. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Editor's Preface

THE PROCEEDINGS of the "Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours" are being published in this double number 6 months after the Symposium was held. The Editorial Board believes that speed is essential in publishing proceedings of scientific meetings. Not all papers came in time to be included in the present number, but late coming papers will appear in the forthcoming (December 1967) issue. Because speedy publication was essential, summaries in German could not be obtained in time and it was thought preferable to omit them rather than to delay publication. We apologize to our German readers and authors for this omission, which was unavoidable in the present state of our German translation facilities. Needless to say the Journal's policy of accepting articles in the three languages remains unchanged.

In the preparation of this number, our thanks are due to the organizers of the Symposium who performed a difficult task with unfailing efficiency, the Pergamon Press which speeded up publication, the authors who gracefully cooperated with the Editorial Office in expediting the preparation of manuscripts. Miss J. Leroy was responsible for the technical organization of the Editorial work.

H. J. TAGNON

Europ. J. Cancer Vol. 3, p. 241. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Second International Symposium on the Biological Characterisation of Human Tumours

Introduction to the Symposium

FRANCESCO BRESCIANI

University di Napoli,
Guest Editor

IN FOUR main sessions during the first two days, the Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours studied the following subjects: Factors in Human Carcinogenesis, The Nature of Malignancy, Biochemistry of Tumours, and Tumours of the Uterine Cervix. These subjects were chosen because, in addition to a number of new experimental facts, new ideas have also been developed in these areas of research. Experienced research workers were invited to give lectures within the framework of the main topics. This offered them a forum to present their results and discuss their ideas in detail, while informing and stimulating other colleagues at the Conference. The emphasis was more on interpretation of results than on experimental methods. The following groups met: Tissue and Organ Culture, Tumour Biochemistry, Cytogenetics, Cell Proliferation, Hormone and Control Mechanisms, Local Reaction to Tumours, and Immunology. All members of the Study Groups were thus given an opportunity to present and discuss their results with fellow specialists. Uninhibited, detailed and lengthy discussion was indeed a main ingredient of the work of the Study Groups. The length of the discussion itself prevented its publication. The hope should be expressed, however, that in future Symposia at least the most important arguments will be reproduced in the Proceedings.

The generous support of the Italian Council for Research made it possible to invite the main speakers and to solve other material problems of organization. In this respect the support of Prof. L. Califano, honorary Chairman of the Symposium and President of the Committee for Biology and Medicine of the Italian Council for Research, should be gratefully acknowledged. Prof. Califano also helped in securing the beautiful Renaissance Villa della Farnesina of the Accademia dei Lincei in Rome as the meeting place for the Symposium. Many thanks are due to Dr. E. Gianni and Dr. G. Roglia of the Accademia dei Lincei for their unfailing courtesy and support in the organization of the meeting, and to many others who made the Symposium possible. Special thanks are due to Prof. H. J. Tagnon, Editor, for speedy publication of these Proceedings in the European Journal of Cancer. This definitely confirms a fruitful association between this Journal and the Co-ordinating Committee on Human Tumour Investigation, organizer of the Symposium series. Finally Prof. F. Bergel, Prof. L. A. Elson and Dr. W. Davis should be congratulated on the success of a meeting of a Committee which they have created and promoted for many years.

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 243–246. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Studies on Aggregation of Human Ascites Tumor Cells

ANNELIES SCHLEICH
Institute of Experimental Cancer Research
University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

INTRODUCTION

TWENTY years ago biologists began to approach more intensively the fascinating phenomenon of the reaggregating dissociated embryo cells. Holtfreter's experiment on amphibian embryos opened this field of developmental physiology [1, 2]. The next landmark in this line was Moscona's reaggregation study on dissociated chick embryo material [3–6]. Moscona first worked with clot cultures. This means that the reaggregating cells had to move together spontaneously by chemotoxis or by some trapping mechanism. Sussmann *et al.* [7] described this procedure as "self aggregates". Subsequently the Moscona's made use of the gyratory shaker. This is an elliptically rotating table on which Erlenmeyer flasks are fixed. The permanent agitation of the dissociated material prevents cells from settling down, and furthermore it offers the facility of chance contacts between the different cell species, thus enabling them to reaggregate selectively. This induced aggregation was a promising tool for our studies on human malignant effusions. The following studies which have been performed with the cooperation of Marion Frick and August Mayer, revealed some interesting phenomena, and perhaps they might serve as a platform to further approaches towards histological dynamics in tumor pathology.

MATERIAL AND METHODS

Pleural and peritoneal effusions from patients with advanced neoplastic diseases have been used throughout these studies. The primary tumors were carcinomas of the ovary, carcinomas of the mammary gland and melanomas. The fluid was centrifuged (5 min 2000 rev/min) and incubated with 0·5% trypsin (5–10 min, 37°C). Then the dissociation was stopped by a small amount of the supernatant fluid of the first centrifugation. After a microscopical examination the cells were spun down and quickly dispersed in the nutrient medium (40% Hanks BSS, 40% human placental cord serum, 20% chick embryo extract). Twenty-five-millilitre Erlenmeyer flasks, each containing $3–4 \times 10^6$ cells in 3 ml medium, were stoppered and incubated in the shaker at 70 rotations per min and 37°C. During the first two weeks half of the medium was changed twice a week, later on 70–80% of the fluid have been replaced once a week. In several cases when the primary fluid was very hemorrhagic, the cell suspension was first grown in roller tubes with daily medium changes. Very soon afterwards the tumor cells were attached to the glasswall and the erythrocytes could be easily eliminated with the fluid. After a few days the tumor cells were trypsinized and transferred to the shaker. The final aggregates were embedded like hanging drop cultures, fixed, sectioned and stained for morphological and histochemical studies. Each tumor was also grown in roller tubes and on tube slips.

RESULTS

Most of the experiments in the literature on aggregation of embryonic tissue were completed after 24–48 hr [3–6, 8]. This time interval was found to be too short for a differentiated aggregation of our material because the ascites and pleural tumor cells clumped together immediately after explantation. How-

ever, this coagulum lysed during the course of the first 24 hr and the cells floated freely in the liquid. Then first minute aggregations started forming. The results around the sixth day were still very poor. It looks as if there was random aggregation. One week later some histogenetic organization was recognizable. Histotypically related cells gathered and obviously multiplied according to the number of visible mitotic figures. A surrounding capsula developed and the central structure became more and more distinct. Good results were obtained after 3–4 weeks. However, even after 72 days little central necrosis was found. The ascites or pleural fluid reflected in its aggregation the population of the explant. In other words, the pattern of the aggregate was the same in all explants of the same tumor type.

The structural quality, however, increased with increasing proportion of mesenchymal cells. A purely epithelial tumor without a stroma did not seem to be capable of aggregation [9]. For instance, the ascites form from a highly malignant melanoma developed during 70 days of culture in the gyratory shaker only numerous, very small cell clumps. On the other hand, the same material, when provided with an adequate amount of trypsinized adult human fibroblasts, grew several large aggregates (Figs. 1 and 2). The same difficulties arose with the exudates of mammary carcinomas (Figs. 3 and 4). They aggregated rather poorly without the sustaining stroma and developed good aggregations when any adult or embryonic mesenchymal tissue was present. The most distinct structural pattern was shown by the aggregates from the ascites of the ovary carcinoma.

In the first explant on tube slips the population includes fibroblasts, white blood cells, epithelial cells, and the mucoproducing giant cells. They all appeared afterwards in the aggregate as well developed structures (Figs. 5, 6, 9 and 10). In several cases, typical adenoid structures were clearly visible (Figs. 7 and 8) and, in one case, the resemblance with a granulosa cell tumor was striking (Fig. 11). None of the 30 different human effusions, which we grew in the gyratory shaker, failed to develop aggregates. Some of them were small; however, they were viable for several weeks. In addition, they were still able to form well structured aggregates with human or even any mammalian fibroblasts. The fibroblastic cells always took the function of the stroma. Several small aggregates were linked together and the interphase, as well as the surface of this conglomeration, were covered with cords of connective tissue (Fig. 12). Attempts to grow aggregates on M 199 or Eagle's Medium with 10% calf serum for a longer interval failed completely. Replacement of the calf serum by 10% human placental cord serum increased the growth rate to a certain degree, but not remarkably. The optimal effect on histotypical aggregation was strictly connected with an increasing proportion of human placental cord serum.

DISCUSSION

Experiments on dissociated solid tumors of different species have been reported by a number of authors. Moscona combined embryonic chick tissue with mouse melanotic cells [5, 6]. Dabrowska succeeded in reaggregating mouse tumors [8]. Halpern *et al.* observed differences in the reaggregation capacities between normal and malignant rat and mouse cell strains in tissue culture [10]. To our knowledge tumor effusions have not yet been grown with this shaker technique. We are aware of the handicap resulting from a long-time developing phase. The intervals between the primary explant and harvesting may be rather long. However, it opens a wide field for morphologists, biochemists and, under certain conditions, also for clinicians. These reaggregating tumors enable us to follow the dynamics of histogenesis from the very first moment of spontaneous cell contact [11, 12], evoke problems of surface reactions to certain compounds and consequently the problems of invasion and infiltration. In this connection it should be worthwhile to study the interaction between epithelial and mesenchymal tissue, as well as the interaction between malignant and normal tissue. Experiments in this direction are now in progress.

Another question is the role of the serum in this system. We still do not know whether the serum mobilizes certain chemotactic ferments [13, 14]. Franks speaks of a normalizing function of the serum in hyperplastic explants of the prostatic gland *in vitro* [15]. Are we in our aggregates dealing with serum-induced regulation between proliferation and differentiation? We only know by now that the quality of the aggregates depends on the amount of homologous serum in the medium. This technique of growing three-dimensional solid tumors has the advantage of easy handling. The free-floating specimen develops under circumstances which simulate to a certain degree the physiological conditions.

From the pathologist's point of view these reaggregations are most striking. They show

clearly that these highly malignant, and therefore supposedly dedifferentiated effusion cells, still bear all the potencies of structural formation.

RESUME

Des cellules d'ascite de tumeurs humaines malignes (carcinome de l'ovaire, carcinome du sein, mélanome généralisé), cultivées selon la méthode de Moscona dans un agitateur rotatif, forment des agrégats solides ressemblant à la tumeur primitive. Les tumeurs ascitiques, ayant une population épithéliale prédominante, ne forment des agrégats que si l'on ajoute des fibroblastes humains. Ces résultats démontrent que les cellules tumorales conservent leur capacité multipotentielle. Cette technique pourrait utilement être appliquée à l'étude des contacts et des interactions cellulaires.

SUMMARY

Ascites cells of highly malignant human tumors (ovary carcinoma, mammary carcinoma, generalized melanoma) developing in the gyratory shaker (Moscona's method modified) were found to form solid aggregations similar to the primary tumor. Ascites tumors, however, with a predominantly epithelial cell population were unable to aggregate without the addition of normal human connective tissue. These results demonstrate the unaltered multipotent capacities of the tumor cells in the ascites form. On the other hand, this technique could become a useful tool in studying cell contacts and cell interaction.

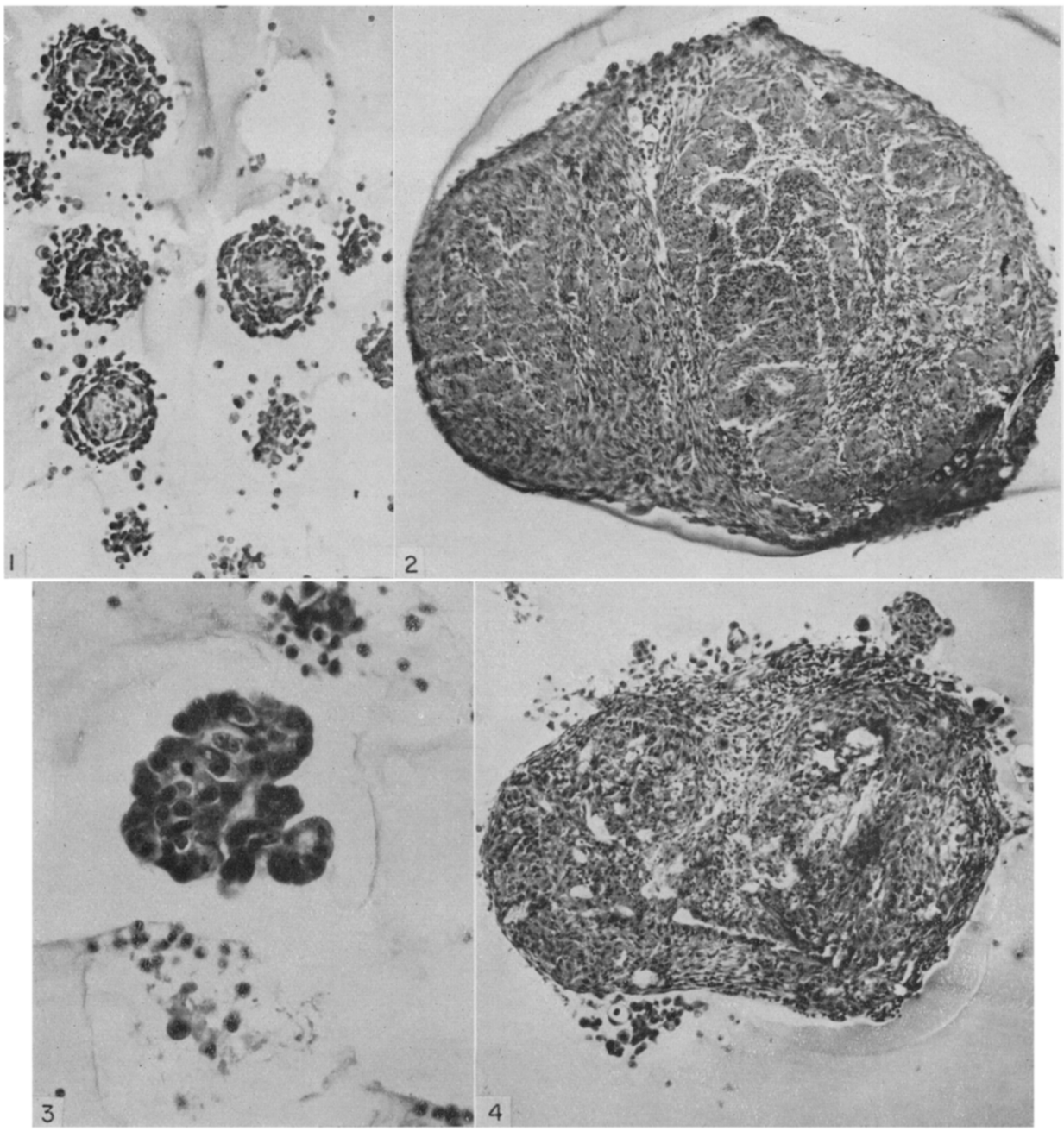
ZUSAMMENFASSUNG

Asciteszellen hoch maligner menschlicher Tumoren (Ovarial-Ca., Mamma-Ca., generalisiertes Melanom), die in einem Rotationsschüttler nach einer modifizierten Moscona-Methode kultiviert wurden, zeigen massive Aggregationen in der Art des Primärtumors. Ascitestumoren mit überwiegend epithelialem Charakter konnten nicht aggregieren ohne Zusatz von normalem menschlichen Bindegewebe. Die Ergebnisse zeigen die unverändert multipotenten Fähigkeiten von Tumorzellen in der Aszitesform. Diese Technik könnte sich als zweckmäßig erweisen zum Studium der Bedeutung des Zellkontaktes und der Zellwechselwirkung.

REFERENCES

1. J. Holtfreter, A study of the mechanics of gastrulation. *J. exp. Zool.* **95** (1944).
2. J. Holtfreter, Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *J. exp. Zool.* **106,** 197 (1947).
3. A. A. Moscona, Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* **3,** 535 (1952).
4. A. A. Moscona, Formation of lentoids by dissociated retinal cells of the chick embryo. *Science* **125,** 598 (1957).
5. A. A. Moscona, The development *in vitro* of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **43,** 184 (1957).
6. A. A. Moscona, Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **22,** 455 (1961).
7. M. Sussman and R. R. Sussman, Aggregative performance. *Exp. Cell Res.* Suppl. 8, 91 (1961).
8. K. Dabrowska-Piaskowska, Observations on the histoformative capacities of tumor cells dissociated by digestion with trypsin. *Exp. Cell Res.* **16,** 315 (1959).
9. H. B. Fell, Studies of development in organ culture: summary, correlation and speculation. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **11,** 73 (1963).
10. B. Halpern, B. Pejsachowitz, H. L. Fedore and G. Barski, Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells. *Nature (Lond.)* **209,** 157 (1966).
11. M. Abercrombie, The basis of the locomotory behavior of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **Suppl. 8,** 188 (1961).

12. E. T. AMBROSE, The movement of fibrocytes. *Exp. Cell Res.* **Suppl. 8,** 54 (1661).
13. H. U. KELLER and E. SORKIN, Studies on chemotaxis. I. On the chemotactic and complement — fixing activity of γ-Globulus. *Immunology* **9,** 241 (1965).
14. H. U. KELLER and E. SORKIN, II. The significance of normal sera for chemotaxis induced by various agents. *Immunology* **9,** 441 (1965).
15. L. M. FRANKS, Nutritional and other factors influencing the balance between function and proliferation in organ culture. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **11,** 83 (1963).



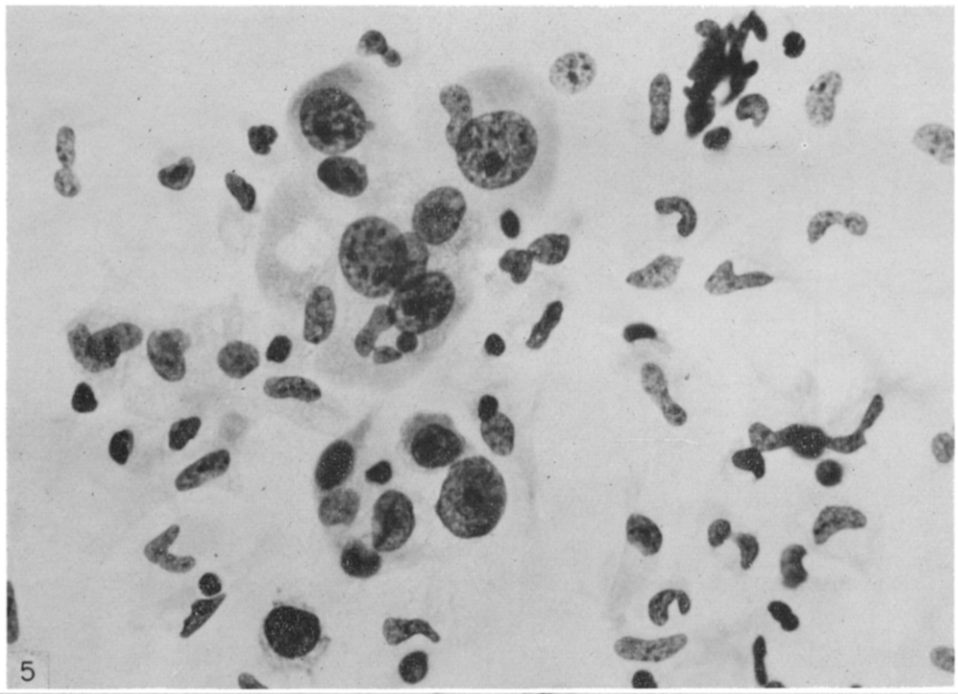
Figs. 1 *and* 2. *Melanoma, H.E.*

(1) *Ascites cells,* 70 *days in shaker* (100×)
(2) *Ascites cells plus trypsinized human adult fibroblasts* (*Peritoneum*), 70 *days in shaker* (100×)

Figs. 3 *and* 4. *Mammary carcinoma, ascites, H.E.*

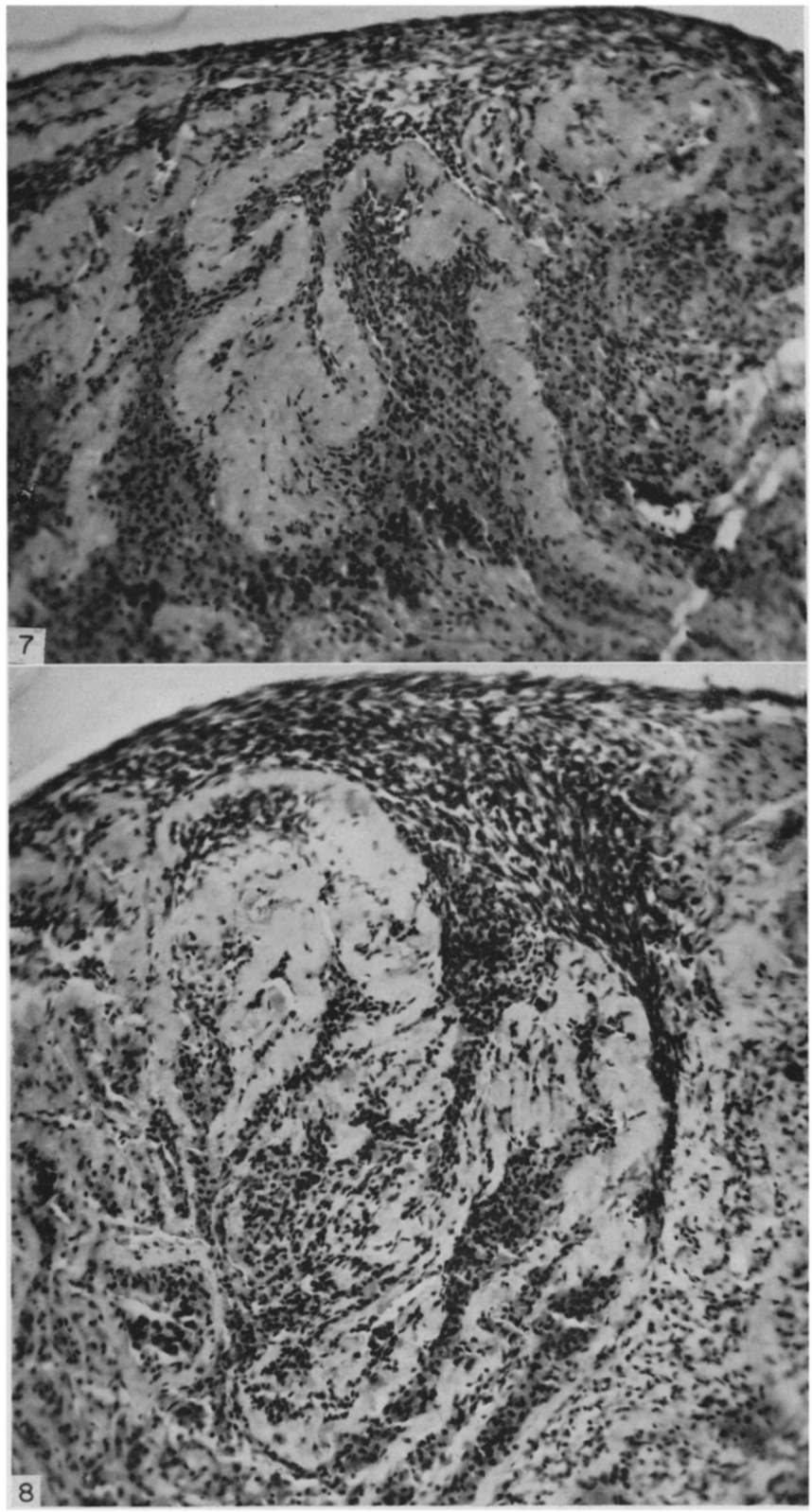
(3) *A group of epithelial cells,* 6 *days in shaker* (375×)
(4) *Poor aggregation of a predominantly epithelial cell population,* 14 *days in shaker* (100×)

(to face p. 244)

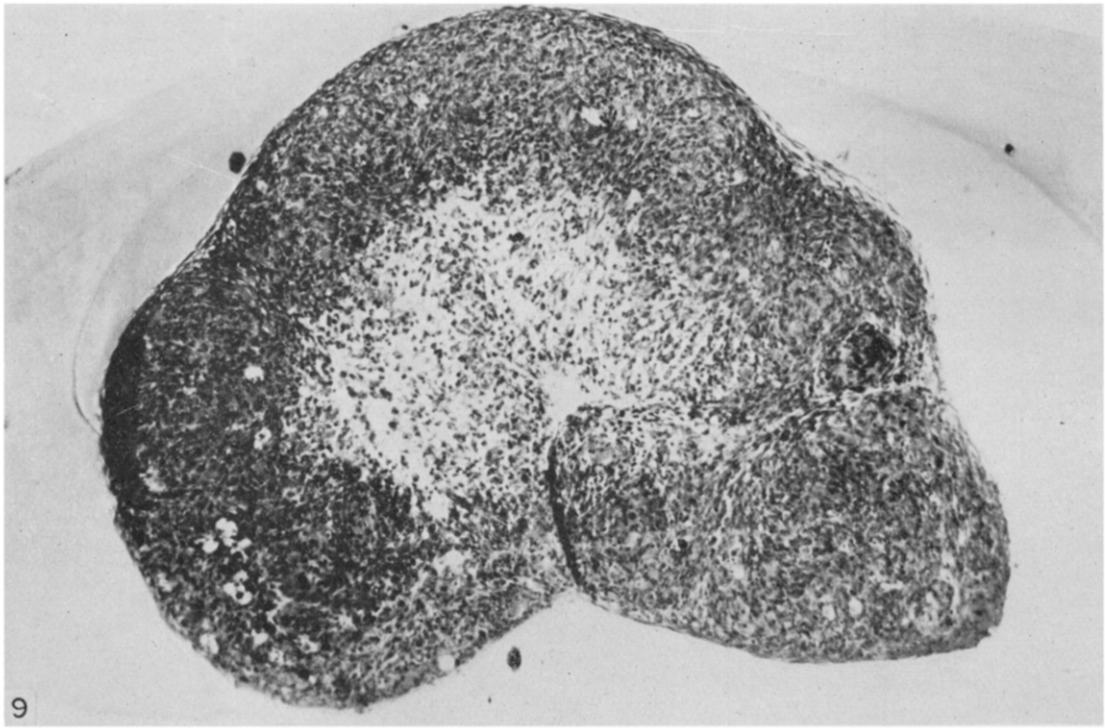


Figs. 5 *and* 6. *Ovary carcinoma, H.E.*

(5) *Ascites cells* in vitro, 2 *hr following paracenthesis* (650×)
(6) *Same tumor*, 21 *days in shaker* (100×)



Figs. 7 *and* 8. *Details of lobular structures of the aggregate Fig.* 6 (150×), *H.E.*



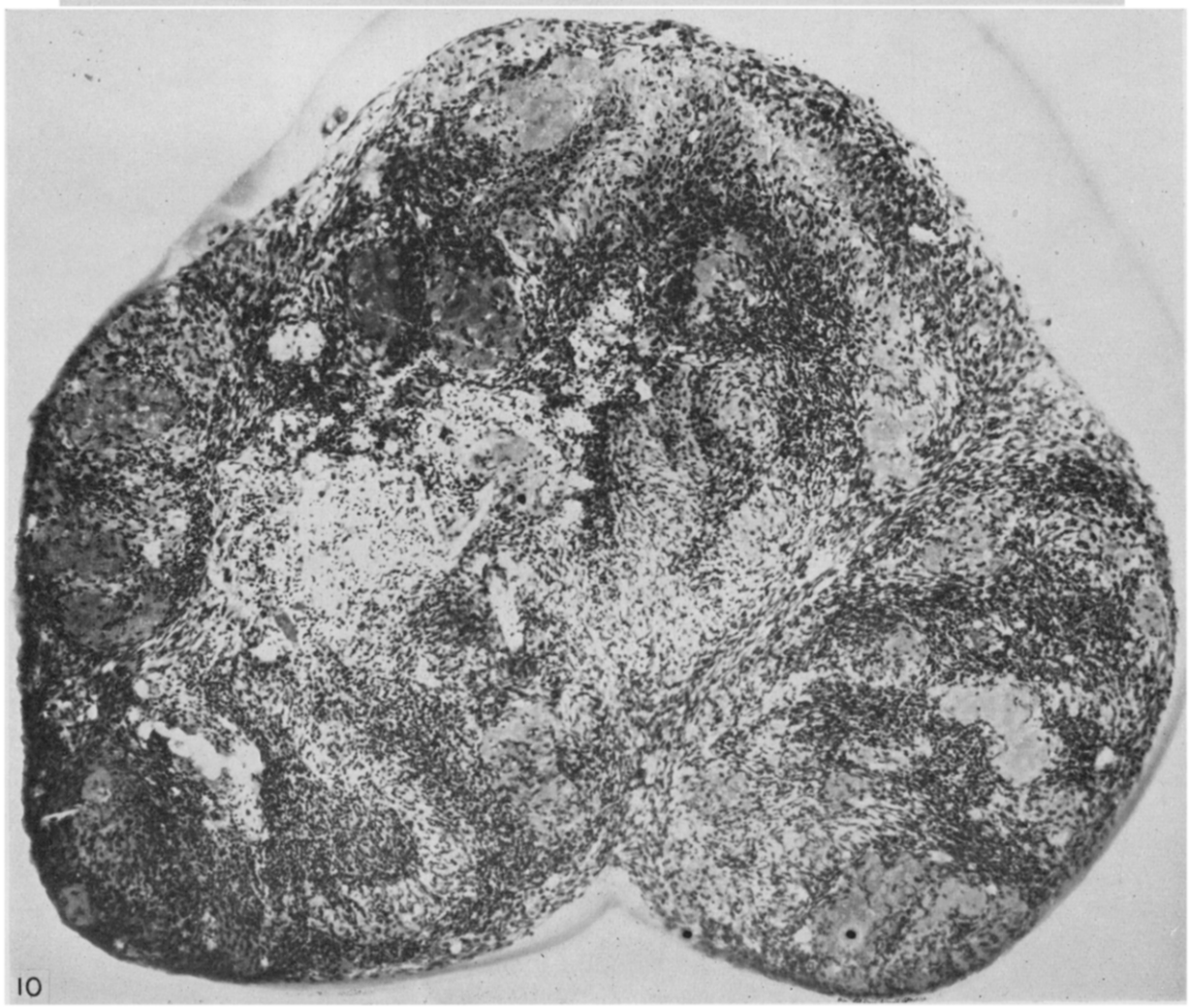


Fig. 9. *Ascites aggregate of an ovary carcinoma*, 27 *days in shaker* (100×), *Azan.*

Fig. 10. *Ascites aggregate of an ovary carcinoma*, 18 *days in shaker* (100×), *H.E.*

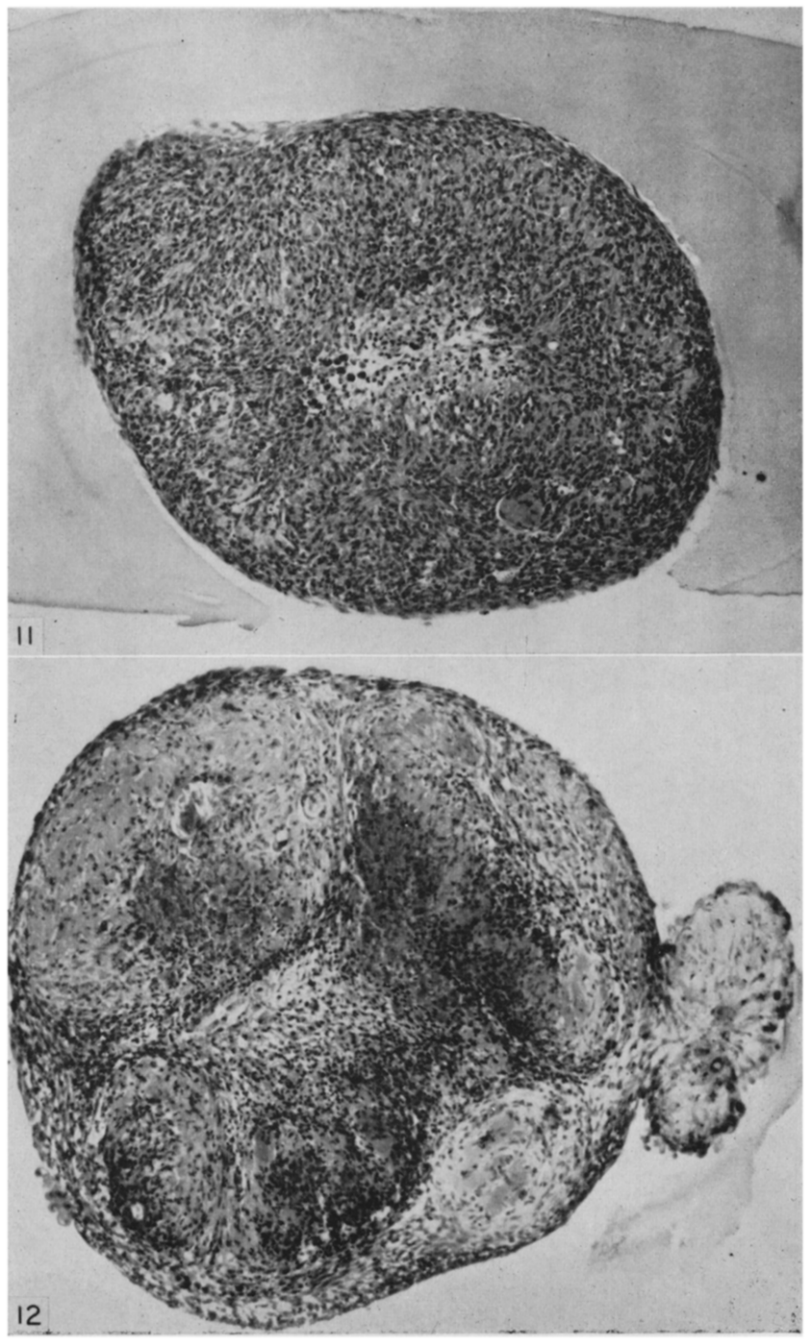


Fig. 11. *Aggregated ascites cells of an ovary carcinoma,* 29 *days in shaker. Note the granulosa-cell type* (100×), *H.E.*

Fig. 12. *Aggregation of ascites cells of an ovary carcinoma showing the cords of connective tissue between several small aggregates* — 21 *days in shaker* (100×), *H.E.*

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 247–250. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Muscle Type Isoenzymes of Liver Aldolase in Hepatomas

Y. NORDMANN and FANNY SCHAPIRA
Institut de Pathologie Moléculaire
dépendant de la Faculté de Médecine et de l'I.N.S.E.R.M., associé au C.N.R.S.
Hôpital des Enfants Malades, Paris, France

INTRODUCTION

THREE aldolase isoenzymes are presently known in mammals:

— muscle type aldolase, which is also called aldolase A.

— liver type aldolase, or aldolase B.

— and brain type aldolase or aldolase C (1).

Aldolase A acts primarily on fructose-1-6-di-phosphate (F-d-P) and slightly on fructose-1-phosphate (F-1-P) (activity ratio F-d-P/F-1-P >50 [2]. Aldolase B has the same activity on the two substrates (ratio F-d-P/F-1-P=1). Aldolase C has a ratio F-d-P/F-1-P around 10. Many other criteria are known which help to differentiate the aldolase isoenzymes: competitive inhibition of muscle aldolase by ATP (which does not inhibit liver aldolase) [11] electrophoretic migration and immunological properties are the most widely used.

This report gives some results that we obtained during our studies on hepatoma and foetal liver aldolase, using the criteria cited above. These results confirm the previous data that one of us obtained with G. Schapira and J. C. Dreyfus in 1962–63 [3, 4], showing that hepatoma aldolase is different from normal liver aldolase. The activity ratio towards the two substrates F-d-P/F-1-P was found to be increased (mean value 5·5 instead of 1 in normal liver). The same kind of results were obtained with foetal liver (activity ratio above 2) and we discussed at this time the similarity between hepatoma and foetal aldolase.

METHODS

— Rabbit muscle aldolase, prepared by the method of Taylor *et al.* [5] was recrystallized 4 times before use,

— Rabbit liver aldolase was prepared by the Pogell method [6], as modified by Rutter [7] and also by Morse and Horecker [8],

— Human hepatomas were carefully dissected free of necrotic and non tumorous material, and were verified as being true hepatomas by histological examination. They were kept at −20°C with some decrease in aldolase activity but without any apparent change in their activity ratio, as shown by studies of normal liver biopsies or studies made on normal liver soon after death,

— Rat hepatomas were obtained by feeding rats with 3′ methyl-4 dimethyl aminoazobenzene*;

— The measurement of aldolase activity were taken using both the colorimetric method of Sibley and Lehninger [9] (which we have adapted to the use of F-1-P as substrate) and

*We would like to thank Dr. Uriel and Miss de Néchaud who gave us the rat hepatomas, and also Pr. Masseveff and Pr. Quenum (Dakar) who sent us the human hepatomas.

Table 1. Properties of normal aldolases

	F-d-P to F-l-P activity ratio	Inhibition of F-d-P activity by ATP* p. 100	Inhibition of F-d-P activity by antimuscle aldolase† p. 100
Normal human liver extract‡	<1·1	<12	<15
Purified rabbit liver aldolase	1·0	5	4
Normal human muscle extract‡	>30·0	>45·0	>95·0
Purified rabbit muscle aldolase	46·0	65·0	98·0
Human foetal liver extract§ (around 10-weeks-old)	2·2	33·0	42·0

*Inhibition was measured with ATP 15×10^{-3}M and F-d-P 5×10^{-5}M.
†The extracts or purified enzymes were mixed with an equal volume of antimuscle aldolase, incubated at 38° for 60 min and then at 4° for 24 hr, and centrifuged. The supernatants were assayed for enzymatic activity — Controls included normal chicken serum.
‡Results of 10 experiments.
§Mean of 4 experiments.

the spectrophotometric method of Baranowski and Niederland [10],

— Competitive inhibition by ATP was studied by the method described by Spolter *et al.* [11],

— Antiserum to rabbit muscle aldolase (antimuscle antialdolase) was prepared in chickens by repeated injections of rabbit muscle aldolase, with or without complete Freund adjuvant,

— Zone electrophoresis was performed on cellulose acetate strips in 0·06 M barbital, 0·01 M ß mercapto-ethanol pH 8·6, as described by Rutter *et al.* [2]. The strips were then stained for aldolase activity using reduction of tetrazolium salts.

RESULTS

Data given in Table 1 have been obtained with rabbit purified muscle and liver aldolase,

Table 2. Properties of human hepatoma aldolase

Hepatomas	F-d-P*	F-l-P*	F-d-P to F-l-P activity ratio	Inhibition of F-d-P activity by ATP†	Inhibition of F-d-P activity by antimuscle aldolase‡
1	1·51	0·11	13·4	58	75
2	0·47	0·051	9·1	52	66
3	0·61	0·08	7·5	50	60
4	0·78	0·14	5·5	40	70
5	0·12	0·04	3·0	16	33
6	3·41	1·56	2·2	25	35
7	1·23	0·61	2·0	27	30
			M=6·25±1·6§	M=38·2±6	M=52·7±7·3

*In international Units.
†‡Conditions are described in Table 1.
§Mean±S.D.

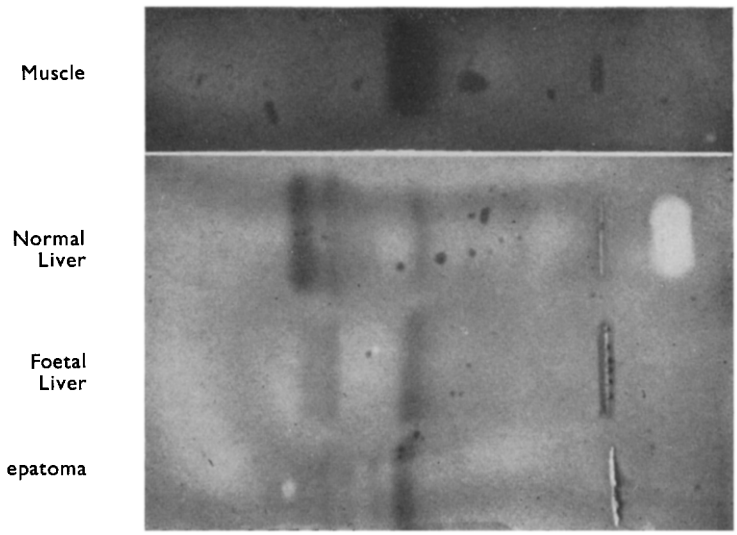


Fig. 1. *Electrophoretic aspect of some aldolases.*

(to face p. 248)

and are similar to these obtained using human extracts of both tissues: as expected ATP [11] and antimuscle aldolase [1] give a marked inhibition on muscle aldolase, but a very slight inhibition on liver aldolase. In contrast with the adult liver, foetal liver shows not only an increased activity ratio, but also, like muscle aldolase, an inhibition by ATP and antimuscle aldolase.

Table 2 shows results obtained with hepatomas which were classified according to their activity towards F-d-P/F-l-P.

Here too one notes an increased activity ratio and a striking inhibition by ATP [12] and antimuscle aldolase. There seems to be a rough correlation between the increase of activity ratio and the percentage of inhibition. This could be interpreted as a relative increase of muscle type aldolase in hepatoma. We have therefore measured the activity ratio of hepatoma in the supernatants after precipitation by antimuscle aldolase serum and we have found a ratio close to 1.

Electrophoretic data (see Fig. 1) have also shown a similarity between rat muscle type aldolase on the one hand, foetal liver and hepatoma aldolases on the other hand. As described by Rutter [2], the normal liver shows a marked cathodic band and a slight anodic band near the origin (this band is the unique band shown by pure muscle aldolase). Foetal and hepatoma aldolase both show a reinforced anodic band. Furthermore hepatoma show three intermediary bands.

DISCUSSION

The above data confirm the fact that hepatoma aldolase shows a striking similarity to foetal liver and indicate also a similarity to muscle aldolase (type A).

The similarity of foetal aldolase is strengthened by the recent works of Stanislawski [13] and Kithier *et al.* [14] who have found some specific foetal antigens in hepatoma.

The present problem is to know if hepatoma and foetal liver aldolases are a mixture or an hybrid of muscle type and liver type aldolase, or a third different and specific type of enzyme. The electrophoretic results, showing isozymic bands with the same migration as aldolase A in foetal liver and in hepatoma suggest that aldolase A is present in both tissues. Nevertheless chromatographic studies are now in progress aiming at ruling out the possibility of another specific type of aldolase.

RESUME

Nous avons développé nos travaux antérieurs sur les anomalies des isoenzymes de l'aldolase dans l'hépatome. L'aldolase de l'hépatome, comme celle du foie foetal, est inhibée par l'antisérum antialdolase de muscle, ainsi que par l'A.T.P., contrairement à l'aldolase de foie normal adulte. Ces résultats, renforcés par l'aspect des tracés électrophorétiques, témoignent de la similitude qui existe entre l'aldolase du foie cancéreux, l'aldolase du foie foetal et l'aldolase du type "muscle".

SUMMARY

Previous studies of abnormalities of aldolase isoenzymes in human hepatoma have been extended. Hepatoma aldolase as foetal liver aldolase presents a marked inhibition by antimuscle aldolase antiserum and also an inhibition by A.T.P. These results strengthened by electrophoretic data indicate a shift towards a muscle pattern of liver aldolase isoenzymes in hepatoma.

ZUSAMMENFASSUNG

Frühere Untersuchungen über abnorme Aldolaseisoenzyme bei menschlichen Hepatomen wurden weitergeführt. Hepatomaldolase wird ebenso wie diejenige der foetalen Leber durch das Antiserum Muskelantialdolase und durch A.T.P. gehemmt, im Gegensatz zur Leberaldolase des normalen Erwachsenen. Diese Ergebnisse verstärkt durch die Elektrophoresebilder beweisen eine Ähnlichkeit zwischen der Aldolase der Tumorleber, der Aldolase der foetalen Leber und der Aldolase des Muskeltyps.

REFERENCES

1. E. Penhoet, T. Rajkumar and W. J. Rutter, Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **56,** 1275 (1966).
2. F. Schapira, L'activité fructose-l-phosphoaldolasique des tissus de Mammiféres. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **43,** 1357–65 (1961).
3. F. Schapira, G. Schapira and J. C. Dreyfus, Type foetal de l'aldolase dans un cas d'hépatome humain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **254,** 3143 (1962).
4. F. Schapira, J. C. Dreyfus and G. Schapira, Anomaly of aldolase in primary liver cancer. *Nature (Lond.)* **200,** 995 (1963).
5. J. F. Taylor, A. Green and G. T. Cori, Crystalline aldolase. *J. biol. Chem.* **73,** 591 (1948).
6. B. M. Pogell, Enzyme purification by selective elution with substrate from substituted cellulose columns. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **7,** 225 (1962).
7. W. J. Rutter, *Methods in Enzymology,* in press.
8. P. Morse and B. Horecker, unpublished data.
9. J. S. Sibley and A. D. Lehninger, Determination of aldolase in animal tissues. *J. biol. Chem.* **177,** 859 (1949).
10. T. Baranovski and T. Niederland, Aldolase activity of myogen A. *J. biol. Chem.* **180,** 543 (1940).
11. P. Spolter, R. C. Adelman and S. Weinhouse, Distinctive properties of native and carboxypeptidase treated aldolases of rabbit muscle and liver. *J. biol. Chem.* **240,** 1327 (1965).
12. Y. Nordman and F. Schapira, Action inhibitrice de l'adénosine triphosphate sur l'aldolase de l'hépatome humain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **262,** 1896 (1966).
13. M. Stanislawski-Birencwajg, Etude immunochimique d'antigènes embryonnaires du rat. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **260,** 364 (1965).
14. K. Kithier, J. Hoostek, J. Masopost and S. Radl, Occurrence of a specific foetal protein in a primary liver carcinoma. *Nature (Lond.)* **212,** 414 (1966).

Europ J. Cancer Vol. 3, pp. 251–255. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Cytogenetic Studies in a Case of Benzene Leukaemia*

ALESSANDRA FORNI and LUCIANO MOREO
Clinica del Lavoro "L. Devoto"
University of Milan, Milan, Italy

THE CHRONIC exposure to inhalation of benzene can produce toxic effects on the bone marrow, which result in hyporegenerative anaemias or pancytopenias. In some cases the haemopathy can evolve into a leukaemia, mostly of the myeloblastic type [1–3].

One such case is presented, which was followed up by cytogenetic studies from the phase of hyporegenerative anaemia to the leukaemic phase.

Case report. Z.G. was a 38-year-old female, when first seen at the Clinica del Lavoro in December 1965. Nothing important in the family history. One normal pregnancy at the age of 26. The patient had been working from 1942 to 1964 as a finisher of electric cables. The cables were covered by a rubber muff, and were cleaned with solvents containing benzene; the solvent was poured on cotton-wool and this was rubbed on the external surface of the cable muff. From 1960 to 1964 the patient complained of weakness, headache, vertigo, irregular fever. In September 1964 a severe anaemia was discovered (Hb 6·4 g/100 ml, RBC 2,100,000/mm^3). She had two hospital admissions and improved under treatment with transfusions.

From September to November 1965 she was admitted to a university hospital. The blood findings were: Hb 4·5 g/100 ml, RBC 1,900,000/mm^3, WBC 4,800/mm^3, with normal differential count, platelets 90,000/mm^3. No bone marrow could be obtained despite several attempts. She was discharged with the diagnosis of benzene-induced hypoplastic anaemia. The case was reported to the Insurance Institute against Occupational Diseases and sent to the Clinica del Lavoro.

On first admission (11/30/65–3/12/66) no important findings were observed by physical examination. The laboratory findings were: Hb 6·4 g/100 ml, RBC 2,000,000/mm^3, WBC 3200/mm^3 with neutrophils 70%, eosinophil 1%, lymphocytes 27%, monocytes 2%; reticulocytes 1%; platelets 120,000/mm^3, free protoporphyrin nine µg 41/100 ml RBC; plasma iron µg 149/100 ml; UIBC µg 110/100 ml plasma, MCV µ^3 108; total serum bilirubin mg 0·7/100 ml; normal bleeding and coagulation times and thromboelastogram. At sternal puncture (2/21/66), the bone marrow was very poor with rare normoblasts and some cells of the myeloid series, mostly myeloblasts and neutrophil promyelocytes with abundant azurophilic granules.

When seen in the out-patient clinic on 4/19/66, the spleen was palpable for the first time; WBC 3000/mm^3 with neutrophils 74%, lymphocytes 16%, monocytes 2%, metamyelocytes 4%, myelocytes 3%, myeloblasts 1%; normoblasts 2%.

On second admission at the Clinica del Lavoro (5/25/66–7/30/66), the laboratory findings showed an accentuation of the anaemia, an increase of immature cells in the peripheral blood (10% of 3000 WBC/mm^3), low platelet count (48,000/mm^3). The bone marrow at sternal puncture on 6/13/66, was rather scanty;

*Supported by PHS Grant No. OH-00263-01.

Table 1.

Date	Hb (g/100 ml)	WBC /mm³	Myelo-blasts %	LAP	Sample	Distribution of chromosome counts						Total counts
						⩽43	44–45	46	47	48–51	~tetra-ploid	
12/20/65	9	5000	0		PBlc	6	17	124	3			150
2/21/66	8·9	2600	0		BM	3	3	10	6			22
4/19/66	7·5	3500	1	10	PBlc	2	5	24	1			32
6/ 1/66	5	3000	10	168	PB	2	1	3*	11	3		20
6/13/66					BM	2		1*	11	5		19
7/28/66	12	3000	7	101	PB				2		1	3
9/ 5/66	8	10,000	16	108	PB		4	2*	11		1	18
11/12/66	5	10,000	17	90	PB	1		2*	26	1	2	32
3/ 7/67	4·3	10,000	18	80	PB		2	1*	25			28

LAP: Leucocyte alkaline phosphatase.
BM: Bone marrow, direct preparation.
* Pseudodiploid cells.
PBlc: peripheral blood, lymphocyte culture.
PB: peripheral blood, direct preparation.

the differential count showed an increase of cells of the myeloid series, some of which with atypical features; the rare cells of the erythroid series were mostly of basophilic type.

During further observation as an out-patient, a progressive enlargement of liver and spleen was noted. The anaemia was always severe, the WBC counts varied between 6000 and 24,000/mm³ with 15–18% myeloblasts.

During the third admission at the Clinica del Lavoro (11/7/66–11/25/66) and the clinical check-ups in the next months, the patient complained of fever and showed a progressive spleen enlargement. The Hb and RBC values decreased progressively, despite the treatment with transfusions; the WBC counts were around 10,000/mm³ with 18–20% myeloblasts.

From 3/3/67 to 3/30/67 the patient was admitted for the fourth time at the Clinica del Lavoro in a very poor condition. She presented mycosis of the oral cavity, hyperpyrexia and bloody sputum. The chest X-ray showed numerous infiltrates, which were interpreted as leukaemic infiltrates. The patient wished to be discharged despite her severe condition and died at home on April 7, 1967. No autopsy was performed.

During the whole course of her illness, the patient was treated only with transfusions, corticosteroids, antibiotics and vitamins.

Material and methods. From December 1965 to March 1967 several cytogenetic studies were performed, at first on peripheral blood lymphocyte cultures, then on direct preparations of bone marrow and peripheral blood (Table 1). The lymphocytes from peripheral blood were cultured *in vitro* for 72 hr in the presence of phytohaemoagglutinin according to a slight modification of the method of Moorhead *et al.* [4]. The direct preparations of bone marrow and of peripheral blood with immature cells were performed according to a modification of the method of Punturieri [5]; the Colcemid treatment lasted 45 min for the bone marrow and 1½ hr for the peripheral blood. Direct chromosome counts were performed. Most metaphases from direct preparations of bone marrow and peripheral blood were also karyotyped.

The leucocyte alkaline phosphatase was determined according to the histochemical score of Kaplow [6].

Chromosome studies. The results of chromosome counts are summarized in Table 1, together with some blood data at the time of study. The first study was performed on peripheral blood lymphocytes. The preparations were very rich in transformed lymphocytes and mitoses, and the counts were performed on 150 elements. Of these cells, 4 showed chromatid aberrations (gaps), 5 showed unstable chromosome aberrations (acentric fragments, dicentric chromosomes) with a total of 8 calculated breaks. One cell with 46 chromosomes showed an abnormal karyotype, due to translocation of part of the long arm of one C and one G chromosome on a chromosome of the D group; the deleted chromosome of the G group was similar to the Ph¹ chromosome. Three cells had 47 chromosomes; the extra chromosome was a large submetacentric not classifiable in one cell, an acrocentric of intermediate size between those of the D and those of the G group in another cell; in one more cell the extra chromosome was a submetacentric approximately of the size of pairs 17–18 and one chromosome of the G group had deleted long arms and was similar to Ph¹.

In February 1966, when the patient was

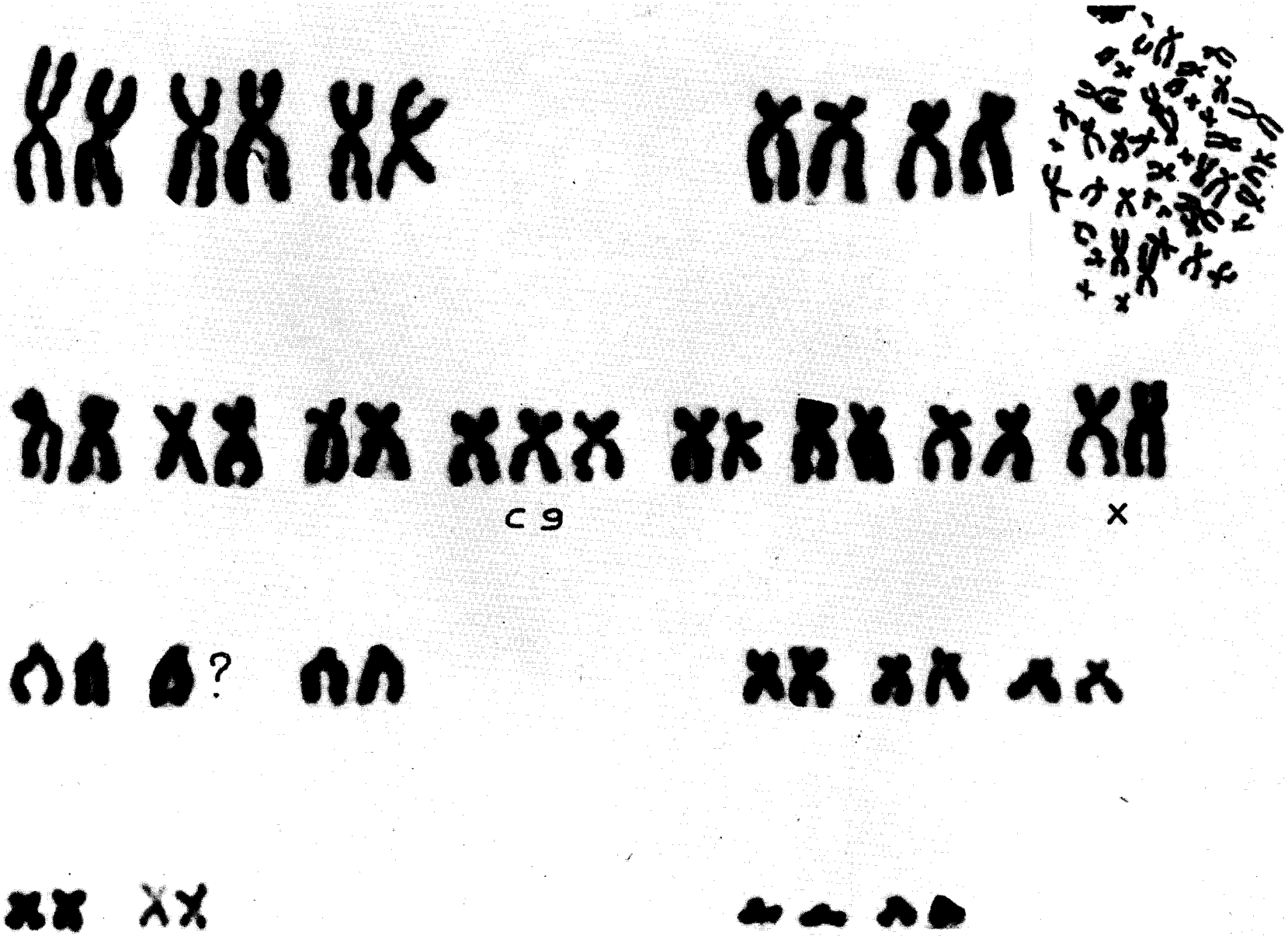


Fig. 1. *Pseudodiploid cell with one extra chromosome in group C and one missing chromosome in group D. The extra chromosome has an evident secondary constriction and is indistinguishable from those of pair* 9.

(to face p. 252)

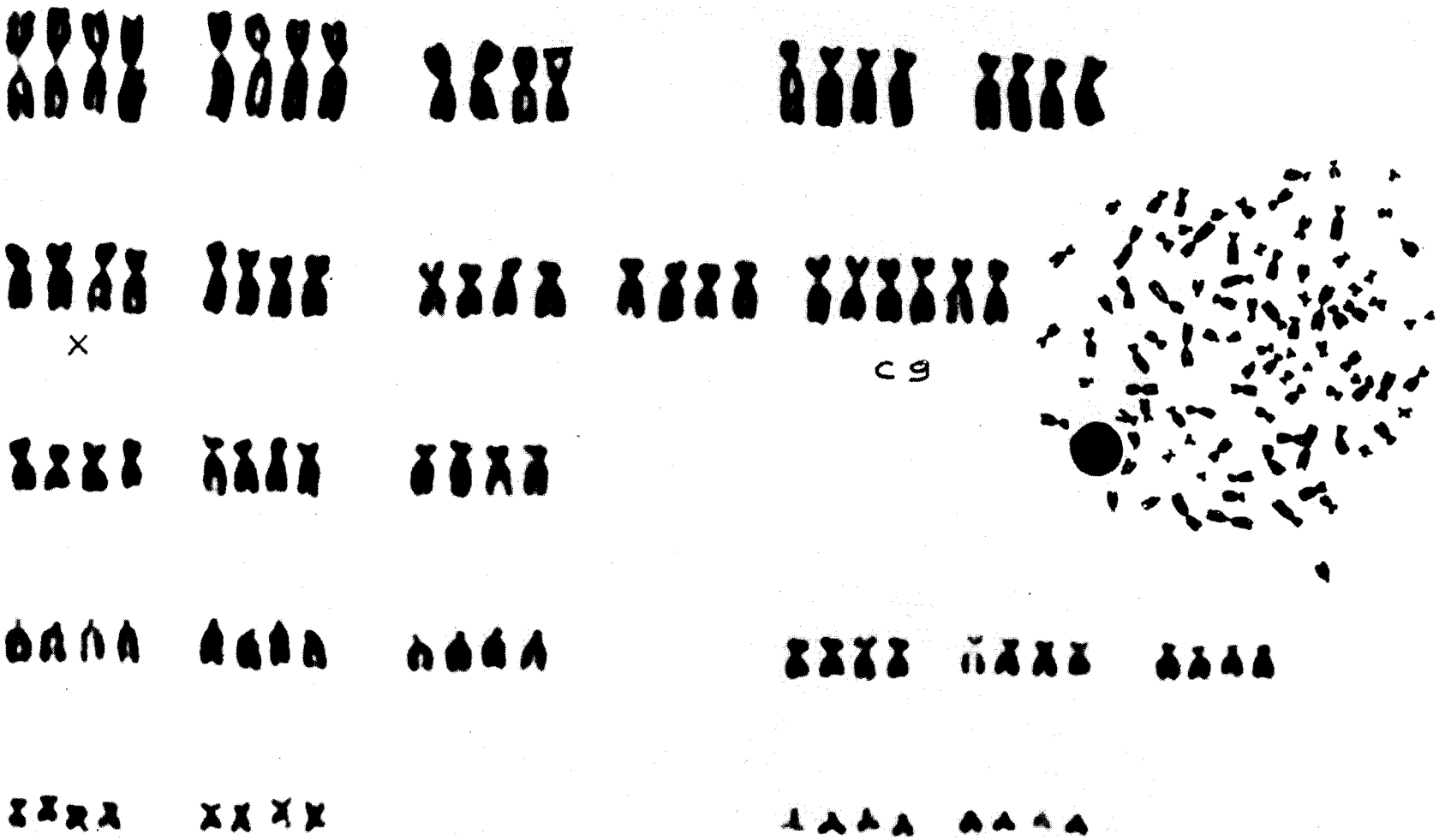


Fig. 2. Cell with 94 chromosomes. Six chromosomes of group C have an evident secondary constriction.

anaemic and leucopenic, still with no immature cells in the peripheral blood, one cell with 46 chromosomes presented an abnormally long acrocentric chromosome in a direct preparation of bone marrow. Six out of 22 cells had 47 chromosomes. In 4 analyzed cells with 47 chromosomes, the extra chromosome was similar to one of the C group in one cell, to those of pair 16 in one cell, to those of the F group in one cell and to those of the G group in one more cell.

In April 1966, when for the first time immature cells appeared in the peripheral blood, no mitoses were seen in direct preparations of peripheral blood. In lymphocytes cultured for 72 hr with PHA, 2 out of 32 cells (one with 47 chromosomes) showed unstable chromosome aberrations, and 2 metaphases with 46 chromosomes had an abnormal karyotype due to deletions and translocations. The leucocyte alkaline phosphatase (LAP) score was low.

In June 1966 the patient had still low blood counts with 10% myeloblasts in the peripheral blood. The chromosome counts on direct preparations of peripheral blood and bone marrow showed a modal number of 47 in 22 out of 39 metaphases. Most cells with 47 chromosomes had an extra chromosome in the C group, which could not be classified further. Three cells with 48 chromosomes had an extra chromosome in the C group and one in the G group; another cell had an extra C and an extra D chromosome. One cell with 49 chromosomes had an extra chromosome in the C, D, E groups, and one had 2 extra C and one extra G. Another cell with 49 chromosomes had 4 extra chromosomes in the C group and one missing of pair 2. One cell with 51 chromosomes had one missing chromosome in the C group, one extra chromosome in the D group, 3 extra chromosomes in the G group and 2 "minute". The cells with 46 chromosomes were pseudodiploid with an extra C and one missing chromosome in another group, mostly G.

In further chromosome studies, the same pattern of group C trisomy was constant in cells with 47 chromosomes, except for 2 cells with an extra G. Cells with 46 chromosomes were pseudodiploid due to the presence of an extra C and one missing chromosome of another group. Of interest was the appearance after July 1966 of occasional near-tetraploid cells; this fact coincided with the appearance in peripheral blood smears of some binucleated cells of the myeloid series, both immature and mature. In occasional cells the extra chromosome could be classified as C 9, due to the presence of 3 chromosomes of the same length with evident secondary constriction in group C (Fig. 1). This was particularly clear in a metaphase with 94 chromosomes, in which 6 chromosomes of the C group showed the secondary constriction (Fig. 2).

DISCUSSION

In the case described here, a leukaemia occurred after a long-standing hyporegenerative anaemia from chronic exposure to benzene for occupational reasons. On the first and third chromosome studies, the patient's lymphocytes cultured *in vitro* with PHA showed a high rate of chromosome abnormalities. Chromosome changes in people with benzene haemopathy have been described before [7, 8]. Also subjects who have recovered from benzene haemopathy [9] and subjects exposed to benzene without signs of toxicity [9, 10] show a high rate of chromosome aberrations both of the unstable and of the stable type in their lymphocytes. It seems therefore that chromosome changes in lymphocytes may be an indicator of exposure to the toxic agent, provided the exposure to radiation and to cytotoxic drugs may be ruled out.

Of interest is the fact that in the present case manifold chromosome changes were present in the bone marrow before the onset of leukaemia. The cells with 47 chromosomes showed different karyotypes. Cells with abnormal karyotypes had been observed also in people with past benzene haemopathy, apparently recovered both from the clinical and the haematological point of view [9].

After the onset of leukaemia, the leukaemic cells both in the bone marrow and in the peripheral blood showed a stable abnormal karyotype with a C group trisomy. The extra chromosome could sometimes be identified as belonging to pair 9. The problem of the relationship of group C trisomy and leukaemia or leukaemoid reactions is an actual one. Several reports have been published of group C trisomy in acute myeloblastic leukaemia, blastic crisis of chronic myelogenous leukaemia and myeloproliferative disorders with leukaemoid reaction [11, 12] (see review of the literature in [13]). As suggested by Sandberg [13], the development of a clone with C 9 trisomy might really play a role in the onset of leukaemia. The findings in our case seem to support this hypothesis.

The occasional cells with 46 and 48 chromosomes with one missing or one extra chromosome in other groups (mostly D and G) and C trisomy, might be part of clones resulting from

abnormal chromosome distribution during mitosis in the leukaemic cells.

The development of the leukaemic phase was accompanied in our case by the finding of a high leukocyte alkaline phosphatase level. This fact does not seem to be related to the C 9 trisomy, since also cases with C trisomy and low granulocyte alkaline phosphatase have been described [12]. The fact that in our case a high score of leucocyte alkaline phosphatase was first found at a time of an infectious complication might be of interest.

As for the mechanism of induction of leukaemia by benzene, one can suggest the hypothesis that multiple chromosome aberrations might be produced by the toxic agent on bone marrow cells, resulting in cells with abnormal chromosome complement. If the abnormal cells are able to undergo mitotic division, different clones may develop, one of which might eventually become predominant due to selective advantage and become the leukaemic clone. This seems to have happened in the case described. It is possible that a benign course of benzene haemopathy might occur, when there is no formation of potentially leukaemic clones. On the other side, the toxic action of benzene on the lymphocyte population might play a role in the development of leukaemia, by affecting the potentiality of the immune system.

RESUME

Un cas d'anémie due au benzène, évoluant vers la leucémie aiguë myéloblastique, après une longue période de latence, a été contrôlé par de multiples analyses cytogénétiques. Au moment où le patient présentait une anémie sévère, une moelle aplastique, et une absence totale de leucocytes immatures dans le sang périphérique, de nombreuses aberrations chromosomiques "stables" et "instables" furent observées dans les lymphocytes des cultures de sang. Quelques mois plus tard, toujours en l'absence de formes immatures dans le sang, de nombreuses cellules à 47 chromosomes furent mises en évidence par l'examen direct de la moelle osseuse. Les cellules hyperdiploïdes appartenaient à des clones différents, le chromosomes supplémentaire ressemblant soit à un chromosome du groupe C, soit à un chromosome des groupes F ou G. Au moment où des myéloblastes apparaissaient dans le sang, toutes les cellules à 47 chromosomes, tant par l'examen direct de la moelle que par la culture du sang, montraient le même caryotype, avec un chromosome supplémentaire du groupe C. Quelques cellules avaient plus de 47 chromosomes. Les auteurs émettent l'hypothèse que les cellules avec différentes aberrations chromosomiques induites par le benzène peuvent être à l'origine de clones anormaux. L'un de ceux-ci pourrait devenir leucémique et supplanter les autres par un processus de sélection.

SUMMARY

A case of benzene anaemia evolving into acute myeloblastic leukaemia after a long latent period was followed up by multiple cytogenetic studies. At a time when the patient showed severe anaemia, aplastic bone marrow, no immature leucocytes in the peripheral blood a high rate of "unstable" and "stable" chromosome aberrations was found in cultured peripheral blood lymphocytes. A few months later, still in the absence of immature leucocytes in the peripheral blood, numerous cells with 47 chromosomes were detected in a direct preparation of bone marrow. The hyperdiploid cells belonged to different clones, the extra chromosome being similar at times to one of the C groups, at times to one of the F or G groups. When myeloblasts appeared in the peripheral blood, all cells with 47 chromosomes in direct preparations of bone marrow and peripheral blood showed the same karyotype with an extra chromosome in the C group; occasional cells with more than 47 chromosomes were also observed. The hypothesis is suggested that cells with different chromosome alterations induced by benzene may give origin to abnormal clones. One of these might become the leukaemic clone by selective advantage.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Fall von Benzolanämie, der nach einer langen Latenzperiode in eine akute Myeloblastenleukämie umschlug, wurde mit Hilfe zahlreicher zytogenetischer Untersuchungen verfolgt. Zu einer Zeit, als der Patient eine schwere Anämie, ein aplastisches Knochenmark und keine unreifen Leukozyten im peripheren Blut hatte, wurde eine hohe Rate von stabilen und unstabilen Chromosomenaberrationen in Kulturen von peripheren Lymphozyten

gefunden. Einige Monate später, immer noch beim Fehlen unreifer Leukozyten im peripheren Blut, konnten in einem direkten Knochenmarkspräparat zahlreiche Zellen mit 47 Chromosomen gefunden werden. Die hyperdiploiden Zellen gehörten verschiedenen Klonen an. Die Extrachromosomen waren einmal denen der C-Gruppe, wieder andere Male denen der F- oder G-Gruppe ähnlich. Als Myeloblasten im peripheren Blut auftauchten, zeigten alle Zellen mit 47 Chromosomen, die in direkten Präparaten von Knochenmark und peripheren Blut gefunden wurden, den gleichen Kerntyp mit einem Extrachromosom in der C-Gruppe. Gelegentlich wurden auch Zellen mit mehr als 47 Chromosomen gefunden. Es wird die Hypothese vorgeschlagen, daß Zellen mit verschiedenen Chromosomenveränderungen, die durch Benzol ausgelöst sind, zum Ursprung abnormer Klonen werden können. Einer von diesen könnte der leukämische Klonus werden aufgrund von Selektionsvorteilen.

REFERENCES

1. E. P. Cronkite, Evidence for radiation and chemicals as leukemogenic agents. *Arch. environm. Hlth* **3,** 297–303 (1961).
2. S. Maugeri, R. Colombi, G. Pollini, E. Strosselli and R. Corsico, Caratteristiche ed evoluzione dell'emopatia benzolica. *Med. d. Lavoro* **56,** 554–560 (1965).
3. E. C. Vigliani and G. Saita, Benzene and leukemia. *New Engl. J. Med.* **271,** 872–876 (1964).
4. P. S. Moorhead, P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips and D. A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20,** 613–616 (1960).
5. E. Punturieri, Metodo diretto per la preparazione cromosomica dal midollo umano. *Haematologica* **49,** 488–494 (1964).
6. L. S. Kaplow, A histochemical procedure for localizing and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* **10,** 1023–1029 (1955).
7. G. Pollini and R. Colombi, Il danno cromosomico midollare nell'anemia aplastica benzolica. *Med. d. Lavoro* **55,** 241–255 (1964).
8. G. Pollini and R. Colombi, Il danno cromosomico dei linfociti nell'emopatia benzenica. *Med. d. Lavoro* **55,** 641–654 (1964).
9. A. Forni, Chromosome changes due to chronic exposure to benzene. *Proc. XV Int. Congr. Occupational Hlth,* II/1 pp. 437–439. Vienna (1966).
10. I. M. Tough and W. M. Court Brown, Chromosome aberrations and exposure to ambient benzene. *Lancet* **i,** 684–684 (1965).
11. A. A. Sandberg, T. Ishihara and L. H. Crosswhite, Group-C Trisomy in myeloid metaplasia with possible leukemia. *Blood* **24,** 716–725 (1964).
12. A. Winkelstein, R. S. Sparkes and C. G. Craddock, Trisomy of group C in a myeloproliferative disorder. Report of case. *Blood* **27,** 722–733 (1966).
13. A. A. Sandberg, The chromosomes and causation of human cancer and leukaemia. *Cancer Res.* **26,** part I, 2064–2081 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 257–262. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Studies on the Dynamics of Heteroploid Cell Populations*

L. DE CARLI and F. NUZZO
Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica
Pavia Section, Italy

THE ESTABLISHED human cell lines present some features in common with neoplastic cell populations, the most outstanding being uncontrolled growth and heteroploidy. For this reason the process of "stabilization" is frequently referred to as malignant transformation. The determination of such a phenomenon is largely unknown, except for those cases in which the transformation is induced by an identified viral agent such as Simian Virus 40 (SV 40) [1]. Therefore, the heteroploid cell lines are scarcely, if at all, informative for the question of the origin of malignancy, but they can provide useful models for the interpretation of the dynamics of aneuploid cell populations which frequently occur in tumours. The study of karyotype variation *in vitro* may elucidate some mechanisms which are involved in the maintenance and progression of tumours. In view of this, the phenomena to be analyzed in the heteroploid cell populations are essentially two: (a) the chromosomal changes which manifest themselves in successive cell generations both at the level of massive cultures and of clonal progenies; (b) the adaptative value of different karyotypes. These features can be analyzed both under normal culture conditions, when the karyotypic changes occur spontaneously, and under conditions of artificial selection. In the present paper one example for each of these conditions will be presented. The first one illustrates the spontaneous dynamics of specific karyotypes in a heteroploid cell population, while the second shows the karyotypic changes induced by 8-azaguanine in the same cell population continuously grown in the presence of the base analogue.

From a methodological point of view the above studies can be approached in two ways:

(1) Directly, by performing the chromosomal analysis on samples or cells taken from the massive population of from cultures of clonal origin. In any case, the analysis has to be limited to numerical changes.

(2) Indirectly, by following the distribution of a certain character, for which a strict association with a specific karyotype can be established. This latter method allows a more rapid and extensive analysis.

In our investigations both methods are exploited in combination. The strain on which the population studies have been carried out is the EUE (human embrionic epithelium), which has been maintained in our laboratory under standard conditions for many years. The trace character used in combination with the chromosome analyses is the alkaline phosphatase (AP) deficiency which has been

*This work was supported by a grant from Euratom-CNR-CNEN Contract No. 012-61-12 BIAI.

found associated with a loss of chromosomes in the G group [2]. The enzyme can easily be revealed at a single cell level or on colonies of clonal origin by a simple histochemical staining reaction [3] (Fig. 1).

The first instance we are referring to, concerns studies on the dynamics of alkaline phosphatase character in the EUE line and in its clones with low activity. The parental non-selected cell line exhibits a high level of AP and its chromosomal constitution has been studied in successive years.

Clones with low AP levels have been derived from this line and also analyzed for their chromosomal distributions. The results are reported in Tables 1 and 2. As can be seen, the distribution of chromosome numbers of the EUE parental lines has remained about constant during a 3-year period. On the other hand, a significant difference in the chromosomal distribution between the parental strain and its clones with low AP can be observed. The frequency of AP- cells (cells with low levels of AP) in the EUE population levels) and AP- colonies in repeated platings [4]. The frequency of AP- cells in the unselected EUE population has been found consistently in the order of 10^{-2}. Small fluctuations around this figure have been found during a 3-year period. The studies on the clonal distribution of the AP- character have shown that there are essentially two types of negative lineages: one which constantly produces negative cells and shows a remarkable stability, and another which continuously produces both positive and negative cells. Sometimes this segregation is evident also at the level of fifteen-days-old colonies from single cells (Fig. 2).

The parental line, with modal number of chromosomes of 63–64 and its clones with low activity and modal number of chromosomes of 53–55, have been also characterized for their growing capacity and efficiency of plating. It was found that all the clones with low activity and with a reduced number of chromosomes have a growth rate and a plating efficiency lower than that of the parental strain at different times of culture, and the transmission of the deficiency throughout successive cell generations, have been studied by determining the proportion of AP+ (high enzymic and clones with high AP activity. The values for generation time ranged from 26 to 28 hr for the AP- lines and from 21 to 23 hr for the parental strain and clones with high AP.

Table 1. Distribution of chromosome numbers in the EUE line

Years	Number of chromosomes										Total number of mitoses
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	
1965	1	1	13	19	[34]	7	3	3	—	2	83
1966	3	2	12	35	[42]	13	—	—	—	—	107
1967	6	3	12	[41]	28	7	1	—	—	—	98

Table 2. Distribution of chromosome numbers in AP- clones from the EUE line

AP- clones		Number of chromosomes								Total number of mitoses
		50	51	52	53	54	55	56	57	
E6D	(1966)	—	2	1	9	32	[41]	4	3	92
$E6D_{29}$	(1966)	3	10	16	[26]	23	4	5	—	87
E6D	(1967)	3	3	4	21	[41]	7	7	4	g0

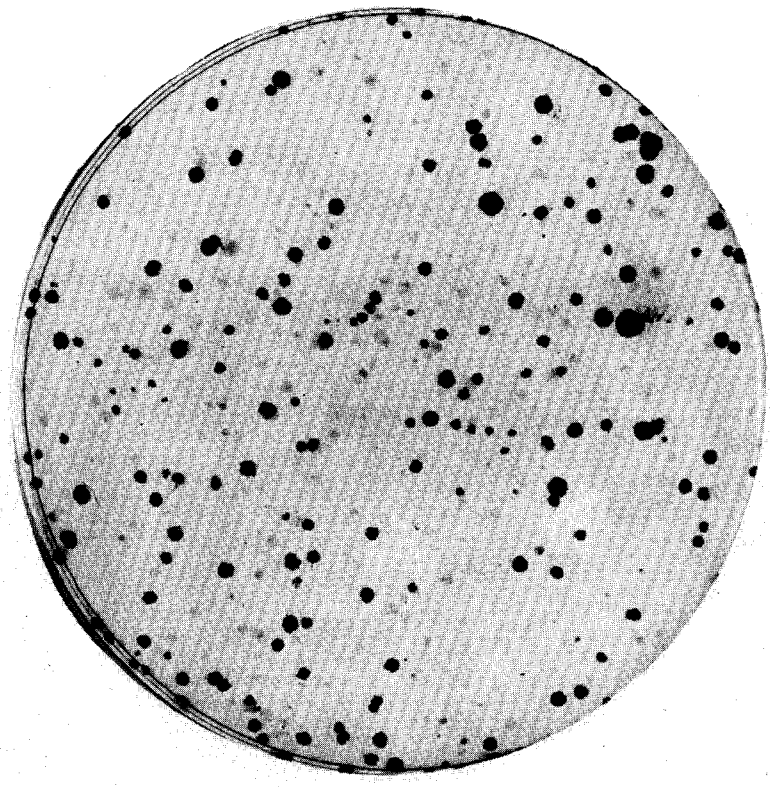


Fig. 1. *EUE clones stained for alkaline phosphatase. Histochemical reaction performed with* para-*nitrophenylphosphate coupled to fast blue RR. The negative colonies are visualized with acridine orange as a counterstain and appear paler than the positive ones.*

(to face p. 258)

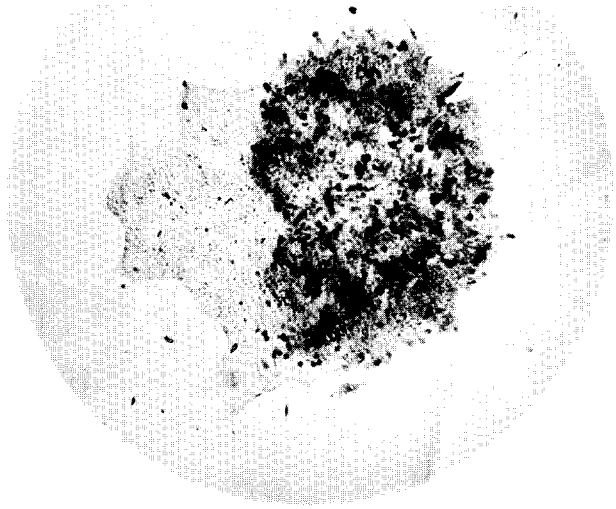


Fig. 2. *An EUE colony segregating for the AP character.* Para-*nitrophenylphosphate coupled to fast blue RR used as histochemical staining.*

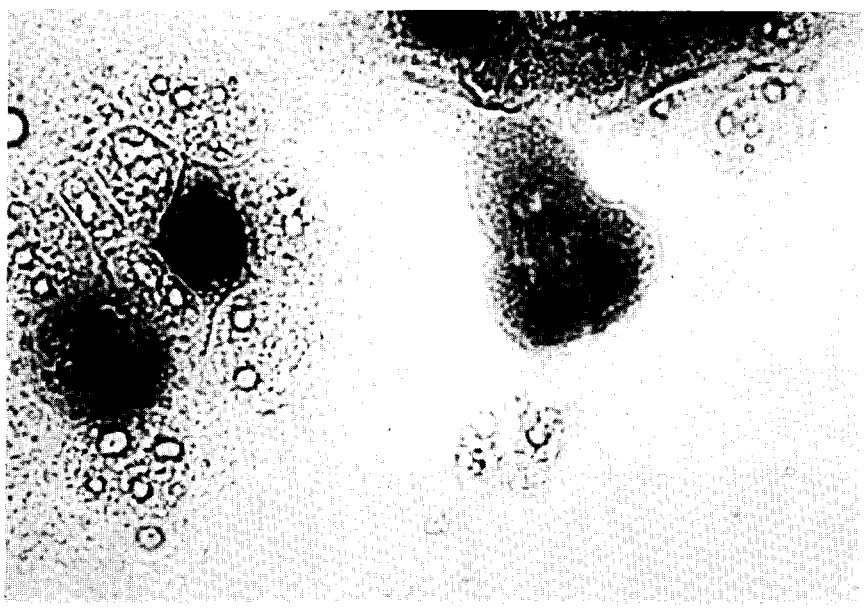


Fig. 4. *A multipolar mitoses observed in a EUE culture treated with* 8-*azaguanine.*

The plating efficiencies were 40 to 60% and 50 to 80%, respectively.

Competition experiments have been carried out between AP+ and AP- cells on artificial mixtures of the two types of cells. The purpose of these experiments was to study the adaptative values of the two karyotypes associated with the enzymic variation. The results of a typical experiment are shown in Fig. 3.

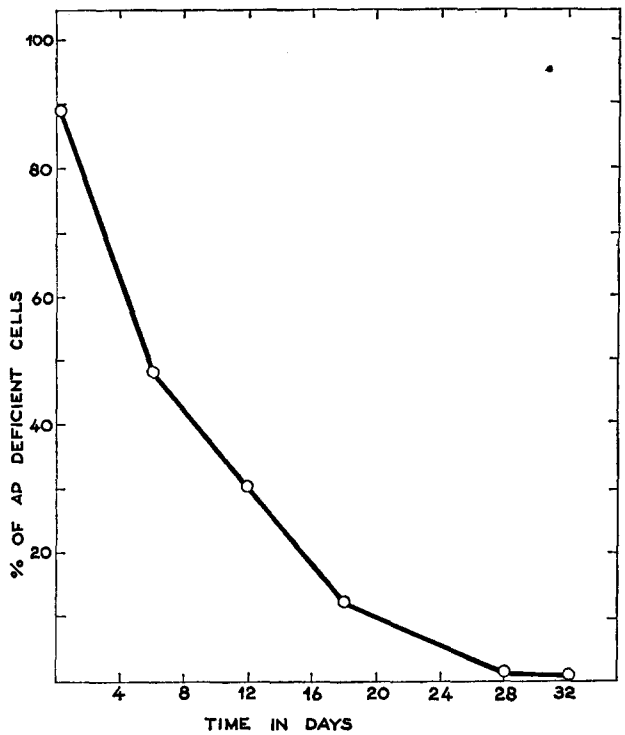


Fig. 3. Relative proportions of AP deficient cells in successive cultures of a mixed AP+ *and* AP- *cell population. The two types of cells were artificially mixed in a proportion of* 1 : 10, *respectively. The total inoculum per bottle was* 10^5 *cells. The cultures were continuously grown under standard conditions. At the times corresponding to the points of this graph the cultures were trypsinized and samples of cells were taken and scored for* AP *activity using the histochemical staining reaction. Subcultures were made each time with the initial inoculum.*

These data demonstrate that the AP- cells are at a selective disadvantage in respect to the positive ones, due to their lower growth rate. In fact, in a 1 : 10 mixture of EUE AP+ and AP- cells, the frequency of this latter type rapidly drops down to the equilibrium value. It is therefore necessary to assume a high frequency of transformation from AP+ to AP- cells in order to account for the constant frequency, around 1% values, of the AP- cells observed in the EUE population. In cytological terms, this corresponds to assuming a high rate of production of karotypes with a reduced number of chromosomes.

Chromosomal dynamics under conditions of artificial selection created by 8-azaguanine

The distribution of chromosome numbers in a heteroploid cell population can be influenced by various environmental factors. For example, the culture conditions, and especially the nutritive media, are known to determine changes in the modal number of chromosomes (De Carli, unpublished data). These changes, however, are of small entity and usually occur at a very slow rate. More dramatic changes can be induced by specific agents such as 8-azaguanine. Prolonged treatment in the presence of this base analogue results in a significant reduction of chromosome number. Parallel to this reduction a marked increase of the frequency of AP- cells has been observed, as expected on the basis of the established correlation between the enzyme levels and chromosome numbers [5]. Table 3 shows the distribution of number of chromosomes in two EUE sublines selected at 10 γ/ml and 100 γ/ml of 8-azaguanine, respectively. The chromosomal changes may be due either to an induction of chromosome losses or to a selection for karyotypes with a lower number of chromosomes. From what is known about the mechanisms of resistance of mammalian cultured cells to 8-azaguanine [6], the second possibility seemed the most likely. In fact, the capacity of

cells to survive in the presence of the analogue has been attributed to the loss of an enzymic function, the IMP-pyrophosphorylase. A reduction in chromosome numbers may lead to a reduced dosage of genes controlling the production of this enzyme. An alternative explanation of the selective advantage of cells with lower number of chromosomes might be that, as shown previously, such cells have a lower growth rate and therefore, incorporate the analogue at a slower rate; this would make them less sensitive. However, a careful analysis of the kinetics of the effect of 8-azaguanine on the treated cultures has drawn attention to the possible role of the analogue in provoking the chromosomal changes in addition to its selective action. It has been noted that one of the first visible cytological effects is the induction of polyploids. These polyploids either degenerate or undergo multipolar mitoses (Fig. 4). The frequency of multipolar mitoses in cultures under normal conditions is less than 3%, but in treated cultures it is increased by about 5 fold (Table 4).

be eliminated and only those carrying the IMP-pyrophosphorylase deficiency would be preserved, presumably because they have lost a number of chromosomes. This dual action of 8-azaguanine requires further controls on different cell lines selected in the presence the analogue. Should the hypothesis be true, one would expect that 8-azaguanine has a similar effect on diploid or quasi-diploid cell strains by increasing the rate of aneuploidy; experiments are in progress to test this possibility.

Table 3. *Distribution of chromosome numbers in the EUE line and in two sublines resistant to* 10 γ/ml (*EUE AZA*^{r10}) *and to* 100 γ/ml (*EUE AZA*^{r100}) *of* 8-*azaguanine*

EUE lines	Number of chromosomes											Total number of mitoses
	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
EUE	—	—	—	—	—	3	2	12	35	[42]	13	107
EUE AZA^{r10}	—	2	2	4	7	18	[23]	15	7	—	4	82
EUE AXA^{r100}	1	4	8	7	[31]	26	7	—	—	—	—	84

CONCLUSIONS

We have hitherto considered two examples of either spontaneous and induced variation in the distribution of chromosomal numbers in a heteroploid cell line. The following conclusions can be drawn from the assembled data. If the karyotypic changes associated with alkaline phosphatase variation are to be considered as representative of the dynamics of the chromosomal complements of the whole EUE population, this would consist of a mixture of both relatively stable and unstable karyotypes. The first case is represented by the pure AP$^-$ lines, the second by the lines continuously segregating for the same character, both having a reduced chromosome complement. Under standard culture conditions, an equilibrium may be reached which depends on

Table 4. *Types of mitotic figures in the EUE line and in a subline resistant to* 8-*azaguanine*

	Number of mitoses				% of multipolar mitoses
	Normal	Poliploid	Multipolar	Abnormal*	
EUE	96	5	3	1	2·86
AZA^r	54	20	14	12	14·00

*Bridges, chromosome lagging.

In these mitoses, the chromosome distribution at anaphase is rarely proportionate, and therefore, it is likely that abnormal divisions result in an increased variability of the chromosome complements. However, in the presence of 8-azaguanine, most of the karyotypes would

the selective advantage of certain karyotypes on one hand, and on the frequency of conversion from one karyotype to another on the other hand. In order for this equilibrium to be maintained stable, one has to assume a very active chromosomal dynamics, which cannot be explained by the accumulation of mitotic errors involving single chromosomes alone. The chromosomal segregation following multipolar mitoses in polyploid cells provides an adequate mechanism, by virtue of which whole sets of chromosomes can be lost or gained in one step. The frequency of these events, which determine the chromosomal segregation, can be increased by virtually any agent able to increase the rate of polyploidy. The possibility of cellular fusions, either spontaneous or mediated by certain viruses [7, 8] has also to be taken into account. The introduction of new chromosomal combinations in the aneuploid population may create different conditions of equilibrium between karyotypes which might be eventually influenced by the same agent which induced segregation; this latter seems to be the case of 8-azaguanine. At the present stage of knowledge there is no means of ascertaining how broad these conclusions apply to the malignancy *in vivo*. However, it appears reasonable to think that at least some of the above mechanisms are operative in the tumour cell populations either spontaneously evolving or under selective pressures determined by various therapeutic agents.

RESUME

Les lignées de cellules hétéroploïdes peuvent fournir des modèles utiles pour l'étude de la dynamique des populations de cellules aneuploïdes qui sont fréquemment observées dans les tumeurs. Deux faits importants sont à considérer dans l'analyse des populations de cellules aneuploïdes: les modifications chromosomiques et les processus de sélection. Deux méthodes différentes sont employées pour l'étude de ces problèmes. La première consiste en l'analyse de la distribution clonale de caractères cellulaires qui peuvent être utilisés comme des marqueurs pour leur association avec des modifications spécifiques du caryotype. La seconde consiste en l'induction de modifications chromosomiques à l'aide de divers agents, dont la 8-azaguanine, et la sélection pour certains variants chromosomiques. Un exemple de chacune de ces méthodes est présenté.

SUMMARY

The heteroploid cell lines may provide useful models for studying the dynamics of aneuploid cells populations which are frequently observed in tumours. Two important features to be analyzed in heteroploid cells populations are: chromosomal changes and selection processes. Two different methods are being used for investigating these problems: the first consists of analyzing the clonal distribution of cell characters which may be used as markers for their association with specific karyotypic changes. The second method consists of inducing chromosomal changes with various agents including 8-azaguanine and selecting for certain chromosomal variants. One example for each of these methods is given.

ZUSAMMENFASSUNG

Die heteroploiden Zellstämme können nützliche Modelle liefern für die Untersuchung der Dynamik von aneuploiden Zellpopulationen, wie sie häufig in Tumoren angetroffen werden. Die beiden wichtigen Gesichtspunkte, die in heteroploiden Zellpopulationen betrachtet werden sollten, sind:
Chromosomenveränderungen und Selektionsprozesse.
Zwei verschiedene Methoden werden angewendet, um diese Probleme zu untersuchen. Die erste besteht aus einer Analyse der Klonen Verteilung von Zellcharakteristiken, die als Marken für ihre Assoziation mit spezifischen Veränderungen des Karyotyps verwendet werden können.
Die zweite Methode besteht in der Induzierung von Chromosomenveränderungen mit verschiedenen Agentien, unter anderem 8-Azaguanin und einer Selektion für bestimmte Chromosomenvarianten. Ein Beispiel für jede dieser Methoden wird angeführt.

REFERENCES

1. H. Koprowski, J. A. Ponten, F. Jensen, R. G. Ravdin, P. Moorhead and E. Saksela, Transformation of cultures of human tissue infected with simian virus SV_{40}. *J. cell. comp. Physiol.* **59,** 281 (1962).
2. L. De Carli, J. J. Maio and F. Nuzzo, Alkaline phosphatase activity and chromosome variation in human cells in culture. *J. nat. Cancer Inst.* **31,** 1501 (1963).
3. J. J. Maio and L. De Carli, The use of chromogenic reactions for the study of enzymic markers in populations of mammalian cells cultured *in vitro*. *Cytogenetics* **1,** 353 (1962).
4. L. De Carli, F. Nuzzo, A. S. Santachiara-Benerecetti and J. Morrow, Karyotypes of human cultured cell clones and their alkaline phosphatase activity, *Conference on Leukocytes Chemistry and Morphology Correlated with Chromosome Anomalies*, New York, November 3–5 (1966).
5. L. De Carli, J. K. Morrow and F. Tredici, Effetto del trattamento con 8-azaguanina sulla frequenza di varianti per la fosfatasi alcalina in un ceppo cellulare umano. *Atti Ass. Genet. It.* **12,** 178 (1967).
6. J. W. Littlefield, Three degrees of guanylic-inosinic acid pyrophosphorylase deficiency in mouse fibroblasts. *Nature (Lond.)* **203,** 1142 (1964).
7. B. Ephrussi and S. Sorieul, Mating of somatic cells *in vitro*. In *Genetic Analysis of Mammalian Cells*. Edited by D. Merchant and J. V. Neel. p. 81–97. University of Michigan Press (1962).
8. H. Harris and J. F. Watkins, Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature (Lond.)* **205,** 640 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 263–277. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Chromosome Studies in 36 Gynaecological Tumours: of the Cervix, Corpus Uteri, Ovary, Vagina and Vulva

RESA WAKONIG-VAARTAJA* and D. TOWNSLEY HUGHES

Department of Cytogenetics, The Chester Beatty Research Institute
Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital
Fulham Road, London

THE STUDY of chromosomes in human cancer cells was rejuvenated by the use of improved cytological techniques, especially after Tjio and Levan's discovery in 1956 that the normal somatic human chromosome number is 46 [1–6].

The great variation in histopathological types of human tumours makes it necessary to study a large number of one type from the same site, before any chromosome pattern can be expected to characterize a tumour site. Only then may it be possible to discover whether or not there is a correlation between the chromosome constitution and other characteristics of the tumour, such as its rate of growth and response to therapy.

In this paper detailed chromosome studies are reported from 19 primary, 1 secondary and 2 recurrent carcinomas of the cervix, and from 4 primary, 1 secondary and 1 recurrent carcinoma of the corpus uteri. In addition, 3 primary carcinomas of the vagina, 1 carcinoma *in situ* of the vulva and 4 primary carcinomas of the ovary are included.

*Present address: Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, U.S.A.

Gynaecological tissues were chosen for the present study because they are easily accessible for studies before and throughout the course of therapy.

It is known that tumours, even of the same histological type, vary considerably in their radiosensitivity [7]. In order to study this problem, biopsies were taken from suitable carcinomas of the cervix for chromosome analysis during radiation treatment.

MATERIAL AND METHODS

Biopsies were taken from apparently active growing tumours avoiding necrotic and infected areas. If possible, a growing edge of tumour was selected and an adjacent fragment was taken for histological examination. The biopsies for chromosome study were immediately placed in 1% sodium citrate at 37°C for 30 min and fixed in 60% acetic acid for a minimum of 30 min. Squash preparations were made and the chromosomes counted, using a phase contrast microscope. Where possible, cells were karyotyped according to the Denver Classification [8, 9], and any deviations from the normal complement were noted.

Only good metaphases could be used for

Table 1. *Cytogenetical and histopathological data of* 31 *primary,* 2 *metastases and* 3 *recurrent gynaecological tumours*

Case No.	Age	Stage of malignancy	Histology	Primary tumour	Metatasis or recurrence	No. cells analysed (for Figs. 1–4)	Polyheteroploid assessment (%)
			CARCINOMA OF THE CERVIX				
H.118	51	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		66	6·5
H.118	51	I	Poorly differentiated squamous	Cervix	Metastasis in urethra	27	5·0
H.132	76		Poorly differentiated squamous	Cervix	Recurrence in cervix	10	6·0
H.133	39	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		26	90·7
H.137	80	II	Poorly differentiated squamous	Cervix		17	64·3
H.147	49	I	Poorly differentiated adenocarcinoma	Cervix		7	16·2
H.154	38	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		23	27·3
H.160	46	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		29	56·2
H.167	26	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		20	55·0
H.168	55	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		7	97·7
H.171	58	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		7	100·0
H.176	74	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		15	100·0
H.177	64	I	Anaplastic squamous	Cervix		2	98·9
H.186	73	II	Poorly differentiated squamous	Cervix		12	95·0
H.198	68	Ia	Adenocarcinoma	Cervix		9	43·8
H.204	37	Ib		Cervix		3	93·4
H.223	45	II	Poorly differentiated squamous	Cervix		38	91·9
H.230	67	I	Poorly differentiated squamous	Cervix		18	6·5
H.234	67		Poorly differentiated squamous	Cervix	Recurrence in cervix	52	—
H.235	53	II	Moderately well-differentiated squamous	Cervix		45	9·9
H.237	48	II	Moderately well-differentiated squamous	Cervix		8	95·8
H.242	41	—	Moderately well-differentiated squamous	Cervix		3	—
			CARCINOMA OF THE CORPUS UTERI				
H.138	75	IV	Well-differentiated papillary adenocarcinoma	Corpus uteri	—	103	96·0
H.138	75	IV			Abdominal metastasis	21	100·0
H.155	74		Mixed mesodermal tumour	Corpus uteri	—	40	93·0
H.155	74	IV			Recurrence	158	100·0
H.175	59		Moderately well-differentiated adenocarcinoma	Corpus uteri	—	26	—
H.227	75		Well-differentiated adenocarcinoma and squamous	Corpus uteri	—	64	1·5

CARCINOMA OF THE VAGINA AND VULVA							
H.196	72	Moderately well-differentiated adenocarcinoma	Vagina	—	—	54	99·3
H.215	60	Poorly differentiated squamous	Vagina	—	—	71	3·4
H.225	55	Poorly differentiated squamous	Vagina	—	—	14	98·9
H.221	68	Carcinoma *in situ*	Vulva	—	—	8	9·1
CARCINOMA OF THE OVARY							
H.74	40	Well-differentiated adenocarcinoma	Ovary	—	—	4	94·0
H.142	54	Anaplastic carcinoma (? teratoma)	Ovary	—	—	15	97·0
H.203	51	Papillary adenocarcinoma	Ovary	—	—	51	65·7
H.241	37	Poorly differentiated adenocarcinoma	Ovary	—	—	97	—

chromosome counting and analysis. However, less well spread cells could be used for estimating the percentage of polyheteroploid cells (i.e. with chromosome numbers of $3n$ and higher) by recording all consecutive mitoses. The polyheteroploid assessment method enables a large number of metaphases to be examined.

For treatment of carcinomas of the cervix, intracavitary radiotherapy was given by three uterovaginal Co^{60} insertions, at 14-day intervals. At the tumour site from which biopsies were taken for chromosomal and histological studies, the radiation dose for each insertion of Co^{60} was 5000–6000 rad. Where possible, biopsies were obtained 14 days after the first insertion. A smaller dose of 500 rad. from an external megavoltage X-ray machine was given to some patients in order to try and reveal the extent of cellular radiosensitivity. Biopsies were taken 18, 52 and 72 hr after an exposure in order to study chromosome damage when the irradiated cells came into division.

RESULTS

Cytogenetical observations on 19 primary, 1 metastasis and 2 recurrent carcinomas of the cervix uteri are given in Table 1 and illustrated in Fig. 1. Five cases are of particular interest because of the modes in their chromosome number distribution. In the primary tumour of H.118, in which 66 cells were counted, 19 had 44 chromosomes (29%) and 21 cells had 46 chromosomes (32%). It was only possible to analyse karyotypes in 4 cells and these are shown in Table 2. The patient then received three consecutive insertions of Co^{60}, but returned with metastasis near the urethra, 5 months after the original diagnosis. The chromosome count of this metastasis showed a similar range to that found in the primary tumour.

The second case of interest was H.160 and this showed a major range of 59 to 62 chromosomes, with a probable mode at 60. Another case, H.234, was a recurrent carcinoma of the cervix, the primary having occurred 27 years earlier. This recurrence had an unusual mode of 46 chromosomes (27%). A total of 52 cells was counted, and karyotypes of 6 of these are shown in Table 2. Furthermore 2 cases had hypodiploid modes: H.235 at 40 (24%) and H.154 at 41 (65%).

In the remaining 17 cases the chromosome counts were distributed over a wide range with no indication of any definite mode. Randomly

Table 2. Karyotypes from cells of seven carcinomas of the cervix (H.113, 118, 133, 154, 186, 223 *and* 234) *and one carcinoma of the corpus uteri* (H.138)

Case No.	Chromosome No.	Chromosome distribution in groups									
		1	2	3	4–5	X, 6–12	13–15	16	17–18	19–20	21–22
H.113	46	2	1	2	4*	15	4+1*a*	2*	4+3*	4	4
H.118. 2.	42	2	1*a*	3*	4	15	6	2	2	4	3
	43	2+1*a*	2	2	4	12	4+1*a*	2	5	4	4
	44	2	1+1*	2+1*a*	3	15	5	2	4	4	4
	45	1*a**+1+1*s*	2	3	4	15	4	1	3	4	6
H.133	41	3	1	2	3	15	4	1	4	3+1*s*	4
H.154. 1.	40	1	1	2+3*s*	2	14	5	2+1*s*	2	3	4
	41	2	1+1*a*	2+1*	1+1*s*	13	3+2*a*+1*s*	2+2*	1+1*	2+1*	4
	41	1	2	2	2	19	4+1*a*	1+1*s*	2	2	4
	42	3	1	3	3	18	3	1+3*s*	2	1	4
	42	2+1*a*	2	2	3	14	5	1	4	4	4
	44	1	2	3	3	22	5	2	1	2	3
	64	4	1+1*a*+1*s*	1	3+1*a*+1*s*	28	5	←2+5*+2→		4	5
H.154. 2.	42	1*a*	2	2	2	21	4	0	3	2	4+1*s*
	44	←1*a*+4*→		2	2	15	3+2*a*	2	4*	3+1*a*	3+2*s*
	45	2	1	2	4	19	2	2	5	4	4
H.154. 3.	41	2	2	3	3	23	2	0	3	1	2
	41	1	1+1*s*	1+2*s*	2	19	5	3	2	1	3
	41	2	3+1*a*+1*s*	1	5+1*a*	12	4	2	1	4	4
	41	1	2	4	2	13	3	0	3	7+1*s*	5
	42	2	0	4+1*s*	4	16	3	1	3+2*a*	2	4
	42	3	2	3+1*s*	3	16	6	2	1	3	2
	43	2	2	2	2	19	1	3	3	4	5
	43	2+1*a*	1	3	5	15	4	2	2+1*a*	3	3+1*a*
	46	2+1*	2+1*	1	3	14	8	1	4	2	7

H.186. 1.	54	3+2*s*	2	3	4	22	3	3	3	6	3
H.223	78	3	2	3	7	29	13	1	4	8	5+2*a*+1*
	79	1	3	4	2	34	9	4	3+1*	9	9
	80	←	8 →		3+1*a*	34	9	2	5+2*a*	9	7
H.234. 1.	46	1+1*a*+1*	1+1*a*	2+1*s*	3+1*	16	5	2	3+1*a*	2+1*a*	4+1*f*
	45	1+1*b*	1+2*a*	1	4+1*a*	15+1*b*	4	1+1*a*	4	4	4+1*f*
	45	2	2+1*a*	1+1*s*	3+1*a*	15	4	1	4+2*a*	4	4+1*f*
	45	1	2+1*a*	2	3+1*	14	4	1+1*	5+1*a*	4	4+1*s*
	42	1	2+1*	2*s*	2	15	6	2	4	3+1*a*	3
	41	2	2+1*a*+1*+1*b*	1+1*s*	2+1*a*	13	3+1*+1*s*	1	2+1*s*	3	4
H.138	61	2	2	1	3	25	6	2	3+1*	8	8
	80	3+1*a*	2+2*s*	3	1*	32	7	3	5+4*	8	5+3*a*+1*s*
	80	1	2+1*	2+3*	2+1*	29	6	11	4+1*s*	6+1*a*+1*s*	7+1*a*+1*s*

Type of abnormal chromosomes: *a* = longer than normal;
b = chromatid breaks;
f = fragment;
s = shorter than normal;
* = centromere position changed.

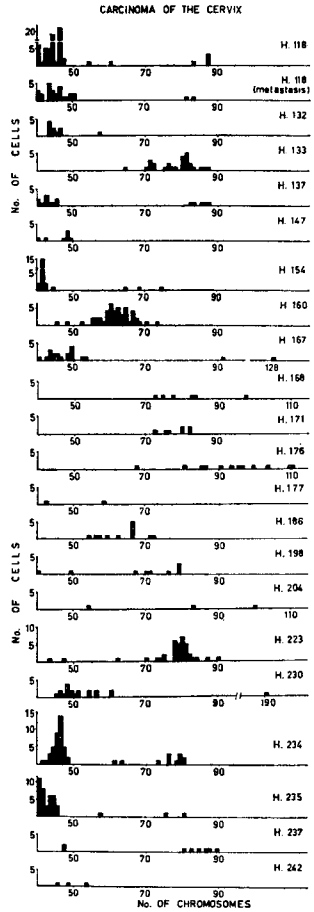


Fig. 1. *Chromosome number distribution in* 21 *malignant carcinomas of the cervix and one metastasis in the urethra.*

abnormal chromosomes were frequently seen, but no tumour had a consistent marker chromosome.

Generally, these gynaecological tumours did not provide many cells of a quality good enough for detailed karyotype analysis. This was mainly due to fuzziness of outline, splitting of the centromere, over-contraction and inadequate spreading, especially in cells with high chromosome numbers. Nevertheless, 35 karyotypes were prepared from seven cases of carcinoma of the cervix and are given in Table 2. Two of the karyotypes, one from each of cases H.154 and H.234, had 46 chromosomes, but both showed a very different chromosome group distribution compared to the normal human complement. Histology and chromosome counts for case H.113 have been reported earlier [10].

Four carcinomas of the corpus uteri are shown in Table 1 and Fig. 2. The chromosome constitution in 3 cells of one of these cases (H.138) is shown on Table 2. In this case the chromosomes of both the primary tumour and metastasis were studied. In the primary tumour there was a very wide range from 46 to 262 chromosomes with a major range between 70 and 90. Only cells in this range were found in a small sample from an abdominal metastasis. A less common histopathological pattern was found in case H.155 in the form of a mixed mesodermal tumour. Forty cells were counted from the primary tumour showing a very wide range of chromosome counts with no indication of a mode; but 33% of these cells had chromatid breaks and chromatid interchanges. This is rarely seen in other uterine tumours before therapy. When symptoms recurred 7 months after radiotherapy another biopsy was examined. This showed a similar wide range in the 158 cells counted with a definite major range from 52 to 56 chromosomes. Twenty seven per cent of these cells had chromosome abnormalities showing a very similar pattern to the primary tumour. Another tumour (H.227) had a well established mode with 47 chromosomes (44%) in the 64 cells counted.

A wide range of chromosome numbers was found in 3 cases of primary carcinoma of the vagina (Table 1, Fig. 3). Tumour H.215 was the only one found to have a distinct mode, at 46 (69%). In 23% of these cells, abnormal chromosomes were found, including chromatid breaks and fragments. In addition the tumour cell population was assessed to have only 3·4% polyheteroploid cells, which is strikingly different from the 99% occurrence of such cells in the other two carcinomas of the vagina (Table 1).

One example of so-called carcinoma-*in situ* of the vulva (H.221) was also studied (Table 1).

Only 8 cells were suitable for chromosome counting:

Chromosome number:	48	51	52	63	110
Number of cells:	3	1	2	1	1

In the 4 cases of carcinoma of the ovary reported here (Table 1, Fig. 4), 2 proved to be of special interest, both having marked chromosomes. In H.203 the marker was longer than a normal chromosome No. 1, with a centromere position similar to a chromosome No. 4–5, and was present in 25% of the 51 cells counted. The second tumour (H.241) had two consistent marker chromosomes, one being a dicentric chromosome, slightly longer than a No. 1, which was present in 25% of the 97 cells counted. The second marker was similar in centromere position to a long chromosome No. 2 and was detected in 20% of the cells studied. These markers were found in many cells throughout the range of chromosome numbers as shown in Fig. 5. Although most chromosome numbers were affected, only

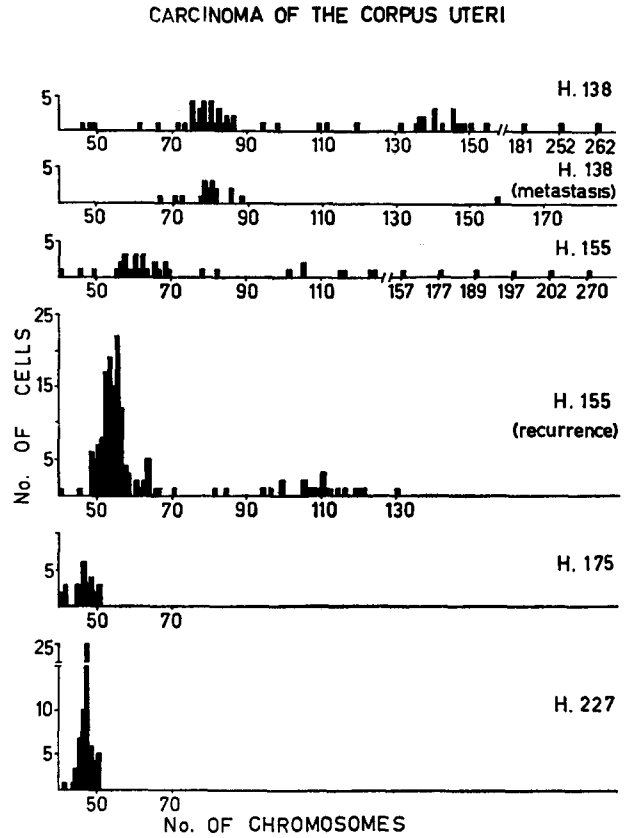


Fig. 2. Chromosome numder distribution in 5 carcinomas of the corpus uteri and one abdominal metastasis.

39·2% of the total cells had markers. They occurred in various combinations per cell: 6% of the cells had both markers, 28% of the cells had only one of the two markers while the remaining 5% of marked cells had other ratios.

Other abnormal chromosomes as well as chromatid breaks and fragments were also present in minor proportions and were often seen in combinations with one or both markers in the same cell. A modal chromosome number of 68 occurred with a frequency of 19%.

Effects of radiotherapy

Previous studies demonstrated that there is variation in response of tumours to a high dose of intracavitary Co^{60} radiation (5000–6000 rad.): ranging from examples with clearly undamaged metaphases, to those in which all the dividing cells showed typical radiation damage; and also more sensitive ones with complete failure of cell division [11]. It was then desirable to determine whether it would be possible to detect further degrees of sensitivity, by exposure to a low dose of X-rays. Therefore an external dose of 500 rad. was

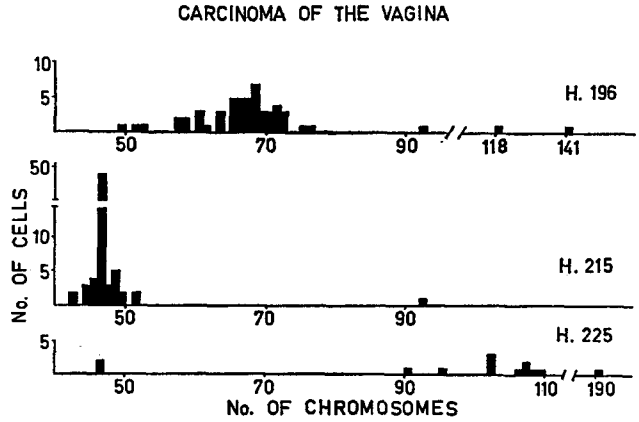


Fig. 3. Chromosome number distribution in 3 carcinomas of the vagina.

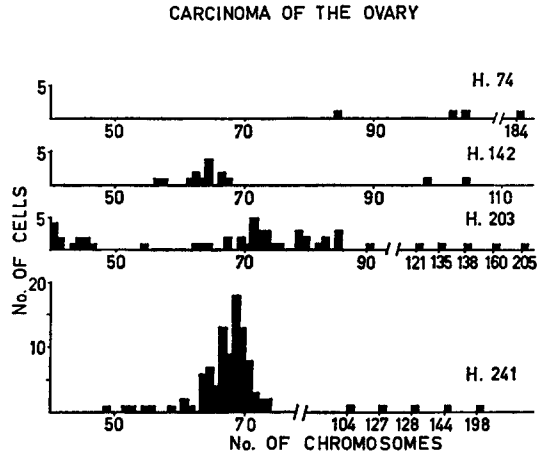


Fig. 4. *Chromosome number distribution in* 4 *carcinomas of the ovary.*

given and the effect assessed according to the frequency of undamaged cell divisions and those with visible chromosomal damage.

Biopsies from 7 carcinomas of the cervix were studied, 18 hr after 500 rad., and all but one (H.168) had a varying number of metaphases in which radiation damage could clearly be seen. The frequency of damaged metaphases appeared to be related to the radiation sensitivity of the tumour. Thus tumour H.168 was remarkably sensitive to the low radiation dose, so that no mitoses at all were seen after 18 hr. Furthermore no cell division was found after 72 hr. Then the first Co^{60} treatment was given and a biopsy taken 14 days later had no mitoses at all. Subsequently this early radiation sensitivity was found to be correlated with a good clinical response after the third Co^{60} insertion. On the other hand, tumour H.154 showed apparent lack of sensitivity to 500 rad., so that only undamaged metaphases were observed after 52 hr. Then the Co^{60} treatment was applied and 14 days later as many as 50% of the metaphases in a biopsy were apparently undamaged. There was a close correlation between the non-sensitivity to the low dose and the poor clinical response after the complete Co^{60} therapy.

The remaining five tumours had varying mixtures of damaged and undamaged metaphases, 18 hr after 500 rad., and had radiation sensitivities between the extremes described above.

DISCUSSION

A wide range of chromosome numbers, karyotypes and ploidy levels has been found in the gynaecological tumours described in this paper. It is considered important to determine whether any consistent chromosomal pattern in the tumour cell populations is associated with the type of tumour encountered (benign or malignant), at a tumour site.

A rare carcinoma *in situ* of the vulva was found to be aneuploid, within the range of chromosome numbers previously reported in this type of lesion in the cervix [12].

The significance of chromosome anomalies in cervical lesions has already been discussed in relation to the mechanism of malignant transformation and diagnosis [13]. It was

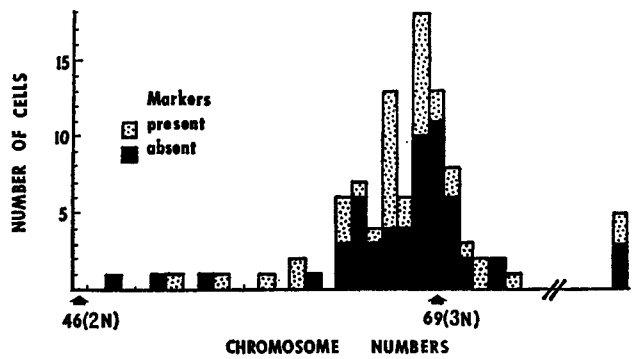


Fig. 5. *Distribution of two marker chromosomes in an ovarian carcinoma* (*No.* 241).

suggested that the very considerable difference in chromosome number frequencies between the two non-invasive lesions, dysplasia and carcinoma-*in situ* could aid histopathological diagnosis of individual cases. However, a firm chromosomal basis for distinguishing carcinoma-*in situ* from carcinoma of the cervix was not clearly apparent; because, although there seemed to be less polyheteroploid cells in carcinoma of the cervix than in carcinoma-*in situ*, there was an overall similarity between total chromosome number frequencies from each type. Thus individual cases could not be diagnosed into either category on the basis of chromosome pattern alone. This difficulty still prevails, even after the interesting recent study of Kirkland [14] of a larger number of cervical lesions in which a statistically significant difference could be detected between carcinoma-*in situ* and carcinoma of the cervix.

In the present study of 22 further carcinomas of the cervix the chromosome situation in cell populations was similar to those previously reported [6, 10, 13, 15]. Chromosome number distributions in all individual cases of our carcinomas were all also different except for the metastasis of case H.118 which was like its primary tumour (Fig. 1).

In carcinomas of the corpus uteri a diverse range of modes have been found between hypodiploid and hypotetraploid. Only 2 of the 6 tumours in the present study (Fig. 2) showed distinct modes which were hyperdiploid; whereas in a previous study 3 out of 5 had a distinct mode at the diploid level [10]. Makino *et al.* [5] observed 4 cases with distinct modes: 2 hyperdiploid, 1 hypertriploid and 1 hypotetraploid. Then Fischer *et al.* [15] reported 2 tumours of the corpus uteri which had hypodiploid and hypotriploid modes respectively.

Few cases of ovarian tumours have been studied so far. Makino *et al.* [6] found modes in only two cases, one pseudodiploid and the other hypotetraploid, whereas Fischer *et al.* [15] only found hypodiploid modes in 4 tumours. Fracarro *et al.* [16] found a case with two modes at hypodiploid and hypertriploid. In the present study a definite mode was only evident in one case at the hypotriploid level. More cases need to be studied before any conclusions can be drawn about favoured stem lines at this site.

In the vagina, only one previous case has apparently been reported in the literature in which chromosomes were studied, involving only 4 polyheteroploid cells [17]. Only 1 of the cases (H.215) in the present study had a diploid mode (46). However, these cells were seen to have different combinations of abnormal chromosomes (i.e. pseudodiploid) and had chromatid breaks and fragments at a frequency of 23%, indicating much karyotype instability in this tumour.

Average number of chromosomes per cell

However, the modal number of chromosomes, which represents the stem-line for tumour growth [18], does not give any indication of the extent of variability in chromosome numbers of each tumour cell population. This can be represented by the mean number of chromosomes per cell for a whole tumour population as is shown in Table 4 for four genital sites. It can be seen that there is a wide range of variation between individual tumours at the same site. However, when the sites are compared in terms of their average number of chromosomes per cell, the extent of similarity is more obvious, provided that the sample of tumours at each site is large enough. Thus there is a distinct difference between the two small samples of corpus uteri, but the mean of both samples is more similar to larger samples from other sites. In addition it is notable that the mean chromosome number for 22 carcinomas of the cervix and the mean calculated from 13 uterine carcinomas of Makino *et al.* [6] are not very different. The present accumulation of data on gynaecological tumours appears to indicate, in general (when enough tumours per site have been studied) that there is a similar range of variability of mean chromosome number per cell between tumours and between tumour sites. It is therefore necessary to examine the distribution of chromosome numbers more closely within the observed range of variation to determine whether any differences between sites can be detected by the method of ploidy level analysis [19].

Ploidy levels in gynaecological tumours

An analysis of the four types of gynaecological tumours, already described, is presented in Table 3 in order to obtain an overall picture of their ploidy levels. Modal ploidy levels are found to be hypodiploid in the cervix (for 22 cases), hyperdiploid in the corpus uteri (for 11 cases), diploid in the vagina (for 3 cases) and hypotriploid in the ovary (for 4 cases). In order to be sure about what is the characteristic modal ploidy level more cases of corpus uteri, vagina and ovary need to be studied. Table 3 shows how the number of cases influences the general picture of ploidy level in the corpus

*Table 3. Chromosome numbers arranged in ploidy levels**

Site of Gynaecological Tumours	No. of Cases	$2n-x$† 35–45	$2n$ 46	$2n+x$ 47–57	$3n-x$ 58–68	$3n$ 69	$3n+x$ 70–80	$4n-x$ 81–91	$4n$ 92	$4n+x$ 93–103	>103	Total Cells
Cervix	22	168 **37·8**	46 10·4	61 13·7	37 8·3	0 0	70 15·7	49 11·0	0 0	7 1·6	6 1·3	444
Corpus uteri Present Study	6	25 6·1	20 4·8	177 **43·0**	39 9·5	1 0·2	63 15·3	28 6·8	0 0	7 1·7	52 12·6	412
Wakonig-Vaartaja (1963)	5	10 6·6	100 **65·8**	40 6·3	1 0·6	35 0	23 0	0 0	0 0	1 0·6	0 0	152
(1963). Total	11	35 6·7	118 22·5	216 **41·2**	36 6·9	1 0·2	35 6·9	23 4·4	0 0	8 1·5	52 9·9	524
Vagina	3	9 6·5	51 **36·6**	17 12·2	15 22·3	3 2·2	12 8·6	1 0·7	2 1·4	4 2·9	9 6·5	139
Ovary	4	11 6·6	1 0·6	7 4·2	**44·9**	15 9·0	35 20·9	8 4·8	0 0	2 1·2	13 7·6	167

**Note* that within each ploidy level, the first vertical column is the actual number of cells in which chromosomes were counted, whereas the second vertical column shows the percentage of total cells.

†x = numbers 1–11.

Table 4. Average number of chromosomes per cell in gynaecological tumour cell populations

Tumour site	No. of cases	Total cells	Mean chromosome number per cell	
			Range among individual cases	Average for total of all cases
Carcinoma of the cervix	22	444	44·7– 94·4	57·0
Corpus uteri				
Present study	6	412	45·8–104·6	69·8
Wakonig-Vaartaja (1963)	5	154	46·0– 53·4	46·8
Total	11	566	45·8–104·6	63·5
Vagina	3	139	46·8–100·9	60·6
Ovary	4	167	68·4–147·5	73·4
Uterine carcinoma of Makino *et al.* (1964)	13	230	46·4– 82·4	64·2

uteri, so that two small groups of cases had different modes when considered separately and also when added together.

However, the present data does give an indication of the ploidy levels favoured by competitive tumour progression in the cell population at these sites. In the cervix, where more cases have been studied the characteristic ploidy mode seems clearer. This question has already been discussed in detail, in relation to the significance of chromosome number variations in malignant transformation [13].

Assessment of the frequency of polyheteroploid cells has also been found to be a useful parameter for rapid assessment of ploidy levels, especially in tumours where few well spread metaphases were available [13]. In addition this method avoids the possible error of recording too few polyheteroploid cells in accurate counts if the large number of chromosomes, per cell, do not spread as well as small ones.

Karyotype analysis

All suitable cells were analysed according to the Denver System of Nomenclature [8, 9] and are shown in Table 2. None of the cells with 46 chromosomes nor the aneuploid cells had the same karyotype. They were all abnormal, in terms of the number of chromosomes per classification group. In addition most cells had obvious structurally abnormal chromosomes as well. Thus cells with the same chromosome number had different karyotypes, in different tumours and even in different samples of the same tumour (e.g. H.154, samples 1–3 in Table 2). It seems that cells of the same clone or stem line were not found, possibly due to the small size of the karyotypeable samples. However, a similar situation has been reported in larger samples of cultured Burkitt lymphoma [20] and also in an old hamster kidney cell line [21]. As in the present study, although the samples studied may not be fully representative of their populations, they do indicate high karyotype instability. The actual mechanism(s) responsible for such instability as yet remains obscure, but results so far suggest that non-disjunction during mitosis is largely responsible [20].

In other tumours there are indications that some groups of chromosomes within the karyotype seemed to have been affected more than others during tumour ontogeny. This has been demonstrated by Steenis [22] in a statistical analysis of the data of Ishihara *et al.* [23] where there was a significant decrease in the number of D and G group chromosomes with a corresponding increase in Group C.

In the present study, a Cochran's Test of 35 karyotypes of carcinoma of the cervix (Table 2) was carried out in the same way as Steenis's analysis (excluding all abnormal chromosomes from the calculations). A different general picture of the groups in the karyotype of the whole population was obtained (Table 5 (ii)). Although most gain occurred in group C and there was a high loss in group D, as previously found by Steenis [22] groups B, E and G are different. There is an increase in group G and pronounced losses in B and E. Therefore the increases in groups C and G appear to have received most contribution from groups B, D and E. Evidently these karyotypes of cervical cancer must have been derived by more than one specific chromosomal mechanism, compared with the likely D–G translocation hypothesis to account for most of the results obtained by Steenis [22]. As is shown in Table 2 the present karyotypes had chromosome breakage as well as clear evidence of translocations in the form of large chromosomes

Table 5. Cochran's Test applied to 35 karyotypes of carcinoma of the cervix (in Table 2) to show the deviations from the percentage of normal chromosomes per group in a diploid cell

(i) Total number of chromosomes per group as a percentage of chromosome number per cell.

	A	B	C	D	E	F	G
Sign 0	0	2	2	0	1	1	3
Sign +	27	11	23	6	14	19	24
Sign −	8	22	10	29	20	15	8

(ii) Number of normal chromosomes per group as a percentage of total normal chromosomes per cell.

	A	B	C	D	E	F	G
Sign 0	0	0	1	1	1	0	0
Sign +	16	9	29	6	6	20	26
Sign −	19	26	5	28	28	15	9

with changes in centromere position. It has been calculated from Table 2 that the abnormal chromosomes are distributed among the groups as follows:

A, 41·3; B, 11·1; C, 0·8; D, 7·9; E, 27·8; F, 4·8; G, 6·3%.

Although the highest number of abnormal chromosomes appear to be found in groups A and E and the lowest in C, it is possible that many abnormal chromosomes are nevertheless included in group C to account for the overall increase in size of this group to 82·8 (Table 6). Abnormal chromosomes cannot be detected easily in group C because there is great difficulty in identifying the morphology of individual chromosomes even in normal cells [24]. For this reason it is useful to compare the results obtained by a Cochran Test on all chromosomes including obviously abnormal ones as in Table 5 (i). Again, there are pronounced increases in groups C and G and loss in group D. However, gain in group A shows up very prominently and such a change cannot be excluded from any assessment of the nature of the deviation in karyotypes of cervical carcinomas from a normal karyotype.

Owing to the possibility that different chromosome groups are affected, according to the site of the tumour, it is difficult to make a direct comparison with the data of Steenis [22] because they were calculated from the total karyotype data from different tumour sites. In order to make a comparison with our results at the same site, a Cochran's Test was calculated from Makino *et al's* [6] for karyotypes of carcinoma of the cervix. Only the stemlines of 5 of these tumours were suitably karyotyped. Table 6 shows the amount of gain or loss per chromosome group as a percentage of the karyotypes analysed. Greatest gains in the karyotypes of Makino *et al's* tumours occur in groups A, B, C and F and largest losses in groups D, E and G. This pattern is similar to that calculated from our data except from groups B and G and the more marked increase in group A.

If the karyotypes of Makino *et al's* tumours

Table 6. A Comparison of two studies on carcinomas of the cervix by means of Cochran's Test, expressed as a percentage of the total karyotypes in each study (all structurally abnormal chromosomes were excluded)*

Deviation of chromosome groups from that of a normal cell	Total Cell population	Chromosome groups within karyotype						
		A	B	C	D	E	F	G
Gain	Present study 35 Karyotypes of Table 2 (from 7 carcinomas)	45·7	25·7	**82·8**	17·1	17·1	57·1	**74·3**
	Makino *et al.* (1964) 5 Karyotypes (from 5 carcinomas)	**80·0**	**60·0**	**60·0**	20·0	20·0	**60·0**	0
Loss	Present study 35 Karyotypes of Table 2 (from 7 carcinomas)	54·3	**74·3**	14·3	**80·0**	**80·0**	42·8	25·7
	Makino *et al.* (1964) 5 Karyotypes (from 5 carcinomas)	20·0	40·0	40·0	**80·0**	**80·0**	40·0	**100·0**

*This comparison could only be made on the basis of morphologically normal chromosomes because Makino *et al.* did not allocate the two abnormal chromosomes in their karyotypes to any of the size groups A–G.

[6] and those in the present report are truly representative of cervical carcinomas of European and Japanese types of women respectively, then the pattern of karyotypes in this malignancy does not fit in with the generalisation derived from all the tumours of many sites calculated by Steenis [22]. In order to be able to determine whether each tumour site has its own pattern, it is therefore desirable that future karyotype analyses of tumours (concerning non-random changes in chromosome groups and in individual chromosomes), should first of all be restricted to larger samples from the same site.

Marker chromosomes

Structurally distinctive abnormal chromosomes, called markers, have been found to be characteristic of individual tumours. When they are present in most cells they indicate a common ancestry of a cell population and provide additional evidence for the mutation theory of malignancy [25, 26]. Such studies have led to the view that human malignant tumours frequently but not invariably arise from a single cell in which chromosome changes have occurred. In the present series of lesions, distinctive marker chromosomes only occurred in two cases of ovarian carcinoma. The markers were morphologically different in these two cases and were present in 25% and 39% of the two tumours respectively (e.g. one case in Fig. 5). They indicate that only part of these populations have a common ancestry, so that these tumours could have arisen from more than one cell. Alternatively, structural changes in the original markers may have given rise to chromosomes similar in appearance to normal ones, so that marker chromosome material could still be present in cells apparently lacking the marker. If so then these tumours could still have arisen from a single cell.

Marker chromosomes may not only characterize an individual tumour, but also a tumour type. Thus Martineau [27] and Fischer [28] found a similar marker chromosome in several seminomas. If this marker is in fact not only morphologically identical, but also composed of the same chromosomal constituents in the different tumours, it is very probable that its formation was associated with the primary malignant transformation in a single cell. Atkin and Baker [26] have previously discussed the importance of marker chromosomes in cancer ontogeny in the light of other examples.

Radiotherapy

Studies in radiotherapy of tumours have shown that mitotic activity may be a useful measure of radiosensitivity: in a low dose range of 50–600 rad. X-rays [29] and also in the high dose range (emitted by radium insertion or Co^{60} or 4Mev X-ray linear accelerator) usually used in cancer treatment [30].

Cox *et al.* [11] also confirmed the previous finding that patients with dividing cells in their radiated tissue after Co^{60} treatment had early recurrence of the tumour after a full course of radiotherapy. On the other hand, no recurrence of tumour growth was found in patients who had no mitoses after Co^{60} treatment. A similar range of responses was found in the present study to be correlated with the level of mitotic activity after a low dose of 500 rad. of X-rays. It is remarkable that individual differences in radiosensitivity can be detected at such a low dose. If these differences are genetical in nature, then it is hoped that the results obtained in this study could lead to further work. It is desirable to assess the usefulness of an index of sensitivity to radiotherapy (based on the ratio of damaged to undamaged cells after low doses); as an indication of the appropriate dose needed to destroy a tumour completely, thereby avoiding the use of an indiscriminate standard dose for all tumours.

Acknowledgements — The cytogenetical information about these tumours was collected in Australia by R. W.-V. who thanks Professor L. W. Cox and the members of the gynaecological staff of the Queen Elizabeth Hospital for providing biopsy material; also many thanks to Mrs. P. Henderson and Miss Elizabeth Tingey for excellent technical assistance.

The results were then analysed, interpreted and written for publication at the cytogenetics department of the Chester Beatty Research Institute. This investigation was supported by grants to the Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital) from the Medical Research Council, and by the National Cancer Institute U.S. Public Health Service.

Requests for reprints should be addressed to D.T.H.

RESUME

Un petit nombre seulement d'études cytogénétiques de tumeurs gynécologiques ayant été publié, de nouvelles recherches sur le rôle possible des chromosomes dans la caractérisation de ce type de tumeurs ont été entreprises.

Trente-six tumeurs ont fait l'objet d'une analyse cytogénétique comportant l'étude du

nombre de chromosomes, la recherche de marquers et l'établissement du caryotype. Pour autant que les fragments de tumeur examinés soient représentatifs de chaque localisation (col utérin, corps utérin, ovaire et vagin), les différences de distribution du nombre de chromosomes, selon la localisation, indiquent les nombres qui sont privilégiés durant l'évolution de populations de cellules, aux différents sièges.

L'analyse du caryotype des carcinomes du col a montré quels groupes de chromosomes étaient le plus souvent impliqués dans la formation des caryotypes anormaux. Ces observations ont été comparées avec les caryotypes de tumeurs décrits précédemment, particulièrement ceux des mêmes localisations.

Des différences individuelles de radiosensibilité furent mises en évidence par des analyses cytogénétiques, après une exposition à une dose de 500 *rad., montrant qu'un index de radiosensibilité pouvait être déterminé à partir d'une dose faible.*

SUMMARY

Since only a few cytogenetical studies, on gynaecological tumours have previously been reported, on a small scale, further information was sought about the possible contribution of chromosomes to the characterisation of gynaecological tumour sites.

The cytogenetics of 36 *tumours were assessed in terms of chromosome numbers (range, modes and ploidy levels) marker chromosomes and karyotypes. If the analysed tumour samples are truly representative of each site (cervix, corpus uteri, ovary and vagina); then the differences in chromosome number distribution, between sites, indicate those numbers that are most favoured during the evolution of cell populations at the various sites.*

Karyotype analysis of cervical carcinomas showed which chromosome groups were most affected in the formation of their abnormal karyotypes. These observations are compared with the pattern of previously reported tumour karyotypes, especially at the same site.

Individual differences in tumour sensitivity were revealed by chromosome studies after 500 *rad. of X-rays, indicating that an index of sensitivity to radiotherapy could be determined from a low dose.*

ZUSAMMENFASSUNG

Da nur wenige cytogenetische Untersuchungen über gynäkologische Tumoren vorliegen, werden weitere Informationen gesucht über den möglichen Beitrag der Chromosomen zur Charakterisierung gynäkologischer Tumoren.

Die Zytogenetik von 36 *Tumoren wurde in Beziehung auf Chromosomenzahl, Marker-Chromosome und Kerntypen bestimmt. Wenn die untersuchten Tumoren wirklich repräsentativ für den Sitz des Tumors sind, (Cervix, Corpus, Ovar und Vagina), dann zeigt der Unterschied in der Verteilung der Chromosomenzahl auf den Tumorsitz die privilegierten Zahlen, während der Evolution jeder Zellpopulation für die verschiedenen Sitze. Analysen der Kerntypen von Zervikalkarzinomen zeigten welche Chromosomengruppen vorwiegend betroffen waren bei der Bildung von abnormen Kerntypen. Diese Beobachtungen werden verglichen mit den früher mitgeteilten Kerntypenmustern, speziell bei gleichem Sitz. Individuelle Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit des Tumors wurden durch Chromosomenstudien nach* 500 *rad Röntgenstrahlen gefunden. Dies zeigt, daß ein Strahlenempfindlichkeitsindex auch bei einer niedrigen Strahlendosis bestimmt werden kann.*

REFERENCES

1. J. H. Tjio and A. Levan, The chromosome number of man. *Hereditas (Lund)* **42,** 1 (1956).
2. A. Levan, Chromosome studies on human tumors and tissues of normal origin, grown *in vivo* and *in vitro* at the Sloan-Kettering Institute. *Cancer* **9,** 648 (1956).
3. T. C. Hsu, Evolution of cell populations. *Int. Rev. Cytol.* **12,** 69–161 (1961).
4. T. S. Hauschka, Chromosome patterns in primary neoplasms. *Exp. Cell Res. Suppl.* **9,** 86 (1963).
5. S. Makino, T. Ishihara and A. Tonomura, Cytological studies of tumours. XXVII. The chromosomes of thirty human tumors. *Z. Krebsforsch.* **63,** 184 (1959).

6. S. MAKINO, M. S. SASAKI and A. TONOMURA, Cytological studies of tumors. XL. Chromosome studies in fifty-two human tumors. *J. nat. Cancer Inst.* **32,** 741 (1964).
7. N. B. ATKIN and B. M. RICHARDS, Clinical significance of ploidy in carcinoma of cervix: Its relation to prognosis. *Brit. med. J.* **ii,** 1445 (1962).
8. T. T. PUCK, A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet* **i,** 1063 (1960).
9. The London Conference on 'The normal human karyotype', 1963. *Ann. hum. Genet.* **27,** 295 (1964).
10. R. WAKONIG-VAARTAJA, Chromosomes in gynaecological malignant tumours. *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaec.* **3,** 170 (1963).
11. L. W. COX, R. WAKONIG-VAARTAJA and N. D. HARVEY, Mitotic activity and radiation response in uterine malignancy. *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaec.* **5,** 131 (1965).
12. R. WAKONIG-VAARTAJA and J. A. KIRKLAND, A correlated chromosomal and histopathological study of pre-invasive lesions of the cervix. *Cancer* **18,** 1101 (1965).
13. R. WAKONIG-VAARTAJA and D. T. HUGHES, Chromosomal anomalies in dysplasia, carcinoma *in situ* and carcinoma of the cervix uteri. *Lancet* **ii,** 756 (1965).
14. J. A. KIRKLAND, Chromosomes in uterine cancer. *Lancet* **i,** 152 (1966).
15. P. FISCHER, E. GOLOB and J. H. HOLZNER, Chromosomenzahl und DNS-Wert bei malignen Tumoren des weiblichen Genitaltraktes. *Z. Krebsforsch.* **68,** 200 (1966).
16. M. FRACARRO, A. MANNINI, L. TIEPOLO and Z. ZARA, High frequencies of spontaneous recurrent chromosome breakage in an untreated human tumour. *Mutation Res. (Amst.)* **2,** 554 (1965).
17. R. C. GOODLIN, Karyotype analysis of gynaecologic malignant tumours. *Amer. J. Obstet. Gynaec.* **84,** 493 (1962).
18. S. MAKINO, The chromosome cytology of the ascites tumors of rats, with special reference to the concept of the stem line. *Int. Rev. Cytol.* **6,** 25 (1957).
19. D. T. HUGHES, The role of chromosomes in the characterisation of human neoplasms. *Europ. J. Cancer* **1,** 233 (1965).
20. D. T. HUGHES, Karyotype evolution in human somatic cell populations (Abstract). *Proc. 3rd int. Congr. hum. Genet.*, Chicago (U.S.A. Library No. 58–17121) p. 49 (1966).
21. D. T. HUGHES and S. AUSTIN, Karyotype instability in the Syrian hamster *in vivo* and *in vitro* (Genetical Society Abstract). *Heredity* **21,** 531 (1966).
22. H. VAN STEENIS, Chromosomes and cancer. *Nature (Lond.)* **209,** 819 (1966).
23. T. ISHIHARA, G. E. MOORE and A. A. SANDBERG, Chromosome constitution of cells in effusions of cancer patients. *J. nat. Cancer Inst.* **27,** 893 (1961).
24. D. T. HUGHES, Quantitative studies in karyotype analysis. In *Chromosomes today* (edited by C. D. DARLINGTON and K. LEWIS), Vol. 1, p. 188. Oliver & Boyd, Edinburgh (1966).
25. R. WAKONIG-VAARTAJA, A human tumour with identifiable cells as evidence for the mutation theory. *Brit. J. Cancer* **16,** 616 (1962).
26. N. B. ATKIN and M. C. BAKER, Chromosome abnormalities as primary events in human malignant disease: evidence from marker chromosomes. *J. nat. Cancer Inst.* **36,** 539 (1966).
27. M. MARTINEAU, A similar marker chromosome in testicular tumours. *Lancet* **i,** 839 (1966).
28. P. FISCHER and E. GOLOB, Similar marker chromosomes in testicular tumours. *Lancet* **i,** 216 (1967).
29. P. C. KOLLER, The effect of radiation on the normal and malignant cell in man. *Brit. J. Radiol. Suppl.* No. 1, 84 (1947).
30. N. B. ATKIN, Cell-division in carcinoma during radiotherapy: a criterion of response to treatment. *Lancet* **ii,** 778 (1960).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 279–287. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

The Possible Role of Genetic Factors in Carcinogenesis*

P. C. KOLLER

Chester Beatty Research Institute,
Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, London, S.W.3

INTRODUCTION

MALIGNANT transformation is a permanent change in behaviour of a cell which is transmitted to the daughter cells. As a biological phenomenon such an event must involve the genetic apparatus of the cell. The purpose of the present paper is to discuss the possible role of genetic factors firstly in the development of cancer in an individual, and secondly in the malignant transformation or "cancerization" of cells. The subject will be considered from two view-points: what is the significance of (i) the familial incidence of cancer and (ii) chromosome anomalies in precancerous conditions.

FAMILY PEDIGREE STUDIES

The concentration of unusual physical or mental conditions in human families had been observed long before the Mendelian principles of heredity were discovered and understood. Perhaps the physician Hoffmann was the first to record this, when in the early 18th century he reported on families with a high incidence of cancer and suggested that the disease might be inherited [1]. Many similar reports have appeared since Hoffmann's observation, but conclusions derived from these studies are still the subject of debate as they lack a suitable control group, which is essential for comparison. Cancer is a common disease in human populations, and the occurrence of cancer in several members of a family can be due to chance alone [2]. In more recent studies, however, new critical criteria have been used in selecting the control group and better statistical methods employed to evaluate the significance of the findings, therefore a more reliable conclusion can be based on them. An impressive number of pedigrees has been collected and analysed by Lentz [3]. Schintz and his collaborators [4] covered about 25,000 individuals and followed family pedigrees showing the reappearance of the same kind of neoplasms through several generations. An example is given in Fig. 1. The "unique family G" of Warthin, analysed by Hauser and Weller [5], is a classical case, and illustrates the accumulation of cancer in a restricted group. The pedigrees covered 174 persons, a total of 41 of whom had cancer of the stomach in the case of the males and of the uterus in the case of the females.

In the compilation of family histories with cancer the emphasis is now on the occurrence of the same type of neoplasm located in the same site or organ. Recent findings, summarized excellently by J. Clemmesen [6], strongly suggest that the familial incidence of gastric and breast cancer has a genetic basis.

*This investigation has been supported by grants to the Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital) from the Medical Research Council and the British Empire Cancer Campaign for Research, and by the Public Health Research Grant No. CA-03188-08 from the National Cancer Institute, U.S. Public Health Service.

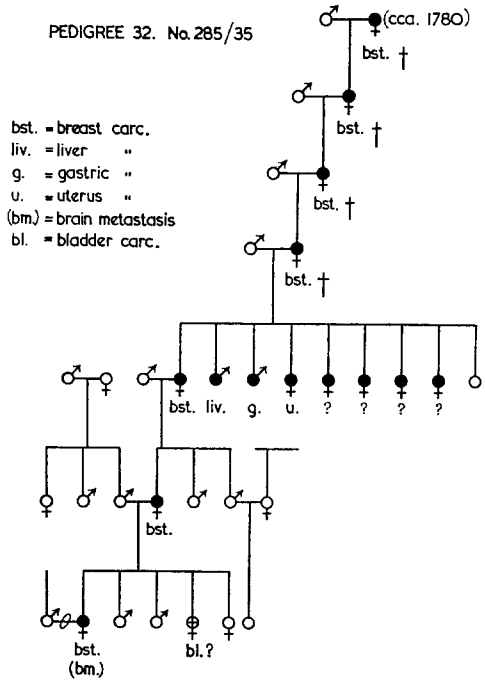


Fig. 1. *Pedigree showing the occurrence of breast cancer in seven generations* [2].

It is now accepted that the risk is twice as great for relatives, particularly brothers, to develop gastric carcinoma where there is a family history of this disease, as for those in whose families no members have died from it. Similarly studies on the familial incidence of breast cancer indicate that the risk is three times higher for a sister of the proposita, than for other women in whose families there had been no cases of death from carcinoma of the breast. There are reports which seem to suggest that carcinoma of the female genital tract occurring in families may also have a genetically determined predisposition [6].

ANIMAL EXPERIMENTS

Definite proof that genetic factors are operating can only be obtained by breeding tests which are not applicable to man. In mice however such tests can be made and the respective role of heredity and environment in the development of neoplasms can be studied.

By inbreeding for more than 20 generations and by selection, strains of mice have been established, the individual members of which have identical genetical constitutions, and it has been found that mice of particular strains, when kept under identical environmental conditions, have a characteristic incidence of a particular type of cancer. Some examples of cancer incidence in various strains of mice are shown in Table 1. It can be seen that the spontaneous incidence varies, but is always below 100 per cent. It was soon found however that both the frequency of cancer and the onset of the disease can be increased and accelerated in the susceptible strains if carcinogens were applied to the mice. Thus strain-A mice have an 85 per cent incidence of lung cancer at 14 months, but when a very minute dose of 1 : 2 : 5 : 6 dibenzanthracene is applied to the skin, incidence is increased to 100 per cent and the latent period reduced to six weeks. The same treatment when given to mice of C57Bl has little or no effect. It was concluded from such experiments that environmental factors (e.g. polycyclic hydrocarbons) produce a more

Table 1. *Tumour incidence in various strains of mice*

Tumour	Strain	Tumour incidence in percentage	Average age of mice in months when tumour appears
Mammary gland	C3H	95	9
	RIII	90	16
	A	80	12
	DBA	65	12
	CBA	15	20
	Balb/C	1	24
	C57BL	0·5	22
Lung	A	85	14
	C57BL	0·5	18
Leukaemia	AKR	95	10
	C58	90	10
	DBA/2	40	12
	C57BL	20	18
	Stoli	1	16

drastic effect on susceptible mice than on mice in which genetic predisposition for the particular cancer is absent.

NATURE OF GENETIC FACTORS

The nature of the genetic factors which underlie predisposition to cancer was studied in breeding tests. By mating mice of the most susceptible strain to those of the most resistant strain, the offspring showed intermediate expression indicating that the inherited susceptibility is governed by many genes, each of them contributing to a different degree. Such genes are called *polygenes* by geneticists [7]. It is known that the effects of these genes can be affected by modifier genes, and linkage studies indicate that the genes responsible for susceptibility in mice are located in different chromosomes. In view of these facts it is understandable therefore that the degree of susceptibility to cancer can vary widely in different individuals. The question is threefold: — Can the basic conclusion derived from experiments with mice be applied directly to man? How is a predisposition to cancer expressed in men with identical genetic constitution? What can be learned from the occurrence of cancer in monozygotic twins, who have identical genetic constitutions?

TWIN STUDIES

The medical literature contains many reports of family pedigrees in which identical twins are affected with cancer. The twins may be either concordant for the trait, that is both partners possess or both are free of it, or they can be discordant, when only one of the pair possesses the trait or character. Concordance in twins can be quite spectacular, as in the case described by Militzer [8] in which both members of monozygotic twins had identical gastric carcinomas, which developed simultaneously and had the same histological features. Another example is the simultaneous appearance of testicular tumours in identical twins; so far five such cases are on record [9].

Systematic studies of cancer incidence in mono- and dizygotic twins show that concordance is significantly higher for cancer at corresponding sites in monozygotic than in dizygotic twins (Table 2). The data strongly suggest the operation of genetic factors which determine predisposition to a particular cancer [6].

HEREDITY AND ENVIRONMENT

On the other hand, the importance of environmental factors in the development of cancer is shown by the very numerous instances of discordance observed in monozygotic twins. It should be noted that the death of one member from cancer does not necessarily indicate a similar fate for the other twin [10].

The most important basic principle of genetics is that the expression of a character (C) or trait is the outcome of interaction between heredity (H) and environment (E). It has been demonstrated experimentally that every biological phenomenon is under the influence of both. The formula C=H+E should never be lost from sight when the make-up or behaviour of an organism is analysed. The visible expression of the genes depends on the conditions existing during the period of gene action, as it may be completely suppressed by internal (cellular) or external factors (environment), though the end result does not necessarily indicate either the absence or presence of a genetic factor.

If all the facts are considered together it seems that inherited predisposition can influence the incidence of certain types o cancer in man. The genetic basis of predisposition is rarely represented by one single gene, as has been established for *retinoblastoma* and *neurofibromatosis* [11]. In the case of common type cancer, (e.g. cancer of breast, cervix, etc.) the basis of susceptibility is complex; several genes of different potency must be postulated on the basis of the observed incidence of cancer in families. Studies seem to indicate that the gene-complex is easily disrupted by breeding and that its phenotypic manifestation is affected by environmental influences to varying degrees. In a close group — like the "G" family of Warthin — the

Table 2. Cancer incidence in twins [6]

Monozygotic	Dizygotic
Number: 120	Number: 287
Concordant: 21%	Concordant: 15%
Same site: 20	Same site: 7
Different site: 5	Different site: 37

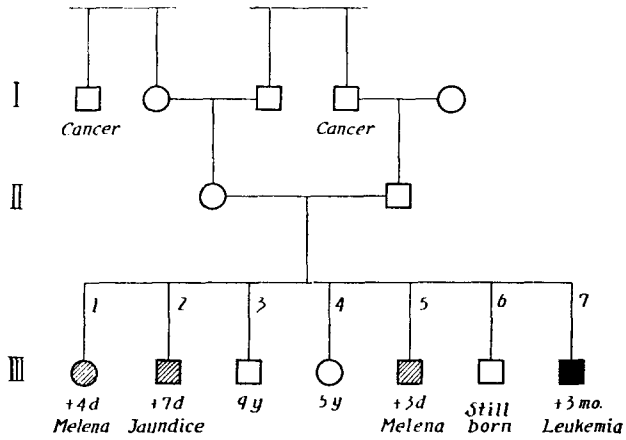


Fig. 2. Pedigree of a first cousin marriage, showing the fate of seven children; one with leukaemia is indicated by a solid symbol, those with probable congenital leukaemia by hatched symbols. The length of life is given in years (y), months (mo) and days (d) [12].

multiple factors (polygenes) determining susceptibility became fully operative in many members. The presence of such genetic factors in the community can be revealed by inbreeding i.e. marriage between first cousins. There are reports in the medical literature which show that first cousin marriages can unmask the existence of deleterious genetic factors, predisposing towards pathological conditions including cancer [12]. An example of such a case is shown in Fig. 2. A similar case has been reported by Boulton [13]. In a series of investigations concerning the incidence of a particular type of neoplasm in a closely related group, Rotkin [14] came to the conclusion that there may be a "cancer genotype" in man and postulates a variable genetic situation that interacts with assorted environmental influences. In general practice the physician may be able to use the information so far available about cancer risk, when considering members of a family with cancer.

The human population is heterozygous for an unknown number of genetic factors, some of which may predispose to cancer, and the epidemiologists must take a more serious view of the carcinogenic hazards present in the environment. Because of the unknown nature and extent of the "genetic load" in the human population, any hazard which may add to this load should be avoided. The fitness of the individual is adversely affected by the presence of deleterious genes, and the greater their number, the greater will be the impairment which may appear as the result of reduced resistance to environmental influences. Man, who is an enormously adaptable organism, is at the present time being thrust into environmental situations in which he has not previously been tested, and the epidemiologists must spare no effort to identify hazards which would add to our "genetic load" and thus could contribute to the development of disease, including cancer. Only with a genetic outlook can many apparently paradoxical situations be understood and explained: e.g. Why it is that a very heavy smoker can live to an old age without contracting cancer of the lung, while others, less addicted to smoking, develop and die from cancer of the lung!

Genetic factors may predispose to cancer indirectly. An example is *Xeroderma pigmentosum*, a condition of hypersensitivity of the skin to ultra-violet light, due to a single recessive gene. The lesions, produced by excessive exposure to sunlight, very often develop into epidermoid carcinoma; if, however, the skin is protected, cancer can be avoided. Another example is *Multiple Polyposis* of the intestine, due to a single dominant gene. A family pedigree is illustrated in Fig. 3, showing five out of six children to be affected. The condition can be controlled by removal of the affected region; otherwise malignant disease develops without exception [15]. These examples show that other genetically determined pathological conditions, which by themselves are not malignant, could develop into cancer.

CHROMOSOME ANOMALIES

Chromosome anomalies in neoplastic tissue have been described in detail by von Hansemann at the end of the last century. Boveri [16] presented his chromosome theory of cancer just over 50 years ago, according to which abnormal chromosome content confers malignant behaviour on the cell. Mitotic anomalies are common in tumours and have

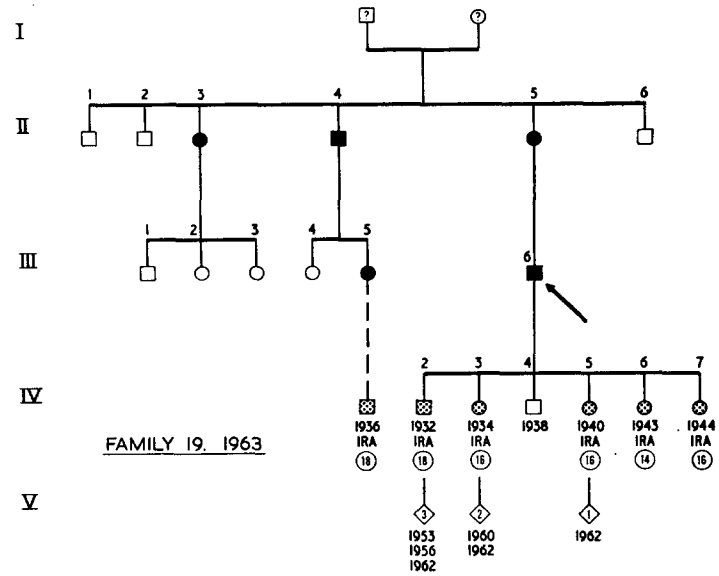


Fig. 3. *Pedigree showing familial incidence of* Multiple Polyposis*; solid symbols indicate carcinoma of the stomach, hatched symbols indicate the presence of intestinal polyps. The date of birth and the age when ileo-rectal anastomosis (IRA) was done, are given* [15].

been and are still used as diagnostic criteria by pathologists [17]. They affect the spindle and cause irregular distribution of chromosomes (Fig. 4). The cytological studies, however, failed to demonstrate the existence of a stable chromosome pattern which would be characteristic and exclusive to the neoplastic cell. Analysis of the chromosome constitution in spontaneous and experimentally induced animal tumours has revealed a great degree of polymorphism.

Similar studies in human tumours became possible after 1956 when, with the application of improved cytological techniques, the correct chromosome number of man ($2N=46$) was firmly established and the morphology of the chromosomes was described in detail. Chromosome anomaly as the cause of pathological conditions was first observed by Lejeune *et al.* [18] who found 47 chromosomes in a "mongol" instead of 46. The additional chromosome was No. 21. The discovery that pathological conditions in man could have a chromosomal basis gave a new impetus to cytological studies in human tumours. Many reports have been published describing both numerical and structural changes in the chromosomes of tumour cells, but the alterations were inconsistent and showed great variation from tumour to tumour, as was found in animal tumours.

The first important observation was made by the two Philadelphia cytologists, Nowell and Hungerford [19], who observed the presence of an abnormal chromosome No. 21 in patients with chronic myeloid leukaemia. The faulty chromosome is referred to as Ph'. The important question as to whether the Ph' chromosome and myeloid leukaemia are causally connected is still under discussion. The true importance of the Ph' chromosome lies in the fact that this is the first instance in which a specific chromosomal change is characteristic of a specific type of neoplastic disease.

The study of chromosome anomalies and their relevance to the primary event occurring during the malignant change of a cell is made difficult by the secondary anomalies which are superimposed on it. Investigations by Lejeune and Berger [20] and de Grouchy and collaborators [21], however, throw new light on these secondary events, showing that they are not occurring in a haphazard way, but that on the contrary the changes represent definite stages in a stepwise karyotypic evolution by successive acquisitions and duplications of supernumerary chromosomes. Evidence is accumulating that chromosome abnormalities in tumours are non-random [22] and though much variation has been observed in the type of chromosome anomalies within and between tumours, recent cytological analysis seems to suggest that similar marker chromosomes are occurring in similar tumours. Such a situation has been found in acute lymphoid leukaemias, lymphosarcomas and testicular tumours. The formation of marker chromosomes may be a part of the primary event of malignant change; the duplication or loss of structurally normal

chromosomes would be a secondary development. In any attempt at the classification of tumours by karyotype, the presence of similar markers might be more significant than the chromosome number of the stem-line which shows great variation. Chromosome studies of precancerous tissues are expected to yield further information in this respect.

CHROMOSOME ANOMALY AS A PREDISPOSING FACTOR

Although it cannot be stated that chromosome anomaly is the cause of malignant change, the evidence is strong that it can predispose toward such an event occurring. Levan and Biesele [23] demonstrated that numerical changes in normal cells grown *in vitro*, preceeded malignant transformation. It must be emphasized, however, that beside changes in chromosome number other changes are required to make cancerization of cells effective, for not every cell population which is heterogenous in respect of chromosome constitution, behaves as cancerous. Under certain conditions, however, chromosome anomalies can predispose the cell to malignant transformation The association of Down's syndrome ("Mongolism") with leukemia might be considered in this light. Mongolism is due to trisomy of chromosome No. 21, the same chromosome which is associated with chronic myeloid leukaemia. In "mongols" the leukaemia is however the acute lymphocytic type and the malignant cells usually contain other chromosome anomalies beside the extra chromosome No. 21. The association of "mongolism" with leukaemia was firmly established by Stewart *et al.* [25] when making a survey of neoplastic diseases in childhood. The occurrence of leukaemia in some members of a family reported by Gunz *et al.* [26] seems to be associated with a deficient chromosome No. 21 (Fig. 5). Recent studies indicate that other pathological conditions due to or associated with chromosome anomalies (e.g. Klinefelter, Turner and Sturge-Weber syndromes) have a high frequency of neoplasm [27, 28].

The most interesting examples of association between genetically determined disease and neoplasms are provided by Fanconi's anaemia [29] and Bloom's syndrome [30]. The significance of this association has been discussed recently by de Grouchy [31]. In both conditions there is a high frequency of cells with chromosome anomalies and an increased tendency to malignancy. From these examples the conclusion may be drawn that chromosome anomaly is a phenotypic expression of cellular instability, and this predisposes the cell to malignant change. Cellular instability in Fanconi's syndrome has been demonstrated by Todaro *et al.* [32]. Cells taken from the skin of patients with the syndrome when grown *in vitro* and infected with oncogenic virus SV-40, were found to transform at least 50 times more frequently than cells from normal persons. (Table 3).

CHROMOSOME ANOMALIES AS INDICATORS

Cell behaviour in Fanconi's anaemia and Bloom's syndrome suggest that chromosome anomalies might be one of the signals of abnormal cellular conditions which can predispose to malignant transformation. It might be possible therefore to use chromosome anomalies which occur in the cells of persons exposed to environmental agents, as indicators of the carcinogenic hazards of these agents. Chromosome analyses of individuals in occupations with high carcinogenic hazards have already been made by the cytogenetics group in Edinburgh [33], and a high incidence of cells with chromosome anomalies found; their frequency showed a direct dose-response relationship. Table 4 summarizes recent observations on workers exposed to benzene. Similar

Table 3. *Frequency of cell transformation* in vitro *by* SV-40 [32]

Source of cells	Number of transformed colonies*
Controls (7)	1·6–5·1
Faconi's anaemia	
Homozygotes:	
AM	79·7±18·1
JV	41·4±12·1
Heterozygotes:	
TM	20·1± 3·2
CV	28·2± 8·7

*10,000 cells plated.

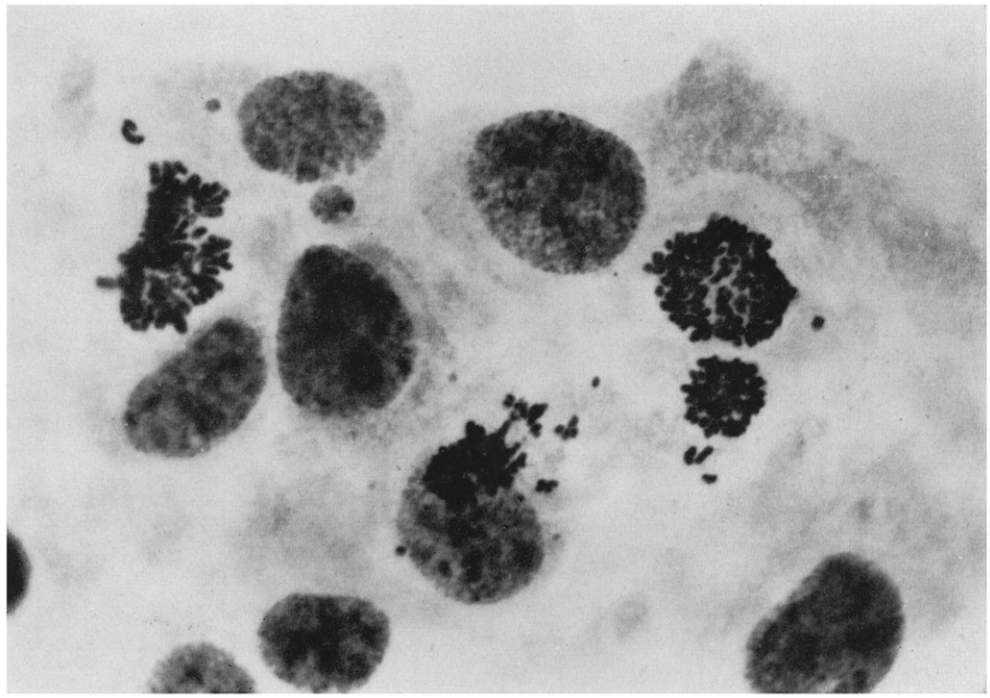


Fig. 4. Mitotic anomalies in carcinoma of the cervix; cells in division differ in the number of chromosomes.

(to face p. 284)

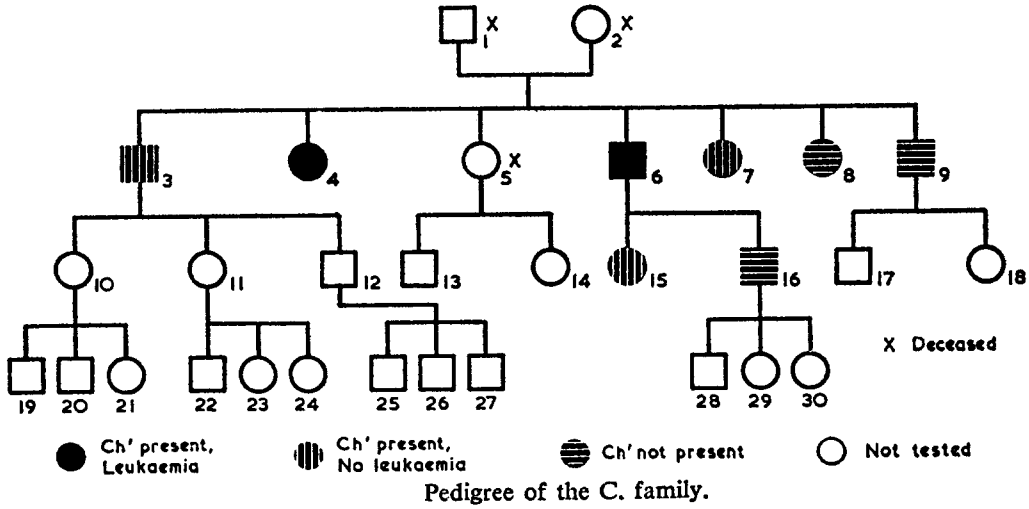


Fig. 5. *Family pedigree showing the association of the defective chromosome No.* 21 (*Ch'*) *with leukaemia* [26].

findings were reported by Pollini and Colombi [34] and Forni [35].

The natural environment of man is undergoing rapid changes; the great variety of chemicals and drugs introduced into industry, food manufacture and medicine, brings new problems in its wake and it has been found that not infrequently the use of such agents is linked with unspecified danger to health. Teratogenic effects of certain drugs are well known, and the same drugs have been found to induce chromosomal anomalies. Recently it was reported that LSD (lysergic acid diethylamide) used for the treatment paranoid schizophrenia, induces chromosome anomalies [36]. Time will show whether certain chemical and drugs widely used nowadays have carcinogenic properties or not. Chromosome anomalies seen in cells of personnel who come into contact with these agents, may be indicators that such hazards exist. The cytological study of the effect produced by these agents upon the genetic mechanism of the cell may be one of the methods by which their carcinogenic potentialities can be elucidated.

Table 4. *Frequency of chromosome aberrations in blood cells of individuals exposed to benzene* * [33]

No. of workers	Occupation	No. of cells studied	% of chromosome anomalies		% of abnormal cells
			Cu†	Cs†	
14	Rubber	1000	1·79	1·00	2·79
4	Packing	400	2·25	1·00	3·25
38	Control	1060	0·57	0·85	1·42

*Rubber workers.
†Cu = unstable
†Cs = stable.

RESUME

Le rôle possible de facteurs génétiques dans la cancérogenèse est discuté de deux points de vue, afin de déterminer le signification de: (1) *l'incidence familiale du cancer et* (2) *das anomalies chromosomiques dans des états précancereux.*

Une revue de la littérature semble indiquer que la haute incidence de certains cancers (sein, estomac) dans certaines familles est due à des facteurs génétiques. Leur nature a été étudieé par des expériences d'élevage chez la souris. On en conclut que plusieurs gènes sont respon-

sables de la prédisposition pour un cancer donné, et que des facteurs de milieu jouent un role important dans le développement du cancer. L'incidence du cancer, dans des syndromes causés par des anomalies chromosomiques, ou associés à celles-ci, suggère que l'instabilité chromosomique pourrait être un facteur prédisposant au cancer. L'attention est attirée sur la possibilité d'utiliser les anomalies chromosomiques comme un indicateur de la cancérogénicité des facteurs du milieu.

SUMMARY

The possible role of genetic factors in carcinogenesis is discussed from two view-points to determine the significance of (1) *the familial incidence of cancer and* (2) *chromosome anomalies in precancerous conditions.*

A survey of pertinent reports seems to indicate that the high incidence of particular cancers (breast, stomach) observed in certain families is due to genetic factors. Their nature has been studied in breeding experiments in mice; it is inferred that several genes are responsible for a predisposition to a particular neoplasm, and that environmental factors play an important role in the development of cancer. The incidence of cancer in pathological syndromes, which are either caused by or associated with chromosome anomaly suggests that genetic instability can be a predisposing factor to cancer. Attention has been drawn to the possibility that chromosome anomalies in cells may be used as indicators of carcinogenicity of environmental factors.

ZUSAMMENFASSUNG

Die mögliche Bedeutung von genetischen Faktoren der Carcinogenese wird unter den folgenden Gesichtspunkten betrachtet: (1) *Familiäre Krebshäufigkeit und* (2) *Chromosomenanomalien bei praecancerösen Zuständen.*

Eine Literaturübersicht scheint darauf hinzuweisen, daß die große Häufigkeit gewisser Krebsformen (Mamma, Magen) bei manchen Familien auf genetische Faktoren zürückzuführen ist. Dies wurde durch bestimmte Zuchtformen bei Mäusen geprüft. Es zeigt sich, daß mehrere Gene für die Prädisposition zu einer bestimmten Krebsform zuständig sind, und daß Umweltfaktoren für die Entwicklung des Krebses eine große Bedeutung haben. Die Häufigkeit von Krebs bei pathologischen Zuständen, die mit einer Chromosomenanomalie einhergehen, läßt vermuten, daß eine genetische Instabilität eine prädisponierender Faktor für Krebs sein kann. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß Chromosomenanomalien in Zellen als Hinweise für die carcinogene Bedeutung von Umweltfaktoren angesehen werden können.

REFERENCES

1. F. Hoffmann, *Opera Omnia.* Geneva (1740).
2. C. M. Woolf, Investigation on genetic aspects of carcinoma of the stomach and breast. *Univ. Calf. Publ. publ. Hlth* **2,** 262 (1955).
3. O. Lentz, Krebs und Vererbung. *Arb. Staatsinst. exp. Ther. Frankfurt* (1947).
4. H. R. Schintz, V. Cocchi and J. C. Neuhaus, Die Vererbung des Krebses bei Menschen. *Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch.* **23** (1948).
5. I. J. Hauser and C. Weller, Further report on the cancer family of Warthin. *Amer. J. Cancer* **27,** 434 (1936).
6. T. Clemmesen, *Statistical Studies in Malignant Neoplasms.* Munksgaard, Copenhagen (1965).
7. P. C. Koller, The genetic component of cancer. In *Cancer Vol.* **1,** p. 335. Edited by R. W. Raven. Butterworth, London (1957).
8. R. E. Militzer, Carcinoma of the stomach in identical twins. *Amer. J. Cancer* **25,** 544 (1935).
9. J. R. Stewart and M. A. Bagshaw. Malignant testicular tumours appearing simultaneously in identical twins. *Cancer* **18,** 895 (1965).
10. L. Dougan, J. D. Scott and H. J. Woodliff, A pair of twins, one of whom has chronic granulocytic leukaemia. *J. med. Genet.* **31,** 217 (1966).
11. P. C. Koller, Heredity and cancer. *The Practitioner* **182,** 693 (1959).

12. T. SHIBUYA, K. YOSHIOKA, M. SATO, A. ISHIGAKI and Ng. TAT-KEUNG, Congenital leukaemia within a family with two cases of stomach cancer and parental consanguinity. *Tohoku J. exp. Med.* **78,** 254 (1962).
13. M. I. BOULTON, H. J. PHILLIPS, R. W. SMITHERS and S. WALKER, Congenital leukaemia with parental consanguinity. *Brit. med. J.* **2,** 866 (1961).
14. J. D. ROTKIN, Further studies in cervical cancer inheritance. *Cancer* **19,** 1251 (1966).
15. C. E. DUKES, The control of precancerous conditions of the colon and rectum. *Canad. med. Ass. J.* **90,** 630 (1964).
16. L. BOVERI, Zur Frage der Enstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena (1914).
17. P. C. KOLLER, Chromosome behaviour in malignant cells. *Arch. Biol. (Liège)* **75,** Supplt. 1185 (1964).
18. J. LEJEUNE, R. TURPIN and M. GAUTIER, La mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann. Génét.* **1,** 41 (1959).
19. P. C. NOWELL and D. A. HUNGERFORD, Chromosome studies on normal and leukaemic human leukocytes. *J. nat. Cancer Inst.* **25,** 85 (1960).
20. J. LEJEUNE and J. BERGER, Sur une méthode de recherche d'un variant commun des tumeurs de l'ovaire. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **262,** 1885 (1966).
21. J. de GROUCHY, C. de NAVA, J. M. CANTU, G. BILSKI-PASQUIER and J. BOUSSER, Modes for clonal evolutions: a study of chronic myelogeneous leukemia. *Amer. J. hum. Genet.* **18,** 485 (1966).
22. Fr. HECHT, J. S. BAJAUT, D. GRUBER and Ph. L. TOUNES, The nonrandomness of chromosomal abnormalities. *New Engl. J. Med.* **271,** 1081 (1964).
23. A. LEVAN and J. J. BIESELE, Role of chromosomes in carcinogenesis as studied in serial tissue culture of mammalian cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **71,** 1022 (1958).
24. J. D. ROELEY, R. K. BLAISDELL and L. O. JACOBSON, Chromosome studies in preleukaemia. I. Aneuploidy of Group C chromosomes in three patients. *Blood* **27,** 782 (1966).
25. A. STEWART, J. WEBB and D. HEWITT, Survey of childhood malignancies. *Brit. med. J.* **1,** 1495 (1958).
26. F. W. GUNZ, P. H. FITZGERALD and A. ADAMS, An abnormal chromosome in chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. med. J.* **2,** 1097 (1962).
27. J. TETER and R. TARLOWSKI, Tumours of the gonads in cases of gonadal dysgenesis and male pseudohermaphroditism. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **79,** 321 (1960).
28. R. T. C. PRATT, The genetics of neurological disorders. In *Neoplasms and Related Disorders.* p. 93. Oxford University Press, London (1967).
29. T. M. SCHROEDER, F. ANSCHÜTZ and A. KNOPP, Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik* **1,** 194 (1964).
30. J. GERMAN, R. ARCHIBALD and A. BLOOM, Chromosomal breakage in a rare and probably genetically determined syndrome of man. *Science* **148,** 506 (1965).
31. J. de GROUCHY, Genetic diseases, chromosome rearrangements and malignancy. *Ann. intern. Med.* **65,** 603 (1966).
32. G. J. TODARO, H. GREEN and M. R. SWIFT, Human diploid fibroblasts transformed with SV-40 or hybrid Adeno-7 x SV-40. *Science* **153,** 1252 (1966).
33. J. M. TOUGH and W. M. COURT-BROWN, Chromosome aberrations and exposure to ambient benzene. *Lancet* **1,** 684 (1965).
34. G. POLLINI and R. COLOMBI, Lymphocyte chromosome damage in the benzene blood diseases. *Med. d. Lavoro.* **55,** 641 (1964).
35. A. FORNI, Chromosome changes due to chronic exposure to benzene. *Proc. XV Intern. Congr. Occupational Hlth, Vienna.* **2,** 437 (1966).
36. M. M. COHEN, M. J. MARINELLO and N. BACK, Chromosomal damage in human leukocytes induced by lysergic acid diethylamide. *Science* **155,** 1417 (1967).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 289–291. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

A Carcinoma of the Cervix Uteri with Hypodiploid and Hypotetraploid Stem-lines

N. B. ATKIN

Department of Cancer Research, Mount Vernon Hospital Northwood, Middlesex, England

RECENT chromosome studies on 5 carcinomas of the cervix uteri showed the presence of a single stem-line in each [1, 2]: although there were wide differences between the karyotypes of these tumours, which had modal chromosome numbers of 44, 47, 48, 60 and 77 respectively, only slight variation was found *within* the tumours. It was possible to select a "stem-line karyotype" for each tumour, and the variation encountered in the tumours mainly took the form of random loss of one or more chromosomes (possibly artefactual) from this karyotype. The incidence of polyploidization was low.

In the present tumour, a slighly more complicated situation has been found: while most of the metaphases are hypotetraploid, with chromosome numbers in the range of 75–83, a minority are hypodiploid, having about 40 chromosomes. Karyotype analysis has been undertaken to try to establish the relationship between these two cell populations.

MATERIALS AND METHODS

The patient, aged 77,was treated by radiation therapy for a Stage III carcinoma of the cervix. Biopsy material obtained before the commencement of treatment for cytogenetic studies was pretreated by a direct method [1]; histologically, the tumour was a poorly-differentiated adenoacanthoma. When the patient was last seen six months after treatment there was evidence of hepatic and pulmonary metastases.

RESULTS

The distribution of chromosome counts showed two distinct modes: while most metaphases were grouped around a mode of 81, there was a smaller mode at 40 chromosomes (Table 1). Several long subacrocentric marker chromosomes were seen in all suitable metaphases (three were commonly present in the hypodiploid cells and 6 or 7 in the hypotetraploid cells). A further abnormal chromosome, a ring chromosome, was seen in most of the hypodiploid metaphases, but on the other hand ring chromosomes were seen in only a *minority* of the hypotetraploid cells (Table 1).

Six metaphases in the hypodiploid range were analysed. Three metaphases with 40 chromosomes showed apparently identical karyotypes (Fig. 1); one metaphase with 41 chromosomes differed only in having an extra D-group chromosome, and one with 39 chromosomes in lacking a C-group chromosome. A metaphase with 42 chromosomes had rather contracted chromosomes; it lacked the ring chromosome but otherwise appeared to differ from those with 40 chromosomes only in having 2 extra D-group chromosomes and one extra No. 2 chromosome.

Table 1. *Distribution of chromosome counts and incidence of ring chromosomes*

		Exact counts							Approximate counts	Total
		39	40	41	42					
Hypodiploid range	Ring chromosome present	1	4	1	—				9	15
	Ring chromosome absent	—	—	—	1				4	5
		75	76	79	80	81	82	83		
Hypotetraploid range	Ring chromosomes Present	—	—	1	—	1	—	—	11	13
	Ring chromosomes absent	3	2	2	6	7	4	3	35	62
Hypo-octoploid range	Ring chromosomes present								1	1
	Ring chromosomes absent								5	5
										101

The karyotypes of metaphases in the hypotetraploid range were more or less duplicates of those in the hypodiploid range, with the notable difference that ring chromosomes (usually in duplicate where present) were only found in about 20 per cent of the metaphases (Table 1; Fig. 2). Protruding chromosome arms, presumably formed by the long arms of the long marker chromosomes, were seen in metaphases and anaphases in a histological section of this tumour (Brandão and Atkin, in preparation).

One metaphase showed the presence of 39 diplochromosomes, no ring chromosomes being seen. Three metaphases, presumably normal cells, showed a normal female diploid karyotype.

Estimation of the DNA content of tumour interphase cells by a photometric method [3] confirmed the presence of two cell populations, the majority of cells having DNA contents corresponding to hypotetraploid chromosome complements, and about 15–20 per cent having approximately half this value.

DISCUSSION

Unlike the 5 cervical carcinomas previously submitted to fairly detailed chromosome analysis [1, 2], the present tumour shows evidence of more than one cell-line. A similar situation to that found in this tumour was however suspected in a few cervical carcinomas among a series on which DNA measurements were made on interphase cells [4]; in these tumours, while the majority of cells were grouped around a modal DNA value corresponding to a high (e.g. hypertetraploid) chromosome number, a minority had values corresponding to approximately half this number. Although it was suspected that the cells with the higher values had been formed by polyploidization of those with the lower values, the precise relationship between the two lines was uncertain in the absence of chromosomal data.

The findings on the present tumour however show a close relationship between the two lines, one being more or less a polyploid of the other. However, there is at least one difference: the absence of ring chromosomes from the majority of hypotetraploid metaphases. It is postulated, therefore, that this tumour, like the 5 cervical carcinomas previously studied, originated from a single cell (the presence of other stem-lines with different karyotypes in regions of the tumours not subject to analysis cannot of course be excluded); it is presumed that this single cell had a low (near-diploid) chromosome number and contained both the 3 long marker chromosomes and the ring chromosome seen in the hypodiploid metaphases. But whereas the high degree of consistency found in the 5 previous tumours suggested that little if any change in the stem-line karyotype had occurred since the single-cell stage, in the present tumour it appears that a new line or perhaps several

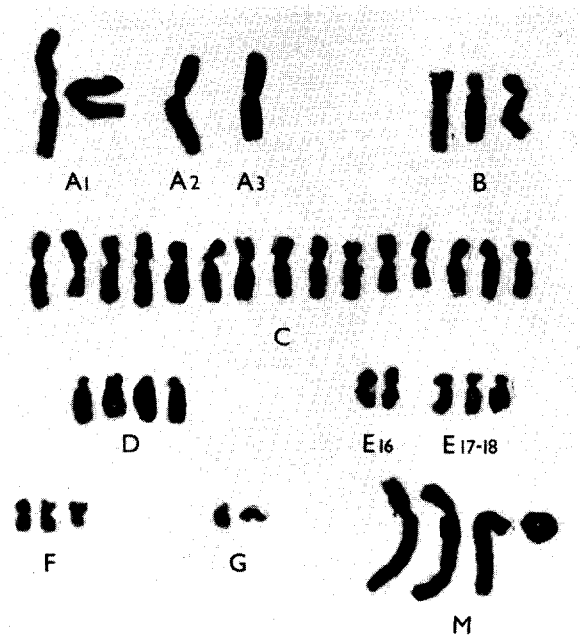


Fig. 1. *Karyotype of metaphase with* 40 *chromosomes.* M=*marker chromosomes, including the ring chromosome* (*right*).

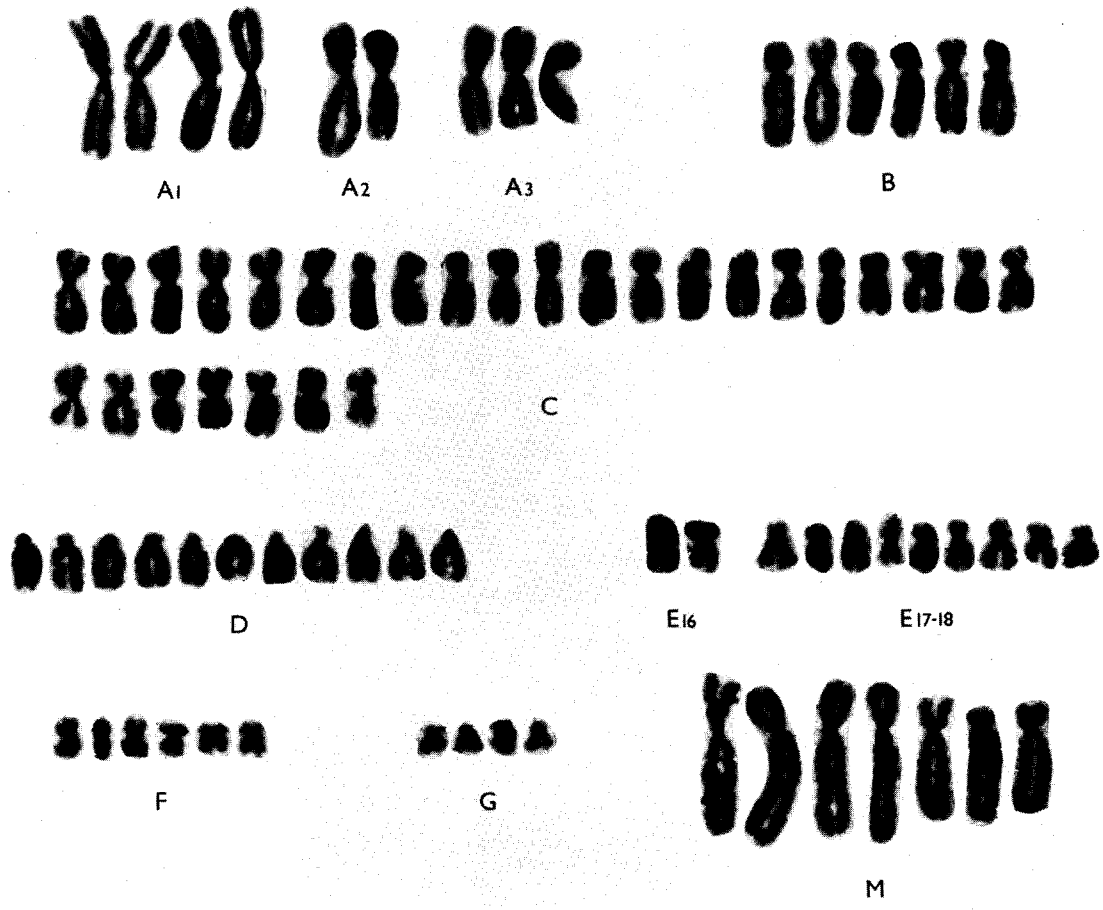


Fig. 2. *Karyotype of metaphase with* 82 *chromosomes.* M=*marker chromosomes.*

(to face p. 290)

lines with closely related karyotypes have arisen in which the chromosomes as a whole have doubled but the ring chromosome has been lost.

Acknowledgements — The author wishes to thank Dr. S. Dische for kindly providing material from his case, Mrs. M. Mason and Miss M. Sears for technical assistance and Mrs. B. J. Langdon for secretarial services.

This work was supported by a grant from the British Empire Cancer Campaign for Research.

RESUME

Contrairement aux résultats d'études antérieures sur 5 *cas de carcinome du col utérin qui avaient mis en évidence une seule lignée cellulaire, le présent travail, basé sur un nouveau cas du même type de tumeurs, a montré la présence de deux lignées principales qui sont associées. Alors que la majorité des métaphases ont environ* 80 *chromosomes, une minorité de mitoses en ont environ* 40. *Les chromosomes marqueurs, de longs acrocentriques, étaient présents dans ces deux lignées, mais un chromosome en anneau, qui était présent dans la plupart des métaphases hypodiploïdes, était observé dans* 20% *seulement des métaphases hypotétraploïdes. Il semble que, pendant le développement de cette tumeur, quelques changements aient eu lieu, par exemple la polyploïdisation des cellules originaires et la perte du chromosome en anneau.*

SUMMARY

In contrast to 5 *previously-studied cervical carcinomas which showed evidence of a single stem-line, the present cervical carcinoma has two related stem-lines. Whereas the majority of metaphases have about* 80 *chromosomes, a few have about* 40. *Long acrocentric marker chromosomes were present in both lines, but a ring chromosome that was present in most of the hypodiploid metaphases was only seen in* 20% *of the hypotetraploid metaphases. It appears that, during the development of the tumour, changes have occurred: polyploidization of the original stem cells and loss of the ring chromosome.*

ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu 5 *früher untersuchten Fällen von Cervical-Karzinom, die das Vorliegen eines einzelnen Zellstammes aufwiesen, hat das hier gezeigte Cervical-Karzinom zwei von einander abhängige Zellstämme. Während die meisten Metaphasen etwa* 80 *Chromosomen enthalten, zeigen einige etwa* 40. *Lange akrozentrische Marker-Chromosome waren in beiden Stämmen vorhanden, aber ein Ringchromosom, das in den meisten hypodiploiden Metaphasen anwesend war, konnte nur in* 20% *der hypotetraploiden Metaphasen gefunden werden. Es scheint, daß es während der Tumorentwicklung Veränderungen gegeben hat: Eine Polyploidisierung der ursprünglichen Stammzellen und ein Verlust des Ringchromosoms.*

REFERENCES

1. N. B. Atkin and M. C. Baker, Chromosome abnormalities as primary events in human malignant disease: evidence from marker chromosomes. *J. Nat. Cancer Inst.* **36,** 539 (1966).
2. N. B. Atkin, M. C. Baker and S. Wilson, Stem-line karyotypes of four carcinomas of the cervix uteri. *Amer. J. Obstet. Gynec*, in press.
3. N. B. Atkin and B. M. Richards, Deoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumours arising at different sites. *Brit. J. Cancer* **10,** 769 (1956).
4. N. B. Atkin, Nuclear size in carcinoma of the cervix: its relation to DNA content and to prognosis. *Cancer* **17,** 1391 (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 293–299. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Cytophotometric Evidence of Change in Nucleolus Associated Chromatin During the Initial Stages of Skin Carcinogenesis by 3,4-Benzpyrene*

J. L. BERNHEIM
Inst. Path. Ontleedk.
Rijksuniversiteit Gent, Belgium

INTRODUCTION

THE transformation of a normal cell into a cell with tumorigenic properties, inheritable by its offspring, can be assumed to take place by a change in the content or expression of its genetic information. It has been shown that benzpyrene and other carcinogens may influence the genome either by direct binding to the DNA [1–7] or by binding to the protein (see review by Heidelberger [8]), which may induce a deletion mutation [9]. These studies are mainly based on biochemical data.

In the present communication, the influence of 3,4-benzpyrene on the cell nucleus was investigated by means of quantitative cytochemical techniques. Since it has been shown in normal cells that the Feulgen-DNA content may show variations in relation to cell function [11, 12], we used the same cytophotometric technique on our material. We have been able to show that, already on the first day and culminating on the fourth and fifth day with a 40% increase, 3,4-benzpyrene induces a significant increase in the Feulgen-DNA content of mouse skin cells (Fig. 1). The Feulgen-DNA content normalizes by the 7th day after the application of 3,4-BP [13].

In order to test the validity of these results, we tried to study the Feulgen-DNA firstly in the nucleolar apparatus and in the extranucleolar chromatin separately, secondly at different hydrolysis time and, thirdly, with manual scanning, the latter technique enabling us to avoid distributional error.

MATERIALS AND METHODS

Mice of the O_{20}AL strain, born within a 5-day interval, 2–2½-months-old, were used. An intercapsular area of 2 cm² was shaved. A solution of 2% 3,4-benzpyrene in acetone was applied to the shaved skin area of 4 experimental mice by 2 strokes of a fine brush. Four controls were painted in the same way with the solvent. Four days after the painting, a skin biopsy was performed and the fragments, care being taken to process them simultaneously, were fixed in alcohol 75 parts, formalin 20 parts and chilled acetic acid 5 parts, dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 5 and 10μ of controls and treated skin were placed on the same slide, in order to standardize staining conditions. Hydrolysis in 1N HCl was performed at 58±1°C during times varying from 4 min to 18 min. The

*This work was supported by a grant from the *Oeuvre Nationale Belge de Lutte contre le Cancer* Brussels, Belgium.

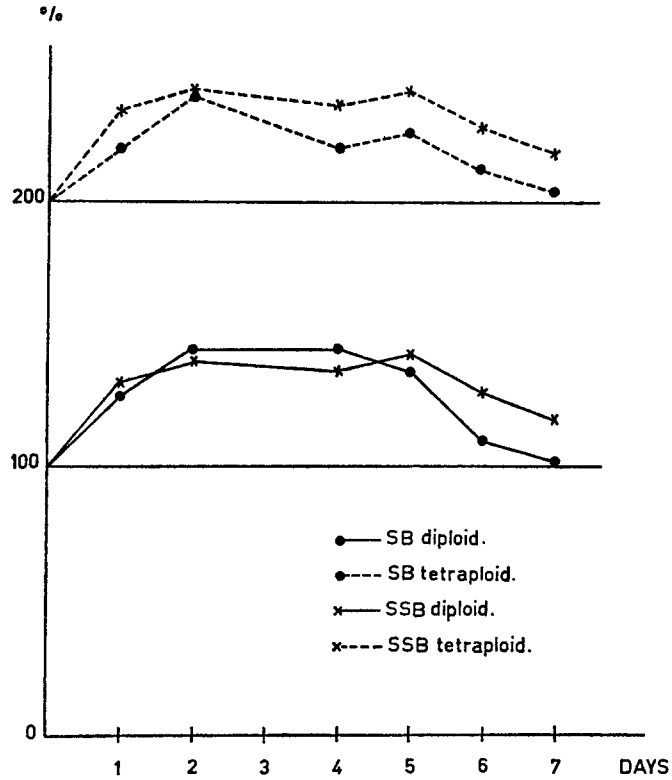


Fig. 1. *Feulgen-DNA content after* 1 *painting with* 3,4-*BP.*
(% increases over pool diploid nuclei of controls = 100%)
SB = *basal layer* SSB = *suprabasal layer.*

sections were then stained with Schiff's reagent for 45 min and washed 2 min in each of three freshly prepared baths of a solution containing 1 part of 1N HCl, 1 part of 10% $NaHSO_3$ and 20 parts of H_2O.

The nucleolar apparatus was measured in 20 nuclei per animal in 4 controls and 4 treated mice in the 5 sections by means of the Lison visible light cytophotometer [10].

The total DNA and extranucleolar DNA were measured in 20 nuclei from each of 2 controls and 2 treated mice, by a manual scanning method described by Roels [10]. This technique enables measurements through the nucleolar and extranucleolar region. The statistical significance of the results was measured by the non-parametric Kolmogarov-Smirnov and 2 χ^2 tests. The rejection region was chosen at 0·001.

RESULTS

On the 4th day, the number of tetraploid cells is 37% of the total number of measured nuclei. This must be born in mind in evaluating some of the following results.

(a) *The nucleolar apparatus* (Fig. 2)

The hydrolysis curves of 4 controls brought together into one pool, and the nucleolar apparati of the four treated mice, which has also been pooled, both showed 2 distinct optima and, secondly, the curve of the carcinogen-treated skin nucleolar apparatus was seen to run at a distinct 1γ higher level at all times.

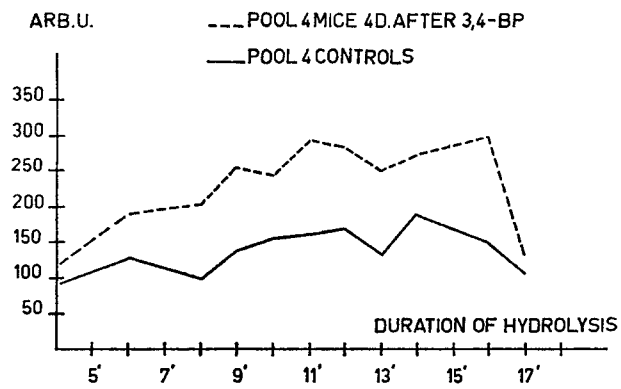


Fig. 2. *Hydrolysis curve of the nucleolar apparatus* 4 *days after* 3,4-*BP.*
(in arbitrary Feulgen-DNA units; measured on 5μ sections).

The first optimum of the treated nucleoli appeared at 11 min hydrolysis, and had a value which was superior by 74% to the first optimum of controls, which occurred at 12 min ($P<0{\cdot}001$). At 13 min, both curves showed a distinct dip, which represented a statistically significant ($P<0{\cdot}001$) decrease. The second optimum of treated nuceloli took place at 16 min, and represented a statistically significant ($P<0{\cdot}001$) increase of 56% over the second optimum of controls, which was situated at 14 min. The shift of the first optimum was statistically insignificant, whereas the shift of the second was highly significant.

The differential hydrolysis curves of treated nucleolar apparati belonging to diploid and tetraploid nuclei is shown in Fig. 3. They

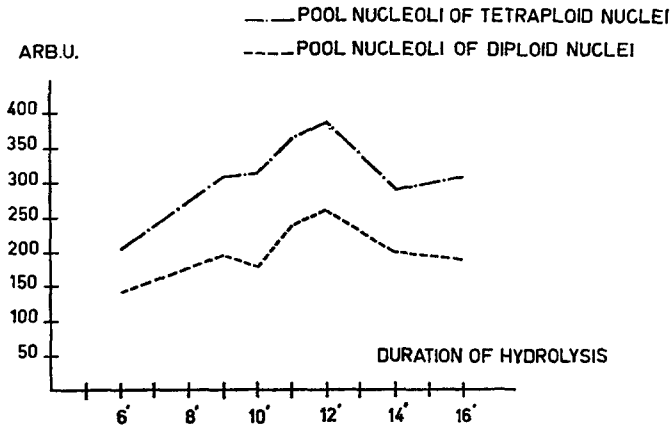


Fig. 3. *Differential hydrolysis curve of the nucleolar apparatus belonging to diploid and tetraploid nuclei* 4 *days after* 3,4-*BP.*
(in arbitrary Feulgen-DNA units; measured on 10μ sections).

represent the pooled data of 2 mice. The measurements were made on 10μ sections, and thus they also contain some extranucleolar chromatin. The two curves run a parallel course, and show only one optimum at 12 min, where the nucleolar apparati belonging to a tetraploid nucleus, which amount to 37% of the total measured nucleoli, have a value 48% above controls.

(b) *The extranucleolar chromatin* (Fig. 4)

The curves of the diploids of controls and of 3,4-BP treated nucleoli run a roughly parallel course and show 2 optima, respectively at 9 min and at 12 min hydrolysis time. At 10 min, both curves show a significant dip and attain values which are no longer statistically different. At the first optimum of 9 min, the treated nuclei show a DNA-content which is 43% above the level of controls, whilst at the second optimum of 12 min, the difference is 27%. These increases are statistically significant ($P<0{\cdot}001$).

The tetraploids follow a slightly different course, their second optimum falling at 11 min and 12 min (there is no statistically significan-difference between these two hydrolysis timet values). The increases over a level twice the diploid value of controls* at respectively 9, 11 and 12 min, are 9, 11 and 0%.

(c) *Total nucleus Feulgen-DNA content*

Figure 5 shows the hydrolysis-curves of total DNA measured by manual scanning expressed as the sum of nucleolar and extranucleolar chromatin.

They correspond roughly with those of the extranucleolar chromatin, the curves of controls and treated skin both showing 2 optima at respectively 9 min and 12 min, a dip to statistically non-different values at 10 min and a parallel course. Again, the second optimum of tetraploids starts at 11 min, i.e. 1 min earlier than for diploids. At the optima, the increases of treated skin nuclei are 38% for the first, 39% for the second ($P<0{\cdot}001$). At 9 min, 11 min and 12 min, the optima of the tetraploids attain a level respectively 4%, 13% and 6% over a level twice that of control diploids.

DISCUSSION

Summing up our results, extranucleolar and nucleolus associated chromatin showed 2 optima. 3,4-BP did not influence the hydrolysis time in extranucleolar chromatin: treated and untreated animals both had their optima at 9 min and 12 min. The carcinogen did change the optima in nucleolus associated chromatin:

*In untreated skin, the tetraploids were too few in number to give a representative control value. Therefore, the double of the mean value of controls was taken as reference.

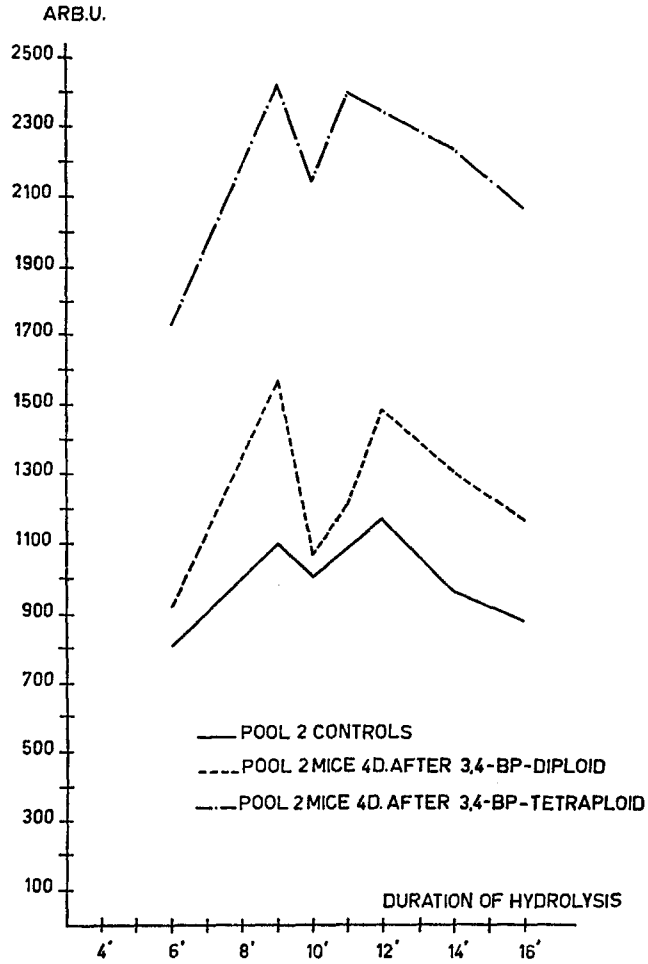


Fig. 4. *Hydrolysis curve of the extranucleolar chromatin* 4 *days after* 3,4-*BP.* (in arbitrary Feulgen DNA-units).

in control animals, the optima were observed at 12 min and 14 min, whilst in 3,4-BP treated mice, they were situated at 11 min and 16 min. Hence, the hydrolysis curves of nucleolar and extranucleolar chromatin of the same nucleus are different. The shift in nucleolus associated chromatin may be due to a different relation between DNA and protein [10–12]. Recent observations reported by Frenster [14] and Allfrey [15] suggest clearly that the DNA-histone complex is different in active and inactive chromatin. The differences in hydrolysis time may well be the sequence of these alterations in binding between DNA and histones. Hence, shifts in hydrolysis time may indicate different states of repression and activation of the DNA.

The Feulgen-DNA content of nucleolus associated chromatin, extranucleolar chromatin and total nuclei were increased, since the hydrolysis curves never overlap and since the differences observed are statistically significant.

In order to investigate if the observed increase in Feulgen-DNA content corresponds to a real increase in DNA, several factors must be considered.

The reported binding of 3,4-BP to mouse skin DNA *in vivo* [5] might influence the hydrolysis curve. It seems logical, however, that this binding would affect the shape of the hydrolysis curve rather than its height. With the scanning method, no such change in the curve was observed. Moreover, preliminary observations on autoradiograms of the skin after treatment with ^{3}H-3,4-BP show the presence of the label only in the cytoplasm [15]. Therefore, we do not consider a direct effect of the carcinogen a likely explanation.

We have also investigated the influence of mitotic activity. The mitotic count in the basal layer rose from 5·9% in controls to 17·3% on the 4th day after 3,4-BP-treatment. Nuclei in G_2 cannot influence our results since we separated diploid and tetraploid nuclei. A greater number of nuclei in the S phase might increase the means of the diploids and decrease the mean of the tetraploids, since one half of the nuclei with an intermediary DNA-

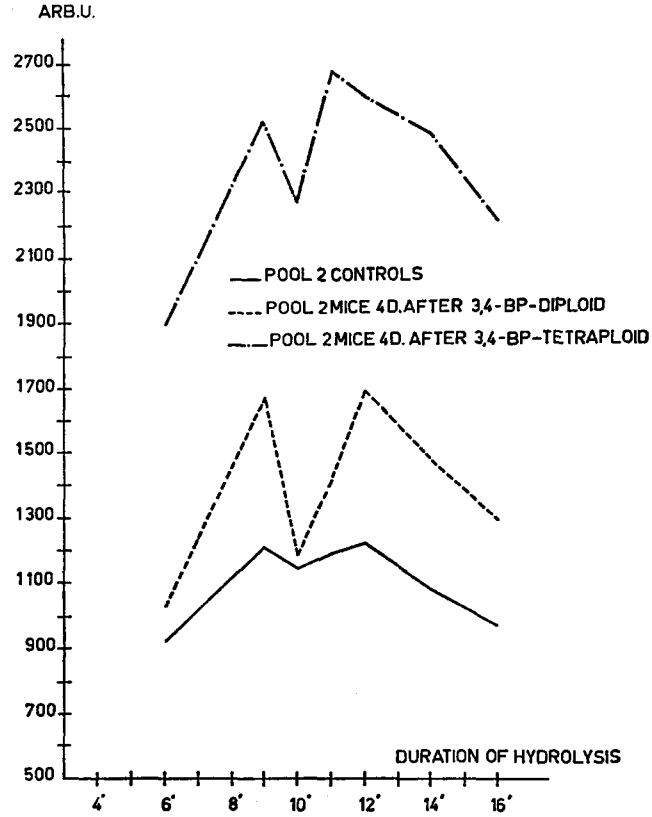


Fig. 5. *Hydrolysis curve of total nuclear DNA* 4 *days after* 3,4-*BP.*
(Sum of nucleolar apparatus and extranucleolar chromatin in arbitrary Feulgen-DNA units).

content had to be classified as diploids and the other half as tetraploids. Their "under-estimation-effect" on tetraploids must be more important than their "overestimation-effect" on diploids, since both classes undergo the influence of an equal number of intermediary values, while the tetraploids represent only 37% of the total number of measured cells. In spite of this, the tetraploids still showed increases over the calculated control values.

Secondly, on the 1st day after painting, neither mitotic figures nor an increase in the number of tetraploids cells (Fig. 2) was observed in the supra-basal layer. These nuclei, however, showed a significant increase in Feulgen-DNA-content (Fig. 1).

In the nucleolar apparatus, Fig. 3 shows that the tetraploids did not have a double charge of DNA and that their DNA content can account for only a relatively small part of the increase observed in treated skin. For these reasons, we can rule out mitotic activity as an important cause of the increase in Feulgen-DNA-content.

Our results, therefore, suggest that the increase in Feulgen-DNA reflects a real increase in DNA-content.

The genetic function of DNA seems to be incompatible with its quantitative variability. Biochemical data obtained in plants [17] indicate the existence of 2 fractions: a stable genetic fraction and an unstable metabolic fraction. Our histochemical data fit in with these findings. We do not believe, however, that the 2 maxima of our curves correspond to these 2 fractions. They are only the expression of a different relation between DNA and the protein. Our results indicate the possibility of local replication of DNA. They fit in with observations suggesting amplification of information in some genetic loci [17–22].

RESUME

—La mesure cytophotométrique de la teneur en ADN des noyaux de l'épiderme de jeunes souris mâles après une seule application d'une solution de 2% *de* 3,4-*benzopyrène dans de l'acétone, a révélé une augmentation qui disparaît le* 7^{e} *jour.*

—Nous avons entrepris de mesurer la teneur en ADN:

(1) *du noyau entier*

(2) *de la chromatine associée au nucléole*

(3) *de la chromatine extranucléolaire des noyaux de la couche basale,* 4 *jours après*

l'application du carcinogène. Les coupes furent colorées au Schiff après des temps d'hydrolyse en HCl 1N allant de 4–18 min. Les courbes d'hydrolyse montrèrent une augmentation de l'ADN-Feulgen du noyau entier, de l'appareil nucléolaire, et de la chromatine extra-nucléolaire. Les 3 courbes d'hydrolyse présentèrent 2 optimums, aussi bien dans les tissus de contrôle que dans les tissus traités au carcinogène. L'application de 3,4-BP produisit un décalage des optimums d'hydrolyse de l'appareil nucléolaire, tandis que la courbe d'hydrolyse de la chromatine extranucléolaire demeura inchangée. Nous interprétons un tel décalage du temps d'hydrolyse comme indiquant une modification de l'association entre l'ADN et les protéines nucléaires. L'augmentation de la teneur en ADN-Feulgen ne peut être expliquée par des changements de la cinétique de la population cellulaire, et semble refléter une amplification locale de l'information génétique.

SUMMARY

—Cytophotometric measurements of the Feulgen-DNA content of nuclei of skin-cells in young male mice after one single application of 2% 3,4-benzpyrene in acetone disclosed a significant increase which levelled off after approximately 7 days.

—Measurements of:

(1) *whole nucleus*

(2) *nucleolus associated chromatin*

(3) *extranucleolar chromatin*

were undertaken on basal layer nuclei 4 days after the application of the carcinogen, and Schiff-stained after hydrolysis durations in 1N.HCl ranging from 4 to 18 minutes. The hydrolysis-curves showed an increase of Feulgen-DNA in whole nuclei, nucleolus associated chromatin and extra-nucleolar chromatin. The three hydrolysis curves attained 2 optima in control tissue as well as in carcinogen-treated tissue. 3,4 BP-treatment induced a shift of the optima in nucleolus associated chromatin. The hydrolysis curve in the extra-nucleolar chromatin remained unchanged. Such a shift in hydrolysis-time is interpreted as reflecting differences in DNA–protein binding. Cell population kinetics are shown to be insufficient in the explanation of the Feulgen-DNA increase, which was interpreted as a net increase suggesting localized amplification of genetic information.

ZUSAMMENFASSUNG

Cytophotometrische Messungen des Feulgen-DNS-Gehaltes der Kerne von Hautzellen junger männlicher Mäuse nach einzeitiger Applikation von 2 % 3,4 Benzpyren in Aceton zeigten einen deutlichen Anstieg, der sich nach ungefähr 7 Tagen ausglich. Es wurde gemessen; Der gesamte Kern, das zum Nucleolus gehörende Chromatin, das extranukleoläre Chromatin. Die Messungen erfolgten an Basalschichtkernen 4 Tage nach der Applikation des Carcinogens und Schiff-Färbung nach Hydrolyse in l-N-HCl für die Dauer von 4 bis 18 Minuten. Die Hydrolysekurven zeigten einen Anstieg der Feulgen-DNS im gesamten Kern, dem Nucleoluschromatin und dem extranucleolären Chromatin. Die drei Hydrolysekurven erreichten zwei Maxima, im Kontrollgewebe ebenso wie im carcinogen behandelten Gewebe. 3,4 Benzpyren-Behandlung führte zu einer Verschiebung der Maxima im Nucleoluschromatin. Die Hydrolysekurve im des extranucleolären Chromatins blieb unverändert. Eine solche Verschiebung in der Hydrolysezeit wird auf Unterschiede in der DNS-Proteinbindung zurückgeführt. Die Kinetik von Zellpopulationen erweist sich als ungenügend für die Erklärung der Veränderung der Feulgen-DNS, die auf einen echten Anstieg zurückgeführt wird, der an eine lokalisierte Vermehrung der genetischen Information denken läßt.

REFERENCES

1. J. Booth and E. Boylabd, The reaction of the carcinogenic dibenzcarbazoles and dibenzacridines with purines and nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* **12,** 75 (1953).
2. E. Boyland and B. Green, The interaction of polycyclic hydrocarbons and nucleic acids. *Brit. J. Cancer* **16,** 507 (1962).
3. M. Liquori, A. B. De Lerma, F. Ascoli, C. Botre and M. Trasciatti, Interaction between DNA and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. molec Biol.* **5,** 521 (1962).

4. E. Boyland, B. Green and S. L. Liu, Factors influencing the interaction of polycyclic hydrocarbons and deoxyribonucleic acid. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **87,** 653 (1964).
5. P. Brookes and P. D. Lawley, Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acid of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature (Lond.)* **202,** 781 (1964).
6. P. O. P. Ts'O and P. Lu, Interaction of nucleic acids. II. Chemical linkage of the carcinogen 3,4 benzpyrene to DNA induced by photoradiation. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **51,** 272 (1964).
7. J. K. Ball, J. A. McCarter and M. F. Smith, The interaction *in vitro* of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* **103,** 275 (1965).
8. C. Heidelberger, Studies on the molecular mechanism of hydrocarbons carcinogenesis. *J. cell. comp. Physiol.* **64,** suppl. 1, 129 (1964).
9. E. C. Miller and J. A. Miller, *In vivo* combinations between carcinogens and tissue constituents and their possible role in carcinogenesis. *Cancer Res.* **12,** 547 (1952).
10. I. Agrell and H. A. Bergquist, Cytochemical evidence for varied DNA complexes in the nuclei of undifferentiated cells. *J. cell. Biol.* **15,** 604 (1962).
11. H. Roels, Etude de l'intensité de la réaction de Feulgen dans le noyau de la cellule thyroïdienne chez le rat blanc. *Exp. Cell Res.* **40,** 459 (1965).
12. H. Roels and M. P. Roels-De-Schrijver, La courbe d'hydrolyse de la réaction de Feulgen dans l'appareil nucléolaire et la chromatine sexuelle de la thyroïde du rat blanc. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* **159,** 2262 (1965).
13. J. L. Bernheim, data to be published (1967).
14. J. H. Frenster, A model of specific de-repression within interphase chromatin. *Nature (Lond.)* **206,** 1269 (1965).
15. V. G. Allfrey, Control mechanisms in ribonucleic acid synthesis. *Cancer Res.* **26,** 2026 (1966).
16. H. Roels, Personal communication (1966).
17. M. Sampson, A. Katoh, Y. Hotta and H. Stern, Metabolically labile deoxyribonucleic Acid. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **50,** 459 (1963).
18. T. S. Painter and A. M. Taylor, Nucleic acid storage in the toad's egg. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **28,** 311 (1942).
19. M. Izawa, V. G. Allfrey and A. E. Mirsky, Composition of the nucleus and chromosomes in the lampbrush stage of the new oocyte. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **50,** 811 (1963).
20. O. L. Miller, Extrachromosomal nucleolar DNA in amphibian oocytes. *J. cell. Biol.* **23,** 60A (1964).
21. H. G. Keyl, A demonstrable local and geometric increase in the chromosomal DNA of Chironomus. *Experientia* **21,** 191 (1965).
22. A. Lima-De-Faria and M. J. Moses, Ultrastructure and cytochemistry of metabolic DNA in tipula. *J. cell Biol.* **30,** 177 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 301–307. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Cell Population Kinetics in Human Acute Leukaemia*

F. GAVOSTO, A. PILERI, V. GABUTTI and P. MASERA
Haematology Laboratory, General Medical Clinic
University of Turin, Italy

THE LABELLING indices (L.I.) of normal bone marrow blast cells are constantly around 50% (Thymidine 1 hr *in vitro*). Mean values for the blasts of acute leukaemia, however, are of the order of 10% and values change significantly from case to case [1–7]. The highest labelling indices occur in acute leukaemias in expanding phase and the lowest in steady state forms [8]. Moreover, most cases also present significant differences between the labelling indices of bone marrow blasts and peripheral blood blasts, the latter values being the lower [8–10].

In 1964 we observed that the cells of any acute leukaemia blast population are markedly heterogeneous and several blast classes can always be distinguished by size [4]. At the one extreme we have large-diameter cells with several nucleoli and greater basophilia and at the other much smaller blasts with few nucleoli and less basophilia. We found immediately that this heterogeneity is proliferative as well as morphologic. Labelling indices become steadily higher with increasing cell diameter. If the distribution of the cell diameters in a given blast population is divided into 3 equal classes (large, medium and small blasts) and the labelling index evaluated for each class, we find that the index of the large blasts is often the same as that of normal blasts. In the small cell class, there is an almost constant absence of labelling.

*This work was supported by Euratom (contract 061-66-3BIOI) and by CNR (grant 115/469/720).

These differences in the degree of proliferative activity among the blast cells in the various classes are much greater than the differences in diameter normally observable among the same type of cells in synthesis phase and in non-synthesis phase (in practice the G_1 phase). This has been confirmed experimentally in two ways: (1) we measured the mean diameter of labelled and non-labelled normal bone marrow blasts, namely blasts which will differentiate and change cell type, and found the difference in diameter to be about 10% [4]; (2) we evaluated the mean diameter of a cohort of blasts labelled *in vivo* by pulse labelling and measured the diameter straight after the first division (after the first halving of the number of grains). Thereafter when the same blasts were measured in G_1 phase the difference was found to be 20% (Table 1). On the other hand the variance range of mean diameter over an entire blast population is generally from *n*

Table 1. *Mean diameters of bone marrow labelled blasts*

	A	B
Case 1	14·7 μ±0·40	10·8 μ±0·32
Case 2	17·7 μ±0·40	13·4 μ±0·20
Case 3	17·9 μ±0·70	14·6 μ±0·58

A = 1 hr after thymidine-H_3 injection (cells in *S* period).
B = 13–17 hr after thymidine-H_3 injection (cell just after the first halving of grains, i.e. in G_1 period).

to $2n$. It can therefore be concluded that we are dealing with a real cell heterogeneity which is not completely dependent on various moments of the mitotic cycle. Consequently, the blast population of every case of acute leukaemia could be divided into a proliferating and a non-proliferating compartment.

Figure 1A shows the percentage of blast cells of various diameter and their respective labelling indices. Even if a correction factor of 15% is considered for the cells in the *S* period, it can be observed that in steady state conditions about 70% of the blast population is made up of non-proliferating cells. This may be regarded as the equivalent of the maturation compartment of the normal bone marrow (or chronic myeloid leukaemia) population.

were taken from bone marrow and blood at different times. The autoradiographic technique employed has already been described [2–4].

Figure 2 shows bone marrow labelling index behaviour after pulse labelling. Subsequent bone marrow sampling within 17 hr of precursor administration showed the labelling index to be increased although it was never doubled.

The fact that the labelling index does not double immediately after mitosis means that leukaemic marrow is not a closed system even if we consider only its proliferating compartment. As we shall see later, cells can be discharged from leukaemic marrow into the peripheral blood after every mitotic division,

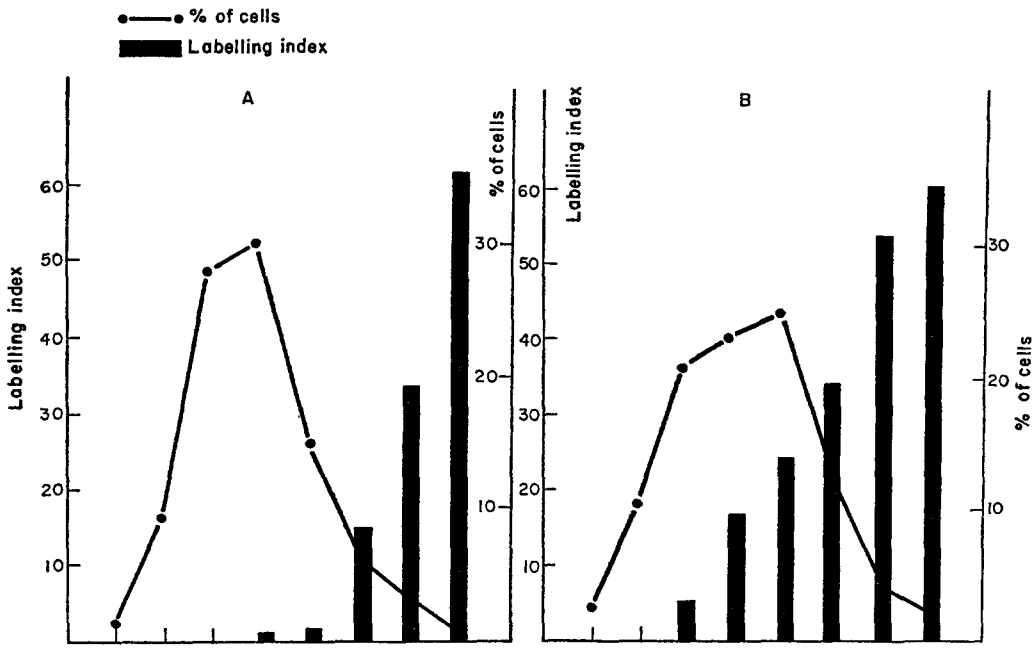


Fig. 1. *Percent blast distribution and* in vitro *labelling indices in* 8 *classes with different diameters in two cases of acute leukaemia in steady state* (*A*) *and in expanding phase* (*B*).

Figure 1B shows, on the contrary, that in cases in expanding phase the proliferating compartment grows bigger. In these forms, the expansion of the leukaemic population may be due to the fact that, after division, a higher number of the large cells retain their parental characteristics, namely they remain large after dividing. In other words, the *in vivo* transformation from large blast cells to small after division (as we will discuss later) might itself set the pace of blast population expansion [8].

We carried out *in vivo* pulse labelling in three non-treated cases of acute myeloblastic leukaemia. Thymidine -H3 was injected i.v. (0·2 μc/g of body weight; sp. act. 2c/mM); samples

and this also applies to the youngest blasts. Evaluation of the part played by extramedullary leukaemic haemopoiesis will naturally be of great importance in this regard.

Figure 2 shows the variations in the mean number of grains per cell labelled at different times after precursor administration. By the 10th and 17th hour the number of grains halved in all cases. This confirms that the population quota already in *S* or on the point of entering *S* at the moment of precursor administration has duplicated. At the first observation (1 hr) grains were widely distributed. Later control showed that the most intensely labelled cells had disappeared while the complement of less intensely labelled cells

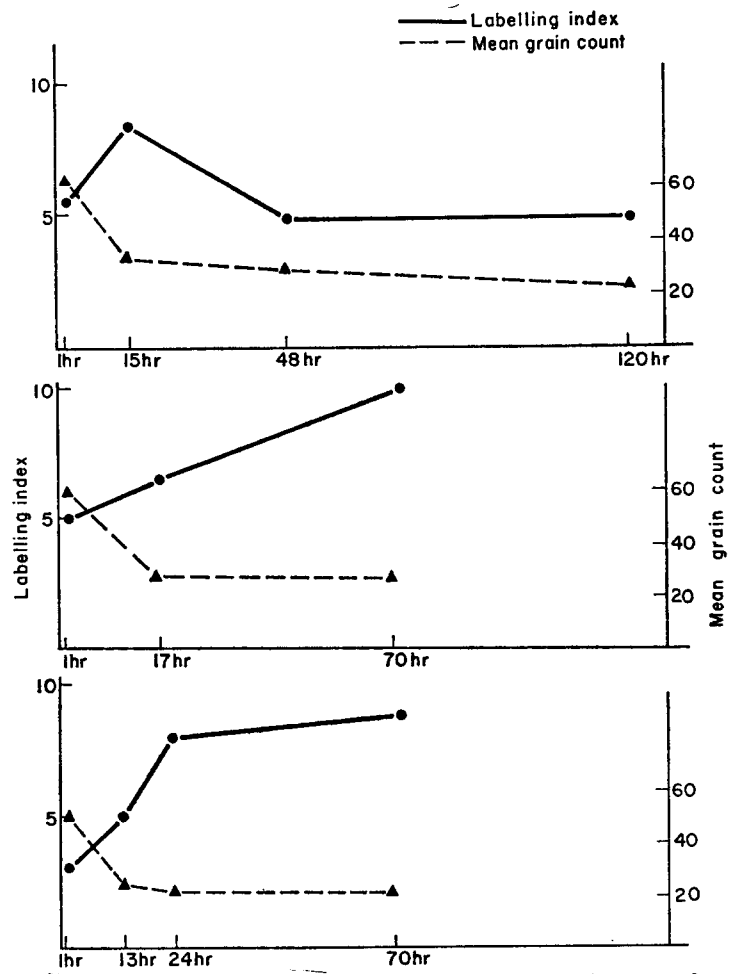


Fig. 2. Percent of bone marrow labelled blast cells and their mean grain count after thymidine-H_3 *injection.*

was correspondingly increased. At later stages the mean number of grains did not vary further up to the 3rd day. In one case which we studied until the 5th day there was, on the contrary, a further reduction. The constancy in the mean number of grains in two cases means that over this period no further division or only a very limited number took place. Therefore, the contemporaneous increase in the labelling index observed in 2 cases can be attributed to a preferential discharge of non-labelled cells during this time.

In the case where the number of grains was seen to be reduced at the 5th day it is clear that some cell divisions had taken place. In theory, doubling time would be 4 days if halving is observed between the 15th hour and the 5th day. But as we shall see later, generation time can be calculated in the order of about 40 hr. Clearly then only some of the cells divided in this case, namely the growth factor, is less than 1.

In Fig. 3 are shown the percentages of mitotic figures from one case labelled at different times. One hour after thymidine administration no labelled mitoses were detected; after 1 hr 45 min the labelling index of the mitoses was 25%, after 3 hr 73·4%, after 4 hr 30 min 96%, after 7 hr 30 min 96%, after 15 hr 97%, after 17 hr 30 min 65%, after 24 hr 12·5%. The *S* period therefore lasted about 16 hr. The generation time of proliferating blasts can be calculated at about 40 hr because the *S* period lasts 16 hr and we have a L.I. of about 40% 1 hr after thymidine administration.

Three classes of blasts of different diameter were studied within the cell population of all cases. After 1 hr the highest labelling indices were observed in the large class (Class I) and the lowest in the medium class (Class II) (Fig. 4). The small class (Class III) presented no labelling. The percentage distribution of cells of the three classes remained constant in all cases for the duration of the experiment. After the first division, namely between the 10th and 17th hours, there was a sharp reduction in the labelling index of large cells and this was accompanied by an increase of the L.I. of medium blasts and by the appearance of labelled small blasts (Fig. 4).

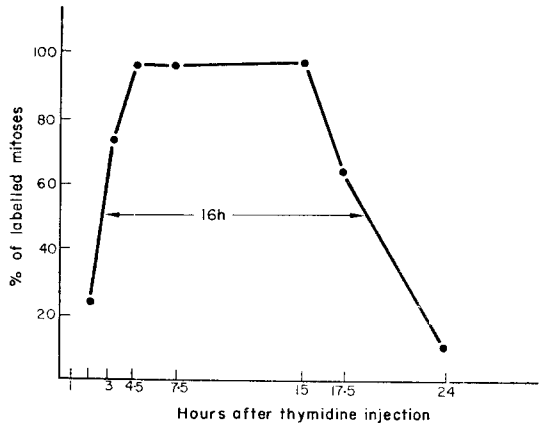


Fig. 3. Percent of labelled mitotic figures in the bone marrow of an acute leukaemia patient after a single injection of thymidine-H_3.

Subsequently the L.I. of large blasts continues to fall, although the fall is much less sharp, whereas the L.I. of medium and small blasts shows a further slight increase in the latter stages.

The behaviour of the mean number of grains is shown in Fig. 4. The mean number of grains of medium and small cells was already halved with respect to mean starting value at the 10th hour; in the case of the large cells halving was completed only at the 17th hour. In later stages, the mean number of grains of the medium and small classes did not change further (as we observed in the case of the population as a whole), whereas a slow fall persisted in the large cells. In case 2 the mean number of grains of large cells halved again between the 2nd and 5th days.

An important finding here is the sharp fall in labelled large blasts following the first division and the corresponding increase of medium and small labelled blasts. It is clear that the latter derive from the former and that between the 10th and 17th hours DNA synthesis, mitosis and subsequent transformation into smaller blasts were completed. The transformation of large blasts to small blasts

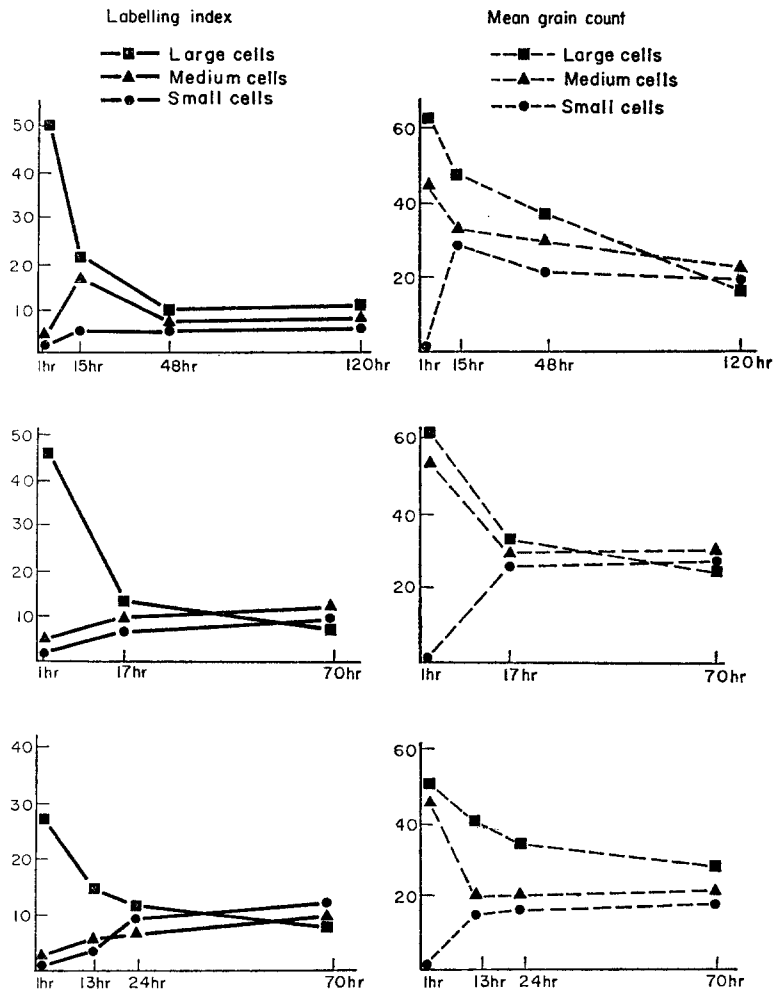


Fig. 4. Labelling index and mean grain count of bone marrow large, medium and small blast cells after thymidine-H_3 injection.

therefore seems to be immediately postmitotic. Furthermore, the fact that the labelling index of the large blasts falls considerably, added to the observation that about 10% of the population's large blasts remains constant (namely that the compartment of large blasts does not expand) means that after division more than 50% of the daughter cells become small. It is evident that from this point of view the large blast class does not display self-maintaining kinetics. In subsequent stages the labelling index of the large blasts still falls although the fall is less sharp. The shallower fall is due to the fact that there are fewer synchronous mitoses of labelled cells in later stages because the wave of cells labelled with pulse labelling has become "desynchronized". After the first division, in later stages we still find a marked fall in the mean number of grains in large blasts, but this fall is only observed in large blasts, not in medium or small ones. Such a finding might mean that after the first mitotic wave some large blasts which were already labelled at zero time are still able to divide and that a part of the large blasts (less than 50% as already seen) retain their parental nature after division and do not beget smaller daughter cells.

Cellular fluxes between the various classes of blast cells of different diameter in the first 10–17 hr after precursor administration were analysed in all 3 cases of acute leukaemia [11]. The model already proposed for normal granulocytopoiesis [12] was employed for this purpose.

Since most newly formed medium and small blasts are discharged into the blood during the postmitotic period of acute leukaemia, we allowed for cell discharge during the period studied when calculating cellular fluxes. Discharged cells were counted on the basis of the number of grains lost per 1000 cells divided by the mean number of grains per cell of labelled cells in peripheral blood.

Table 2 shows the relative numbers, labelling indices and proliferation rates for each class of blast cells of various diameter. In all cases, the sum of the proliferation rates proved to be decidedly lower than the total efflux from the proliferating compartment.

As already mentioned with regard to the time variations of the labelling indices, this also means that the proliferating cells compartment does not behave as a self-maintaining system. In other words, most of these cells give rise only to smaller diameter cells which no longer proliferate.

Recently some Authors [10–14] posed the problem whether or not acute leukaemia blast cells are stem cells. The kinetic study of acute leukaemia blast cells and, specifically, of the fraction of blasts which have a proliferative

Table 2. Fluxes in acute leukaemia blast populations

		Large cells	Medium cells	Small cells
Case 1	Relative number	79	347	574
	Labelling index	66·5%	1·1%	0%
	Proliferation rate	3·28	0·25	0
	Influx		4·70	1·15
	Sum of the proliferation rates:		3·53	
	Total influx in the non proliferating compartment:		5·85	
		Large cells	Medium cells	Small cells
Case 2	Relative number	86	433	481
	Labelling index	45·9%	2·8%	0%
	Proliferation rate	2·46	0·77	0
	Influx		2·92	1·33
	Sum of the proliferation rates:		3·23	
	Total influx in the non proliferating compartment:		4·25	
		Large cells	Medium cells	Small cells
Case 3	Relative number	101	651	249
	Labelling index	23·8%	1·1%	0%
	Proliferation rate	1·50	0·47	0
	Influx		3·45	1·18
	Sum of the proliferation rates:		1·97	
	Total influx in the non proliferating compartment:		4·63	

activity similar to that of normal blasts, gives clear evidence that blast cells do not behave as stem cells from a kinetic point of view, namely that the proliferating blast compartment is not self-maintaining but needs to be fed from another precursor compartment.

RESUME

La prolifération des cellules blastiques de la leucémie aiguë humaine a été étudiée par l'incorporation in vitro *et* in vivo *de la thymidine H_3, en utilisant la technique autoradiographique.*

Des index de marquage élevés, pour l'ensemble de la population, furent observés dans les formes ayant une population de blastes en phase d'expansion.

Une étude analytique de la population blastique de chaque cas a amené à identifier deux compartiments, l'un proliférant, l'autre non-proliférant.

In vivo, *après marquage instantané par la thymidine tritiée, on observa la transformation des blastes de grande taille en blastes plus petits. Il apparut aussi que ce changement de taille s'observait après des divisions cellulaires, et que des blastes de plus petite taille, sans aucune activité proliférative, pouvaient apparaître après le toute première division.*

L'étude de la cinétique des blastes marqués in vivo, *dans ces conditions, suggère que le compartiment des blastes proliférants ne se présente pas comme un système auto-entretenu, mais plutôt comme un compartiment à la fois de multiplication et de maturation.*

SUMMARY

The proliferative activity of the blast cells of human acute leukaemia was evaluated by in vitro *and* in vivo *incorporation of thymidine-H_3 and autoradiography.*

Higher labelling indices (L.I.) of the total population were observed in the forms with the blast population in expansion phase.

Analytical study of the blast population of each single case led to the identification of two compartments, one proliferating and one non-proliferating.

In vivo, *after pulse labelling with thymidine-H_3, a transformation of large blast cells to smaller was observed. It was also observed that this change in size occurs after cell divisions and that after the very first division smaller size blasts with no proliferative activity whatsoever may appear.*

Study of the kinetic behaviour of blasts labelled in vivo *after pulse labelling suggests that the pool of proliferating blasts does not behave as a self-maintaining system, but rather as a multiplicating-maturating compartment.*

ZUSAMMENFASSUNG

Die proliferative Aktivität von Blasten der menschlichen akuten Leukämie wurde durch in vitro *und* in vivo*-Inkorporation von ^3H-Thymidin und Autoradiographie bestimmt. Ein höherer Markierungsindex (M.I.) der gesamten Population wurde beobachtet bei Formen, in denen sich die Blastenpopulation in einer expansiven Phase befand. Analytische Untersuchungen der Blasenpopulation für jeden Einzelfall führte zur Identifizierung von zwei Compartments, von denen eines proliferiert und eines nicht proliferiert.* In Vivo*-nach Einzeitmarkierung mit ^3H-Thymidin wurde ein Übergang von großen Blastzellen zu kleineren beobachtet. Es wurde beobachtet, daß diese Veränderung der Zellgröße nach einer Zellteilung erfolgt und daß nach der ersten Teilung Blasten mit kleinerer Größe ohne proliferative Aktivität auftreten. Eine Untersuchung des kinetischen Verhaltens von Blastzellen, die mit Einzeit-Markierung* in vivo *markiert waren, weist daraufhin, daß der Pool proliferierender Blasten sich nicht wie ein selbst unterhaltendes System verhält, sondern eher wie ein multiplikatives Reifungscompartment.*

REFERENCES

1. F. Gavosto, A. Pileri and G. Maraini, Incorporazione di timidina marcata con tritio negli elementi del midollo osseo normale e leucemico. Indagini autoradiografiche. *Haematologica* **44,** 977 (1959).

2. F. GAVOSTO, G. MARAINI and A. PILERI, Proliferative capacity of acute leukaemia cells. *Nature* (*Lond.*) **187,** 611 (1960).
3. F. GAVOSTO, G. MARAINI and A. PILERI, Nucleic acids and protein metabolism in acute leukaemia cells. *Blood* **16,** 1555 (1960).
4. F. GAVOSTO, A. PILERI, C. BACHI and L. PEGORARO, Proliferation and maturation defect in acute leukaemia cells. *Nature* (*Lond.*) **203,** 92 (1964).
5. C. G. CRADDOCK and G. S. NAKAI, Leukaemic cell proliferation as determined by *in vitro* deoxyribonucleic acid synthesis. *J. clin. Invest.* **41,** 360 (1962).
6. A. M. MAUER and V. FISHER, *In vivo* study of cell kinetics in acute leukaemia. *Nature* (*Lond.*) **197,** 574 (1963).
7. S. A. KILLMANN, E. P. CRONKITE, J. S. ROBERTSON, T. M. FLIEDNER and V. P. BOND, Estimation of phases of the life cycle of leukaemic cells from labelling in human beings *in vivo* with tritiated thymidine. *Lab. Invest.* **12,** 671 (1963).
8. A. PILERI, V. GABUTTI, P. MASERA and F. GAVOSTO, Proliferative activity of the cells of acute leukaemia in relapse and in steady state. *Acta haemat.* (*Basel*) in press.
9. A. M. MAUER and V. FISHER, Comparison of the proliferative capacity of acute leukaemia cells in bone marrow and blood. *Nature* (*Lond.*) **193,** 1085 (1962).
10. S. A. KILLMANN, Proliferative activity of blast cells in leukemia and myelofibrosis. Morphological differences between proliferating and non-proliferating blast cells. *Acta med. scand.* **178,** 263 (1965).
11. F. GAVOSTO, A. PILERI and V. GABUTTI, Kinetics of cell population in acute leukemias. *Exp. Hemat.* **13,** 7 (1967).
12. H. M. PATT and M. A. MALONEY, An evaluation of granylocytopoiesis. In *Cell Proliferation* (a Guinness Symposium), p. 157. Blackwell, Oxford (1963).
13. E. P. CRONKITE, Kinetics of leukemic cell proliferation. In *Perspectives in Leukemia* (Symposium of the Leukemia Society, New Orleans, Louisiana 1966), in press.
14. A. M. MAUER and V. FISHER, Characteristics of cell proliferation in four patients with untreated acute leukaemia. *Blood* **28,** 428 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 309–314. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Intercellular Variation in the Amounts of DNA, RNA and Mass in a Leukemia and a Fibroblast Cell Population *in vitro*

D. KILLANDER

Institute for Medical Cell Research and Genetics, Medical Nobel Institute, Karolinska Institutet, Stockholm 60, *Sweden*

EARLY cytochemical studies on human carcinoma *in vivo* showed a larger difference in the amounts of nucleic acid and protein between individual cells in neoplastic cell populations than between individual cells in normal cell populations [1, 2]. In agreement with these studies it was found that *in vitro* cell lines derived from neoplastic sources exhibited a larger intercellular variability with respect to the amounts of nucleic acid and protein than cell lines derived from normal tissues [3]. This observation was investigated further in the present work by studying the factors which cause the overall cytochemical variability in proliferating cell populations. The principle aim was to obtain more information about the question of why neoplastic cell populations exhibit a larger cytochemical variability than normal cell populations. For this purpose two cell lines were selected. One cell line was of neoplastic origin (mouse leukemia cell line CCRF-1210) and one was of non-neoplastic (mouse fibroblast cell line L-929) origin. The CCRF-1210 cell population was characterized by a high and the L-929 cell population by a low intercellular variation in the amounts of DNA, RNA and protein [3–5].

The cells were cultured directly on quartz slides and representative areas of the slide cultures were photographed with time lapse cinematography. The cells were fixed after about 3 days in culture. The time lapse film was used for the determination of the rate of cell multiplication in the growing cell population (population doubling time), the generation times of individual cells, and the age of the fixed cells. These cells were then analyzed individually for dry mass by microinterferometry and RNA and DNA content by ultraviolet and Feulgen microspectrophotometry [6–8].

The three top histograms in Fig. 1 illustrate the overall intercellular variation in the amounts of DNA, RNA and protein (dry mass) in the fibroblast population. Schematically there are three sources of the overall cytochemical variability, *viz.*:

Factor A. Cells in *different* stages of the cell growth and duplication cycle contain different amounts of nucleic acid and protein. This is illustrated by the interphase DNA, RNA and protein synthesis curves in Fig. 2. This variation factor will thus cause a distribution of values between the post-mitotic (m_0) and premitotic (m_T) limit values (Fig. 1, top). Since the amount of DNA, RNA and protein

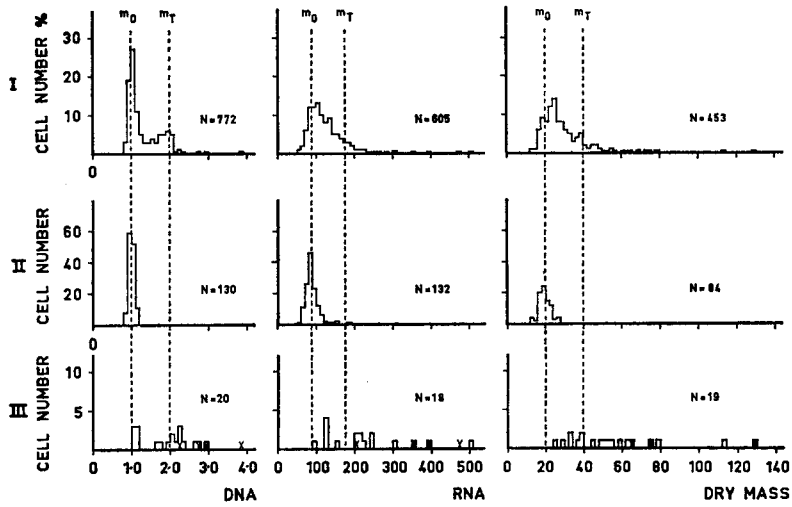


Fig. 1. *Histograms of relative DNA, RNA and dry mass values of individual mouse fibroblasts (L-cells). Cytochemical analysis of: I. randomly selected cells in the cell population, II. cells in the initial stage of interphase (=cells younger than 2·25 hr), III. non-participating cells (=cells older than 30 hr=1·5 times the mean generation time) (open bars) and binucleated cells (x).*

doubles in the average cell of the population during interphase [10] the $m_T : m_T$ ratios are 1 : 2 in all these parameters.

Factor B. Cells in the *same* stage of the cell growth and duplication cycle contain different amounts of nucleic acid and protein. This source of variation has also been referred to as momentary variation. The initial stage of interphase and the mitotic stage are fairly well line II, the momentary DNA, RNA and defined stages in the cell cycle and suitable for studies on momentary variation. In Fig. 1, line II, the momentary DNA, RNA and protein (mass) variations of the initial stage of interphase are illustrated. The RNA and mass distributions are somewhat skewed to the right. This might be explained by synthesis of RNA and protein during the age interval (0–2·25 hr) used for the characterization of the initial stage of interphase. Such a synthesis would also result in a too large momentary variation. Therefore, in comparative studies of cell populations with respect to momentary variation, it is advisable to use the same age interval for the characterization of the initial stage of interphase. Since, in this case, the length of G_1 periods are longer than 2·25 hr, the momentary DNA variation could not be influenced by any synthesis of DNA.

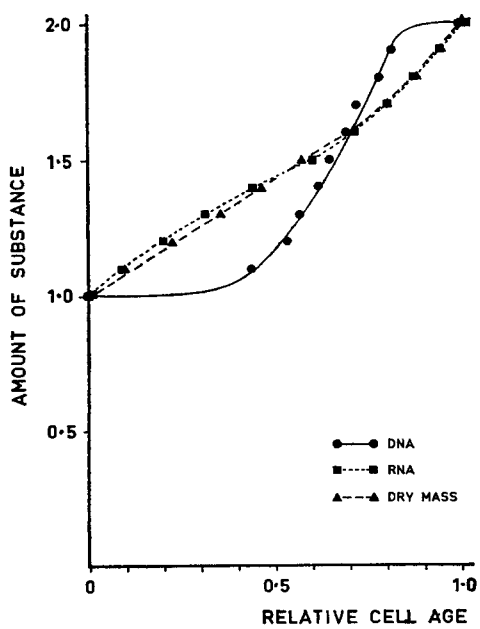


Fig. 2. *Amounts of DNA, RNA and dry mass in mouse fibroblasts plotted against interphase time* [9].

Possible causes for momentary variation have been discussed in previous reports [4, 5, 10]. Momentary RNA and mass variation might be genetically conditioned, i.e. a given cell population might be a genetically mixed population in which the subpopulations are characterized by specific RNA and mass values. In addition, within a given proliferating cell population there is a discrepancy between the increase in bulk of protein and nucleic acid in the single cell during interphase *and* the specific synthetic processes leading to the initiation of mitosis [11, 12]. This discrepancy results in a momentary RNA and mass variation in the mitotic stage of the cell cycle. Unequal distribution of material to the daughter cells at mitosis is another cause of momentary RNA and mass variation [4, 10]. This inequality of distribution is combined with

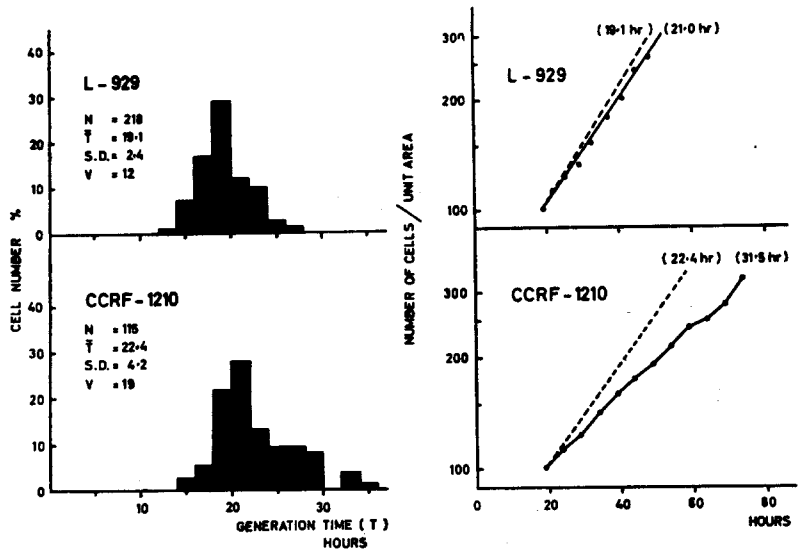


Fig. 3. Histograms of generation times of individual cells in the fibroblast (L-929) *and the leukemia* (CCRF-1210) *cell population (left). Growth curve of the fibroblast and the leukemia cell population (right). The dashed line represent the slope of a population doubling time equal to the mean generation time.*

mitotic RNA and mass variation, and they together are the cause of momentary RNA and mass variation in the initial stage of interphase. Momentary DNA variation can also be caused by unequal distribution of DNA at mitosis. Polyploidization is another source of this variation.

Factor C refers to cell abnormality, which includes non-participating cells (abnormally old cells, some of which never divide), multinucleation, cell fusion etc. Most of these cells never divide but continue their synthesis of nucleic acid and protein and will thus contribute to the extreme DNA, RNA and mass values in the cell population (Fig. 1, line III).

The leukemia and the fibroblast cell populations were compared with respect to the rate of cell multiplication and the A, B and C variability factors. The cells multiplied asynchronously in both populations (Fig. 3).

Table 1. Cytochemical variability data for the L-929 *and the* CCRF-1210 *cell lines*

	DNA		RNA		Mass	
	L-929	CCRF-1210	L-929	CCRF-1210	L-929	CCRF-1210
Intercellular variation (coeff. of variation)	29	42	37	43	36	51
Premitotic : postmitotic ratio	1·9	2·3	1·9	1·8	2·0	2·3
Momentary variation in the initial stage of interphase (coeff. of variation)	6·4	29	22	40	16	50
Unequal distribution of material at mitosis						
mean of all positive d% values	1·8	11	5·5	18	6·6	12
standard deviation*	2·5	11	5·1	19	9·6	19

*Standard deviation $(s) = \sqrt{\left[\frac{\Sigma (d\%)^2 - \frac{(\Sigma d\%)^2}{n}}{n-1}\right]}$. Since the sum of all positive and negative $d\%$ values is zero $(s) = \sqrt{\frac{\Sigma (d\%)^2}{n-1}}$. The numbers of observations (n) are given in Fig. 4.

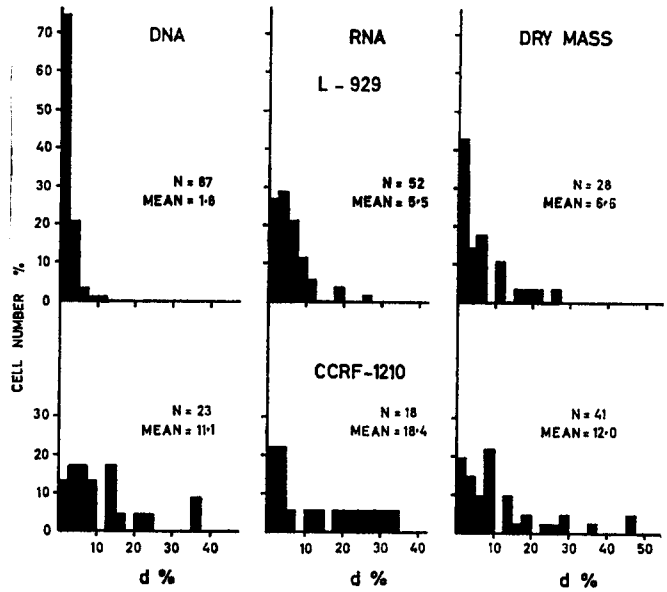


Fig. 4. Histograms of the unequal distribution of DNA, RNA and mass to the daughter cells at mitosis in the fibroblast (L-929) *and the leukemia* (CCRF-1210) *cell line. Only the positive* d% *values (cf. text) are shown, and the means of these values are given. The error of measurement was* 2% *(coefficient of variation).*

The intercellular variation in generation time was higher ($P<0{\cdot}01$) in the leukemia than in the fibroblast cell line. In the leukemia cell line there was also a larger discrepancy between the population doubling time and the mean generation time. This greater discrepancy is due to a larger number of non-participating cells in the leukemia than in the fibroblast cell population (see below). In both cell lines the ratio of the mean premitotic to the mean postmitotic DNA, RNA and mass values was 2 : 1 (Table 1). Thus, one source of the overall cytochemical variability, i.e. individual cells having reached different stages of the cell cycle (factor A), was the same in both populations. However, momentary variation (factor B) was considerably higher in the leukemia population than in the fibroblast population (Table 1) and so was the number of abnormal cells (factor C) which was 8·0% and 2·6% of the total number of cells in the two respective populations. The B and C factors are therefore likely to be the main causes of the greater overall variability in the neoplastic cell line.

The higher momentary variation in the leukemia than in the fibroblast cell population was investigated further by determining the distribution of cell material to the daughter cells at mitosis. Unequal distribution of substance to the daughter cells at mitosis results in the formation of one bigger ($m+d$) and one smaller ($m-d$) daughter cell, where m is the mean amount of substance of the two daughter cells and d is the amount of unequally distributed material. The d value was obtained from the difference ($=2d$) in the DNA, RNA and mass content between the two cells of a sister pair in the initial stage of interphase. In order to make the data from all the sister cell analyses comparable d was expressed in per cent of m: $d\% = (d/m) \times 100$. Figure 4 and Table 1 show that there are greater and more frequent unequal distributions of DNA, RNA and mass in the leukemia than in the fibroblast cell line. So this is one explanation for the higher momentary variation in the initial stage of interphase in the leukemia than in the fibroblast cell population. It might also explain the greater number of non-participating and binucleated cells in the leukemia cell line, since the magnitude of the error in distribution of material to daughter cells at mitosis might be of importance to newly divided cells if they are to grow and divide normally.

In summary, it was found that factor A caused the same intercellular variation with respect to the amounts of DNA, RNA and mass in the leukemia and the fibroblast cell line. The greater cytochemical variability in the former cell line was due to factors B and C. Unequal distribution of DNA, RNA and protein to daughter cells at mitosis might be of importance for the increased influence of the B and C factors in the neoplastic cell line.

These studies were supported by grants from the Wallenberg Foundation and the Swedish Cancer Society. The biophysical parts of the

work have been supported by grants from the Swedish Medical Research Council (Project 12X-531-03) and the Swedish Natural Science Research Council (Grant 8-11).

RESUME

En accord avec des études cytochimiques préliminaires sur des tumeurs humaines in vivo, *il fut établi que des lignées de cellules, dérivées de tissus néoplasiques et cultivées* in vitro, *présentaient des variations plus grandes de la quantité en acides nucléiques que les lignées de cellules normales dont elles dérivaient. En utilisant des méthodes micro-spectro-photométriques et micro-interférométriques associées à la cinématographie accélérée, ces observations ont été étendues par l'étude des causes de la variabilité cytochimique dans les populations de cellules en culture. Le principal objet de cette étude était de savoir pourquoi les cellules néoplasiques présentent cette plus grande variabilité cytochimique. Dans une population de cellules en prolifération, il existe deux causes principales de la variation intercellulaire de la composition en acides nucléiques et en protéines: (A) Des cellules à des stades différents de la croissance et du cycle mitotique contiennent des quantités différentes d'acides nucléiques et de protéines. (B) Des cellules, à un même stade, contiennent également des quantités différentes d'acides nucliéques et de protéines. En outre, des anomalies cellulaires (facteur C), par exemple des cellules non participantes, contribuent à la variabilité cytochimique. On observa que le facteur A causait la même variation dans une population normale et dans une population néoplasique. La variabilité plus grande, dans cette dernière, était due aux facteurs B et C. Une distribution inégale de l'ADN, de l'ARN et des protéines aux cellules-filles, lors de la mitose, semblerait contribuer largement à l'influence plus grande des fractions B et C dans les lignées néoplasiques.*

SUMMARY

In agreement with early cytochemical studies on human tumours in vivo, *it was found that* in vitro *cell lines derived from neoplastic sources exhibited a larger intercellular variation in the amounts of nucleic acid and protein than cell lines derived from non-neoplastic sources. Using microspectrophotometric and microinterferometric methods in combination with time lapse cinematography this observation was investigated further by studying the factors which cause the overall cytochemical variability in cell populations in culture. The principal aim was to obtain more information about the question why neoplastic cell populations exhibit a larger cytochemical variability than normal cell populations. In proliferating cell populations there are two main sources of overall intercellular variation in the amounts of nucleic acid and protein. (A) Cells in* different *stages of the cell growth and duplication cycle contain different amounts of nucleic acid and protein. (B) Cells in the* same *stage of the cell growth and duplication cycle contain different amounts of nucleic acid and protein. In addition, cell abnormality (factor C) e.g. non-participating cells, was found to contribute to the overall cytochemical variability. It was found that factor A caused the same variation in a normal and a neoplastic cell population. The greater cytochemical variability in the latter was due to factors B and C. Unequal distribution of DNA, RNA and protein to daughter cells at mitosis might be of importance for the increased influence of the B and C factors in the neoplastic cell line.*

ZUSAMMENFASSUNG

In Übereinstimmung mit früheren cytochemischen Studien an menschlichen Tumoren in vivo *fand man, daß Zellstämme neoplastischen Ursprungs eine größere interzelluläre Variation in der Menge der Nukleisäuren und des Proteins aufwiesen als Zellstämme nicht neoplastischer Herkunft. Mit Hilfe der Mikrospektrophotometrie und der Mikrointerferometrie in Verbindung mit einer Zeitrafferkinematographie wurden diese Beobachtungen weiter verfolgt, wobei die Faktoren geprüft wurden, die die cytochemische Variabilität von Zellpopulationen in der Kultur beeinflussen. Es wurde vorallem versucht herauszufinden, warum neoplastische Zellpopulationen eine größere cytochemische Variabilität haben als normale Populationen. Es gibt zwei Hauptursachen für die Unterschiede im Nu-*

kleinsäuren-und Proteingehalt. (A) Zellen in verschiedenen Wachstums-und Verdopplungszyklusstadien enthalten unterschiedliche Mengen von Nukleinsäure und Protein. (B) Zellen in der gleichen Phase von Wachstum und Duplikation enthalten verschiedene Mengen von Nukleinsäure und Protein. (C) Abnormale nicht in der Teilung beteiligte Zellen tragen zur Erhöhung der cytochemischen Variabilität bei. Faktor (A) trifft für neoplastische und normale Zellen zu. Bei den letzteren ist Faktor (B) und (C) für die größere Variabilität verantwortlich. Eine ungleichmäßige Verteilung von DNS, RNS und Protein zwischen den Tochterzellen bei der Mitose kann einen Einfluss auf die erhöhte Bedeutung der Faktoren (B) und (C) beim neoplastischen Stämmen haben.

REFERENCES

1. T. Caspersson and L. Santesson, Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumours. *Acta Radiol. Suppl.* **46** (1942).
2. T. Caspersson, *Cell Growth and Cell Function.* Norton, New York (1950).
3. T. Caspersson, G. E. Foley, D. Killander and G. Lomakka, Cytochemical differences between mammalian cell lines of normal and neoplastic origins. Correlation with heterotransplantability in Syrian hamsters. *Exp. Cell Res.* **32,** 553 (1963).
4. D. Killander, Intercellular variations in generation time and amounts of DNA, RNA and mass in a mouse leukemia population *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **40,** 21 (1965).
5. D. Killander, Intercellular variability in normal and neoplastic cell populations *in vitro*. A quantitative cytochemical study. *Thesis,* Almqvist-Wiksell, Uppsala, Sweden (1966).
6. T. Caspersson and G. Lomakka, Scanning microscopy techniques for high resolution quantitative cytochemistry. *N.Y. Acad. Sci.* **97,** 449 (1962).
7. G. Lomakka, A rapid scanning and integrating cytophotometer. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **VI,** 47 (1965).
8. G. Lomakka, A rapid scanning and integrating microinterferometer. *Acta. histochem. (Jena) Suppl.* **VI,** 393 (1965).
9. A. Zetterberg and D. Killander, Quantitative cytochemical studies on interphase growth. II. Derivation of synthesis curves from the distribution of DNA, RNA and mass values of individual mouse fibroblasts *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **39,** 22 (1965).
10. D. Killander and A. Zetterberg, Quantitative cytochemical studies on interphase growth. I. Determination of DNA, RNA and mass content of age determined mouse fibroblasts *in vitro* and of intercellular variation in generation time. *Exp. Cell Res.* **38,** 272 (1965).
11. D. M. Prescott, Relations between cell growth and cell division. *Exp. Cell Res.* **9,** 328 (1955).
12. M. M. Swann, The control of cell divisions: A review. I. General mechanisms. *Cancer Res.* **17,** 727 (1957).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 315–319. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

In Vivo Proliferation of Heterotransplanted Human Cancer Cells*

DAVID M. GOLDENBERG, ERICH MÜLLER and SIEGFRIED WITTE
Cancer Research Laboratory, Department of Medicine, University Clinics, and Department of Pathology, University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Federal Republic of Germany

THE TRANSPLANTATION of human cancer to a host of a different species dates back to the very beginnings of tumor transplantation. In spite of the encouraging reports of Greene using the anterior chamber of the eye [1] and the brain [2], of Toolan for the subcutaneous space of conditioned rats [3, 4], and of the research groups in Boston with the hamster cheek pouch [5–8], transplantation studies with human tumors are few in number. At the present time, not many human neoplasms can be serially propagated *in vivo*, regardless of host, site or method used. Although some proliferation of almost any type of cancer material can be obtained in the first transfer, very few human tumors are now available for transplantation on a regular and predictable basis. Except for the groups mentioned, few laboratories have indulged, on the basis of the literature, in an appraisal of the hamster cheek pouch as a primary site for human tumor transplantation.

After taking up this task and reviewing various methods of host immunosuppression, we have at this date established five serially transplantable tumors derived from human cancer material; preliminary accounts of the transplantation history and growth characteristics of some of these have already been reported [9; 10]. GW-39 and GW-77, our first two human tumor systems particularly convenient for study, are colonic cancers resembling each other both histologically and biologically, and are now in their 33rd and 25th passages, respectively. Our third tumor system, GW-127, is derived from a human ovarian carcinoma and has a much more rapid growth rate and malignant character, both in its original host and in the hamster, than the other two bowel tumors; it is now in its 34th animal transfer. Whereas, therefore, GW-39 and GW-77 exhibit an expansive growth pattern in the hamster, as is customary for such xenogeneically growing human tumor systems, GW-127 is a striking exception and thus the subject of this communication.

MATERIALS AND METHODS

Ten-day-old GW-127 tumors of the 14th cheek pouch passage in unconditioned hamsters were carefully excised and freed of blood and necrotic areas, and homogenized by hand in a solution of physiological saline supplemented with penicillin and streptomycin, making a final tumor suspension of 10% (w/v). Ten hamsters received 0·1 ml in both their cheek pouches, seven animals received 0·03 ml intracerebrally by the technic reported elsewhere [11], and seven hamsters each received 0·1 ml subcutaneously at the right lower quadrant of the abdomen, intraperitoneally, and intramuscularly to the right

*Supported in part by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft*

thigh. Hamsters of both sexes weighing 40–50g and fed standard animal pellets supplemented with biweekly rations of carrots were used.

At the time of spontaneous death, all organs were removed and fixed in 10% formalin for microscopic study. Histological sections were made of at least four levels and stained with hematoxylin and eosin, with cresyl-violet, and according to van Giesson.

RESULTS

Transplantation to the cheek pouch

Hamsters injected with GW-127 into their cheek pouches showed macroscopic evidence of tumor growth 3 days later. Tumor proliferation is so rapid that the entire cheek pouch was filled with well vascularized tumor masses between 7 and 9 days after inoculation, after which invasion through the cheek pouch wall takes place. After about 12 days, large tumors can be seen protruding out of the ventral neck region (Fig. 1), indicating, upon histological examination, that spread to the local lymph nodes has occurred (Fig. 2). The next site of tumor growth was the lungs, where the picture of a subpleural lymphangiotic carcinomatosis is seen (Fig. 3). Most animals expired between 12 and 20 days post implantation.

Transplantation to the subcutaneous space

Since tumor proliferation in this region almost invariably resulted in intraperitoneal carcinomatosis (Fig. 4), little could be differentiated morphologically between sc or ip inoculation.

Transplanation to the peritoneal cavity

Once tumor cells are present intraperitoneally, be it by direct injection or by secondary growth after im or sc implantation, almost every organ in this cavity is involved, either by continuous extension externally or by spread via the lymphatics or the blood. Hemic metastasis can be seen occasionally in the form of sinusiodal tumor spread in the liver (Fig. 5), while the typical lymph-vessel carcinomatosis already witnessed in the lungs is again present. Continuous spread to some livers could be observed in the form of a subcapsular infiltration of tumor cells (Fig. 6). Further dissemination has also been encountered in the peritubular region of the kidneys (Fig. 7), in the adrenal cortex (Fig. 8), and in more distant lymphnodes. Even portions of the gastrointestinal tract, such as the pancreas (Fig. 9), the small intestine's submucosa (Fig. 10), and, within the thorax, the esophagus (Fig. 11) were invaded externally. Continuous tumor invasion from without could also be seen to trespass the spleen's capsule (Fig. 12), making it appear as if no internal organ is destined to escape this tumor's growth vigor. At the time of death, which varied between 12 and 17 days, the peritoneal cavity was filled with much hemorrhagic exudate containing tumor cells. No tumor cells were found in the brains.

Transplantation to the leg musculature

Prior to invasion of the peritoneal cavity, im growth, which was also quite invasive in nature (Fig. 13), likewise resulted, yet less widespread, in metastasis to the spleen (Fig. 14), liver, lungs and regional lymphnodes. At the time of spontaneous death, 13–18 days after transplantation, tumor cells could not be observed in the genital organs, kidneys, adrenals or brains.

Transplantation to the brain

Intracerebral inoculation of GW-127 tumor cells resulted in rapid proliferation in the cerebrospinal spaces and in the injection canal itself. From these points on, contiguous invasion of the brain tissue could be seen (Fig. 15). Neurological symptoms of increased intracranial pressure appeared as early as 5-days post transplantation. At the time of death, almost all animals showed extensive lung atelectasis and tumor growth resembling that seen after transplantation to the other sites mentioned. In one hamster, metastasis to the sinusoidal space of the liver was also found (Fig. 16), whereas all other organs were microscopically free of tumor cell invasion.

DISCUSSION

The usual critique against the use of transplantable tumors, regardless of etiology or species-origin, is that they almost never metastasize, thus not being comparable models for studying human neoplasia. GW-127, a tumor derived from a human carcinoma and maintained in serial passage in unconditioned golden hamsters, represents an important exception for tumor cell spread takes place by both continuous and discontinuous routes. Noteworthy further is that a quite regular metastatic picture witnessed was a lymphangiotic carcinomatosis in the subpleural region of the lungs, resulting in widespread tumor invasion of lung tissue and extensive atelectasis.

This was seen in almost all animals, regardless of whether the site of tumor inoculation was the cheek pouch, the brain, the subcutaneous space of the abdomen, the leg musculature or the peritoneal cavity. Invasion and infiltration by contiguous extension is the characteristic growth pattern of this neoplasm. After im growth without evidence of direct extension to the peritoneal cavity, tumor spread to the liver and to the spleen could be observed, thus suggesting hemic metastasis. The more predominant form of metastatic spread, however, would seem to be via the lymphatics. In contrast to the tumor cells seen enlodged in the lung vessels of hamsters transplanted intracerebrally with GW-39 and GW-77 tumor cells, thus indicating that invasion of cerebral vessels had taken place [12, 13], GW-127 cells implanted to the brain resulted in spread to the lungs via the lymphatics. As a result of rapid proliferation and spread of GW-127 within the cerebrospinal spaces, early extension through the foramina of the base of the skull to the perineural and perivascular lymphatics, and thereafter to the mediastinal lymphatics, seems plausible. The question of tumor cell spread from the cheek pouch to the regional lymph nodes and thereafter to the lungs, i.e. whether initially by continuity-invasion or by true discontinuous metastasis, cannot be resolved on the basis of the evidence at hand and shall therefore be the subject of further experimentation. Thus the GW-127-hamster host system is not, as sometimes suggested for other heterografted tumors, similar to an *in-vivo* tissue culture, but is a true malignant neoplasm exercising its innate capacity for invasion and metastasis in its new natural environment.

Regarding the possibility of tumor cell transformation under prolonged passage in alien hosts, the unique proliferative vigor witnessed for GW-127 leads us to question whether perhaps a change in the direction of loss of species-identity has taken place. Whereas we have found that human antigenicity has been retained by all three human tumors discussed here to the same extent, in spite of their being serially transplantable in unconditioned hamsters and at various body sites [12, 14], evidence is now accumulating, thanks to the karyological studies of Drs. Haemmerli and Schmid of Zürich [15], that the GW-127 tumor resembles the hamster karyotype. If confirmed, this certainly would help explain the growth behavior of this tumor in the hamster.

That karyotypic instability is an intrinsic property of human tumors has already been well documented [16–18]. After heterologous transplantation, a degree of adaptation to the new physiological milieu occurs, so that chromosomal changes do not seem unlikely. It is conceivable that the cells transferred in our GW-127 tumor system now have a mixture of chromosomes derived both from the tumor and its hamster host; indeed such intraspecies hybridization has already been shown in tissue culture [19–21]; or the tumor's human karyotype might have become completely lost, so that the initially human tumor cells would now have the hamster genotype. Another possible explanation is that the serial heterotransplantability of a human neoplasm may be due to viral oncogenesis, in which case the karyotype of the transplanted tumor would resemble the host's genotype while retaining in many respects its original phenotype (morphological characteristics). Yet, if one of these postulates is true, this would be the exception and not the rule for heterografted human tumors. Why different tumors behave differently in new hosts and have perhaps new properties after serial passage provides, to be sure, much room for speculation and further investigation, and certainly has bearings, if only indirectly, on the process of neoplasia itself. The prolonged *in-vivo* passage of human tumors provides an opportunity to observe, under experimental conditions, the growth potentials of a heterogeneous population of cancer cells while perhaps permitting in isolated examples transformations in the evolution of malignant tumors to occur.

RESUME

Le caractère prolifératif et l'extension tumorale d'une nouvelle tumeur transplantée, dérivée d'un carcinome de l'ovaire humain, GW-127, sont décrits après sa transplantation chez le hamster non conditionné, aux sièges suivants: abajoue, tissu sous-cutané, cavité péritonéale, musculature de la cuisse et cerveau. Une extension, continue et discontinue, put être démontrée microscopiquement. La dissémination métastatique la plus fréquente se faisait par les lymphatiques, mais des métastases hématogènes furent aussi observées dans le foie, les surrénales et la rate. L'implantation intracérébrale provoquait un envahissement des espaces cérébrospinaux et du tissu cérébral lui-même. Presque tous les animaux, indépendamment du siège de l'implantation, avaient des métastases pulmonaires

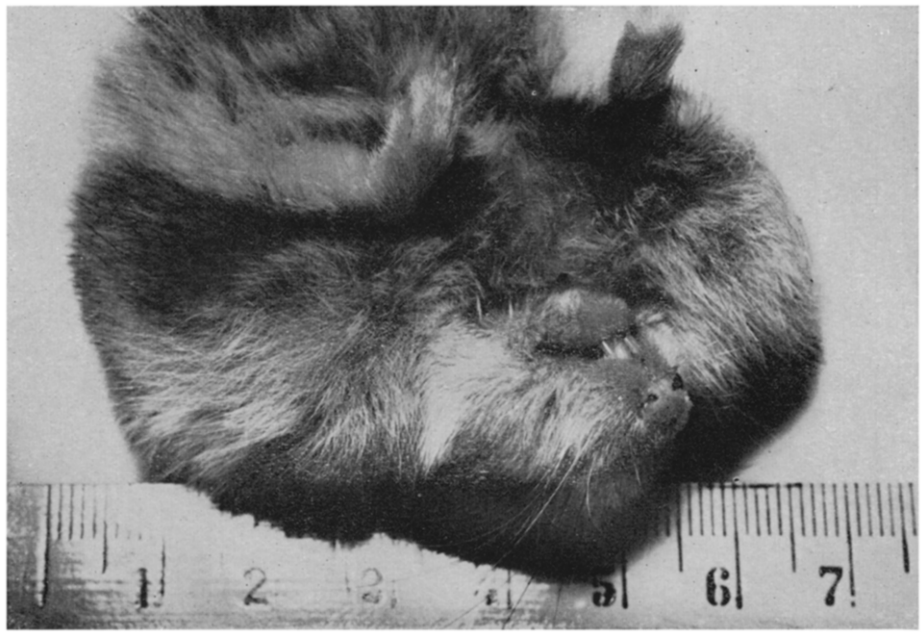


Fig. 1. *Golden hamster bearing* 15*-day-old GW*-127 *tumors in both cheek pouches, with extension to cervical lymph nodes.*

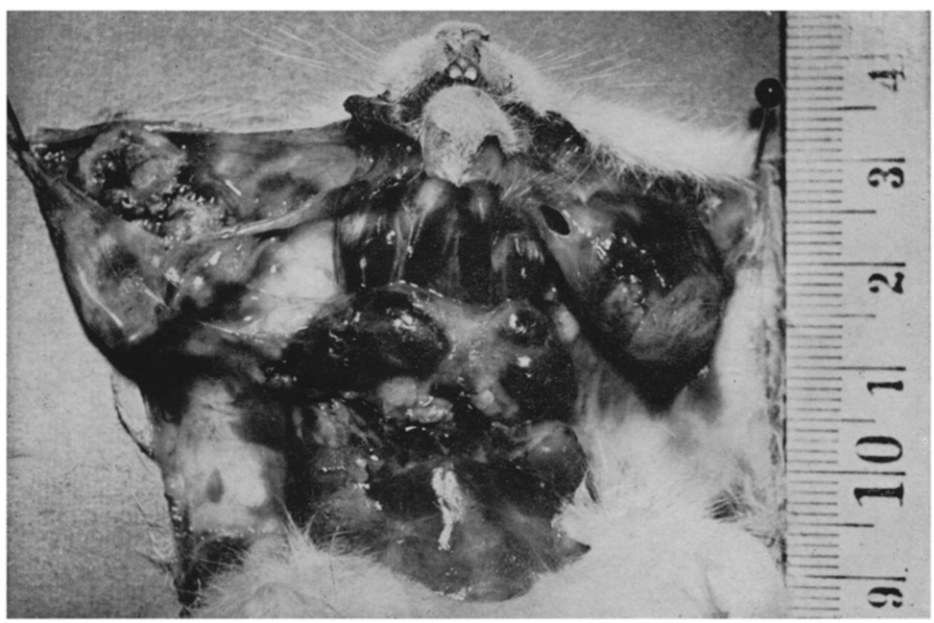


Fig. 2(*a*). *Hamster from above after dissection. Note partly necrotic tumor material in right cheek pouch and massive tumors at supraclavicular lymphnodes.*

(to face p. 316)

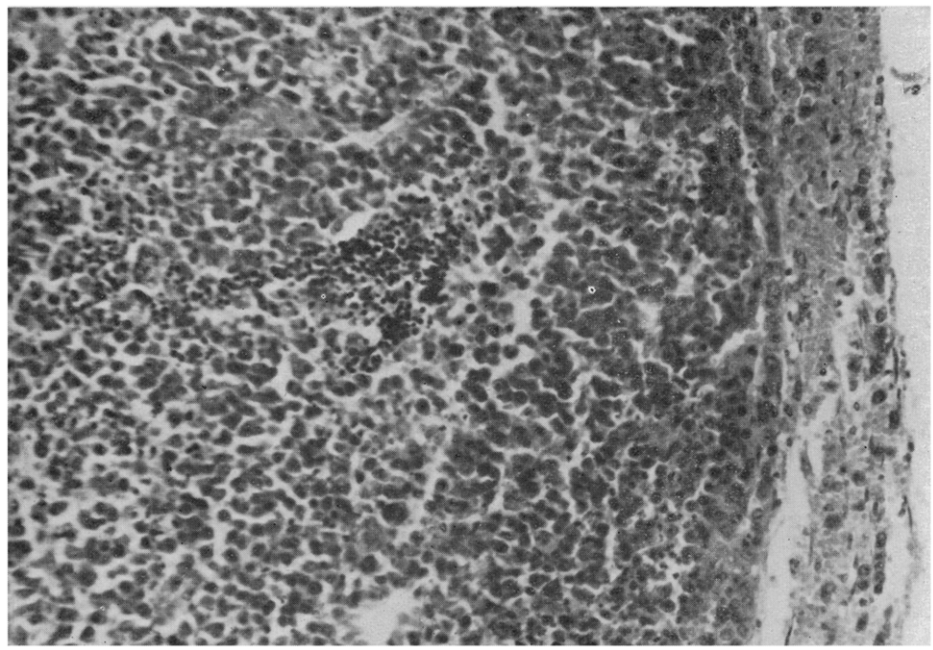


Fig. 2(*b*). *Section of lymphnode of same animal* (× 190, *H.E.*).

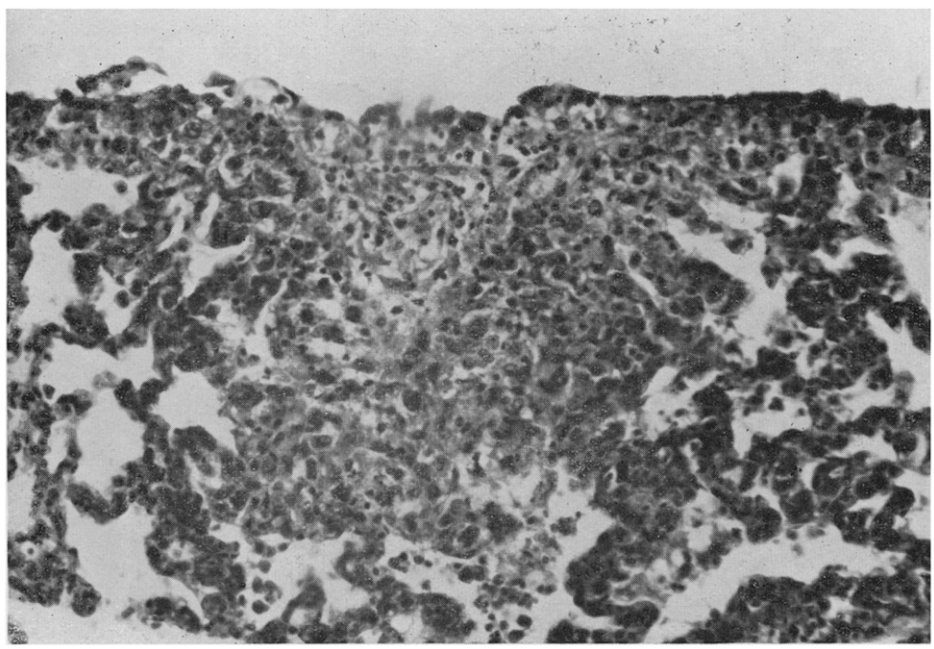


Fig. 3. *Lung metastasis* 13 *days after transplantation of GW*-127 *to the cheek pouch* (× 190, *H.E.*).

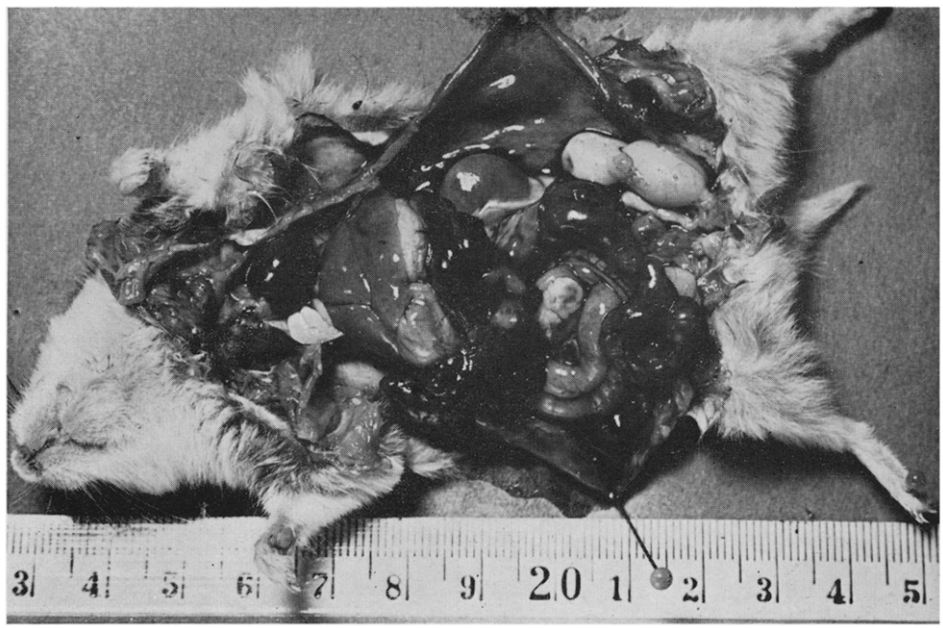


Fig. 4. *Peritoneal carcinomatosis in hamster* 16 *days after sc transplantation of GW*-127.

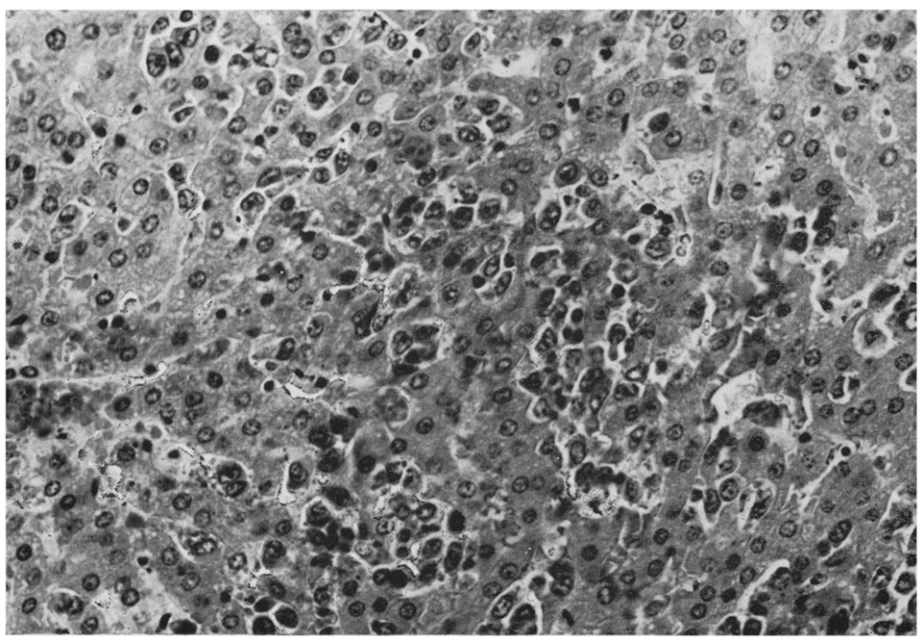


Fig. 5. *Section of hamster liver showing sinusoidal spread of GW*-127 *tumor cells* (× 300, *H.E.*).

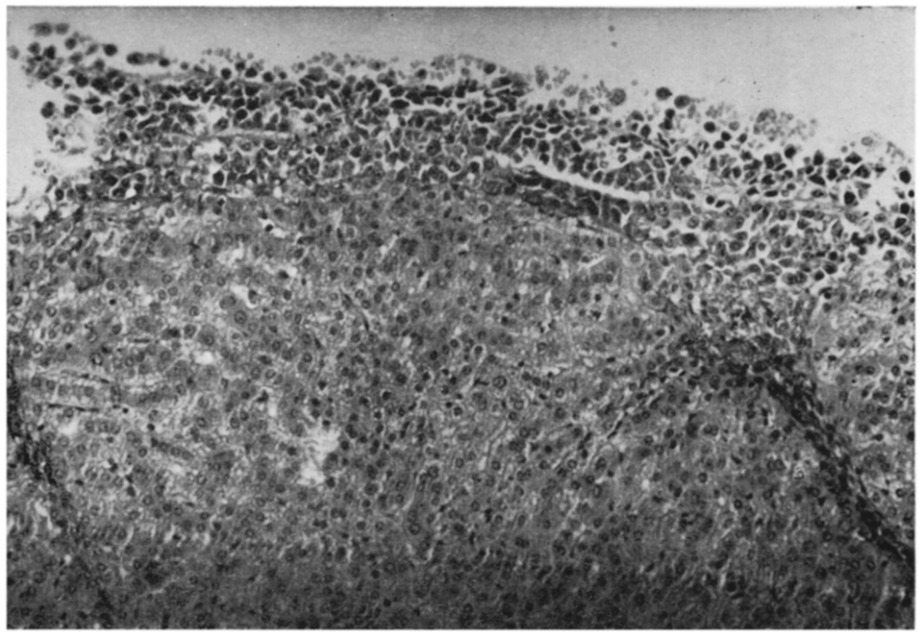


Fig. 6. *Liver of another animal showing continuous invasion from border and subcapsular spread of GW-127* (× 150, *H.E.*).

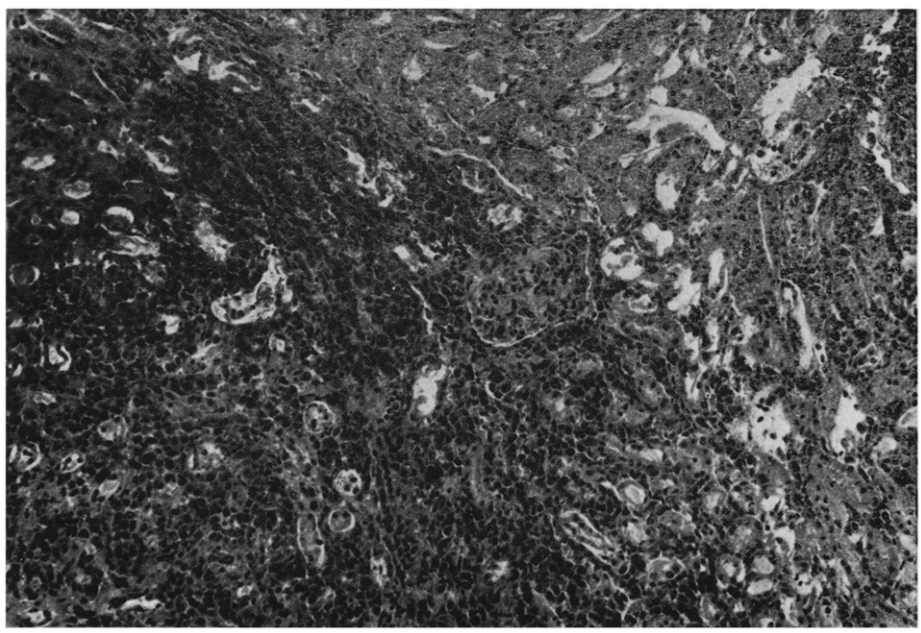


Fig. 7. *Photomicrograph of hamster kidney with peritubular spread of GW-127 cancer cells* (× 120, *H.E.*).

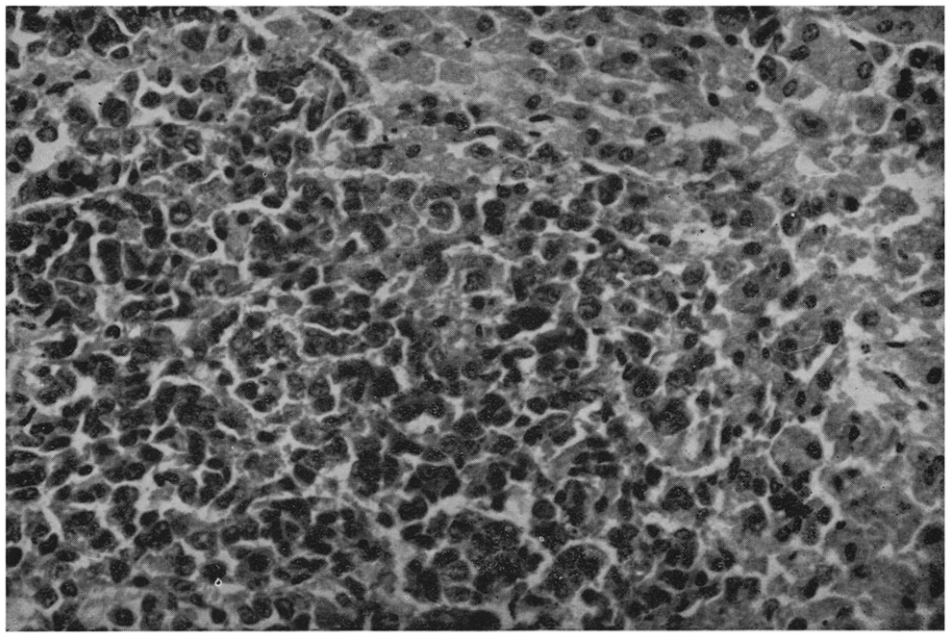


Fig. 8. *Metastasis of GW-127 ovarian carcinoma to adrenal cortex* (× 300, *H.E.*).

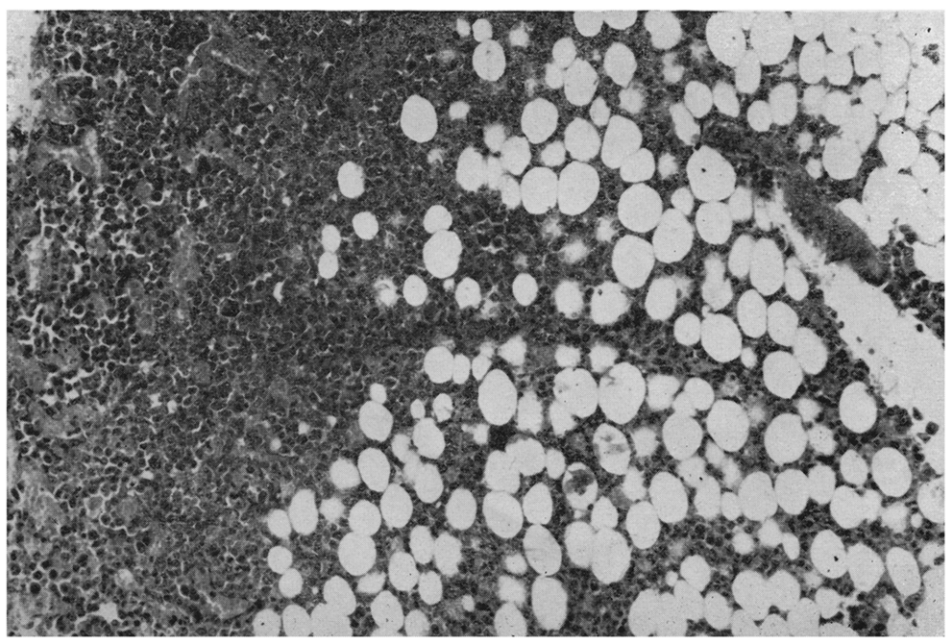


Fig. 9. *Continuous external spread of GW-127 tumor cells to fat tissue of pancreas* (× 120, *H.E.*).

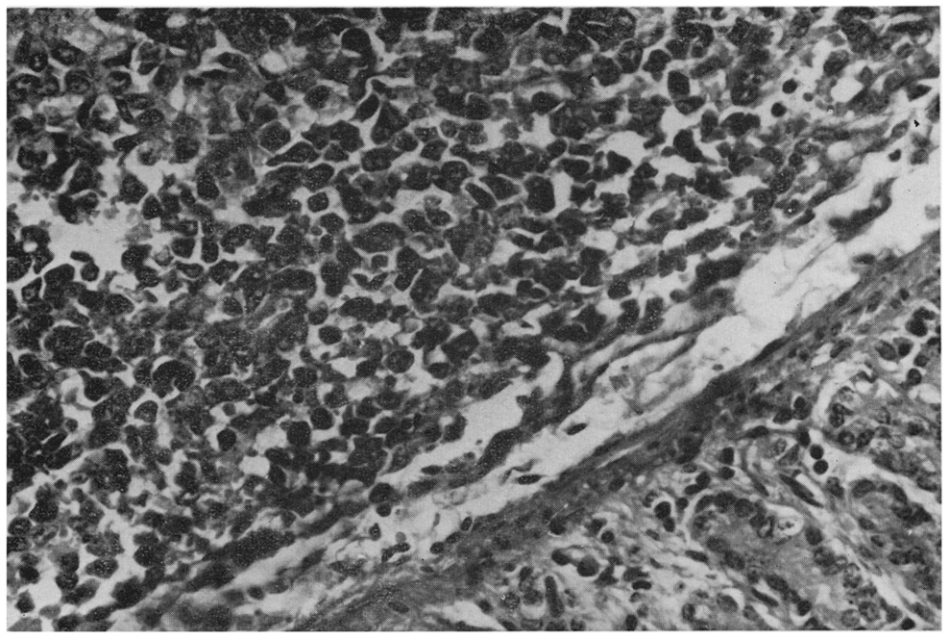


Fig. 10. *Photomicrograph of hamster small intestine showing widespread tumor cell invasion of the submucosa* (× 300, *H.E.*).

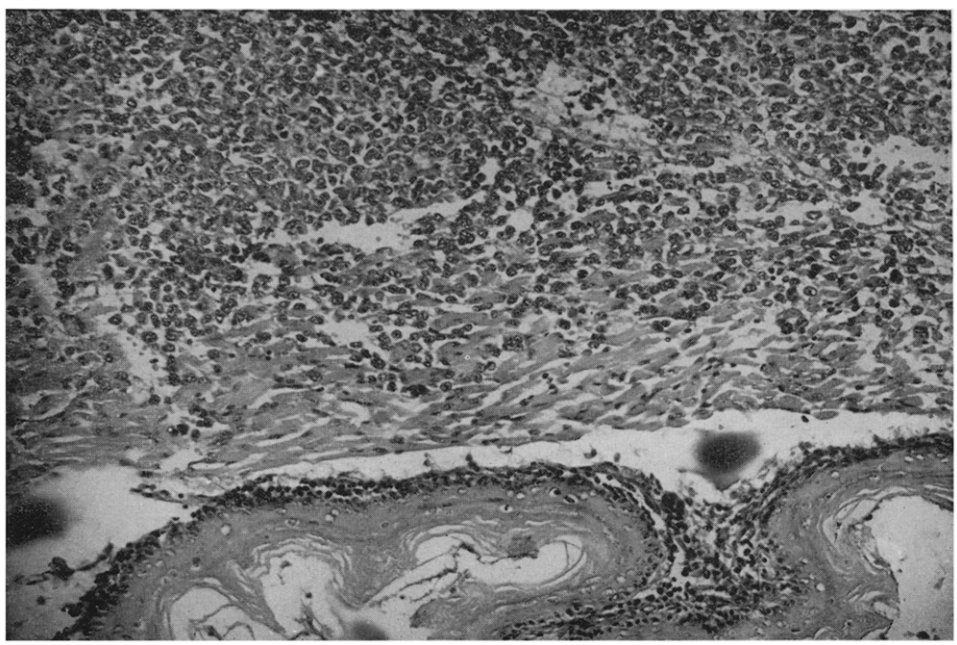


Fig. 11. *Tumor cell invasion of the hamster esophagus, seen after peritoneal carcinomatosis* (× 120, *H.E.*).

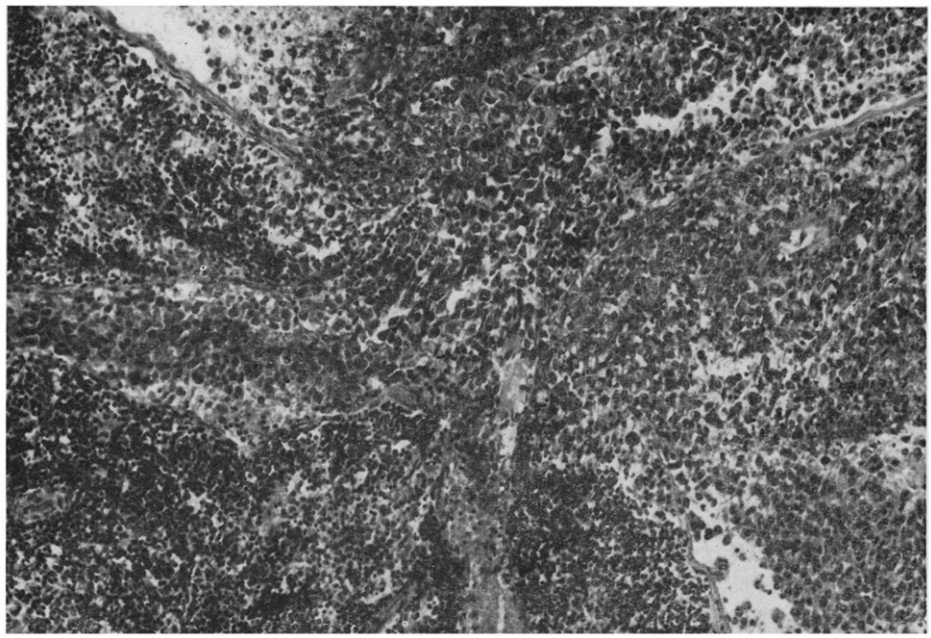


Fig. 12. *Direct external spread of GW-*127 *tumor cells through the spleen capsule with deeper penetration* (× 120, *H.E.*).

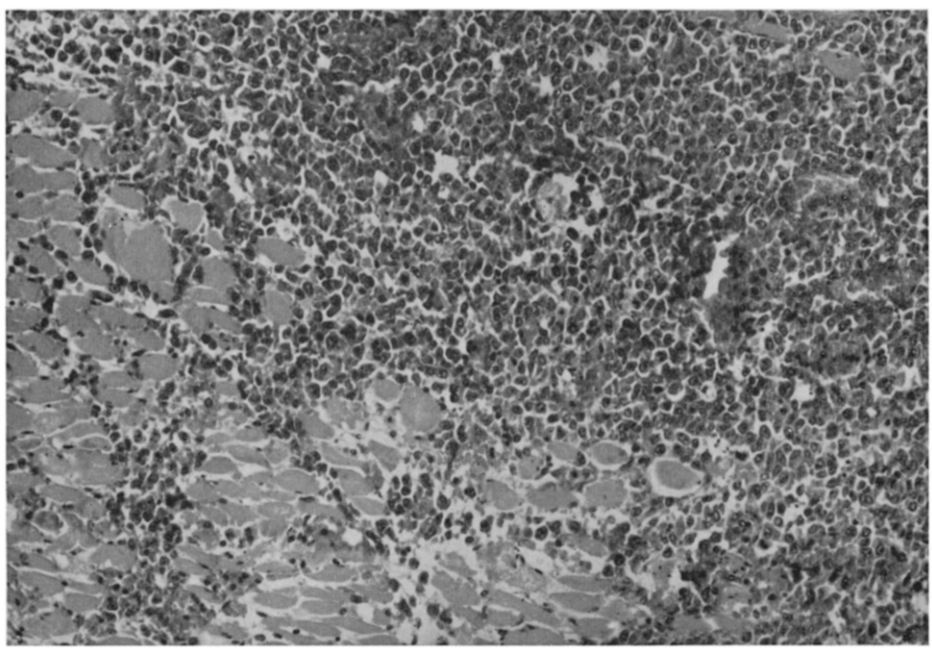


Fig. 13. *Section of thigh musculature transplanted with GW-*127. *Hamster expired* 13 *days after implantation.* (× 150, *H.E.*).

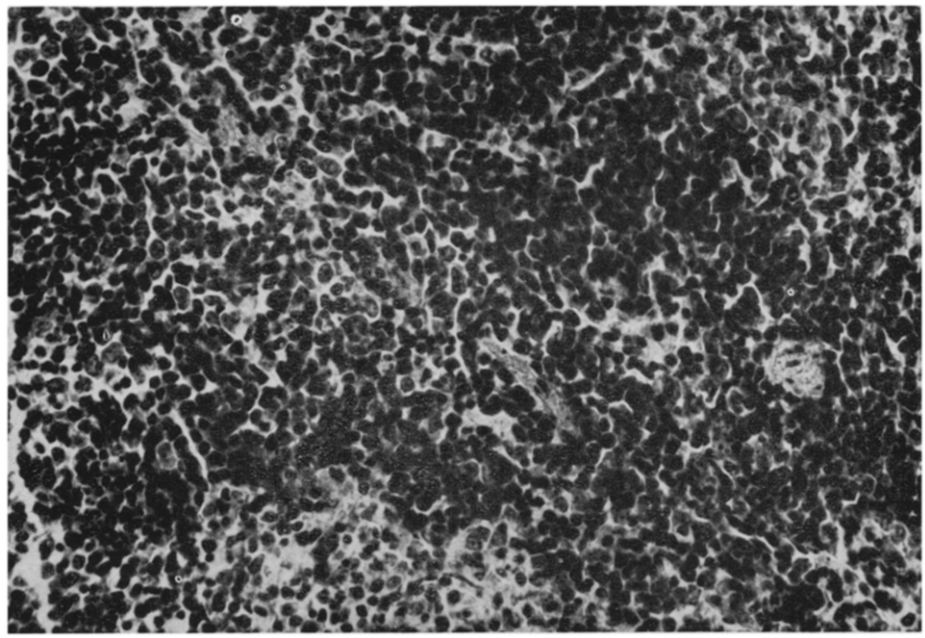


Fig. 14. *Photomicrograph of spleen from same animal as in previous figure* (× 300, *H.E.*).

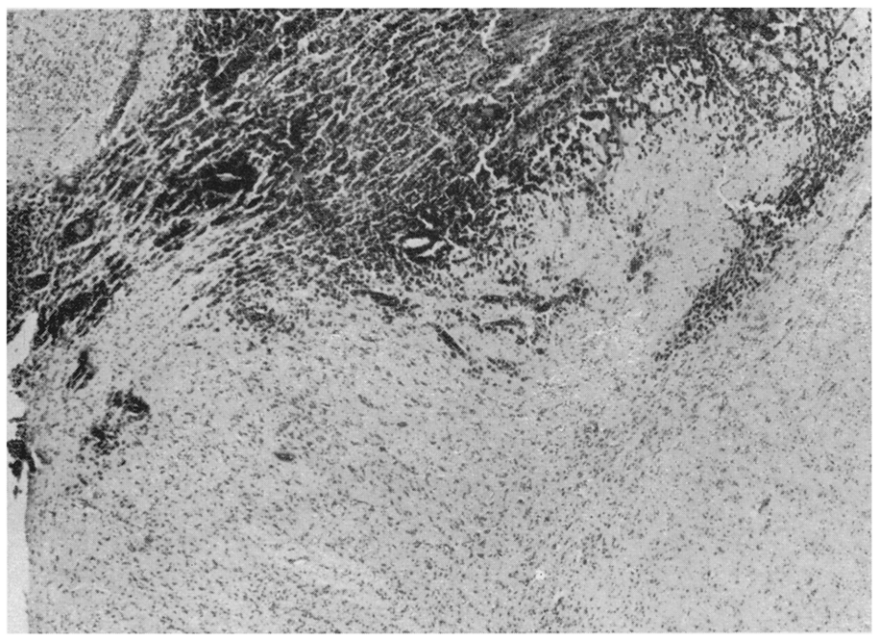


Fig. 15. *Section through hamster brain transplanted with GW-*127 *tumor cells at time of spontaneous death,* 11 *days post inoculation. Note invasion of brain tissue from tumor cells proliferating in injection canal* (× 37, Van Giesson).

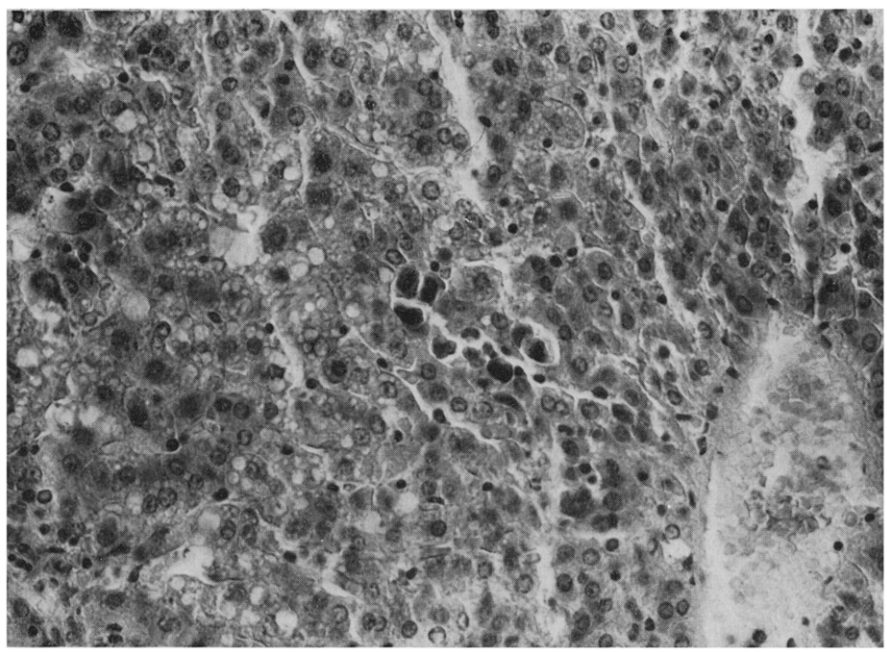


Fig. 16. *Sinusoidal growth of a small cluster of GW-127 tumor cells in the liver of a hamster transplanted intracerebrally* 13 *days previously* ($\times$ 300, *H.E.*).

sous forme d'une lymphangite carcinomateuse. L'adaptation de ce néoplasme humain à un hôte étranger est discutée; l'hypothèse d'une transformation du matériel génétique, d'une hybridation ou d'une perte de spécificité est évoquée, mais demande confirmation.

SUMMARY

The proliferative character and tumor cell spread of a newly serially transplanted tumor derived from a human ovarian carcinoma, GW-127, are described after transplantation to the following sites of unconditioned hamsters: cheek pouch, subcutaneous space, peritoneal cavity, thigh musculature and brain. Both continuous and discontinuous spread of this quite vigorous tumor could be demonstrated microscopically. The more predominant metastatic route was via the lymphatics, although blood-borne metastasis to the liver, adrenals, and spleen could also be seen. Intracerebral transplantation resulted in proliferation and spread within the cerebrospinal spaces and invasion of the brain tissue itself. Almost all animals, regardless of transplantation site, had lung metastasis in the form of a lymph-vessel carcinomatosis. The adaptation of this human neoplasm to an alien host is discussed in terms of a possible transformation of genetic material and/or species hybridization or loss which, however, necessitates confirmation.

ZUSAMMENFASSUNG

Der proliferative Charakter und die Tumorzellausbreitung eines neuen in Serien transplantierten Tumors, GW-127, abgeleitet von einem menschlichen Ovarial-Ca. werden nach Transplantation in die folgenden Regionen eines nicht vorbereiteten Hamsters beschrieben: Backentasche, subkutaner Raum, Peritonealhöhle, Oberschenkelmuskulatur, Gehirn. Sowohl eine kontinuierliche als auch eine diskontinuierliche Ausbreitung dieses vitalen Tumors konnte mikroskopisch gefunden werden. Vorherrschend war der lymphatische Metastasierungsweg, wenngleich auch hämatogene Aussaat in Leber, Nebennieren und Milz beobachtet wurden. Die intracerebrale Implantation führte zur Proliferation und Aussaat im cerebrospinalen Bereich und zur Invasion des Gehirngewebes. Fast alle Tiere hatten, unabhängig vom Implantationsort, Lungenmetastasen in Form einer Lymphangitis carcinomatosa. Die Adaptierung dieses menschlichen Tumors an einen fremden Wirt wird diskutiert unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Transformation genetischen Materials und einer Hybridisierung oder eines Spezifitätsverlustes, doch bedarf eine solche Hypothese noch der Bestätigung.

REFERENCES

1. H. S. N. Greene, Heterologous transplantation of human and other mammalian tumors. *Science* **88,** 377 (1938).
2. H. S. N. Greene, The transplantation of tumors to the brains of heterologous species. *Cancer Res.* **11,** 529 (1951).
3. H. W. Toolan, Successful subcutaneous growth and transplantation of human tumors in X-irradiated laboratory animals. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **77,** 572 (1951).
4. H. W. Toolan, Growth of human tumors in cortisone-treated laboratory animals: Possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer Res.* **13,** 389 (1953).
5. A. H. Handler, Transplantation of heterospecific tumor tissue into the cheek pouch of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Doctoral dissertation, Boston University (1951).
6. H. M. Lemon, B. R. Lutz, R. Pope, L. Parsons, A. H. Handler and D. I. Patt, Survival and growth of human tissues transplanted to hamster cheek pouch. *Science* **115,** 461 (1952).
7. W. B. Patterson, R. N. Chute and S. C. Sommers, Transplantation of human tumors into cortisone-treated hamsters. *Cancer Res.* **14,** 656 (1954).
8. A. H. Handler, S. Davis and S. C. Sommers, Heterotransplantation experiments with human cancers. *Cancer Res.* **16,** 32 (1956).
9. D. M. Goldenberg, S. Witte and K. Elster, GW-39: A new human tumor serially transplantable in the golden hamster. *Transplantation* **4,** 760 (1966).

10. D. M. GOLDENBERG, Die Verwendung einiger neuer Human-Tumorstämme in der experimentellen Krebsforschung. 1. Teil. *Arch. Geschwulstforsch.* **29,** 1 (1967).
11. D. M. GOLDENBERG, H. SCHMIDT and S. WITTE, Tierexperimentelle Beobachtungen über das intracerebrale Wachstum menschlicher Tumoren. *Z. Krebsforsch.* **69,** 316 (1967).
12. D. M. GOLDENBERG, Die Verwendung einiger neuer Human-Tumorstämme in der experimentellen Krebsforschung. 2. Teil. *Arch. Geschwulstforsch.* **29,** 18 (1967).
13. H. SCHMIDT, Wachstum und Ausbreitung intracerebral transplantierter Geschwülste. *Verh. dtsch. Path. Ges.*, in press.
14. D. M. GOLDENBERG, S. WITTE and H. GÖTZ, (in preparation).
15. G. HAEMMERLI, personal communication.
16. P. C. KOLLER, Cytological variability in human carcinomatosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **63,** 793 (1956).
17. S. MAKINO, T. ISHIHARA and A. TONOMUA, Cytological studies of tumors. XXVII. The chromosomes of thirty human tumors. *Z. Krebsforsch.* **63,** 184 (1959).
18. S. MAKINO, M. S. SASAKI and A. TONOMURA, Cytological studies of tumors. XL. Chromosome studies in fifty-two human tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* **32,** 741 (1964).
19. B. EPHRUSSI and S. SORIEUL, Mating of somatic cells *in vitro*. *Univ. Mich. med. Bull.* **28,** 347 (1962).
20. B. EPHRUSSI and S. SORIEUL, New observations on the *in vitro* hybridization of mouse cells. *C. R. Acad. Sci. Paris* **254,** 181 (1962).
21. B. EPHRUSSI, Interspecific hybridization of somatic cells. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **53,** 1040 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 321–328. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

A Comparison of the Effects upon HeLa Cells of Isopropyl Methane Sulphonate and X-rays During Different Phases of the Cell Cycle

DANILO PETROVIC* and A. H. W. NIAS

Paterson Laboratories, Christie Hospital and Holt Radium Institute, Manchester, U.K.

INTRODUCTION

CERTAIN similarities between the effects of X-rays and alkylating agents have led to the use of the term radiomimetic in describing the biological activity of these drugs [1–3]. The similarity depends upon the choice of parameter however, and of the two parameters described in this paper (dose–response and relative sensitivity during different phases of the cell cycle) only in the former case can there be said to be any similarity.

One group of alkylating agents is the alkane sulphonic esters. These compounds have been studied extensively in this laboratory and some of their biological effects have been reported [4–6]. These compounds are the product of the reaction of an alkane sulphonic acid and an alcohol, and are of the general formula $R.SO_2.OR'$. In the case of Isopropyl Methane Sulphonate (IMS) R is CH_3 and R′ is $(CH_3)_2CH$.

IMS was chosen because the drug has the short chemical half-life of 13 min at 37°C [7]. It could therefore be used to deliver a "pulse" treatment at various points in the cell cycle merely by adding the drug to the culture medium; no subsequent change of culture medium would be necessary. The effect of a pulse treatment with IMS could therefore be compared with that of an acute dose of X-rays.

METHODS

HeLa cells were grown in monolayer culture; the techniques have been described previously [8]. Cells were cultured in 4 oz medical flat bottles for clone counting and clone size analysis, in plastic bottles for determinations of average cellular multiplicity and as cover slip cultures for autoradiography. Cell survival was estimated by the clone-forming ability of single cells after 10 days, according to the method of Puck and Marcus [9]. The method of estimating clone size distribution has been described previously [8]. For the dose–response curves shown in Figs. 1 and 2, and the clone size distributions shown in Figs. 5 and 6, asynchronous cells were obtained by trypsinising logarithmically growing cultures.

Synchronised cells were obtained by the method of Terasima and Tolmach [10] by which cells in mitosis are selected from a logarithmically growing culture. The degree of synchronisation was estimated for each experiment by determining (1) the mitotic index at zero time, (2) the average cellular multiplicity at hourly intervals, (3) the labelling index, also at hourly intervals. For determination of the labelling index, a pulse label of

*Present address: Laboratory of Cellular Radiobiology, Institute "Ruder Boskovic", Zagreb, Yugoslavia.

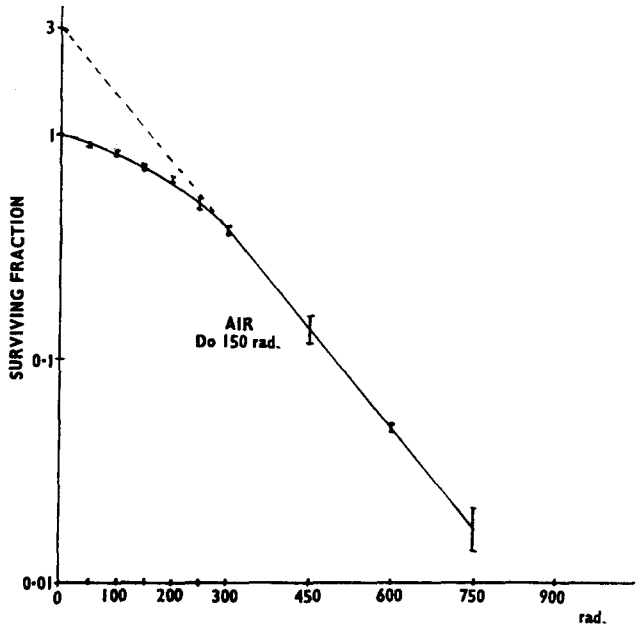


Fig. 1. *Dose–response of asynchronous HeLa cells to X-rays (standard errors of the means of* 20 *experiments).*

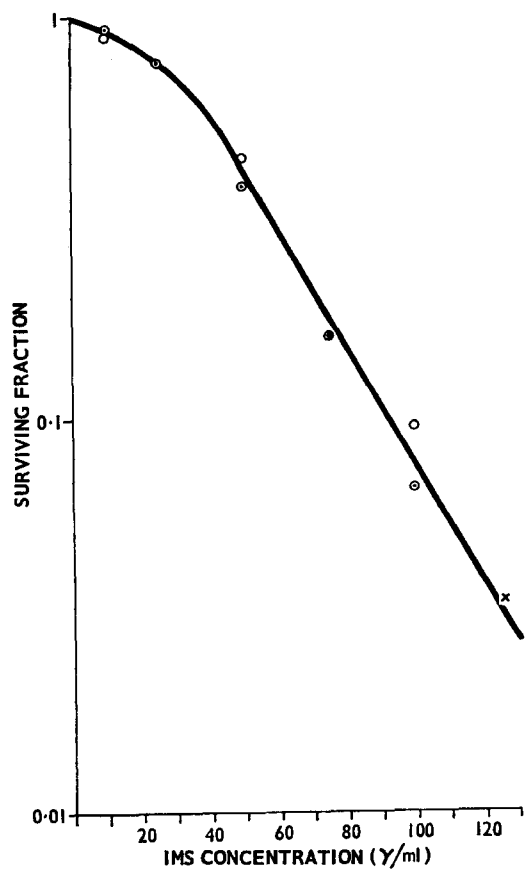


Fig. 2. *Dose–response of asynchronous HeLa cells to IMS. (Points from* 3 *experiments).*

tritiated thymidine (0·1 μc/ml final concentration) was added 20 min before fixation and autoradiography. The labelling index also permitted a measure of the phases of the cell cycle in each experiment.

Irradiation was from a Resomax machine at 300 kVp 2 mm Cu H.V.L., 100 rad/min.

RESULTS

(A) *Cell survival*

The dose–response curves after X-ray (Fig. 1) and IMS (Fig. 2) show a qualitative similarity. They both have shoulders indicating that an accumulation of damage is required before the start of the exponential part of the survival curve. Because of the similarity of the two dose–response curves, some similarity of the mechanisms of cell killing by the two agents might have been expected. For this reason, the effect of the two agents upon synchronously growing cells was studied at different stages of the cell cycle to see whether the effect of IMS can be related to the DNA synthetic phase, as has been shown with X-rays [11].

In each experiment with synchronised cells, the degree of synchrony of the cell population was estimated. At zero time, the average mitotic index was 80%. This figure includes 30% of the cells in metaphase, 30% in other stages of mitosis and 20% in late telophase (i.e. two daughter cells still sticking together).

Figure 3 shows the average cellular multiplicity (ACM) in one experiment at different times after mitosis; an average of 1·8 cells per colony was found until the eighteenth hour. Thus, during this period, about 80% of colonies contained two daughter cells originating from the inoculated mitotic cells. The curved line in the same figure represents the percentage of labelled cells. During the first eight hours of incubation less than 10% of cells incorporated tritiated thymidine, indicating that less than 10% of cells were in the DNA synthetic period during that time. These cells then passed through the S period (delimited by the dashed line), as shown by the steep rise and fall of the proportion of labelled cells.

The G_2 phase was less well synchronised since the rise in the ACM curve indicates the appearance of mitotic cells from eighteen hours onwards. For this reason the length of this phase was determined by subtraction of $M+G_1+S$ from the doubling time of unsynchronised populations.

Although the degree of synchrony tends to decrease towards the end of the cell cycle, there is still sufficient delimitation between the G_1, S and G_2 phases to permit a comparison of the effects of X-rays and IMS at different times during the progress of cells through the three interphase periods.

The half-life of IMS in complete culture medium was confirmed as thirteen minutes by estimating the increasing survival of cells when treated with culture medium in which 125 μg/ml of IMS had been incubated at 37°C for increasing periods of time. After 1 hr in warm culture medium, there was no further

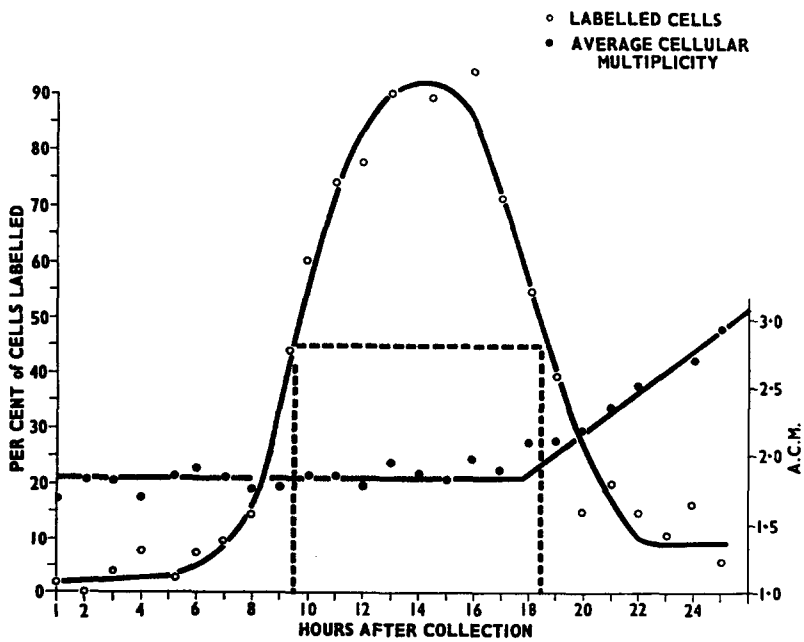


Fig. 3. Average Cellular Multiplicity (A.C.M.) and Labelling Index of Synchronised HeLa Cells.

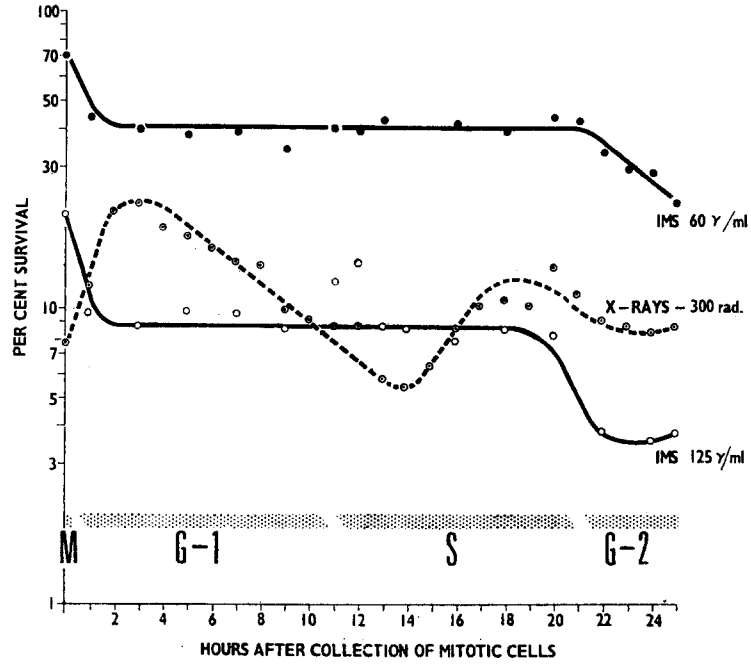


Fig. 4. Composite survival of synchronised HeLa cells after treatment with X-rays or IMS at different times during the cell cycle.

effect on cell survival and it can therefore be concluded that the breakdown products of IMS have no residual effect.

The results of the comparison between X-rays and IMS is illustrated in composite Fig. 4, where the cell survival after a single X-ray dose of 300 rad., delivered at different times during the cell cycle, is consistent with the findings of Terasima and Tolmach [11]. Following mitosis, the cells become more resistant as they progress into the G_1 phase. Towards the end of G_1 and the beginning of S they become more sensitive, and towards the end of S they become more resistant again. Finally, in G_2 and the next mitosis sensitivity increases.

The other two curves in Fig. 4 show the survival of cells treated with two different concentrations of IMS at different times during the cell cycle. The pattern of these two curves does not differ when compared to each other, but it does differ when compared to the X-ray curve. Following mitosis, the curves fall to a plateau for most of the cell cycle, indicating that there is no difference in sensitivity between the G_1 and S periods. An increase in sensitivity appears in G_2 where a drop in survival was always observed. This drop in the G_2 period may be an underestimate as there are some mitotic cells which begin to appear at this time due to desynchronisation. Similar curves were obtained with two other dose levels of IMS, 54γ/ml and 74 γ/ml.

(B) *Clone size analysis*

Figures 5 and 6 illustrate clone size distributions of asynchronous cells treated with two dose levels of X-rays and IMS. This method of analysis serves to illustrate the range of cell damage resulting from increasing dosage of the particular agent. The higher the dosage, the wider the spread of clone sizes and the smaller the average clone size. The same range of "small" clones results from IMS as has been described following X-rays [12]. The effect upon the clone size distribution is related to the dose—response curves shown in Figs. 1 and 2.

This dose dependent effect is further illustrated in Fig. 7 which shows the changes in clone size distribution following treatment of synchronised cells with a constant dose of X-rays or IMS at various points during the cell cycle. The changes in distribution can be expressed in terms of the spread of clone sizes towards the lower values and this is reflected in a lowering of the average clone size. This can be expressed as an average number of divisions (although such a parameter can only be used as a general indication). The distributions in Fig. 7 should be considered in relation to the survival patterns for synchronised cells shown in Fig. 4.

Irradiation at zero hour gave a clone size distribution which was wide and had a low average clone size (3·3 divisions). At 3 hr, i.e. in early G_1, it gave an average clone size which was significantly higher (5·8 divisions)

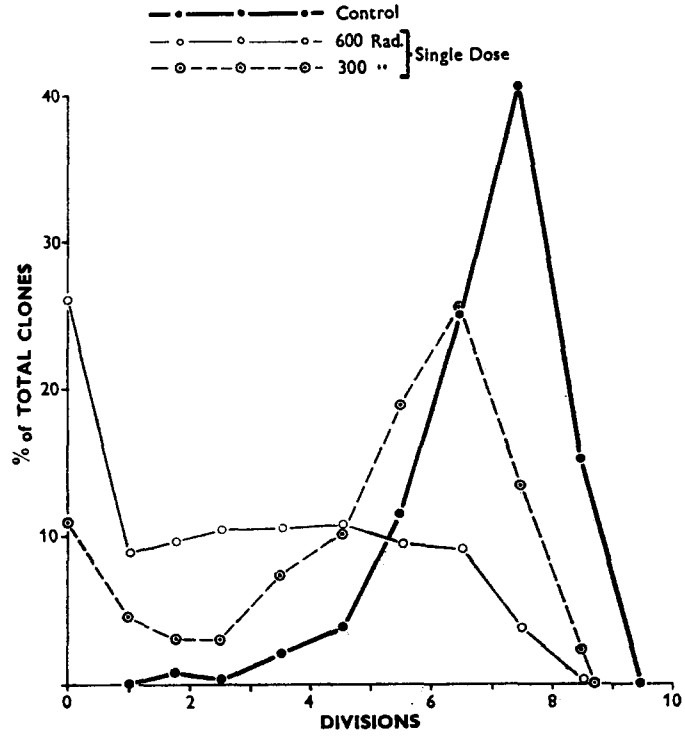


Fig. 5. *Clone size distributions of HeLa cells* 10 *days after irradiation.*

but this fell again when irradiation was given at 9 hr or 14 hr, i.e. in late G_1 and early S (4·1 and 3·1 divisions) only to rise again when irradiation was given at 20 hr, i.e. late S (4·3 divisions).

With IMS (75 γ/ml) the highest average clone size (6·5 divisions) occurred with treatment at zero hour. With treatment at 3 hr the average was lower (5·1 divisions) but this distribution was repeated with treatment at 9, 14 and 18 hr (5·0, 5·1 and 5·1 divisions) i.e. throughout the G_1 and S periods. With

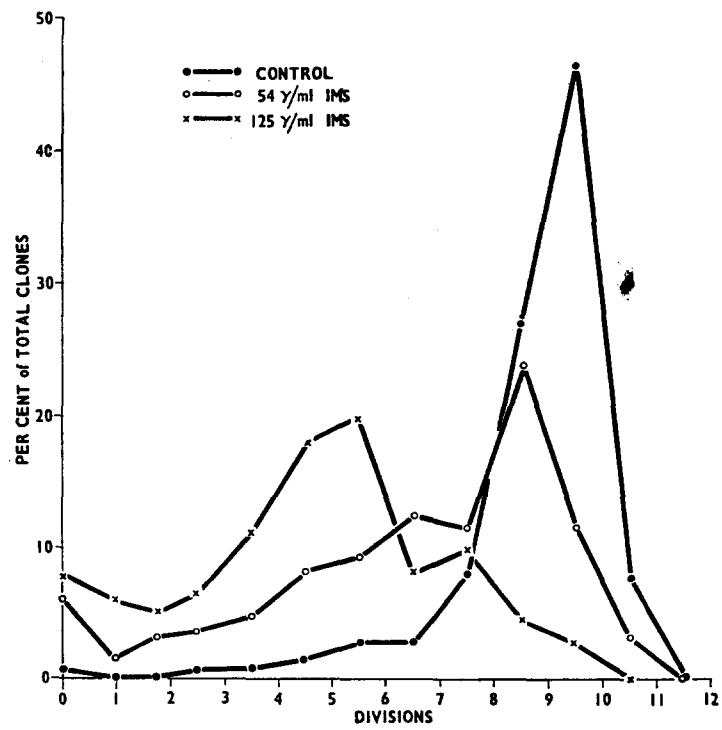


Fig. 6. *Clone size distributions of HeLa cells* 10 *days after treatment with IMS.*

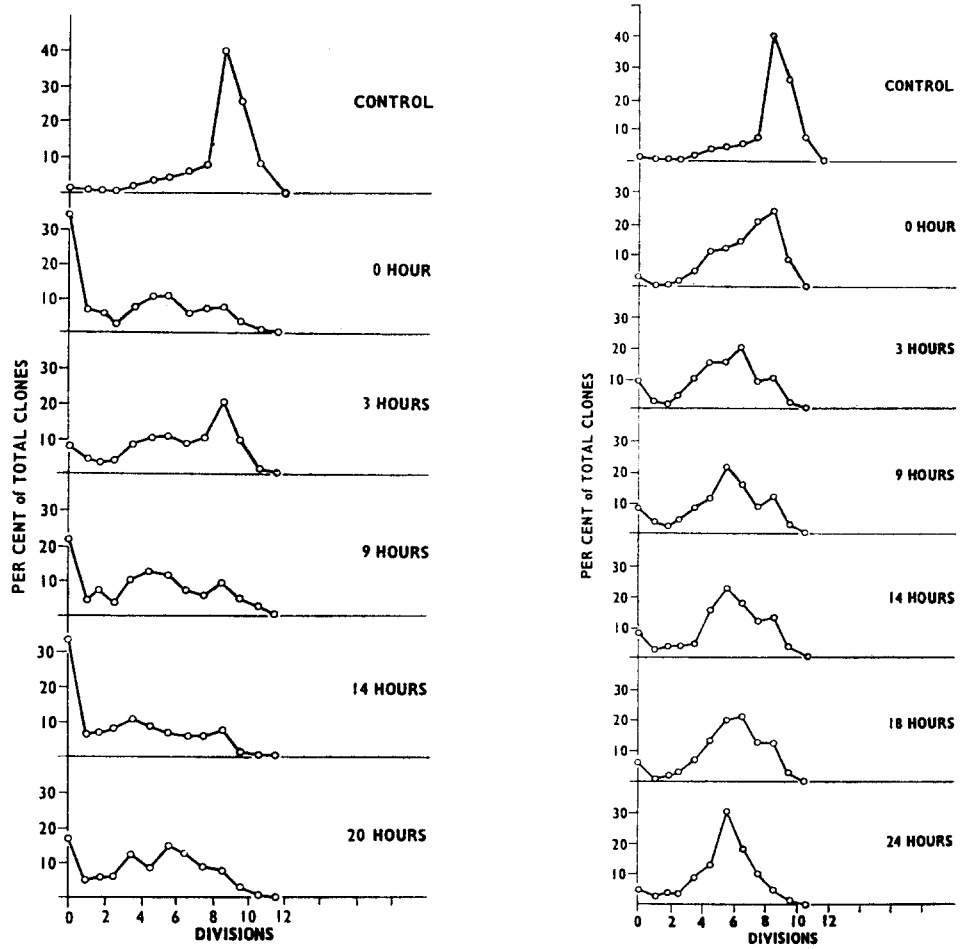


Fig. 7. Composite clone size distributions of synchronised HeLa cells treated at different times during the cell cycle. (A) 300 rad. X-ray (B) 75γ/ml IMS.

treatment at 24 hr, the average clone size showed an obvious further drop (4·7 divisions). Thus the difference in the pattern of survival shown in Fig. 4 is confirmed in Fig. 7.

DISCUSSION

A similarity in the shape of the dose–response curves after irradiation and IMS treatment of asynchronous HeLa cells has been demonstrated (Figs. 1 and 2). The effect of these two agents upon the proliferation rate of the cells is also similar when assessed by the clone size analyses shown in Figs. 5 and 6. From this parameter of the dose–response of asynchronous cells there is little difference between the two agents. It is when the effect of the two agents is compared during progress of the cells through the phases of the division cycle that differences become obvious.

It is difficult to interpret the effects at zero hour in Fig. 4 since, although the cells are in mitosis, they have just been subjected to the selection technique. Nevertheless, during the next 3 hr, the irradiated cells show increasing survival, while those treated with IMS show decreasing survival. By 3 hr, the cells might be expected to have recovered from any technical damage. This indicates that there is a difference in the effects of the two agents upon immediate post-mitotic cells.

The difference from 3 hr onwards is even more obvious in that cells irradiated at later times show a decreasing survival, whilst those treated with IMS show a constant survival. The difference in the effect of the two agents can be directly related to the events in the cell cycle occurring towards the end of the G_1 phase and the beginning of the S phase. The G_1—S transition is clearly the most sensitive portion of the cell cycle with resepct to X-ray treatment. As far as treatment with IMS is concerned, there is no particularly sensitive phase.

The final period of observation corresponds to the G_2 phase and the next mitosis. These two phases cannot be clearly delimited by the technique used because of increasing asynchrony of the cells; so although the pattern

of cell survival was similar after both types of treatment, this may not be significant.

There is considerable evidence that one of the primary biological targets of X-rays is DNA. The fact that the G_1—S transition is the most radiosensitive period in the cell might be considered as evidence of this. The absence of a change in the sensitivity to IMS during the same period in the cell cycle might therefore indicate a difference in the mode of action between these two agents.

Acknowledgements—This work was conducted during the tenure of a Fellowship (by Danilo Petrovic) from the International Atomic Energy Agency.

The authors are grateful for the technical assistance of Mrs. Dorothy Robinson and Mrs. Sylvia Delve.

RESUME

L'effet de l'agent alkylant isopropyl-méthane-sulfonate (IMS) sur la survie des cellules HeLa en croissance synchrone a été étudié par la méthode de Puck de la cellule isolée. La survie des cellules traitées, à différentes phases du cycle, a été comparée à la survie des cellules irradiées. Les cellules irradiées étaient plus résistantes durant les périodes G_1 et G_2 et plus radiosensibles au début de la période S ainsi que l'avaient montré Terasima et Tolmach). Au contraire, l'IMS montrait une répartition plus uniforme de la survie. La cinétique des cellules HeLa, traitées à différentes phases du cycle cellulaire, a été étudiée par l'analyse de la taille clonale, et de nouvelles différences ont été mises en évidence entre les réponses à l'irradiation et au traitement par l'IMS. La distribution de la taille des clones, après irradiation, peut être mise en corrélation avec la phase de radiosensibilité, le diamètre clonal moyen étant plus grand au début de G_1 plus petit au début de S, et augmentant de nouveau en G_2. La distribution, après le traitement par l'IMS, est plus uniforme durant tout le cycle cellulaire.

SUMMARY

The effects on HeLa cells of the alkylating agent isopropyl methane sylphonate (IMS) and X-irradiation have been compared. Survival of the clone forming ability of asynchronous cells followed a similar dose–response curve after both agents, and there was a similar effect upon the distribution of clone sizes. By contrast, treatment at different times during the cycle of synchronised cells revealed a marked difference in survival patterns: after irradiation the level of survival varied and the G_1–S transition period was much more radiosensitive than the rest of the cell cycle. IMS treatment produced no difference in survival level throughout the majority of the cell cycle. A different mode of action is postulated for the two agents.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkungen der alkylierenden Substanz Isopropyl-Methan-Sulfonat (IMS) und von Röntgenstrahlen auf Hela-Zellen wurden untersucht. Das Überleben der Klonusbildungsfähigkeit asynchroner Zellen zeigte eine ähnliche Dosiswirkungskurve bei beiden Agentien, und ebenso verhielt sich die Verteilung der Klonusgrößen. Dagegen fanden sich deutliche Unterschiede in der Überlebensform bei Behandlung von isochronen Zellen zu verschiedenen Zykluszeiten. Nach Bestrahlung war die Überlebensrate unterschiedlich. Es ergab sich eine viel höhere Strahlenempfindlichkeit für die G_1–S Übergangsperiode als für den Rest des Zyklus. Bei IMS zeigte sich kein Empfindlichkeitsunterschied für die Überlebensrate im Verlauf des Zyklus. Es wird daraus ein unterschiedlicher Wirkungsmechanismus der beiden Agentien abgeleitet.

REFERENCES

1. P. Dustin, Some new aspects of mitotic poisoning. *Nature (Lond.)* **159,** 794 (1947).
2. E. Boyland, Effects of radiations and radiomimetic drugs. *Endeavour* **11,** 87 (1952).
3. L. A. Elson, *Radiation and Radiomimetic Chemicals.* Butterworth, London (1963).

4. H. Jackson, B. W. Fox and A. W. Craig, Antifertility substances and their assessment in the male rodent. *J. Reprod. Fertil.* **2,** 447 (1961).
5. M. Partington, B. W. Fox and H. Jackson, Comparative action of some methane sulphonic esters on the cell population of the rat testis. *Expl. Cell Res.* **33,** 78 (1964).
6. B. W. Fox, Comparative action of methyl and isopropyl methane sulphonates on the peripheral leucocyte count in monkeys. *Nature (Lond.)* **212,** 1058 (1966).
7. W. C. J. Ross, *Biological Alkylating Agents.* Butterworth, London p. 112 (1962).
8. A. H. W. Nias, C. W. Gilbert, L. G. Lajtha and C. S. Lange, Clone-size analysis in the study of cell growth following single or during continuous irradiation. *Int. J. Rad. Biol.* **9,** 275 (1965).
9. T. T. Puck and P. I. Marcus, Action of X-rays on mammalian cells. *J. exp. Med.*, **103,** 653 (1956).
10. T. Terasima and L. J. Tolmach, Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature (Lond.)* **190,** 1210 (1961).
11. T. Terasima and L. J. Tolmach, Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle. *Biophys. J.* **3,** 11 (1963).
12. W. K. Sinclair, X-ray-induced heritable damage (small-colony formation) in cultured mammalian cells. *Radiat. Res.* **21,** 584 (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 329–333. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Pilot Studies of the Cell Population Kinetics in Irradiated Tumours

L. RÉVÉSZ and P. LINDFORS

Department of Tumor Biology
Karolinska Institutet Medical School
Stockholm, Sweden

INTRODUCTION

DURING recent years, various lines of evidence have been obtained on the intercellular variation of metabolic, nutritional, chromosomal, antigenic and other tumor characteristics. The results clearly indicate that neoplasms must be regarded as a genetically heterogeneous population of cells. Interclonal variation represents a fundamental attribute, and evolution follows through the competition of various individual clones [1]. Many of the cellular properties of the clones within a neoplasm which were found to vary represent important factors in determining sensitivity to X-rays. It is conceivable that the intercellular variation will also affect the extent of the damage which ensues when tumors are subjected to X-ray treatment. At present, the information is insufficient concerning the sequential remodelling of the population structure which can be expected to occur on the basis of the heterogeneous response to treatment. Shift in the dynamic equilibrium between various competing genotypes may be of importance to the subsequent sensitivity of a population. For example, radioresistant cell types have an obvious selective value with regard to treatment. This may lead to their preferential accumulation and to an increase in the resistance of the population as a whole. Alternatively, it is conceivable that sensitive cells, although killed in a larger proportion, have a faster multiplication rate and can overgrow the resistant cells after some time. Such a process will counteract development of radioresistance.

The work to be described was performed in an attempt to approach the problem experimentally. Neoplastic cell renewal systems were constructed with genetically closely related radiosensitive and radioresistant cell elements in various, determined proportions. The kinetic factors were studied which govern the proliferation pattern of such model populations *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

One of the oldest and best known experimental neoplasms, an Ehrlich mouse ascites tumor, denoted ELD was used. This tumor shows a remarkable constancy with respect to its cellular composition. In the course of several hundred serial transplantations since 1952, when its kariotype had been first described in detail [2], the frequency of cells in the diploid region has been regularly about 97 per cent while the rest has been in the tetraploid region. The tetraploid cells were shown to arise from diploid by endomitotic reduplication mechanisms [3]. Although exposure to radiation or immunoselection can result in a change in the relative proportion of diploid and tetraploid cells [4]; nevertheless, the tumor regularly reverts to the original composition shorter or longer periods after the

exposure. Cell populations consisting exclusively of cells in the tetraploid region could be obtained by cloning single isolated tetraploid cells [5]. However, also such lines reverted to populations with a diploid majority when they became contaminated with a few diploid cells (unpublished observations).

In the present investigation, diploid and tetraploid cells were mixed together in varying proportions. These artificial populations were grown intraperitoneally in mice, and the frequency of cells of the two different ploidies was recorded at regular time intervals. The ascites tumors which developed were transplanted serially to new hosts after 8 days of growth. This method permitted to follow the population changes during the rapid proliferation phase of the tumor and independently of the lethal effect of the growth on the host organism. All transplantations were made by using an inoculum dose of 5×10^6 cells. Before inoculation, the hosts were irradiated with 400 R X-rays in order to permit the growth of the graft in the absence of homograft reaction. Diploid and tetraploid cells were identified by chromosome counts on aceto-orcein stained smears prepared from tumors after colchicine treatment. The details of this procedure have been described previously [6]. The standard error of the determinations as established by counts of 200 metaphase plates on duplicate smears was less than 2 per cent of the mean.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Figure 1 illustrates the results obtained with cell populations in which the relative proportion of diploid and tetraploid cells was 50 : 50, 30 : 70, 5 : 95 and 0·5 : 99·5 per cent, respectively. It can be seen that all the populations reverted to the standard population composition which characterizes the ELD tumor. It can be also noted that the speed of the reversion was in a direct relationship with the size of the initial proportion of the diploid cells.

The following considerations were made to explain this finding:

(1) λ — fraction of the diploid cells divides per unit time giving rise to 2 diploid cells;

(2) μ — fraction of the diploid cells divides per unit time giving rise to 2 tetraploid cells by an endomitotic process; and

(3) ν — fraction of tetraploid cells divides per unit time giving rise to 2 tetraploid cells.

Assuming that λ, μ and ν are constants and thus independent e.g. of time, and considering furthermore, that cell divisions may occur independently of each other, it follows:

$$\frac{dD}{dt} = (\lambda - \mu) \cdot D \qquad (1)$$

$$\frac{dT}{dt} = 2\mu D + \nu T \qquad (2)$$

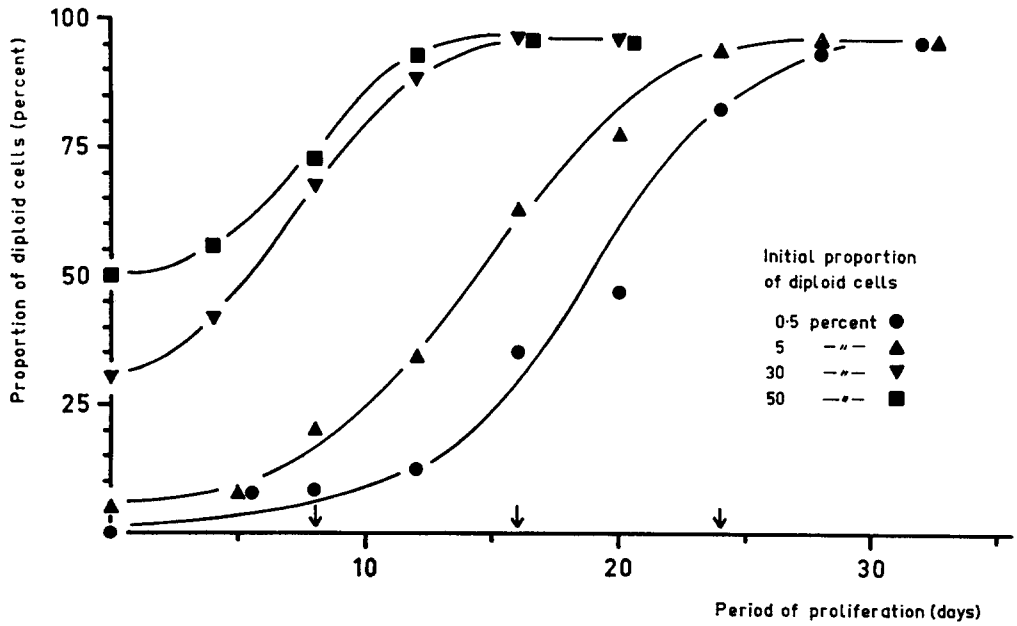


Fig. 1. *Relative proportion of diploid cells at different time intervals in the course of* in vivo *proliferation of populations composed of genetically related diploid and tetraploid tumor cells with an initial frequency of* 50 : 50, 30 : 70, 5 : 95 *and* 0·5 : 99·5 *per cent, respectively. Points represent mean values of* 2 *separate determinations with a standard error not larger than* 6 *per cent. Each determination is based on counts of* 200 *metaphase plates made by scoring duplicate smear preparations from the colchicine treated tumor cell population of* 1 *mouse. Arrows indicate the time of serial, intraperitoneal transfers of the tumor cell population.*

where D and T indicates the number of diploid and tetraploid cells, respectively.

By solving these equations with regard to the initial situation when $D(O)=D_0$ and $T(O)=T_0$ we obtain:

$$D(t)=D_0 \cdot \exp(\lambda-\mu)\,t \tag{3}$$

$$T(t)=\left(\frac{2\mu D_0}{\nu-\lambda+\mu}+T_0\right)\cdot\exp(\nu t)-\frac{2\mu D_0}{\nu-\lambda+\mu}\cdot\exp[(\lambda-\mu)\,t] \tag{4}$$

Considering the relative proportion of diploid cells at any time, $R(t)$, can be written

$$R(t)=\frac{D_0\cdot\exp[(\lambda-\mu)\,t]}{\left(\frac{2\mu D_0}{\nu-\lambda+\mu}+T_0\right)\cdot\exp(\nu t)+\frac{\nu-\lambda-\mu}{\nu-\lambda+\mu}\,D_0\cdot\exp[(\lambda-\mu)\,t]} \tag{5}$$

or, expressing $R(t)$ as a function of the initial proportion of diploid cells, R_0:

$$R(t)=\frac{R_0\cdot\exp[(\lambda-\mu-\nu)\,t]}{1-\frac{\nu-\lambda-\mu}{\nu-\lambda+\mu}\cdot R_0+\frac{\nu-\lambda-\mu}{\nu-\lambda+\mu}\,R_0\cdot\exp[(\lambda-\mu-\nu)\,t]} \tag{6}$$

Since we know that the final proportion of diploid cells reaches a constant value which is independent of the initial proportion:

$$\lim_{t\to\infty}R(t)=\frac{\nu-\lambda+\mu}{\nu-\lambda-\mu}=p=0{\cdot}97 \tag{7}$$

we can write:

$$R(t)=\frac{p\cdot R_0\cdot\exp[(\lambda-\mu-\nu)\,t]}{p-R_0+R_0\cdot\exp[(\lambda-\mu-\nu)\,t]} \tag{8}$$

The curve in Fig. 2 shows the variation of $R(t)$ with time as calculated by formula (8) considering a value for $p=0{\cdot}97$ and the situation when $R_0=0{\cdot}5\%$. Shift of this curve parallelly with the time axis to intersect $R(t)$ axis at a chosen level, permits the graphical construction of the curve which will describe the theoretical time relationship of the reversion for a certain R_0. In the present case, as an alternative, we normalized the experimental data presented in Fig. 1 by shifting the points parallelly with the time axis to correspond a common time scale as defined by $R_0=0{\cdot}5$. The starting values of the experiments, having an experimental error of a type different from the rest, were excluded. It can be seen that the experimental data are in a remarkably good agreement with the theoretical expectation. It can be concluded that the simple kinetic model implying the parameters λ, μ and ν explains well the dynamic balance of the subpopulations in the ELD tumor.

An estimation of the numerical value of

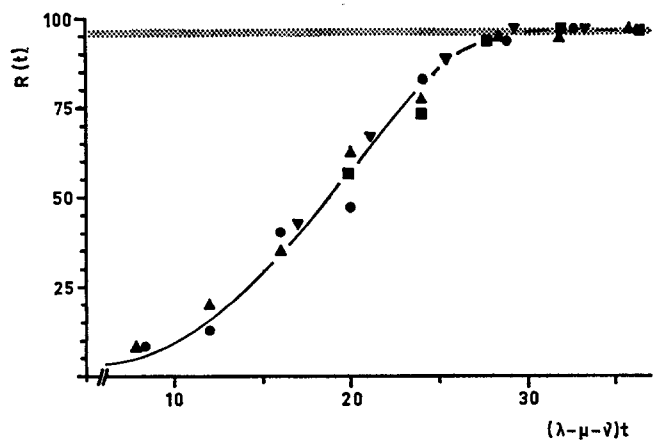


Fig. 2. Comparison of the experimental observations, illustrated in Fig. 1 with the theoretical kinetic model, expressed by formula 8 using constants p=0·97 *and* R_0=0·5 *per cent. The observational points were normalized by a shift parallelly with the time axis to correspond a time scale defined by these constants. Shaded area indicates lim* R(t) *with 95 per cent confidence limits.*
$t\to\infty$

these parameters can be made using formulas (3) and (8). Taking advantage of the experimental data presented here, and those which are available in a previous publication [5] and describe the growth curve of ELD cells, it can be calculated that $\mu \approx 0 \cdot 004 \pm 0 \cdot 001$, $\lambda \approx 1 \cdot 6$ and $\gamma \approx 1 \cdot 3$. Due to insufficient information with regard to the growth characteristics of ELD under the conditions relevant to the present experiments, the value of the latter two parameters represent approximations with a probably large error. Further growth tests are in progress to establish them with greater accuracy.

The closer knowledge of these kinetic parameters can be expected to help a better understanding of the conditions which occur after exposure of ELD to radiation. Diploid cells are more radiosensitive than tetraploid cells [6, 7]. After irradiation, their proportion in the population is decreased to a greater extent than the tetraploid cells. However, considering that λ is larger than ν, the population, on the whole, may not become more resistant. Remnants of faster growing sensitive, diploid cells, if present, will restitute the original sensitivity of the population. Radioselection of resistant cells with a subsequent increase of population resistance to irradiation would require certain alterations in the tumor kinetics. Experiments with mixed, model populations exposed to various doses of X-rays are being conducted to test whether such alterations may occur, i.e. whether radiation may induce a change in the inherent, apparently constant kinetic parameters of an established tumor.

Acknowledgements — The authors wish to acknowledge the valuable suggestions and advice given them by Professor J. Rotblat and Dr. B. Jansson. This work has been supported by grants from the Swedish Cancer Society, Sir Samuel Scott of Yews Trust and Stiftelsen Therese och Johan Anderssons Minne.

RESUME

De nombreuses études, au cours des dernières années, ont mis en évidence les variations intercellulaires de différentes caractéristiques métaboliques, nutritionelles, de croissance, antigéniques etc., dans les tumeurs. Ces résultats sont compatibles avec l'idée que les néoplasmes peuvent être considérés comme une population de cellules génétiquement hétérogène, dans laquelle la variabilité interclonale représente un attribut fondamental et où l'évolution se fait à travers la compétition entre les divers composants individuels de la population. Etant donné que beaucoup de propriétés cellulaires que l'on sait varier constituent aussi des facteurs importants pour déterminer la radiosensibilité, il en résulte que l'irradiation sublétale conduit à un remodelage séquentiel de la structure de la population dans les tumeurs. Des modèles expérimentaux furent établis, basés sur ces considérations, et utilisant des mélanges artificiels de cellules de plusieurs types, réalisant des populations de cellules tumorales de composition définie quant à la radiosensibilité et aux caractéristiques de croissance des divers éléments. Utilisant le contenu des cellules en ADN comme un marqueur spécifique, les modifications de la structure de la population proliférante furent analysées à intervalles variables. Les données montrent que certains types cellulaires ont une valeur sélective qui aboutit à un déplacement de l'équilibre entre différents génotypes compétitifs, ce qui peut avoir une importance décisive pour la croissance ultérieure de la population considérée.

SUMMARY

Diploid and tetraploid cell lines, both derived from the same Ehrlich ascites tumor, were mixed together in varying proportions. The resulting cell populations were grown in mice by serial intraperitoneal transfers. At regular time intervals, the relative proportion of the two cell types was determined by chromosome analysis of colchicine treated populations. In all cases, the frequency of diploid cells increased gradually, until a constant level was reached. The length of the growth period, necessary for the shift, was inversely related to the initial proportion of diploid cells. The observational data were in a good agreement with a theoretical kinetic model defined by an independent, average growth rate of the diploid and tetraploid subpopulations, and the occurrence of endomitotic processes in diploid cells giving rise to tetraploid cells at a constant rate. The numerical value of the kinetic parameters, calculated by mathematical formulas which were developed on the basis of the model, agreed well with previous estimates. The role of the particular kinetics in the development of radioresistant cell populations was discussed in view of the greater radioresistance of tetraploid cells as compared to diploid cells.

ZUSAMMENFASSUNG

Diploide und tetrapoide Zellstämme, beide aus dem gleichen Ehrlich-Ascites-Tumor abstammend, wurden in verschiedenem Verhältnis miteinander vermischt. Die sich ergebende Zellpopulation wurde in Mäusen durch intraperitoneale Reihenübertragung kultiviert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde das Verhältnis der beiden Zelltypen durch Chromosomenanalyse der mit Colchicin behandelten Populationen bestimmt. In allen Fällen nahm die Häufigkeit der diploiden Zellen stetig zu bis ein konstanter Spiegel erreicht war. Die Dauer der Wachstumsperiode, die für diese Verschiebung benötigt wurde, war umgekehrt proportional dem Anfangsverhältnis der diploiden Zellen. Die beobachteten Resultate standen in guter Übereinstimmung mit einem theoretischen kinetischen Modell, das durch eine unabhängige mittlere Wachstumsrate der diploiden und tetraploiden Unterpopulation gekennzeichnet ist und dem Vorliegen eines endomithoischen Prozesses in den diploiden Zellen, die zu einem stetigen Anwachsen des Anteils der tetraploiden Zellen führt. Die Zahlenwerte der kinetischen Parameter, die mit Hilfe mathematischer Formeln errechnet wurden, die sich aus diesem Modell ableiten ließen, zeigten gute Übereinstimmung mit den vorangegengenen Bestimmungen. Die Bedeutung der speziellen Kinetik bei der Entwicklung strahlenresistenter Zellpopulationen wird diskutiert im Hinblick auf die höhere Strahlenresistenz tetraploider Zellen im Vergleich zu diploiden Zellen.

REFERENCES

1. M. HARRIS, *Cell Culture and Somatic Variation.* Holt, Rinehart & Winston, New York (1964).
2. K. BAYREUTHER, Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. *Z. Naturforsch.* **7,** 554 (1952).
3. A. LEVAN and T. S. HAUSCHKA, Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J. nat. Cancer Inst.* **14,** 1 (1953).
4. K. KAZIWARA, Derivation of stable polyploid sublines from a hyperdiploid Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.* **14,** 795 (1954).
5. T. S. HAUSCHKA, S. T. GRINNELL, L. RÉVÉSZ and G. KLEIN, Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells *in vivo.* IV. Influence of doubled chromosome number on growth rate and final population size. *J. nat. Cancer Inst.* **19,** 13 (1957).
6. L. RÉVÉSZ and U. NORMAN, Relationship between chromosome ploidy and radiosensitivity in selected tumor sublines of common origin. *J. nat. Cancer Inst.* **25,** 1041 (1960).
7. L. RÉVÉSZ and B. LITTBRAND, Variation of the relative sensitivity of closely related neoplastic cell lines irradiated in culture in the presence or absence of oxygen. *Nature (Lond.)* **203,** 742 (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 335–342. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Changes in DNA Synthesis and Cell Proliferation During Hepatocarcinogenesis by Diethylnitrosamine*

M. F. RAJEWSKY
Max-Planck-Institut für Biophysik
Frankfurt a.M., Germany

THE EXPERIMENTS described in this paper have been carried out as part of a general study on the regulation of proliferation in mammalian cell populations during carcinogenesis *in vivo*. Such investigations have become more promising since
(a) the specific [1] incorporation of radioactive thymidine (Tdr) into DNA during the *S*-period of the cell cycle [2, 3] can be used for the determination of various parameters of cell proliferation kinetics with the aid of autoradiographic and liquid scintillation techniques, and
(b) systems have become available for experimental carcinogenesis in specific organs and tissues, with high yields of malignant tumours and precise and reproducible dose–response relationships.

During the past years, a new class of powerful chemical carcinogens with alkylating properties, the dialkylnitrosamines, have been characterised [4, 5]. One of these compounds, diethylnitrosamine (DEN), has been selected for the investigation presented here, the experimental system being the induction of multifocal hepatocellular carcinomata in rats by continuous oral administration of DEN at a daily dose of 5 mg/kg body weight under standardised conditions [6, 7].

This system was chosen for several reasons:
(a) In contrast to other hepatocarcinogens, feeding of DEN to rats at the indicated dose level results in the development of hepatocellular carcinomata only and there is practically no reaction of connective tissue or bile duct cells [8]. The tumour yield is almost 100 per cent and the dose-response relationships are extraordinarily precise [6, 7], the median time (t_{50}) until death with liver carcinomata being about 160 days$\pm$5–10% (S.D.).
(b) The chemical basis of the biological effects of the dialkylnitrosamines is relatively well understood [see 9, 5]. It is believed that these compounds are transformed *in vivo* into diazoalkanes and carbonium ions after enzymatic oxidative dealkylation. An important site of alkylation is the N-7-position of guanine in RNA and DNA [10]. Hence, in the case of the carcinogenic nitrosamines, diazoalkanes or carbonium ions may well represent the proximate carcinogens.
(c) At the same daily dose (5 mg DEN/kg body weight), the DEN–rat liver system has also been studied by other groups from different viewpoints. For example, histological and cytospectrophotometric observations [8, 11] have shown that while in the parenchymal cell population there is a shift of the average ploidy

*Paper presented at the First Meeting of the European Study Group for Cell Proliferation, Rome, April 26th, 1967, in conjunction with the Second International Symposium on the Biological Characterisation of Human Tumours, Rome, April 24th–26th, 1967.

to somewhat higher values, suddenly after about 120 days of DEN administration groups of small, seemingly diploid cells with highly basophilic cytoplasm appear in numerous lobular centers. These cells are considered to be the origin of the multifocal 'microcarcinomata'.

The only study, to our knowledge, in relation to the rate of DNA synthesis and cell proliferation in this system has been reported by Côté *et al.* [12]. These authors have, by autoradiography, determined the proportion of cells in DNA synthesis after *in vivo* pulse exposure to ^{3}H-Tdr (^{3}H-thymidine labelling index; L.I.) at several stages of DEN carcinogenesis. Increased L.I. values were observed, especially for the parenchymal cells. However, the small number of experimental animals excluded a quantitative analysis as a function of time of carcinogenesis.

To study in more detail DNA synthesis and cell proliferation of the main liver cell populations in this system, we have, therefore, combined autoradiographic L.I. determinations with measurements of *in vitro* incorporation of ^{3}H-Tdr into liver explants under standardised conditions [13, 14].

MATERIALS AND METHODS

One hundred and four male rats of the inbred strain BDII, 7–8 months of age, were used. The animals were housed 2 per cage and body weights were recorded once weekly. At the start of the experiments, the mean body weight was 227 g$\pm$6% (S.D.).

DEN was administered in the drinking water at a daily dose of 5 mg per kg body weight, corresponding to about 2% of the acute LD_{50}. No loss of animals due to toxic effects of the drug and no cases of liver cirrhosis were recorded. The mean body weight increased slightly during the experiment, reaching a value of 246 g$\pm$11% (S.D.) after 125 days of DEN administration.

A group of 25 animals was used to establish the median time (t_{50}) of death with liver carcinomata. All animals of this group died with multifocal hepatocellular carcinomata. t_{50} was 160 days$\pm$6% (S.D.).

For the autoradiographic L.I. determinations, 6 control animals (no DEN treatment) and one animal after 20, 60, 82, 93, 107, 117, 132 and 149 days of DEN administration respectively, were injected intraperitoneally with 0·5 µCi of ^{3}H-Tdr (14 Ci/mM) at 9.00 a.m. and sacrified 90 min later. Autoradiographs of 4–5 µ liver sections were prepared with Ilford K5 emulsion according to the dipping technique [15]. After an exposure time of 40 days, the preparations were developed and stained with hematoxylin and eosin. About $1{\cdot}5\times10^4$ cells per liver were counted in randomly selected areas to determine the L.I. values for the different liver cell populations. In addition, the cell counts from these preparations were used to compute the ratio of parenchymal to non-parenchymal liver cells as a function of time of carcinogenesis.

The characteristics of the standardised *in vitro* system for the measurement of ^{3}H-Tdr incorporation into liver explants have been reported elsewhere [13, 14]; a short description is, therefore, sufficient in this context.

Fifty-three animals treated with DEN and 12 untreated control animals were sacrificed (10.00 a.m.) in 2–4 days intervals during the period of the experiment. Under sterile conditions and at 4°C, cubic explants of 1 mg fresh weight were cut randomly from the livers with cataract knives [16]. Four culture tubes were prepared per liver, each containing 20 explants (=20 mg$\pm$3% S.D.) in 3 ml synthetic medium "199" plus 1 ml calf serum. One millilitre Hanks balanced salt solution containing 2 µCi ^{3}H-Tdr (2·7 Ci/mM) was then added per tube, the final ^{3}H-activity in the medium being 0·4 µCi per ml. The tubes were brought to 37°C in a water bath, stoppered tightly, and incubated at 37·5°C in a roller incubator (23 rev/min). After 500 min, incorporation of Tdr was stopped by cooling to 4°C. The explants were then placed into stainless steel baskets and washed in three changes of Hanks solution (4°C) containing an excess of unlabelled Tdr, for 15, 30 and 75 min respectively, followed by an extraction with cold 5% TCA for 10 min. After vacuum drying to constant weight and dry weight determination, the explants from all four tubes were pooled and combusted, using a modified dry oxidation technique [17] and methanol as the absorbent for the resulting HTO. The ^{3}H-activity per mg dry weight was measured in a three channel liquid scintillation counter and the channels ratio method [18] was used for quench correction.

RESULTS AND DISCUSSION

It is well known that in suckling rats (up to a body weight of about 30 g) the parenchymal liver cells are predominantly diploid (90%). The proportions of diploid and tetraploid nuclei change rapidly with increasing body weight, reaching a fairly stable level of about 10% diploid and 80% tetraploid nuclei at a body weight of about 100 g [19]. On the

Table 1. *Cell populations and autoradiographic* ^{3}H-Tdr *labelling indices* (L.I.) *in adult* BDII *rat liver. Mean values from measurements in* 6 *control animals. Standard deviations* $<\pm 5\%$. *Total liver* L.I.: 0·53%

Cell population	Ploidy	Fraction of all Liver cells (%)		L.I. (%)	Fraction of all ^{3}H-labelled Liver cells (%)	
Parenchymal cells	2, *4*, 8 *n*	60·7		0·29	33·1	
Littoral cells	2 *n*	35·3		0·94	62·5	
Bile duct epithelia	2 *n*	1·1	39·3	0·02	0·04	66·9
Other cell types	2 *n*	2·9		0·80	4·4	

basis of cytospectrophotometric [19] and autoradiographic [20] results, the hypothesis has been advanced that it is essentially the diploid compartment of the parenchymal liver cell population which is responsible for cell division and polyploidisation.

Normally the L.I. gives information on the rate of cell production, provided a reasonable assumption can be made for the duration of the DNA synthetic period (t_S) of the cell cycle. In the case of the parenchymal liver cells, however, the L.I. merely indicates the proportion of cells in DNA synthesis since, in contrast to most other cell types, a DNA synthesizing parenchymal liver cell does not necessarily proceed to division but may instead be doubling its ploidy. Therefore, and as a consequence of the low L.I. of the parenchymal liver cells in the adult animal [21], parameters of cell kinetics other than the L.I. can only be measured with difficulties in this particular cell population. In the undisturbed "steady state" system, such measurements have only been attempted by very few authors [22–24].

Table 1 shows the mean L.I. values obtained by autoradiography for the main liver cell populations of 6 control rats (no DEN treatment) sacrificed at 30-day intervals during the experiment. In these control livers, inter animal variation of L.I. values was surprisingly low ($<5\%$ S.D.).

Although the autoradiographic experiments had to be limited to a small number of animals, some information was obtained on the L.I. of the parenchymal and non-parenchymal liver cell populations as a function of time of DEN administration (Fig. 1). In fairly good agreement with data published by Côté *et al.* [12] we found no significant changes in the proliferative activities of the non-parenchmal cell populations, whereas already on the 20th day of carcinogenesis the L.I. of the parenchymal cells was increased by a factor of 2·5 to 3, and remained at this level until approximately the 100th to 120th day. At this time basophilic cell groups appear, followed by multiple 'microcarcinomata', and almost simultaneously the fraction of DNA synthesizing cells increases rapidly as documented by higher L.I. values. An L.I. value of 15·1% was measured in an advanced hepatocellular carcinoma.

To analyse in more detail the DNA synthetic activity of the liver during DEN carcinogenesis, *in vitro* incorporation of ^{3}H-Tdr into fresh liver explants was measured, using the standardised procedure referred to under 'materials and methods' [13, 14]. Compared with L.I. determination by autoradiography, this technique is much less time consuming and permitted measurements to be performed every 2–4 days in a total of 53 experimental and 12 control livers.

When the incubation of cubic tissue explants in ^{3}H-Tdr containing medium is carried out under air atmosphere (as was done in the experiments reported here), only cells in a peripheral zone of the explants (depth about 110μ in explants from adult rat liver [25]) proceed through the *S*-period of the cell cycle and incorporate ^{3}H-Tdr into their DNA. The depth of this "zone of DNA synthesis" is proportional to the square root of (c_0/Q_{O_2}), where c_0 is the oxygen partial pressure and Q_{O_2} the tissue specific oxygen consumption.

The *in vitro* data (expressed as ^{3}H-activity per mg dry weight) give information analogous to relative liver L.I. values if (a) incorporation of ^{3}H-Tdr is proportional to the ploidy of the DNA synthesizing cells, and if (b) the depth of the "zone of DNA synthesis" in the explants and (c) ploidy and rate of DNA synthesis of the *S*-cells do not change during the time of DEN carcinogenesis. (a) is an acceptable assumption, and (b) appears to be fulfilled since c^2 was kept constant and Q_{O_2} does not change significantly during hepatocarcinogenesis by DEN [26]; (c) can be tested by comparison of the *in vitro* data with those obtained by autoradiography.

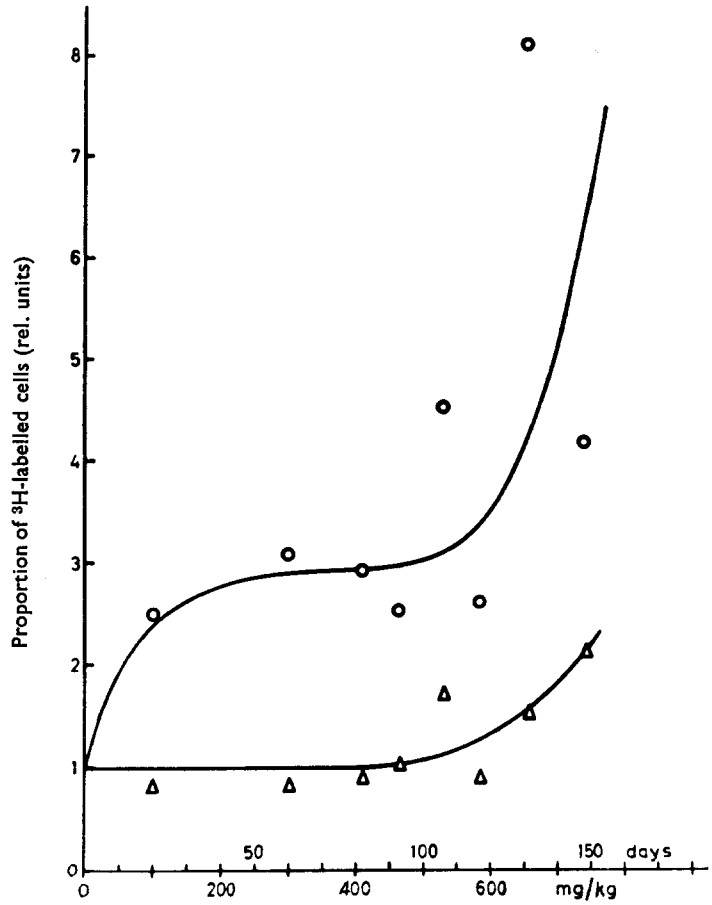


Fig. 1. *Autoradiographic* ³H-Tdr *labelling indices of parenchymal* (○) *and non-parenchymal* (△) *liver cells as a function of time hepatocarcinogenesis by* DEN.
Ordinate: *Proportion of* ³H-*labelled cells* (*relative units*).
Abscissa: *Above: Time* (days) *after beginning of* DEN *administration.*
Below: Total administered dose of DEN (*mg/kg body weight*).

Figure 2 shows the results of the *in vitro* experiments. Although about 6 times more experimental animals were used for these measurements than for autoradiography, the variation of the measured values still does not permit a complete analysis of the "fine structure" of the investigated process. However, several characteristic features appear more clearly.

The *in vitro* data are in good agreement with the corresponding total liver L.I. values, computed from the autoradiographic L.I. values of the parenchymal and non-parenchymal cell populations as a function of time of carcinogenesis (see Fig. 1). This is also the case for the parenchymal cell population alone, when the *in vitro* data are corrected by subtraction of a constant value representing the contribution of the non-parenchymal cells to the total ³H-activity of the explants. The correction is based on the autoradiographic finding (see Fig. 1) that the proliferative activity of the non-parenchymal cell populations remains unaltered during DEN carcinogenesis, and on two assumptions mentioned before, namely that ³H-Tdr incorporation is proportional to the ploidy of the DNA synthesizing cell, and that ploidy and rate of DNA synthesis of the *S*-cells does not significantly change during DEN carcinogenesis.

The best fit of the corrected *in vitro* data with the autoradiographic L.I. values for the parenchymal cell population was obtained when the DNA synthesizing parenchymal cells were assumed to be diploid. This supports the hypothesis that the diploid cells represent the main DNA synthesizing compartment of the parenchymal cell population [19, 20], and extends it to the situation where this cell population is subject to the effects of a carcinogen.

A further result of the *in vitro* experiments that would have remained undetected on the basis of the autoradiographic data alone, is the fact that the increase in ³H-Tdr incorporation (and L.I. of the parenchymal cells) to a level 2–3 times higher than the control value is

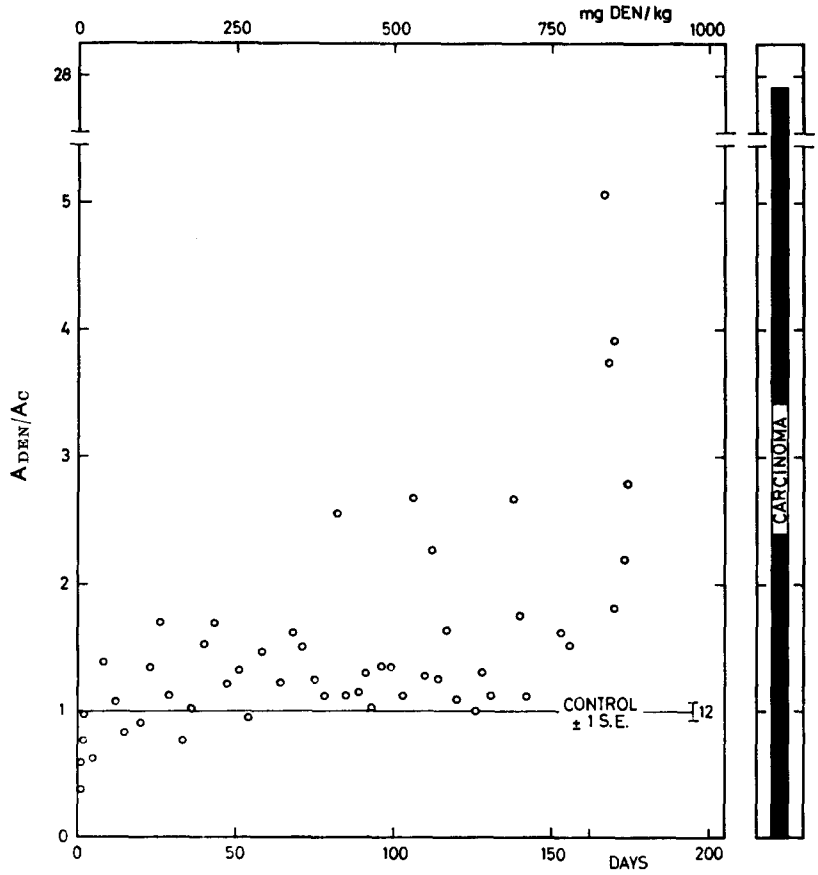


Fig. 2. In vitro *incorporation of* ^{3}H-Tdr *into rat liver explants as a function of time of hepatocarcinogenesis by* DEN in vivo. *Each point represents the mean value for* 80 *randomly selected* 1 *mg explants from one liver. For comparison: Mean value for hepatocellular carcinomata.*

Ordinate: *Quotient* (A_{DEN}/A_C).

A_{DEN}: *Rel.* ^{3}H-*activity* (*counts/min/mg dry weight*) *of liver explants from* DEN *treated animals.*

A_C: *Mean rel.* ^{3}H-*activity* (*counts/min/mg dry weight*) *of liver explants from* 12 *control animals* (*no* DEN *treatment*), *sacrificed at* 15 *day intervals during the time of the experiment.*

There was no apparent trend in the 12 *control values during the time of the experiment.*

S.E. $_{control}$: ± 7%.

Abscissa: *Above: Total administered dose of* DEN (*mg/kg body weight*).

Below: Time (*days*) *after beginning of* DEN *administration.*

preceded by an initial depression of DNA synthesis. ^{3}H-Tdr incorporation drops sharply soon after the start of DEN administration, and it takes about 3–5 days until the system begins to respond with an overshoot reaction. Preliminary results of experiments presently carried out in this laboratory indicate that this initial depression of DNA synthesis is not restricted to the parenchymal cell population. There are undoubtedly analogies between this phenomenon and the behaviour of DNA synthesis during liver regeneration [27], and it may be assumed that under the influence of the carcinogen a certain amount of parenchymal cell damage and/or death must first be accumulated before a "regenerative" response is triggered.

The increase in the proportion of DNA synthesizing parenchymal cells after the initial depression of DNA synthesis could be the result of an increase in the proliferative fraction of the population (e.g. re-entry of so-called G_0-cells into the cell cycle; see ref. 14) and/or a shortening of the duration of the cell cycle relative to the duration of the *S*-period. Both effects are known to occur to a different extent during mammary tumour development in the C3H mouse [28].

The degree of polyploidisation of the parenchymal cells during DEN carcinogenesis [11] does not appear high enough to explain the 2–3 fold increased level of L.I. and ^{3}H-Tdr incorporation maintained for about 100–120 days; furthermore, a higher incidence of

parenchymal cells in mitosis has been observed during DEN carcinogenesis [8]. It may, therefore, be assumed that at least part of these cells proceed to division. This leads to the question whether the result is a progressive increase in the total number of parenchymal cells during the first 100–120 days of carcinogenesis, or the higher rate of cell proliferation merely compensates a constant increased rate of cell loss. If, as the autoradiographic results indicate, the proliferative activity of the non-parenchymal cells remains unaltered, determination of the number of parenchymal cells as a fraction of all liver cells at different times during carcinogenesis should provide an answer to this question. It was found that the fraction of parenchymal cells remained constant during the time of the experiment ($0{\cdot}606 \pm 1{\cdot}1\%$ S.E.; 14 measurements, including 6 control livers). The increased proliferative activity of the parenchymal cell population may, therefore, be interpreted as a compensatory response to an increased rate of cell loss resulting from the continuous administration of the carcinogen.

Interestingly, observations on mitotic activity [29] and DNA synthesis [30] of the parenchymal liver cells during 4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis have also suggested that until the appearance of hyperbasophilic regions (after 90–180 days, in this system), this cell population undergoes "a process of reparative cell formation in response to the cellular damage caused by the carcinogen". The finding [31–33] that the total number of liver cells remains constant during an initial 4–8-week interval of hepatocarcinogenesis by 2-acetylaminofluorene, and then increases at a constant rate, may perhaps be interpreted in a similar way.

Reactions of cell populations to carcinogens similar to the one described for hepatocarcinogenesis by DEN, have also been observed in other carcinogenic systems. In chemically induced skin carcinogenesis in mice, for example, an initial depression of DNA synthesis accompanied by extensive cell loss is also followed by an overshoot in proliferation [34]. It remains to be seen whether the apparently general property of carcinogens, to cause increased cell proliferation in the respective target cell populations, is an irrelevant side effect or creates a necessary condition for malignant transformation and/or realisation of malignant growth [35].

Acknowledgements — The author wishes to thank Mrs. G. Dose-Augstein for her valuable technical assistance.

Thanks are also due to Prof. H. Druckrey and Dr. R. Preussmann (Forschergruppe Praeventivmedizin, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i.Br., Germany) for a gift of N,N-diethylnitrosamine and the generous supply of BDII strain rats.

RESUME

Dans le cadre d'une étude générale sur la régulation de la prolifération de populations de cellules de mammifères, au cours de la cancérogénèse, la synthèse de l'ADN et l'activité proliférative furent étudiées dans le foie de rat, pendant l'administration continue de diéthylnitrosamine. Ce système cancérigène est caractérisé par un rendement très élevé, par une spécificité pour le foie, et par une corrélation très précise par rapport à la dose utilisée (survie médiane pour le carcinome hépatocellulaire multifocal: 160 *jours, DS* 6%). *Les index de marquage (I.M.) par la thymidine ^3H, après exposition instantanée* in vivo, *à divers stades de la cancérogénèse, furent combinés aux mesures de l'incorporation* in vitro *de la thymidine ^3H dans des explants de foie frais. Tandis que l'activité proliférative des cellules non parenchymateuses restait inchangée durant la cancérogénèse, l'incorporation de thymidine ^3H et l'I.M. des cellules parenchymateuses présentaient des modifications caractéristiques. Celles-ci sont analysées et discutées en ce qui concerne l'interférence du carcinogène avec les mécanismes contrôlant la prolifération des cellules hépatiques.*

SUMMARY

In the context of a general study on the regulation of proliferation in mammalian cell populations during carcinogenesis, DNA synthesis and proliferative activity in rat liver was investigated during carcinogenesis by continuous administration of diethylnitrosamine. This carcinogenic system is characterised by an extremely high and liver specific tumour yield and very precise dose response relationships (median time of death with multifocal hepatocellular carcinomata: 160 *days* $\pm 6\%$ *S.D.). Autoradiographic determination of ^3H-thymidine labelling indices (L.I.) after* in vivo *pulse exposure to ^3H-Tdr at several*

stages of carcinogenesis was combined with in vitro *measurements of* ^{3}*H-Tdr incorporation into fresh liver explants under standardised conditions. Whereas the proliferative activities of the non-parenchymal cell populations remained unaltered during carcinogenesis,* ^{3}*H-Tdr incorporation and L.I. of the parenchymal cell population showed characteristic changes. These are analysed and discussed in relation to the interference of the carcinogen with mechanisms controlling liver cell proliferation.*

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen einer allgemeinen Untersuchung über die Wachstumsregulation von Säugetierzellpopulationen während der Carcinogenese wird die DNS-Synthese und die proliferative Aktivität der Rattenleber während der Carcinogenese durch kontinuierliche Zufuhr von Diäthylnitrosamin geprüft. Das carcinogenetische System ist durch seine extrem hohe und leberspezifische Tumorausbeute mit sehr exakter Dosiswirkungsabhängigkeit gekennzeichnet. (Mittlere Überlebenszeit bei multifokalem hepatozellulären Karzinom: 160 *Tage*$\pm$6% *S.D.). Die autoradiographische Bestimmung des* ^{3}*H-Thymidin-Markierungsindex nach einer Einzeit* in vivo ^{3}*H-Thymidin-Gabe in verschiedenen Stadien der Carcinogenese wurde kombiniert mit* in vitro*-Messungen der* ^{3}*H-Thymidin-Inkorporation in frisches Leberexplantat unter Standardbedingungen. Während die Proliferationsaktivität nicht parenchymaler Zellpopulationen während der Carcinogenese unverändert blieb, zeigte die* ^{3}*H-Thymidin-Aufnahme und der M. I. der parenchymalen Zellpopulationen charakteristische Veränderungen. Diese werden analysiert und diskutiert in Beziehung auf die Wechselwirkung von Carcinogen mit Mechanismen, die die Proliferation der Leberzellen hemmen.*

REFERENCES

1. P. Reichard and B. Estborn, Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J. biol. Chem.* **188,** 839 (1951).
2. A. Howard and S. R. Pelc, Nuclear incorporation of P^{32} as demonstrated by autoradiographs. *Exp. Cell Res.* **2,** 178 (1951).
3. W. L. Hughes, V. P. Bond, G. Brecker, E. P. Cronkite, R. B. Painter, H. Quastler and F. G. Sherman, Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **44,** 476 (1958).
4. P. N. Magee and R. Schoental, Carcinogenesis by nitroso compounds. *Brit. med. Bull.* **20,** 102 (1964).
5. H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic, D. Schmähl, J. Afkham, G. Blum, H. D. Mennel, M. Müller, P. Petropoulos and H. Schneider, Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.* **69,** 103 (1967).
6. H. Druckrey, A. Schildbach, D. Schmähl, R. Preussmann and S. Ivankovic, Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. *Arzneimittel-Forsch.* **13,** 841 (1963).
7. M. F. Rajewsky, W. Dauber and H. Frankenberg, Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science* **152,** 83 (1966).
8. E. Grundmann and H. Sieburg, Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126,** 57 (1962).
9. E. C. Miller and J. A. Miller, Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* **18,** 805 (1966).
10. P. N. Magee and E. Farber, Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine *in vivo*. *Biochem. J.* **83,** 114 (1962).
11. H. P. Hobik and E. Grundmann, Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat.* **127,** 25 (1962).
12. J. Cöté, W. Oehlert and F. Büchner, Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen Kanzerisierung der Leberparenchymzelle der Ratte durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat.* **127,** 450 (1962).

13. M. F. Rajewsky, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours. II. Characteristics of a standardised *in vitro* system for the measurement of ^{3}H-thymidine incorporation into tissue explants. *Europ. J. Cancer* **1,** 281 (1965).
14. M. F. Rajewsky, Zellproliferation in normalen und malignen Geweben: ^{3}H-Thymidin-Einbau *in vitro* unter Standardbedingungen. *Biophysik.* **3,** 65 (1966).
15. B. M. Kopriwa and C. P. Leblond, Improvements in the coating technique of radioautography. *J. Histochem. Cytochem.* **10,** 269 (1962).
16. H. Wrba and H. Rabes, Zur Methode der quantitativen Bestimmung des Umsatzes an markierten Stoffen durch Organkulturen. *Exp. Cell Res.* **26,** 62 (1962).
17. F. Kalberer and J. Rutschmann, Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischem Probenmaterial mittels des Flüssigkeits-Scintillations-Zählers. *Helv. chim. Acta.* **242,** 1957 (1961).
18. E. T. Bush, General applicability of the channels ratio method of measuring liquid scintillation counting efficiencies. *Analyt. Chem.* **35,** 1024 (1963).
19. H. Naora, Microspectrophotometry of cell nuclei stained with the Feulgen reaction. IV. Formation of tetraploid nuclei in rat liver cells during postnatal growth. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3,** 949 (1957).
20. J. Post and J. Hoffman, Further studies on the replication of rat liver cells *in vivo*. *Exp. Cell Res.* **40,** 333 (1965).
21. E. Stöcker, E. Teubner and G. Rosenbusch, Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. *Verh. dtsch. path. Ges.* **48,** 295 (1964).
22. J. Post, C.-Y. Huang and J. Hoffman, The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat. *J. Cell Biol.* **18,** 1 (1963).
23. J. Post and J. Hoffman, Changes in the replication times and patterns of the liver cell during the life of the rat. *Exp. Cell Res.* **36,** 111 (1964).
24. E. Stoecker and W. D. Heine, Über die Proliferation von Nieren — und Leberepithel unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Beitr. path. Anat.* **131,** 410 (1965).
25. M. F. Rajewsky, Thymidin-Inkorporation und O_2-Konzentration in Explantaten normaler und maligner Gewebe *in vitro*. *Naturwissenschaften* **52,** 341 (1965).
26. E. Heise and M. Görlich, Veränderungen der Stoffwechselgrößen und der Aktivitäten glykolytischer Fermente wahrend der Cancerisierung von Rattenlebern durch Diathylnitrosamin. *Exp. Cell Res.* **33,** 289 (1964).
27. N. L. R. Bucher, Regeneration of mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.* **15,** 245 (1963).
28. F. Bresciani, A comparison of the cell generative cycle in normal, hyperplastic and neoplastic mammary gland of the C3H mouse. In *Cellular Radiation Biology*, 18th Ann. Symp. Fundamental Cancer Research, p. 547. University of Texas, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute (1964).
29. R. Daoust, The mitotic activity in rat liver during DAB carcinogenesis. *Cancer Res.* **22,** 743 (1962).
30. A. Simard and R. Daoust, DNA synthesis and neoplastic transformation in rat liver parenchyma. *Cancer Res.* **26,** 1665 (1966).
31. A. K. Laird and A. D. Barton, Cell growth and the development of tumors. *Nature (Lond.)* **183,** 1655 (1959).
32. A. K. Laird and A. D. Barton, Cell proliferation in precancerous liver: Linear growth curve. *Nature (Lond.)* **188,** 417 (1960).
33. A. K. Laird and A. D. Barton, Cell proliferation in precancerous liver: Relation to presence and dose of carcinogen. *J. nat. Cancer Inst.* **27,** 827 (1961).
34. O. H. Iversen and A. Evensen, Experimental skin carcinogenesis in mice. *Acta path. microbiol. scand.*, Suppl. 156 (1962).
35. L. Sachs, An analysis of the mechanism of carcinogenesis by polyoma virus, hydrocarbons, and X-irradiation. In *Molekulare Biologie des malignen Wachstums*, 17. *Colloquium d. Ges. f. Biologische Chemie, Mosbach/Baden*, p. 242. Springer-Verlag (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 343–348. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Blast Cell Proliferation in a Child with Untreated Acute Leukaemia: Results of a Preliminary Study Using Tritiated Thymidine for Pulse-Labelling *in vivo*

H. P. WAGNER and H. COTTIER

Swiss Center for Clinical Tumour Research, Berne, Switzerland, and Department of Pathology, University of Berne, Switzerland

THE PROLIFERATIVE pattern of blast cells in acute leukemia [1–8] and that of granulocyte and erythrocyte precursors in hematologically normal patients [9] has been assessed *in vivo* with tritiated thymidine (^{3}HT) as a cell label. Blast cell proliferation in so-called acute lymphoid leukemia (ALL) of childhood has been studied *in vivo* by analyzing the variation of the labelling index of interphase-blasts (ILI) and the variation of the mean or median grain count per labelled interphase-blast (MGC/LIC), both as a function of time after one [2, 5, 7] or more [4, 7] injections of ^{3}HT. In one instance [7] the variation of the mitotic labelling index (MLI) of bone marrow blasts after pulse-labelling with ^{3}HT has been investigated as well.

In this communication we present the results of a preliminary study based on (a) a combined analysis of the ILI- and MGC/LIC variation and (b) a combined analysis of the variation of the MLI and the mean or median grain count per labelled mitotic figure (MGC/LMF), all as a function of time after a single intravenous injection of ^{3}HT.

METHODS

The patient investigated, a ten-year-old girl, was admitted to the Pediatric Clinic, University of Berne, because of pallor and hemorrhagic skin lesions. Her initial blood count was as follows: hemoglobin 7·2g per cent, white blood cell count 69,000/mm^3 with 93 per cent blast cells, platelet count 6000/mm^3. In the bone marrow over 95 per cent blast cells were found. On the second day in hospital at 12.25 p.m. the patient was given intravenously 0·2 μc of ^{3}H-thymidine per gramme body weight (Amersham, specific activity 1·9 c/mM, concentration 1 mc/ml). Bone marrow samples were then obtained from sternum and iliac crests at frequent time intervals up to 13½ hr after ^{3}HT injection. Local anesthesia was maintained with Dépôt–Impletol®. Smears were prepared immediately from each sample, air-dried, processed for autoradiography with liquid emulsion (Eastman Kodak NTB-2) and exposed for 121 days in dehumidified air at 4°C. After development, the smears were stained with Giemsa solution (concentration 1 : 100, pH 6·0), dried and mounted with coverslips. Due to rapid clotting a few samples obtained between 2 and 6 hr after ^{3}HT injection could not be evaluated properly and were discarded.

In all samples evaluated at least 1000 bone marrow blasts in interphase were counted and differentiated into 6 classes according to nuclear size, class 1 corresponding to the smallest,

class 6 to the largest nuclear size (Fig. 1). The grains over each nucleus were registered. In addition, all mitotic figures of blast cells, usually 50 to 100, were classified according to mitotic phase and size of the nuclear material. The grains over the nuclear material of each mitotic figure were counted. Mitotic figures of red cell precursors were rarely observed and had finer, more condensed chromosomes (Fig. 1). These mitotic figures were registered separately and were not used for the MLI and MGC/LMF calculations. Although background was negligible interphase cells and mitotic figures with less than 4 grains were considered to be unlabelled.

RESULTS

Studies on bone narrow blasts in interphase (ILI, MGC/LIC)

Of all blast cells in the bone marrow 8·25 per cent were found to be labelled 30 min after ^{3}HT injection. Most of the labelled blasts were large and were classified as belonging to nuclear size classes 6 and 5. Some were medium sized and corresponded to nuclear size classes 4 or 3. None of the small blast cells with nuclear sizes 2 or 1 were labelled initially.

Of all atypical cells counted 3·1 per cent had nuclei of size 6 or 5. Fifty-four per cent of these large cells were labelled initially.

In Fig. 2 the variation of the labelling index of cells in interphase is shown separately for all, for the largest and for the smallest blasts, as a function of time after a single intravenous injection of ^{3}HT. Only the labelling index of blasts with nuclear sizes 1 and 2 varies significantly during the 13½ hr observation period: it starts to rise above the zero line 4½ hr after ^{3}HT injection and slowly reaches a value of 6·9 per cent 13½ hr after administration of the radioactive precursor. Note that the curve for large blasts oscillates around 50 per cent throughout the observation period.

In Fig. 3 the MGC/LIC of blasts with nuclear sizes 5 and 6 is represented as a function of time after a single injection of ^{3}HT. During the second half of the observation period a slight decrease of the curve is found.

Studies on bone marrow blasts in mitosis (MLI, MGC/LMF)

The overall mitotic index was 0·76°/$_{oo}$. Most of the mitotic figures observed were classified as belonging to nuclear size class 5.

In the *upper half of Fig. 4* the variation of the MLI of bone marrow blasts is shown as a function of time after a single intravenous injection of ^{3}HT. The MLI starts to rise later than 2 and prior to 4½ hr following administration of ^{3}HT. Eighty-three per cent of all mitotic figures are labelled 6 hr after pulse-labelling. Thereafter the MLI oscillates around 80–85 per cent. A value of 100 per cent is never reached. No significant fall of the MLI curve is observed during the rest of the 13½ hr observation period.

In the *lower half of Fig. 4* the variation of the MGC/LMF is represented as a function of time

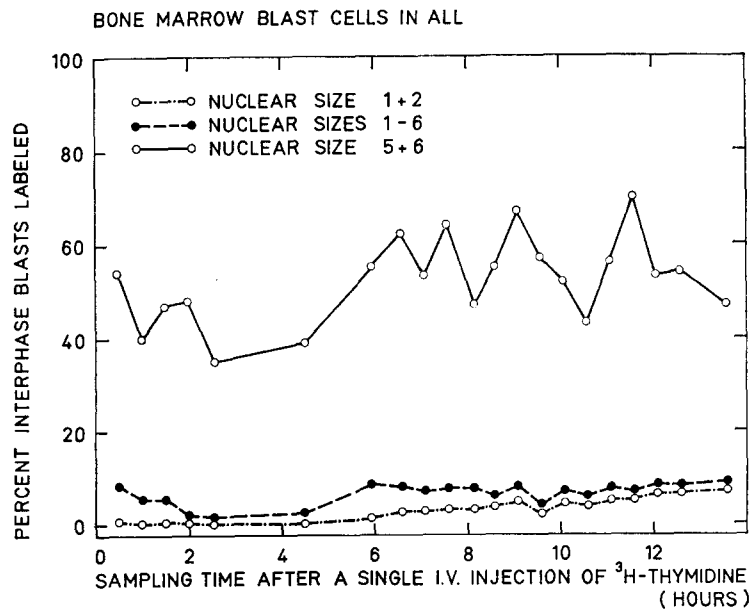


Fig. 2. Variation of the labelling index for all, for the largest and for the smallest bone marrow blasts in interphase, as a function of time, after a single injection of ^{3}HT.

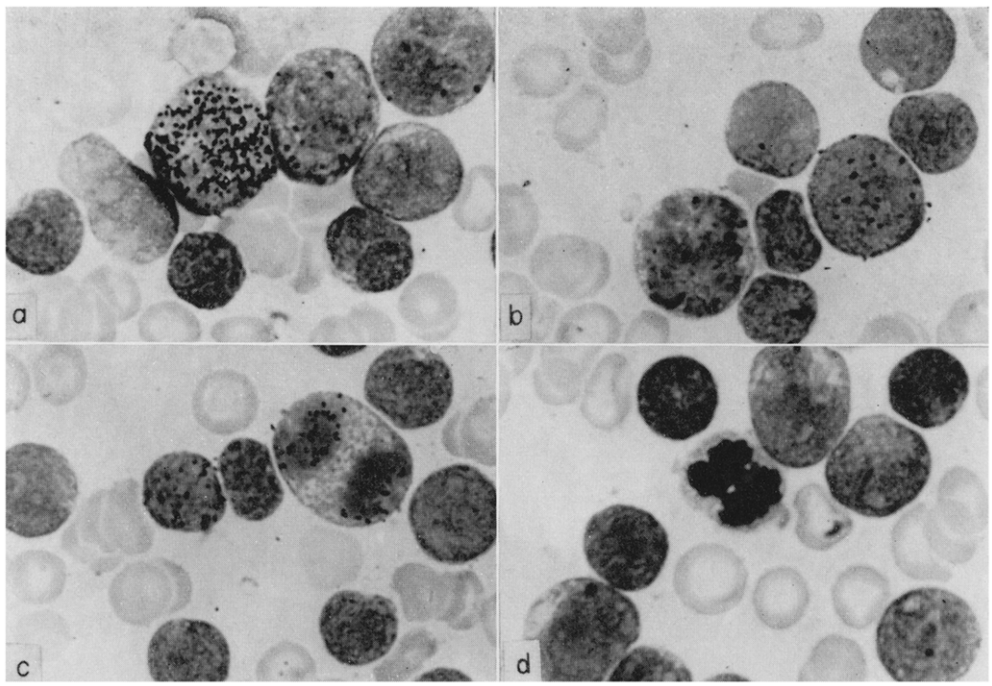


Fig. 1. *Autoradiographs of bone marrow cells obtained* $6\frac{1}{2}$ *hr after a single injection of* ^{3}HT. (*Giemsa, enlargement* $\times$ 2000).

(a) blasts with nuclear sizes 1–5.
(b) blast, nuclear size 5, in anaphase.
(c) blast, nuclear size 5, in telophase.
(d) normoblast in anaphase. Note the more condensed nuclear material.

(to face p. 344)

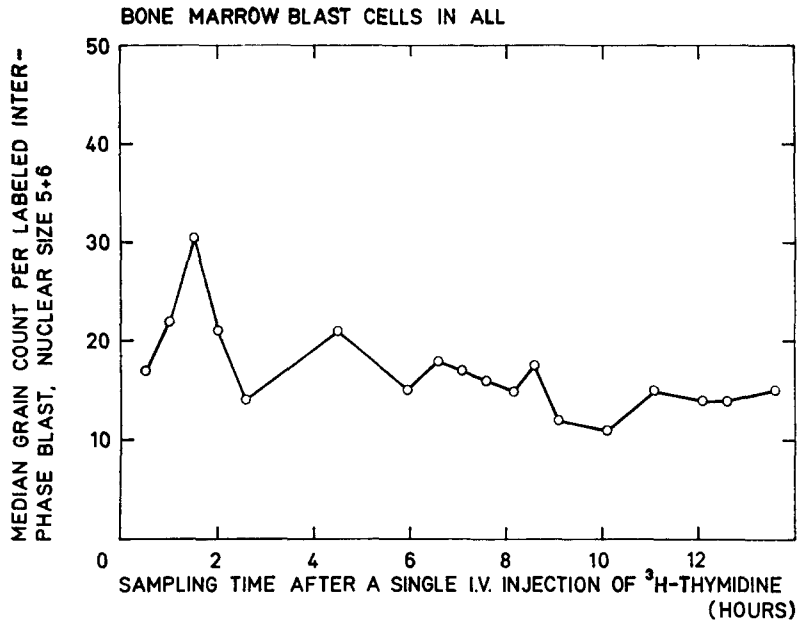


Fig. 3. *Variation of the median grain count per labelled interphase blast, nuclear size* 5 *and* 6, *as a function of time after a single injection of* ^{3}HT.

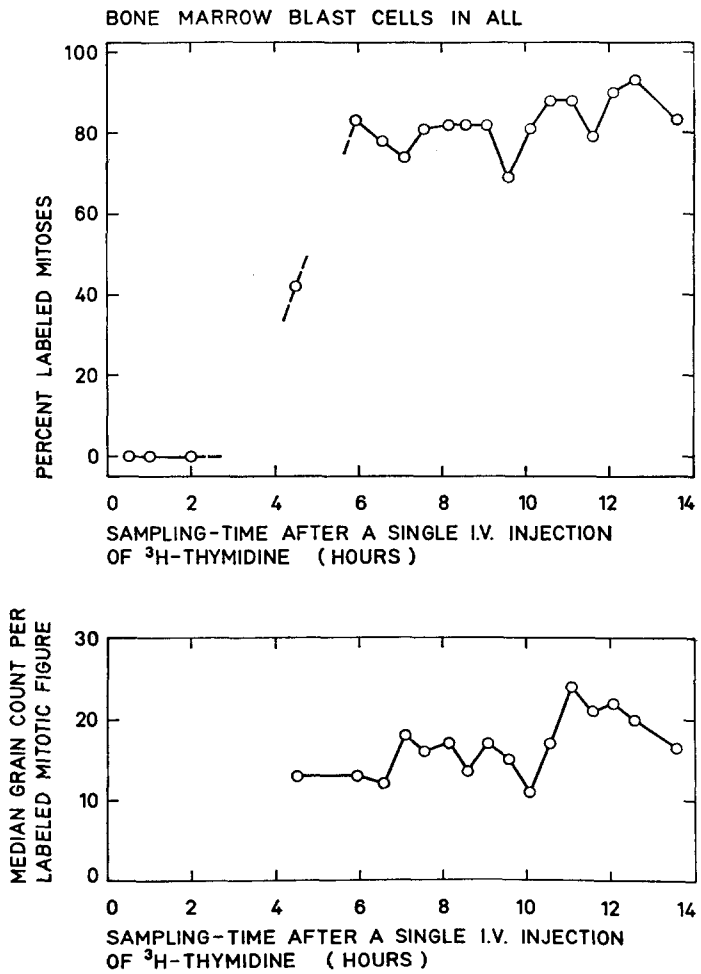


Fig. 4. Upper half: *Variation of the mitotic labelling index of bone marrow blasts, as a function of time after a single injection of* ^{3}HT.
Lower half: *Variation of the median grain count per labelled mitotic blast cell figure, as a function of time after a single injection of* ^{3}HT.

after a single injection of ^{3}HT. The MGC/LMF curve shows a slight tendency to rise, then oscillates around 18 grains.

DISCUSSION

The results presented have been obtained from a child with untreated "leukaemic" ALL. Even if one admits that it is often difficult to differentiate morphologically various forms of acute leukemia one has to consider that (1) acute leukemias of adults differ in many respects from those seen in children and (2) that among the latter at least the so called acute "lymphoid" and the acute "myeloblastic" leukaemia represent rather distinct clinical entities. Our results may therefore be characteristic only for the blast cell line(s) found in "ALL".

Assumptions for discussion and possible pitfalls involved in the assessment by autoradiographic techniques using ^{3}HT as a cell marker of the proliferative pattern of a cell line have recently been reviewed [10, 11]. It has also been shown that the combined analysis of the variation of the MLI and of the MGC/LMF, as a function of time after a single injection of ^{3}HT, necessitates the least number of assumptions in the evaluation of the proliferative characteristics of a cell line without morphologically detectable cytoplasmic differentiation as is the case for blast cell line(s) of ALL [11].

As reported by Mauer and Fisher [2, 4, 5, 7] the leukaemic cell population in ALL seems to comprise a proliferating and a non-proliferating group of cells: only the larger blast cells were found to divide and to incorporate ^{3}HT. If we consider the fact that approximately 50 per cent of the largest elements were labelled initially and if we recall that the overall labelling index 30 min after ^{3}HT injection was found to be 8 per cent, it may be approximated that no more than 16 per cent of the total blast cell population in the bone marrow of this child were actively proliferating.

The absence of a significant variation in the labelling index of large blast cells in interphase as a function of time after ^{3}HT injection [Fig. 2] suggests that a significant influx of cells from a compartment with a percentage of proliferating cells higher or lower than 50% did not occur during the period of observation. However, the possibility of such an influx being compensated by inefficient autoradiography cannot be excluded since many labelled cells had grain counts near zero. The labelling index may also have been influenced by reutilization of label from disintegrating labelled cells.

The variation of the labelling index of blast cells with nuclear sizes 1 and 2 after a single injection of ^{3}HT seems to indicate a minimal turnover rate for these cells of approximately 0·7 per cent per hour. It is perfectly possible that a considerable fraction of these small elements have a much slower turnover. In this context it is of interest to note that small blasts with a barely detectable rim of cytoplasm were not found to become labelled with time after ^{3}HT administration even when the overall labelling index of the small blast cells had risen to 7 per cent.

The variation of the median grain count per labelled interphase blast of nuclear sizes 5 and 6 after a single injection of ^{3}HT (Fig. 3) illustrates that it is practically impossible to evaluate the decrease of the MGC/LIC and to assess the generation time by determining a mean grain count halving time [11].

The overall mitotic index of $0{\cdot}75°/_{oo}$ is low. One possible explanation may be dilution of bone marrow samples with peripheral blood. This would reduce the mitotic index since mitotic figures were not found in the peripheral blood of this patient.

The MLI data (*upper half of Fig. 4*) suggest a minimal duration of G_2 of more than 2 but less than $4\frac{1}{2}$ hr. In addition, the minimal duration of S plus G_2 seems to be longer than $13\frac{1}{2}$ hr for majority of blasts. The fact that the median grain count of mitotic figures (*lower half of Fig. 4*) does not fall nor show clear-cut separate peaks during this period is in line with this tentative conclusion. In one patient with ALL, Mauer and Fisher [7] found a similar MLI curve which never reached 100 per cent values. One possible explanation may be inefficient autoradiography since many labelled cells had grain numbers near zero. Furthermore we cannot, on the basis of the present data, exclude the possibility that some fractions of cells might proliferate at different speed or remain for prolonged periods of time in G_2.

Finally the results of this preliminary study demonstrate that removal of bone marrow samples at short time intervals over 36 to 48 hr after a single injection of ^{3}HT might be necessary in order to evaluate more precisely the duration of the various phases of the generation cycle of the dividing blasts in ALL.

Acknowledgements—We thank Miss G. Markwalder, Miss M. Schütz and Miss S. Büchler for their valuable technical assistance.

RESUME

La variation de l'index de marquage des blastes médullaires en interphase (ILI), celle du nombre moyen de grains par blaste marqué (MGC/LIC), la variation du nombre relatif de mitoses marqués (MLI) et celle du nombre moyen de grains par mitose marquée (MGC/LMF), toutes en fonction du temps après une injection de thymidine tritiée (^3HT), sont analysées in vivo *pendant* $13\frac{1}{2}$ *heures chez une jeune fille de* 10 *ans atteinte d'une leucémie lymphoïde aiguë. Seuls les grandes blastes sont marqués initialement. Un maximum de* 16% *des blastes médullaires prolifèrent. Aucune variation significative de l'index de marquage des grands blastes n'est observée en fonction du temps après injection de ^3HT. L'index de marquage des petits blastes augmente de* 0·7% *par heure à partir de* 4 *heures et demie après l'injection de ^3HT. La variation du MLI et celle du MGC/LMF indiquent, pour G^2, une durée minimale comprise entre* 2 *heures et* 4 *heures et demie, et pour $G^2 + S$, une durée minimale dépassant* 13 *et demie.*

SUMMARY

The variation of the labelling index of bone marrow blasts in interphase (ILI), of their median grain count (MGC/LIC), of their mitotic labelling index (MLI) and of the median grain count per labelled mitotic figure (MGC/LMF), all as a function of time after a single intravenous injection of tritiated thymidine (^3HT), were analyzed in vivo *during a* $13\frac{1}{2}$ *hr period in a 10-year-old girl with untreated acute lymphoid leukaemia. Only the larger blasts were found to be labelled initially. No more than* 16 *per cent of the total blast cell population were actively proliferating. No significant change in the labelling index of the largest blast cells as a function of time after injection of ^3HT was observed during the period of observation. The labelling index of the smallest blast cells started to rise* $4\frac{1}{2}$ *hr after injection of ^3HT and increased at a rate of approximately* 0·7 *per cent per hour. The MLI and the MGC/LMF data indicate a minimal duration of G_2 of more than* 2 *but less than* $4\frac{1}{2}$ *hr and minimal duration of G_2 plus S of more than* $13\frac{1}{2}$ *hr.*

ZUSAMMENFASSUNG

Die Variation des Markierungsindexes von Interphasenblasten im Knochenmark (ILI), diejeninge der mittleren Körnerzahl pro markierton Interphasenblast (MGC/LIC) sowie diejenige des Mitosenmarkierungsindexes (MLI) und der mittleren Körnerzahl pro markierte Mitose (MGC/LMF), alle als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von tritiertem Thymidin (^3HT), wurden in vivo *bei einem zehnjährigen Mädchen mit einer akuten lymphatischen Leukämie über eine Dauer von* $13\frac{1}{2}$ *Stunden nach Verabreichung des radioaktiven Vorläufers verfolgt. Nur grosse Blasten waren initial markiert. Nicht mehr als* 16 *Prozent aller Blasten im Knochenmark waren in nachweisbarer Proliferation begriffen. Der Markierungsindex grosser Blasten variierte während* $13\frac{1}{2}$ *Stunden nach Injektion von ^3HT nicht signifikant. Der Markierungsindex der kleinsten Blasten begann* $4\frac{1}{2}$ *Stunden nach ^3HT-Injektion um cirka* 0·7 *Prozent pro Stunde zu steigen. Die Variation des MLI und der MGC/LMF liessen auf eine minimale G_2-Dauer von mehr als* 2 *aber weniger als* $4\frac{1}{2}$ *Stunden und auf eine minimale Dauer von G_2 plus S von mehr als* $13\frac{1}{2}$ *Stunden schliessen.*

REFERENCES

1. S. A. Killmann, E. P. Cronkite, J. S. Robertson, T. M. Fliedner and V. P. Bond, Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labelling in human beings *in vivo* with tritiated thymidine. *Lab. Invest.* **12,** 671 (1963).
2. A. M. Mauer and V. Fisher, *In vivo* study of cell kinetics in acute leukemia. *Nature (Lond.)* **197,** 574 (1963).
3. F. Gavosto, A. Pileri, C. Bachi and L. Pegoraro, Proliferation and maturation defect in acute leukemia cells. *Nature (Lond.)* **203,** 92 (1964).
4. A. M. Mauer, Characteristics of cell proliferation in a patient with acute leukemia. *Lancet* **ii,** 675 (1964).
5. A. M. Mauer and V. Fisher, Maturation defect of leukemic blast cells in acute leukemia. *J. clin. Invest.* **44,** 1074 (1965).
6. B. Clarkson, T. Ohkita, K. Ota and A. O'Connor, Studies of cellular proliferation in acute leukemia. *J. clin. Invest.* **44,** 1035 (1965).

7. A. M. Mauer and V. Fisher, Characteristics of cell proliferation in four patients with untreated acute leukemia. *Blood* **28,** 428 (1966).
8. B. Clarkson, T. Ohkita, K. Ota and J. Fried, Studies of cellular proliferation in human leukemia I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine. *J. clin. Invest.* **46,** 506 (1967).
9. P. Stryckmans, E. P. Cronkite, J. Fache, T. M. Fliedner and J. Ramos, Deoxyribonucleic acid synthesis time of erythropoietic and granulopoietic cells in human beings. *Nature (Lond.)* **211,** 717 (1966).
10. L. E. Feinendegen, *The Use of Tritium in Biology.* Academic Press, New York, *in press.*
11. A. Janett, H. P. Wagner, C. R. Jansen, H. Cottier and E. P. Cronkite, Studies on lymphopoiesis—IV. A comparison of two approaches for the determination of the generation time in thoracic duct cells without detectable cytoplasmic differentiation. *Europ. J. Cancer* **2,** 231 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 349–354. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Causal Relationship Between Completion of DNA Synthesis and Onset of the G_2 Period in the Division Cycle

R. SCHINDLER,* N. ODARTCHENKO, L. RAMSEIER* and A. GRIEDER

Swiss Institute for Experimental Cancer Research
Lausanne, Switzerland

IN THE division cycle of normal and neoplastic cells, DNA synthesis takes place during interphase within a distinct time interval separated from mitosis by two periods (termed G_1 and G_2, respectively) during which no synthesis of DNA is observed. Several methods have been applied to studies of the division cycle: Autoradiography following incorporation of labeled DNA precursors has been used extensively for determining the duration of different phases of the cell cycle under conditions *in vivo* as well as *in vitro* [1 – 4]. In addition, in cell cultures the cells in one phase of the cycle may be separated from the remainder of the cell population by physical means [5], and the synchronous cultures which are thus obtained lend themselves for descriptive studies of cellular characteristics in various phases of the cycle. Furthermore, cell cultures may be partially synchronized by reversible inhibition of a process which is specific for one phase of the cycle; this approach permits analysis of relationships between different phases of the cell cycle.

A possibility for partial synchronization of cell cultures is based on the effects of inhibitors of the biosynthesis of the thymine component of DNA, such as folic acid antagonists or 5-fluorouracil-deoxyribonucleoside (FUDR). In mammalian cell cultures the inhibition of cell reproduction by the folic acid antagonist, amethopterin, is prevented by the addition of glycine, a purine (e.g. hypoxanthine), and thymidine to the medium [6]. The addition of amethopterin in combination with glycine and a purine results, therefore, in a specific thymine deficiency and an interruption of DNA synthesis. Similarly, FUDR acts as a specific inhibitor of the biosynthesis of thymidine 5′-phosphate, and the toxicity of this analogue in mammalian cell cultures is prevented by thymidine [7]. If thymidine is added to the cultures several hours later than the inhibitors, a partial synchronization of cell reproduction is observed [8–11].

In the present communication, comparative studies on the usefulness of these inhibitors in synchronization of neoplastic cell cultures are

*Present address: Department of Pathology, University of Berne, Switzerland.

described. Furthermore, an analysis of the relationship between the period of DNA synthesis and the G_2 period is presented, which is based on partial synchronization by reversible inhibition of DNA synthesis and autoradiography following incubation with thymidine-H^3.

MATERIALS AND METHODS

Culture techniques

Cultures *in vitro* of a transplantable murine mast cell tumor (cell line P-815-X2) were used. This cell line was derived from the original P-815 tumor [12] by a selection process *in vitro* and two consecutive cloning procedures [13, 14]. The culture techniques [13] and the medium [15] have been previously described. Cell reproduction in the cultures was determined by hemocytometer counts. In the medium used, cell doubling times of 9 to 15 hr were observed. As described before [13], the P-815-X2 cells, except for a minor proportion of their population, do not attach to the surface of culture vessels.

Determination of mitotic indices

Cells were fixed by mixing an aliquot of the suspension culture with an equal volume of ethanol acetic acid–water (5 : 2 : 3, v/v). Subsequently, the cells were centrifuged and resuspended in a small volume of 0·025% crystal violet in 1% acetic acid. In this suspension the percentage of cells in prophase, metaphase and early anaphase (subsequently termed "mitotic index") was determined by hemocytometer counts. Cells were thus counted as mitoses from the appearance of distinctly visible chromosomes through the entire metaphase and into anaphase, while cells after the onset of furrowing were excluded from the counts.

Autoradiography

After incubation with thymidine-H^3, the cells were fixed as described above. Subsequently, smears were prepared, prestained by the Feulgen reaction and then processed for autoradiography, using NTB-2 Kodak emulsion. After 2-weeks exposure, the preparations were developed, fixed and counterstained with Carazzi's glycerin–hemalum through the film. In each sample, the percentage of labeled mitoses was determined by counting 100 mitoses.

RESULTS

1. *Autoradiographic analysis of the division cycle*

A culture was incubated during 20 min with thymidine-H^3 (0·4 μc/ml). Subsequently, the cells were centrifuged and reincubated in medium containing non-labeled thymidine (0·03 μmole/ml). The time course of mitotic labeling of this culture is presented in Fig. 1. The generation time of approximately 11 hr corresponds well with the observed cell doubling time under comparable conditions. The duration of DNA synthesis is approximately 7 hr, while for G_2 the method used does not permit an accurate determination because of the centrifugation of the cells after labeling and the concomitant interruption of culture conditions (e.g. temperature).

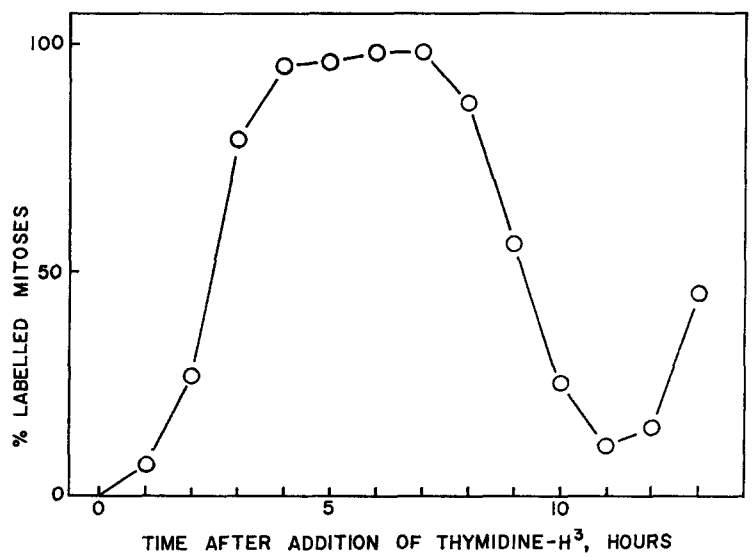


Fig. 1. *Time course of mitotic labeling in a neoplastic cell culture after incubation with thymidine-H^3 during* 20 *min.*

For a more precise determination of G_2, a culture was incubated with thymidine-H^3 (0·5 μc/ml) without subsequent centrifugation, and the percentage of labeled mitoses was determined at regular time intervals. As seen in Fig. 2, labeled mitoses began to appear 1 hr following the addition of thymidine-H^3 and reached 100% 2 to 3 hr later. The minimal duration of G_2, therefore, is 1 hr.

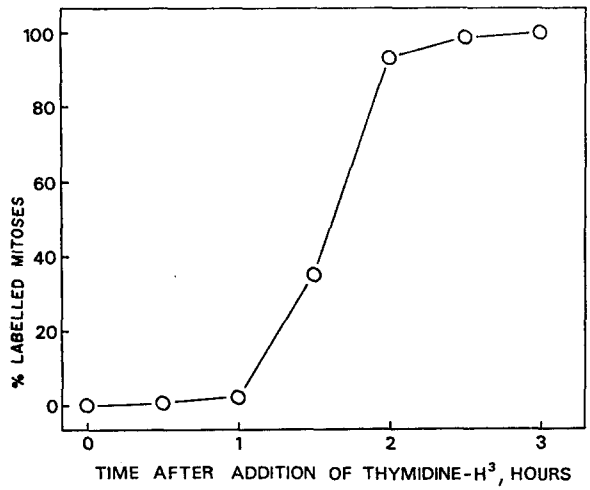


Fig. 2. Time course of mitotic labeling in a neoplastic cell culture during continuous incubation with thymidine-H^3.

2. *Analysis of G_2 by reversible inhibition of DNA synthesis*

(*a*) *Specificity of inhibition by amethopterin and FUDR* — Cultures containing approximately 10^5 cells per ml were incubated during 30 hr with various concentrations of FUDR or amethopterin, respectively, in the presence and absence of thymidine (0·03 μmole/ml). In the experiments with amethopterin, the medium was supplemented with hypoxanthine (0·03 μmole/ml) and glycine (0·1 μmole/ml). As seen in Fig. 3, FUDR, in the absence of thymidine, strongly inhibited cell reproduction at concentrations as low as 10^{-6} μmole/ml, while in the presence of thymidine, the cultures were protected from the inhibitory effects of FUDR up to concentrations of 10^{-2} μmole/ml. This indicates that under the conditions used (simultaneous addition of FUDR and thymidine), FUDR specifically inhibited DNA synthesis in concentrations from 10^{-6} to 10^{-2} μmole/ml. With amethopterin, on the other hand, different results were obtained, as presented in Fig. 4. Addition of this analogue, at a concentration of 10^{-4} μmole/ml, resulted in a

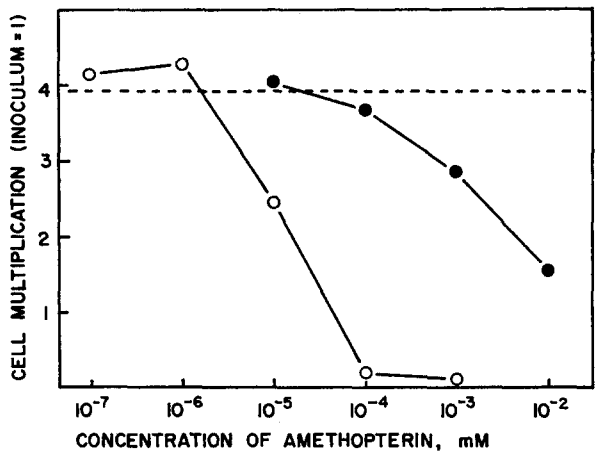


Fig. 4. Toxicity of amethopterin in the presence (●) and absence (○) of thymidine. Medium containing hypoxanthine (0·03 μmole/ml) and glycine (0·1 μmole/ml). Broken line: control cultures (no amethopterin).

marked inhibition of cell multiplication, which was prevented by thymidine. With lower concentrations of amethopterin, however, no complete inhibition was obtained, while higher concentrations were inhibitory even in the

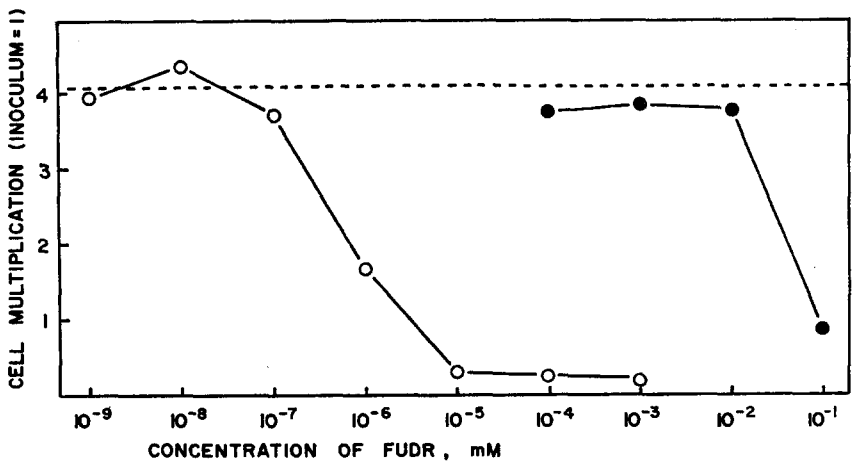


Fig. 3. Toxicity of FUDR in the presence (●) and absence (○) of thymidine. Broken line: control cultures (no FUDR).

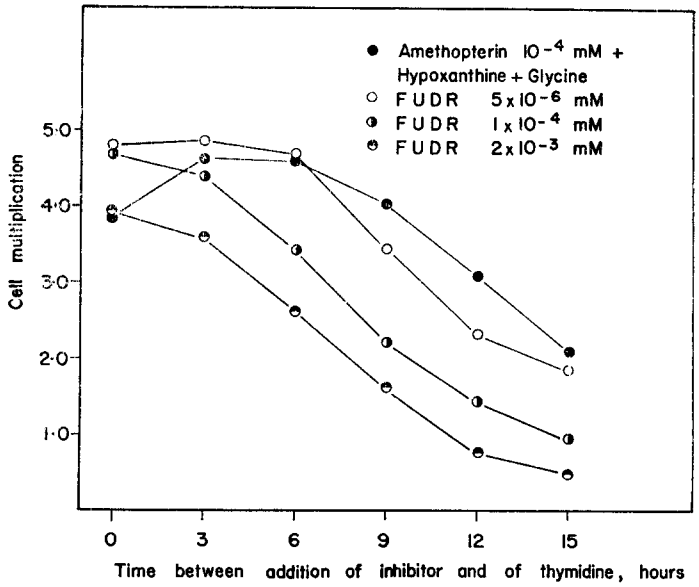


Fig. 5. Cell multiplication as a function of the time interval between addition of amethopterin or FUDR and addition of thymidine. Cell multiplication was measured from the time of addition of the respective inhibitor until 24 hr after the addition of thymidine. Each point represents the average of results obtained in three independent experiments.

presence of thymidine. This indicates that there exists only a narrow range of concentrations around 10^{-4} μmole/ml in which amethopterin causes a specific inhibition of DNA synthesis.

In a second series of experiments, cell viability following inhibition of DNA synthesis during different time intervals and subsequent addition of thymidine was determined. FUDR was used at final concentrations of 5×10^{-6}, 1×10^{-4}, and 2×10^{-3} μmole/ml, while amethopterin was added to parallel cultures at 10^{-4} μmole/ml and in combination with hypoxanthine and glycine. To one group of cultures, thymidine, at a final concentration of 0·03 μmole/ml, was added at the same time as the respective inhibitors, to the other groups of cultures 3, 6, 9, 12 or 15 hr later. For each culture, overall cell multiplication from the time of addition of the inhibitor until 24 hr after the addition of thymidine was determined. The results, as summarized in Fig. 5, indicate that the degree of irreversible cell damage is dependent not only on the duration of the inhibition, but also on the type and the concentration of the inhibitor used. For purposes of synchronization, a low concentration of FUDR appears preferable to a high concentration of this antimetabolite, while amethopterin, at a concentration of 10^{-4} μmole/ml, caused even less damage to the reproductive capacity of the cells than FUDR at all concentrations tested. Amethopterin, therefore, was used exclusively in subsequent studies on synchronization of cell cultures.

(*b*) *Mitotic activity of partially synchronized cultures.* DNA synthesis was inhibited in a culture by amethopterin (10^{-4} μmole/ml) in combination with hypoxanthine and glycine. 6 hr later, thymidine (0·03 μmole/ml) was added, and thereafter the mitotic index was measured every 30 min. As illustrated in Fig. 6, the number of mitoses remained at a low level during approximately 1 hr, then began to rise and at 3 hr exceeded the pre-inhibition level of 1·5 to 2%. Since DNA synthesis under these conditions is resumed immediately following the addition of thymidine [15], the time lag before the rise of mitotic activity represents the duration of G_2.

DISCUSSION

The data presented in Figs. 3 and 4 indicate that both FUDR and amethopterin, under appropriate conditions, may be used to obtain a specific inhibition of DNA synthesis. High concentrations of FUDR cause irreversible cell damage more rapidly than low concentration of this antimetabolite, as reported previously for strain L cells [16], while the reversibility of the inhibition is maintained during an even longer time interval if amethopterin is used (Fig. 5). For the purpose of synchronizing cell division, therefore, amethopterin appears to be preferable.

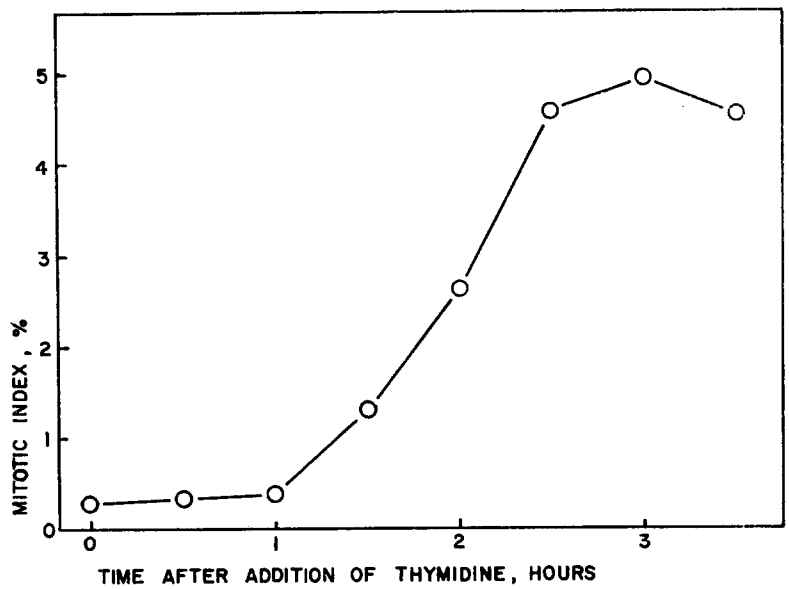


Fig. 6. Time course of mitotic activity in a partially synchronized cell culture.

As seen in Figs. 2 and 6, the lag period between addition of thymidine and the rise of mitotic activity following inhibition of DNA synthesis agrees well with the lag between addition of labeled thymidine and the appearance of labeled mitoses. This constancy of G_2 indicates that inhibition of DNA synthesis during 6 hr does not significantly change the duration of the subsequent G_2 period. These findings support the conclusion that the processes which are specific for G_2 and the rate of which determines its duration cannot begin before DNA synthesis has been completed.

Acknowledgements—This work was supported by the Swiss National Foundation for Scientific Research. The competent technical assistance of Miss M. Pavillard is gratefully acknowledged.

RESUME

Des cultures cellulaires d'un mastocytome de souris ont été synchronisées par inhibition réversible de la synthèse d'ADN par l'améthoptérine (combinée avec l'hypoxanthine et la glycine), ou la FUDR, suivie d'une addition de thymidine. La capacité proliférative des cellules était mieux maintenue pendant l'inhibition par l'améthoptérine que pendant celle par la FUDR. Dans des cultures partiellement synchronisées, la durée de la phase G_2 a été déterminée en mesurant la période de latence entre l'addition de thymidine et la reprise de l'activité mitotique. G_2 a aussi été mesurée en évaluant l'intervalle de temps entre l'addition de thymidine-H^3 et l'apparition de mitoses marquées. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de la synthèse de l'ADN ne modifie pas de façon significative la durée de la phase G_2 qui la suit. On en conclut donc que les processus spécifiques de la phase G_2 ne peuvent pas commencer avant que a synthèse de l'ADN ne soit terminée.

SUMMARY

Cultures of a murine mast cell tumor were partially synchronized by reversible inhibition of DNA synthesis with amethopterin (in combination with hypoxanthine and glycine) or FUDR and subsequent addition of thymidine. Cellular reproductive capacity was better maintained during inhibition by amethopterin than that by FUDR. In partially synchronized cultures, the duration of G_2 was measured using the time lag between addition of thymidine and resumption of mitotic activity. The duration of G_2 was also determined using the lag between addition of thymidine-H^3 and the appearance of labeled mitoses. The results indicate that inhibition of DNA synthesis does not significantly change the duration of the subsequent G_2 period, and support the conclusion that the processes which are specific for G_2 cannot begin before DNA synthesis has been completed.

ZUSAMMENFASSUNG

Zellkulturen eines Mäusemastozytoms wurden synchronisiert durch reversible Inhibition der DNS-Synthese mit Amethopterin (in Kombination mit Hypoxanthin und Glycin) oder mit FUDR und anschließender Zufuhr von Thymidin. Die Zellreproduktionsfähigkeit während der Inhibition wurde besser durch Amethopterin als durch FUDR erhalten. In partiell synchronisierten Kulturen wurde die Dauer der G^2-Periode gemessen, indem die Latenzperiode zwischen der Zugabe von Thymidin und der Wiederaufnahme der mithotischen Aktivität bestimmt wurde. Die Dauer von G^2 wurde ebenfalls gemessen mit Hilfe des Zeitintervalls zwischen ^{3}H-Thymidin und dem Erscheinen markierter Mitosen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Inhibition der DNS-Synthese die Dauer der anschließenden G^2-Phase nicht signifikant verändert. Es wird daraus geschlossen, daß die spezifischen Prozesse der ^{2}G-Phase nicht beginnen können, bevor die DNS-Synthese abgeschlossen ist.

REFERENCES

1. A. Howard and S. R. Pelc, Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity Suppl.* **6,** 261 (1953).
2. L. G. Lajtha, R. Oliver and F. Ellis, Incorporation of ^{32}P and adenine ^{14}C into DNA by human bone marrow cells *in vitro*. *Brit. J. Cancer* **8,** 367 (1954).
3. R. B. Painter and R. M. Drew, Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell cultures (HeLa). *Lab. Invest.* **8,** 278 (1959).
4. C. P. Stanners and J. E. Till, DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **37,** 406 (1960).
5. T. Terasima and L. J. Tolmach, Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **30,** 344 (1963).
6. M. T. Hakala and E. Taylor, The ability of purine and thymine derivatives and of glycine to support the growth of mammalian cells in culture. *J. biol. Chem.* **234,** 126 (1959).
7. M. A. Rich, J. L. Bolaffi, J. E. Knoll, L. Cheong and M. L. Eidinoff, Growth inhibition of a human cell strain by 5-fluorouracil, 5-fluorouridine, and 5-fluoro-2′-deoxyuridine — reversal studies. *Cancer Res.* **18,** 730 (1958).
8. M. L. Eidinoff and M. A. Rich, Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluoro-2′-deoxyuridine: time parameters for subsequent reversal by thymidine. *Cancer Res.* **19,** 521 (1959).
9. R. Schindler, Der zeitliche Ablauf der Desoxyribonukleinsäure-Synthese im Teilungszyklus von Krebszellen in Kultur. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **18,** C93 (1960).
10. R. R. Rueckert and G. C. Mueller, Studies on unbalanced growth in tissue culture. I. Induction and consequences of thymidine deficiency. *Cancer Res.* **20,** 1584 (1960).
11. A. P. Mathias and G. A. Fischer, The metabolism of thymidine by murine leukemic lymphoblasts (L5178Y). *Biochem. Pharmacol.* **11,** 57 (1962).
12. T. B. Dunn and M. Potter, A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. *J. nat. Cancer Inst.* **18,** 587 (1957).
13. R. Schindler, M. Day and G. A. Fischer, Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxy tryptamine and histamine *in vitro*. *Cancer Res.* **19,** 47 (1959).
14. J. P. Green and M. Day, Heparin, 5-hydroxyryptamine, and histamine in neoplastic mast cells. *Biochem. Pharmacol.* **3,** 190 (1960).
15. R. Schindler, Biochemical studies of the division cycle of mammalian cells: evidence for the premitotic period. *Biochem. Pharmacol.* **12,** 533 (1963).
16. J. E. Till, G. F. Whitmore and S. Gulyas, Deoxyribonucleic acid synthesis in individual L-strain mouse cells. II. Effects of thymidine starvation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **72,** 277 (1963).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 355–360. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Chromosome DNA Replication in Human Tumour Cells Labelled *in vivo* and *in vitro**

L. TIEPOLO†, C. ZARA‡ and M. FRACCARO†
†*EURATOM Unit for Human Radiation and Cytogenetics, University of Pavia*
‡*Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Pavia*

DIFFERENTIALS in the chronology of DNA replication within individual chromosomes and among chromosomes within the cell are generally considered the expression of different stages of genetic activity. Heteropycnosis, late replication and genetic inactivation have thus been integrated as the consequence, at different levels of observation, of the same phenomenon [1]. Following the suggestion that late replication might be characteristic of heterochromatin [2] it has been widely held that "heterochromatic" regions are late replicating, and vice-versa. In fact, it has been recently shown autoradiographically that the heterochromatic regions of the somatic chromosomes of *Drosophila melanogaster*, a species in which the localization of heterochromatin is based on genetical evidence, are indeed late replicating [3]. As pointed out by Taylor [1] the evidence emerging from various types of studies on different organisms indicate that the chromosome morphological changes correlated with developmental stages are indicators of gene function rather than expression of special classes of DNA. The application of these concepts and techniques to the study of tumour cells could be of direct relevance to the problem of the genetic control and differentiation of cancer cell populations. In this communication, we present data on the patterns and chronology of chromosome DNA replication in human tumour cells labelled with tritiated thymidine (^{3}H-TdR) *in vivo* and/or *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

(a) *Labelling of cells during short incubation*

Two samples of malignant effusions were obtained at 30-days interval from a 68-year-old woman with a carcinoma of the ovary, who had been treated for months with cyclophosphamide (Case A). The cytogenetic findings in independent samples obtained before and during treatment are given in Table 1. After removal from the body, aliquots of ascitic fluid were incubated at 37°C for 1 hr. After this incubation 1 μc/ml of ^{3}H-TdR (Amersham, specific activity 3C/mM) was added to the samples which after incubation at 37°C for 4 hr were processed by the standard air-drying technique to obtain chromosome preparations.

(b) *Labelling of cultured cells*

For the study of DNA replication patterns, cells obtained from the malignant effusion in a 56-year-old woman with cancer of the ovary (Case B) were cultured *in vitro* for 10 days. Direct examination prior to culture revealed a modal number of 40 chromosomes. Dispersed cells grown in Petri dishes for 10 days were processed to obtain cytological preparation

*This publication is contribution No. 308 of the EURATOM Biology Division.

Table 1. *Results of the cytogenetic analysis in three samples of malignant effusion from case A. Sample* 1 *before treatment, sample* 2 *and* 3 *during treatment with cyclophosphamide. These samples were processed simultaneously and independently from those incubated with* ^{3}*H-TdR*

Sample (dates)	No. of metaphases			Modal chromosome number of aneuploid cells	Range of chromosome number
	Aneuploid	Diploid	Total		
1 (10.9.64)	114	208	322	54	22–246
2 (13.1.65)	96	27	123	53	19–250
3 (10.2.65)	127	234	361	47	32–300

after 4 hr of continuous contact with 0·5 μc/ml of ^{3}H-TdR. Subsequently, another sample was obtained from the same patient and also cultured *in vitro*. In these cultures the cells after a pulse of 15 min with 0·5 μc/ml of ^{3}H-TdR were allowed to grow in new medium with an excess of unlabelled thymidine and preparations for the scoring of labelled metaphases made at the appropriate intervals.

(c) *Labelling* in vivo

This was performed by injecting ^{3}H-TdR (specific activity: 5C/mM) diluted in saline directly into the peritoneal cavity of three patients with malignant effusions from cancer of the ovary. The doses were 200 μc/20 ml in the first (Case B, see above) and 1 μc/20 ml in the other two patients (C, D). In independent samples Case C had a modal number of 36 and Case D of 40 chromosomes.

It should be noticed that in all these cases there was a high degree of karyotypic variation [4].

RESULTS

(a) The proportions of labelled metaphases after 4-hr incubation in the presence of ^{3}H-TdR is given for the two experiments in Table 2. About 30 per cent of the metaphases was labelled. This indicates that the method is efficient for a study of the replication patterns. Table 2 also shows the relative proportion of the labelled metaphases classified into normal diploid and tumoral aneuploid cells. The

Table 2. *Number and proportion of labelled metaphases after* 4*-hr incubation in the presence of* ^{3}*H-TdR (upper part) and (below) distribution of diploid and aneuploid among the labelled metaphases of the same samples. Rows* 2* *and* 3* *give the same distribution in the control samples shown in Table* 1

Sample	All metaphases		
	Labelled No. (%)	Unlabelled No. (%)	Total
2	131 (29)	317 (71)	448
3	90 (35)	172 (65)	262
Sample	**Labelled metaphases**		
	Diploid No. (%)	Aneuploid No. (%)	Total
2	21 (62)	13 (38)	34
2*	27 (22)	96 (78)	123
3	29 (81)	7 (19)	36
3*	234 (65)	127 (35)	361

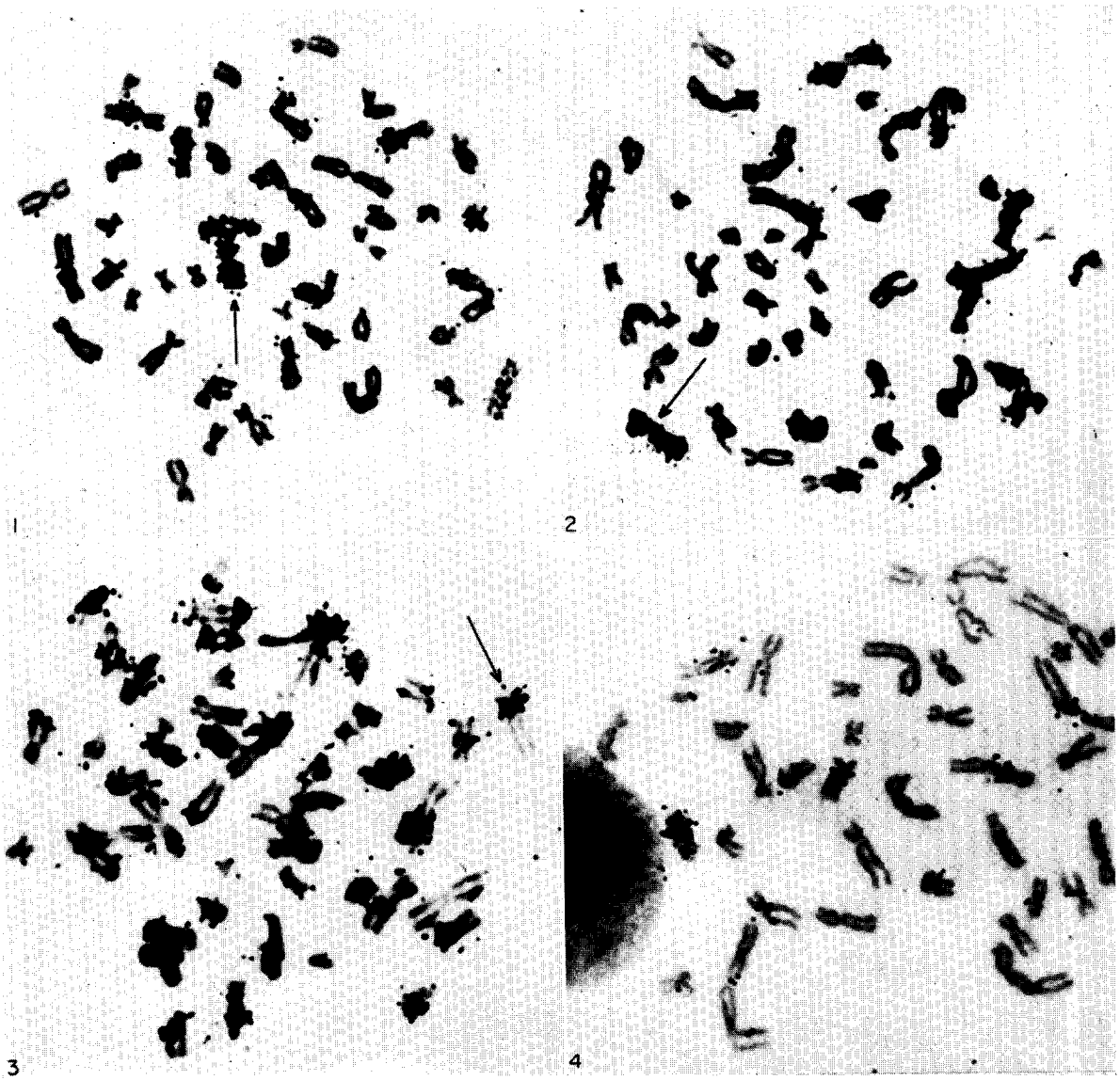


Fig. 1. *Autoradiography of a metaphase with* 46 *chromosomes from a malignant effusion incubated for* 4 *hr in presence of* ^{3}H-*TdR. Note a single, medium-sized late replicating chromosome* (*arrow*).

Fig. 2. *Metaphase with* 48 *chromosomes from the sample as in Fig.* 1. *Note the late replicating chromosome* (*arrow*).

Fig. 3. *Metaphase with* 55 *chromosomes from the sample as in Figs.* 1 *and* 2. *Blocks of late-replication in several chromosomes. The arrow points to a characteristic block at the distal end of a marker chromosome.*

Fig. 4. *Metaphase of an hypodiploid tumour cell with* 40 *chromosomes cultured* in vitro. *Note a single late replicating chromosome.*

(to face p. 356)

Fig. 7. *Aneuploid metaphase labelled* in vivo *and processed* 4 *hr after injection of* ^{3}H-*TdR. Note blocks of late-replication. Case C.*

Fig. 8. *Same as in Fig.* 7, 6 *hr after injection. Note late-replicating chromosome.*

proportion of labelled metaphases is higher among the normal cells.

Analysis of the labelling patterns revealed in a proportion of the diploid cells the presence of a single, medium-sized late replicating chromosome. (Fig. 1). This chromosome had therefore the characteristic behaviour of the late-replicating X-chromosome as found in the normal female cell. A single, medium-sized late replicating chromosome was occasionally observed also in aneuploid cells as the one reproduced in Fig. 2. This finding indicates the persistence of a late replicating X also in aneuploid cells. In the diploid cells the patterns at the single chromosome level were those normally found also in other experimental systems. The aneuploid cells displayed the presence of late replicating blocks distributed along various chromosomes. These blocks were often seen at the distal end of marker chromosomes (Fig. 3). No attempt has been made as yet to quantify and study in detail the distribution and behaviour of such late replicating sections. This analysis is in progress.

(b) The sample of tumour cells labelled continuously *in vitro* was composed entirely by hypodiploid cells with a modal number of 41 chromosomes. In a sample of 100 cells 36 were labelled. Several of the labelled cells displayed characteristic late-replicating blocks with apparent preferential location at the centromeric regions. A relevant finding was that of a single medium-sized chromosome obviously late-replicating (Fig. 4).

(c) For subject B in addition to the *in vivo* labelling a sample of cells was cultured *in vitro* and pulse-labelled. Thus, a comparison was made possible between two samples of the same cell population labelled *in vivo* and *in vitro*. Both samples had the modal number of 40 chromosomes and no diploid normal cell was found. Figure 5 shows the proportion of labelled metaphases at different intervals after contact with ^{3}H-TdR in the two systems. *In vitro*, at 4 hr 8 per cent of metaphases were labelled and the proportion increased to reach a maximum of 45·5 per cent at 18 hr. *In vivo* it was possible to obtain only six samples spread along a 12-hr interval. At 3 hr no labelled metaphases were found. The proportion increased progressively to 36 per cent at 12 hr. Both curves were found to be flattened in comparison with the curves usually obtained in cell populations which are in logarithmic growth and randomized in the phases of the cell cycle. The curve for such a population, an established cell line pulse-labelled in culture, is also drawn in Fig. 5. The curves of the two other *in vivo* experiments are reproduced in Fig. 6. In both instances the two first samples of fluid were small and few metaphases were found. Thus, in both cases the scoring of labelled metaphases began at 4 hr.

In case C the pick of the curve was found at 12 hr with 75 per cent of labelled metaphases and in case D at 14 hr with 76 per cent. In both cases, the majority of metaphases were diffusely labelled without obvious patterns. In case C, however, at 4 hr the occasional cell

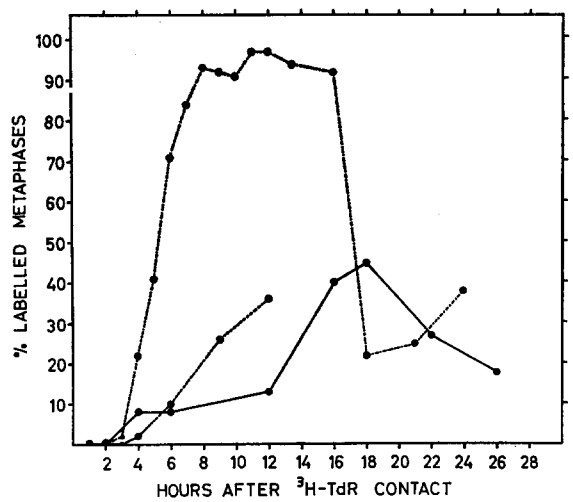


Fig. 5. Proportion of labelled metaphases at different intervals in cells labelled in vivo *(broken line) and pulse-labelled after culture* in vitro *(continuous line) from the same case of malignant effusion. The third curve was obtained from a pulse-labelling* in vitro *experiment in an established cell line of human origin (EUE).*

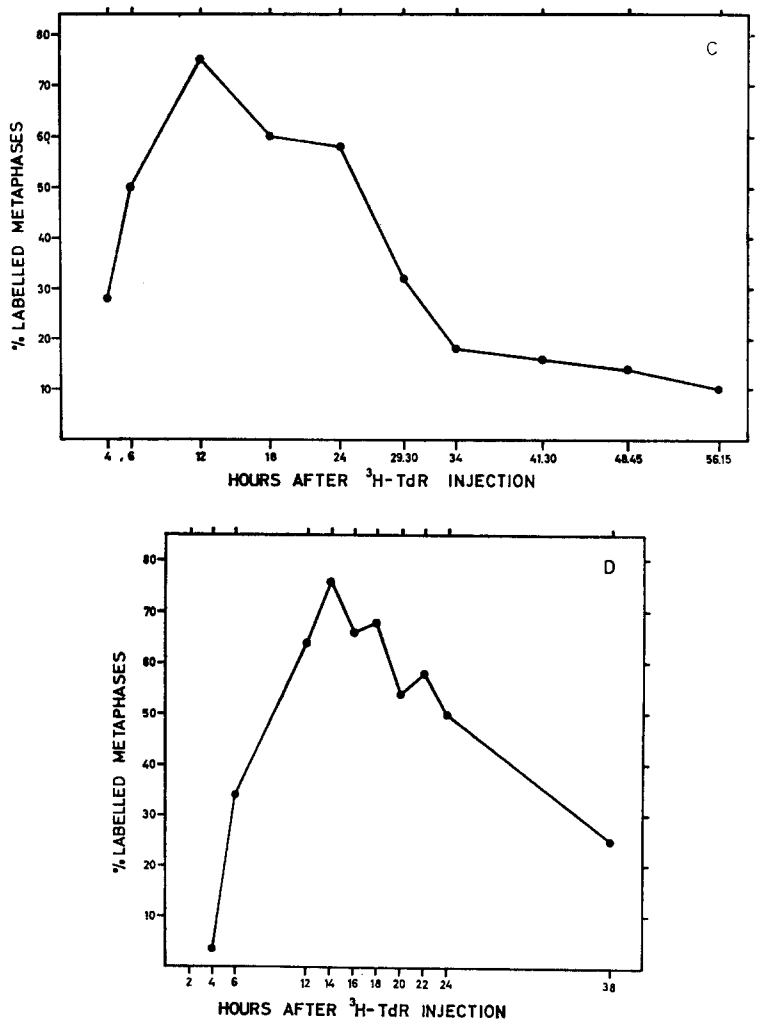


Fig. 6. Proportion of labelled metaphases at different intervals after injection of ³H-TdR in cases C and D.

displayed prominent blocks of late replication (Fig. 7) often located at the centromeric region and at 6 hr a single late-replicating chromosome was found in a proportion of cells (Fig. 8).

DISCUSSION

The results of the autoradiographic studies presented in this communication are, at the present stage of the investigation, essentially of methodological relevance. Thus, we have demonstrated that it is possible to investigate efficiently DNA replication at the chromosome level in cancer cells not only by culture techniques as already shown by Yamada and Sandberg [5], but also by direct incubation of cancer cells in the effusion liquid (see also [6, 7]) and, in selected instances, by ³H-TdR-labelling *in vivo*. Each of these methods offer in turn information on different aspects. Thus, the short term incubation for 4 hr is the simplest approach to study patterns of late replication. We were able to demonstrate the presence of the late-replicating X chromosome in both normal diploid and tumoural aneuploid cells within the same sample. Incidentally, the presence of diploid cells in the cancer effusions make this system of further utility by affording a mean of direct internal comparison. It should be noted that we have found, in one case, a single late-replicating medium-sized chromosome also in cultured highly aneuploid cells and similarly in some instances also in cells labelled *in vivo*. As to the blocks of late-replication that we observed in a variety of tumour cells their immediate significance is difficult to assess, without a painstaking qualitative and quantitative comparative study. It should be pointed out that the high degree of karyotypic variation also within individual tumours makes difficult an immediate and

critical use of these patterns. On the other hand, the very presence of patterns which are not found in normal cells indicate an additional criterion for the study of chromosome rearrangements in tumours. In this system, we have found differentials in the relative frequency of labelled metaphases between normal and cancer cells, the tendency being of a higher proportion for the normal ones. These differences could be due to differentials in the length of phases of the cell cycle. For instance, the tumour cells could be heterogeneous for the length of the G_2 period and since the contact with ^{3}H-TdR was 4 hr, all cells with G_2 longer than this time lapse would not be scored as labelled metaphases. An alternative hypothesis could be that of an impaired reproductive capacity of the tumour cells. In this case a proportion of the cells exposed to ^{3}H-TdR during their *S* period could fail to reach metaphase. Of course, both these and other selective processes may interplay to shape the composition of the cohort of labelled cells. The single experiment in which we were able to compare the same cell population labelled *in vivo* and after culture *in vitro* indicate that this is also a feasable approach. Similar, repeated experiments should be instrumental in assessing how much the dynamics of cultured cells is comparable to that of the same cell population in its natural environment.

The shapes of the curves of the proportion of labelled metaphases after injection *in vivo* of ^{3}H-TdR differ from those usually found in a cell population growing in a logarithmic fashion, as already indicated in Fig. 5. This could be mainly due to the fact, already shown on the basis of extensive data by Clarkson *et al.* [8], that the populations under study were probably composed by cells with chronological differences in their cycles. Selective forces resulting in differential cell death are likely to contribute significantly to the heterogeneity of the population. The fact that the proportion of labelled metaphases in our experiments never reached the 100 per cent mark indicated that probably a number of cell, labelled in *S*, do not reach metaphase. In any case from the *in vivo* and from the short incubation experiments we may conclude that the cycle of tumour cells is longer than the average one for normal diploid human cells, as estimated in different experimental systems.

RESUME

Des études autoradiographiques, par le marquage à la thymidine tritiée de la réplication de l'ADN dans des cellules d'épanchements néoplasiques d'origine ovarienne, furent entreprises dans les conditions expérimentales suivantes: (a) après incubation pendant 4 heures; (b) en culture de cellules à long terme; (c) in vivo. *Après incubation, la proportion relative de métaphases marquées était différente dans les cellules tumorales et dans les cellules diploïdes normales du même énchantillon. Un chromosome de taille moyenne, se répliquant tardivement, fut occasionellement observé dans les cellules diploïdes et dans les cellules aneuploïdes, dans tous les systèmes expérimentaux. Dans les cellules tumorales, des processus inhabituels de réplication tardive furent observés. Les expériences de marquage* in vivo *ont montré que le cycle des cellules tumorales était plus long que l'estimation habituelle du cycle des cellules diploïdes normales.*

SUMMARY

Autoradiographic studies of the DNA replication patterns were performed by labelling with ^{3}H-TdR cells of malignant effusions from cases with cancer of the ovary in different experimental systems: (a) after incubation for 4 hr; (b) long term cell culture; (c) directly in vivo. *After incubation, a difference was found in the relative proportions of labelled metaphases between tumoural and normal diploid cells within the same sample. A single medium-sized late replicating chromosome was occasionally observed in diploid and aneuploid cells in all systems. In tumour cells unusual segmental patterns of late replications were observed. The* in vivo *labelling experiments indicated that the cycle of tumour cells is longer than that usually estimated in normal diploid cells.*

ZUSAMMENFASSUNG

Autoradiographische Untersuchungen über die Replikationsmuster von DNS wurden mit ^{3}H-Thymidin markierten Zellen von Ergüssen bei Ovarial-Ca. unter den folgenden Bedingungen vorgenommen:

(*a*) *nach 4 h Inkubation*
(*b*) *in langfristiger Zellhaltung*
(*c*) in vivo.

Nach Inkubation fand sich ein Unterschied in der Relation markierter Metaphasen zwischen Tumorzellen und normalen diploiden Zellen derselben Probe. Ein einzelnes mittelgroßes spät replizierendes Chromosom wurde gelegentlich in diploiden und aneuploiden Zellen bei allen Bedingungen gefunden. Bei Tumorzellen wurden abnorme segmentale Muster später Replikation gefunden. Die in vivo-*Markierungsversuche zeigten, daß der Zyklus von Tumorzellen länger ist als er üblicherweise bei normalen diploiden Zellen gefunden wird.*

REFERENCES

1. J. H. Taylor (1964). Regulation of DNA replication and variegation-type position effects. *Symp. inter. Soc. Cell Biol.* **3,** 175.
2. A. Lima-de-Faria (1959). Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. *J. biophy. biochem. Cytol.* **6,** 457.
3. C. Barigozzi, S. Dolfini, M. Fraccaro, G. Rezzonico Raimondi and L. Tiepolo (1966). *In vitro* study of the DNA replication patterns of somatic chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell Res.* **43,** 231.
4. C. Zara, M. Fraccaro, M. Gerli, A. Mannini and L. Tiepolo (1966). L'effetto del trattamento con ciclofosfamide sulla dinamica cromosomica di popolazioni di cellule tumorali *in vivo*. *Arch. Ostet. Ginec.* **71,** suppl., in press.
5. K. Yamada and A. A. Sandberg (1966). Chronology and pattern of human chromosome replication. III. Autoradiographic studies on cells from cancer effusions. *J. nat. Cancer Inst.* **36,** 1057.
6. S. Curcio (1966). Analisi cromosomica di un caso di ca. ovarico. Aspetti della replicazione del DNA. *Arch. Ostet. Ginec.* **71,** 436.
7. L. Tiepolo, M. Fraccaro, A. Mannini and C. Zara (1966). Modalità di replicazione del DNA cromosomico in cellule tumorali. *Arch. Ostet. Ginec.* **71,** suppl., in press.
8. B. Clarkson, K. Ota, T. Ohkita and A. A. O'Connor (1965). Kinetics of proliferation of cancer cells in neoplastic effusions in man. *Cancer* **18,** 1189.

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 361–369. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Cellular Proliferation Patterns in an Experimental Rhabdomyosarcoma in the Rat

A. F. HERMENS and G. W. BARENDSEN
Radiobiological Institute TNO, 151 *Lange Kleiweg*
Rijswijk ZH, The Netherlands

INTRODUCTION

THE GROWTH of tumours depends basically on the rate of production of new cells and the mean life time of non-proliferating cells. Both of these parameters are dependent on various factors and they may change during tumour growth. The rate of production of cells is determined by the fraction of proliferating cells present in the tumour at a given moment and *the distribution* of their cell cycle times.

It has been demonstrated by Mendelsohn [1] for experimental mammary tumours transplantable in mice, that not all the cells present in a tumour are involved in the production of new tumour cells. Therefore the fraction of cells proliferating at a given moment has been defined as the *growth fraction* [1]. It has also been shown that this fraction varies with tumour size and tumour growth rate [1, 2]. The concept of a growth fraction which can be characterized by a single estimate of the fraction of cells proliferating at a given moment, is based, among others, on the assumption that there is in the tumour a random distribution of cells preparing for division, and that there are no regional variations in the growth rate due to variation of cell cycle time or the fraction of cells proliferating. However, regional variations in the fractions of proliferating cells may be expected, especially in the larger tumours where vascular and nutrient supply may show regional variation. Furthermore if variation in growth rate due to variation in cell cycle time distribution in different tumour regions should occur, then there can be no simple relation between growth rate and growth fraction of the tumour.

Our studies concerning tumour growth were designed to analyse the pattern of cell proliferation in an experimental rhabdomyosarcoma transplantable in an inbred strain of rats.

MATERIALS AND METHODS

The tumours were obtained by a selection procedure, employed in order to obtain a good reproducibility of the tumour growth characteristics. A tumour cell suspension was prepared from a rhabdomyosarcoma BA 1112, which originally developed in an irradiated rat of an inbred strain denoted WAG/Rij [3]. These cells were grown in a suitable medium containing Eagle's salt solution and 6% calf serum. From this primary tissue culture a subline denoted R_1 was derived by selection of one single clone. This subline has been maintained in tissue culture since 1963. From these R_1 cells cultured *in vitro*, solid tumours were grown in rats of the strain mentioned, by inoculating a known number of cells subcutaneously in the flanks of female rats 7–8-weeks-old. Each rat received four separate inoculations. The tumours were measured in three dimensions with vernier callipers twice a week. All measurements were carried out in duplicate and from the mean values for the three dimensions obtained, the tumour volumes

were calculated*. The growth curve of these tumours is shown in Fig. 1. The *mean* volume of the tumours used in the experiments described in this paper is 0·3 cm³.

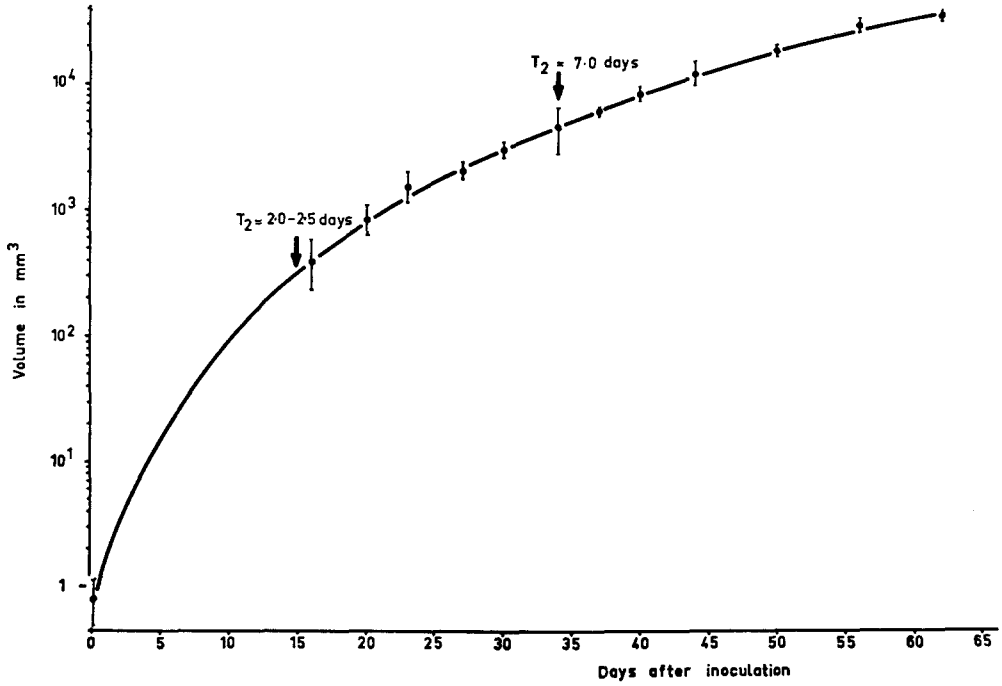


Fig. 1. Growth curve of an experimental rhabdomyosarcoma, grown in the flanks of rats. Each point on the curve represents the mean value obtained from measurements of 8 to 12 tumours. The bars indicate the standard deviations. The arrows indicate tumour volumes at which the doubling times were 2–2·5 days and 7 days respectively.

For the study of the fraction of cells actively engaged in proliferation, labelling of cells with ³H-thymidine† was employed. In a first series of experiments pulse labelling was used by injecting intra-peritoneally 1 μc ³H-thymidine per gramme body weight. The tumours were excised from the anaesthetized rats at different time intervals after the pulse labelling.

In a second series of experiments repeated labelling with ³H-thymidine of the same specific activity was used in order to simulate continuous labelling. After an initial dose of 1 μc/gram body weight each animal received at 4-hr intervals an additional injection of 0·2 μc/gram body weight intraperitoneally. The tumours were excised from the anaesthetized animals at 4-hr intervals after the first labelling and thus had repeated doses of ³H-thymidine, except for the first tumours which were excised 3 hr post labelling. Because this experiment was extended over a period of 24 hr, the tumours received 1, 2, 3, 4 or 5 additional doses of ³H-thymidine.

After excision the tumours were immediately fixed in Bouin's Solution, processed by histological techniques and paraffin blocked by standard laboratory procedures. From these tumours serial cross sections, 2 μ thick, were cut at a distance of half the diameter from one end of the tumour.

Autoradiographs were made, using Ilford G-5 Nuclear Research Emulsion (Ilford Nuclear Research Ltd., Essex) according to the procedure of the dipping film technique described by Messier and Leblond [4]. The protective-celloidin coat was omitted however.

The autoradiographs were exposed for 26–32 days in order to obtain not more than a maximum number of 30 grains over the nucleus of the heaviest labelled cells. The autoradiographs were processed by a standard technique and stained with hematoxylin and eosin. Depending on the background, which was usually less than 2 grains per cell nucleus, a cell was scored as labelled if at least 5 grains were localized over the nucleus.

The autoradiographs of the tumours of the experiment involving single pulse labelling were used to count the numbers of labelled and unlabelled mitosis in straight zones, 100–300 μ wide, through the centre of the tumour cross-section. To avoid errors in the correct deter-

*Depending on the shape of a tumour, the volume was computed for a sphere or a spheroid using the appropriate formulas.

†³H-thymidine with a specific activity of 1·9 c/m mole was obtained from Schwarz Bioresearch Inc., Orangeburg, N.Y.

mination of the mitotic phases, the metaphases and anaphases were scored and used to compute the percentage of labelled mitosis. From each tumour two slides were used, in each of which a total of 100 mitoses were counted. For the estimation of fractions of labelled mitoses mean values of results obtained from two tumours were used.

In both the first and second series of experiments the number of labelled and unlabelled interphase cells were scored in areas of $100 \times 100\mu^2$ each, at intervals of 100μ, localized in straight zones across the centre of the tumour cross-section (text Fig. 2). In each tumour cross-section two of such straight zones perpendicular to each other were counted. The data obtained in this way were plotted on a linear scale as a function of the location in the tumour cross-section. An example of the data obtained from one cross-section of a tumour excised 3 hr after pulse labelling is given in text Fig. 4.

During the experiments all animals were kept under the same conditions, with free supply of water and food pellets. The room was kept at a constant temperature of 20°C. To avoid a possible influence of a circadian behaviour in cell cycle times, the light intensity was kept at a constant level throughout the experiments.

RESULTS

1. *The tumour properties*

The tumours arising from these R_1-cells grow as solid cell masses. Within this mass the cells are arranged in intertwining strands which close to the periphery of the tumour tend to be orientated parallel to each other. The cells are spindle shaped with an elongated nucleus in which 1 or 2 nucleoli can be distinguished. The plasma is usually scanty, especially in those cells localized in the tumour centre.

The stroma is not abundant and consists of tiny bundles of collagenous and reticular fibres, which form a small-meshed network that is in close contact with the cells embedded in between. Apart from differences in cell sizes the cells show only minor morphological variations. In the small tumours used in our experiments there are scattered pycnotic cells, which are more abundant in the centre, although in tumours smaller than 1·5 g, massive central necrosis is only seen sporadically. Macroscopically, these tumours grow as more or less elongated lumps or as solid spheres. Tumours irregular in shape were excluded from the experiments.

The growth curve obtained by plotting the volume on a logarithmic scale against the time on a linear scale is non-linear and non-exponential but, growth-rate decreases as the

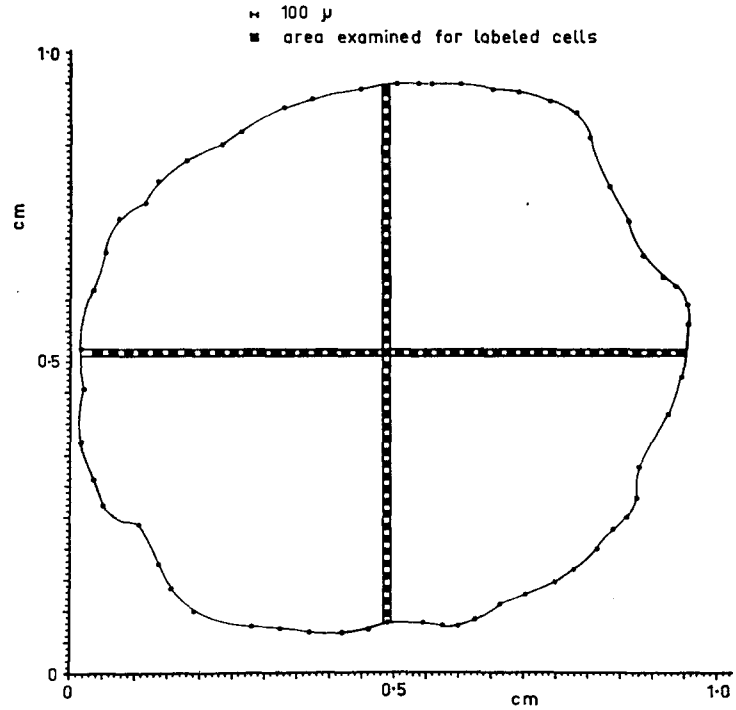


Fig. 2. Cross-section of a small tumour. Labeled and unlabeled cells were counted in areas measuring $100 \times 100\mu^2$ *(black areas) in two zones across the tumour centre, perpendicular to each other.*

volume increases. The volume doubling times of the tumours, estimated from the tangents at points where the tumours have volumes of 0·3 cm^3 and 3·0 cm^3, are about 2·0–2·5 days and 7 days respectively.

2. *^{3}H-thymidine labelling experiments*

The cell cycle time was estimated from the variation of the fraction of labelled mitoses as a function of the time interval after the pulse labelling, as has been described by Quastler and Sherman [5] and Wimber [6]. Figure 3 represents the fractions of labelled mitoses as a function of time during a period of 28 hr after pulse labelling which could be measured accurately except for the first 1·5 hr.

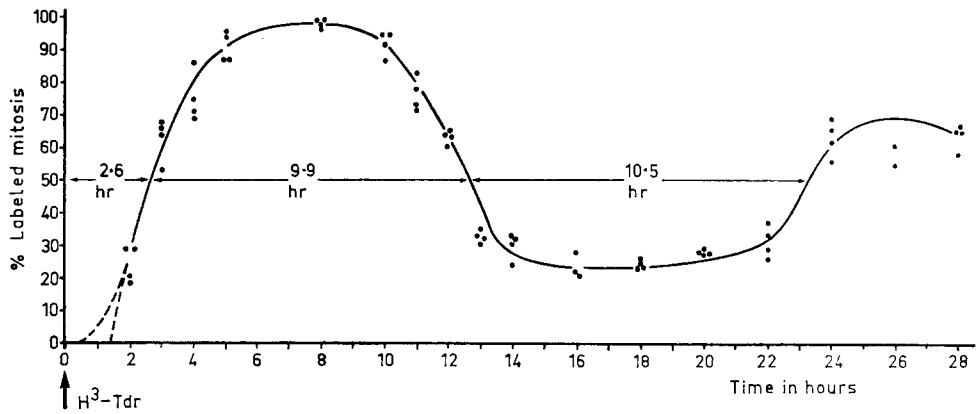


Fig. 3. Variations of the fractions of labeled mitoses as a function of time after pulse-labeling with ^{3}H-thymidine in small tumours. Each dot represents the fraction of labeled mitoses computed from 100 metaphases+anaphases in one tumour cross-section.

The maximum percentage of labelled mitosis is 98%, and the second maximum is 65%. From this figure mean values for the cell cycle time and its components were derived, namely: The mean cell cycle time T_c is 20·4 hr, the postsynthetic time plus the time from onset of mitosis to the point between the end of metaphase and beginning of anaphase i.e. (G_2+M) is 2·6 hr and the mean interphase time G_1 is 7·9 hr. The mean period of DNA synthesis is 9·9 hr.

From the fractions of labelled cells counted in alternating areas of 10^4 μ^2 the *mean* fraction of labelled cells present in the tumour cross-section were calculated. For a tumour excised 3 hr after pulse labelling the values estimated from data of two cross-sections as shown in Fig. 2, are 19·8% and 19·2%.

The patterns of the fractions of labelled cells, plotted as a function of the location in a tumour cross-section, obtained from data of tumours excised at equal time intervals after pulse labelling, have the same shape as the one shown in Fig. 4. From this figure it can be seen that there are alternating peaks and troughs. The larger fractions of labelled cells occur more frequently near the periphery whereas the smaller fractions generally are found in the centre of the tumour.

Text Fig. 5 compares three examples of patterns of labelled cells, plotted in the same way as described for Fig. 4, which are obtained from data of tumour cross-sections from tumours excised at *different* time intervals after the first labelling. It can be concluded that the three respective patterns of labelled cells have a similar shape. However, the patterns of labelled cells of tumours excised 12 and 20 hr after the first labelling obtain higher levels than the pattern of tumours excised 3 hr after the first labelling. This figure also shows that there is a clear increase of the fractions of labelled cells for each area of the tumour cross-section in the period between 3 and 12 hr after repeated labelling, whereas in the period between 12 and 20 hr this increase is less pronounced.

Part of the data obtained after repeated injections of ^{3}H-thymidine are summarized in Table 1. From this table it can be seen that for the corresponding cross-sections of a tumour the *mean* fractions of labelled cells counted in two perpendicular zones show but small variations. In order to evaluate the increase of the fraction of labelled cells with time during the semi-continuous labelling quantitatively for different areas of the tumour, the data obtained for the centre and the periphery of the tumours were grouped together. The cross-sections were divided in six equal parts, in such a way (see text Fig. 6) that two outer sections (I and VI), two inner sections (II and V) and two centre sections (III and IV) are grouped together.

Table 1. *Mean fractions of labelled cells at different time intervals after repeated labelling*

Time of excision (hr)	Tumour volume (mm^3)	Number of cells counted		Mean % labelled cells	
		Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
3	172	3897	3837	19·8	19·2
8	389	5997	5774	31·8	29·4
12	315	4932	4034	39·2	42·8
20	275	6044	5369	41·0	42·1

Mean fractions of labeled cells after repeated injection of ^{3}H-thymidine counted in two zones A and B of a tumour cross-section in one tumour. The time indicated in the table is the time passed after the first injection ($t=0$) at the moment the tumour was excised.

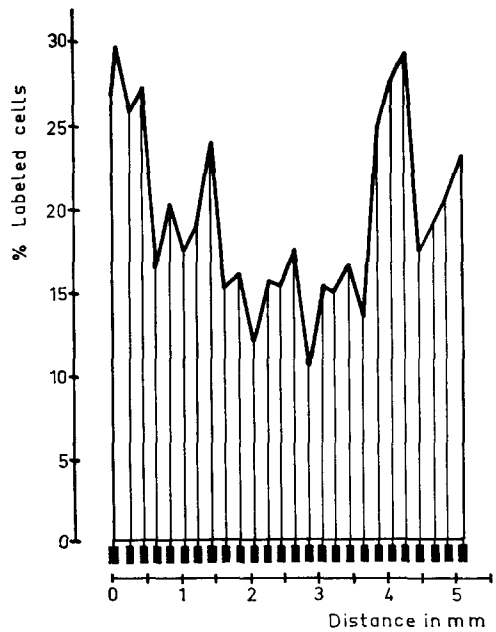


Fig. 4. *Pattern of labelled cells* 3 *hr after pulse-labelling. Fractions of labelled cells* 3 *hr after pulse-labelling are plotted as a function of the location in a tumour cross-section. Each vertical line indicates the fraction of labelled cells present in an area of* $100 \times 100\mu^2$ *(black areas). The distance on the abscissa corresponds to the distance of the counted area from one edge of the cross-section. The origin of the abscissa has been taken arbitrarily from one end of the cross-section.*

The values corresponding to the outer, inner and centre sections respectively, were averaged and standard deviations computed.

By plotting the data obtained by this procedure on a linear scale as a function of the time, three curves were obtained as shown in Fig. 6. It can be concluded that in all the three sections there is a steep increase of the fraction of labelled cells during the first 12 hr of semi-continuous injection of ^{3}H-thymidine. After that time a distinct plateau is reached extending up to 20 hr. The mean values of the percentages of labelled cells in the outer sections are higher at all the time intervals of the experiment than the corresponding values in the centre sections of the tumours and these variations are significantly different from each other.

DISCUSSION

The experimental data presented in the previous section show that the growth of this rhabdomyosarcoma is a complicated phenomenon, involving quantitative differences in the proliferation of cells in different regions of the tumour. Many experimental transplantable tumours grow very rapidly with doubling times of a few days [7, 8]. The R_1 rhabdomyosarcoma does not grow exponentially. Shortly after inoculation of the tumour cells in the host the growth rate is high with a doubling time of the order of one day, but the growth rate decreases with increasing volume and at a volume of about 10 cm^3 it corresponds to a doubling time of about 10 days. This decrease in growth rate is presumably not due to antigenic properties of the tumour cells with

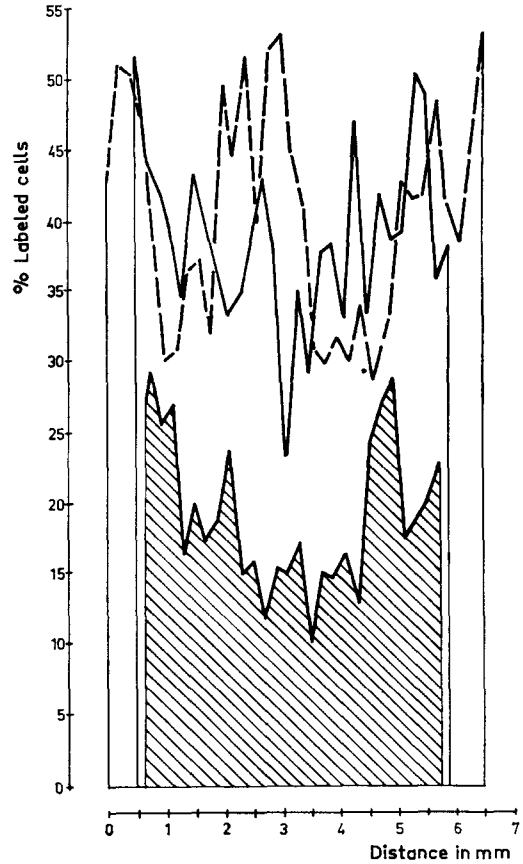


Fig. 5. Patterns of labelled cells after repeated labelling. Fractions of labelled cells obtained from areas of $100 \times 100\ \mu^2$ *of tumours excised at different time intervals after repeated labelling are plotted as a function of the location in the tumour cross-section. Each curve represents the pattern of labelled cells obtained from one tumour cross-section for each time interval of* 3 *hr (cross-hatched area),* 12 *hr (——) and* 20 *hr (– – –) respectively after repeated labelling with* ^{3}H*-thymidine.*

respect to the host tissues since it has been shown by various methods that this tumour has no detectable antigenic properties incompatible with the host [9].

The tumours investigated in the experiments reported here had a volume of about 0·3 cm^3 and grew at a rate corresponding to a doubling time T_2 of about 2·5 days. The analysis of the cell cycle presented in Fig. 3 shows however that the mean cell cycle time of the proliferating cells in these tumours is about 20·4 hr. This implies that not all cells in the tumour are involved in the process of cell proliferation. Mendelsohn has introduced the concept of a "growth fraction" to describe the growth of spontaneous C3H mammary tumours where the mean cell cycle time was about 35 hr and the T_2 values of the tumours varied with the volume and showed a wide distribution with a mean of about 7 days [1, 2]. He also demonstrated that this fraction of cells actually involved in the cell cycle can be estimated using the pulse labelling technique. The data obtained with this technique for the R_1 rhabdomyosarcoma show however that a considerable variation is present in the fractions of labelled cells in different sites in the tumour. For example the fractions of labeled cells for a tumour of 170 mm^3 counted 3 hr after pulse labelling in areas of $10^4\ \mu^2$ in various regions of the tumour varied from 10·2 per cent to 29·8 per cent (the mean number of cells counted per area of $10^4\ \mu^2$ is about 150 cells). In a larger tumour the variations are still larger, e.g. in a tumour of 3450 mm^3 the values ranged from 0 to 34·2 per cent. It is clear that the following calculations concerning growth fractions based on *mean* labelling frequencies represent a simplification of the actual growth pattern. The significance of the labelling patterns will be discussed subsequently.

From the data presented in Fig. 3 it can be derived that the DNA synthesis period T_s is equal to a fraction of 9·9/20·4=0·485 of the cell cycle time T_c. To a first approximation the labelled fraction N_L in a population of these cells, assuming that it contains only cells involved in the cell cycle, should be equal to

$$N_L = \frac{T_S}{T_C} = 0 \cdot 485.$$

The observed mean fractions of labelled cells is 0·195. The growth fraction of cells in this tumour may be derived as the ratio of these values and is equal to 0·195/0·485=0·40.

The growth fraction can also be calculated by the method employed by Mendelsohn as the ratio of the fraction of labelled cells estimated a short time after pulse labelling and the fraction of labelled mitosis, measured at a sufficiently long interval after labelling to allow the wave of labelled mitoses to have de-synchronized. This latter fraction was estimated at 0·58 at 48 and 72 hr after pulse labelling. Consequently the growth fraction calculated by this method is 0·195/0·58=0·336. The two values are in good agreement, perhaps fortuitously, considering the fact that both values must be considered as approximations. It is clear however that a large proportion of cells present in the tumour is not involved in the cell cycle. Whether these cells have a finite life time and eventually will be lost from the tumour or whether they simply have a very long generation time and can divide after appropriate stimulation is unknown.

Figures 4 and 5 show significant variations in the fractions of labelled cells counted per area of 10^4 μ^2. This pattern of variations shows further that the lower values are concentrated in the centre of the tumours. This has been observed in all tumours with volumes in excess of 0·2 cm³. It is unlikely that these lower fractions of labelled cells in the centre are due to a decreased availability of ³H-thymidine for different tumour regions, since the maximum numbers of grains per nucleus did not differ significantly for different regions. It must be concluded that the differences in fractions of labelled cells in different areas of the tumour represent true variations in fractions of cells synthesizing DNA. As will be discussed in more detail in a separate publication, comparison of the cell cycles for the centre and the periphery of large tumours (3·0 cm³) shows that the duration of the *S*-phase does not differ

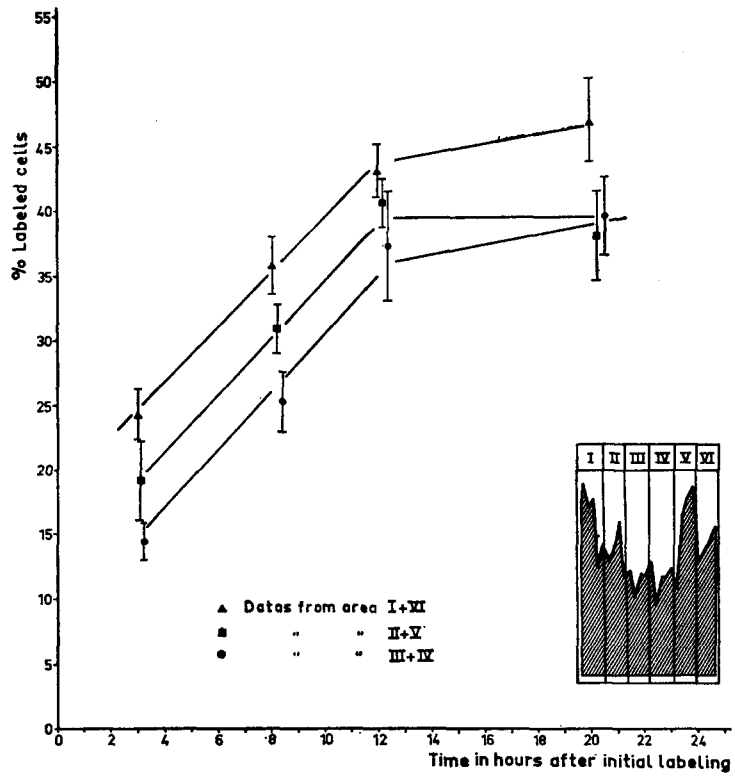


Fig. 6. *Variations of the fractions of labelled cells as a function of time after repeated injections with* ³H-*thymidine. In order to compare the data obtained for areas near the periphery of a tumour with those obtained for areas near the centre, each cross-section has been divided in six sections of equal size. The data represent the sections (I and VI), (II and V) and (III and IV) of two tumour cross-sections obtained from one tumour sample. This was done for all the tumours excised at different intervals after repeated labelling. The mean fractions of labelled cells and their confidence limits were computed for each pair of sections and plotted as a function of time after the initial injection of* ³H-*thymidine.*

for different regions of the tumour. It may further be noted that the duration of the *S*-phase shows only small variations for tumours of different sizes. It may be inferred that the variations in the fractions of labelled cells are due either to variations in the duration of the cell cycle and/or to the presence of different proportions of non-proliferating cells.

The experiments with repeated injections of ^{3}H-thymidine simulating continuous labelling yield some further information about the growth pattern in this tumour. In Fig. 6 it is shown that in areas in the centre as well as in areas near the periphery, the fractions of labelled cells increase to plateau levels which are reached about 10 to 14 hr after the first labelling. If the differences of a factor of 2 between the fractions of labelled cells in different areas counted after the first ^{3}H-thymidine injection were due to simple variations in the generation cycles of the proliferating cells rather than to variations in the proportions of non-proliferating cells, then the T_c values for different areas should differ by a factor of about 2 and consequently the curve in Fig. 6 representing the centre areas should reach the plateau region much later than the curve for the peripheral areas. Since this is not indicated in the curves of Fig. 6 it may be concluded that the variations of fractions of labelled cells between different areas in the tumours are mainly due to variations in the growth fractions. Experiments with larger tumours where these variations are more pronounced will be carried out to investigate the nature of these variations further.

RESUME

Pour déterminer les variations numériques des cellules participant au processus de prolifération et les variations du temps de doublement, nous avons utilisé une tumeur du type Rhabdomyosarcome, transplantable chez le rat.

Les cellules ont été marquées avec la thymidine ^3H, injectée soit une seule fois, soit à plusieurs reprises, après quoi des autoradiographies ont été préparées.

Le pourcentage de cellules marquées, après une injection de thymidine ^3H, est toujours plus élevé dans les régions de la périphérie.

Les résultats obtenus, après injections répétées de thymidine ^3H, nous montrent que les variations de l'index de marquage, que nous avons constatées à divers endroits dans les tumeurs, reposent sur de vraies variations dans les fractions des cellules proliférantes.

SUMMARY

The studies reported concern the growth pattern of a transplantable rhabdomyosarcoma in the rat. Fractions of labelled cells in various regions of the tumour were estimated after pulse labelling and after repeated labelling with ^3H-thymidine of tumours with volumes of about 0·3 cm^3. An analysis is presented of the cell cycle time of the proliferating cells and of the variations of the fractions of labelled cells.

The distribution of labelled cells through the cross-section of the tumour showed a high labelling index near the periphery and alternating indexes with lower peaks in the centre.

The results of the experiments using repeated labelling of the tumours showed that the variations of the fractions of labelled cells represent true variations in growth fractions.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen uber die Wachstum-Kinetik von Tumoren wurden unternommen mit der Absicht die Grösse der Variationen mit der Tumor-Zellen an der Proliferation betellight sind, und die Variationen welche es möglichweisse für die Generationsdauer dieser Zellengibt, zu analysieren. Für diese Untersuchungen wurden experimentelle Rhabdomyosarcome gebraucht welche transplantiert werden können auf Inzucht-Ratten.

Es wurden nach einmaliger Gabe von ^3H-Thymidin, mittels Autoradiografie wechselende Prozentsätzen markierter Zellen gefunden. Die Verteilung markierter Zellen im Tumor-Querschnitt ist derart das an den Rändern öfter höhere Prozentsätzen markierter Zellen und im Zentrum öfter niedrigere Werte gefunden werden.

Wiederholte Gaben von ^3H-Thymidinergaben Resultate die es klar maschen das Variationen in den Prozentsätzen markierter Zellen auf wirklichen Differenzen in der Anzahl der im Tumor anwesenden proliferierenden Zellen beruken.

REFERENCES

1. M. L. MENDELSOHN, Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse. III. The growth fraction. *J. nat. Cancer Inst.* **28,** 1015 (1962).
2. M. L. MENDELSOHN, The kinetics of tumor cell proliferation. In *Cellular Radiation Biology*, pp. 498–513. Williams & Wilkins Company, Baltimore (1965).
3. H. S. REINHOLD, A cell dispersion technique for use in quantitative transplantation studies with solid tumours. *Europ. J. Cancer* **1,** 67 (1965).
4. B. MESSIER and C. P. LEBLOND, Preparation of coated radioautographs by dipping sections in fluid emulsion. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **96,** 7 (1957).
5. H. QUASTLER and F. G. SHERMAN, Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell. Res.* **17,** 420 (1959).
6. D. E. WIMBER, Duration of the nuclear cycle in Tradescantia paludosa root tips as measured with H^3-thymidine. *Amer. J. Botany* **47,** 828 (1960).
7. H. D. SUIT and R. J. SHALEK, Response of anoxic C3H mouse mammary carcinoma isotransplants (1–25 mm^3) to X-irradiation. *J. nat. Cancer Inst.* **31,** 479 (1963).
8. R. H. TOMLINSON, An experimental method for comparing treatments of intact malignant tumours in animals and its application to the use of oxygen in radiotherapy. *Brit. J. Cancer* **14,** 555 (1960).
9. H. S. REINHOLD, Stralengevoeligheid van Tumoren. Thesis, Rotterdam Medical School (1967).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 371–379. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Analyse Biochimique des Facteurs Déterminant la Croissance de Tumeurs Cancéreuses Humaines en Culture d'Organes *in vitro*

YVON CROISILLE, JAMES MASON, EMILIENNE WOLFF et ETIENNE WOLFF

Collège de France, Paris

Nous nous proposons, dans le présent travail, d'analyser les facteurs qui permettent la croissance de tumeurs cancéreuses humaines cultivées *in vitro* suivant le mode organotypique. Et. et Em. Wolff cultivent, depuis plusieurs années, deux tumeurs humaines malignes qui avaient été prélevées directement sur les malades au cours d'opérations chirurgicales [1,2]. Ces nodules sont de petites tumeurs massives, vivant en dehors de l'organisme, et dépourvues de tout stroma. Elles ont conservé la même structure organisée et les mêmes propriétés physiologiques que dans l'organisme humain. Elles ont de plus acquis une morphologie extérieure caractéristique de chacune des deux tumeurs. Ce sont de véritables souches organoïdes capables de se multiplier indéfiniment. L'une, Z516, provient d'un épithélioma du côlon descendant, l'autre, Z200, d'une métastase hépatique d'un cancer d'origine gastrique [2,4].

Dans une première phase de nos expériences, les explants tumoraux ont été associés à des fragments de mésonéphros ou de foie d'embryon de poulet de 8½ jours, sur lesquels ils vivent en parasites. La mosaïque ainsi réalisée repose sur un milieu semi-solide, formé d'agar-agar, d'extrait d'embryon de poulet, et de sérum de poulain: explantés seuls sur ce milieu de culture, pourtant très favorable à la culture d'organes embryonnaires, les fragments de tumeur meurent au bout de 8–15 jours. Les deux tumeurs Z200 et Z516 ont été transplantées pendant 2 ans, dans ces conditions. Dans une deuxième phase, nous avons interposé une membrane dialysante (cellulose Visking, cellophane, membrane vitelline d'un oeuf de poule non incubé) [5] entre les fragments d'organes embryonnaires et les explants tumoraux. Les deux tumeurs humaines vivent, dans ces conditions, respectivement depuis 4 ans 9 mois et 3 ans 1 mois. Les nodules sont transférés tous les 7 jours sur des milieux frais. Nous disposons ainsi d'environ 5000 nodules tumoraux. Ils se nourrissent des substances qui dialysent à travers la membrane et qui proviennent, d'une part, de l'organe embryonnaire qui vit sur le milieu de culture; d'autre part, du milieu lui-même. Les unes peuvent être considérées comme des aliments essentiels, les autres comme des facteurs indispensables à la prolifération des nodules. Nous avons, dans une troisième étape, remplacé le mésonéphros par un extrait total de levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae*) dont les cellules sont très riches en principes nutritifs et en substances de croissance. Cet extrait, ajouté au milieu de base, s'est montré très favorable et permet une

croissance exubérante des deux souches organoïdes cancéreuses [6], Les deux tumeurs cancéreuses vivent sur cet extrait, l'une depuis 142 semaines, l'autre depuis 90 semaines (Fig. 1). Quelles sont les substances qui permettent une telle prolifération des tissus tumoraux et qui sont contenues aussi bien dans le mésonéphros de 8½ jours qui dans l'extrait de levure de bière? L'étude de ce problème est le sujet de ce travail. Peut-on isoler chimiquement ces substances favorisantes?

METHODES

Techniques de culture

La méthode de culture organotypique de nodules cancéreux d'Et. et Em. Wolff a été exposée dans le deuxième volume de ce Journal [5].

Les transferts des nodules cancéreux se font tous les 7 jours sur des milieux frais. A chaque transfert, les nodules les plus prospères sont coupés en 2 ou 3 fragments, de sorte qu'à chaque passage le nombre d'explants est doublé ou triplé. Nous maintenons un nombre constant de nodules qui servent à la perpétuation des deux souches organoïdes. Les explants en excès servent de tests pour l'étude des substances favorables à la prolifération cancéreuse. Afin de vérifier la valeur d'un extrait ou d'un fractionnement, nous préparons 6 à 8 séries expérimentales. Nous utilisons, pour chaque série, 6 cultures particulièrement saines et volumineuses, que nous allons numéroter de a–f. Chaque culture choisie, "a" par exemple, contient 4 explants très épais, souvent soudés entre eux. Chaque nodule sera coupé en 2 fragments. Les 8 fragments seront explantés sur 8 milieux de culture différents; chacune des 6 séries expérimentales, devant servir à étudier, par exemple, les 2 fractions A et B résultant d'une analyse, comprend 8 récipients de culture. Un récipient contient un milieu servant de témoin. Il est composé de 12 volumes d'agar–agar à 1% dans du liquide de Gey, de 4 volumes d'extrait d'embryon de poulet de 8½ jours et de 4 volumes de sérum de poulain. Ce milieu ne suffit pas à assurer la survie des nodules cancéreux pendant plus de 8–15 jours . Les explants meurent rapidement. Trois récipients contiennent le milieu de base et la fraction A à étudier. Trois autres récipients contiendront les produits de base et la fraction B. Un dernier récipient témoin contiendra le milieu de base et le mélange des fractions A et B à la concentration nécessaire pour reconstituer le produit actif initial, à partir duquel ont été extraites les fractions A et B. Chaque récipient reçoit un des 8 fragments de la culture que nous appellerons (a). Nous procédons de même avec les récipients b, c, d, e, f, de sorte que chaque milieu porte 6 explants de la même souche ayant évolué séparément; tous les explants de même origine sont représentés dans chaque milieu à étudier. Chaque expérience comprend 6–8 séries, représentant par conséquent 192–256 nodules cancéreux. Nous admettons qu'une fraction est favorable à la prolifération tumorale lorsque les séries expérimentales la contenant peuvent être repiquées pendant 25–30 semaines au moins. Cela indique une prolifération intense qui pourrait continuer indéfiniment si les difficultés d'entretenir simultanément les souches et différentes séries expérimentales ne demandaient pas un personnel et un travail considérables.

Préparation des extraits

La préparation de l'extrait de levure de bière a déjà été exposée dans ce Journal [5]. Préparation de l'extrait de foie: 50 g de foie de poulet de 3 mois sont additionnés à 45 ml de solution de Tyrode et 45 ml d'eau déminéralisée; ils sont ensuite broyés dans un homogénéiseur à couteaux (type H 451, Equipements industriels, Paris) tournant à 40 000 tours/min. pendant 2½ min. Le broyat est dialysé à froid contre un très grand volume d'eau déminéralisée. Le dialysat est ramené à 90 ml sous vide, dans un évaporateur rotatif.

Préparation des dialysats

Les extraits bruts sont dialysés à 4°C, pendant 18 heures, dans des tubes de cellulose Visking (Union Carbide Chicago) contre de l'eau déminéralisée. Afin de déterminer approximativement le diamètre des pores de ces tubes, nous avons utilisé des solutions de substances de poids moléculaire connu. Le cytochromec de P M 16 500 ne passe pas à travers les pores de ces tubes. Le lysozyme de P M 14 380 est à la limite de passage. La ribonucléase de PM 12 700 passe facilement. Ceci permet d'affirmer que le P M des substances contenues dans les dialysats de foie, de mésonéphros, et de levure de bière, est inférieur à 15.000. Toutes les molécules de P M supérieur à 15.000 sont par conséquent retenues à l'intérieur des tubes. Il en est ainsi, en particulier, des grosses molécules protéiques [9].

Fractionnement des dialysats

Pour fractionner les dialysats, nous avons eu recours à la filtration sur gel de Sephadex (G 25), d'une part, et à la chromatographie par

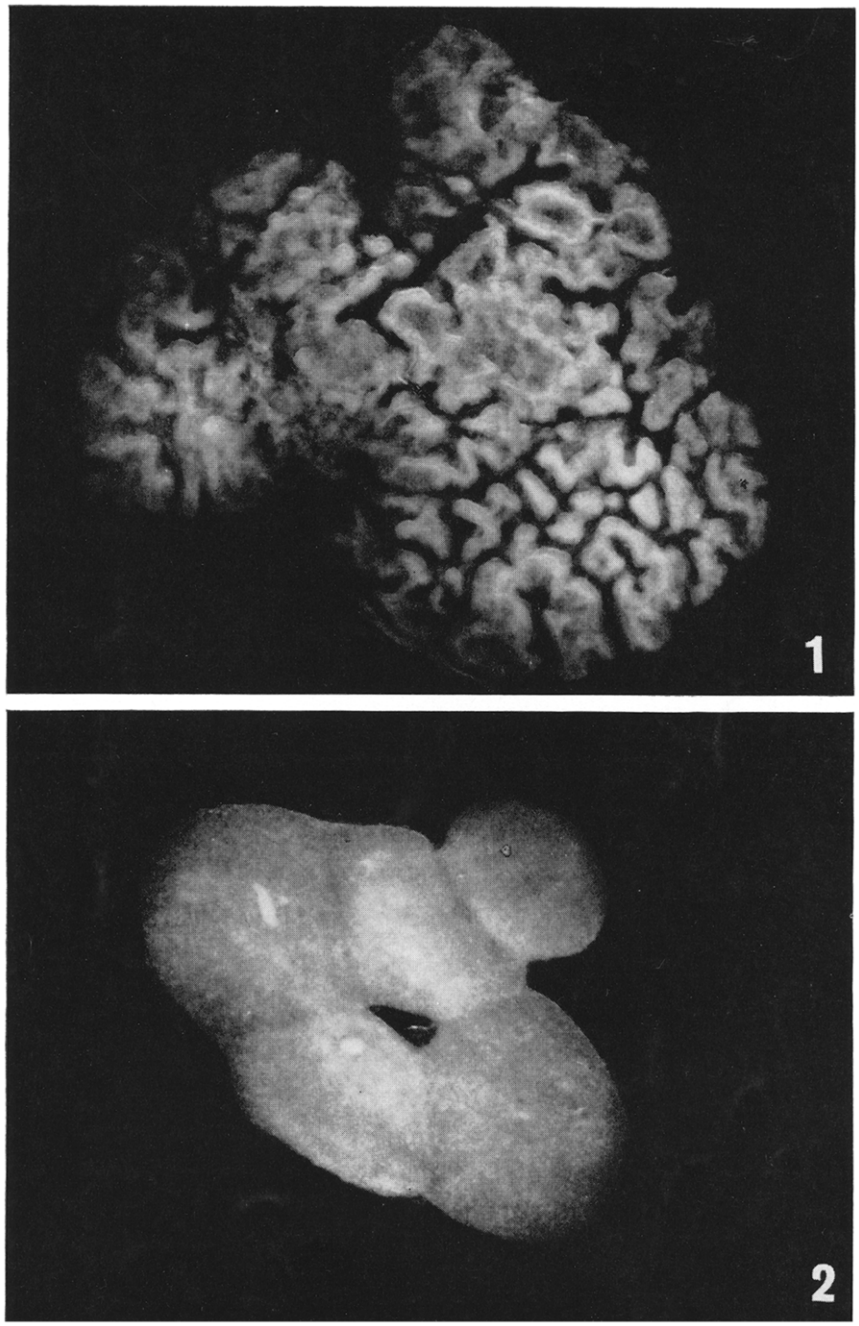


Fig. 1. 1—*Nodule cancéreux de la souche organoïde* Z 516 *provenant d'un épithélioma humain du côlon et cultivé sur du dialysat de foie de poulet de* 3 *mois depuis* 32 *semaines. La souche organoïde vit en culture organotypique sur mésonéphros depuis* 3 *ans* 8 *mois.*
2—*Nodule cancéreux de la souche organoïde* Z 200, *provenant d'un métastase hépatique d'un cancer humain d'origine gastrique. Ce nodule prolifère depuis* 134 *semaines sur de l'extrait total de levure de bière. La souche organoïde vit en culture sur mésonéphros depuis* 5 *ans* 5 *mois.*

(to face p. 372)

échanges d'ions sur Amberlite (IR 120 et IRA 400), d'autre part. Le détail des différentes opérations sera décrit dans le texte. Signalons simplement ici que les différentes fractions obtenues ont été ramenées à la concentration initiale par évaporation rotative sous vide. Ce dernier procédé nous a dicté le choix des éluants. Ainsi, pour la filtration sur Sephadex, nous avons employé l'eau déminéralisée comme éluant, et non pas une solution tampon, afin de ne pas courir le risque d'une trop forte concentration en sels dans les solutions à éprouver. Pour la chromatographie sur Amberlite nous avons choisi des éluants volatiles (NH_4OH, CH_3CO_2H) qui, ensuite, ont été éliminés par évaporation rotative sous vide jusqu'à ce qu'on obtienne un résidu sec. Le résidu est ensuite repris dans l'eau déminéralisée. Le pH de toutes les fractions est ajusté à 7,2.

RESULTATS

Culture sur des extraits totaux

Nos premières recherches concernant les substances permettant la prolifération organotypique *in vitro* de tumeurs malignes humaines prélevées directement sur les malades ont été faites avec des extraits totaux de mésonéphros ou de foie d'embryon de poulet de $8\frac{1}{2}$ jours, ou de foie de poulet de 3 mois. Il se sont tous révélés toxiques. Nous avons ensuite préparé des extraits totaux à partir de poudre acétonique de levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae* [6]. Cet extrait s'est montré puissamment actif, et les deux tumeurs malignes cultivées sur des milieux de base additionnés d'extrait prolifèrent respectivement depuis 142 et 90 semaines. Leur croissance est intense. Elles triplent leur volume en 7 jours tout en conservant leur morphologie spécifique et leur structure d'origine. En particulier, la tumeur maligne Z 516 secrète un mucus abondant, formé, comme dans le malade, par un mélange de mucines neutres, de sulfomucines et de sialomucines [7].

Culture sur des dialysats

La plupart des extraits totaux, à part celui de levure de bière, s'étant montrés toxiques, nous les avons dialysés dans des tubes Visking contre de l'eau déminéralisée [8, 9]. Nous disposons ainsi de quatre dialysats dont chacun peut être introduit dans un milieu de culture de base à raison d'un volume de dialysat pour 11 volumes de milieu. C'est cette concentration qui s'est révélée la plus favorable. La tumeur Z 200 et la tumeur Z 516 ont vécu respectivement pendant 90 et 50 semaines sur les milieux à base de dialysat de levure de bière. De même, sur les dialysats de mésonéphros, de foie embryonnaire et de foie de 3 mois, nous avons maintenu la prolifération intense pendant 45–50 semaines. Toutes les cultures ont été interrompues en pleine prospérité. Ainsi, les composés qui permettent la prolifération des nodules cancéreux organoïdes *in vitro* se trouvent dans la fraction dialysable des extraits, parmi les substances de PM inférieur à 15.000.

L'ébullition, pendant 2 heures, de l'extrait de levure et de son dialysat ne détruit pas les facteurs de croissance. Ceux-ci sont donc thermostables [9].

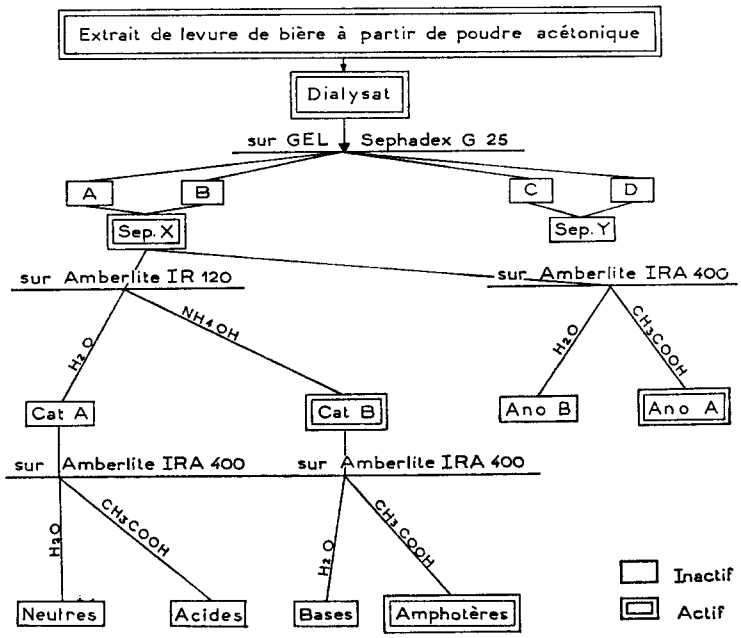
Nos recherches actuelles se concentrent sur le dialysat de levure, d'une part, et le dialysat de foie de poulet de 3 mois, d'autre part. On peut les préparer plus rapidement et plus facilement en quantités plus importantes que les dialysats d'organes embryonnaires. Ces dialysats permettront vraisemblablement de cultiver indéfiniment les tumeurs humaines Z 200 et Z 516.

Fractionnement des dialysats par filtration sur gel

Afin d'analyser ces deux dialysats actifs, nous avons en premier lieu utilisé la filtration sur gel de Sephadex G 25. Vingt à guarante ml de dialysat de levure sont mis sur une colonne de Sephadex G 25 (60×2 cm). Ensuite la colonne est éluée avec de l'eau déminéralisée, et on collecte des fractions de 10 ml. En nous référant à la courbe d'élution obtenue, nous avons défini 4 fractions que nous désignons par Sep A, B, C, D. La Fig. 2 montre le résultat d'une telle séparation.

Ces fractions ont été utilisées séparément. Ensuite elles ont été mélangées dans toutes les combinaisons réalisables. Afin de reconstituer le dialysat initial avec son activité, les quatre fractions A, B, C, D ont été regroupés en une seule (Sep Rec). Ces fractions ou mélanges de fractions sont toujours ramenés au volume convenable. Nous les introduisons séparément dans les milieux de base à raison de 1 volume pour 11 volumes de milieu total. Les seules combinaisons montrant une activité certaine sont les mélanges contenant les fractions A et B, c'est-à-dire, Sep X et Sep Rec. Les nodules Z 200 et Z 516 explantés sur des milieux contenant Sep X ou Sep Rec ont pu être repiqués pendant 35 semaines; les cultures ont continué à proliférer activement, ce qui a permis de multiplier constamment le nombre de nodules. Les cultures ont été arrêtées en pleine prospérité. La fraction Sep X contient les produits qui, présents dans les dialysats, permettent la prolifération organotypique cancéreuse *in vitro* (Tableau 1).

Tableau 1. *Fractionnement de l'extrait de levure de bière* (Saccharomyces cerevisiae)



Séparation sur échangeurs d'ions

La fraction Sep X a été ensuite soumise à une nouvelle séparation sur des échangeurs d'ions.

Dans une première étape, la fraction Sep X est adsorbée sur une colonne d'Amberlite IR 120 (échangeur de cathions, sous forme H^+). La colonne est éluée par 8 fois son volume d'eau déminéralisée. La fraction Cat A que l'on obtient est inactive. En revanche la fraction éluée par NH_4OH à 10%, et que nous appelons Cat B, s'est révélée très active.

Les cultures des nodules cancéreux sur les milieux contenant la fraction Cat B ont proliféré activement. Nous les avons transférées tous les 7 jours, pendant 30 semaines, et les avons abandonnées en pleine prospérité. Il est logique de penser que les facteurs qui permettent une prolifération extrêmement im-

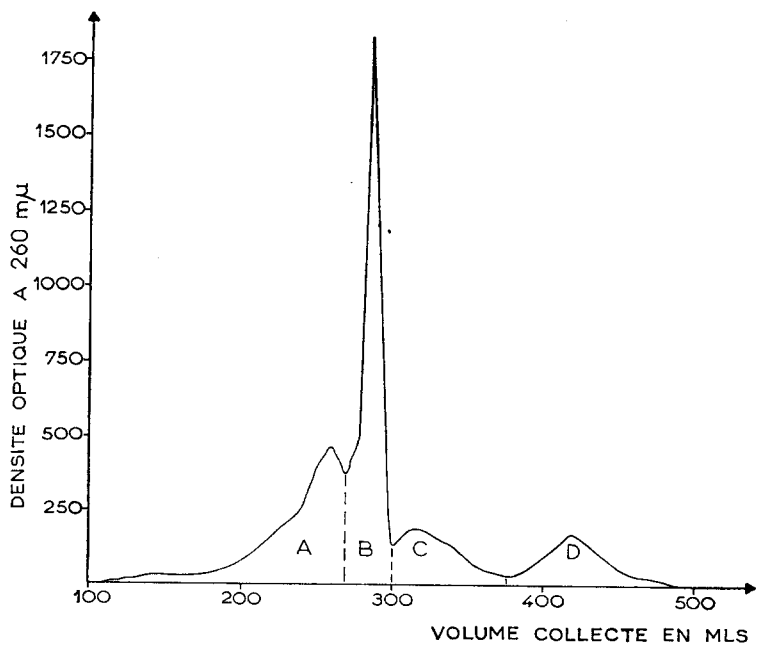
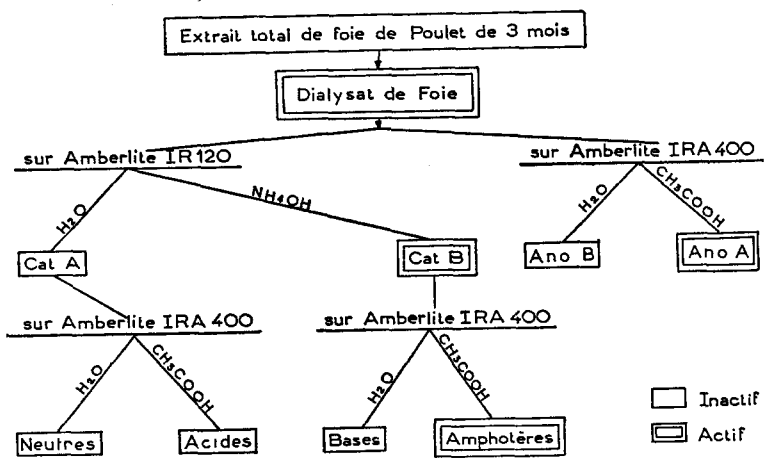


Fig. 2. *Courbe d'élution du dialysat de levure de bière* (Saccharomyces cerevisiae) *après filtration sur une colonne de gel de Sephadex* G 25.

Tableau 2. Fractionnement de l'extrait de foie de poulet de 3 mois



portante des nodules cancéreux sont à rechercher dans le groupe Cat B.

Le même fractionnement a été fait en partant du dialysat de foie de poulet de 3 mois (Tableau 2). C'est également la fraction Cat B qui s'est montrée favorable à la prolifération des nodules cancéreux. Les cultures de nodules cancéreux, sur des milieux contenant la fraction Cat B, sont dans la 35e semaine de transfert. Les nodules explantés sur des milieux contenant la fraction Cat A de la levure ou du foie périclitent dès la 2e ou, au plus tard, la 3e semaine.

Dans une deuxième étape, la fraction Sep X ou le dialysat de foie sont adsorbés sur une colonne d'Amberlite IRA 400 (échangeur d'anions, sous forme OH−).

La fraction Ano B que l'on obtient après élution par H_2O déminéralisée est inactive. Les fractions Ano B provenant soit du foie, soit de la levure sont inactives.

Ensuite, la colonne est éluée par l'acide acétique 2N; la fraction Ano A, ainsi recueillie, est active et permet la prolifération intense des nodules cancéreux. Les fractions Ano A provenant soit du foie, soit de la levure, sont toutes deux également actives. Les cultures de nodules tumoraux sur des milieux contenant la fraction Ano A sont à leur 31e repiquage.

Dans une troisième étape, pour nous permettre de cerner plus étroitement le problème, les deux fractions résultant de la séparation de Sep X ou du dialysat de foie, sur IR 120, ont été adsorbées chacune sur une colonne d'Amberlite IRA 400. Il s'agit des fractions Cat A et Cat B.

Le groupe Cat A est ainsi résolu en deux nouvelles fractions: l'une "neutres" est éluée avec l'eau déminéralisée; l'autre "acides" est éluée avec l'acide acétique.

Le groupe Cat B, soumis au même traitement, est lui aussi résolu en deux fractions: l'une "bases" est éluée avec l'eau déminéralisée, et l'autre "amphotères," est éluée avec l'acide acétique. Seule la fraction "amphotères" s'est révélée active, qu'elle provienne du foie ou de la levure de bière.

Les termes "amphotères", "acides", "bases" et "neutres" correspondent au comportement des différents constituants sur les deux types de colonnes, dans les conditions expérimentales de nos recherches. Les substances "amphotères" sont retenues à la fois sur les deux types de colonnes IR 120 et IRA 400. Les "bases" sont retenues sur l'échangeur de cathions, les "acides" sur l'échangeur d'anions; les substances "neutres" ne sont retenues sur aucune des deux colonnes.

Les nodules tumoraux, explantés sur les milieux contenant l'une ou l'autre des trois fractions "neutres", "acides", ou "bases", qu'elles proviennent du foie ou de la levure, périclitent dès le 2e ou le 3e repiquage. C'est une survie sans croissance. Les explants cancéreux cultivés sur des milieux contenant les produits "amphotères" prospèrent activement et conservent tous leurs caractères spécifiques. Ils vivent ainsi sur ces milieux depuis 28 semaines et les nodules les plus prospères peuvent être dédoublés ou "détriplés" à chaque transfert.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Quelle peut être la nature des substances favorisant la prolifération *in vitro* des nodules tumoraux et qui se trouvent dans les dialysats de levure de bière et de foie de poulet de 3 mois, dans les différentes fractions actives telles Sep X, Cat B, Ano A, "amphoteres"?

La prolifération anarchique si frappante des tumeurs cancéreuses, dans l'être vivant, exige une alimentation très riche en principes actifs indispensables à la croissance: acides aminés, bases pyrimidiques, puriques, nucléotides, vitamines et autres. Aussi, parallèlement au fractionnement, et tout au long de celui-ci, nous avons recherché la présence de quelques-uns de ces principes actifs par la technique de la chromatographie sur papier et sur couches minces. Dans toutes les préparations actives, la chromatographie a révélé la présence d'un très grand nombre de substances ninhydrine positives correspondant, pour la plus grande partie, à des acides amines. Nous savons, d'autre part, que la fraction active la plus purifiée, celle des "amphotères", contient des substances capables d'exister à l'état de bases ou à l'état d'acides, propriété caractéristique commune à tous les acides aminés. Il est remarquable que la présence des acides aminés est toujours liée aux fractions actives.

D'autre part des dosages d'acides aminés libres, par la méthode Moore et Stein [10], nous ont permis de constater que les dialysats de foie et de levure, que nous préparons, contiennent environ 8 fois plus d'acides aminés que le dialysat de l'extrait d'embryon de Poulet de 9 jours et le dialysat de sérum de Poulain de l'Institut Pasteur que nous utilisons.

L'état actuel de nos recherches nous a conduits à une fraction purifiée de substances "amphotères" qui contiennent les acides aminés des dialysats, alors que les autres fractions qui sont inactives ne contiennent pas d'acides aminés. Cette concomitance entre la présence d'acides aminés en grande quantité et l'activité de l'extrait, des dialysats, ou des fractions qui les contiennent, nous permettent-elles de dire que les acides aminés sont les facteurs indispensables à la prolifération cancéreuse? Certainement non, car la fraction "amphotère" contient probablement, en dehors des acides aminés, un grand nombre de substances différentes.

Nous avons essayé d'attaquer le problème en ajoutant des acides aminés au milieu de base. Jusqu'ici, ces recherches longues et complexes n'ont donné aucun résultat.

Rappelons que les milieux que nous utilisons pour les cultures d'organes, et qui nous ont servi de milieux de base pour la culture de tumeurs organisées ne suffisent pas à manitenir celles-ci en vie et à assurer leur croissance. Pourtant ces milieux sont constitués d'extraits d'embryons et de sérum de poulain qui contiennent de nombreuses substances nutritives parmi lesquelles des protéines complexes, des enzymes, des acides aminés, des nucléotides, des vitamines, des substances ternaires, etc. Les acides aminés sont représentés dans le deux composants organiques du milieu. On peut se demander ce que les extraits ou les fractions de levure et de foie apportent au milieu de base pour le rendre favorable à la croissance cancéreuse. S'agit-il d'acides aminés qui seraient beaucoup plus concentrés dans les extraits que dans le milieu de base? S'agit -il de substances spécifiques de croissance? Les deux solutions sont plausibles. Nous ne pouvons résoudre actuellement cette alternative. L'analyse de la fraction "amphotère" permettra d'apporter une solution à ce problème.

RESUME

1. *Le présent mémoire donne une vue d'ensemble des résultats de nos recherches récentes concernant l'analyse biochimique des facteurs déterminant la croissance organotypique* in vitro *de tumeurs malignes humaines.*

2. *Depuis plusieurs années, nous entretenons deux tumeurs malignes humaines du tube digestif. Ces tumeurs prolifèrent activement sous forme de nodules organisés, massifs, formés de cellules cancéreuses, dépourvus de stroma. Ils conservent leurs propriétés initiales.*

3. *Ces nodules se nourrissent sur des organes embryonnaires de poulet, tels le mésonéphros et le foie auxquels ils sont associés sur un milieu nutritif, selon la méthode de Et. Wolff et Em. Wolff. Ils vivent ainsi l'un depuis* 5 *ans* 9 *mois, l'autre depuis* 4 *ans* 1 *mois. Leur croissance est telle qu'à chaque transfert—tous les* 7 *jours—ils peuvent être coupés en* 2 *ou* 3 *fragments. Leur nombre peut être maintenu ou augmenté rapidement selon les besoins. Ces nodules de prolifération sont utilisés pour l'étude des extraits ou fractions d'extraits qui favorisent la prolifération* in vitro *des tumeurs cancéreuses.*

4. *Nous avons pu remplacer les organes embryonnaires vivants par l'extrait de levure de bière, par des dialysats d'extraits de levure de bière, de mésonéphros ou de foie embryonnaire, ou encore par du dialysat d'extrait de foie de poulet de* 3 *mois.*

Ils ont tous une activité stimulant la croissance égale ou même supérieure à celle des organes embryonnaires vivants. Les composants de ces dialysats ont des masses molé-

culaires inférieures à 15.000. *Les protéines complexes de PM supérieur à* 15.000 *ne sont donc pas en cause.*

L'ébullition, pendant 2 *heures, de l'extrait de levure ou de son dialysat ne détruit pas leur activité. Les facteurs de croissance présents sont, par conséquent, thermostables.*

5. *Nous avons, en une première étape, fractionné le dialysat de levure de bière par filtration sur Colonne de gel de Sephadex G* 25. *Quatre fractions A, B, C, D ont été obtenues. Introduites séparément dans les milieux de base, elles sont inactives. Le mélange des fractions A et B (Sep X) est seul actif, et a permis la prolifération des deux souches organoïdes pendant* 35 *semaines.*

6. *Le mélange Sep X d'une part, et le dialysat de foie d'autre part, ont été ensuite soumis à une séparation sur des échangeurs d'ions.*

Le passage de l'un ou de l'autre sur une colonne d'Amberlite IR 120 *(échangeur de cathions sous forme* H^+*), a permis de séparer une fraction Cat A, inactive (éluée par* H_2O*), d'une fraction Cat B très active (éluée avec* NH_4OH*). La colonne d'Amberlite IRA* 400 *(échangeur d'anions sous forme* OH^-*) a permis de séparer une fraction inactive Ano B (éluée par* H_2O*) d'une fraction très active Ano A (éluée par* CH_3COOH*). La fraction Cat B d'une part, et la fraction Ano A d'autre part, qu'elles proviennent de la levure de bière ou du foie de poulet de* 3 *mois, ont produit une croissance intense des nodules tumoraux des deux souches organoïdes pendant* 31 *semaines. Celles-ci continuent à proliférer.*

7. *Dans une nouvelle étape, les fractions de foie ou de levure, Cat B et Cat A, ont été adsorbées chacune sur des colonnes d'Amberlite IRA* 400. *Ainsi on obtient* 4 *nouvelles fractions: l'une "neutres", l'autre "acides" à partir de Cat A, l'une "bases" et l'autre "amphotères" à partir de Cat B. Seule la fraction "amphotères" s'est révélée active, qu'elle provienne du foie de poulet ou de la levure de bière.*

8. *Cette fraction des "amphotères" contient les substances actives qui existent dans Cat B et dans Ano A, dans les dialysats de foie de poulet et de levure de bière dont nous sommes partis.*

9. *Grâce à la chromatographie sur papier et en couches minces, nous avons pu vérifier que toutes les fractions actives contiennent de nombreux acides aminés. Les fractions inactives n'en contiennent pas.*

Cette constatation ne permet pas toutefois de conclure que des acides aminés sont les substances qui stimulent la croissance des tumeurs cancéreuses organoïdes in vitro. *En effet, outre les acides aminés, la fraction la plus purifiée, celle des "amphotères", contient certainement d'autres substances.*

De nouveaux fractionnements sont en cours ainsi que des recherches utilisant d'autres méthodes.

SUMMARY

1. *The present article presents a general view of our recent work concerning the biochemical analysis of factors determining organotypic growth of human malignant tumours* in vitro.

2. *Two human malignant tumours of intestinal origin have been maintained for several years, and these tumours proliferate actively in the form of massive organized nodules, comprised solely of cancer cells and devoid of stroma. They conserve their initial properties.*

3. *These nodules live on chick embryo organs such as the mesonephros and the liver, with which they are associated on the culture medium according to the method of Et. Wolff and Em. Wolff. In this way the two lines have been maintained* 5 *years* 9 *months and* 4 *years* 7 *month respectively. Their growth is such that at each* 7*-day transfer they can be divided into* 2 *or* 3 *fragments, thus their number is either maintained or rapidly increased subject to the need. These nodules are used for the study of the extracts or extract fractions which favour their proliferation* in vitro.

4. *The embryonic organs could be replaced by an extract of brewers yeast, by dialysates of this extract, or by mesonephros, embryonic liver or adult* (3*-month-old pullet) liver dialysates. All have a "growth stimulating activity" equal or superior to that of living embryonic organs. Molecules of M.W. of more than* 15,000 *are thus unnecessary. Boiling for two hours does not inhibit the activity of the extracts, thus indicating the thermostability of the growth factors.*

5. *The dialysate of yeast was first fractionated on a column of Sephadex G-*25 *gel to*

obtain four fractions (A. B. C. D.). When introduced separately into the basal medium they proved inactive, only a mixture of A and B being effective (Sep X). This mixture has supported the proliferation of the two organotypic lines 35 *weeks.*

6. *The mixture Sep. X and the liver dialysate were then fractionated using ion exchangers. Passage of either through Amberlite IR* 120 *(H^+ form) gives two fractions—Cat A (eluted with H_2O) which is inactive, and Cat B (eluted with NH_4OH) which is very active. Similarly the use of Amberlite IRA* 400 *($-OH^-$form) led to two fractions, Ano B (eluted with H_2O), inactive, and Ano A (eluted with CH_3COOH) which proved to be highly active. These active fractions have already supported an intense tumour growth for* 31 *weeks and proliferation continues.*

7. *Further fractionation of the groups Cat A and Cat B using Amberlite IRA* 400 *(OH^-form) gave four new fractions, "neutrals" and "acids" from Cat A and "bases" and "amphoterics" from Cat B. Only the "amphoterics" fraction proved active (whether originating from liver or yeast).*

8. *The fraction "amphoterics" would thus seem to be indispensable to growth, whether in groups Cat B or Ano A and whether originating from* 3 *month pullet liver or yeast.*

9. *Paper or thin layer chromatography verifies that all the active fractions contain the amino acids while the inactive fractions lack them. Nevertheless this observation does not permit the conclusion that the amino acids are the substances which stimulate the growth of the organoid cancerous tumours* in vitro, *since other substances are present even in the most purified fraction ("amphoterics"). Further fractionation and other approaches are being continued in order to clarify the position.*

ZUSAMMENFASSUNG

1. *Diese Arbeit gibt eine Gesamtübersicht der Resultate unserer letzten Forschungen, welche sich mit der biochemischen Analyse der Wachstumsfaktoren der organotypischen Krebstumorenkulturen* in vitro *befassen.*

2. *Seit mehreren Jahren unterhalten wir zwei menschliche Krebstumoren des Verdaungsapparates in organotypischer Kultur. Sie wuchern aktiv, als organisierte, massive Knötchen. Sie sind nur aus Krebszellen zusammengesetzt, ganz ohne Stroma. Es sind organoïde Stämme, die ihre ursprünglichen Eigenschaften beibehalten, ins besondere ihr Wucherungsvermögen, und imstande sind, sich ins Unendliche zu vermehren.*

3. *Diese Knötchen leben auf embryonalen Organexplantaten des Hühnchens, wie Mesonephros oder Leber, mit welchen sie auf dem Medium nach der Methode von Et. und Em. WOLFF, assoziert sind. Der eine dieser Stämme (Z* 200*) lebt nun auf diese Weise seit* 5 *Jahren und* 5 *Monaten, der andere (Z* 516*) seit* 3 *Jahren und* 8 *Monaten. Ihr schnelles Wachstum macht es möglich jeden* 7*-Tag die Krebstumorenexplantate in* 2 *oder* 3 *Teile zu schneiden. Wir können ihre Anzahl je nach Bedarf rasch zunehmen lassen oder beihalten. Es sind diese Proliferations knötchen welche wir für die Versuche der extrahierten wachstumsfördernden Substanzen gebrauchen.*

4. *Wir können nun die lebenden Organe auf denen die Knötchen* in vitro *als Parasiten leben durch Bierhefeextrakt, oder durch Dialysate von Bierhefe, von Mesonephros, von Leber aus dem Hühnerembryo, oder auch durch Bialysate von Leber eines* 3 *Monate alten Hühnchens ersetzen. Alle diese Dialysate besitzen ein aktives, wachstumsförderndes Vermögen, welches dem der lebenden embryonalen Organe gleichkommt oder es sogar übertrifft. Das Molekulargewicht der in diesen Dialysaten vorhandenen Substanzen ist kleiner als* 15,000. *Komplexe Proteïne kommen also deshalb nicht in Betracht. Ein zweistündiges Kochen dieser Dialysate zerstört diese Wachstumsfaktoren nicht. Sie sind demnach thermostabil.*

5. *In einer ersten Stufe wird das Hafedialysat durch Filtrieren auf einer Sephadex G-*25 *Gelsäule in* 4 *Fraktionen, A, B, D und D getrennt. Einzeln gebraucht sind diese* 4 *Fraktionen inaktiv. Die Mischung von A une B (Sep X) ist allein aktiv und bewirkt die Wucherung der zwei Krebsstämme in Organkultur während mehr als* 35 *Wochen.*

6. *Sep X einerseits und das Leberdialysat andererseits werden durch Ionenaustausch (Amberlit IR* 120*—Kathionenaustausch) weiter getrennt. Nach Elution mit H_2O erhält man eine erste Fraktion, Cat A, welche inaktiv ist. Durch Elution mit HN_4OH wird die aktive Fraktion, Cat B, gewonnen.*

Durch Anionenaustausch mit Amberlit IRA 400 *wird ebenfalls eine inaktive Fraktion, Ano B, von einer sehr aktiven Fraktion, Ano A, getrennt.*

Die Krebstumorenexplanantate beider Stämme konnten auf den beiden aktiven Fraktionen Cat B und Ano A während 31 *Wochen kultiviert werden gleichgültigob diese beiden Fraktionen von Leber oder Hefe kommen.*

7. *In einer nächsten Stufe wird jede der Fraktionen Cat B und Cat A durch Säulenchromatographie mit Amberlit IRA* 400 *getrennt. Wir erhalten nun* 4 *neue Fraktionen: eine "neutrale", und eine "saure", von Cat A abgeleitet, eine "basische" une eine "amphotere" von Cat B abgeleitet. Die Organkulturen zeigen dass allein die "amphotere" Fraktion wachstumsfördernd wirkt, gleich sie nun von Leber oder Hefe stammt.*

8. *Diese "amphotere" Fraktion enthält die aktiven Substanzen welche in Cat B, in Ano A, in den verschiedenen Dialysaten von Leber oder Hefe, sowie auch im Hefeextrakt vorhanden sind.*

9. *Die papier — und Dünnschichtenchromatographie hat gezeigt dass alle aktiven Fraktionen zahlreiche Aminosäuren enthalten. Die inaktiven Fraktionen dagegen enthalten keine Aminosäuren.*

Diese Festellung erlaubt es aber nicht den schluss dass die Aminosäuren die wachstumsfördernden Substanzen darstellen, welche das Wuchern der Krebstumorenexplantate in vitro *bedingen. In der Tat enthält die bisher reinste Fraktion ("amphotere") ausser den Aminosäuren noch andere Substanzen.*

Weitere Untercushungen sind im Gang.

REFERENCES

1. Et. Wolff et Em. Wolff, Peut-on associer, en culture organo-typique, des cancers humains fraîchement prélévés à des tissus embryonnaires de poulet? *C. R. Acad. Sci.* (*Paris*) **252,** 1873 (1961).
2. Et. Wolff et Em. Wolff, Culture de cancers humains sur du rein embryonnaire de poulet explanté *in vitro. Presse méd.* **69,** 1123 (1961).
3. Et. Wolff et Em. Wolff, Nouveaux résultats dela culture organotypique de cancers humains. *C. R. Acad. Sci.* (*Paris*) **258,** 2439 (1964).
4. Et. Wolff et Em. Wolff, Développements récents de la culture organotypique de deux tumeurs humaines d'origine digestive. *Presse méd.* **73,** 1157 (1965).
5. Et. Wolff et Em. Wolff, Cultures organotypiques de longue durée de deux tumeurs humaines du tube digestif. *Europ. J. Cancer* **2,** 93 (1966).
6. Et. Wolff, Em. Wolff et Y. Croisille, Culture organotypique de deux épithéliomas humains en l'absence de substratum vivant. *C. R. Acad. Sci.* (*Paris*) **260,** 2359 (1965).
7. R. Beaupain et Em. Wolff, Etude histochimique du mucus sécrété par une tumeur maligne du côlon cultivée *in vitro. C. R. Acad. Sci.* (*Paris*) **264,** 1953 (1967).
8. Et. Wolff, Em. Wolff, Y. Croisille et J. Mason, Introduction à l'analyse biochimique des substances favorisant la croissance organotypique des cancers humains *in vitro. Bull Acad. Nat. Méd.* (*Paris*) **150,** 94 (1966).
9. Em. Wolff, Y. Croisille, J. Mason et Et.Wolff, Sur la stimulation de cultures organotypiques de deux épithéliomas humains par des dialysats d'extrait de levure, de mésonéphros et de foie d'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sci.* (*Paris*) **262,** 2120 (1966).
10. S. Moore et W. H. Stein, Modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* **211,** 907 (1954).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 381–387. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Cell Loss as a Factor in the Growth Rate of Human Tumours

G. G. STEEL

Biophysics Department, Institute of Cancer Research (Surrey Branch), Belmont, Surrey, England

INTRODUCTION

ONE OF the main objectives of investigations into the cell population kinetics of tumours is to describe the way in which a tumour achieves a particular rate of growth. Such a description should be mainly in terms of three principal parameters:

(i) the cell cycle time of proliferating cells
(ii) the proportion of cells proliferating
(iii) the extent of cell loss

and the first step towards making a more informed judgement on response to therapy must be an understanding of their relative importance. One approach to the measurement of the first two of these parameters has been described by Steel, *et al.* [1]. Their method was based on the use of two tritiated thymidine experiments, both sensitive to spread in cell cycle time, and the results enabled information to be gained not only on the duration of the average cell cycle but also on the spread of cycle times within the tumour cell population and the proportion of non-proliferating cells. The measurement of cell loss presents many problems. An attempt to use a direct thymidine turnover technique [2] was frustrated by extensive reutilisation of tritium from thymidine. Only recently, however, has serious consideration been given to the possibility of estimating cell loss by measuring the birth rate of cells within a tumour and comparing this with its actual volume growth rate. Such an approach is not entirely straightforward for there are other factors which can influence tumour size apart from cell number; the purpose of the present paper is to show what estimates can be made by this method of the rate of cell loss from human tumours and to focus attention on the lines of investigation which should be followed to make the estimates more reliable. The present paper is a preliminary report, as presented at the 1967 meeting of the European Study Group for Cell Proliferation; a more detailed communication giving all the relevant theory will be published in due course.

Two principal techniques are available to estimate cell birth rate with a view to calculating cell loss: the colchicine technique, used *in vivo* in human subjects by Iversen and Refsum [3] and the measurement of thymidine labelling index coupled with estimates of the length of the DNA synthetic period. The present work will be based on the thymidine labelling method only. Its advantages are that it avoids the uncertainty involved in the choice of colchicine dosage [4] and that thymidine labelling may be carried out *in vitro* with some confidence that the results reflect *in vivo* labelling indices [5]. The possibility of *in vitro* labelling means that the labelling method may be applied to any resected tumour, with no inconvenience to the patient. The main disadvantage of the labelling method is that it requires a knowledge of the duration of the DNA synthetic period. Although this has been measured in many tissues of experimental animals, there is little data on its duration in human tissues. However, since the necessary techniques are available there is good reason to believe that future

research will provide a better understanding of the range of values which the S period can have in human tumours.

THE ESTIMATION OF CELL LOSS ON THE BASIS OF THYMIDINE LABELLING INDEX

Consider a population of cells, some of which are proliferating with identical phasing of the cell cycle (cycle time t_c, duration of DNA synthesis t_s) and some non-proliferating. Consider first the situation in which there is no cell loss. If at every division α proliferative cell are produced ($1 \leqslant \alpha \leqslant 2$ for an expanding cell population) then it can be shown that when the population has grown sufficiently to make the starting conditions negligible, the growth of the cell population will be exponential and the proliferative fraction will be constant and given by

$$p = \alpha - 1 \qquad \text{(i)}$$

Furthermore the doubling time of such a population will be

$$T = \frac{\log_e 2}{\log_e \alpha} \cdot t_c \qquad \text{(ii)}$$

The labelling index of *proliferative cells* is proportional to t_s/t_c; its precise value is given by the fractional area of the age distribution diagram [1] for cells in the *S* period, and it may be given in the form

$$(L.I.)_{\text{proliferative cells}} = \mu\, t_s/t_c$$

$$= L.I. \times \frac{1}{\alpha - 1} \qquad \text{(iii)}$$

where *L.I.* is the thymidine labelling index of the whole population. Eliminating t_c between equations (ii) and (iii) gives

$$T = \mu . \frac{\log_e 2}{\log_e \alpha} (\alpha - 1) \frac{t_s}{L.I.} \qquad \text{(iv)}$$

This equation has been published previously in the form

$$T = \lambda \frac{t_s}{L.I.} \qquad \text{(v)}$$

[6] where T was termed the Potential Doubling Time—the doubling time of the cell population in the absence of cell loss. Estimation of the Potential Doubling Time by the measurement of labelling index and the duration of t_s thus depends upon a knowledge of the value of λ, which itself depends on μ and α. However, lack of precise information on λ in practice introduces little uncertainty in estimates of Potential Doubling Time, particularly in work on human tumours. When α tends to unity (small proliferative fraction) the expression $(\log 2/\log \alpha)(\alpha\ 1)$ approaches 0·693 and μ must be close to unity; when α is close to 2 (almost all cells proliferative then $(\log 2/\log \alpha)(\alpha 1)$ tends to unity and λ can range between 0·693 and somewhat greater than unity. In the case of human tumours, however, μ must in this latter situation be close to 0·693: a large proliferative fraction in a slowly-growing tumour implies a long cell cycle time and if DNA synthesis occurs near the end of the cell cycle μ must be close to its *lower* limit. In dealing with human tumours (doubling times in excess of say 14 days) it is thus unlikely that λ will be outside the range 0·7 to 0·8.

The importance of equation (v) is that it allows the "no loss" doubling time of a tumour cell population to be calculated from the measurement of cell production and that by the comparison of such an estimate with the actual doubling time the possible extent of cell loss can be deduced. The assumption in this reasoning is that cell loss is the only process which gives rise to a discrepancy between Potential and actual doubling times. Defining a parameter φ as the rate of cell loss as a fraction of the rate at which cells are entering mitosis, the actual rate of growth of the population is given by

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\log_e 2}{T} (1 - \varphi)\ N$$

$$\varphi = 1 - \frac{T}{T_a} \qquad \text{(vi)}$$

where T_a is the actual doubling time. The above definition of φ as a parameter of cell loss needs some elaboration. A choice must be made between expressing the rate of cell loss as a fraction of the rate at which cells are being added to the population (one cell per division) or as a fraction of the birth rate (two cells per division). Using the present definition of the parameter φ, 100% cell loss corresponds to a cell population whose size is static. The estimation of cell loss by this method requires a knowledge of three parameters labelling index, the duration of DNA synthesis and the actual volume doubling time. Since such data is not available on individual human tumours, the best that can be done at present is to bring together all the available data on labelling index and growth rate, accepting the fact that these are obtained on rather different classes of tumour material, using also the best estimate of t_s which can be made at this stage.

Table 1. *Labelling indices of human tumours*

Site of tumour	No. of measurements	Median labelling Index [%]	Potential doubling time* (days)	Principal authors†
Breast	38	1·1	43	Wolberg & Brown [13]
Colon	31	4·5	10·4	Wolberg [14]; Lieb & Lisco [15]
Stomach	11	6·9	6·8	
CNS	15	2·0	23·4	Kury & Carter [16]
Melanoma	8	3·3	14·2	
Lung and Larynx	8	15·0	3·1	Titus & Shorter [17]
Tongue	6	7·2	6·5	
Uterus and Cervix	6	4·8	9·8	
Lymphosarcoma, Burkitt Tumour	9	32·0	1·5	Cooper *et al.* [18]
Miscellaneous sites	38	1·4	33	
All Sites	170	3·0	15·6	

*Calculated for $\lambda = 0{\cdot}75$
$t_s = 15$ hr.

†Data also included from Johnson *et al.* [19]; Baserga *et al.* [20]; Steel & Bensted [6]; Leevy [21]; Coons *et al.* [22]; Johnson & Bond [23]; Rubini *et al.* [24]; Hendrickson & Hibbs [25]; Oehlert *et al.* [26].

Thymidine labelling index

In Table 1, 170 measured values of thymidine labelling index for human tumours are collected, taken from the work of various authors on tumours in a wide range of sites. Most of the measurements were made by *in vitro* labelling although a few were obtained by *in vivo* thymidine administration. For all the data summarised in this table the median labelling index is 3·0%, 80% of the values being in the range 0·01% to 20%. Since 10% of the values are recorded as zero labelling, the lower limit of this range is poorly defined.

Actual tumour doubling time

The available data on the volume doubling times of human tumours have recently been reviewed by Steel and Lamerton [7]. They consist for the most part of measurements on primary and secondary tumours of the lung. In Table 2 the results of six groups of authors are compared. There are some differences between individual series which may reflect significant differences in the growth rates of the various types of tumour, but if the results are amalgamated they yield an overall median doubling time of 66 days with 80% of the values falling in the range 18 to 200 days.

Duration of DNA Synthesis

Published values for the duration of DNA synthesis in tissues of experimental animals commonly fall in the range 7–10 hr [8, 9]. Few measurements are available on human tissues

Table 2. *Doubling times of human tumours*

Author	Site	No. of measurements	Median volume doubling time (days)	Range (days)
Breur [27]	Lung metastases	86	40	4–745
Collins *et al.* [28]	Lung metastases	24	40	11–164
Collins [29]	Lung metastases from colon or rectum	25	96	34–210
Garland *et al.* [30]	Primary bronchial Carcinomas	22	105	27–480
Schwartz [31]	Primary bronchial Carcinomas	12	62	17–200
Spratt [32]	Primary skeletal Sarcomas	6	75	21–366

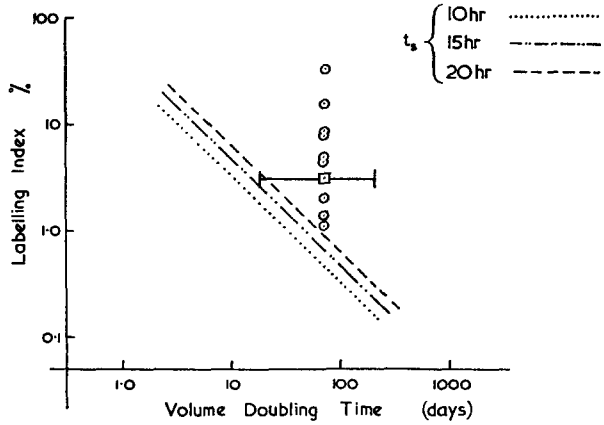


*Fig.*1. *The correlation of thymidine labelling index with volume doubling time for human tumours. The broken lines show the "no loss" conditions given by equation* (v), *taking* $\lambda = 0{\cdot}75$ *and with three values for the duration of the DNA synthetic period.* 80% *of values of volume doubling time summarised in Table* 2 *fall within the indicated limits. The points shown thus* ⊙ *are the meidan labelling indices for the various tumour site classes as given in Table* 1. *The point shown thus* ⊡ *indicates the overall median labelling index and median doubling time.*

but the available data [10–12] suggest a somewhat longer period. At the present time a value of 15 hr would appear to be the best estimate for its duration in solid tumours.

Graphical presentation of the data

The above data can be presented graphically in the form shown in Fig 1. From equation (v) the "no loss" conditions are plotted as a series of straight lines on the double-logarithmic coordinates, for various assumed values of t_s. The experimental data are also presented in this diagram, showing the median labelling indices of the tumour site classes from Table 1 and 80% of the range of values of tumour doubling time. It is clear that the bulk of the data, comprising the greater part of that at present available on the labelling index and doubling time of human tumours, falls well to the right of the "no loss" conditions, implying that cell loss is in general extensive. Taking the median values of labelling index and doubling time and an S period of 15 hr, equation (vi) yields a median cell loss of 77%. If the S period is taken to be 20 hr this figure becomes 70% and for 30 hr it becomes 54%.

DISCUSSION

The fact that cell loss does take place from tumours is clear. The widespread occurrence of overt necrosis, the phenomenon of metastasis and the detection of cancer cells in the circulating blood and in exfoliative specimens are all evidence of cells being lost from tumours. The extent of such cell loss and its influence on the overall growth rate of the tumour have, however, been difficult to assess. What has been done in the preceding section is to estimate the cell loss from human tumours on the basis of the best available data on thymidine labelling index and volume doubling time. The data and calculations are necessarily open to criticism from various points of view. They do, however, justify the hypothesis that in many, perhaps most, human tumours cell loss exceeds 50% when defined as above in terms of the parameter φ. The principal assumptions in the calculations may be summarised as follows:

(i) That the duration of the DNA synthetic period in human tumour cells is not much greater than 15 hr.

(ii) That the growth rate data are representative of human tumours in general; in particular that the growth rate of primary and secondary tumours of the lung is not much less than that of primary tumours in other sites.

(iii) That the measurements of labelling index are representative; it is not certain that the *in vitro* labelling indices so far obtained on human tumours accurately reflect the true *in vivo* labelling indices or that the various authors have taken care to avoid bias in favour of well-labelled regions of tumour.
What can be claimed, however, is that the data have come from a wide range of independent observers.

(iv) That the theory used for exponentially-growing tumours can satisfactorily be applied to human tumours in general, which probably do not grow exponentially. The effects of non-exponential growth in modifying the estimates from (equation (v)

are not large: for linear growth λ is always unity.

(v) That the size distribution of proliferating cells is the same as for the population as a whole.

(vi) That the contribution of intracellular substance to the growth rate of human tumours in general is small.

The calculations given above do not allow any inferences to be made about the biological mechanism of cell loss from tumours. Three principal types of cell loss may occur:

(a) *Exfoliation from primary carcinomata.* Since epithelia commonly shed cells at a rate which is consistent with turnover times of only a few days, it is highly probable that carcinomata lose cells by the same mechanism.

(b) *The spread of cells within the body, particularly via the vascular system and lymphatics.* The loss by this route may not be large, but it cannot be accurately estimated at the present time.

(c) *Cell death.* This may be of two types: the death of cells at the boundary of a region of overt necrosis, and secondly the death of cells within non-necrotic tumour tissue as evidenced by the observation of isolated degenerate nuclei. The death, particularly of isolated cells, is presumably related to their proliferative status. Some may die in abortive mitosis, others after an extended non-proliferative lifespan.

It should be emphasised that cell loss as detected by the present calculations is revealed as a deficit in the overall "balance sheet" for tumour volume. In tumours which contain necrotic regions it is assumed that the necrotic proportion is not changing with time to a significant extent. The measurements of labelling index are presumably made on viable tumour tissue and the calculated potential doubling times therefore refer to the viable tumour volume. If, however, the necrotic proportion is constant then the doubling time of viable tumour tissue equals the doubling time of the tumour as a whole and cells which die and subsequently form part of the necrotic volume are included in the estimate of cell loss. The assumptions and the biological mechanisms listed above summarise the main areas for further investigation into this particular method of estimating cell loss from tumours. If subsequent research supports the hypothesis that a majority of human tumours are subject to cell loss in excess of 50%, the implications are of great interest. On the one hand, if cell loss is the *dominant* factor in the growth of many tumours, it may be right to search specifically for therapeutic agents which directly influence cell loss. On the other hand, it would seem important to screen for anti-tumour agents using experimental tumours which also have extensive cell loss. In any discussion of the response of a tumour to therapy one must consider not only the effects on the rate of cell production, but also on the rate of cell loss.

RESUME

On décrit une méthode permettant l'estimation de la perte des cellules dans des tumeurs. Le temps potentiel du doublement (c'est-à-dire le temps de doublement en l'absence de perte de cellules) peut être calculé à partir de mesures de l'index de marquage à la thymidine et de la durée de la période de synthèse de l'ADN. La perte de cellules peut être estimée en comparant le temps réel de doublement du volume de la tumeur et le temps potentiel de doublement, calculé selon la méthode décrite.

Ce genre de calcul est appliqué à des tumeurs humaines, en utilisant les données publiées sur les temps de doublement de volume et les index de marquage. On montre que les données disponibles, provenant d'un important matériel, sont compatibles avec un taux de perte de cellules de plus de 50% du taux de production de nouvelles cellules par les mitoses.

Les hypothèses possibles sont proposées, et la nature biologique de la perte de cellules est brièvement discutée.

SUMMARY

A method is described by which cell loss from tumours can be estimated. From measurements of thymidine labelling index and the duration of the DNA synthetic period, the The Potential Doubling Time of a tumour can be calculated (i.e. the doubling time in the absence of cell loss). By comparing this with the actual volume doubling time an estimate of cell loss can be made.

This type of calculation is applied to human tumours using published data on volume

doubling time and thymidine labelling index. It is shown that the available data, obtained on a wide range of tumour material, are consistent with the rate of cell loss being more than 50% *of the rate at which cells are being added by mitosis. The inherent assumptions are listed and the biological nature of cell loss is briefly discussed.*

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode beschrieben, um den Zellverlust von Tumoren zu bestimmen. Aus der Bestimmung des Thymidin-Markierungsindex und der Dauer der DNS-Synthese-Periode kann die potentielle Verdoppelungszeit des Tumors errechnet werden (dis ist die Verdoppelungszeit bei fehlendem Zellverlust). Durch Vergleich dieser mit der wirklichen Tumorverdoppelungszeit kann der Zellverlust bestimmt werden. Dieses Rechenverfahren wird auf menschliche Tumoren angewendet, wobei veröffentlichte Angaben über Tumorvolumen, Verdoppelungszeiten und Thymidin-Markierungsindex zugrundegelegt werden. Es wird gezeigt, daß die verfügbaren Angaben, die aus einem großen Bestand von Tumormaterial erhalten wurden, eine Zellverlustrate von mehr als 50% *der durch Mitose hinzugekommenen Zellen ergeben. Die Hyopthesen werden angeführt und die biologischen Prozesse des Zellverlustes werden kurz diskutiert.*

REFERENCES

1. G. G. Steel, K. Adams and J. C. Barrett, Analysis of the cell population kinetics of transplanted tumours of widely-differing growth rate. *Brit. J. Cancer* **20,** 784 (1966).
2. G. G. Steel, Delayed uptake by tumours of tritium from thymidine. *Nature (London)* **210,** 806 (1966).
3. O. H. Iversen, Kinetics of cellular proliferation and cell loss in human carcinoma. (This symposium).
4. I. F. Tannock, A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. *Exp. Cell Res.* **47,** 345 (1967).
5. M. F. Rajewsky, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours, *Europ. J. Cancer* **1,** 281 (1965) .
6. G. G. Steel and J. P. M. Bensted, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours, *Europ. J. Cancer* **1,** 275 (1965).
7. G. G. Steel and L. F. Lamerton, The growth rate of human tumours. *Brit. J. Cancer* **20,** 74 (1966).
8. I. L. Cameron and R. C. Greulich, Evidence of an essentially constant duration of DNA synthesis in the renewing epithelia of the adult mouse. *J. Cell Biol.* **18,** 31 (1963).
9. C. R. Pilgrim and W. Maurer, Autoradiographische Untersuchungen uber die konstanz der DNS-verdopplungs-dauer bei zeccarten von maus und ratte durch doppelmarkierung mit H^3 und C^{14}- thymidin. *Exp. Cell Res.* **37,** 183 (1965).
10. P. K. Lala, M. A. Maloney and H. M. Patt, Measurement of DNA-synthesis time in myeloid-erythroid precursors. *Exp. Cell Res.* **38,** 626 (1965).
11. M. Lipkin, P. Sherlock and B. Bell, Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. *Gastroenterology* **45,** 721 (1963).
12. M. Tubiana and E. Frindel (This symposium).
13. W. H. Wolberg and R. R. Brown, Autoradiographic studies of *in vitro* incorporation of uridine and thymidine by human tumour tissue. *Cancer Res.* **22,** 1113 (1962).
14. W. H. Wolberg, Human tumour resistance to fluorinated pyrimidines. *Cancer Res.* **24,** 1437 (1964).
15. L. M. Lieb and H. Lisco, *in vitro* uptake of tritiated thymidine by carcinoma of the human colon. *Cancer Res.* **26,** 733 (1966).
16. G. Kury and H. W. Carter, Autoradiographic study of human nervous system tumours. *Arch Path.* **80,** 38 (1965).
17. J. L. Titus and R. G. Shorter, Labelling of human tumours with tritiated thymidine. *Arch. Path.* **79,** 324 (1965).
18. E. H. Cooper, G. L. Frank and D. H. Wright, Cell proliferation in Burkitt tumours. *Europ. J. Cancer* **2,** 377 (1966).

19. H. A. Johnson, W. E. Haymaker, J. R. Rubini, T. M. Fliedner, V. P. Bond, E. P. Cronkite and W. L. Hughes, A radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after *in vivo* uptake of tritiated thymidine. *Cancer* **13,** 636 (1960).
20. R. Baserga, G. C. Henegar, W. E. Kisieleski and H. Lisco, Uptake of tritiated thymidine by human tumours *in vivo*. *Lab. Invest.* **11,** 360 (1962).
21. C. M. Leevy, *in vitro* studies of hepatic DNA synthesis in precutaneous liver biopsy specimens. *J. Lab. clin. Med.* **61,** 761 (1963).
22. H. Coons, A. Norman and A. M. Nahum, *In vitro* measurement of human tumour growth. *Cancer* **19,** 1200 (1966).
23. H. A. Johnson and V. P. Bond, A method of labelling tissue with tritiated thymidine *in vitro* and its use in comparing rates of cell proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of human breast. *Cancer* **14,** 639 (1961).
24. J. R. Rubini, E. P. Cronkite, V. P. Bond and S. Keller, *In vitro* labelling of proliferating tissues and tumours with tritiated thymidine. *J. nucl. Med.* **2,** 223 (1961).
25. F. R. Hendrickson and G. G. Hibbs, Radiation effects on cell cycle dynamics. *Radiology* **83,** 131 (1964).
26. W. Oehlert, P. Dormer and R. Lesch, Autoradiographische Untersuchungen uber die DNS-synthese im uberlebenden Tumorgewebe der Menschen. *Beitr. path. Anat.* **128,** 468 (1963).
27. K. Breur, Growth rate and radiosensitivity of human tumours. I. Growth rate of human tumours. *Europ. J. Cancer* **2,** 157 (1966).
28. V. P. Collins, R. K. Loeffler and H. Tivey, Observations on growth rates of human tumours. *Amer. J. Roentgenol.* **76,** 988 (1956).
29. V. P. Collins, Time of occurrence of pulmonary metastases from carcinoma of colon and rectum. *Cancer* **15,** 387 (1962).
30. L. H. Garland, W. Coulson and E. Wollin, The rate of growth and apparent duration of untreated primary bronchial carcinoma. *Cancer* **16,** 694 (1963).
31. M. Schwartz, A biomathematical approach to clinical tumour growth. *Cancer* **14,** 1272 (1961).
32. J. S. Spratt, The rate of growth of skeletal sarcomas. *Cancer* **18,** 14 (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 389–394. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Kinetics of Cellular Proliferation and Cell Loss in Human Carcinomas

A Discussion of Methods available for *in vivo* Studies

O. H. IVERSEN
Institutt for Generell og Eksperimentell Patologi
University of Oslo, Rikshospitalet, Oslo 1, *Norway*

A CARCINOMA is very seldom built up of epithelial cells only. As soon as the tumour reaches a measurable size, it also contains a stroma with a vascular bed and often nerves. In addition there is regularly some infiltration with lymphocytes, plasma cells and other white blood cells. It is often very difficult to decide if the stroma is a part of the tumour itself, that means a real *neo*formation, or if it is the body's own connective tissue that has been infiltrated with the malignant cells. Pathologists often disagree on this point.

However, when working with the kinetics of tumour growth, it is necessary to make a simplification and to use some sort of model thinking. In this paper only the kinetics of the proliferation of the epithelial malignant cells in a carcinoma are taken into consideration. Actual measurements of *size* of a tumour includes also the stromal part of the tumour, but the available methods for measuring cell *proliferation* give valuable results only with the epithelial tumour cells. When the increase in size of a tumour is compared to the rate of cell proliferation, an error is thus introduced. But it is possible to a certain extent to estimate the size of this error, and at least to estimate its direction. This point will be commented upon in the discussion.

We have been working with the following mathematical model for the size of a tumour. At any moment the mass of a tumour M can be expressed as follows:

$$M = \int_0^t F(t)\mathrm{d}t - \int_0^t G(t)\mathrm{d}t,$$

where M is the mass of the tumour and $F(t)\mathrm{d}t$ is the rate of cell proliferation whereas $G(t)\mathrm{d}t$ is the rate of cell loss. In simple words this says that the mass of the tumour is the net gain of the rate of entry of cells into the tumour over the rate of cell loss. Actual *growth* of a tumour, which means *increase in weight or volume*, occurs when the cell proliferation rate is higher than the rate of cell loss.

In this paper are discussed only the methods available for studies *in vivo*. There are several techniques available for measuring the actual mass or size of a tumour, and also for measuring the rate of cell proliferation. There is, however, at present no good method for measuring the rate of cell loss. This has to be calculated from the two first-mentioned parameters.

First some few words about the problem of medical ethics in these cases. No experiments should be performed if they involve possible danger for the patient and are not to his

benefit. It is of course of great practical and theoretical interest to get a better knowledge of the cell proliferation kinetics of human tumours. It is impossible to give a general rule for cases like these. Each doctor has to make his own decision in each single case. But we should never forget that when working with human beings, one is a physician before one is a scientist.

Methods for measuring the mass or the size of the tumour

This can only be performed after the tumour is clinically visible. The very early, and probably most important, steps in tumour development are impossible to observe, because of the small size of the tumour at that stage. If tumour growth is exponential, there is a relatively long period that has been calculated to be about 30 cell doubling times before a tumour is clinically visible. Thereafter it can sometimes be observed and followed either by direct inspection or X-ray observation. These methods are of course burdened with the general difficulty that as soon as we suspect a tumour to be malignant, the patient is sent to a surgeon to have the tumour removed. The available data on such measurement are therefore not representative for all types of malignant tumours, and very often the first part of the measurements is only the patients own statement about the size of the tumour before it was clinically observed by a doctor.

Direct inspection. This is mostly used on skin tumours, and has been performed in some cases. As an example I can mention here the works of Heite and his school [1] who has tried to measure the growth rate of skin carcinomas and correlate this to the age of the patients. Heck observed very interesting differences between the different types of tumours. Basal cell carcinomas grew with decreasing speed with the age of the patient, whereas squamous cell carcinomas grew with higher speed the elder the patients were.

X-ray observation is often used and almost all the papers on this item refer to the measurements of pulmonary metastases from tumours [2, 3]. Often such tumours are not suited for surgical therapy, and it has thus been possible to follow many tumours and metastases in the lung by radiological examination. Different types of calculation have been employed. Using a special roentgenological technique in the large bowel a group of workers [4] also tried to estimate the growth rate of papillomas and carcinomas in the colon. The common results of all these investigations are that when tumour increases in size, it follows an exponential growth curve or a modified exponential growth curve. It is also a fact that the doubling times varies considerably between different types of tumours. The fastest growing tumours have been found to have a doubling time of 7 to 8 days, and slowly growing tumours have been found with doubling times up to 300 days [5]. If values from many investigations are taken together, the average doubling time of human carcinomas or metastases of carcinomas in the lung seems to be in the region of 50–100 days.

Growth rate of human tumour can also be estimated from different types of *clinical information*, for instance the time period that elapses between the first symptom that was felt by the patient, and the time for diagnosis, the so called *delay* [6]. This has often been studied and the results are always the same, viz: the shorter the delay, the faster grows the tumour, and the worst the prognosis. Such informations, however, can only give very inaccurate estimates of the growth rate of human tumours. The only reliable information has come from direct inspection and X-ray observations.

Methods used for measuring cellular proliferation

All these methods require a biopsy, but a biopsy is always necessary to get a correct and reliable tumour diagnosis.

It was long thought that the mitotic count or the number of tritiated thymidine labelled cells were reliable methods for measuring the rate of cell proliferation in a tissue. This was based on the assumption that the time for DNA synthesis and the mitotic duration remained relatively constant in each cell type in each species. During periods of varying rates of cell renewal only the intermitotic phase was assumed to be varying. It can now be stated definitely that such an assumption is not valid. Both DNA synthesizing time and mitotic duration may vary considerably.

It is thus evident that the mitotic index or the mitotic count is not a measure of the rate of cell proliferation, unless we know the mitotic duration. To measure the mitotic rate we must then rely upon a stathmokinetic method using for instance colchicine, Colcemid or one of the vinca-alcaloids. Such a method is not perfect, and used in man it has many difficulties, but used properly it can give an estimate of the mitotic rate. Ideally one should follow the increase in mitotic count at different time intervals after the injection of the stathmokinetic substance. It would be best to have

values 1, 2, 3, 4 and 5 hr after the injection, and use the straight line increase in the mitotic count. For different tissues and different rates of proliferations the Colcemid-effect fades off after 4, 5, or 6 hr, and this has to be investigated in each case. The tangent of the angle between the straight part of the line and the abscissa is the rate of entry of cells into mitosis, which can be accepted as an estimate of the rate of cellular proliferation.

To find the mitotic duration one must also measure the mitotic count without using Colcemid. The relationship between the mitotic count and the mitotic rate and duration is as follows: Mitotic count (without Colcemid) = Mitotic rate (with Colcemid) × Mitotic duration. Mitotic rate is here defined as the number of cells dividing per time unit per given number of cells. With such a method it is possible to find both the mitotic rate and the mitotic duration. The mitotic duration may vary widely. Generally it seems to be short when the proliferation rate is high, and long when the proliferation rate is low. There is some evidence now pointing to the fact that a high mitotic count in some tumours is mainly due to long mitotic duration and not to a high rate of cell proliferation [7].

When the stathmokinetic method is to be used in humans one must first have a biopsy of a representative part of the tumour without pretreatment with Colcemid. From this one can determine the mitotic index, which is the number of visible mitoses per 1000 tumour cells. Thereafter the patient must be given one single intravenous injection of 10 mg Colcemid. When the patient is more than 60-years-of-age and has a malignant tumour, we consider the possible danger of one single injection of 10 mg Colcemid to be so small that it is justified to do such investigations. We inject Colcemid before the radical operation when the whole tumour is to be removed. In this way the patient is not subjected to more surgery than is necessary for the diagnosis and the treatment of his tumour. We try to use 4 hr between the injection of Colcemid and the expected fixation of the specimen.

This type of investigation is really difficult, especially the mitosis counting. The first obvious fact is that different areas of the tumour have very different accumulations of Colcemid-arrested mitoses, which may mean that the local proliferation rates in different areas of the tumour are fluctuating within wide limits. The consequence of this is that one has to count very many cells to get a good average from each tumour, or one has to work with selected group values from different areas of the tumour.

Dr. Sigvald B. Refsum d. y. in cooperation with professor Peter Berdal at the clinic of oto-laryngology at the Rikshospitalet, Oslo, has tried to measure the rate of cell proliferation in 61 patients with malignant tumours in different sites [8].

As some of the biopsy specimens and most of the surgical specimens also contained normal or hyperplastic epithelium, and epithelial glands, and even some cases with areas that could be defined as "carcinoma *in situ*", we had the opportunity to count the average rate of proliferation in such areas. The results were as follows: The number of arrested mitoses per 1000 cells per hour was in mucous gland 0·5, in cylindrical and squamous epithelium of the larynx and trachea 4·8, in hyperplastic epithelium 10, in "carcinoma *in situ*" 12·8, and in infiltrating carcinomas 12·7. It can thus be concluded that the rate of cell proliferation on the average seems to be higher in hyperplastic epithelium and in carcinomas than in normal tissue. Another characteristic feature is, however, that the variation in different areas in the tumours was much greater in carcinomas than in normal epithelium. Most of the carcinomas proliferate at a somewhat faster speed than normal epithelium. We have also tried to estimate the mitotic duration, and it may vary considerably in the different tumours and in the different areas of the tumours, the values found being between 1 and 3·5 hr. Generally the mitotic duration was shorter in the fast proliferating tumours. We can conclude that the mitotic count alone is not a reliable measurement of the growth rate of a tumour.

Another possible method of measuring the rate of cell proliferation *in vivo* is to inject tritiated thymidine into the patient, and determine the uptake of this label, mostly by autoradiography. This has been performed both by the intravenous route [9–12] and by local injection in an area close to a skin disease [13]. The first method, to inject tritiated thymidine intravenously into a patient is very expensive and possibly dangerous to the patient. It has only been performed on patients that have very advanced tumours. These tumours may be in a state of slow growth because of the deteriorated condition of the patients. The other method is less expensive, and less dangerous for the patients.

The measuring of the number of labelled cells after one single injection of tritiated thymidine and autoradiography is, however, open to the same type of criticisms as is the

mitotic count. The labelling index is also dependent upon the duration of the DNA Synthesis phase. The labelling index is better than the mitotic count, because the time for DNA synthesis is longer than the mitotic duration. Ideally one should do two injections with about 1 hr interval and take two diopsies, and in this way measure the increase in number of labelled cells during this hour. This would have given a direct measure of the proliferation rate as expressed by the number of cells entering into DNA Synthesis phase per hour per given number of cells.

The general results of the investigations performed hitherto seem to be the same as those obtained by the Colcemid method. Tumours may proliferate at very different rates in different areas of the same tumour, and in different patients. It is thus necessary to count very many cells to get a good average from each tumour or to work with smaller localized accumulation of cells within each tumour. Even these investigations have shown that malignant tumours do not necessarily proliferate faster than the mother tissue from which they have emerged.

Before leaving the methods for measurements of cellular proliferation, I also mention with a few words that some biochemical signs like the Crabtree-effect, the anaerob glycolysis, the anaerob proteinsynthesis, the incorporation of uridine etc. have been tested, but they are all on the borderline between *in vivo* and *in vitro* methods [14–17].

Finally the discrepancy that exists between the rates of cell proliferation found with the Colcemid method and the actual rate of tumour growth as observed directly will be discussed. If the proliferative pool of a tumour comprises all epithelial cells, then it is possible to *calculate* the doubling time in days from the different proliferation rates found. In our 61 tumours we have found an average proliferation rate of 12·7 per 1000 cells per hour which would mean a clinical doubling time of only 2·3 days. This is obviously not consistent with the clinical facts. If we use the values given in the literature, the average doubling time of malignant tumours should be about 70 days. This discrepancy, which is in conformity with the results from all other studies, must be explained either by errors in the methods, or by assuming a high rate of cell loss from the tumours. If the stroma is taken into consideration as regards the actual size of the tumour, this discrepancy becomes even higher. One of the first possible errors is of course uncertainty in the countings and the fact that we do not know how large the proliferative pool is. However, if the cell loss exists, and this cell loss is proportional in the dividing and the nondividing pool of cells, such an error does not interfer with the calculations. Only if the cell loss from the nondividing pool is great, and from the dividing pool is very small, a considerable error can be introduced.

We have been considering different possible ways of cell loss from a tumour. If the tumour is located on the surface, a great cell loss by exfoliation can occur. We also know that many tumour cells have amoeboid movements and move through the walls of the vessels into the blood and the lymph stream. Very often there also is hypoxia with necrosis in a tumour, and there may be toxic substances destroying cells in tumours. It may also be a fact that some tumours produce cells that lack essential enzyme-systems or have other defects not consistent with normal cellular life, so that these cells die and are phagocytized by neighbouring cells. Cytolysis caused by immunological mechanism and by aggresive phagocytosis from neighbouring cells is also a possibility, and then of course the formation of cells that are polyphoid and stop dividing.

If we use the model for growth of a tumour as stated in this paper, and if we make the assumption that the proliferation values found are representative as an average, we are forced to the conclusion that there is from any malignant tumour hitherto measured by the Colcemid method or by the tritiated thymidine method a considerable cell loss which amounts to between 95 or 99 per cent of the rate of cell proliferation. Of course this is not peculiar. In the renewing cell populations there is a continuous high rate of cell renewal and cell loss. *The cell loss is, however, both in the renewal and in the stable cell populations* 100 *per cent of the cell proliferation. In a tumour the cell loss is a little reduced.* It is only 95 to 99 per cent of the cell renewal, and in this way the tumour size increases.

We do not know if this really has something directly to do with malignancy or not. Traditionally one has conceived of cancer as a tissue that grows faster than the tissue of origin. It might be interesting to think of a malignant tumour as a tissue that has a slightly reduced cell loss.

RESUME

Les méthodes actuelles pour mesurer la vitesse de croissance réelle, ainsi que la vitesse de la prolifération des tumeurs malignes humaines in vivo, *sont présentées et discutées. Les résultats de ces études montrent une grande différence entre les deux paramètres. Cette différence peut être expliquée par l'existence d'une mortalité cellulaire importante. Les diverses possibilités de cette élimination cellulaire sont discutées. Les tissus normaux prolifératifs ont une mortalité cellulaire équivalant à* 100% *de la régénération cellulaire. Les tumeurs ont une mortalité cellulaire diminuée.*

SUMMARY

The available methods for the measurement of growth rate and rate of cellular proliferation in human malignant tumours in vivo *are described and discussed. The results from such investigations show a great discrepancy between the two parameters. This discrepancy must be explained by a continuous cell loss from tumours. Possible ways of cell loss are discussed. Normal renewing tissues have a cell loss which is* 100 *per cent of the cell renewal. Tumours have a reduced cell loss.*

ZUSAMMENFASSUNG

Die üblichen Methoden der Bestimmung des Zellwachstums und der Zellproliferation bei menschlichen malignen Tumoren in vivo *werden beschrieben und diskutiert. Die Ergebnunisse dieser Untersuchung zeigen eine große Diskrepanz der beiden Parameter. Diese kann nur durch einen ständigen Zellverlust des Tumors erklärt werden. Die möglichen Wege dieses Zellverlustes werden diskutiert. Normales Erneuerungsgewebe hat einen Zellverlust von* 100% *der Zellerneuerung. Tumoren haben einen verringerten Zellverlust.*

REFERENCES

1. M. I. Heck, Uber die Kollektiveigenschaften des Basalioms und des Carcinoma spinocellulare im Lichte einer retrospektiven Datenanalyse. Dissertation am Albert-Ludwigs-Universitat zu Freiburg (1966).
2. K. Breur, Growth rate and radiosensitivity of human tumours — I. Growth rate of human tumours. *Europ. J. Cancer* **2,** 157 (1966).
3. K. Breur, Growth rate and radiosensitivity of human tumours — II. Radiosensitivity of human tumours. *Europ. J. Cancer* **2,** 173 (1966).
4. S. Welin, J. Youker and J. S. Spratt, The rates and patterns of growth of 375 tumors of the large intestine and rectum observed serially by double contrast enema study (Malmø technique). *Amer. J. Roentgenol.* **90,** 673 (1963).
5. G. G. Steel and L. F. Lamerton, The growth rate of human tumours. *Brit. J. Cancer* **20,** 74 (1966).
6. R. Sutherland, *Cancer. The Significance of Delay.* Butterworth, London (1960).
7. A. Evensen and O. H. Iversen, Rate of cell proliferation in a mouse squamous cell carcinoma. *Nature (Lond.)* **196,** 383 (1962).
8. S. B. Refsum and P. Berdal, Cell loss in malignant tumours in man. *Europ. J. Cancer* **3,** 235 (1967).
9. E. M. Malaise, E. Frindel and M. Tubiana, Cinetique de la prolifération cellulaire de deux tumeurs humaines étudiées grâce à l'injection de thymidine tritiée. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, Série D 264, 1104 (1967).
10. H. A. Johnson, W. E. Haymaker, J. R. Rubini, T. M. Fliedner, V. P. Bond, E. P. Cronkite and W. L. Hughies, A Radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after the *in vivo* uptake of tritiated thymidine. *Cancer* **13,** 636 (1960).
11. H. A. Johnson, J. R. Rubini, E. P. Cronkite and V. P. Bond, Labeling of human tumor cells *in vivo* by tritiated thymidine. *Lab. Invest.* **9,** 460 (1960).
12. P. Kissel, A. Duprez, M. Bessot, J. Schmitt and A. Dollander, Autoradiography *in vivo* of human cancers. *Nature (Lond.)* **210,** 274 (1966).
13. Ph. Frost, S. D. Weinstein and E. J. Van Scott, The ichthyosiform dermatoses. II. Autoradiographic studies of epidermal proliferation. *J. invest. Derm.* **47,** 561 (1966).
14. I. J. Bickis and I. W. D. Henderson, Biochemical studies of human tumor. I. Estimation of tumor malignancy from metabolic measurements *in vitro*. *Cancer* **19,** 89 (1966).

15. H. De Roetth, Chemical characteristics and varying degrees of malignancy in tumors of the human ovary. I. Oxygen consumption and lactic acid production. *Cancer Res.* **17,** 833 (1957).
16. R. A. L. Macbeth and J. G. Bekesi, Oxygen consumption and anaerobic glycolysis of human malignant and normal tissue. *Cancer Res.* **22,** 244 (1962).
17. W. H. Wolberg and R. B. Brown, Autoradiographic studies of *in vitro* incorporation of uridine and Thymidine by human tumor tissue. *Cancer Res.* **22,** 1113 (1962).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 395–403. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

The Role of Prophylactic Castration in the Therapy of Human Mammary Cancer

R. NISSEN-MEYER
The Norwegian Radium Hospital, Oslo
Norsk Hydro's Institute for Cancer Research, Oslo, Norway

INTRODUCTION

THE RESULTS of breast cancer treatment at The Norwegian Radium Hospital during the years 1932–1951 was reported by Rennaes [1]. This series included a total of 2671 patients, with a 5-year crude survival rate of 46·2 per cent. 1981 patients (74 per cent of the total number) were classified as stage I or II, with a 5-year crude survival rate of 59·2 per cent.

Nissen-Meyer [2] reported the treatment results in a new series from the same hospital including all patients having their first treatment during a 6-year period 1957–1963. The total of 1442 cases in this series had a 5-year crude survival rate of 63·0 per cent. 1129 patients (78 per cent of the total number) were classified as stage I or II, with a 5-year crude survival rate of 71·8 per cent.

The 5-year survival rates in the first series were of good average standard, compared with the results reported from other centres. In the new series the 5-year crude survival rates are considerably better. In view of the striking similarity of all "end-results" of breast cancer treatment reported during the last 30 years, this improvement seems remarkable, and it is natural to look for a possible explanation.

First, however, we have to analyze the nature of the observed improvement. The calculation of 5-year crude survival rates only seems insufficient for this purpose. In Fig. 1 are shown the complete survival curves for the combined stage I and II from the old and from the new series. It is seen that during the first 4 years the curves are steadily diverging from each other, in favour of the new series. After 5 years, however, the gap between them narrows again more and more. This indicates that the increased 5-year survival rate does not reflect an increased cure rate, but only an increased survival of the cases not cured. The curve from the new series seems thus to be a typical "delay-curve". A further analysis reveals that the curve from the new series fits nearly exactly with a theoretical curve constructed under the assumption that 35 per cent of the recurrence patients in the old series had their survival prolonged with 4 extra years.

This seems, in fact, to be the difference between the treatment results in these two series: an increase in survival time about 4 years for about 35 per cent of the patients who were not cured by the mastectomy. The ultimate cure rate seems not to be increased.

Is it possible to explain such a difference as a result of a change in treatment methods? The surgical and radiological treatment methods were virtually unchanged from 1932 to 1963 (a radical Halsted's mastectomy and postoperative local irradiation). In the second series, however, endocrine treatment, including "prophylactic" castration, was systematically used. We may put forward the hypothesis that the observed increased survival length is mainly due to the systematic use of endocrine treatment and will in the following discuss if the "prophy-

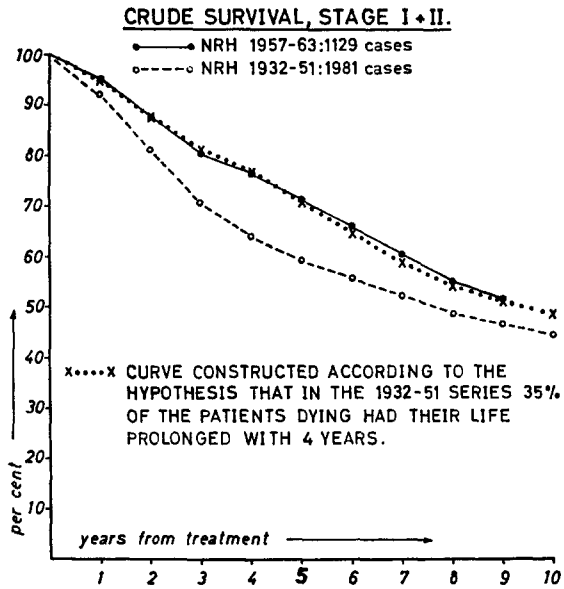


Fig. 1. Comparison of the total old and new series of operable breast cancer patients.

lactic" castration may have played a major role.

MATERIAL AND METHODS

During the 6-year period from 22.XI.1957 to 31.XII.1963 all histologically verified cases of breast cancer admitted to the hospital were registered for a prospective study of the effect of endocrine treatment. A total of 1129 patients were classified as stage I and II, and formed the case material for a study of "prophylactic" vs. "therapeutic" castration. The primary endocrine treatment was as follows: 605 patients received primary ovarian irradiation, whereas primary oophorectomy was performed in 74 patients. The rest, 450 patients, had no primary castration, but castration was planned to be performed as soon as possible if recurrences were diagnosed.

Four hundred and forty-eight of these patients were included in controlled clinical trial series with random allocation between treatment groups.

If recurrences were diagnosed, prednisone treatment (2·5 mg four times daily) was given as soon as possible, in order to depress the pituitary-adrenocortical function.

In a previous publication [2] full details are given about the composition of the groups of patients discussed in the present paper, as well as about the treatment methods, the criteria, and the statistical methods used.

The urinary excretion of oestrone was determined by the method of Brown and Blair [3], pregnanediol by the method of Klopper *et al.* [4], and pregnanetriol by the method of Fotherby and Love [5].*

The choice of patients for the steroid excretion study and the reliability criteria of the methods in our laboratory have been discussed in a previous paper [6].

RESULTS

(I) *Premenopausal patients*

(*a*) *Patients with a relatively good prognosis.* A controlled clinical trial was found ethically justified in 161 cases of good-risk premenopausal patients (before a patient was included in this trial, the prognosis was estimated, based not only on the stage, but also on the site of the tumour in the breast and on the malignancy grading. Included in the trial were only patients with a good prognosis and without serious contra-indications against a primary castration). These 161 patients were allotted at random to one group with ovarian irradiation immediately after the radical mastectomy, and one control group where ovarian irradiation was planned as soon as recurrences were diagnosed. The results in this trial are shown in Fig. 2. The difference in rates free of disease seven years after mastectomy is to-day just short of statistical significance.

A total of 217 premenopausal patients were classified as *stage I.* Of these 112 had primary castration, 105 had not. The results in these two groups are shown in Fig. 3. The trend is just the same as in the smaller, randomized

*This part of the study has been made in collaboration with Dr. T. Sanner, who was responsible for the laboratory work. A more detailed report is in preparation.

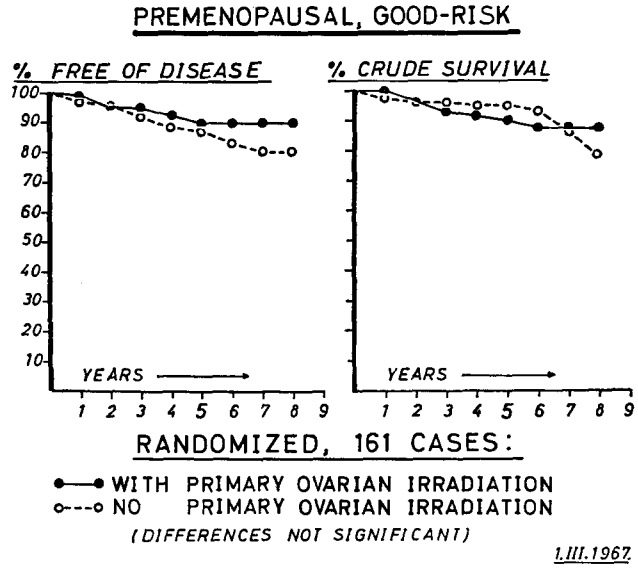


Fig. 2. Ovarian irradiation versus *control, premenopausal patients with good prognosis.*

series: There is a difference in rates free of disease developing after 4 years, in favour of the treatment group, whereas the difference naturally seems to develop later in the crude survival rates. In the treatment group 3 patients died from causes unrelated to breast cancer. With these included, the 5-year survival rate was 89·8 per cent, the 5-year rate free of recurrences was 90·9 per cent.

(*b*) *Patients with a relatively poor prognosis.* When our study started in 1957, we found it so likely that such patients would benefit from a primary castration, that we would, for ethical reasons, not start a clinical trial with an untreated control group in this category of patients. We decided to let all the young patients with a poor prognosis have the chance of a primary castration, if no serious contraindication against this treatment was found.

We have therefore no control group in this category, but can only report the results in the total group of 201 premenopausal patients in *stage II.* All but eight were primarily castrated.

The 5-year crude survival rate was 70·2 per cent, the 5-year rate free of recurrences was 60·4 per cent. The results are graphically shown in Fig. 3.

(*II*) *Postmenopausal patients*

In Fig. 4 are shown the results of a controlled clinical trial including 80 cases in stage I and 95

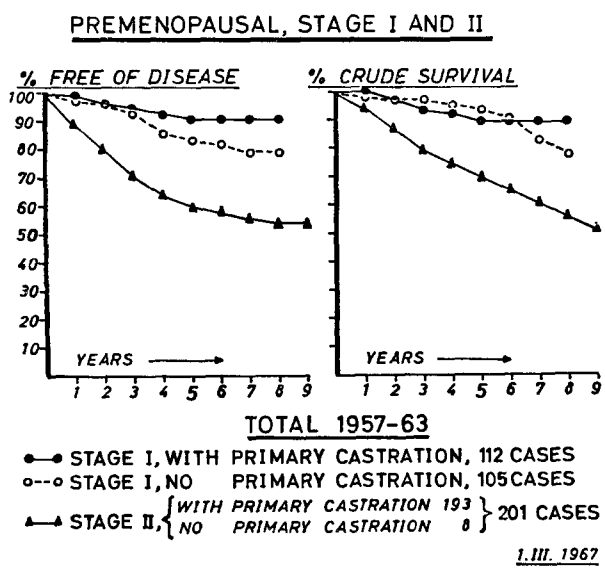


Fig. 3. Premenopausal patients, new series, stage I and stage II.

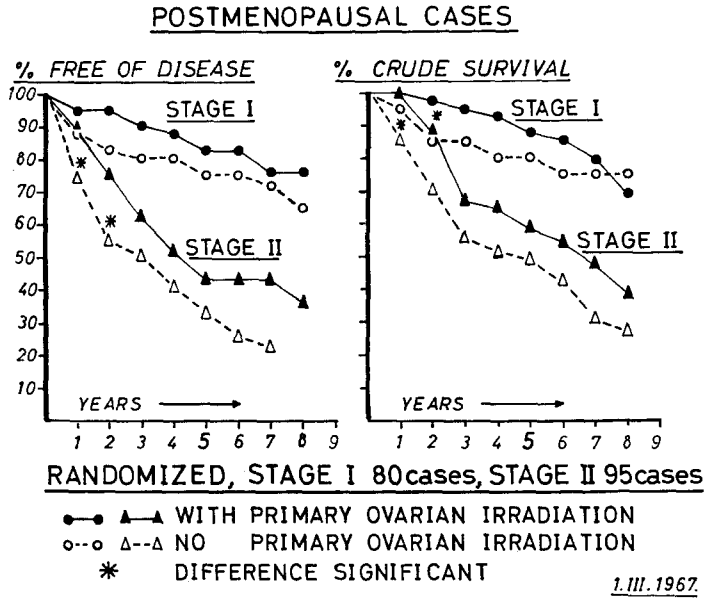


Fig. 4. Ovarian irradiation versus *control, postmenopausal patients.*

cases in *stage II*, with random allocation between one group with primary ovarian irradiation and one control group where ovarian irradiation was postponed until diagnosis of recurrences. The results were definitely in favour of the treatment groups, both in terms of years free of disease and in terms of crude survival. As indicated by the asterisks, the difference has statistical significance. All patients were at least 6 months past their natural menopause, the average age in the series was 60 years.

One might ask if the results found in this postmenopausal series were mainly due to the cases only some few years past the menopause. As shown in Fig. 5 this is not the case. Also in the 89 cases more than 60-years-old a significant difference in results was found.

Already less than 4 years after start of the study, it was clear that the ovarian irradiated group of the postmenopausal patients did significantly better than the control group, and we had found no distressing side-effects of the treatment. According to the ethical rules of controlled clinical trials, we decided to stop the allocation of new cases, and continued with primary ovarian irradiation to all new postmenopausal patients up to the age of 70 years. The primarily castrated groups have thus been increased to 342 cases. As shown in Fig. 6, the favourable results are kept unchanged. The

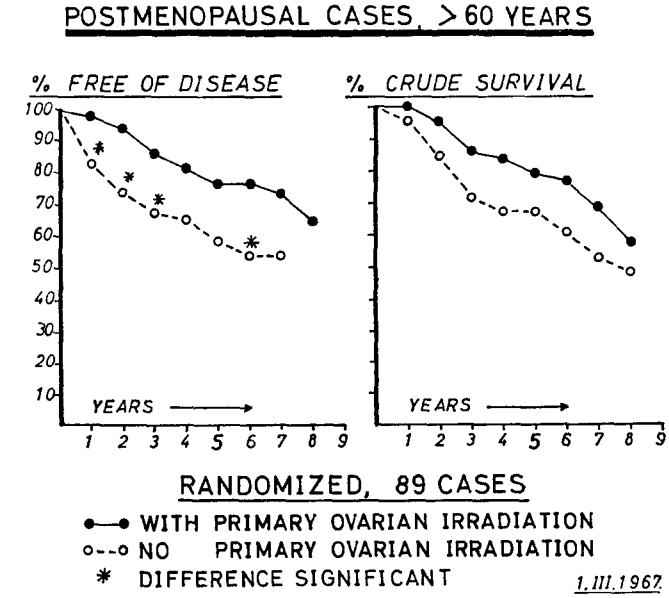


Fig. 5. Ovarian irradiation versus *control, postmenopausal patients* > 60 *years.*

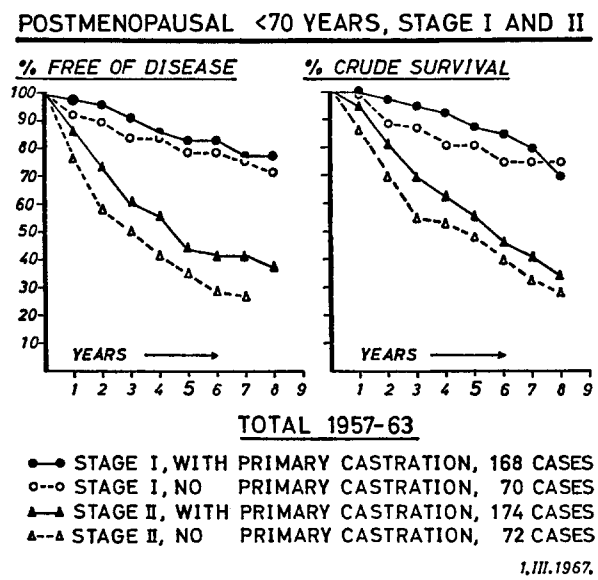


Fig. 6. *Postmenopausal patients* < 70 *years, new series,* stage 1 *and* stage II.

crude 5-year survival rate was 87·9 per cent for *stage I,* 55·5 per cent for *stage II.*

Comparison of oophorectomy and ovarian irradiation

The relative merits of these two methods of castration were compared in a controlled clinical trial with blind randomization of the cases. For this trial premenopausal patients with a poor prognosis were chosen. As shown in Fig. 7, no significant differences in results were found. The trend was slightly in favour of the radiological way of castration, but this may be due to chance alone.

Steroid excretion studies

The clinical study was combined with a study of the urinary excretion of some steroid metabolites during the different stages of the treatment. We have especially looked for a possible explanation for the clinical effect of ovarian irradiation in the postmenopausal women. In Fig. 8 are shown the average excretion values of oestrone, pregnanediol and pregnanetriol in the following three groups of patients: (A) patients with a spontaneous menopause only, (B) patients with oophorectomy or ovarian irradiation, and (C) postmenopausal patients on cortico-steroid treatment (prednisone 2·5 mg four times daily). In group B the excretion of all three steroids decreases slowly with increasing age. In group A, however, the excretion of oestrone is considerably higher in the groups under 50 years and

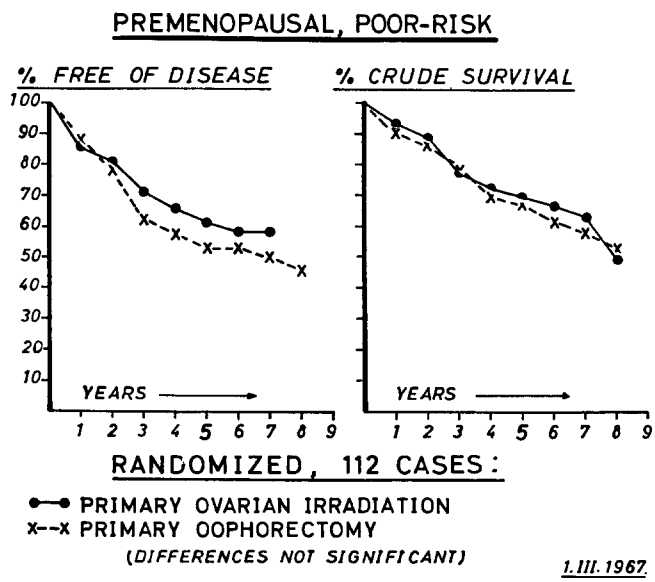


Fig. 7. *Oophorectomy* versus *ovarian irradiation.*

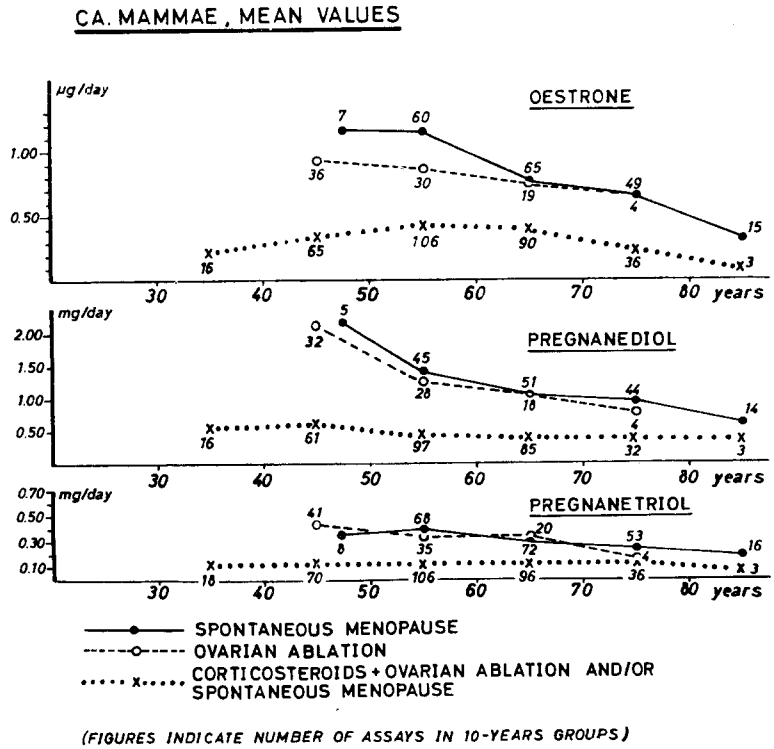


Fig. 8. Urinary excretion of oestrone, pregnanediol and pregnanetriol. Mean values in groups of breast cancer patients in relation to age and endocrine treatment.

between 50 and 60 years. A slight trend in the same direction is seen in the excretion of pregnanediol.

When prednisone treatment was given to patients with a spontaneous or artificial menopause, the excretion of all three steroids dropped to very low values.

Only in 12 cases we had the opportunity of measuring the steroid excretion in the same postmenopausal patients twice, before and after ovarian irradiation. The average age of this small group of patients was 56·3 years, the range between 51 and 62 years. The excretion of oestrone decreased at an average from 1·02 to 0·67 µg/day, the excretion of pregnanediol from 1·94 to 1·29 mg/day. The excretion of pregnanetriol seemed not to be influenced by ovarian irradiation.

DISCUSSION

The expression "prophylactic" castration is not adequate. We do not expect the castration to prevent recurrences, but perhaps to delay recurrences, and also perhaps to prolong total survival in the cases not cured by the primary surgical and radiological treatment. "Primary" castration is a more appropriate term. However, the term "prophylactic" castration has been widely used as opposed to "therapeutic" castration, which means a castration performed when the patient has developed clinically significant metastases.

The possible effect of a "prophylactic" castration may only be evaluated by statistical methods in large groups of patients. If the relative merits of "prophylactic" and "therapeutic" castration shall be compared, a "therapeutic" castration should be performed if and when recurrences occur in the control group (logically, however, cases where "therapeutic" castration was planned, but could for one reason or other not be performed before the patient died, shall *not* be excluded from the control group). All other treatment, primary surgical and radiological treatment as well as palliative treatment in recurrence cases, has to be kept as standardized as possible in both groups. This has been done in the present study.

Since we want to study the possibility that a primary endocrine treatment might decrease the speed of tumour growth, we are not only interested in comparing the survival rates at one arbitrarily chosen time, such as the 5-year survival rates. Our primary interest is to compare the time free of symptoms and the total survival time in the recurrence cases of two groups. An estimate of the difference in total survival time is easily obtained in the following way: We simply add the differences of the survival rates (counted as a percentage) of the

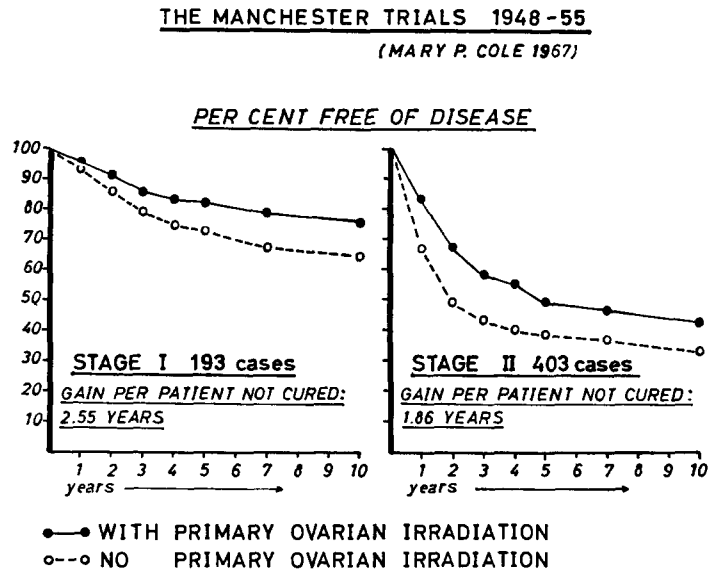


Fig. 9. *Results from the controlled clinical trial performed at the Christie Hospital in Manchester* 1948–55.
Ovarian irradiation versus *control, premenopausal patients.*

two groups after 1, 2, 3 etc. years for the total follow-up time. This will give the difference in total years of life in a group of 100 patients. These extra years of life are, however, only obtained by the patients eventually dying. If this difference in total years of life per 100 patients is divided by the highest cumulative percentage deaths in the series, an estimate is obtained of *the gain in years of life per recurrence patient.* In just the same way an estimate is obtained of *the gain in years of symptomfree life per recurrence patient.*

In the randomized series of the present study we found a statistically significant difference in results in the postmenopausal patients up to the age of 70 years, in favour of the groups with primary ovarian irradiation.

In the randomized series of premenopausal patients with a relatively good prognosis, there was also a difference in rates free of disease in favour of the group with primary castration. This difference is to-day just short of statistical significance. However, in this category of patients the disease is progressing very slowly, and it will necessarily take many years before a possible effect in the treatment group may be demonstrated. It will necessarily take still more years before a possible effect may be demonstrated in the crude survival rates. We cannot yet consider the evaluation of this part of the trial as terminated.

We have no randomized series for the evaluation of primary castration in the series of premenopausal patients with a relatively poor prognosis (*stage II*).

During the years 1948 to 1955 a controlled clinical trial of the value of "prophylactic" ovarian irradiation was performed at The Christie Hospital in Manchester. The 10 years follow-up results were presented at the "First Tenovus Symposium on Factors Influencing Prognosis of Breast Cancer", held in Cardiff 12th–14th April 1967. With kind permission of Dr. Mary P. Cole the rates free of disease are graphically shown in Fig. 9. The patients were allotted at random to a treatment and a control group. They were premenopausal or within two years of the menopause. Both in *stage I* and in *stage II* the difference in results was definitely in favour of the treatment group. In *stage II* this difference was statistically significant, in *stage I*, after seven years, it was just short of statistical significance. However, the validity of the observed favourable result in premenopausal patients in *stage I* is increased when the results of the Manchester and the Oslo trials are seen together.

In the Manchester trials the endocrine treatment after diagnosis of recurrences was not kept standardized and equal in the two groups. For this reason only the rates free of disease seem comparable with the results of the Oslo trials.

The statistically significant results obtained by ovarian irradiation in the group of postmenopausal women up to the age of 70 years are somewhat surprising.

The clinical observations are, however, supported by the observations made in the steroid excretion studies. When these pieces of evidence

Table 1. *Estimates of differences in years free of clinical disease and years of life, expressed as extra years per patient not cured by the mastectomy*

	Years free of disease	Total years of life
"Prophylactic" *versus* "Therapeutic" castration		
Premenopausal patients:		
Stage I, Oslo trials	2·12	0·23
Stage I, Manchester trials	2·55	
Stage II, Oslo trials	(no control group)	
Stage II, Manchester trials	1·86	
Postmenopausal patients:		
Stage I, Oslo trials	1·16	1·70
Stage II, Oslo trials	1·25	0·99
NRH 1957–63 *versus* NRH 1932–51 series		
Stage I+II, all age groups		1·40

are put together, we are left with the following conclusions:

(1) After the natural menopause the ovaries may continue to produce hormones, in some cases probably for more than 10 years,

(2) this ovarian function may, in some cases, stimulate the growth of breast cancer tissue, and shorten the life of the patient,

(3) ionizing irradiation may suppress this ovarian function.

The results of the statistical analyses are summarized in Table 1. From these observations we may deduce that primary ovarian irradiation reduces the growth rate of the tumour tissue in the patients not cured by the primary treatment, and that it does so already from the time of the radical surgery on. Thereby the average time free of symptoms in the recurrence cases is prolonged with about 2 years in the premenopausal patients, and with about 1·2 year in the post menopausal patients. From the series of the present study it is still too early to draw definite conclusions about the interval between diagnosis of recurrences and deaths. However, the total survival time is also longer in the groups with primary castration, both in the Oslo and the Manchester trials, with about the same difference as the difference in time free of disease. We may draw the preliminary conclusion that the interval between recurrences and death is about the same regardless if the castration was performed "prophylactically" or "therapeutically".

For the patient who is not cured by the primary treatment and who will ultimately die from her disease, the interval free of symptoms is certainly much more worth than the time after recurrences are diagnosed, when she knows the consequences. If we could ignore the side-effects of an ovarian irradiation, there would be no doubt that "prophylactic" castration was superior to "therapeutic" castration. The side-effects can, however, not always be ignored. It is the duty of the doctor in charge of the patient in each single case to consider the prognosis, the possible effect and the side-effects of a primary ovarian irradiation, and to give his advice if such treatment should be given.

RESUME

L'irradiation "primaire" des ovaires — auteurs préfèrent ce terme è celui d'irradiation "prophylactique" — ralentit la croissance du tissu tumoral dans les cas de cancer du sein avec récidive. L'intervalle sans séjour de maladie est, en moyenne, allongé d'environ 2 ans chez les patientes préménopausiques, et d'environ 1, 2 an chez les patientes postménopausiques, jusqu' à l'age de 70 ans. Cette observation, dans le groupe postménopausique, est appuyée par les résultats de l'étude de l'excretion dés stéroides urinaires.

Le temps de survie total est plus long dans le groupe des patientes traitées par castration "prophylactique" que dans le groupe traité par castration "thérapeutique".

SUMMARY

Primary ovarian irradiation is found to reduce the growth rate of the tumour tissue in the recurrence cases. The interval free of disease is at an average increased with about 2 years in premenopausal patients, with about 1·2 year in postmenopausal patients up to the age of 70 years. The observation in the postmenopausal group is supported by the results of a study of the urinary steroid excretion.

Total survival time was also longer in the groups with "prophylactic" castration compared with the groups with "therapeutic" castration.

ZUSAMMENFASSUNG

Ovarialbestrahlung als Zusatzbehandlung bei der Radikaloperation des Brustkrebses reduziert die Washstumsgeschwindigkeit des Tumorgewebes in den Rezidivällen. Das Interval ohne Krankheitssymptome wird damit verlängert, durchschnittlich mit ungefähr 2 Jahren bei Premenopausepatientinnen, 1, 2 Jahren bei Postmenopausepatientinnen bis zum 70-Jahres Alter. Die Beobachtung des klinischen Effektes in der Postmenopausegruppe wird durch die Resultate einer Steroidanalysestudie unterstützt.

Die totale Überlebenszeit war auch länger in den Gruppen mit "prophylaktischer" Kastration als in den Gruppen mit "therapeutischer" Kastration.

REFERENCES

1. S. Rennaes, Cancer of the breast in women, a clinical and statistical investigation of the material at the Norwegian Radium Hospital 1932–51. *Acta chir. scand.* Suppl. 266 (1960).
2. R. Nissen-Meyer, Castration as part of the primary treatment for operable female breast cancer. A statistical evaluation of clinical results. *Acta radiol. (Stockh.)* Suppl. 249 (1965).
3. J. B. Brown and H. A. F. Blair, A method for the determination of very small amounts of oestrone in human urine. *J. Endocr.* **20,** 331 (1960).
4. A. Klopper, E. A. Michie and J. B. Brown, A method for the determination of urinary pregnanediol. *J. Endocr.* **12,** 209 (1955).
5. K. Fotherby and D. N. Love, A modified method for the estimation of pregnanetriol in urine. *J. Endocr.* **20,** 157 (1960).
6. R. Nissen-Meyer and T. Sanner, The excretion of oestrone, pregnanediol and pregnanetriol in breast cancer patients. *Acta endocr. (Kbh.)* **44,** 325 (1963).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 405–416. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Chemicals and Environmental Carcinogenesis in Man

DAVID B. CLAYSON

The Department of Experimental Pathology and Cancer Research
The School of Medicine, Leeds, 2

IT HAS been suggested that four out of every five cancers in man have their origins in the environment. The environmental agents which lead to these tumours are still largely unknown and, in this paper, an attempt will be made to discuss carcinogenesis in man from the viewpoint of the soundness and the relevance of the evidence. This evidence consists of epidemiological surveys and animal experiments. No attempt will be made to list every carcinogenic factor which is known, or thought, to act in man.

(1) *Evidence for individual factors acting in man*

A well conducted animal experiment is the most convincing way in which the carcinogenic action of a substance may be demonstrated. Such an approach is not permissible in man. However, the more closely the information gathered by an epidemiological investigation attains to that which would have been obtained in a direct experiment, the greater is the confidence in the conclusions. Ideally a number of populations is required receiving known exposures to the suspected substance and of which the previous history can be sufficiently accurately determined to ensure that a matched control population can be assembled. This enables the effects of exposure to other potentially carcinogenic factors to be excluded. Such "pseudo-experimental" exposures in man are rare and are confined to patients receiving certain therapeutic agents or to workpeople in a number of occupations.

The use of chlornaphazin (2-bis(2'-chloroethyl)aminonaphthalene) in the control of *polycythaemia vera* is a recent and excellent example of a "pseudo-experimental" exposure (Table 1). Thiede *et al.* [1] followed up 61 patients who had received the drug; 20 of these received more than 100g and 8 more than 175g. Seven of the patients who had received more than 100g developed carcinoma of the bladder with a latent period, to diagnosis, of from 2 to 11 years (mean 5 years). This incidence is much higher than would be expected in the general population. Thiede produced evidence that *polycythaemia*, of itself, did not lead to bladder cancer. Also, although 6 of the 7 patients with bladder cancer had received P^{32} as well as chlornaphazin, he was able to show that P^{32} did not lead to bladder cancer in *polycythaemia* patients. It must, therefore, be concluded that chlornaphazin, as might be expected from its chemical relationship to 2-naphthylamine, is a potent bladder carcinogen in man.

Further examples of therapeutic and industrial exposures of man to carcinogens are given in Tables 2, 3 and 4. The evidence in many of the examples is good, but not quite as good as in the case of chlornaphazin. For example, Dahlgren [2] collected 61 cases of tumours associated with the use of thorotrast (colloidal thorium dioxide) in diagnostic radiology. It was not possible to evaluate the size of the population from which these cases were drawn and thus to determine the risk to the patient from receiving thorotrast. The origin of the tumours was established by the presence in their vicinity of deposits of radioactive thorium. The tumours were mainly

Table 1. *Carcinoma of the bladder as a result of chlornaphazin therapy of* polycythaemia vera *patients* [1]

Treatment	No. of patients	No. with carcinoma of bladder	Notes
Received chlornaphazin	61	7	6/7 also had P^{32}
Received more than 100g chlornaphazin	20	7	6/7 also had P^{32}
No chlornaphazin	40	0	
P^{32} without chlornaphazin	46	0	

Table 2. *Examples of therapeutic exposure of man to actual or potential carcinogens*

Agent	Site of tumours		Analogous carcinogens
	Man	Animal (species)	
Chlornaphazin	Bladder [1]		2-naphthylamine [3–5]
Thorotrast	Liver Injection site [2]	S.C. sarcoma (rat) [41]	Radiation: Dial painters [42] atomic bomb survivors [43] ankylosing spondylitis [44]
Isoniazid	—	Lung (mouse) [45]	—
Evan's blue	—	R.E. system (rat) [46]	—
Colloidal iron oxide	—	S.C. sarcoma (rat) [47]	—

Table 3. *Examples of industrial exposure of man to actual or potential carcinogens*

Agent	Occupation	Site of tumours	
		Man	Animal (species)
Tars, oils, pitches, soots	Coal tar, Mineral oil } processing, etc. Chimney sweeping, Cotton mule spinning }	Skin [50] Lungs Scrotum [10]	e.g. Skin (mouse, rabbit) S.c. sarcoma (rat)
Aromatic amines	Chemical, Rubber, Cable } manufacture Rodent operatives [9]	Bladder [3, 7, 8]	Various (various) [34]
Mesothorium Uranium	Radium dial painters [42] Mining [48]	Lung	Bone (mouse) [49]
Arsenic [23]	Smelting and refining Sheep dip Viniculture	Skin? Lung?	None

Table 4. Examples of human lung carcinogens

Agent	Occupation	Site of tumours	
		Man	Animal (species)
Cigarette [12, 13]	Smoking	Lung	Tar→skin tumours (mouse)
Atmospheric pollution	—	Lung?	—
Asbestos	Manufacture use	Carcinoma of lung [16] Mesothelioma of pleura or peritoneum [17]	Mesothelioma of pleura (rat) [51]
Chromium	Chromate workers, etc. [14]	Lung	S.C. sarcoma (rat, mouse) [52]
Nickel	Refining	Lung Nasal sinuses [15]	Lung S.C. sarcoma } (rat)
Beryllium	Use	Lung?	Lung (rat, primate) [53, 54] Bone (rabbit) [55]

located either in the cavities into which the thorotrast had been injected or in the liver where the systemically-injected particulate matter collected. The case for the involvement of thorotrast in the induction of these tumours is strengthened by the knowledge that radiation induces cancer under other conditions in man, such as the bone tumours of the radium dial painters, the leukaemias of the therapeutically irradiated ankylosing spondylitis patients and the leukaemias which followed the use of nuclear weapons in World War II.

The bladder cancer hazard in the chemical industry (Table 3) calls for special comment because it illustrates how much information may be obtained by a thorough investigation with the full co-operation of the industry concerned. With the help and sponsorship of the Association of British Chemical Manufacturers, Case [3, 4, 5] was able to draw up a list of names of all those who worked in a number of chemical factories for more than six months between 1921 and 1950. By dint of patient searching through death certificates, hospital records and "Coroners' " inquests, he was able to show that these chemical workers were developing bladder cancer at about 30 times the rate expected for the general population. By the use of factory records of the jobs which these men had carried out, he was then able to show that five chemicals were responsible for the majority of the tumours. However, it was not possible for him to gauge the severity of exposure of the individual to the noxious agents but he was able to demonstrate that the proportion of a group of men developing cancer of the bladder was related to their length of service in the industry and thus, indirectly, to their probable exposure. As a result of Case's work the manufacture of 2-naphthylamine was abandoned in the United Kingdom and the industry improved the methods of working with the other chemicals. Case [6] also showed that a bladder cancer hazard existed through the use of the same noxious chemicals in the British Rubber Industry but, here, the lesson was not taken as seriously [7] and recently [8] tumours have been found also in the cable making industry. This has led the British Government to take statutory powers to prohibit or to control the industrial use of the most dangerous aromatic amines. The discovery of bladder cancer in two rodent operatives (rat catchers) has drawn attention to the fact that the rodenticide, alpha naphthyl-thiourea (ANTU) may be a human bladder carcinogen, either in its own right or because of traces of naphthylamines incorporated in it [9]. The thoroughness of Case's work in seeking the agents responsible for industrial bladder cancer has seldom been matched and is comparable to the work of Henry in seeking the aetiology of cancer of the scrotum [10].

Cancer of the lung is of major concern in several countries and especially in the United Kingdom where it accounts for over 38 per cent of all cancers in the male [11]. The

evidence that cigarette smoking is of major importance in its induction has been clearly set out on many occasions [12, 13] and needs no repetition. It is difficult to establish the carcinogenicity of specific industrial substances to tissues such as the lung, where there is a high background incidence of tumours. Nevertheless, the ability of a number of inorganic chemicals to induce lung cancer in man has been established. In the case of chromium, for example, Bidstrup and Case [14] showed that in a British factory the incidence of carcinoma of the lung was higher than it would have been even if every one of the workpeople had been a heavy smoker. With nickel, which is also a lung hazard, the evidence is strengthened by the finding of carcinomas of the nasal sinuses as well as of the lung [15]. Asbestos is one of the most recent lung cancer hazards to be discovered. It is also one of the most worrying because of the increasing extent to which asbestos is being employed in a wide variety of industries and because of the persistence of asbestos in the lung. The evidence for its action is two-fold; firstly there is an association between asbestosis and carcinoma of the lung [16] and secondly, the discovery that asbestos led to the otherwise rare mesotheliomas of the pleura and peritoneum [17].

Supporting evidence is required to make the results of statistical surveys fully convincing. The fear that an association between an environmental factor and cancer is coincidental rather than causal will be dispelled to some extent if the observation can be repeated in different circumstances on different populations. The causal nature of the relationship will be strengthened if it can be shown that removal of the factor leads, ultimately, to a reduction of cancer at the site or sites affected by the agent. This is often difficult to achieve because, for economic or other reasons, the community is unwilling to forego the advantages which the use of the hazardous substance presents. For example, fifteen years passed between the convincing demonstration by Case that certain aromatic amines are bladder carcinogens in man and their legal control in the United Kingdom. On the other hand, British doctors were, in many cases, sufficiently impressed by the dangers of cigarette smoking to relinquish the habit, and this has been followed by a fall in their lung cancer rate [18]. Finally, statistical evidence can be supported by the results of animal experimentation. The induction of cancer in the laboratory is of major importance in the elucidation of human carcinogens, but it is necessary to realise the limitations of the technique.

Not all species of animal are equally sensitive to the administration of a specific chemical carcinogen (Table 5). Thus, for example, 2-naphthylamine is a potent bladder carcinogen in man and the dog, somewhat less active in the hamster [19], a hepatocarcinogen in the mouse, and without carcinogenic effect in the rat and rabbit. These differences in species susceptibility are due to differences in the metabolism of the compounds [20, 21] and possibly to differences in the ease of transport, penetration and liberation of the active metabolite. As these factors are not fully understood in any species, let alone man, there are considerable difficulties in applying the results of animal tests to the human population. In my opinion, it is likely that carcinogens which do not require specific metabolism for activity, and are of suitable physical properties to penetrate biological material, will be found to be carcinogenic no matter what species are used for their investigation. A further difficulty which arises in the interpretation of animal tests in the light of the human disease, is the question of comparable levels of dosing. It is usually difficult to assess how much of a particular carcinogen has been received by an individual human, especially as it is often in the self interest of those who may volunteer information to keep the estimated amount to a minimum. It may then be suggested that the amounts given in the animal experiment are out of all proportion to that received by the human. Because relatively small numbers of animals may be used in any one experiment whereas the human exposure may affect thousands of individuals, because there is no way of assessing a minimum threshold dose for a carcinogen in man and because of the inherent difficulties in interpreting for man the results of animal tests, it is necessary to use as much of a carcinogen as will not debilitate the animals in carcinogen screening tests.

Despite all these difficulties, it is encouraging to observe that, with one important exception, every substance suspected of inducing cancer in man has been shown to induce cancers in one or more tissues of one or more species of animal. In most cases it has been possible to find conditions in which the animal tumour and the human tumour are in the same tissue and the method of entry of the carcinogen is similar. This means that the aetiology of the human cancer is open to experimental investigation. The exception is arsenic, which is believed by many to be a carcinogen in man but for which there is no reliable experimental

Table 5. *The site of election of tumours induced by three aromatic amines*

Species	2-Naphthylamine	2-Acetamidofluorene	4-Aminodiphenyl
Man	Bladder	Not known	Bladder
Dog	Bladder	Bladder, liver	Bladder
Cat	None	Lung, liver, kidney	Not known
Rat	Bladder (pre-cancer)	Various	Intestine, breast
Rabbit	None	Bladder, ureter	Bladder
Hamster	Bladder	Liver	Not known
Mouse	Liver	Various	Liver (bladder)

confirmation [22]. Twenty years have passed since an attempt was made to review the information about arsenic in a thorough, critical and dispassionate manner [23] and it is time that the evidence was reassessed.

Animal experiments are now being used extensively to attempt to prevent new carcinogenic hazards from entering the human environment. It will be clear from what has been said above that they are by no means perfect as the human being reacts to carcinogenic stimuli in different ways from animals. The tests provide, however, the only practical method of trying to prevent new carcinogens entering the environment, because it is not possible, as many of us had hoped, even yet to predict carcinogenic activity from chemical structure or other chemical, toxicological or physiological properties.

Industrial and therapeutic exposures of man probably represent only a small proportion of one per cent of all human cancers. They represent the most easily established of the preventable human cancers.

(2) *Geographical pathology and environmental tumours of unknown aetiology*

The attention which has been paid in the last decade to Geographical Pathology is largely responsible for the impression that a high proportion of human cancer is due to environmental factors. The straightforward comparison of the incidence of various types of cancer between one country, or one region, and another can give valuable results but, nevertheless, has severe limitations. The validity of the results from any survey depends on the accuracy with which individual items of information can be collected. Standards of medical care vary widely in different countries with the consequence that the completeness and accuracy of diagnosis is affected. Also, the effectiveness of treatment varies from one country to another. Although the latter difficulty may be overcome by considering morbidity rather than mortality, morbidity statistics have even less chance of being accurate in an under-doctored community. Cancer Registeries, such as that developed in Denmark [24], can be of great value in gathering and analysing statistics but their conclusions are, in any case, only as accurate as the reports on which they are based.

Variations in cancer incidence between countries, apart from the differences in the accuracy of the data, are difficult to interpret. For example, cancer of the stomach is much more prevalent and cancer of the breast less common in Japan than in the U.S.A. [25]. This may be because of genetic differences between the races or because of differences in the environment to which they are exposed. The influence of genetic factors may be minimised by one of two techniques: by comparison of the cancer incidence in migrant populations with that of their countrymen who remained at home or who migrated at a different time; or by using the method of cohort analysis in which the cancer incidence in people born at different times, but in the same geographical region, are compared. A number of examples of the use of these techniques is given in Table 6. For example, stomach cancer among the Japanese is probably environmental because migrants living in the U.S.A. and Canada do not show the same preponderance of the disease as do residents in Japan [26].

The production of satisfactory statistical evidence that differences in cancer incidences can be explained by environmental factors is only a part of the problem. The elucidation of the actual factors concerned is much more difficult. It is here that the synthesis of many different lines of evidence, ranging from experimental oncology to botanical, chemical and physical investigations of the environment, are required. The usual method is to look for known human or animal carcinogens in the environment. For example, the demonstration that there is an excessive incidence of cancer of the stomach in N.W. Iceland [27] has been

Table 6. Types of large scale epidemiological surveys in man

Description	Populations compared	Examples of cancers studied	Limitations of method
Geographical	By geographical situation	(i) Mammary: Japan vs. W. Europe [25] (ii) Stomach: Iceland [27]	Hereditary factors
Cohort analysis	By date of birth	Lung: U.S.A. [56]	Changes in diagnosis
Migrant populations	Migrants with home or with other migrants	(i) Stomach: Japanese [26] (ii) Lung: U.K. vs. New Zealand [57] South Africa [58]	(i) Size of population (ii) Standards of medical care

explained by the custom of these people to eat unusually large quantities of smoked birds and fish which probably contain, among other things, quantities of the carcinogenic polycyclic hydrocarbons and which induced intestinal tumours in rats [28]. The association of stomach cancer with the nature of the soil on which the patient has been residing [29] does not appear to have as facile an explanation. It has been shown that cancer soils have a high content of organic matter, zinc and cobalt [30] relative to other soils, but the connection between these factors and the tumours is not obvious. In view of the demonstration that bracken (*Pteridium aquilina*) contains a carcinogenic factor [31, 32], Boyland [33] suggested that the water supplies in areas with excess stomach cancer cases may contain bracken products. The verification of this idea will require the identification of the bracken carcinogen and a demonstration that it is significantly more prevalent in the water supplies of those areas with a high incidence of stomach cancer than in other areas.

The types of chemical which are known to induce cancer in animals [34] are summarised in Table 7. There have been a number of significant developments in the past decade. The most important, from the standpoint of the human disease, is the demonstration of several types of naturally occurring carcinogens (Table 8). The mysterious deaths of about 100,000 young turkeys in the United Kingdom led to the discovery of aflatoxin, a product of the mould *Aspergillus flavus*, which is a potent hepatocarcinogen in the rat [35]. It has been suggested that aflatoxin contamination of foodstuffs is the main factor in the aetiology of liver cancer in people living in certain parts of the tropics. It may be possible to verify the truth of this suggestion by measurements of the amount of aflatoxin contamination in the affected areas. It must be remembered, however, that the discovery of aflatoxin was very much a chance affair and that it is possible that many more, potent natural carcinogens remain to be discovered apart from the few shown in Table 8.

The second significant advance in chemical carcinogenesis has been the discovery of a completely new and extremely potent class of chemical carcinogens. The report by Magee and Barnes [36] that dimethylnitrosamine induced hepatomas and kidney tumours in rats has been followed by much work, especially in Germany by Druckrey and his collaborators, to show that many related nitrosamines and nitrosamides are carcinogenic [37]. These compounds are remarkable in that quite small differences in the molecular configuration lead to large variations in the tissue which is attacked (Table 9). As with the natural carcinogens described above, there is, as yet, no direct evidence that they are important in the induction of cancer in man. The fact that N-nitrosodiethylamine induces hepatic cell cancers in monkeys serves as a reminder that exposure of man to these chemicals is to be avoided [38].

The third important result to come from the study of chemical carcinogenesis is the demonstration that it is now possible to induce tumours of most tissues of animals by the administration, by feeding or injection, of single chemical substances. Thus, in man, the glandular stomach is the site of most cancers in that organ. This tumour has only recently been mimicked in the rat by the oral administration of 2,7-fluorenyldiacetamide [39] or N-nitroso-N-methylurethane [40]. Furthermore, it has been shown with increasing frequency that

Table 7. Classes of chemical carcinogens [34]

Polycyclic hydrocarbons	Biological alkylating agents
Aromatic amines	Nitrosamines and nitrosamides
Aromatic azo compounds	Inorganic carcinogens
Aliphatic chlorocarbons	Liver poisons
Hormones	Miscellaneous

Table 8. Examples of naturally occurring carcinogens

Source	Example	Name	Tumour (species)
Mould	*Aspergillus flavus*	Aflatoxin	Liver [35], s.c. sarcoma [59], trachea [59], stomach [60] (rat)
	Penicillium Islandicum	—	Liver [61] rat
Plant	Cycad	Cycasin	Liver, Kidney (rat) [62]
	Senecio, etc.	Retrorsine	Liver (rat) [63]
	Bracken	Not isolated	Intestine (rat) [31, 32]
	Croton tiglium	Phorbol esters	Skin (mouse) [64]
	Euphorbia Ingens	Latex	Skin (mouse) [65]
	Citrus	Oils	Skin (mouse) [66]
Animal	Tryptophan	Metabolites	Bladder (mouse) [67]*
	Hormones	e.g. Oestrogen	Endocrine tissues (various) [34]
	Cholesterol	—	? s.c. sarcomas (mouse) [68]

*Implantation experiments.

Table 9. Carcinogenic activity of some dialkylnitrosamines in B.D. rats [69]

Compound	Site of election of tumours					
	Liver	Kidney	Bladder	Oesophagus	Lung	Pharynx
Diethyl NA	+	−	−	+	−	−
Di-n-butyl NA	+	−	+	+	−	−
Di-n-amyl NA	+	−	−	−	+	−
Ethyl-n-butyl NA	−	−	−	+	−	−
Ethylvinyl NA	−	−	−	+	−	−
Di-ethanolyl NA	+	−	−	−	−	−
N-nitrosomorpholine	+	−	−	−	−	−
N-nitrosopiperidine	−	−	−	+	−	+
Diphenyl NA	−	−	−	−	−	−

NA=nitrosamine.

either very low doses or single applications of chemical carcinogens are sufficient to induce cance in high yield. This means that in seeking the environmental causes of human cancer it is necessary to seek not only for substances acting over long periods but also for insults which may act once during the lifetime of the individual. As these insults may come from naturally occurring carcinogens it will be realised that the complete understanding of the aetiology of human cancer may take a considerable time to acquire.

The evidence for the action of chemicals in inducing cancer in man has been reviewed. It is realised that background radiation and viruses may also play a part in the induction of the human disease but the evidence for the involvement of these causes is, for the most part, more ephemeral than for chemicals.

RESUME

Les données concernant le rôle d'agents chimiques dans l'indication du cancer chez l'homme sont revues. L'étude systématique de populations relativement petites, mais investiguées en détail, peut, parfois, mettre en évidence un risque spécifique, particulièrement dans les cas d'exposition thérapeutique, ou industrielle, à certains produits chimiques cancérogènes. D'autre part, les études épidémiologiques doivent être complétées par des expériences chez l'animal.

Des études épidémiologiques sur de grandes populations montrent que plusieurs cancers humains sont provoqués par des facteurs du milieu. La nature des agents en cause est matière à spéculation, et celle-ci doit être guidée par l'étude expérimentale de la cancérogenèse chimique. Des travaux récents ont montré l'importance des cancérogènes d'origine naturelle. Ils ont aussi établi que de nouveaux cancérogènes synthétiques, n'appartenant à aucune classe connue de cancérogènes chimiques, sont encore découverts. Certains d'entre eux ont une spécificité remarquable pour certains tissus, et ils sont capables de provoquer des cancers par l'administration d'une dose unique. Ces expériences, chez l'animal, attirent l'attention sur la complexité des problèmes liés à l'étude des facteurs responsables de la maladie chez l'homme.

SUMMARY

The evidence for the induction of cancer in man by environmental chemicals is considered. Epidemiological surveys of relatively small well-investigated populations can sometimes indicate the presence of a specific hazard, especially in cases of therapeutic or industrial exposure to carcinogenic chemicals. Otherwise the surveys must be supplemented by other evidence such as well-conducted experiments in animals.

Epidemiological surveys of large populations indicate that many human cancers have an environmental origin. The nature of the agents involved is a matter for speculation which must be guided by the experimental study of chemical carcinogenesis. Recent work in this field has emphasised the importance of naturally occurring carcinogens and demonstrated that potent new synthetic carcinogens, which do not belong to the well established classes of chemical carcinogens, are still being found. Some of these have striking tissue specificities and may induce cancer after only a single dose. These animal experiments emphasise the complex problems to be faced in elucidating the factors responsible for the human disease.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedingungen der Krebsinduktion beim Menschen durch chemische Agenzien der Umwelt, werden betrachtet. Eine epidemiologische Untersuchung verhältnismäßig kleiner gut durchuntersuchter Populationen kann manchmal die Anwesenheit einer specifischen Gefährdung besonders in Fällen von therapeutischer oder industrieller Exposition von carcinogenen Chemikalien aufzeigen. Anderenfalls muß die Untersuchung ergänzt werden durch eine weitere Abklärung, wie z. B. sorgfältig durchgeführte Tierversuche. Die epidemiologische Untersuchung großer Populationen zeigt, daß viele menschliche Krebse einen Umweltursprung haben. Die Natur der Agenzien, die daran beteiligt sind, ist spekulativ und muß durch experimentelle Untersuchungen über chemische Carcinogenese gesichert werden. Die jüngsten Abeiten auf diesem Gebiet haben die Bedeutung der natürlich vor-

kommenden Carcinogene unterstrichen und gezeigt, daß wirksame neue synthetische Carcinogene, die nicht zu den bereits wohl bekannten Klassen der chemischen Karcinogene gehören, noch immer gefunden werden. Einige dabon haben auffällig gewebsspezifische Eigenschaften und können Krebse nach einer einzigen Dosis hervorrufen. Diese Tierexperimente zeigen, wie komplex das Problem ist, das sich bei der Aufklärung von Faktoren stellt, die für die menschliche Erkrankung verantwortlich sind.

REFERENCES

1. T. Thiede, E. Chievitz and B. C. Christensen, Chlornaphazine as a bladder carcinogen. *Acta med. scand.* **175,** 721 (1964).
2. S. Dahlgren, Thorotrast tumours, a review of the literature and report of two cases. *Acta path. microbiol. scand.* **53,** 147 (1961).
3. R. A. M. Case, M. E. Hosker, D. B. McDonald and J. T. Pearson, Tumour of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuffs intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine. *Brit. J. industr. Med.* **11,** 75 (1954).
4. R. A. M. Case and J. T. Pearson, Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuffs intermediates in the British chemical industry. Part II. Further consideration of the role of aniline and of the manufacture of auramine and magenta (fuchsine) as possible causative agents. *Brit. J. industr. Med.* **11,** 213 (1954).
5. R. A. M. Case, Incidence of death from tumours of the urinary bladder. *Brit. J. prev. soc. Med.* **7,** 14 (1953).
6. R. A. M. Case and M. E. Hosker, Tumour of the urinary bladder as an occupational disease in the rubber industry in England and Wales. *Brit. J. prev. soc. Med.* **8,** 39 (1954).
7. Annotation, Cancer Research *Lancet* **ii,** 25 (1964).
8. J. M. Davies, Bladder tumours in the electric-cable industry. *Lancet* **ii,** 143 (1965).
9. Anon., A dangerous rodenticide. *Lancet* **ii,** 1183 (1966).
10. S. A. Henry, *Cancer of the Scrotum in Relation to Occupation.* Oxford University Press, London (1946).
11. G. E. Godber, *On the state of the Public Health: the Annual Report of the Chief Medical Officer of the Ministry of Health for the Year* 1965, p. 88. H.M. Stationery Office, London (1965).
12. *Smoking and Health: summary of a report of the Royal College of Physicians of London on smoking in relation to cancer of the lung and other diseases.* Pitman Medical, London (1962).
13. *Smoking and Health: report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service.* Pub. Hlth. Service Pubn. No. 1103. U.S. Govt. Printing Office, Washington (1964).
14. P. L. Bidstrup and R. A. M. Case, Carcinomas of the lung in workmen in the bichromates-producing industry in Great Britain. *Brit. J. industr. Med.* **13,** 260 (1956).
15. G. P. Barnett, *Annual report of the Chief Inspector of Factories for the year* 1948, p. 93. H.M. Stationery Office, London (1948).
16. G. M. Bonser, J. S. Faulds and M. J. Stewart, Occupational cancer of the urinary bladder in dyestuffs operatives and of the lung in asbestos textile workers and iron ore miners. *Amer. J. clin. Path.* **25,** 126 (1955).
17. M. L. Newhouse and H. Thompson, Epidemiology of mesothelial tumours in the London area. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **132,** 579 (1965).
18. R. Doll and A. B. Hill, Mortality in relation to smoking: ten years' observations. *Brit. med. J.* **i,** 1399, 1460 (1964).
19. U. Saffiotti, F. Cefis, R. Montesano and A. R. Sellakumar, Induction of bladder cancer in hamsters fed aromatic amines. *Industr. Med. Surg.* **35,** 564 (1966).
20. E. Boyland, *Biochemistry of bladder cancer.* C. C. Thomas, Springfield, Illinois (1963).

21. E. C. Miller and J. A. Miller, Mechanisms of chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* **18,** 805 (1966).
22. C. Baroni, G. J. Van Esch and U. Saffiotti, Carcinogenesis tests of two inorganic arsenicals. *Arch. environm. Hlth.* **7,** 668 (1963).
23. O. Neubauer, Arsenical cancer: a review. *Brit. J. Cancer* **1,** 192 (1947).
24. J. Clemmesen, *Statistical Studies in the Aetiology of Malignant neoplasms. Acta path. microbiol. scand.*, Suppl. 174 (1965).
25. M. Segi, I. Fukushima, S. Fujisaku, M. Kurihara, S. Saito, K. Asano and H. Nagaike, Cancer morbidity in Miyagi Prefecture, Japan, and a comparison with morbidity in the United States. *J. nat. Cancer Inst.* **18,** 373 (1957).
26. R. L. Smith, Recorded and expected mortality among the Japanese of the United States and Hawaii, with special reference to cancer. *J. nat. Cancer Inst.* **17,** 459 (1956).
27. J. Sigurjonsson, Geographical variations in mortality from cancer in Iceland, with particular reference to stomach cancer. *J. nat. Cancer Inst.* **37,** 337 (1966).
28. N. Dungal, Stomach cancer in Iceland. *Canad. Cancer Conf.* **6,** 441 (1966).
29. P. Stocks, Cancer in North Wales and Liverpool region. *35th Annual Report of the British Empire Cancer Campaign*, Suppl. (1957).
30. P. Stocks and R. I. Davies, Zinc and copper content of soils associated with the incidence of cancer of the stomach and other organs. *Brit. J. Cancer* **18,** 14 (1964).
31. I. A. Evans and J. Mason, Carcinogenic activity of bracken. *Nature (Lond.)* **208,** 913 (1965).
32. A. M. Pamucku, C. Olson and J. M. Price, Assay of fractions of bovine urine for carcinogenic activity after feeding bracken fern (*pteris aquilina*). *Cancer Res.* **26,** 1745 (1966).
33. E. Boyland, A chemist's view of cancer prevention. *Proc. roy. Soc. Med.* **60,** 93 (1967).
34. D. B. Clayson, *Chemical Carcinogenesis.* J. & A. Churchill, London (1962).
35. M. C. Lancaster, F. P. Jenkins and J. M. Philp, Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature (Lond.)* **192,** 1095 (1961).
36. P. N. Magee and J. M. Barnes, The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Brit. J. Cancer* **10,** 114 (1956).
37. P. N. Magee and J. M. Barnes, *Advanc. Cancer Res.*, in press.
38. M. G. Kelly, R. W. O'Gara, R. H. Adamson, K. Gadekar, G. C. Botkin, W. H. Reese and W. T. Kerber, Induction of hepatic cell carcinomas in monkeys with N-nitrosodiethylamine. *J. nat. Cancer Inst.* **38,** 323 (1966).
39. H. L. Stewart, K. C. Snell, H. P. Morris, B. P. Wagner and F. E. Ray, Carcinoma of the glandular stomach of rats ingesting N,N'-2,7-fluorenylene-bisacetamide. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **5,** 105 (1961).
40. R. Schoental, Induction of tumours of the stomach in rats and mice by N-nitroso-N-alkylurethanes. *Nature (Lond.)* **199,** 190 (1963).
41. F. R. Selbie, Tumours in rats and mice following the injection of thorotrast. *Brit. J. exp. Path.* **19,** 100 (1938).
42. J. C. Aub, R. D. Evans, L. M. Hempelmann and H. S. Martland, The late effects of internally-deposited radioactive materials in man. *Medicine (Baltimore)* **31,** 221 (1952).
43. R. D. Lange, W. C. Moloney and T. Yamawaki, Leukaemia in atomic bomb survivors I. General observations. *Blood* **9,** 574 (1954).
44. W. M. Court Brown and R. Doll, Mortality from cancer and other causes after radiotherapy for ankylosing spondylitis. *Brit. med. J.* **ii,** 1327 (1965).
45. C. Biancifiori and L. Severi, The relation of isoniazid (INH) and allied compounds to carcinogenesis in some species of small laboratory animals: a review. *Brit. J. Cancer* **20,** 528 (1966).
46. A. H. E. Marshall, The production of tumours of the reticular tissue by di-azo vital dyes. *Acta path. microbiol. scand.* **33,** 1 (1953).
47. H. G. Richmond, The carcinogenicity of an iron-dextron complex in *Cancer Progress Volume* 1960, p. 24. Edited by R. W. Raven. Butterworth, London (1960).
48. R. Seltser, Lung cancer and uranium mining: a critique. *Arch. environm. Hlth.* **10,** 923 (1965).

49. M. P. FINKEL, Relative biological effectiveness of radium and other alpha emitters in CF No. 1. female mice. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **83,** 494 (1953).
50. S. A. HENRY, Occupational cutaneous cancer attributable to certain chemicals in industry. *Brit. med. Bull.* **4,** 389 (1947).
51. J. C. WAGNER, Experimental production of mesothelial tumours of the pleura by implantation of dusts in laboratory animals. *Nature (Lond.)* **196,** 180 (1962).
52. W. W. PAYNE, Production of cancers in mice and rats by chromium compounds. *Arch. industr. Hlth.* **21,** 530 (1960).
53. A. J. VORWALD and A. L. REEVES, Pathologic changes induced by beryllium compounds. Experimental studies. *Arch. industr. Hlth.* **19,** 190 (1959).
54. A. J. VORWALD, The induction of experimental pulmonary cancer in the primate. Abstracts of papers at *9th int. Cancer Congr.*, Tokyo. p. 125 (1966).
55. J. M. BARNES, F. A. DENZ, and M. A. SISSONS Beryllium bone sarcomata in rabbits. *Brit. J. Cancer* **4,** 212 (1950).
56. H. F. DORN, Increase in cancer of the lung. *Industr. Med. Surg.* **23,** 253 (1954).
57. D. F. EASTCOTT, The epidemiology of lung cancer in New Zealand. *Lancet* **i,** 37 (1956).
58. G. DEAN, Lung cancer among white South Africans: report on a further study. *Brit. med. J.* **ii,** 1599 (1961).
59. F. DICKENS, H. E. H. JONES and H. B. WAYNFORTH, Oral, subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances: the intratracheal administration of cigarette tar in the rat. *Brit. J. Cancer* **20,** 134 (1966).
60. W. H. BUTLER and J. M. BARNES, Carcinoma of the glandular stomach in rats given diets containing aflatoxin. *Nature (Lond.)* **209,** 90 (1966).
61. M. MIYAKE, Primary hepatic cancer and liver cirrhosis in Japan. *Acta Un. int. Cancr.* **17,** 892 (1961).
62. G. L. LAQUEUR, O. MICKELSEN, M. G. WHITING and L. T. KURLAND, Carcinogenic properties of nuts from Cycas circinalis L. indigenous to Guam. *J. nat. Cancer Inst.* **31,** 919 (1963).
63. R. SCHOENTAL, M. A. HEAD and P. R. PEACOCK, Senecio alkaloids: primary liver tumours in rats as a result of treatment with (1) a mixture of alkaloids from *S. jacobaea* Lin.; (2) retrorsine; (3) isatidine. *Brit. J. Cancer* **8,** 458 (1954).
64. I. BERENBLUM, The co-carcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.* **1,** 44 (1941).
65. F. J. C. ROE and W. E. H. PEIRCE, Tumour promotion by Euphorbia Latices. *Cancer Res.* **21,** 338 (1961).
66. F. J. C. ROE, Oil of sweet orange: a possible role in carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* **13,** 92 (1959).
67. G. T. BRYAN, R. R. BROWN and J. M. PRICE, Mouse bladder carcinogenicity of certain tryptophan metabolites and other aromatic nitrogen compounds suspended in cholesterol. *Cancer Res.* **24,** 596 (1964).
68. I. HIEGER, Cholesterol carcinogens. *Brit. med. Bull.* **14,** 159 (1958).
69. H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN and D. SCHMAHL, Carcinogenicity and chemical structure of nitrosamines. *Acta Un. int. Cancr.* **19,** 510 (1963).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 417–421. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Desoxyribonucleic Acid Synthesis in the Lymphocytes of Patients with Malignant Disease

D. CROWTHER, G. HAMILTON FAIRLEY and R. L. SEWELL
Department of Medicine, St. Bartholomew's Hospital
London, England

THERE is good evidence of a host reaction against a variety of tumours in experimental animals. Nearly all these tumours have been shown to possess transplantation antigens and immune mechanisms play an important part in the defence against the tumour. The tumours principally studied have been those due to viruses and chemical agents, but examples of tumour specific, transplantation type antigens have also been found in both spontaneous tumours and those caused by physical agents.

This immune reaction is cell-mediated, involving cells of the lymphoid series in a similar way to delayed hypersensitivity and homograft reactions. Although humoral factors may play a part, their role is uncertain and variable. They often either have no effect or actually enhance tumour growth. The importance of the lymphocyte has been stressed both in the part it plays in primary tumour regression and in concomitant immunity, i.e. the resistance of the host to secondary transplanted tumour in the presence of progressive growth of the primary tumour.

As yet there is very little direct evidence of immune reactions in man playing a part in host defence against cancer. However, some indirect evidence is accumulating that there is such a reaction and it does seem likely that the lymphocyte plays a key role here also.

We therefore decided to study the lymphocytes in patients with malignant disease. Bearing in mind the suppressive effects of malignancy on cell-mediated immunity, it was thought that lymphocytes from patients with Hodgkin's disease would provide a useful source of information since the depression of delayed hypersensitivity and homograft reactions is such a feature in this disease.

Today I would like to discuss mainly our findings in Hodgkin's disease. Evidence will be presented that there is a range of abnormalities in the population of cells of the lymphoid series in the peripheral blood of such patients which is similar to the changes occurring in patients under antigenic stimulation. The data are drawn from 32 controls and 17 patients with Hodgkin's disease before treatment was given.

The experiments I will describe were carried out on peripheral blood lymphoid cells separated off by standing defibrinated blood with finely divided iron powder and methyl cellulose. In this process the phagocytic cells sediment following ingestion of the iron, leaving the lymphocyte-rich serum which may be pipetted off. A study of Leishman stained

smears showed that the preparations in nearly all cases contained over 98% lymphoid cells; the monocytes and polymorphs having been removed.

The large lymphoid cell shown in Fig. 1 is typical of one of the types of cell which is present in increased numbers in Hodgkin's disease. These cells are approximately 20μ in diameter, have prominent nucleoli, a deeply basophilic cytoplasm and a well-developed Golgi zone. This particular patient had over 4% large lymphoid cells in his lymphocyte preparation.

Figure 2 shows the percentage of large lymphoid cells present in the lymphocyte preparations from controls, patients with Hodgkin's disease and various common infections. These cells are present in the peripheral blood of normal controls; however their numbers do not rise above 0·5%. In contrast, there are large increases in Hodgkin's disease and amongst some common bacterial and viral infections. Viral diseases such as glandular fever, infectious hepatitis, rubella, etc., which are known to induce an atypical lymphocytosis were excluded from this study. The cases involved patients with pneumonia, acute bronchitis, empyema, tuberculosis, and one case had a common cold.

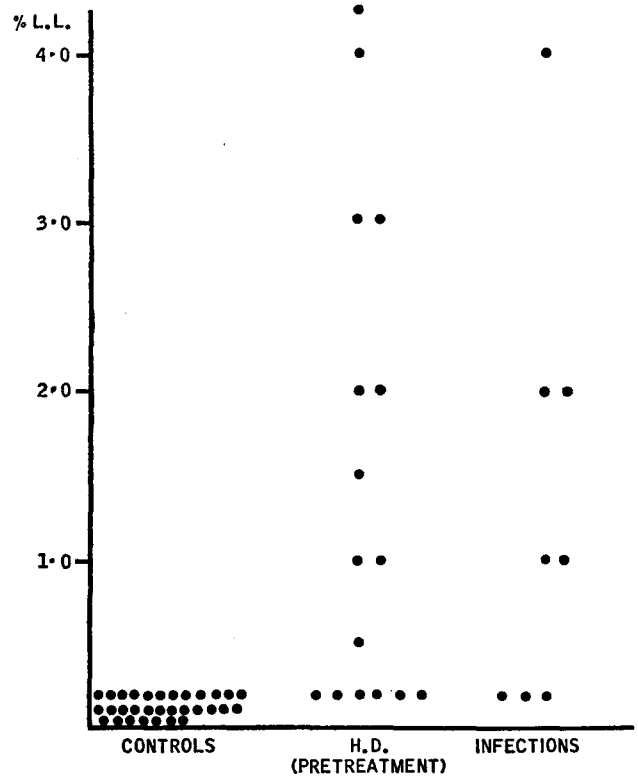


Fig. 2. Percentage of large lymphoid cells present.

Figure 3 shows two large lymphoid cells from a patient with a common cold. The similarity between these cells and the lymphoid cell from a patient with Hodgkin's disease is easily seen. This patient had 4% large lymphoid cells in her lymphocyte preparation.

Mr. M. S. G. Birbeck of the Chester Beatty Research Institute, London, kindly prepared electron micrographs of lymphocyte preparations in a few of our patients. Figure 4 shows a large lymphoid cell from a patient with Hodgkin's disease. The cell has large numbers of ribosomes arranged in rosettes; however there is very little endoplasmic reticulum. These cells are very similar morphologically to those described by Hall *et al.* [1, 2] in the efferent a lymph of lymph nodes draining sites of antigenic stimulation in experimental animals.

It was also noted in the Leishman stained films obtained from our patients that in addition to the large lymphoid cells there is an increase in basophilia of the cytoplasm of the smaller lymphocytes.

Figure 5 shows the pale cytoplasm of the normal lymphocyte population.

Figure 6 shows the increase in basophilia which occurs in the smaller lymphocytes of patients with Hodgkin's disease. Electron microscopy of these cells shows that they are not all that different from the smaller lymphocytes from controls but their ribosomal content

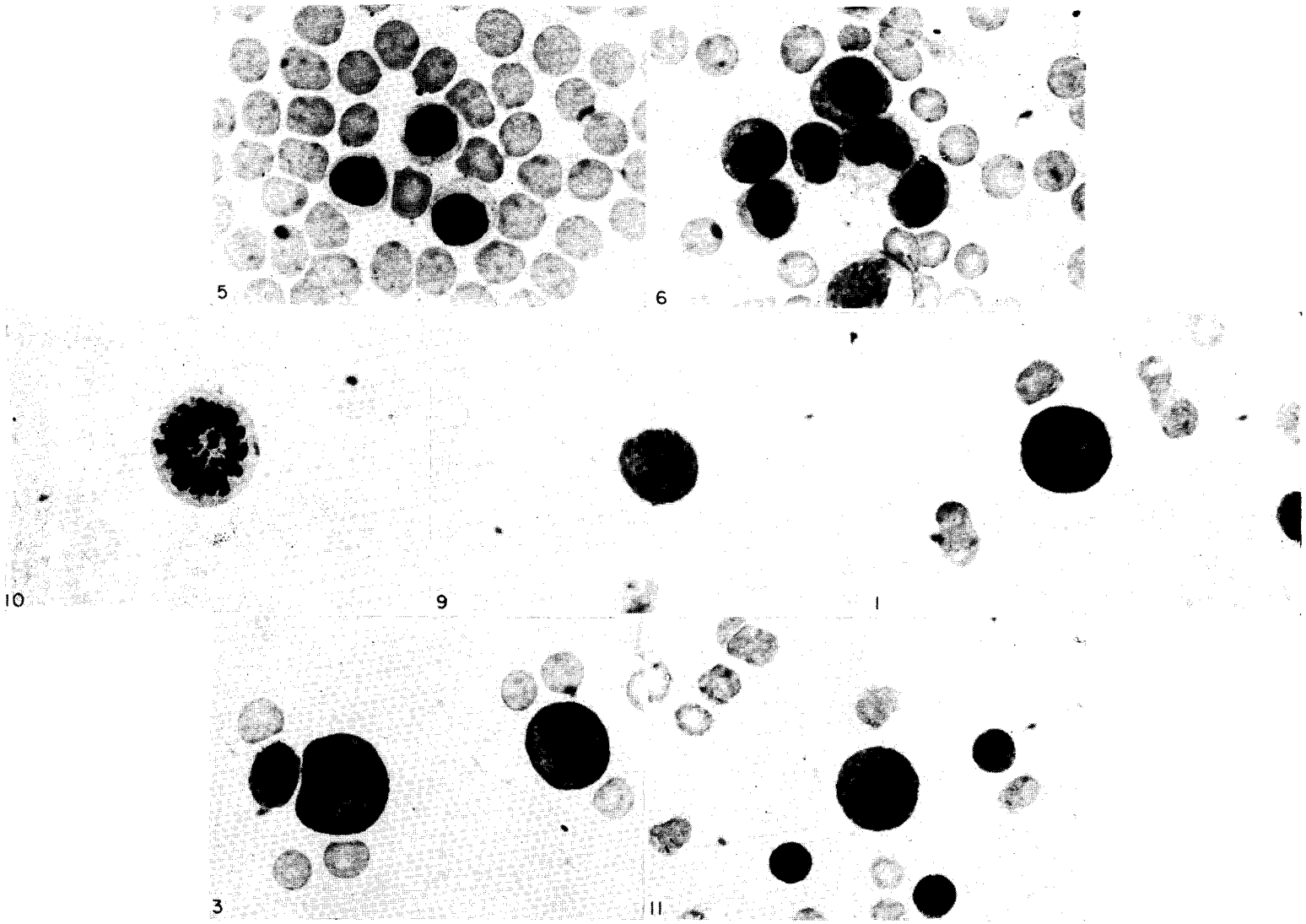


Fig. 1. *Large lymphoid cell from a patient with Hodgkin's disease (Leishman stain).*
Fig. 3. *Large lymphoid cell from patient with common cold.*
Fig. 5. *Photograph of control lymphocytes (Leishman).*
Fig. 6. *Photograph of smaller lymphocytes in Hodgkin's disease with an increase in basophilia.*
Fig. 9. *Autoradiograph of a large lymphoid cell labelled with tritiated thymidine taken from a patient with Hodgkin's disease.*
Fig. 10. *Mitotic figure in peripheral blood of patient with Hodgkin's disease.*
Fig. 11. *Large lymphoid cell in a control following immunisation.*

(to face p. 418)

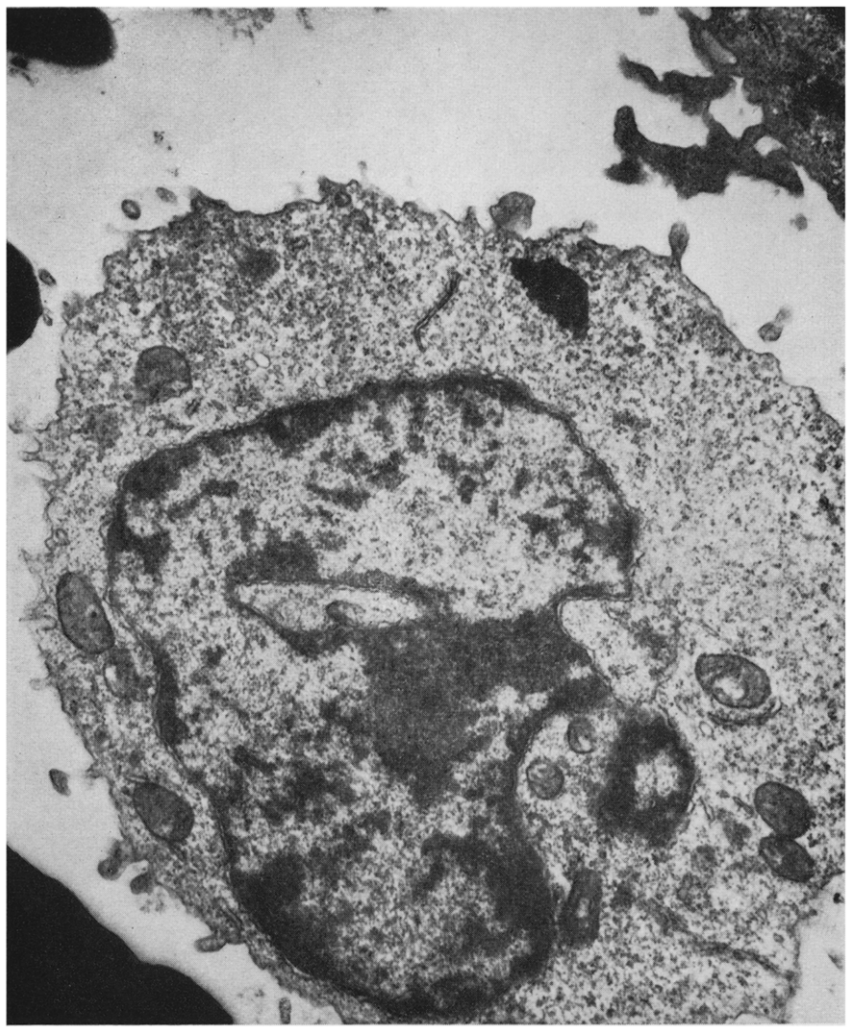


Fig. 4. Electron micrograph of large lymphoid cell from patient with Hodgkin's disease.

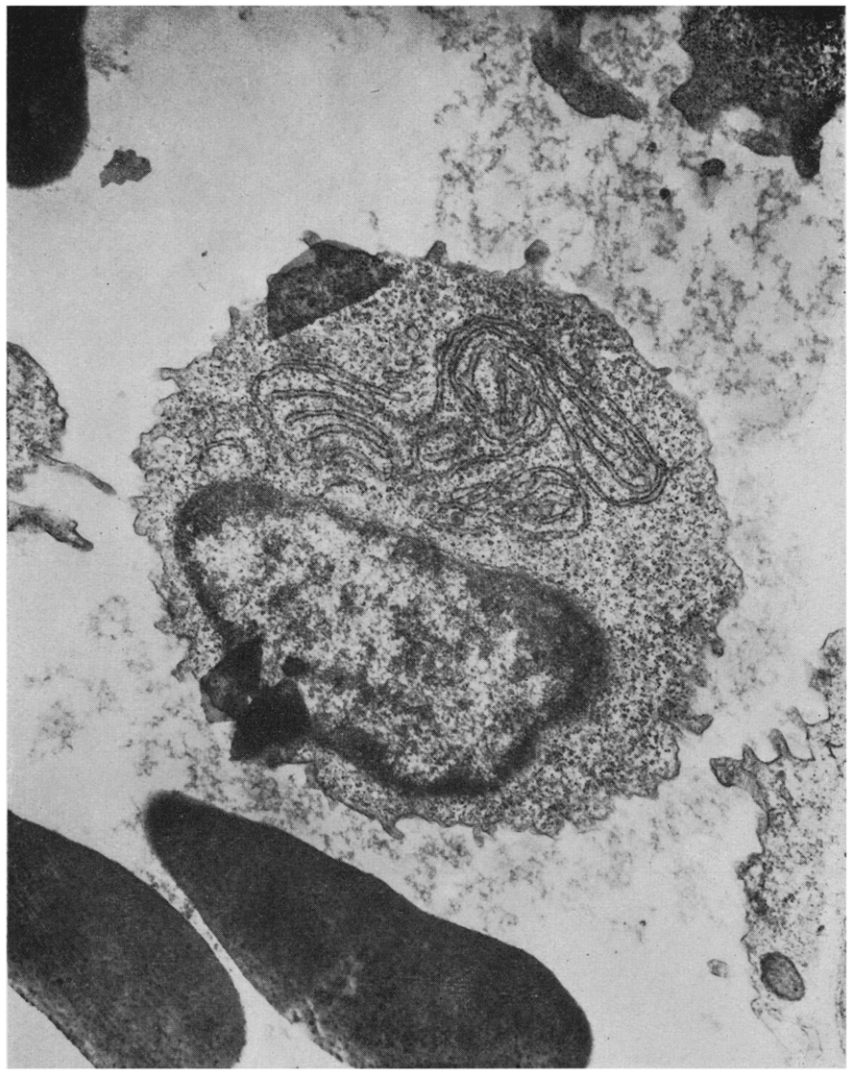


Fig. 7. Electron micrograph of a plasma cell from a patient with Hodgkin's disease.

is increased to some extent and some plasma cells are present.

Figure 7 shows a plasma cell from a patient with Hodgkin's disease. Occasionally cells with endoplasmic reticulum are found in control preparations but they are not so numerous as in Hodgkin's disease, nor have they such a well-developed endoplasmic reticulum. The differences therefore are quantitative rather than qualitative.

the slide showing numbers of large lymphoid cells in these conditions is obvious. Only 2 out of 17 patients with Hodgkin's disease had a normal DNA synthesis of less than 1500 counts/min per million cells. One patient had a 40-fold increase in DNA synthesis over control values. Increases in DNA synthesis were also seen in patients with common infections.

Kuper and Bignall in 1964 [4] in a paper

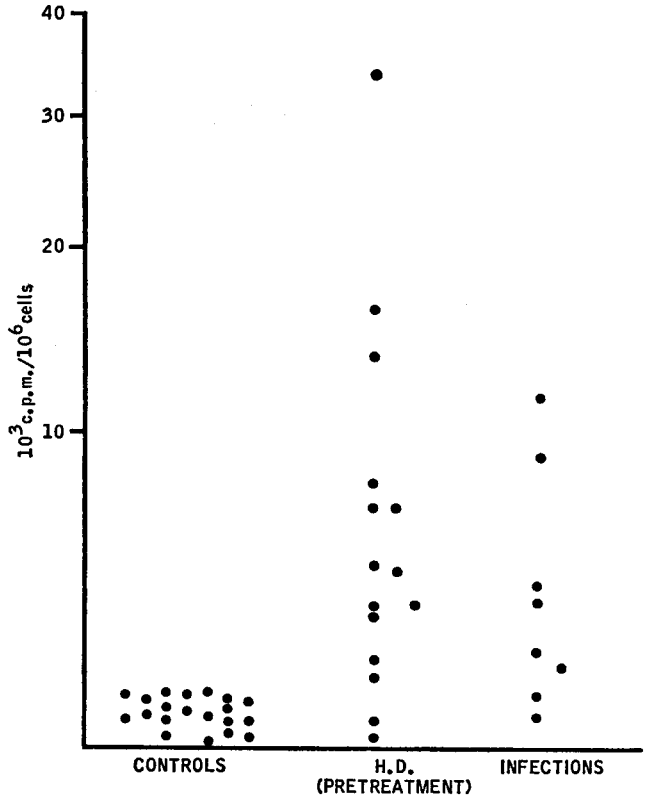


Fig. 8. *Desoxyribonucleic acid synthesis in lymphoid cell preparations.*

I would now like to describe our measurements of desoxyribonucleic acid synthesis in the lymphoid cell population. Bond [3] showed that irradiation may be followed by an increase in numbers of cells synthesising DNA in the peripheral blood. It is, therefore, of some importance to study patients before irradiation — or for that matter before any other treatment.

Figure 8 shows the amount of tritiated thymidine taken up into DNA *in vitro* by the lymphoid cells. The cells were incubated with tritiated thymidine for ½ hr at 37°C. The cells were centrifuged and the trichloracetic acid and alcohol insoluble material was dissolved in 1M KOH and the amount of tritium estimated using a liquid scintillation counter. The results are expressed in counts/min per million cells. The similarity between this slide and

entitled, *Tritiated-thymidine Uptake by Tumour Cells in Blood* noted uptake in mononuclear cells in 3 patients with Hodgkin's disease. The authors did not, however, state what these cells were. They may have been monocytes, malignant cells, lymphoid cells or myelocytes.

Autoradiography of lymphocyte preparations in our patients (Fig. 9) showed that the large lymphoid cells constitute nearly all the labelled cells. Smaller cells are not often labelled. The numbers of labelled cells in these preparations correlate with the numbers of large lymphoid cells present and with the amount of DNA synthesis as measured using the liquid scintillation counter.

Since the build up of DNA by the cell is a prelude to mitosis, we expected to see mitotic figures in the lymphocyte preparations from patients with Hodgkin's disease and infections.

Cells in mitosis were indeed found in a few cases.

Figure 10 shows a mitotic figure in the peripheral blood of a patient with Hodgkin's disease.

It is apparent then that the response by lymphoid cells to common bacterial and viral infections is similar in many ways to the peripheral blood changes in patients with Hodgkin's disease. In both groups there is an increase in numbers of large lymphoid cells, many of which are in the DNA synthetic phase of cell growth. The increases in DNA synthesis in patients with bacterial infections are however much smaller than the increases observed in Hodgkin's disease. Medium sized lymphocytes with increased basophilia are also prominent. Such changes occur in Hodgkin's disease patients with normal or low total lymphocytes counts, normal or low folate levels and with normal or low haemoglobin levels. All stages of the disease have been found to have these changes and there is no apparent correlation with ability to give delayed hypersensitivity reactions.

A group of 10 patients with advanced carcinoma was also studied before any treatment was given. Four of the ten patients showed a trend similar to that occurring in Hodgkin's disease; however the changes were only just significantly above control values. Similar but more pronounced changes were also seen in patients with reticulum cell sarcoma and mycosis fungoides.

The fact that the lymphocyte is involved in these changes in malignant disease and the close similarity to the changes observed in infections suggests that the reaction may be an immune response to tumour tissue. If this is true we might expect that similar changes in the lymphocytes would occur in autoimmune disease and after immunisation. Preliminary experiments on a few patients have confirmed this expectation. Eight controls challenged with tetanus toxoid, inactivated poliovaccine delayed hypersensitivity antigens have responded with an increase in numbers of large lymphoid cells synthesising DNA.

Figure 11 shows a typical large lymphoid cell in the peripheral blood of an immunised control. The numbers of such cells rose to 2·5% in this subject following immunisation. These cells were morphologically indistinguishable from similar cells occurring in Hodgkin's disease. Autoradiography showed that tritiated thymidine was taken up into a considerable proportion of these large lymphoid cells. An increase in basophilia of the smaller lymphoid cells was pronounced in these immunised cases. Recently we have studied 3 patients with acute rheumatoid arthritis as an example of another form of antigenic stimulus. Both these patients had similar changes in the lymphoid cells. Obviously, these latest results need confirmation with larger numbers of patients; however it does seem possible that we are examining a lymphocytic reaction to tumour tissue resembling known immune reactions.

There are other explanations of the changes we have described. No malignant cells of the Hodgkin or Sternberg-Reed type were seen in the peripheral blood of patients with Hodgkin's disease examined with the light microscope or with the electron microscope but it is still possible that these are malignant cells of a different sort.

The possibility of a subclinical infection in Hodgkin's disease cannot be excluded but there was no overt infection in any of our patients.

The possibility that these changes could be due, at least in part, to disorganisation of the lymph node architecture by malignant tissue has not been excluded. The failure of proper recirculation of lymphocytes and an increase in output of more primitive lymphoid cells might then occur; the situation being analogous to the development of a leucoerythroblastic blood picture in patients with bone marrow infiltrations. However, we have found that patients with carcinomatous infiltration of lymph nodes usually have normal lymphoid cell populations in the peripheral blood.

It is also possible that some hypothetical tumour product could be inducing these changes and as yet we have no direct evidence on this point.

The most attractive and probably the most likely explanation of these changes in the lymphoid cell population is that they are due to a form of immune reaction to the presence of tumour tissue. It is also a useful hypothesis in that it suggests further work which might be done. A study of antibody production by these cells is under way and projects involving the use of these reacting lymphoid cells for immunotherapy of human malignant disease is under consideration.

Acknowledgement — We are most grateful to the Wellcome Foundation for the generous financial support which made this work possible.

RESUME

Il est bien établi que, chez de nombreux animaux dans le laboratoire, il existe une réaction de l'hôte contre la tumeur dont il est porteur, et que cette réaction se fait par l'intermédiaire des lymphocytes. Afin de rechercher si une telle réaction existe chez l'homme, une étude de plusieurs propriétés des lymphocytes chez des patients atteints d'affections néoplasiques a été entreprise. La synthèse de l'AND, étudiée par la mesure de l'incorporation in vitro *dans la thymidine tritiée par la technique du comptage par scintillations, est augmentée dans les lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de lymphomes et de diverses infections. Dans la maladie de Hodgkin, cette augmentation de la synthèse de l'ADN apparaît chez presque tous les patients avant le traitement, et elle s'élève, dans certains cas, jusqu'à* 40 *fois les valeurs obtenues chez les témoins. Elle est en relation avec la présence de cellules lymphoïdes primitives dans les préparations de lymphocytes. La possibilité qu'une telle augmentation de l'activité métabolique des cellules lymphoïdes soit en rapport avec une réaction lymphocytaire contre la tumeur est discutée.*

SUMMARY

There is conclusive evidence in many experimental animals that there is a reaction by the host against its own malignant disease which is mediated by lymphocytes. In order to investigate the possibility of such a reaction by the lymphocyte to malignant tumours in man a study of several properties of the lymphocyte in these conditions has been undertaken. Lymphocytes from the peripheral blood of patients with lymphomas and controls under various forms of immune stress have been found to have an increased DNA synthesis as measured by the uptake of tritiated thymidine in vitro *using scintillation counting techniques. In Hodgkin's disease this increased DNA synthesis occurs in nearly all patients before treatment and in some instances is over* 40 *times the values obtained using control patients. This increase in DNA synthesis is correlated with the presence of primitive lymphoid cells in the lymphocyte preparations. The possibility that this increase in metabolic activity of the lymphoid cells is related to a lymphocytic reaction against the tumour will be discussed.*

ZUSAMMENFASSUNG

Es besteht ein schlüssiger Hinweis bei vielen Versuchstieren, daß es eine Reaktion des Wirtes gegen seine eigenen malignen Erkrankungen gibt, die über die Lymphozyten abläuft. Um die Möglishkeit einer solchen Reaktion von Lymphozyten auf maligne Tumoren beim Menschen zu untersuchen, wurden Studien über verschiedene Lymphozyteneigenschaften unter diesen Bedingungen unternommen. Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit Lymphomen und Carcinomen zeigten eine vermehrte DNS-Synthese bei der Aufnahmemessung von Tritium-markiertem Thymidin in vitro *unter Anwendung der Szintillationstechnik. Bei Hodgkin' scher Krankheit tritt diese vermehrte DNS-Synthese bei fast allen Patienten vor der Behandlung auf und ist in einigen Fällen bis zu* 40*-fach erhöht gegenüber einer Kontrollgruppe von Patienten. Der Anstieg der DNS-Synthese wird in Beziehung gesetzt zur Anwesenheit primitiver Lymphoidzellen in den Lymphozytenpräparaten. Die Möglichkeit, daß dieser Anstieg der Stoffwechselaktivität von Lymphoidzellen auf eine lymphozytäre Reaktion gegen den Tumor zurückzuführen ist, wird diskutiert.*

REFERENCES

1. J. G. Hall and B. Morris, The lymph-borne cells of the immune response. *Quart. J. exp. Physiol.* **48,** 235 (1963).
2. J. G. Hall, B. Morris, G. D. Moreno and M. C. Bessis, The ultrastructure and function of the cells in lymph following antigenic stimulation. *J. exp. Med.* **125,** 91 (1967).
3. V. P. Bond, T. M. Fliedner, E. P. Cronkite and G. Andrews, DNA synthesising cells in the blood of man and dog exposed to total body irradiation. *J. Lab. clin. Med.* **57,** 711 (1961).
4. S. W. A. Kuper and J. R. Bignall, Tritiated-thymidine uptake by tumour cells in blood. *Lancet* **i,** 1412 (1964).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 423–433. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

The Immunological Approach to the Treatment of Human Cancer*

G. MATHE, L. SCHWARZENBERG, J. L. AMIEL, M. SCHNEIDER, A. CATTAN and J. R. SCHLUMBERGER

Institut de Cancérologie et d'Immunogénétique, Hôpital Paul-Brousse† *and Service d'Hématologie de l'Institut Gustave Roussy*‡

AMONGST the all too few methods capable of destroying cancer cells are the immune reactions. These may be effected by the direct action of immuno-competent cells or via the humoral antibodies which they produce. However, though the oncolytic effect of these immune reactions had been demonstrated in experimental tumours many years ago, the serious scientific trial of immunotherapy as a treatment for cancer in man has until recently been a rare event.

The earlier experiments in animals were made mainly on tumours grafted into allogeneic hosts. It was thought that the immune responses obtained should just be considered to be the same as those directed against the grafts of normal tissues. There was little reason to suppose that such a reaction would be obtained in the case of a spontaneous cancer, for then the tumour would be isogeneic with respect to its host.

The discovery by Foley [1] that cancer cells carry new antigens and the subsequent confirmation of this work by many others, Prehn [2], Old and Boyse [3] and Klein [4] must be especially noted because it has generated a real feeling of enthusiasm in certain cancer specialists.

This important new concept of leukaemia specific antigens and the fact that chemotherapy, at present, can only effect a cure in two types of cancer, placental choriocarcinoma and African hematosarcoma, both of which are examples of intensive immune reactions [5–7] justifies fully the efforts of those few physicians who have tried to introduce various methods of immunotherapy in clinical practice.

Immunotherapy has a double role to play, preventive and curative.

I. *Preventive immunotheraphy.* Consists in avoiding the use of those treatments that reduce the effectiveness of the immune defence mechanisms. In clinical practice, we consider it a wise precaution to maintain a watch on the patients' immune responses throughout the course of treatment of malignant disease. We observe the reaction to BCG introduced into the skin every 4 or 8 days. An intensive treatment with steroids at high dose can suppress these reactions. Figure 1 summarizes the reactions of a patient to BCG in relation to treatment with steroids. Some other drugs used in cancer chemotherapy are able to inhibit the reactions to BCG, in particular azathioprin and cyclophosphamide [9].

II. *The curative role of immunotherapy.* Consists of either stimulating or inducing the patient own immune responses or giving him antibodies or immuno-competent cells.

*This work was carried out with the aid of "E.O.A.R.", contract No. 61(052)816 SA≠5, with the aid of "I.N.S.E.R.M.", contract no. CR. 66-235, and with the aid of "C.E.A." contract no. 8133/R.

†14, Avenue Paul-Vaillant-Couturier, 94-Villejuif, France.

‡16 bis, Avenue Paul-Vaillant-Couturier, 94-Villejuif, France.

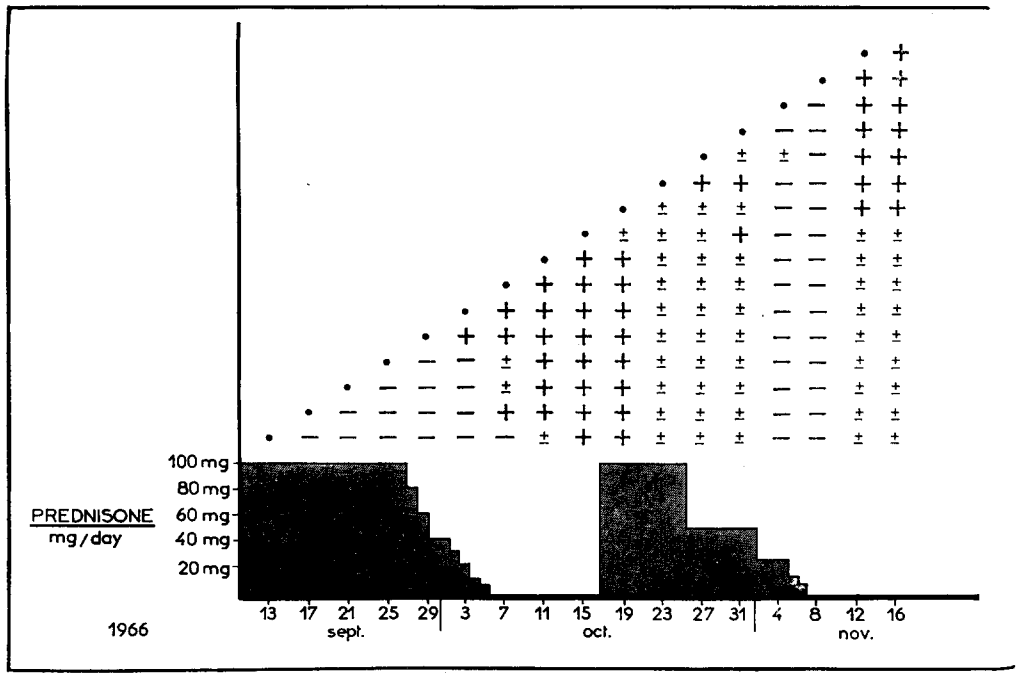


Fig. 1. *Effect of prednisone on the reaction to B.C.G.*
● *Vaccination;* + ± − *Reaction.*

Active immunotherapy is the stimulation or the initiation of immune responses. Passive immunotherapy is the administration of humoral immunological factors, either serum or immunoglobulins. Adoptive immunotherapy is the administration of immuno-competent cells.

(A) We have no experience with passive immunotherapy.

(B) *Active immunotherapy.* May be non-specific, consisting in stimulating the immune defences with adjuvants or specific, consisting in vaccinating the patients with leukaemic cells.

As adjuvant, we use BCG applied every 4th day in 20 scarifications each 5 cm long (Fig. 2) in which we put 2 ml of a suspension of 25 mg of living bacilli per millilitre. No untoward incidents have accompanied this treatment.

For specific vaccination, we give each week intradermal injections of 4×10^6 leukaemic cells, taken from patients in relapse and stored at −70°C. The cells used for the first ten injections are treated by formalin (to inactivate any hypothetical virus); the subsequent injections are of cells irradiated with 4000 rad. *in vitro*. The injections are well tolerated.

Out of 22 patients with acute lymphoblastic leukaemia in remission, who had been treated previously by prednisone and 7 chemotherapeutic agents (Fig. 3), 6 were still in remission at the end of this chemotherapy period: they were divided by randomisation into 3 groups. The first group (2 patients) was given no treatment. The second group (2 patients) was vaccinated with a pool of leukaemic cells. The third group (2 patients) was treated by BCG. Since then the two untreated patients have relapsed after 2 and 3 months in remission; the 2 patients given BCG remain in complete remission 18 and 24 months after cessation of drug treatment (Table 1). One of the patients "vaccinated" with leukaemic cells has remained in remission for more than 16 months; the other one for more than 10 months (Table 1).

These results are as yet preliminary: we are conducting a new trial in which the period of chemotherapy has been varied are shown in Fig. 4 while the period of immunotherapy is kept constant. The results of this trial are not available because the first patients are just at the beginning of this second period.

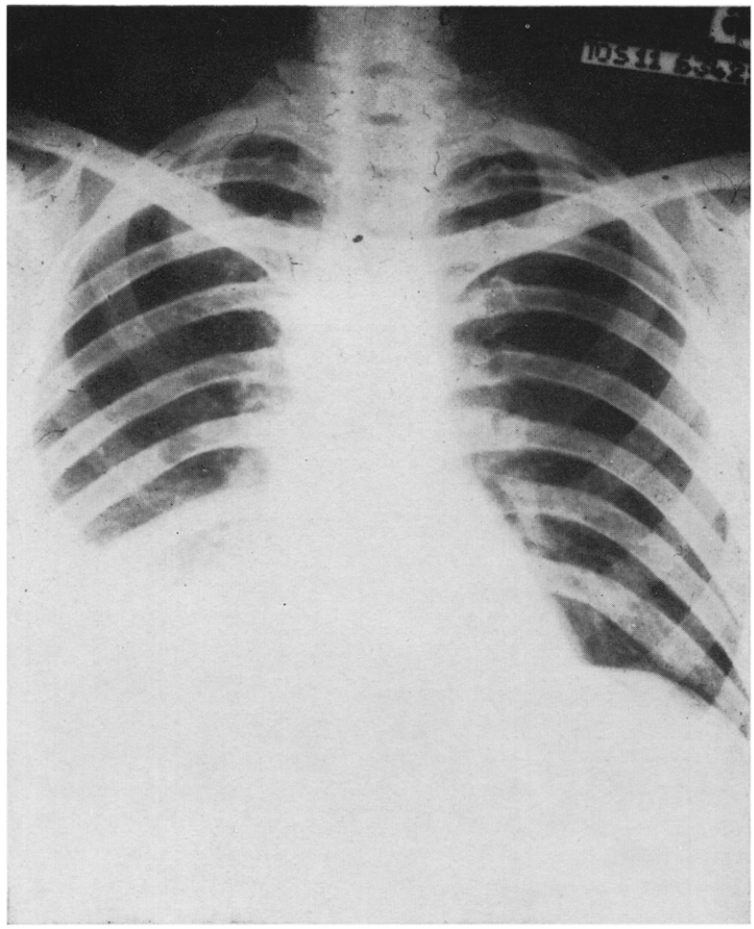
(C) Our experiments on mice with grafted leukaemia [10, 11], spontaneous leukaemia [12, 13], and viral leukaemia [14, 15] led us to the development of the concept of *adoptive immunotherapy* by showing (Fig. 5): (1) the antileukaemic effect of the reaction of allogeneic immuno-competent cells (B) against the leukaemic cells (a) carried out by a recipient (A); (2) the antileukaemic effect of the reaction of immuno-competent cells of a donor immunized against a leukaemogenic virus (α) on leukaemic cells (a) of the leukaemia induced in (A) by that virus (α); (3) the antiviral effect of immuno-competent cells (B) against that leukaemogenic virus (α).

Fig. 2. Appearance of a reaction to B.C.G.

(to face p. 424)

Fig. 7. Exfoliative dermatosis, which is typical of a secondary syndrome complicating allogeneic bone marrow graft. Macroscopical features.

Fig. 8. *Macroscopical features of the skin after white cell transfusions. The aspect is similar to the exfoliative dermatosis complicating an allogeneic bone marrow graft.*



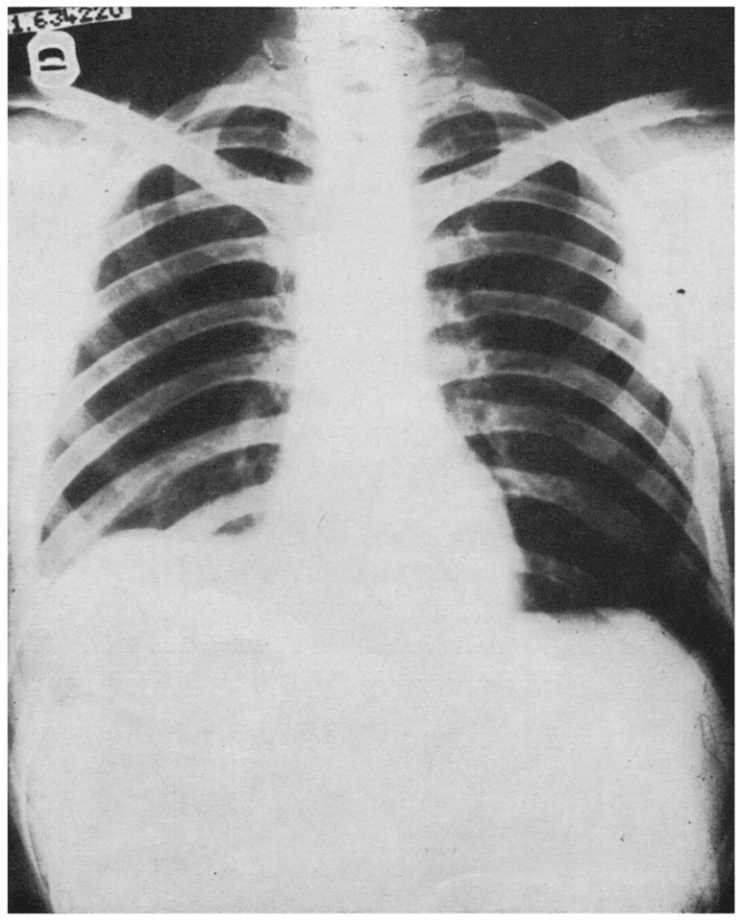


Fig. 10a. *and* 10b. *Results of a local immunotherapy of pleural effusion in a patient with Hodgkin's disease.*

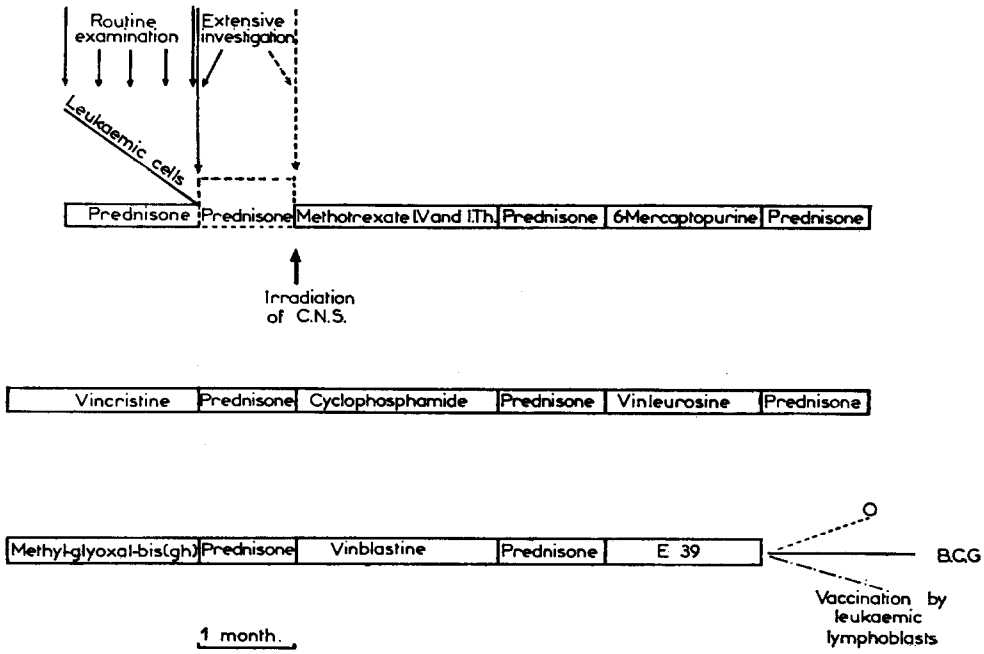


Fig. 3. *Schedule No.* 1 *of treatment of acute lymphoblastic leukaemia.*

They also showed the difficulty of taking advantage of this immunotherapeutic effect because of the graft-vs.-host reaction which ensues. In addition, they showed that the antileukaemic effect of the graft's reaction against the leukaemic cells is only marked when the number of leukaemic cells is small.

Finally, it should be mentioned that in recent experiments, we have achieved remarkable results by the use of adoptive immunotherapy, in the local treatment of neoplastic ascites by injecting normal or immunized semi-allogeneic lymphoid cells [16] or heterospecific [17] immunized lymphoid cells *in situ*.

Since 1958, we have been carrying out trials of adoptive immunotherapy in human leukaemias and lymphomas, based on the experimental results in mice. The research has been in 3 areas: (1) grafts on allogeneic bone marrow after irradiation in the patients with leukaemia; (2) transfusions of blood leucocytes; (3) injections of lymphoid cells in case of neoplastic pleuritis or ascites.

Our experience with *allogeneic bone marrow grafts* following irradiation [18–21] consists of 21 trials and the overall results are given in Table 2. The grafts have been proved by the methods indicated on Table 3.

The antileukaemic effect can therefore be analysed by studying four cases (Fig. 6) in which the patients survived the secondary syndrome.

In the two first patients an apparently complete remission was achieved. The first, whose leukaemia was of 20 months' duration, had had three remissions lasting 12 months, five months and three weeks respectively.

Table 1. *Effect of B.C.G. and administration of leukaemic cells in acute leukaemia*

	Duration of the Remission after chemotherapy has been stopped (months)	Total duration of the disease (months)
Controls	2	30*
	3	20*
B.C.G.	18	43
	24	57
Vaccination	10	67
	16	56

*Until the relapse of the disease.

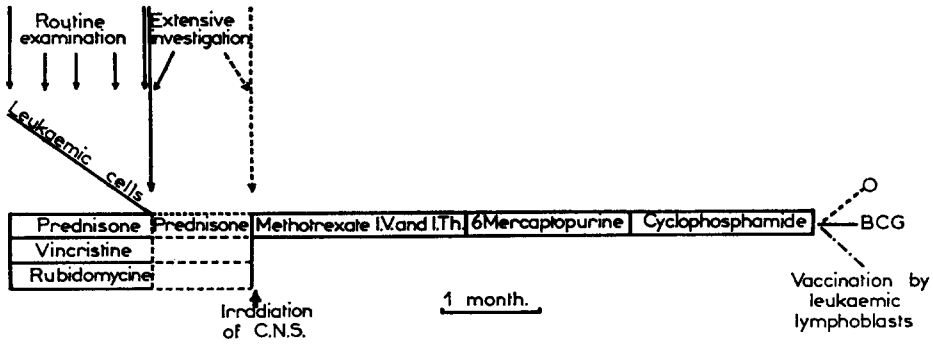


Fig. 4. Schedule No. 2 of treatment of acute lymphoblastic leukaemia.

After the graft he survived for 12 months, of which nine were of complete remission. The second patient, with leukaemia of 13 months' duration, who had two remissions of 8 months and 3 weeks respectively followed by a relapse when the trial was undertaken, survived for 9 months, including 5 months' complete remission. The third patient with leukaemia of 9 months' duration in whom the use of the various chemotherapeutic agents did not induce a second complete remission, died 12 months after the graft, after a complete remission of 6 months' duration. The fourth patient with leukaemia of 20 months' duration, had had two remissions of 11 months and one month respectively; he had entered a period of relapse at the time of irradiation; he was still in complete remission when he died from zoster encephalitis, 20 months after the graft. The autopsy revealed no sign of leukaemia.

In view of the frequency with which the grafts take, it will be seen that the real stumbling block in the way of application of bone marrow grafts to the treatment of leukaemia is the secondary syndrome, of which the main symptoms are the same as in other animal species. The skin manifestations are especially characteristic among them (Fig. 7). [22]

Observation, after *transfusions of leucocytes* given for symptomatic reasons, of phenomena (Fig. 8), similar to those of the secondary syndrome which occurs as a complication of allogeneic bone marrow grafts [23, 24], led us to think that the graft-vs.-host reaction could occur even in non irradiated recipients, and for that reason to try to obtain an antileukaemic effect from this reaction.

We therefore used leucocyte transfusions to treat patients suffering from acute leukaemia, which had been proved refractory to all the methods of treatment at present available. We used, as donors, patients with chronic myelocytic leukaemia.

We have now experience of 21 cases of acute leukaemia treated in this way. The antileukaemic effects observed are shown in Table 4. It can be seen that 10 remissions, including 7 complete ones (Fig 9) were obtained in the cases treated in this manner. In all the cases except one, the effect can be attributed with certainty to the leucocyte transfusions, because the patients had been resistant previously to the various agents available. The frequency with which signs of the graft-vs.-host reaction appeared and the good correlation between that reaction and

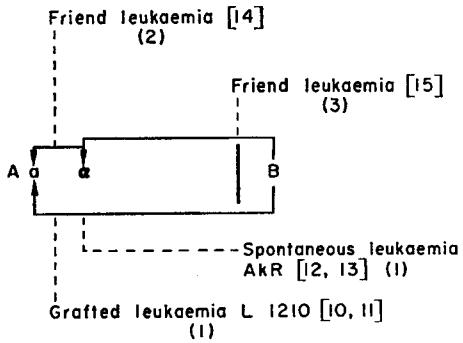


Fig. 5. Theoretical design of the basic of adoptive immunotherapy of acute leukaemia.

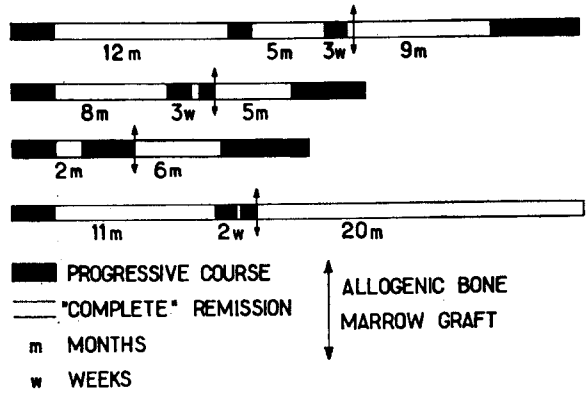


Fig. 6. The active phases and remissions in 4 patients treated by allogeneic bone marrow grafts and who had not died from marrow aplasia or the secondary syndrome.

Table 2. Attempts to graft bone marrow in leukaemic patients.

Total Results	
Number of attempts	21
Failure of the graft	6
(5 died with aplasia + 1 failure was followed by isogenic restoration)	
Grafts	15
Died with acute secondary syndrome	8
Died with subacute secondary syndrome,	
(Candida albicans septicemia)	1
(Varicella encephalitis)	1
Died with chronic secondary syndrome at 20 months,	
(Herpes zoster encephalitis)	1
Complicated by a controlled secondary syndrome, died with leukaemia	4

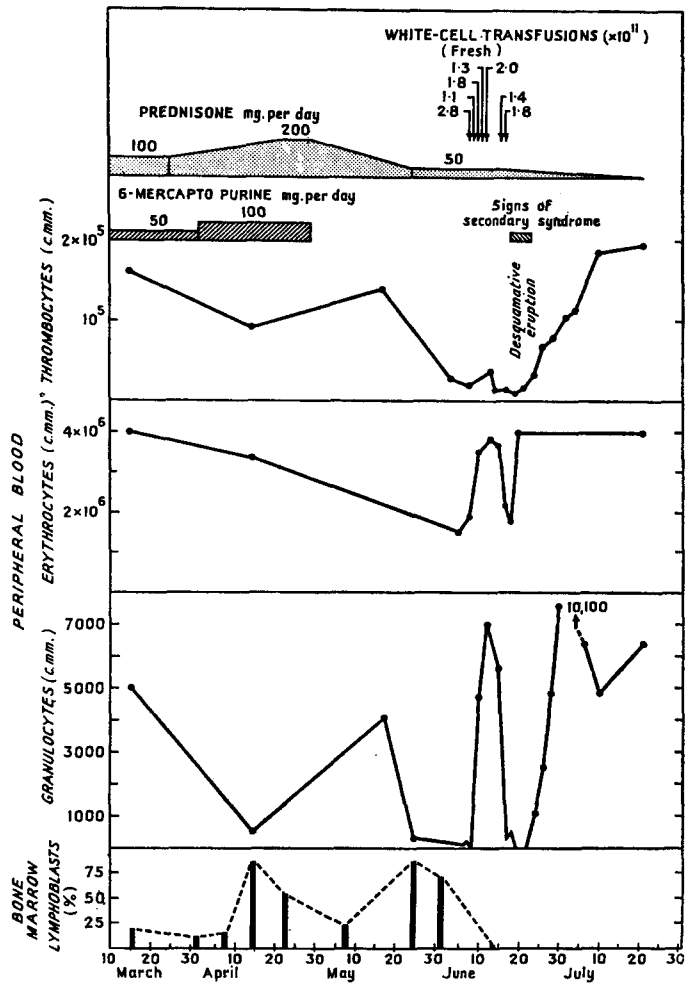


Fig. 9. Treatment of acute leukaemia by white cell transfusions.

Table 3. Proofs of the "take" of an allogeneic bone marrow graft in man

Red cell antigens*
Sex-associated polymorphonuclear drumsticks (19)
Sex-associated heterochromatic lobules of mononuclear cells†
Sex chromosomes (20)
Immunoglobulin groups (Inv) (20)
Specific tolerance linked with chimerism (20)

*Mathé, Jammet, Pendic, Schwarzenberg *et al.*, 1959.
†Seman, 1961.

Table 4. The nature of the leucocytes transfused into 21 patients with acute leukaemia and the overall results obtained

Type of leukaemia	Number of leucocytes Injeted	States of leucocytes injected (fresh, stored, incubated)	Final antileukaemic effect	Signs of secondary syndrome
Monocytic	$6{\cdot}3\times10^{10}$	Stored at −70°C		
Lymphoblastic	9×10^{10}	Stored at −70°C	Associated with Leurocristine. C.R. 15 days	
Lymphoblastic	1×10^{11}	Fresh		
Lymphoblastic	$1{\cdot}2\times10^{12}$	Fresh	Complete remission for 80 days	+
Lymphoblastic	$2{\cdot}5\times10^{11}$	Fresh	Incomplete remission for 8 days	
Myleoblastic	1×10^{11}	Stored at −70°C		
Monoblastic	8×10^{10}	Stored at 70—°C	Incomplete remission for 15 days	
Lymphoblastic	$2{\cdot}3\times10^{11}$	Stored at —70°C	Complete remission for 20 days	+
Lymphosarcoma transformed into acute leukaemia	1×10^{11}	Stored at −70°C	*	+
Lymphoblastic	$1{\cdot}8\times10^{11}$	Stored at −70°C	Complete remission for 4 months	+
Myeloblastic	$9{\cdot}4\times10^{11}$	Fresh	Complete remission for 10 days	
Monoblastic	$7{\cdot}1\times10^{11}$	Fresh	Complete remission for 7 days	+
Lymphoblastic	$2{\cdot}6\times10^{11}$	Fresh	Incomplete remission for 7 days	+
Lymphoblastic	$2{\cdot}6\times10^{11}$	Stored at −70°C		—
Lymphoblastic	$2{\cdot}0\times10^{11}$	Stored at —70°C		
Lymphoblastic	$5{-}0\times10^{11}$	Stored at —70°C		
Lymphoblastic	$1{\cdot}0\times10^{11}$	Stored at 70°C —		
Myeloblastic	$3{\cdot}5\times10^{11}$	Stored at —70°C		
Lymphoblastic	$9{\cdot}8\times10^{11}$	Incubated 2hr at 37°C		
Lymphoblastic	$9{\cdot}4\times10^{11}$	Incubated 2hr at 37°C	Complete remission for 8 days	+
Lymphoblastic	6×10^{11}	Incubated 2hr at 37°C		

*Left hospital after 2 days.
†Cutaneous signs absent.

the antileukaemic effect (Table 5) give reasons for attributing the effect to the reaction.

The remarkable results recorded in mice treated for tumour ascites by means of *local injection of heterospecific lymphoid cells* if the donor is immunized, led us to treat 12 patients suffering from neoplastic pleural or peritoneal effusion by splenic cells of rabbits immunized by cells previously isolated from the pleural or peritoneal fluid. The injections were given by the intrapleural or intraperitoneal routes and were sometimes followed by a febrile reaction. One peritoneal and one pleural effusion in patients suffering respectively from lymphosarcoma and Hodgkin's disease, were thus successfully decreased (Fig. 10a and 10b) [25].

III. *The prospects of immunotheraphy.* These are not limited only to the assumptions on which present clinical trials have been based and it is hoped that new methods which have been shown useful in animal experiments can be applied to man.

(A) *Active immunotherapy.* Adjuvants other than BCG have been shown to be useful and merit trial as *non specific* active immunotherapy agents in man. Such agents are *Bordetella pertussis* and *Corynebacterium parvum* [26]. *Specific* active immunotherapy is the object of work on the conservation of the antigenicity of cells used for vaccination while at the same time suppressing their proliferative ability or if possible modifying their antigens to increase antigenicity without reducing specificity. Among

Table 5. The immunotherapeutic effect of leucocyte transfusions. Relation between the anti-leukaemic action and the existence of a secondary syndrome

	Secondary syndrome		
	Complete remissions	Incomplete remissions	No effect
Secondary syndrome present : 6 : (7)*	3 (4)*	2	1 (?)†
Absence of the signs of a secondary syndrome	1‡	2	11

*In one patient the cutaneous signs were absent.
†The patient was removed from the hospital by his family after 2 days.
‡Patient in which there was a severe digestive upset.

N.B. The diagnosis of a secondary syndrome was based on strict criteria, in particular the existence of a skin eruption, which is typical both macroscopically and histologically. This rash may or may not be accompanied by other signs, i.e. digestive tract disturbance of other generalized illness etc. It was noted that a complete remission did not occur unless it was accompanied by cutaneous signs * or variable digestive upsets‡.

work of this kind Jasmin *et al.* [27, 28] working in our laboratory have reported encouraging results using iodo-acetamide.

(B) *Passive immunotherapy.* Trials of immunoglobulins from antilymphocyte serum are at present under way. These sera have been used in attempts at allogenic transplantation [29]. This method of conditioning is not only proved useful in the induction of tolerance but results in a fall in lymphocyte count. It is in addition generally well tolerated. Although immune sera are usually useless and even sometimes dangerous in the case of solid tumours, due to the phenomenon of immunological enhancement, sera are readily prepared in animals which are cytotoxic as far as leukaemias are concerned. These sera are prepared by immunizing heterospecific, allogenic or even isogenic recipients. As such serum is only effective *in vivo* when the number of neoplastic cells is small [30], it would be of interest to carry out therapeutic trials in man under similar conditions, that is at the beginning of the remission as a complementary treatment of chemotherapy.

(C) *Adoptive immunotherapy.* Progress along various lines has been made as a result of animal experiments: for example, incubation of allogeneic lymphoid cells at 37°C considerably reduces both the frequency and gravity of the secondary syndrome (which is no longer seen after 2 hr incubation) [31]. The treatment of leukaemic animals with fresh allogeneic lymphoid cells eradicated the neoplasm but kills them of secondary syndrome. One hour incubation seems to reduce the secondary syndrome inductive effect more than the antileukaemic effect and the survival of the animal is prolonged [32].

(D) *Local adoptive immunotherapy of neoplastic ascites.* By placing allogeneic lymphoid cells in a diffusion chamber we have obtained notable results in the ascitic form of L 1210 leukaemia [16]. These results suggest that a humoral factor, either a protein or some other factor, was responsible and suggest further lines of investigation which may lead to a simplified method of local immunotherapy in man.

(E) *The greatest effort is being directed towards attempts to increase the specificity of immunization with respect to the neoplastic cells.* Haddow and Alexander [33] treated chemically induced sarcomata in rats with heterospecific lymphoid cells from donors immunized by tumour fragments from the recipient and they obtained remarkable results. We have carried out two clinical trials with Alexander *et al.* (unpublished work) in which patients with melanomas have been treated with lymphoid cells from sheep immunized against the tumours of the patients. No regression occurred and the trial was very poorly tolerated in two patients (fever, vomiting, hypotension) perhaps because of immunization of the donors by normal antigens of the recipient.

Several methods are under investigation for immunizing donors specifically against the neoantigens of neoplastic cells: (a) the immunization of the donor of serum or immunocompetent cells by cancer cells after the subject has been first made tolerant towards the normal cells of the cancer-bearing subject; (b) the immunization of the donor of serum or immuno-competent cells or of the cancer

bearing subject by the neo-antigen of the cancer cells: Jollès *et al.* (unpublished work) at the Institute of Cancerology and Immunogenetics are attempting to extract this antigen (in preliminary experiments the antigen has been shown to prevent the development of the Friend leukaemia when previously injected into the animals as a vaccination).

It is not certain that the immunization of donors of immuno-competent cells is of value in all cases: (a) in experiments on the mouse with local immunotherapy, although we have shown the benefit of immunization of donors of heterospecific lymphoid cells, we have obtained in the case of allogeneic adoptive immunotherapy the same results with immunized and unimmunized donors [16, 17]; (b) in the case of experiments on local and general adoptive allogenic immunotherapy, we have obtained better results by immunizing the donors against the normal antigens of the recipient than by immunizing against the leukaemic cells; (c) finally, results which we have recently reported [34, 35] unfortunately suggest that the neoantigens of neoplastic cells are not specific to the tumour tissue.

This appears to reduce the possibility of an eventual specific immunotherapy, although it does not detract from the possible usefulness of immunotherapeutic methods. It means however that suppression of the danger of immunotherapy due to its immunological effects on normal tissues may not be possible. If immunotheraphy develops as an effective therapeutic method it will probably remain a method difficult to manage.

In conclusion, it is still too early to foresee the future development of leukaemia immunotherapy and its eventual indications. Certain of the techniques which are the most active are not free of risks: however the same could probably be said of certain other procedures at their outset. The first tentative steps in clinical immunotherapy have been taken; further steps must necessarily be taken cautiously and clinical trials must be based on assumptions derived from firm biological data.

RESUME

L'immunothérapie doit avoir une double visée: préventive et curative. L'immunothérapie préventive *consiste à éviter que les traitements, notamment l'hormonothérapie et la chimiothérapie, ne réduisent les défenses immunitaires; les auteurs suivent ces défenses par des vaccinations répétées au BCG et montrent que certains composés, certains modes d'administration, peuvent les inhiber, tandis que d'autres les laissent intacts.*

L'immunothérapie à visée curative, *peut être active, passive, ou adoptive. L'immunothérapie active peut consister en stimulation non spécifique des défenses immunitaires par le BCG, ou en vaccination par des cellules néoplasiques; les auteurs appliquent ces méthodes aux leucémies aiguës pendant les rémissions. L'immunothérapie passive consiste en l'administration de sérum et de gammaglobulines. L'immunothérapie adoptive peut consister notamment en l'utilisation de la réaction du greffon contre l'hôte; celle-ci est employée dans le cas de greffe de moelle osseuse ou de transfusion de globules blancs. Les résultats obtenus dans le traitement des leucémies aiguës sont rapportés. Elle peut consister en l'administration de cellules immunocompétentes de donneurs hétérospécifiques immunisés; de remarquables résultats dans le traitement local de pleurésies ou d'ascites néoplasiques sont rapportés.*

SUMMARY

Immunotherapy must have two aims: preventive and curative. Preventive *immunotherapy consists in the avoidance of treatments, especially hormonotherapy and chemotherapy, which reduce the immune defences; the authors study these defences by repeated vaccinations with BCG and show that some compounds, some methods of administration can inhibit them while others do not.*

Immunotherapy with a curative *purpose can be active, passive or adoptive. Active immunotherapy consists of non-specific stimulation of the immune defences by BCG or by vaccination with neoplastic cells; the authors use these methods in case of acute leukaemia during remission. Passive immunotherapy consists of giving serum and immunoglobulins. Adoptive immunotherapy can be by use of the graft versus host reaction; this method is used in case of bone marrow graft or white cells transfusions. The results obtained in case of acute leukaemia have been reported. It can consist of injections of immuno-competent cells*

from heterospecific immunized donors; remarkable results were obtained in the local treatment of pleural effusion or neoplastic ascites.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Immuntherapie hat zwei Ziele: ein praeventives und ein curatives.
Die praeventive Immuntherapie muß solche Behandlungsformen vermeiden, die die Immunabwehr schwächen, besonders die Hormontherapie und die Chemotherapie. Die Autoren untersuchen diese Abwehrmechanismen durch wiederholte Impfungen mit BCG und zeigen, dass einige Substansen und Verabreichungsformen sie hemmen und andere nicht. Die Immuntherapie mit curativem Ziel kann aktiv, passiv oder adoptiv sein. Die aktive Immuntherapie besteht in einer nicht spezifischen Stimulierung der Immunabwehr durch Impfung mit BCG oder Tumorzellen. Die Verff. verwenden diese Methode bei akuter Leukämie während der Remission. Zur passiven Immuntherapie werden Serum und Immunglobulin gegeben. Eine adoptive Immuntherapie kann in der Ausnutzung einer Reaktion Transplantat — Wirt bestehen. Dies geschieht bei Knochenmarkstransplantationen oder Leukozytentransfusionen. Es wird über Ergebnisse bei akuter Leukämie berichtet. Sie kann in der Injektion immunkompetenter Zellen von heterospezifisch immunisierton Spendern bestehen. Beachtliche Erfolge wurden in der Lokalbehandlung von neoplastischen Pleura- oder Peritionealergüssen erzielt.

REFERENCES

1. E. J. Foley, Antigenic properties of methyl-cholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* **13,** 835 (1953).
2. R. T. Prehn, Tumor specific immunity to non viral tumors, *Canad. Cancer Conf.* **5,** 387 (1963).
3. L. J. Old and E. A. Boyse, Immunology of experimental tumors, *Ann. Rev. Med.* **15,** 167 (1964).
4. G. Klein, Recent trends in tumour immunity, *Israel J. med. Sci.* **2,** 135 (1966).
5. G. Mathe, J. Dausset, E. Hervet, J. L. Amiel, J. Colombani and G. Brule, Immunological studies in patients with placental choriocarcinoma, *J. nat. Cancer Inst.* **33,** 103 (1964).
6. J. L. Amiel, A. M. Mery and G. Mathe, Les réponses immunitaires chez des patientes atteintes de choriocarcinome placentaire. Corrélation entre ces réponses et l'évolution de la maladie, *Coll. Immunosuppressions Hématologiques. Liège* (1967).
7. G. Klein, P. Clifford, E. Klein and J. Stjernsward, Search for tumour specific immune reactions in Burkitt lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction, *Symp. U.I.C.C.*, Kampala (Ouganda) (1966).
8. J. L. Amiel, M. Sekiguchy, G. Daguet, S. Garattini and V. Palma, Étude de l'effet immunodépresseur des composés chimiques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, *Europ. J. Cancer* **3,** 47 (1967).
9. G. Mathe, M. Hayat, M. Schneider, J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, A. Cattan, J. R. Schlumberger and S. Fajbisowicz, Etude par le test au BCG de l'effet des chimiothérapies anticancéreuses sur les défenses immunitaires, *Brit. med. J.*, in press (1967).
10. G. Mathe and J. Bernard, Essai de traitement de la leucémie L 1210 par l'irradiation X suivie de transfusions de cellules hématopoïétiques normales (isologues ou homologues, lymphoïdes ou myéloïdes, adultes ou embryonnaires). *Rev. franç Etude clin. biol.* **4,** 442 (1959).
11. G. Mathe, J. L. Amiel and J. Niemetz, Greffe de moelle osseuse après irradiation chez des souris porteuses de leucémie suivie de l'administration d'un produit antimitotique, *C.R. Acad. Sci.* **54,** 3603 (1962).
12. G. Mathe and J. Bernard, Essai de traitement par l'irradiation X suivie de greffe de cellules myéloïdes homologues de souris atteintes de leucémie spontanée très avancée, *Bull. Cancer* **45,** 289 (1958).
13. G. Mathe, J. L. Amiel and J. Bernard, Traitement de souris AkR à l'âge de 6 mois par irradiation totale suivie de transfusions de cellules hématopoiétiques homologues. Incidences respectives de la leucémie et du syndrome secondaire, *Bull Cancer* **47,** 331 (1960).

14. G. MATHE, J. L. AMIEL and Ch. FRIEND, Essai de traitement de la leucémie de Charlotte Friend par la greffe de cellules hématopoïétiques de donneurs vaccinés, *Bull. Cancer* **49,** 416 (1962).
15. G. MATHE and J. L. AMIEL, Réduction de la concentration plasmatique du virus de Charlotte Friend par immunothérapie adoptive, *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **259,** 4408 (1964).
16. G. MATHE, Immunothérapie adoptive locale de la leucémie L 1210 ascitique par des cellules lymphoïdes allogéniques libres ou en chambre de diffusion, immunisées ou non contre des cellules leucémiques ou des cellules DBA/2 normales, *Rev. franç Etude clin. biol.*, in press (1967).
17. G. MATHE, Immunothérapie adoptive locale de la tumeur BP 8 ascitique chez la souris, *Rev. franç Etude clin. biol.* **19,** 1027 (1966).
18. G. MATHE, J. BERNARD, L. SCHWARZENBERG, M. J. LARRIEU, C. LALANNE, A. DUTREIX, P. DENOIX, J. SURMONT, V. SCHWARZMANN and B. CEOARA, Essai de traitement de sujets atteints de leucémie aigüe en rémission par irradiation totale suivie de transfusion de moelle osseuse homologue, *Rev. franç. Etude clin. biol.* **4,** 675 (1959).
19. G. MATHE, J. BERNARD, M. J. de VRIES, L. SCHWARZENBERG, M. J. LARRIEU, C. LALANNE, A. DUTREIX, J. L. AMIEL and J. SURMONT, Nouveaux essais de greffe de moelle osseuse homologue après irradiation totale chez des enfants atteints de leucémie aiguë en rémission, *Rev. Hémat.* **15,** 115 (1960).
20. G. MATHE, J. L. AMIEL, L. SCHWARZENBERG, A. CATTAN and M. SCHNEIDER, Haematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone marrow transplantation (control of the secondary syndrome, specific tolerance due to the chimerism), *Brit. med. J.* **ii,** 1633 (1963).
21. G. MATHE, J. L. AMIEL, L. SCHWARZENBERG, A. CATTAN, M. SCHNEIDER, M. J. de VRIES, M. TUBIANA, C. LALANNE, J. L. BINET, M. PAPIERNIK, G. SEMAN, M. MATSUKURA, A. M. MERY, V. SCHWARZMANN and A. FLAISLER, Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism induced specific tolerance and possible antileukaemic effects, *Blood* **25,** 279 (1965).
22. G. MATHE, M. J. de VRIES, L. SCHWARZENBERG, J. L. AMIEL, A. CATTAN, M. SCHNEIDER, J. L. BINET, M. TUBIANA, C. LALANNE, V. SCHWARZMANN and R. NORDMANN, Les divers aspects du syndrome secondaire compliquant les transfusions de moelle osseuse ou de leucocytes allogéniquees chez des patients atteints d'hémopathies malignes, *J. Europ cancer* **1,** 75 (1965).
23. L. SCHWARZENBERG, G. MATHE, J. L. AMIEL, A. CATTAN, M. SCHNEIDER and J. R. SCHLUMBERGER, Adoptive immunotherapy by transfusions of leucocytes, *Lancet* **ii,** 365 (1966).
24. L. SCHWARZENBERG, G. MATHE, J. de GROUCHY, C. de NAVA, M. J. de VRIES, J. L. AMIEL, A. CATTAN, M. SCHNEIDER and J. R. SCHLUMBERGER, White blood cell transfusions, *Israel J. med. Sci.* **1,** 925 (1965).
25. G. MATHE, L. SCHWARZENBERG, J. L. AMIEL, M. SCHNEIDER, A. CATTAN and J. R. SCHLUMBERGER, Curability of leukaemia: some recent approaches in *perspective in leukaemia*, Symposium New-Orleans (1966).
26. M. F. A. WOODRUFF and J. L. BOAK, Inhibitory effect of injection of Corynebacterium parvum on the growth of tumour transplants in isogenic hosts, *Brit. J. Cancer* **20,** 345 (1966).
27. C. JASMIN, C. PITTON and C. ROSENFELD, Action de l'iodoacétamide sur le virus de Rauscher, *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **264,** 511 (1967).
28. C. JASMIN, C. ROSENFELD et C. PITTON, Effet de l'iodoacétamide sur les cellules tumorales non virales ou virales, *Rev. franç. Etude clin. Biol.*, in press (1967).
29. Y. IWASAKI, K. A. PORTER, J. A. AMEND, T. L. MARCHIORO, V. ZUHLKE and T. E. STARZL, The preparation and testing of horse antidog and antihuman antilymphoid plasma or serum and its protein fractions, *Surgery* **124,** 1 (1967).
30. P. A. GORER and D. B. AMOS, Passive immunity of mice against C57B1 leukosis EL.4 by means of iso-immune serum, *Cancer Res.* **16,** 338 (1956).
31. G. MATHE, J. L. AMIEL, L. SCHWARZENBERG, J. F. DORE, M. SEKIGUCHI and J. M. BECHET, Effets de l'incubation à 37°C pendant deux heures sur la capacite de réactivité des cellules immuno-compétentes, *Nouv. Rev. Fr. Hématol* **6,** 657 (1966).
32. G. MATHE, Immunothérapie adoptive de la leucémie L 1210 par des cellules lymphoïdes allogéniques incubées a 37°C, *Rev. franç. Etude clin. biol.*, in press (1967).

33. A. HADDOW and P. ALEXANDER, An immunological method of increasing the sensitivity of primary sarcoma to local irradiation with X-rays, *Lancet* **i,** 452 (1964).
34. G. MATHE, Antigénicité nouvelle démontrée par isogreffe d'un fragment de peau prélevé cinq jours après injection intradermique de di-méthylbenzanthracène, *Rev. franç. Etude clin. biol.*, **12,** in press (1967).
35. G. MATHE, Antigénicité nouvelle démontrée par isogreffe d'un fragment de peau prélevé chez des souris infectées par un virus leucémigène, *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, in press (1967).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 435–436. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Letter to the Editor

Malignant Lymphomas and Renal Changes in Swiss Mice Given Nitrosomethylurea

B. TERRACINI and A. STRAMIGNONI
Istituto di Anatomia e Istologia Patologica
Università di Torino, Torino, Italy

THE CARCINOGENICITY of nitrosomethylurea (NMUrea) has been repeatedly demonstrated *in vivo* [1–4] and *in vitro* [5]. In rats, repeated intravenous injections of the related chemical nitrosoethylurea induced leukaemias of different types [1]. In the present experiment malignant lymphomas have been produced by NMUrea after subcutaneous injection to less than 20-hr-old randombred Swiss mice.

Experimental details and main results are included in Table 1. NMUrea (kindly provided by Mr. P. F. Swann, Medical Research Council, Carshalton, Surrey) was given at doses of either 100 or 50 μg (respectively about 66 and 33 mg/kg). The highest dose killed all the mice in 8–18 days. At 50 μg, 19 of the original 24 animals were alive at weaning. They were obviously smaller than mice given the solvent only and than untreated controls. They died or were killed in poor conditions before the 22nd week of life. A total of 15 mice of this group had a poorly differentiated lymphosarcoma (Fig. 1) involving the thymus and one or more among the following organs: myocardium, lung, spleen, lymph nodes, liver, kidney and bone marrow. Almost all mice showed also non neoplastic renal changes, i.e. a reduction of cell number and marked thickening of the basal membranes in the glomeruli, which appeared partly hyalin and strongly PAS positive (Fig. 2). Some mice also showed renal cysts with thick basal membranes lined by flat epithelium or devoid of epithelial lining. Hair loss and diarrhoea were not noticed. Two mice of each sex failed to develop malignant lymphomas: they were underweight and showed renal changes as their tumour-bearing littermates. In untreated Swiss mice bred in this laboratory, glomerulosclerosis appear only occasionally and late in life.

In another experiment which is still under way, 24 male Swiss mice aged 12 weeks were given NMUrea as a single subcutaneous injection of either 50 or 100 mg/kg. They are now 50-week-old: 9 of 15 mice at the lower dose and 2 of 9 at the higher dose are surviving. Thirteen animals died after the 24th week of life: 10 among these (5 at each dose level) had a malignant lymphoma. Another mouse given the highest dose had a subcutaneous sarcoma. Glomerular changes were only occasionally seen in the kidneys of these mice and were mild.

The ability of NMUrea to produce malignant lymphomas after neonatal administration is comparable to that of polycyclic hydrocarbons [6] and urethane [7]. On the contrary, another nitroso compound, i.e. nitrosodimethylamine, when given to newborn mice of the same strain, produced hepatic and pulmonary but no lymphatic tumours [8].

The glomerular changes produced by NMUrea are similar to those described after irradiation [9], both factors being more effec-

Table 1. *Carcinogenicity of a single subcutaneous injection of nitrosomethylurea to newborn swiss mice*

No. of litters	Dose NMUrea	Survivors at weeks 0	5	30	Average weight at 6 weeks (in g) f	m	Mice dying with malignant lymphoma and week of death
2	100 μg	16	0	0			0
3	50 μg	24	19	0	11·6	13·8	15* (11, 12, 13, 15, 15, 16, 18, 18, 18, 19, 19, 21, 21, 22, 22)
1	Solvent only	8	8	8	17·7	22·2	0
	Untreated controls		119	117	19·7	22·7	2 females (29, 30)

*Animals of both sexes considered together

tive in newborn than in adult mice. Their relation with the malignant lymphomas requires further studies: in the present series renal changes were also found in mice without malignant lymphomas and were much less pronounced in tumour-bearing animals which had been treated with NMUrea when adults.

The present investigation has been aided by a grant from the Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research.

REFERENCES

1. H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic and D. Schmähl, Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-ratten. *Z. Krebsforsch.* **69,** 103 (1967).
2. K. Herrold, Carcinogenic effect of N-methyl-N-nitrosourea administered subcutaneously to Syrian Hamsters. *J. Path. Bact.* **92,** 35 (1966).
3. D. D. Leaver, P. F. Swann and P. N. Magee, The induction of tumours in the rat by a single oral dose of nitrosomethylurea. Synopses of papers presented at the 113*th Meeting of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, p. 5 (1966).
4. A. Graffi, F. Hoffmann and M. Schutt, N-methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature (Lond.)* **214,** 611 (1967).
5. F. K. Sanders and B. O. Burford, Morphological conversion of cells *in vitro* by N-nitrosomethylurea. *Nature (Lond.)* **213,** 1171 (1967).
6. G. Pietra, H. Rappaport and P. Shubik, The effects of carcinogenic chemicals in newborn mice. *Cancer* **14,** 308 (1961).
7. L. Fiore-Donati, L. Chieco-Bianchi, G. De Benedictis and G. Maiorano, Leukaemogenesis by urethan in newborn Swiss mice. *Nature (Lond.)* **190,** 278 (1961).
8. B. Terracini, G. Palestro, M. Ramella-Gigliardi and R. Montesano, Carcinogenicity of dimethylnitrosamine in Swiss mice. *Brit. J. Cancer* **20,** 871 (1966).
9. P. H. Guttman and H. I. Kohn, Age at exposure and the acceleration of intercapillary glomerulosclerosis in mice. *Lab. Invest.* **12,** 250 (1963).

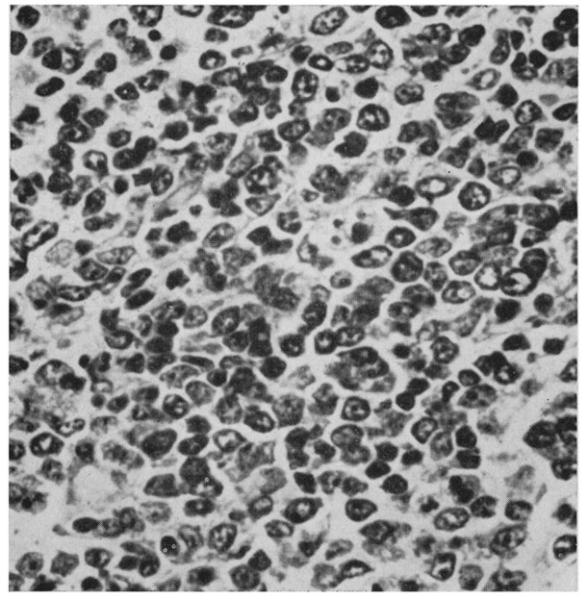


Fig. 1. *Characteristic aspect of lymphoma* ($\times 565$).

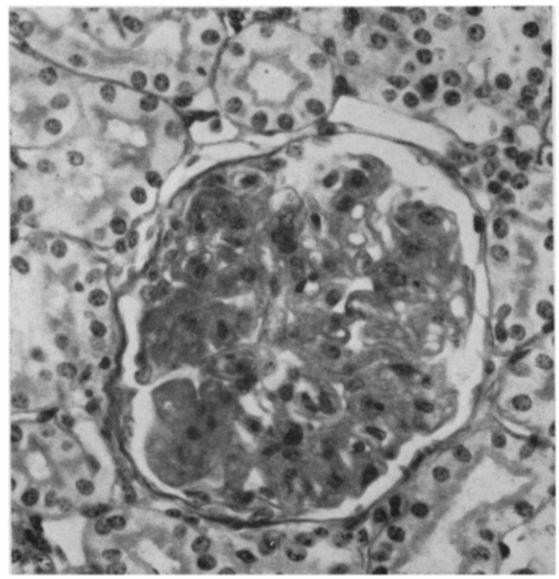


Fig. 2. *Glomerular lesion* ($\times 390$).

(to face p. 436)

Europ. J. Cancer Vol. 3, p. 437. Pergamon Press 1967. Printed in Great Britain

Lettre à l'Editeur

Essai de Traitement du Myélome Multiple par une Méthylhydrazine

ORGANISATION EUROPÉENNE DE RECHERCHE SUR LE TRAITEMENT DU CANCER (G.E.C.A.)

L'ESSAI a porté sur 20 malades âgés de 31 à 72 ans. Dans tous les cas, la maladie avait été affirmée par une étude de la moelle osseuse, une radiographie du squelette, et une étude immuno-électrophorétique.

Le traitement a comporté l'administration d'une méthylhydrazine† à la dose habituelle de 300 mg/jour par voie orale. Dans deux cas, le traitement a été interrompu précocement au bout de 11 et 13 jours, du fait d'une leucopénie dans l'un des cas, et d'une intolérance digestive dans le second. La durée totale du traitement, pour les 18 autres malades, a été de 23 à 45 jours dans 16 cas, et de 120 à 150 jours dans 2 cas. En dehors de quelques troubles digestifs, la toxicité du produit s'est essentiellement manifestée par une leucopénie qui n'a été sèvére que dans 9 cas; celle-ci n'est apparue d'ailleurs qu'en fin de traitement. Les résultats ont été appréciés en tenant compte des douleurs, mais surtout de modifications objectives de la vitesse de sédimentation, des données sérologiques et de la plasmocytose médullaire. Les résultats ont été classés en "échec total", "échec partiel", "rémission incomplète" et "rémission complète". Au total, sur 20 malades traités, on a observé 17 échecs totaux et 3 échecs partiels. Ces derniers consistaient en une diminution relative des douleurs, des anomalies protidiques et de la plasmocytose médullaire.

Il nous semble justifié de conclure que le produit n'a pratiquement pas d'action sur le myélome multiple. En effet, dans un essai simple où on ne prend pas de témoins, le calcul montre que pour ne pas laisser échapper un produit qui aurait une efficacité d'au moins 15%, il faut donner ce médicament à un nombre minimum de 15 malades. Si aucun succès n'est observé sur 15 malades successifs, on peut rejeter le produit avec un risque d'erreur de 10%.

*Travail du Groupe Coopérateur "Leucémies et Hématosarcomes".

Ont participé à cet essai, les Services de Messieurs:
— J. BOUSSER (Hotel-Dieu, Paris)
— P. CROIZAT et L. REVOL (Hopital Edouard-Herriot, Lyon)
— H. GERHARTZ (Berlin)
— Y. KENIS (Institut Jules-Bordet, Bruxelles)
— C. H. W. LEEKSMA (La Haye)
— G. MARCHAL (Paris)
— G. OBRECHT (Freiburg, Allemagne)
— G. MATHE (Sce d'hématologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif)
— W. H. STEINFERT-KROESE (Rotterdam)
— S. WITTE (Erlangen, Allemagne)
— Unité de Recherches Statistiques (Villejuif) (Directeur D. SCHWARTZ)

†L'Ibenzméthysine 1 méthyl-2-*p*-isopropyl-carbonmyl-benzyl-hydrazine (Natulan®).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 439–448. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

The Interpretation of Abnormal Sexchromatin Incidence in Human Breast Tumors on the Basis of DNA Measurements*†

ALICE KALLENBERGER‡, A. HAGMANN‡ and C. DESCOEUDRES§

‡*Department of Anatomy of University of Basel*

§*Clinic of Gynaecology, Liestal, Switzerland*

THIS paper deals with two questions:

(1) What kind of changes in the nuclei are responsible for the appearance of abnormal sexchromatin incidence in breast tumors of human females?

(2) Does abnormal sexchromatin incidence in these tumors show any relation to the course of the disease, especially to the rate of survival?

As an approach to these problems we first analysed the variability of sexchromatin incidence in benign and malignant mammary tumors of human females and up to now we have examined approximately 500 cases [1–3]. The fact that in breast cancer the sexchromatin counts may vary from the normal level in the range of about 70% of sexchromatin positive nuclei to almost entire loss of them is now generally accepted, as well as the occurrence of nuclei with more than one sexbody, or with multiple big chromocenters in a considerable number of breast cancer [4–16]. On the other hand the interpretation of these anomalies is still a matter of controversy, although a relation between cellular differentiation and sexchromatin picture was often postulated [5–8, 12–14]. The fact that histological differentiation is not clearly related to sexchromatin incidence still seems to contradict this idea. Atkin *et al.* [17–20], in investigations concerning mainly tumors of the uterus, have shown evidence for a correlation between ploidy grade and sexchromatin incidence: the near diploid cancers having more often normal sexchromatin counts compared to the near tetraploid ones.

These results and the observation that sexchromatin negative tumors are mainly composed of large nuclei [21]—observed too by Atkin and Gropp [22, 23] — led us to the hypothesis that sexchromatin anomalies in breast cancer may be caused by alterations of the chromosomal compliments [21, 24, 25].

INTERPRETATION OF SEXCHROMATIN INCIDENCE

To answer the first question concerning the nuclear changes responsible for the appearance of abnormal sexchromatin incidence in breast tumors, we analysed 20 normal mammary glands, 8 benign tumors and 60 breast carcinomas by measuring sexchromatin incidence, nuclear size, DNA content and mitotic index.

Methods

The mitotic index was calculated from Feulgen stained sections by counting at least 1000 nuclei along a straight line and noting

*Presented at the Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours, Rome, April 24–26, 1967.

†This work was supported by a grant from the Fritz Hofmann-La Roche Foundation, Basel, No. 91, and by grant No. 3957 from the Swiss National Foundation for Scientific Research.

separately prophases, metaphases and anaphases touched by the line. The index is defined as the number of dividing nuclei per 1000. Mitotic index 0 means that no mitoses have been found in 5000 cells.

For all the other investigations Feulgen stained impression prints were used. These preparations present intact nuclei which facilitate the sexchromatin counts and permit the use of the same nuclei for additional investigations.

Sexchromatin incidence. At least 100 nuclei were counted and classified as negative (−) and positive (+) or "chromocenter nuclei" (++) according to the presence of zero, one or several Barr bodies or similar big chromocenters.

Cancers were classified according to sexchromatin incidence as follows:

I sexchromatin positive (more than 30% nuclei with one Barr body)
II poor in sexchromatin (10–30% nuclei with one Barr body)
III sexchromatin negative (less than 10% nuclei with one Barr body)
IV rich in "chromocenter nuclei" (more than 20% nuclei with multiple large chromocenters)
V mosaic tumors (tumors composed of areas with varying sexchromatin incidence)

(*For the clinical part of the study the mosaic tumors were grouped according to the region with the most abnormal sexchromatin picture. For details and distribution of cancers in the sexchromatin groups see* Kallenberger [1, 2].

Nuclear size. The outline of intact nuclei was drawn on a paper at a magnification of 1400 times by means of the "WILD-projecting-tubus". The areas were measured by the point counting method [26]. The nuclei were grouped in three classes comprising small, middle and large nuclei, the small nuclei corresponding in size approximately to the nuclei of normal epithelium.

DNA *values.* The relative amount of DNA in the nuclei was measured by means of the plug method, using a histophotometer of the Lyson type (details of method see Klinger and Schwarzacher 1960 [27]). Nuclei from normal epithelium served as reference system.

Results

Table 1 shows that benign tumors contain nuclei with properties very similar to those of normal epithelium. Cancers with a high sexchromatin count are still mainly composed of near diploid, small nuclei and show a very low mitotic activity. The decrease of sexchromatin positive nuclei is related to the loss of diploidy. Thus, in cancers with 10 to 30% sexchromatin positive nuclei, only about 50% of the measured nuclei are in the diploid range, compared to 80% in tumors with high sexchromatin counts. In sexchromatin negative tumors we found only an average of 15% near diploid nuclei, the rest being near tetraploid or showing DNA values more than 5 c*. Tumors with high numbers of "chromocenter nuclei" have DNA values similar to those of the negative tumors. Both groups with high DNA values show a high mitotic activity.

Since the results, listed in this table, are average values of cancers with corresponding sexchromatin counts, we tried to complete our knowledge on the relation between sexchromatin incidence and DNA content of the

Table 1. *Sexchromatin incidence, nuclear size,* DNA *content and mitotic index of normal epithelium, benign and malignant tumors of the breast*

Tissue	Sexchromatin % nuclei		Nuclear size % nuclei			DNA content % nuclei in DNA classes			Mitotic index
	+	++	small	medium	large	~2 c	~4 c	>5 c.	0/00
Normal epithelium [20]	77·2	3·0	97·5	2·5	0	99·3	0·7	0	0·3
Benign tumors [8]	74·5	5·4	93·5	5·0	0	93·1	6·8	0	1·9
Cancer I [22]	52·0	12·0	77·9	19·1	3·0	79·0	20·0	1·0	5·3
Cancer II [5]	21·9	10·4	35·2	36·2	28·6	54·1	43·5	2·4	9·8
Cancer III [15]	5·9	6·3	16·2	45·1	38·8	15·1	58·2	26·7	13·6
Cancer IV [18]	17·5	41·6	16·2	45·4	38·4	14·2	63·7	21·9	14·4

*c = arbitrary haploid DNA value.

Table 2. Values of benign and malignantmammary tumors (Frequency distribution of sexchromatin positive, sexchromatin negative and "chromocenter" nuclei of the diploid and polyploid nuclear groups)

Tumor type	2 c nuclear group number of tumors with equal or unequal frequency distribution of + and − nuclei			4 c and polyploid nuclear groups number of tumors with equal or unequal frequency distribution of + and − nuclei		
	equal	unequal	difference	equal	unequal	difference
Benign tumors [6]	5	1	more − nuclei hyperdiploid			
Sexchromatin positive cancers [7]	4	3	more − nuclei hyperdiploid [2]			++ nuclei only
			− nuclei hypodiploid [1]			
Mosaic tumors with dominantly + nuclei [4]	2	2	more − nuclei hyperdiploid			++ nuclei only
Mosaic tumors with dominantly − and ++ nuclei [16]	2	3	more − nuclei hyperdiploid	9	7	++ nuclei with higher DNA values [5]
						− nuclei with higher DNA values [2]

c=arbitrary haploid value.

nuclei by comparing the DNA content of positive, negative and "chromocenter" nuclei in 33 tumors. In this study the sexbodies and chromocenters of nuclei, measured histophotometrically, were carefully designed, and the different types of nuclei of each tumor have been compared in diagrams.

The results of these investigations are summarized in Table 2. The dominant DNA values of the 6 benign tumors are diploid for

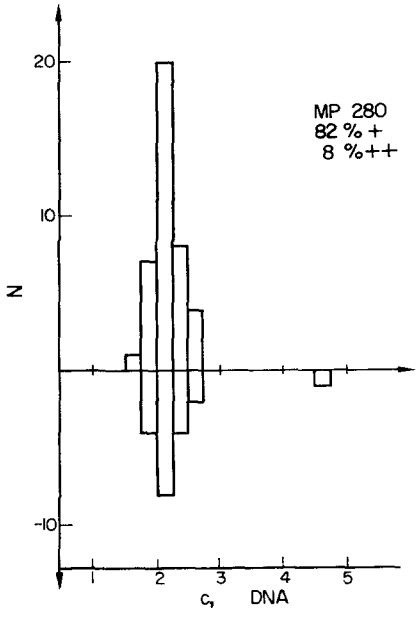


Fig. 1. MP 280: Benign tumor. DNA values of sexchromatin positive and negative nuclei with equal frequency distribution.

sexchromatin positive as well as sexchromatin negative nuclei. The frequency distribution of both nuclear types is identical in 5 tumors (Fig. 1), whereas the sixth tumor shows negative nuclei in the triploid range, without corresponding sexchromatin positive ones. Following up this case, it turned out to be a proliferating mastopathia cystica, which by several authors is regarded as precancerous lesion [28].

Four of the 7 sexchromatin positive cancers show an equal frequency distribution of positive an negative nuclei in the diploid DNA group (Fig. 2). In 2 tumors more negative nuclei are in the hyperdiploid range (Fig. 3) and in one tumor the negative nuclei proved to be dominantly hypodiploid. In 4 of the 7 sexchromatin positive cancers nuclei with two sexbodies are present. Their DNA value is in the tetraploid range, except in the tumor with hypodiploid negative nuclei, where the DNA values of the "chromocenter" nuclei are near triploid.

In positive tumors, containing small areas with abnormal sexchromatin findings, positive and negative nuclei with corresponding frequency distribution in the 2-day group exist as well as "chromocenter nuclei" with higher DNA content. In two of the 4 investigated cancers there are more negative nuclei within the hyperdiploid DNA measurements (Fig. 4).

In addition, 16 cancers, mainly composed of sexchromatin negative and "chromocenter

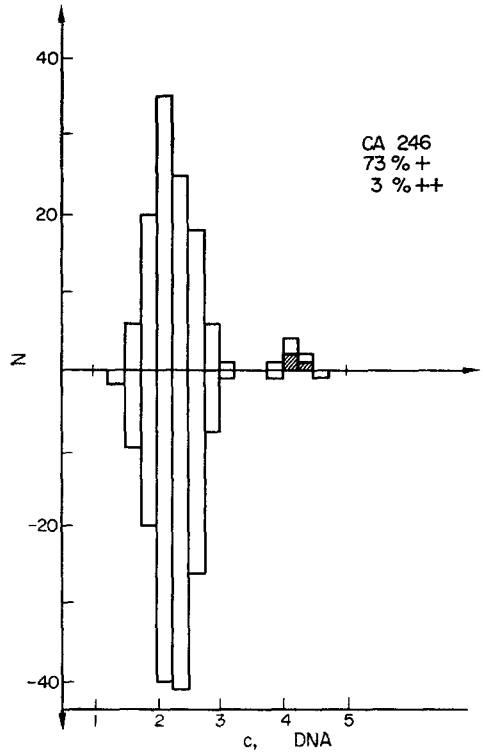


Fig. 2. CA 246: Sexchromatin positive cancer. DNA *values of positive and negative nuclei with equal frequency distribution.*

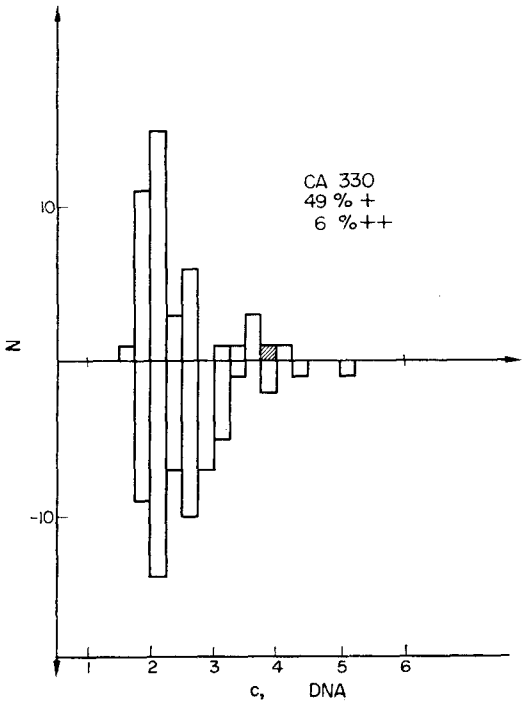


Fig. 3. CA 330: Sexchromatin positive cancer. DNA *values of positive and negative nuclei. There are more negative nuclei in the hyperdiploid range.*

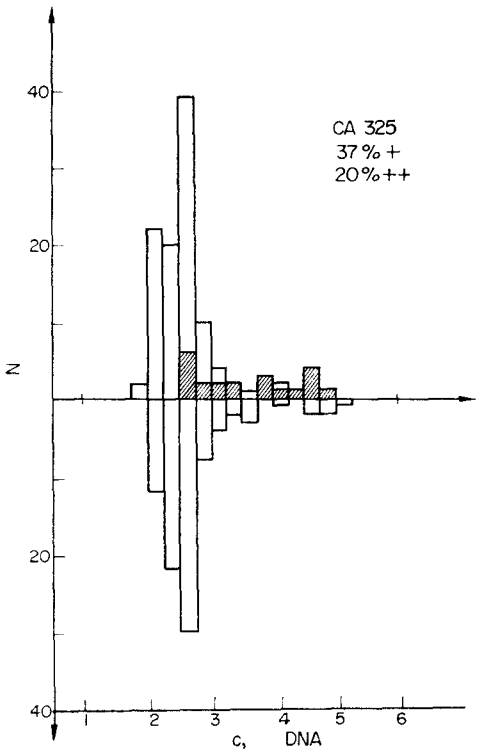


Fig. 4. CA 325: Sexchromatin positive cancer. Containing areas with high incidence of nuclei with 2 sexbodies (dark columns). These nuclei have DNA *contents from 2·5 c to 5 c.*

nuclei", were analysed. Ten of the tumors still exhibit a low percentage of nuclei with one sexbody (almost normal nuclei), which proved to be near diploid. In 4 cancers, some corresponding negative nuclei, and, in 2 cancers large nuclei with one sexbody and near tetraploid content are present.

But as mentioned before, most of the nuclei are sexchromatin negative or rich in chromocenters, and their DNA value is near tetraploid. In 9 of 16 cancers, the DNA values of these abnormal positive, negative and "chromocenter nuclei" correspond with an approximately equal frequency distribution (Fig. 5). In 5 cancers, the dominant DNA values of the "chromocenter nuclei" are higher compared to the negative nuclei. On the contrary, in 2 tumors, the negative nuclei show a higher ploidy grade (Fig. 6).

Discussion

From these results we may conclude:

(1) Abnormal sexchromatin incidence is in positive correlation with the loss of normal diploid DNA content of the nuclei. Sexchromatin negative cancers and cancers rich in "chromocenter nuclei" show dominantly near tetraploid DNA values.

(2) Negative nuclei in benign tumors and in sexchromatin positive cancers are actually

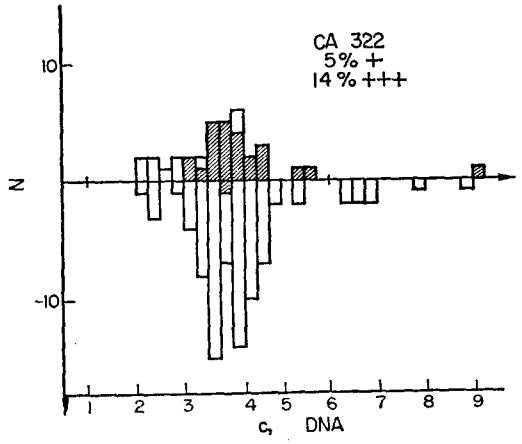


Fig. 5. *CA* 322*: Cancer composed of sexchromatin negative and "chromocenter nuclei" with equal frequency distribution in the hypo- to hypertetraploid range.*

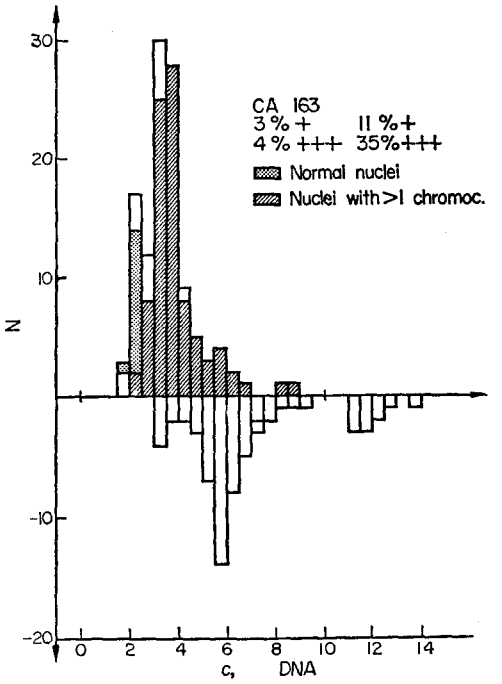


Fig. 6. *CA* 163 *Cancer with sexchromatin negative and "chromocenter nuclei" and* DNA *values different for the two types of nuclei.*

not different from sexchromatin positive nuclei regarding their DNA content. Nevertheless, in some of these tumors more negative nuclei are present in the hyperdiploid range. Since, according to Klinger *et al.* [29] and Comings [30], the DNA synthesis in diploid nuclei is not responsible for the disappearance of the sexchromatin, the predominance of sexchromatin negative nuclei in the hyperdiploid range may be evaluated as a sign of beginning polyploidisation of the tumor.

(3) DNA measurements show that in polyploid tumors sexchromatin negative and "chromocenter nuclei" may represent identical nuclear classes, showing the same frequency distribution. On the other hand the presence of morphologically different nuclei may reveal the existence of different cell lines.

(4) Due to the fact that appearance of abnormal sexchromatin incidence in breast cancer correlates positively with loss of diploidy, we interpret this as a sign of cellular dedifferentiation.

2. SEXCHROMATIN INCIDENCE AND SURVIVAL TIME

To clear up the problem of a possible correlation between sexchromatin incidence and clinical course of the disease, especially survival time, patients operated six to seven years ago were followed up. After elimination of patients, succombed for other reasons than breast cancer, 80 patients could be included in this study. Seven out of these 80 patients had a hormonal treatment after mastectomy. They are equally distributed over the four sexchromatin groups and the different survival times and therefore do not influence the results.

The results of this investigation are listed in Table 3 according to mean survival time. The significance of the differences, based on statistical analysis by using the Fisher's test [31], is indicated. The survival rate in per cent is demonstrated in Figs. 7–10. The mean survival time, as well as the rate of survival is significantly higher in the group of patients with sexchromatin positive cancer, compared to patients with sexchromatin negative cancer and with polyploid tumors rich in "chromocenter nuclei".

This difference is obvious, independent of the stage of the tumor at the moment of operation, but only significant for tumors with lymphnode metastasis. This means that for cancers, operated radically in an early stage, prognosis is good, whatever the cytological grade of the tumor may be.

This difference is equally present in patients before or after menopause, although not significant. The factors lymphnode metastasis and small number of patients are in competition with the cytological differentiation.

If the longer survival of sexchromatin positive tumors were caused only by positive effects of hormonal treatment, as pretended by Regele *et al.* [13], we should expect the same survival rate in our groups of sexchromatin positive and negative tumors. As this is certainly not the case, we can attribute the better survival of these tumors to their inferior malignancy. (Data, presented by

Table 3. Survival time of breast cancer in relation to sexchromatin incidence

Tumor type	Sexchromatin incidence	No. of cases	Ploidy grade	Mean survival time (months)	Significance of difference in relation to group I	*P*
All tumors investigated	I positive	24	near diploid	62·4		
	II poor	16	mixed	54·3	no	>0·05
	III negative	17	near tetraploid	46·8	no	0·05
	IV chromoc.n.	23	near tetraploid	43·0	yes	<0·01
	III+IV	40	near tetraploid	44·3	yes	<0·01
Tumors without lymphnode metastasis	I positive	8	near dipoid	66·8		
	III+IV	12	near tetraploid	55·3	no	>0·05
Tumors with lymphnode metastasis	I positive	17	near diploid	61·0		
	III negative	12	near tetraploid	41·6	yes	<0·05
	IV chromoc.n.	16	near tetraploid	38·7	yes	<0·01
	III+IV	28	near tetraploid	39·9	yes	<0·01
Tumors of premenopausal women	I positive	9	near diploid	60·7		
	III+IV	10	near tetraploid	47·1	no	>0·05
Tumors of postmenopausal women	I positive	11	near diploid	57·4		
	III+IV	25	near tetraploid	41·4	no	>0·05
Histologically undiff. cancer with lymphnode metastasis	I positive	11	near diploid	59·1		
	III+IV	18	near tetraploid	30·9	yes	<0·001

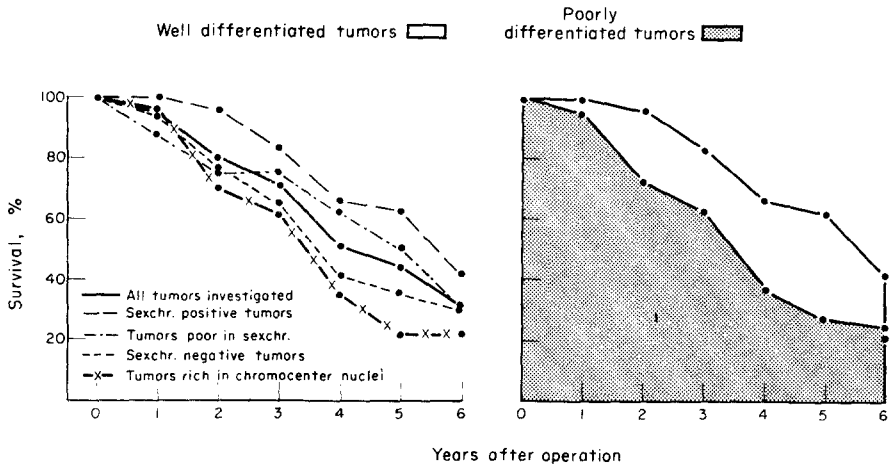


Fig. 7.

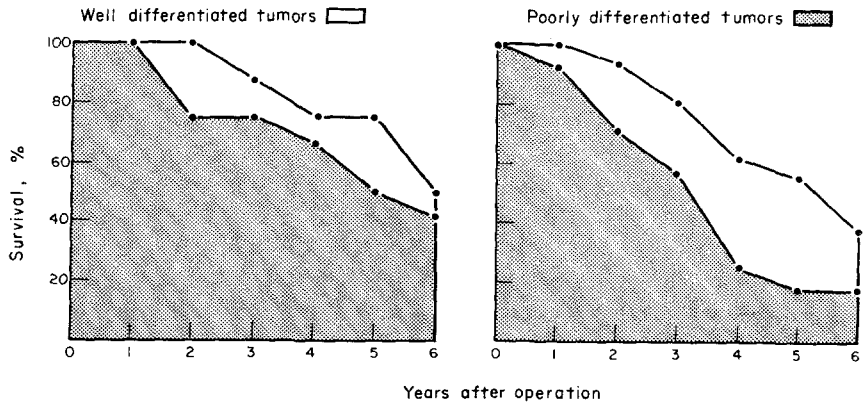


Fig. 8.

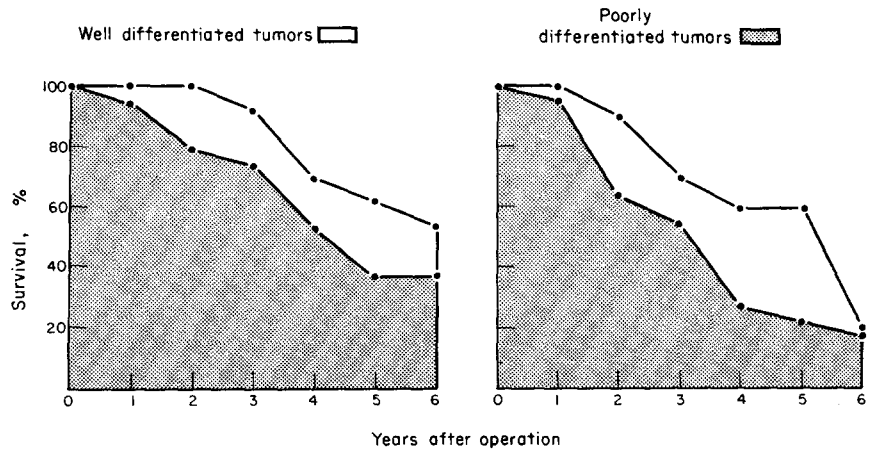


Fig. 9.

Bohle [32] seem to prove the same survival time for positive and negative cancer without hormonal treatment. As in his material, collected from literature, the positive group includes probably tumors with relatively low sexchromatin counts, as well as tumors with nuclei, containing two and more sexchromatin bodies, the survival rate of these "positive" cancers corresponds to an average of our group I, II and IV. This average is of course, in our material too, with a 5-year survival rate of 44·5% not significantly different from the 5-year survival of the negative tumors with 35·3%).

The view that the longer survival of sexchromatin positive breast cancer is caused by a better cytological differentiation and a corresponding low malignancy, is supported by the fact that the difference is highly significant ($P<0·001$) in the very small group (29 cases) of patients with histologically undifferentiated cancer and lymphnode metastasis. In this group the sexchromatin positive tumors have a mean survival time of 59 months, compared to 31 months of the negative tumors and the tumors with "chromocenter nuclei".

This proves, that abnormal sexchromatin incidence is a sign of cellular dedifferentiation, which superimposes the histological grade of a tumor in the way that a cancer with a poor histological, but high cytological grade has a better prognosis, than a cancer with a poor histological and poor cytological grade.

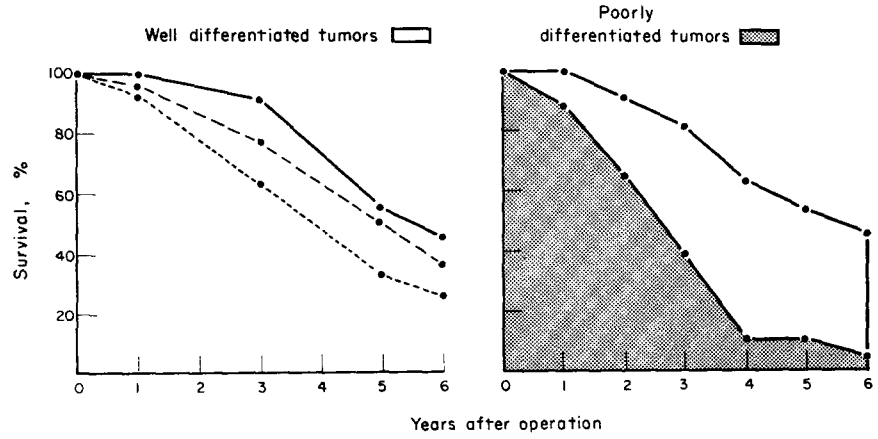


Fig. 10.

Acknowledgements — We gratefully acknowledge the support of this work by Dr. H. P. Klinger, Dept. of Genetics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, who provided the slides of the eighty cases followed up in this study.

We gratefully acknowledge the technical assistance of Miss Gerda Debrunner.

RESUME

(1) *L'incidence de la chromatine sexuelle et le contenu en* ADN *d'empreintes, colorées au Feulgen, de* 20 *glandes mammaires normales, de* 8 *tumeurs bénignes et de* 60 *carcinomes du sein furent déterminés par numération et par histophotométrie. Les tumeurs bénignes avaient approximativement les mêmes valeurs que le tissu normal (plus de* 70% *de chromatine sexuelle positive, plus de* 90% *de noyaux à valuer diploïde). Vingt-deux carcinomes, avec un compte élevé pour la chromatine sexuelle* (52%), *contenaient encore* 79% *de noyaux à valeur diploïde. Dans les cancers avec des valeurs basses pour la chromatine sexuelle* (10–30%), 54% *des noyaux avaient une valeur diploïde, et* 46% *une valeur tétraploïde. Les tumeurs sans chromatine sexuelle, et les tumeurs avec une forte incidence de noyaux contenant deux ou plusieurs corpuscules sexuels, avaient* 15% *de noyaux diploïdes,* 60% *de noyaux tétraploïdes, et* 25% *de noyaux à haute polyploïdie. Ainsi, la perte de noyau avec un corpuscule correspond à la perte de la diploïdie.*

(2) *Alors que, dans les tissus normaux et les tumeurs bénignes, les noyaux positifs et négatifs avaient le même contenu en* ADN, *dans les cellules carcinomateuses, les noyaux négatifs manifestaient une tendance à l'hyperploïdie. Des néoplasmes, contenant tant des noyaux négatifs que des noyaux avec plusieurs corpuscules sexuels, avaient des taux d'*ADN *élevés, différents pour les deux types de noyaux. Ceci indique qu'une telle tumeur est composée de plusieurs lignées cellulaires.*

(3) *Parmi* 80 *malades porteurs de carcinomes différant par l'incidence de la chromatine sexuelle et n'ayant pas reçu de traitement hormonal,* 62,5% *avec des tumeurs positives survivaient* 5 *ans, contre* 27,5% *avec des tumeurs négatives. La survie moyenne plus longue des cancers positifs est significative pour le groupe de malades avec métastases régionales au moment de l'opération, et, très significative, si, dans ce groupe, seules les tumeurs dédifférentiées histologiquement sont considérées. La disparition des cellules avec une chromatine sexuelle, c'est-à-dire des cellules approximativement diploïdes, est, par conséquent, évaluée comme un signe de dédifférentiation cytologique, qui se superpose à la dédifférentiation histologique et qui augmente la malignité d'une tumeur.*

SUMMARY

(1) *Sexchromatin incidence and* DNA *content of Feulgen stained impression prints from* 20 *normal mammary glands,* 8 *benign tumors and* 60 *breast carcinomas were determined numerically and histophotometrically. Benign tumors have approximately the same rate as normal tissue (over* 70% *sexchromatin positive, over* 90% *near diploid nuclei). Twenty-two carcinomas with high sexchromatin counts* (52%) *still contain* 79% *near diploid nuclei. In cancer with low counts of positive nuclei* (10–30%) 54% *nuclei are in the diploid,* 46% *in the tetraploid range. Negative tumors and tumors with high incidence of nuclei with two or more sexbodies contain about* 15% *near diploid,* 60% *near tetraploid and* 25% *high ploid nuclei. Thus the loss of nuclei with one sexbody correlates positively with the loss of diploidy.*

(2) *While in normal tissue and in benign tumors positive and negative nuclei have the same* DNA *content, the negative nuclei in sexchromatin positive carcinomas show a tendency to hyperdiploidy. Neoplasms, containing negative as well as nuclei with more than one sexbody, show high* DNA *contents, which may be different for the two types of nuclei. This indicates, that such a tumor is composed of different stemlines.*

(3) *From* 80 *patients with carcinomas differing in sexchromatin incidence, who had no hormonal treatment,* 62·5% *with positive tumors survived* 5 *years, compared to* 27·5% *with negative tumors. The mean survival time is significantly higher for sexchromatin positive cancer than for cancer with abnormal sexchromatin picture in the group of tumors with lymphnode metastasis at operation. This difference is highly significant if only histologically undifferentiated cancers are considered. Therefore, the loss of nuclei with one sexbody is regarded as a sign of dedifferentiation which enhances the malignancy of breast carcinoma.*

ZUSAMMENFASSUNG

(1) *Bei* 20 *normalen Brustdrüsen,* 8 *gutartigen Tumoren und* 60 *Mammakarzinomen wurden Sexchromatin, Kerngrösse,* DNS-*gehalt und Mitoseindex bestimmt. Die Werte sind bei gutartigen Tumoren annähernd gleich wie bei normalem Gewebe (über* 70%

Zellkerne mit 1 *Sexchromatinkörperchen (SB), über* 90% *annähernd diploide Kerne).* 22 *Karzinome mit hohem Gehalt* (52%) *an Nuclei mit* 1 *SB enthalten noch* 79% *annähernd diploide Kerne. In sexchromatinarmen Karzinomen* (10–30% *positive Kerne) sind* 54% *der Nuclei noch annähernd diploid,* 46% *hypo-hypertetraploid. Bei sog. sexchromatinnegativen Tumoren und Karzinomen mit hohem Prozentgehalt an Kernen mit* 2 *und mehr SB sind nur noch* 15% *der Kerne annähernd diploid,* 60% *annähernd tetraploid und* 25 % *haben extrem hohe* DNS-*Werte. Das Verschwinden der Kerne mit* 1 *SB geht in Mammakarzinomen somit parallel mit dem Verschwinden der annähernd diploiden Zellen.*

(2) *In normalem Gewebe und in gutartigen Tumoren weisen sexchromatinpositive und negative Nuclei gleiche* DNS-*Werte auf. Demgegenüber zeigen die negativen Kerne auch in Karzinomen mit hohem Prozentgehalt an Kernen mit* 1 *SB eine Tendez zur Hyperdiploidie. Karzinome (Mosaike), die aus sexchromatinnegativen und aus Kernen mit mehreren Chromozentren aufgebaut sind, zeigen hohe* DNS-*Werte, die für die verschiedenen Zellkerntypen verschieden sein können. Dieser Befund spricht für das Vorliegen verschiedener Zellstämme.*

(3) *Bei* 80 *Patienten ohne hormonale Behandlung, mit einer Beobachtungszeit von* 6 *Jahren, wurden Sexchromatinvorkommen und Ueberlebenszeit verglichen. Von den Patienten mit sexchromatinpositiven Tumoren überleben* 62,5% *im Vergleich zu* 27,5% *mit negativen Karzinomen die* 5 *Jahresgrenze. Die mittlere Ueberlebenszeit der sexchromatinpositiven Karzinome ist signifikant höher bei den Patienten, welche bei der Operation bereits Lymphknotenmetastasen aufwiesen. Die Differenz ist hoch signifikant, wenn nur histologisch undifferenzierte Karzinome mit regionalen Lymphknotenmetastasen in Betracht gezogen werden. Das Verschwinden der sexchromatinpositiven Nuclei in Mammakarzinomen wird deshalb als Zeichen der zellulären Entdifferenzierung aufgefasst, das sich der Histologischen Entdifferenzierung aufpfropft und die Malignität eines Mammakarzinoms erhöht.*

REFERENCES

1. A. Kallenberger, Ueber das Geschlechtschromatin bei Mammakarzinom. *Schweiz. med. Wschr.* **94,** 1450 (1964).
2. A. Kallenberger, Die Beurteilung der Mammakarzinome nach dem Gehalt an Kernen mit Geschlechtschromatin und Heterochromatin. *Wien. klin. Wschr.* **76,** 873 (1964).
3. A. Kallenberger und R. Wenner, Geschlechtschromatin bei Mammakarzinom. *Schweiz. med. Wschr.* **96,** 80 (1966).
4. V. M. Kimel, Clinical–Cytological correlation of mammary carcinoma based upon sex chromatin counts. *Cancer (Philad.)* **10,** 922 (1957).
5. M. L. Barr and K. L. Moore, Chromosomes, sex chromatin and cancer. *Canad. Cancer Conf.* **2,** 3 (1957).
6. K. L. Moore and M. L. Barr, The sexchromatin in human malignant tissues. *Brit. J. Cancer* **11,** 384 (1957).
7. A. S. Tavares, Nuclear "Sex" in undifferentiated cell-carcinomata. *J. Path. Bact.* **74,** 363 (1957).
8. A. S. Tavares, Tumores e sexo nuclear. *Médico (Porto)* **7,** 8 (1958).
9. H. A. Hienz und P. N. Ehlers, Das zellkernmorphologische Geschlecht von Mamma- und Prostatacar cinomen. *Klin. Wschr.* **35,** 862 (1957).
10. H. A. Hienz, Zur zellkernmorphologischen Geschlechtserkennung von Tumoren, speziell Mammakarzinomen. *Wien. klin. Wschr.* **76,** 862 (1964).
11. R. Graf und G. P. Marzoli, Das zellkernmorphologische Geschlecht von Tumoren endokrin beeinflussbarer Organe. *Bruns' Beitr. klin. Chir.* **202,** 242 (1961).
12. F. Gross, W. Mahringer, H. Trebbin und A. Bohle, Zur Bedeutung der Barrschen Zellkernkörper beim Brustkrebs der Frau. *Dtsch. med. Wschr.* **89,** 1215 (1964).
13. H. Regele, F. Kaufmann, W. Verderber und H. Wasl, Erfahrungen mit Sexchromatin und Hormontherapie beim Mammakarzinom. *Wien. klin. Wschr.* **76,** 871 (1964).
14. U. Fierz und Chr. Hedinger, Geschlechtschromatinkörper in Mammatumoren verschiedener Differenzierungsgrade. *Klin. Wschr.* **44,** 375 (1966).

15. H. Gropp, U. Wolf und F. Pera, Sexchromatin und Chromosomenstatus beim Mammakarzinom. *Dtsch. med. Wschr.* **90,** 637 (1965).
16. B. Wacker and C. P. Miles, Sex chromatin incidence and prognosis in breast cancer. *Cancer* **19,** 1651 (1966).
17. N. B. Atkin, Sexchromatin and chromosomal variation in human tumours. *Acta Un. int. Cancr* **16,** 41 (1960).
18. N. B. Atkin, The Relationship between the deoxyribonucleic acid content and the ploidy of human tumours. *Cytogenetics* **1,** 113 (1962).
19. N. B. Atkin, Die chromosomale Basis von Sexchromatinabweichungen in menschlichen Tumoren. *Wien. klin. Wschr.* **76,** 859 (1964).
20. N. B. Atkin and B. M. Richards, Deoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microphotometry of Feulgen stain: A comparison of tumours arising at different sites. *Brit. J. Cancer* **10,** 769 (1956).
21. A. Kallenberger, Die Bedeutung der Geschlechtschromatinbefunde in Mammakarzinomen. "UICC Panel Disc., Berlin-Jena" Abhandl. *Dtsch. Akad. d. Wissensch.* Berlin, Bd.V, in press. (1965).
22. N. B. Atkin, Nuclear size in carcinoma of the cervix: its relation to DNA content and to prognosis. *Cancer* **17,** 1391 (1964).
23. H. Gropp, B. Hein und U. Wolf, Kerngrösse und Sexchromatinhäufigkeit beim Mammakarzinom. *Z. Krebsforsch.* **68,** 123 (1966).
24. A. Kallenberger, Z. Dolinar und A. Hagmann, Chromatinstrukturen in den Zellkernen von Mammakarzinomen. *Anat. Anz.* **120,** Erg. H. 589 (1967).
25. A. Kallenberger, A. Hagmann, W. Meier-Ruge und Cl. Descoeudres, Beziehungen zwischen Sexchromatinvorkommen, Kerngrösse und DNS-Werten in Mammatumoren und ihre Bedeutung für die Ueberlebenszeit. *Schweiz. med. Wschr.* **97,** 678 (1967).
26. A. Hennig, Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Messtechnik. *Mikroskopie* **12,** 174 (1957).
27. H. P. Klinger und H. G. Schwarzacher, The Sex chromatin and heterochromatic bodies in human diploid and polyploid nuclei. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8,** 345 (1960).
28. H. Baumgartner und H. Stamm, Das Problem der Mammatumoren. *Fortschr. Geburtsh. Gynäk.* **27,** 60 (1966).
29. H. P. Klinger, H. G. Schwarzacher and J. Weiss, DNA content and size of sex chromatin positive female nuclei during the cell cycle. *Cytogenetics* **6,** 1 (1967).
30. D. E. Comings, The duration of replication of the inactive X chromosome in humans based on the persistence of the heterochromatic sex chromatin body during DNA synthesis. *Cytogenetics* **6,** 20 (1967).
31. Th. Reich, *Idee und Praxis der Medizinischen Statistik.* pp. 68–72. Hans Huber, Bern (1964).
32. A. Bohle, Personal communication cited by H. Regele (1966). Der derzeitige Stand der Frage nach dem Wert der zellkernmorphologischen Untersuchung beim Mammakarzinom. *Wien. klin. Wschr.* **78,** 363 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 449–455. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Ploidy and Histological Types of Mammary Carcinomas*

AMÂNDIO S. TAVARES

Department of General Pathology, Faculty of Medicine, University of Oporto, Oporto, Portugal

VARIATIONS of DNA nuclear contents have been reported to be related with prognosis and radiosensitivity of uterine cervix carcinomas [1], degree of differentiation in uterine carcinomas [2], adenocarcinomas of the ovary [3] and of the breast [4], and carcinomas of the bladder [5], as well as with prognosis of carcinomas of the bladder and prostrate [6, 7]. In the latter case, a correlation appears to exist with the response of the tumour to oestrogen therapy. Contradictory evidence, however, has been published [8, 9]. In fact, DNA measurements are but a gross method for assessing variations of the chromosome number and/or structure, but they are justified for an evaluation of ploidy while karyotyping of tumours is not done routinely.

This paper reports the results of a comparison between metastasizing and non-metastasizing carcinomas of the female breast, using ploidy and elements of the stromal reaction as parameters.

MATERIAL AND METHODS

A series of 70 carcinomas from the registry of the Department of Morbid Anatomy was used in this investigation. Metastases were searched for in the axillary lymphnodes, and were found in 39 cases (10 adenocarcinomas and 29 undifferentiated—medullary, trabecular, or squirrous—carcinomas); the remaining 31 tumours did not show any metastases after serial sectioning of lymphnodes, and were considered as apparently non-metastasizing growths.

Sections of the primary growth, and of the metastases whenever present, were made from paraffin blocks, after processing in a Histokinette, and stained by the Feulgen method, accordingly to a previously published schedule [10], with hydrolysis by 1N hydrochloric acid at 60°C for 15 min, and treatment for 1 hr with Schiff's reagent prepared with basic fuchsin, Gurr. DNA measurements were done by means of a Deeley integrating densitometer, at a magnification of 450 diameters and a 5650 Å wavelength.

One area for each histological type present in a tumour or its metastases was chosen at random, and, in each area, 30 nuclei for metastasizing growths and their metastases, 50 for the non-metastasizing ones, were examined, with readings in triplicate. In the last group, cells of medullar areas were divided into two groups of 25 according to their position, near the center or near the periphery of carcinomatous areas. In each area, nuclei free from superposition and uncut by the microtome were selected at random; as a rule, 10 μ thick sections were used, but thicker, 12 or 15 μ, ones were prefered when the proportions of cut nuclei was greater than 40%, due to their large dimensions.

The obtained values, in arbitrary units of optical density, were converted into L units, by comparison with the values obtained in nearby neutrophils, as proposed by Atkin and Ross [11]. Thus, an internal standard of ploidy unit (1 L) is available and variations due to the staining technique are minimized.

Statistical analysis was done both with DNA values for all cells read, and with the DNA

*Presented at the Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours, Rome, April 1967.

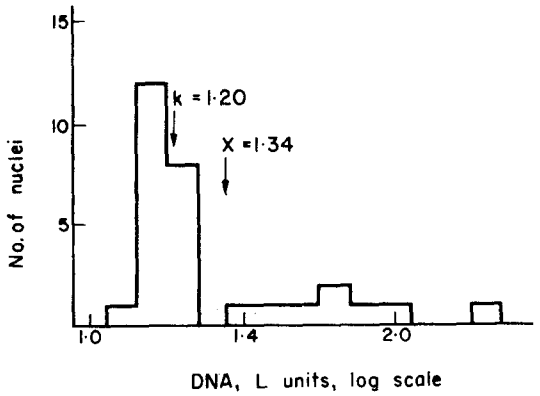


Fig. 1. Histogram of obtained DNA *values in a primary adenocarcinoma of the female breast. Comparison of the mean* DNA *contents and the computed modal value* ($\bar{X}$ *and* k, *respectively*).

value of the primary mode (k) of the histogram (Fig. 1) for each area, as calculated assuming a bimodal distribution of DNA nuclear contents, between k and $2k$, in a growing population. As previously defined [12],

$$k = \frac{3\sum_1^n X + \sqrt{9\sum_1^n X^2 - 8n\sum_1^n X^2}}{4n}$$

and, since variations due to DNA synthesis tend to increase slightly the value of k, near-diploidy (2C) was attributed to tumours with k in the range 1–1·4; values of 1·5–2, 2·1–2·8, and higher than 2·8 were classified as near-triploid (3C), near-tetraploid (4C), and near-hexaploid (6C). Octoploid lines were not identified in this series, probably due to the rejection of cut nuclei.

The use of sections for this study was preferred, in spite of the error of determination, higher than that obtained when smears or crushed nuclei are used; identification of differentiation type was easier, even when two types were very near to each other, and the error of the method is included, in the analysis of variance, in the sum of squares for rest, together with the error of the determination and that due to the presence of cells in the S and G_2 periods, far from the primary mode. Thus, F values tend to be lower, and the significance of differences is not overestimated.

The stromal reaction was evaluated semi-quantitatively on haematein-eosin stained sections, by means of an arbitrary grading, from 0 to 5 , of each of the following characteristics: sclerosis, hyalinization, density of lymphocyte infiltration, density of plasma-cell infiltration, density of fibroblasts, vascularization, and necrosis of neoplastic elements. At least, two readings of each characteristic were done at different times, with fairly consistent results. This method was already successfully applied to the analysis of male breast morphology as related to age and to the discrimination of gynaecomastia and age-influenced aspects [13].

RESULTS

A—Ploidy in metastasizing carcinomas

The data obtained in 31 cases, which were first submitted to statistical analysis [4], show that primary adenocarcinomas are near-tetraploid in average (k=2·023), as well as primary squirrous carcinomas (k=2·203); on the contrary, medullary carcinomas have lower primary modes (k=1·803) and may be separated into two groups, one 4C(k=2·020) coexisting with the squirrous type, and the other, lower one (k=1·752), corresponding to those tumours exclusively medullary or with both glandular and medullary differentiation. The difference between modal values computed for squirrous and medullary areas, in tumours where they existed alone or represented the most important part of the growth, is significant (Δ=0·400, t=2·05, for 23 degrees of freedom), and so is also the difference between modal values for glandular areas and those coexisting with anaplasia (Δ=0·603; t=2·37, for 18 d.f.).

Ploidy in metastases tended to be lower than in the primary sites (Δ=0·146; t=1·66, for 148 d.f.); this lack of significance may be related to a difference of DNA contents in exclusively squirrous and exclusively medullary

Table 1. Metastasizing carcinomas of the breast. Mean primary mode (k) *and histological type*

	Primary				Metastases				Total			
	$\bar{k}$	t	n	P	$\bar{k}$	t	n	P	$\bar{k}$	t	n	P
Adenocarcinomatous × medullary	0·097	0·54	46	—	0·114	0·95	55	—	0·085	0·80	103	—
Adenocarcinomatous × squirrous	0·241	1·15	36	—	−0·315	2·83	61	<0·01	−0·274	2·62	99	<0·01
Medullary × squirrous	0·338	1·99	38	<0·05	−0·429	3·44	52	<0·01	−0·359	3·57	92	<0·01

metastases ($\Delta=0\cdot580$; $t=2\cdot91$, for 21 d.f.), and to a difference in squirrous and adenocarcinomatous metastases [$\Delta=0\cdot429$; $t=2\cdot05$, for 23 d.f.). This is also true if all observed areas are considered regardless of their exclusiveness (Table 1).

If tumours are separated into two classes, according to their ploidy (2C and 4C), it may be seen that the ploidy of the primary growth tends to be repeated in the metastases, as in Meek's series [14], but either 2C or 2C and 4C lines appear in the colonies of carcinomas with both 2C and 4C areas; i.e., there is apparently no preference for a 4C line when it coexists with a 2C line in the primary site (Table 2).

The variability of DNA modal values is slightly greater in the primary site than in the metastases (Table 3); this fact may be related to the fact that tumour lines tend to be more defined in the secondary growths.

Also, a significant correlation between DNA modal values of the primary carcinomas and their respective metastases was obtained (Table 4). This correlation was greatly influenced by the histological type, being still more significant for the cases with identical morphology in both locations; inversely, the correlation is null when the secondary tumour showed a differentiation not readily seen in the breast growth.

Table 2. Ploidy of breast carcinomas and their metastases

Metastases	Primary tumours			
	2C	4C	2C and 4C	Total
2C	5	1	4	10
4C	2	9	0	11
2C and 4C	1	3	6	10
Total	8	13	10	31

B—Ploidy of non-metastasizing tumours

The mean modal value in this group, studied by Marques [15], is lower than that obtained in metastasizing tumours, either considered in the whole or fractioned according to histological types, but the differences are significant only for all groups and for squirrous carcinomas (Table 5). However, the range of ploidy values was practically as great as in the primary tumours of the metastasizing growths, with similar coefficients of variability (Table 3).

As regards medullary carcinomas, cells near the periphery of neoplastic masses tended to have higher nuclear DNA contents than those near the center ($\bar{X}$, respectively, 1·779 and 1·691). This difference is significant, although less than the obvious difference among cases

Table 3. Mean DNA modal values according to site and differentiation

	Primary				Metastases				Primary, non-metast.			
Histological type	d.f.	$\bar{k}$	*s*	*cv*	d.f.	$\bar{k}$	*s*	*cv*	d.f.	$\bar{k}$	*s*	*cv*
Adenocarcinomas	23	1·959	0·7062	36·05	33	1·755	0·4353	24·80	11	1·618	0·5196	32·11
Medullary carcinomas	25	1·862	0·5383	28·91	24	1·641	0·4655	28·37	11	1·691	0·3166	18·72
Squirrous carcinomas	15	2·200	0·4891	22·23	30	2·070	0·4472	21·60	21	1·695	0·5131	30·27
All types	63	1·978	0·6005	30·36	87	1·832	0·4476	26·07	43	1·674	0·4675	27·93

$\bar{k}$—mean DNA modal value; *s*—standard deviation; *cv*—coefficient of variation per cent; d.f.—degrees of freedom.

Table 4. DNA in primary carcinomas of breast and metastases. Analysis of variance of regressions

Type		d.f.	*S.S.*	*MS*	*F*	*P*
Identical	Regression	1	3·1838	3·1838	15·85	<0·001
	Rest	52	10·4443	0·2009		
	Total	53	13·6281	0·2571		
Different	Regression	1	0·0030	0·0030	—	—
	Rest	31	4·3594	0·1406		
	Total	32	4·3624	0·1363		
All cases	Regression	1	1·8282	1·8282	9·62	<0·01
	Rest	85	16·1623	0·1901		
	Total	86	17·9905	0·2092		

d.f.—degrees of freedom; *SS*—sum of squares; *MS*—mean square.

(Table 6); the interaction cases x position has a low F value.

The comparison of ploidy between the two groups shows that tumours with 2C or 4C lines tend to have a greater metastasizing capacity than those with 3C or 6C lines, especially for all undifferentiated types, where the χ^2 test is significant (Table 7). If this is confirmed in a larger series now under study, the relation between malignancy and ploidy in breast carcinomas in women will be opposite to that observed in prostate carcinomas, where 3C and 6C tumours appear to be more malignant and resistant to oestrogen therapy [6].

Table 5. Differences in mean modal values of DNA *per site, type, and metastasizing capacity*

	Primary, metastasizing × non metastasizing				Metastasizing carcinomas primary × metastasizing			
Types	d.f.	$\bar{k}_1-\bar{k}_2$	t	P	d.f.	$\bar{k}_1-\bar{k}_2$	t	P
Adenocarcinoma	32	0·341	1·42	<0·20	54	0·204	1·34	<0·20
Medullary carcinoma	34	0·171	0·98	>0·30	47	0·221	1·53	>0·10
Squirrous carcinoma	34	0·505	0·92	<0·01	43	0·130	0·89	<0·40
All types	104	0·304	2·79	<0·01	148	0·146	1·66	0·10

Table 6. Non-metastasizing medullary carcinomas. Cell position and DNA *nuclear contents: analysis of variance*

	d.f.	*SS*	*MS*	*F*	*P*
Cases	8	387,373·10	48,421·64	23·07	Inf.[a1]
Position	1	8,676·84	8,676·84	4·11	<0·05
Interaction	8	25,810·52	3,226·32	1·54	0·10
Rest	432	906,864·02	2,099·22		
Total	449	1,328,724·48	2,959·30		

Table 7. Carcinomas of the female breast. Ploidy, histological type, and metastasizing capacity

	Adenocarcinomas			Undifferentiated carcinomas		
	2C–4C	3C–6C	Total	2C–4C	3C–6C	Total
Metastases						
Present	4	6	10	20	9	29
Absent	6	1	7	10	14	24
Total	10	7	17	30	23	53
	$\chi^2=1·915$; $P=0·083$			$\chi^2=3·984$; $P=0·023$		

Table 8. Carcinomas of the female breast. Coefficients of regressions, ploidy/stromal reaction

Characteristics	Metastasizing carcinomas (n=30)			Non-metastasizing carcinomas (n=20)			Difference, regression coefficient			
	b	F	P	b	F	P	$S^2b_1b_2$	b_1-b_2	t	P
Sclerosis	-0·127	—		0·333	—		0·6177	0·460	0·585	
Hyalinization	-0·506	—		0·070	—		0·9164	0·576	0·602	
Lymphocyte inf.	-1·705	6·21	<0·05	0·136	—		0·6265	1·841	2·326	0·02
Plasma-cell inf.	-0·855	1·39	>0·20	0·470	1·29	>0·20	0·6986	1·325	1·585	0·12
Fibroblasts	-0·083	—		0·732	4·56	<0·05	0·3578	0·815	1·362	0·18
Vascularization	0·152	—		0·452	—		0·6513	0·604	0·748	
Necrosis carcinoma elements	1·093	4·32	<0·05-	0·417	—		0·8789	1·694	1·807	0·08

C—Stromal reaction and ploidy

Semi-quantitative evaluation of morphological characteristics of the stromal reaction was done in 31 metastasizing carcinomas and in 20 without any obvious metastases and regression coefficients between the DNA modal value and each of the characteristics were computed independently for each group. Since the number of cases is small, significant results were obtained only for lymphocyte infiltration and necrosis of tumour elements in the first group, and density of fibroblasts in the second (Table 8).

It should be noted, however, that even for non-significant regressions, the coefficients are all positive for tumours without metastases and all negative for those without them, the only exception being necrosis—which shows a negative correlation in the first group and a positive one in the second.

The differences between regression coefficients computed for both groups are significant for lymphocytic infiltration only; this lack of significance may be due to the semi-quantitative evaluation of the characteristics, which tends to increase the variance of the data and thus reduce the values of t, and also to the fact that this method of analysis does not distinguish between 2C and 4C tumours on one hand, and 3C and 6C on the other—a division which was shown above to be related to the metastasizing ability of these growths. Nevertheless, the differences for plasma-cell infiltration, density fibroblasts, and necrosis of neoplastic elements also tend to present slightly high values of t (Table 8 and Fig. 2).

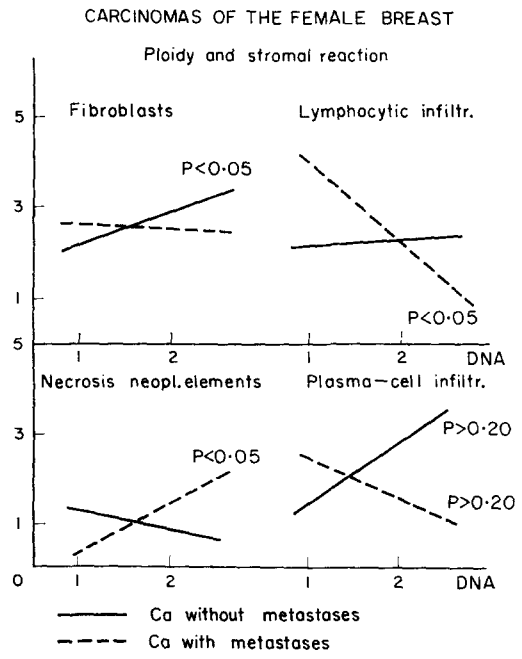


Fig. 2. Regression lines for four of the stromal elements analyzed. Each P *value corresponds to the nearby regression line. The scale on the left is that of semiquantitative analysis of stromal reaction, with a* 0 *to* 5 *grading.*

It may be assumed that ploidy and the presence or absence of metastases are but two of the parameters in the plurifactorial correlations which define stromal reaction. It is interesting to point out that plasma-cell infiltration, probably related to immunological reaction to the tumor, is high in 2C growths of the metastasizing group and in the 4C growths of the other, while lymphocytic infiltration is nearly constant in this group and shows a high negative regression coefficient in tumours with metastases.

Although this investigation bears on a small series, the results obtained indicate that the relation between ploidy and metastasizing ability of the female breast carcinoma is not a simple one, and multivariate analysis, with other parameters, will be necessary. Furthermore, the differences between the computed regression coefficients for carcinomas with and without metastases may explain the difficulty always encountered when evaluating the metastasizing capacity of a tumour by analysis of its stromal reaction. It is felt that information about this reaction should be interpreted taking the tumour ploidy into account.

Acknowledgement—This investigation was done under a grant from the Portuguese Institute for Higher Culture to the Research Centre for Morbid Anatomy and General Pathology, Faculty of Medicine, University of Oporto.

RESUME

*Des mesures de l'*ADN *nucléaire, par la réaction de Feulgen et lecture à l'aide du microdensimètre intégrateur de Deeley, furent effectuées dans* 70 *cas de cancer du sein* (39 *cas avec métastases axillaires et* 31 *cas sans métastases). Les résultats furent analysés en fonction du degré de différenciation, du type de la réaction du stroma, et de la capacité de métastasier. Lorsque plus d'un type morphologique était présent dans la tumeur ou dans les métastases, la ploïdie de chaque zone était déterminée.*

Une analyse statistique des résultats a permis de tirer les conclusions suivantes: (1) *la*

*dispersion des valeurs d'*ADN *est plus faible dans les métastases que dans la tumeur primitive;* (2) *il existe une corrélation entre les ploïdies des tumeurs primitives et de leurs métastases lorsque le type morphologique est identique;* (3) *les carcinomes glandulaires et squirreux tendent vers la valeur* 4C, *tandis que les carcinomes alvéolaires et trabéculaires tendent vers des valeurs modales plus basses, particulièrement lorsqu'ils sont isolés et associés à des aspects glandulaires;* (4) *dans les métastases, l'infiltration lymphocytaire du stroma est plus importante dans les tumeurs à valeur* 2C, *et la nécrose dans les tumeurs à valeur* 4C; (5) *les carcinomes* 2C *et* 4C *ont une plus grande capacité de métastasier que les tumeurs* 3C *et* 6C, *surtout pour les types indifférenciés;* (6) *lorsque plusieurs lignées existent dans la tumeur primitive, les lignées paradiploïdes semblent être favorisées au niveau des métastases;* (7) *dans les carcinomes alvéolaires, les valeurs d'*ADN *étaient plus élevées à la périphérie qu'au centre des masses tumorales.*

SUMMARY

In a series of 70 *breast carcinomas in women* (39 *with metastases,* 31 *without metastases to the axillary lymphnodes, as assessed by histological examination), nuclear* DNA *determinations were done by means of Feulgen reaction and reading in a Deeley integrating microdensitometer. The results were analysed according to the degree of differentiation, type of stromal reaction, and metastasizing capacity. Whenever more than one morphological type was present in a tumour or in its metastases, the ploidy of each area was determined.*

Statistical analysis of the data yielded the following conclusions: (1) *the dispersion of* DNA *values is smaller in the metastases than in the primary tumour;* (2) *there is a significant correlation between ploidies of primary tumours and their metastases, when the morphological type is identical;* (3) *glandular and squirrous carcinomas tend to be* 4C, *while alveolar (and trabecular) carcinomas tend to have lower modes, especially when isolated or associated to glandular aspects;* (4) *lymphocytic infiltration of the stroma is highest in* 2C *tumours, and necrosis in the* 4C *class, for metastasizing growths;* (5) 2C *and* 4C *carcinomas tend to have a greater metastasizing capacity than* 3C *of* 6C *tumours, especially for undifferentiated types;* (6) *when more than one line is observed in the primary growth, the paradiploid one appears to be preferred in metastases;* (7) *in alveolar carcinomas,* DNA *values were higher in the periphery than in the center of the tumour masses*

ZUSAMMENFASSUNG

Nukleäre DNS-*Bestimmungen (mit der Methode von Feulgen) und Messungen mit dem Deeley-Integrationsmikrodensitometer wurden an* 70 *Mammakarzinomen durchgeführt. Bei* 39 *Frauen wurden axilläre Lymphknotenmetastasen histologisch nahcgewiesen. Die Ergebnisse wurden nach Grad der Differenzierung, Typ der Stromareaktion und Metastasierungsfähigkeit anlaysiert. In den Fällen, die im Tumor oder in seinen Metastasen mehr als einen morphologischen Typ aufwiesen, wurde die Ploidie jeder Zone bestimmt.*

Die statistische Auswertung der Ergebnisse führte zu folgenden Schlüssen: 1. *Die Streuung der* DNS-*Werte ist in den Metastasen kleiner als in den primären Tumoren;* 2. *es besteht eine signifikante Korrelation zwischen den Ploidien der primären Tumoren und ihrer Metastasen, wenn beide vom gleichen morphologischen Typ sind;* 3. *glanduläre Karzinome und Scirrhen sind meistens* 4C, *alveoläre (und trabekuläre) Karzinome zeigen niedrigere Stufen, insbesondere wenn sie isoliert sind oder glanduläre Aspekte aufweisen;* 4. *lymphozytare Infiltration des Stromas ist am ausgesprochensten in* 2C-*Tumoren, Nekrosebildung in der Klasse* 4C *bei metastasierenden Geschwülsten;* 5. 2C- *und* 4C-*Karzinome zeigen eine grössere Metastasierungsfahigkeit als* 3C- *oder* 6C-*Tumoren, besonders wenn sie undifferenziert sind;* 6. *wenn mehr als eine Zellinie in der primären Geschwulst gefunden wird, zeigen die Metastasen gewöhnlich die paradiploide Linie;* 7. *die alveolären Karzinome zeigten höhnlich die paradiploide Linie;* 7. *die alveolären Karzinome zeigten höhere* DNS-*Werte in der Peripherie als im Zentrum der Tumorknoten.*

REFERENCES

1. N. B. Atkin, Nuclear size in carcinoma of the cervix: its relation to DNA content and to prognosis. *Cancer, N.Y.* **17,** 1391 (1964).
2. N. B. Atkin, The relationship between the deoxyribonucleic acid contents and ploidy of human tumours. *Cytogenetics, Basel* **1,** 113 (1962).
3. S. Bader, H. C. Taylor Jr. and E. T. Engle, Desoxy ribonucleic (DNA) content of human ovarian tumours in relation to histological grading. *Lab. Invest.* **9,** 443 (1960).
4. A. S. Tavares, J. C. Maia and J. M. Rodrigues Pereira, Estudos de citologia do cancro. V—As relaçoes tumor primitivo—metástases nos carcinomas do seio. *O Médico,* **32,** 6 (1964).
5. A. S. Tavares, J. M. Rodrigues Pereira and J. B. Branco, Estudos de citologia do cancro. II—A determinaçao do A.D.N. no citodiagnóstico do carcinoma vesical. *J. méd.* **50,** 361 (1963).
6. J. Costa, A. S. Tavares, A. de Carvalho and M. Reis, A citoquímica no prognóstico do cancro das vias urinárias. *J. Méd.* **59,** 865 (1966).
7. A. S. Tavares, J. Costa, A. de Carvalho and M. Reis, Tumour ploidy prognosis in carcinomas of the bladder and prostrate. *Brit. J. Cancer,* **20,** 438 (1966).
8. W. Sandritter and D. Kleinhans, Uber das Trockengewicht, den DNS-und Histonproteingehalt von menschlichen Tumoren. *Z. Krebsforsch.* **65,** 555 (1964).
9. W. Sandritter, M. Carl and W. Ritter, Cytophotometric measurements of the DNA content of human malignant tumors by means of the Feulgen reaction. *Acta cytol. (Philad.)* **10,** 26 (1966).
10. A. S. Tavares, Novos aspectos da citologia do cancro. *O Médico,* **13,** 272 (1961).
11. N. B. Atkin, and A. Ross, Polyploidy in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumours arising at different sites. *Brit. J. Cancer,* **10,** 769 (1960).
12. J. C. Maia, Statistical analysis of DNA histograms. Communication to the *Colloquium on Chromosomes and DNA in Pathology* (Oporto, 1963). Cited in [6, 7] (1966).
13. A. S. Tavares, *Aspectos da patologia da mama masculina.* Oporto (1958).
14. E. S. Meek, The cellular distribution of deoxyribonucleic acid in primary and secondary growths of human breast cancer. *J. Path. Bact.* **82,** 167 (1961).
15. M. G. Marques, Contribuiçao para o estudo da ploidia dos carcinomas do seio. M.D. thesis, Oporto (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 457–466. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Charakterisierung menschlicher Tumoren durch autoradiographische Untersuchungen von Biopsiematerial*

W. OEHLERT
Pathologisches Institut der Universität, Freiburg i. Brsg·

Die von zahlreichen Arbeitsgruppen mit unterschiedlicher Methodik durchgeführten autoradiographischen Stoffwechseluntersuchungen an menschlichen Geweben und Zellen dienen der Beantwortung verschiedener Fragen. So wurden die Versuchsergebnisse z.T. zur diagnostischen Bewertung des Biopsiematerials [1] z.T. auch für die Stellung der Prognose herangezogen. Einige Autoren errechneten unter Verwendung der erhaltenen autoradiographischen Untersuchungsergebnisse nach Applikation von ^{3}H-Thymidin die Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Tumoren [2–4], andere berücksichtigen sie bei der Wahl des Cytostatikums [5, 6]. Im Folgenden soll ein Überblick über die z.T. praktizierte Methodik derartiger autoradiographischer Stoffwechseluntersuchungen und über einige der bisher erreichten Ergebnisse gegeben werden. Hierbei sollen in erster Linie Untersuchungen der DNS-Neubildung unter Verwendung von ^{3}H-Thymidin berücksichtigt werden.

Untersuchungstechnik

Die günstigsten Versuchsbedingungen sind dann gegeben, wenn der Einbau radioaktiv markierter Nucleinsäure- und Proteinvorläufer *in vivo* und der autoradiographische Nachweis anschliessend an Biopsiematerial oder an Zellausstrichen erfolgt [7]. Dieses Vorgehen erfordert jedoch die Injektion verhältnismässig grosser Aktivitätsmengen, sodass diese Methode wegen der damit verbundenen Strahlenbelastung des Gesamtorganismus nur in Ausnahmefällen und nicht routinemässig oder gar mehrmals nacheinander durchführbar ist. Nur mit dieser Methode der *in vivo*-Inkorporation jedoch ist die exakte Bestimmung der DNS-Synthese–Zeit und anderer Generationsphasen möglich.

Um die Strahlengefährdung des Gesamtorganismus möglichst gering zu halten, wurde die intraarterielle Applikation radioaktiv markierter Nucleinsäurevorläufer vorgeschlagen [8]. Dabei erfolgt eine überwiegende Markierung des Operationsgebietes, bzw. des zu entfernenden Tumors, der dann nach operativer Entfernung autoradiographisch untersucht werden kann. Bei Wahl geeigneter Versuchszeiten zwischen intraarterieller Injektion und mehrmaliger Gewebsentnahme vor der endgültigen operativen Entfernung des Tumors gelingt auch mit dieser Methode eine Bestimmung von Generationszeiten.

Eine ebenfalls verhältnismässig streng begrenzte lokale Markierung von Lymphknoten erreicht man durch Injektion von tritiiertem Thymidin (50 μC) in die periphere Lymphbahn [9]. Nach Excision der entsprechenden Lymphknotengruppen und deren autoradiographischer Untersuchung erhält man

*Presented at the Second International Symposium on the Biological Characteristization of Human Tumors, Rome, April 24–26, 1967.

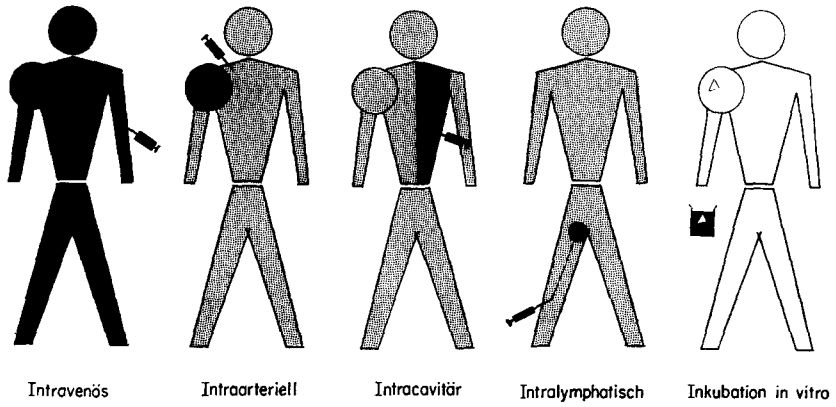


Abb. 1. Die verschiedenen Applikationsmöglichkeiten radioaktiv markierter Nukleinsäurevorläufer zur autoradiographischen Untersuchung menschlicher Tumoren und die damit verbundene Strahlengefährdung des Gesamtorganismus.

Aussagen über die Proliferationsaktivität und das Markierungsmuster bei Erkrankungen des lymphatischen Gewebes, vor allen Dingen bei Tumoren in diesen Geweben.

Ebenfalls ohne eine grössere Strahlenbelastung des Gesamtorganismus können Einbauversuche mit Radioaktivität in Körperhöhlen-Ergüssen durchgeführt werden [10]. Bei dieser Methode kommt man mit relativ kleinen Aktivitätsdosen (bis zu 500 μC) aus und erreicht innerhalb des Ergusses eine verhältnismässig grosse Aktivitätskonzentration.

Jegliche Belastung des Gesamtorganismus wird vermieden, wenn man die Einbauversuche *in vitro* an bioptisch entnommenen Geweben oder durch Punktion gewonnenen Zellen durchführt. Bei der Interpretation der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse setzt man voraus, dass die Inkorporationsverhältnisse des Tumorgewebes *in vitro* den *in vivo* existierenden Bedingungen gleichzusetzen sind. Wie eine Reihe von Kontrollversuchen gezeigt hat [11, 12], sind diese Voraussetzungen bei kurzen Inkubationszeiten in neutralem Medium weitgehend erfüllt. Der Nachteil der Inkubationsmethode liegt in der sehr geringen Eindringtiefe des Mediums, welches zwar durch Inkubation bei erhöhtem Sauerstoffdruck verbessert werden kann [13], aber dennoch die Untersuchung nur sehr kleiner Gewebspartikel gestattet. Da die Stoffwechselverhältnisse und der histologische Gewebsaufbau vor allem in grösseren Tumorarealen sehr unterschiedlich sein können, werden die bei der Inkubation kleiner Gewebspartikel erhaltenen Ergebnisse immer nur beschränkte Aussagen über umschriebene Tumorareale zulassen. Zusätzlich sei darauf hingewiesen, dass mittels der Inkubationsmethode eine Bestimmung von Generationsphasen nicht möglich ist.

Technik der in vitro-*Inkubation*

Unmittelbar nach Gewebsentnahme erfolgt die 30 min. Inkubation bei 37° in Ringerlösung oder anderen Nährmedien, durch welche ein Sauerstoffstrom geblasen wird. Durch Wahl von Inkubationsgefässen, in denen ein hoher Sauerstoffdruck während der Inkubation erzeugt wird [13] können die Ergebnisse erheblich verbessert werden. Der Inkubationslösung werden die entsprechenden radioaktiv markierten Stoffwechselvorläufer zugesetzt und zwar in folgender Konzentration:

^{3}H-Thymidin (spezifische Aktivität 3C/mMol) 2–4 μC/ml

^{3}H-Cytidin (spezifische Aktivität, 1,9 C/mMol) 4,6 μC/ml

^{3}H-Leucin-DL (spezifische Aktivität 2,4 C/m Mol) 10 μC/ml.

Nach 30-min Inkubation werden die Gewebsstücke für 24 Stunden in 4%igem neutralem Formalin fixiert, anschliessend in Paraffin eingebettet und in üblicher Weise in 5 μ-dicke Schnitte zerlegt. Von diesen Gewebsschnitten werden unter Verwendung photographischer Emulsionen (Ilford K2, Ilford G 5, Kodak AR 10-Stripping-Film) Autoradiogramme angefertigt, die nach entsprechenden Belichtungszeiten photographisch entwickelt, fixiert und dann gefärbt werden. Diese Technik wurde in vielfacher Weise modifiziert, z.B. durch Veränderung der Inkubationszeiten, durch entsprechende vorhergehende Präparation der entnommenen Gewebsproben oder durch unterschiedliche Anfertigung der Autoradiogramme; sie ist jedoch im Prinzip bei allen Untersuchern die gleiche.

Ergebnisse autoradiographischer Untersuchungen zum Proliferationsmuster und der Proliferationsgrösse präcanceröser menschlicher Gewebsveränderungen

Im Tierexperiment konnte am Beispiel des

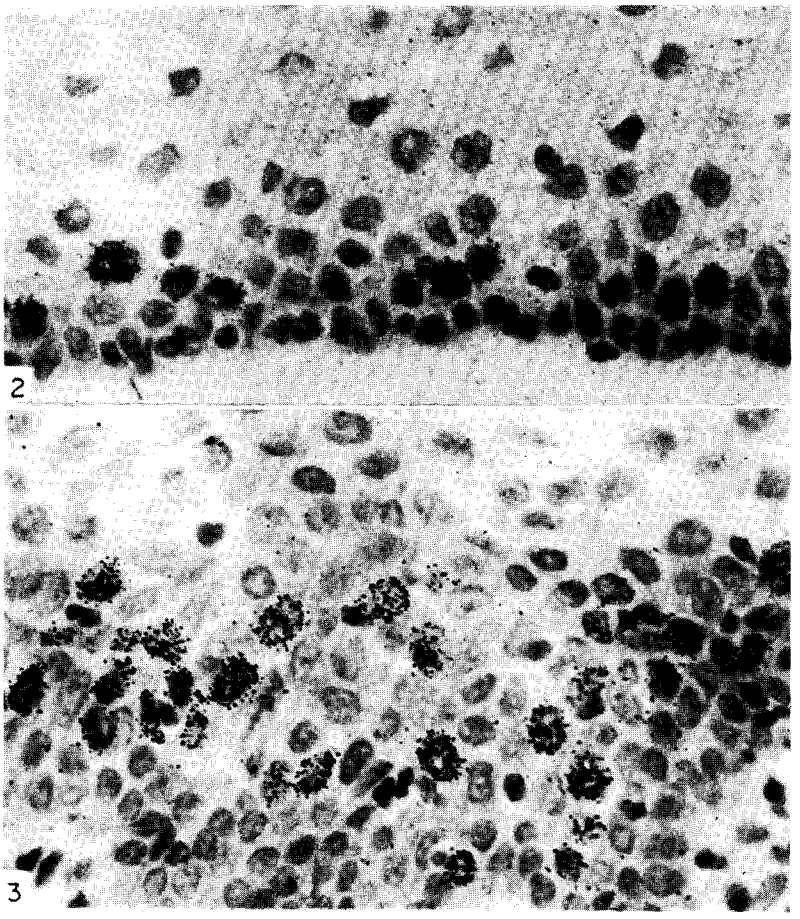


Abb. 2. *Autoradiogramm des normalen Portioepithels,* 30 *min nach inkubation mit* ^{3}*-H-Thymidin.*

Abb. 3. *Autoradiogramm des abnormen Portioepithels,* 30 *min nach Inkubation mit* ^{3}*-H-Thymidin.*

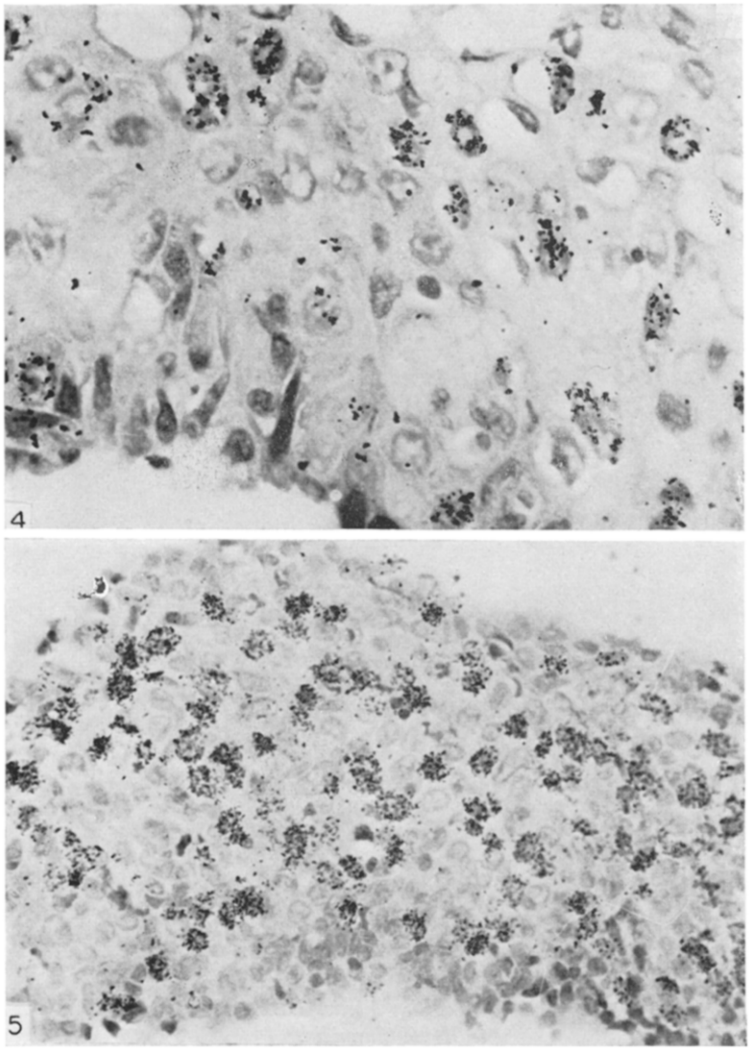


Abb. 4. *Autoradiogramm des atypischen Portioepithels*, 30 *min nach Inkubation mit* ^{3}H-*Thymidin.*

Abb. 5. *Autoradiogramm des nicht verhornenden Pflasterzellkarzinoms der Portio, 30 min. nach Inkubation mit* ^{3}H-*Thymidin.* (*Alle Bilder aus: Fettig und Sievers* [15]).

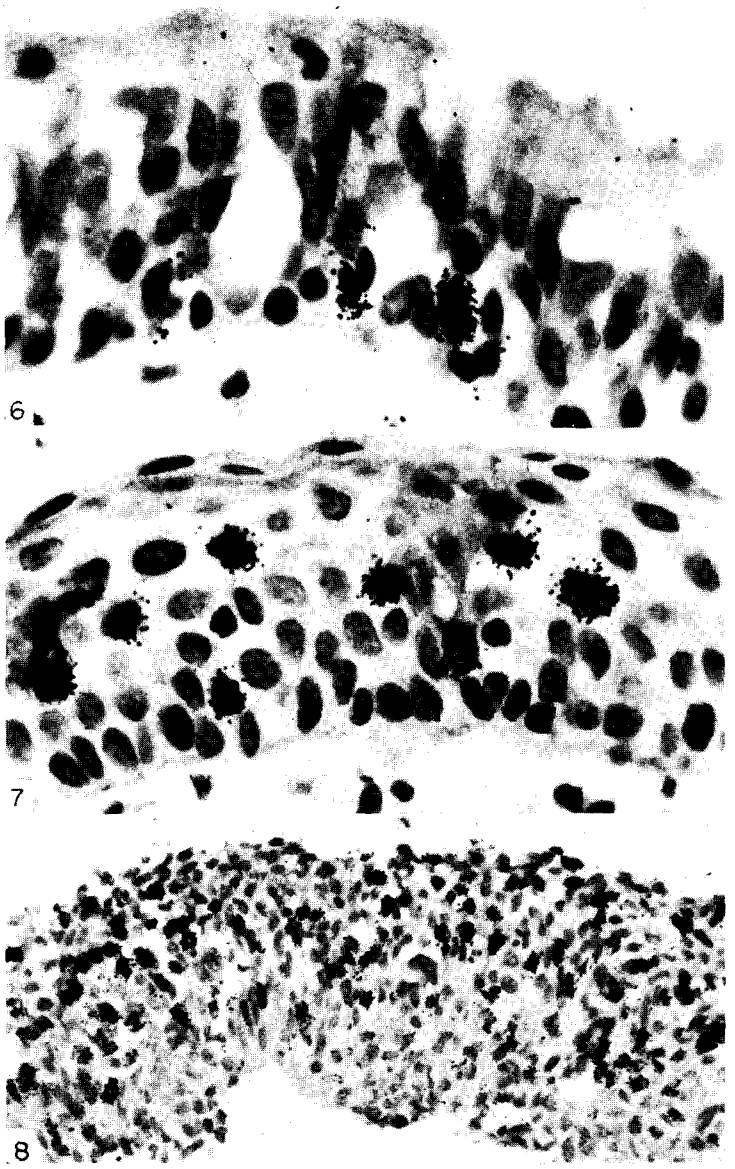


Abb. 6, 7, 8. *Autoradiogramme des normalen* (6) *metaplastischen* (7) *carcinomatös* (8) *veränderten menschlichen Bronchialepithels,* 30 *min. nach Inkubation mit* ^{3}*-H-Thymidin.*

Tabelle 1. *Autoradiographisch bestimmte Generationszeit der intermitotischen Zellen der Mäusehaut während der Krebsentstehung durch Methylcholanthren-Applikation* [14]

Gewebe	^{3}H-Markierungsindex	Länge der S-Phase	Generat. Zeit
Strat. basale unbeh. Epithel	2–4%	6–7 Std.	150 Std.
Hyperplasie	14,2%	8 Std.	56 Std.
Carcinom	30,0%	8 Std.	32 Std.

Plattenepithelcarcinoms der Mäusehaut nach lokaler Applikation von Methylcholantren nachgewiesen werden, dass dem über mehrere Wochen sich hin erstreckenden Cancerisierungsprozess zum voll ausgebildeten Carcinom eine steigende Proliferationsgeschwindigkeit und eine Veränderung des Proliferationsmusters im mehrschichtigen Plattenepithel parallel gehen. Die in Tabelle 1 aufgeführten Werte zeigen, dass vom normalen mehrschichtigen Plattenepithel über die Hyperplasie bis zum Carcinom eine erhebliche Zunahme der Proliferationsaktivität mit der dazugehörigen Abnahme der Generationszeit erfolgt [14].

Ganz ähnliche Ergebnisse wurden bei autoradiographischen Untersuchungen am mehrschichtigen Portioepithel durch Inkubation von Gewebsstücken mit ^{3}H-Thymidin erhalten. [15] Bei den in Tabelle 1a aufgeführten Werten wurde die Generationszeit unter Zugrundelegung einer DNS-Synthesezeit von 6 Stunden errechnet. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass auch im menschlichen Portioepithel während der präcancerösen Epithelveränderungen eine erhebliche Steigerung der Proliferationsrate besteht. Innerhalb der verschiedenen Entdifferenzierungsstufen vom abnormen zum atypischen Portiopithel bestehen keine signifikanten Unterschiede; mit der Entwicklung zum Carcinom erfolgt jedoch eine erneute Steigerung der Proliferationsrate mit einer entsprechenden Verkürzung der Generationszeit.

Zusätzlich zu diesen durch quantitative Auswertung von Autoradiogrammen erhaltenen Aussagen, die selbstverständlich nur als relative Annäherungswerte verstanden werden können, wurde durch die Inkubationstechnik eine Änderung im Proliferationsmuster des Portioepithels aufgefunden, welche in Parallele zu den entsprechenden Veränderungen bei der experimentellen Cancerisierung zu setzen ist.

In Abb. [2–5] ist deutlich erkennbar, dass bei der Cancerisierung des menschlichen Portioepithels immer mehr Zellschichten in die DNS-Synthese und damit in die Indifferenzzone einbezogen werden. Im voll ausgebildeten Carcinom schliesslich existiert eine eigentliche Indifferenzzone nicht mehr. Alle Zellen sind zur DNS-Synthese befähigt.

Tabelle 1*a*. *Nach* in vitro-*Incorporation von* ^{3}*H-Thymidin bestimmte Markierungsindices und geschätzte Generationszeiten des Portioepithels (menschl.) des atypischen Epithels und des Portiocarcinoms* [15]

Gewebe	^{3}H-Markierungsindex (%)	Länge der S-Phase	Generat. Zeit
Portioepithel normal	6,2		96 Std.
abnorm.	12,0	für alle Gewebe angenommene Zeit	50 Std.
unruhig	15,0		40 Std.
		=6 Std.	
atypisch	15,7		38 Std.
Carcinom	23,0		26 Std.

Tabelle 2. ^{3}H-*Markierungsindices und geschätzte Generationszeiten menschlicher Tumoren nach autoradiographischen Untersuchungen* (in vitro-*Inkubation*)

Gewebe	Markierungsindex (%)	Generat. Zeit	Literatur
Adeno-Ca. Colon			
Metastase	22,0	27 Std.	
Magen-Ca.	9,0	66 Std.	
Adeno-Ca. Colon			
Metastase	8,0	75 Std.	
Leber-Ca.	2,5	10 Tage	
Glioblast. multif.	0,6	1 Monat	[2a]
Cystadenom Ovar	0,36	1,5 Monat	
Ovarial-Ca.	0,34	1,5 Monat	
Mamma- Ca.	0,14	3,0 Monat	
Leiomyom	0,07	5,5 Monat	
Kleinzell. Bronchus-Ca.	10,2	60,0 Std.	
Kieferhöhlen-Ca.	15,0	39,6 Std.	[3]
Pflasterzell-Ca. Zunge	7,0	85,8 Std.	
Pflasterzell-Carcinome der Portio uteri	18,3	32,8 Std.	
Pflasterzell-Carcinome der Portio uteri	20,8	28,8 Std.	
Pflasterzell-Carcinome der Portio uteri	25,8	23,2 Std.	
Pflasterzell-Carcinome der Portio uteri	26,6	22,6 Std.	[15]
Adeno-Ca. Corp. uteri	9,6	62,5 Std.	
	12,3	48,8 Std.	
	14,8	40,9 Std.	
Schleimhaut-Sa. Uterus	12,3	48,8 Std.	
Coecum-Ca.	20,2	28,0 Std.	
Sigma-Ca.	26,5	22,0 Std.	
Rectum-Ca.	15,4	35,0 Std.	[18]
Ca. Rectum/Sigma	4,5	112,0 Std.	
Sigma-Ca.	10,9	48,0 Std.	
Aszites Zellen nach *in vivo*-Applikation von ^{3}H-Thymidin			
Mamma-Ca.	12,5	3,4 Tage	
Ovarial-Ca.	4,5	6,5 Tage	
Oesophagus-Ca.	3,2	9,0 Tage	[10a]
Magen-Ca.	3,0	10,0 Tage	
Lymphoma malign. Hodgkin	1,8	16,0 Tage	
Kystoma pseudomuc. Ovar.	0,05	16,0 Monate	

Ähnliche Untersuchungen wie am Portioepithel wurden [16] am Biopsiematerial des Bronchialepithels vorgenommen. Auch hier liess sich nachweisen, dass mit zunehmender Entdifferenzierung des Epithels eine Steigerung der Proliferationsaktivität erfolgt, welche im Carcinom ihren Höhepunkt erreicht. In den Abb. [6–8] erkennt man, dass im metaplastisch veränderten Bronchialepithel, wie im Portioepithel, die Indifferenzzone auf alle Zellschichten ausgedehnt wird, wobei die gewebsspezifische Differenzierung verloren geht und die Proliferationsaktivität zunimmt.

Von besonderem Interesse sind Versuchsergebnisse von Trepel und Mitarb. [17] welche durch *in vitro*-Inkubation mit ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Cytidin die DNS-Synthese und den RNS-Umsatz in verschiedenen Zellarten des Lymphknotens bei Lymphknotenhyperplasien, Morbus Hodgkin, grossfollikulärem Lymphoblastom und Leukosen bestimmt haben. Dabei ergaben sich für Lymphknotenhyperplasien, grossfollikuläres Lymphoblastom und Morbus Hodgkin sehr ähnliche Einbauspektren, insofern, als bei allen drei Erkrankungen die lymphatischen Retikulumzellen den grössten Markierungsindex aufwiesen. Ähnliche Markierungsspektren zeigten

reifzellige und unreifzellige Lymphadenosen, während die akute Myelose und das Retikulumzellsarkom völlig andere Markierungsverhältnisse aufwiesen. Die Grösse des Markierungsindex für die einzelnen Zellarten bei den verschiedenen Erkrankungen lagen sehr nahe beieinander und ähnlich wie für die Leukosen kann auch für die Lymphknotenerkrankungen festgestellt werden, dass die Proliferationsaktivität reaktiver Veränderungen eher grösser ist, als diejenige bösartiger Tumoren wie: Morbus Hodgkin, grossfollikuläres Lymphoblastom oder Lymphadenose.

Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit bösartiger Tumoren durch in vitro-*Untersuchungen der DNS-Synthese*

Bei guter Durchmarkierung der untersuchten Gewebe und durch Auswertung genügend grosser Zellzahlen kann der ^{3}H-Markierungsindex der entsprechenden untersuchten Tumoren ermittelt werden. Er gibt die Anzahl markierter Zellkerne pro Gesamtzellzahl an. Unter der Annahme, dass jeder DNS-Synthese eine Mitose folgt, ist der ^{3}H-Markierungsindex ein direktes Mass für die Proliferationsaktivität eines Gewebes. Für das entsprechende Gewebe für das die Länge der DNS-Synthesezeit bekannt ist, kann die mittlere Lebensdauer der entsprechenden Zellpopulation errechnet werden. Wir hatten bereits darauf hingewiesen, dass die Bestimmung der DNS-Synthesezeit mittels der Inkubation überlebenden Gewebes praktisch unmöglich ist. *In vivo*-Untersuchungen an menschlichen Geweben hatten ergeben, dass mit DNS-Synthesezeiten von 6 bis über 12 Stunden zu rechnen ist. Legt man derartige Werte der Berechnung von Generationszeiten unter Verwendung der durch *in vitro*-Inkubation erhaltenen Markierungsindices zugrunde, so hat man zu berücksichtigen, dass diese Werte mit einer erheblichen Fehlerbreite belastet sind. Es besteht die Moglichkeit, dass die Lange der DNS-Synthesezeit bei den verschiedensten Tumoren des Menschen ganz erhebliche Unterschiede aufweisen kann, sodass für eine exakte Bestimmung der Generationszeit die DNS-Synthesezeit für den entsprechenden Tumor jeweils bestimmt werden müsste.

Bei den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen wurde von der Mehrzahl der Untersucher ihren Berechnungen eine DNS-Synthesezeit von 6 Stunden zugrundegelegt, welche, wie wir heute, wissen mit Sicherheit zu kurz bemessen ist. Immerhin wurden auf diese Weise zunächst einmal Werte für die verschiedenartigsten menschlichen Tumoren erhalten, die unter Berücksichtigung der genannten Voraussetzungen miteinander vergleichbar sind. Die bei annähernd gleichen Inkubationszeiten erhaltenen Ergebnisse für eine ganze Reihe von menschlichen Tumoren sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Das Verhältnis zwischen Markierungs- und Mitose-Index in menschlichen Tumoren

Wir wissen aus allen bisher vorliegenden autoradiographischen Untersuchungen *in vivo*, dass entsprechend der unterschiedlichen Länge der DNS-Synthese–Zeit und der Mitosezeit auch die Markierungs- und Mitoseindices unterschiedlich sind. Da bei der Mehrzahl der untersuchten proliferierenden Gewebe die DNS-Synthesezeit um ein Vielfaches länger als die Mitosezeit ist, liegen im allgemeinen die Werte der ^{3}H-Markierungsindices in schnell proliferierenden Geweben etwa um den Faktor 10 höher als die entsprechenden Mitoseindices. [19] Das Verhältnis zwischen

Tabelle 3. ^{3}H-*Markierungsindex und Mitoseindex in menschlichen Tumoren nach* 120 *min. Inkubation mit* ^{3}H-*Thymidin* [20]

Gewebe	^{2}H-Markierungsindex (%)	Mitoseindex (%)
Scirrhöses Ca. Mamma	0,74	0
Pflasterzell-Ca. Portio	5,64	0,14
Pflasterzell-Ca. Portio	3,86	0,04
Neurogenes Sarkom Brustwand	1,06	0,02
Leiomyosarkom Magenwand	0,88	0,02
Pflasterzell-Ca. Larynx	6,30	0,12
Pflasterzell-Ca. Pharynx	19,72	0,32
Normales Zungenepithel	4,90	0,02
Pflasterzell-Ca. Zunge	7,32	0,02
Adeno-Ca. Uterus (bestrahlt)	0,20	0
Adeno-Ca. Uterus (unbestrahlt)	7,24	0,14
Thymon	1,36	0,12

Markierungs- und Mitoseindex gibt demnach im allgemeinen das Verhältnis zwischen Länge der Mitosezeit und Länge der DNS-Synthesezeit an. Die Verhältnisse verschieben sich in dem Augenblick, da nicht jeder DNS-Synthese eine Mitose folgt. Wie die Ergebnisse von Coons, Norman und Nahum [20] in Tabelle 3 zeigen, bestehen in inkubierten Tumorgeweben Unterschiede zwischen ^{3}H-Markierungsindex und Mitoseindex, die so gross sind, dass sie unmöglich durch das unterschiedliche Verhältnis zwischen DNS-Synthesezeit und Mitosezeit bedingt sein können. Die Untersucher inkubierten frisch entnommene Gewebsbröckel zwei Stunden lang bei 37° in einem Nährmedium unter einer 95 %igen Sauerstoffatmosphäre. Die quantitative Auswertung erfolgte anschliessend an Zellausstrichen der trypsinierten und zerriebenen Gewebe. Die dabei erhaltenen riesigen Unterschiede zwischen Markierungs- und Mitoseindex sind u.E. dadurch bedingt, dass zwar alle diejenigen Zellelemente, welche sich zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme in ihrer DNS-Synthesephase befanden, diese zu Ende führten und dabei markiert und gezählt wurden. Demgegenüber dürften die zum gleichen Zeitpunkt beginnenden oder in Gang befindlichen Mitosen während der Inkubation abgelaufen und deshalb bei der Untersuchung nicht mehr nachweisbar sein. Da neue Mitosen nach den bisher vorliegenden Erfahrungen während der Inkubationszeit nicht mehr einsetzen, muss die Mitosezahl inkubierten Materials geringer als unter *in vivo*-Verhältnissen sein.

So konnte z.B. Rajewski [12] bei Inkubationsversuchen mit tierischen Tumoren nachweisen, dass im Excisionsmaterial zwar die bereits begonnene DNS-Synthese weiter abläuft und dabei ein Einbau von ^{3}H-Thymidin stattfindet, ein Übertritt neuer Zellen aus der G 1-Phase in die DNS-Synthesephase und aus der G 2 in die Mitosephase nicht mehr erfolgt. Die nach Inkubation ermittelten Mitoseindices sind deshalb im Gegensatz zu den Markierungsindices nicht den Verhältnissen *in vivo* gleichzusetzen. Zu Vergleichen zwischen Markierungs- und Mitoseindex müssen demnach Mitosezählungen herangezogen werden, die an frisch entnommenen, nicht aber an inkubiertem Gewebsmaterial durchgeführt werden.

Zur Bestimmung von Wachstumgeschwindigkeiten menschlicher Tumoren durch Inkubationsversuche

Versucht man aus Ergebnissen, welche im Inkubationsversuch erhalten werden, die Wachstumsgeschwindigkeit entsprechender menschlicher Tumoren zu bestimmen, so hat man eine ganze Reihe von Faktoren zu berücksichtigen, welche im Einzelfall mehr oder weniger gut zu definieren sind.

Bei der Gewebsentnahme aus einem Tumorareal und der Untersuchung eines sehr kleinen Gewebszylinders erhält man nur Angaben über die Verhältnisse in dem untersuchten im Verhältnis zur Gesamttumorgrösse winzigen Gewebsbezirk. Die Wachstumsintensität kann in den verschiedenen Gewebsarealen eines Tumors ausserordentlich unterschiedlich sein. Vor allem muss berücksichtigt werden, dass erfahrungsgemäss periphere Tumorareale besser durchblutet und deshalb wachstumsintensiver sind, als zentral gelegene Gewebspartien. Lieb und Lisco [18] versuchten in ihren Untersuchungen die unterschiedliche Wachstumsintensität in Tumorzentrum und Peripherie zu berücksichtigen. Durch die getrennte Auswertung zahlreicher kleiner inkubierter Gewebsbröckel verschiedener Tumoren erhielten sie Mittelwerte für Tumorzentrum und Tumorperipherie, welche in Tabelle 4 aufgeführt sind. Wie die Ergebnisse zeigen, können die Unterschiede bei

Tabelle 4. ^{3}H-*Markierungsindex in zentralen und peripheren Tumorabschnitten nach* 30 *min. Inkubation mit* ^{3}H-*Thymidin* [18]

Tumor	^{3}H-Markierungsindex in %	
	Zentrum	Peripherie
Coecum-Ca.	21,0; 21,6 24,2; 16,5	18,5; 16,3 23,1
Sigma-Ca.	11,9; 16,5 31,5; 21,8	24,4; 38,0 25,5; 42,5
Rectum-Ca.	4,8; 10,0	31,5
Rectum/Sigma-Ca.	3,1; 3,4 7,1	
Sigma-Ca.	8,7	

verschiedenen Tumoren gering, wie im Falle des Coecum-Carcinoms oder aber sehr erheblich sein, wie beim Rektumcarcinom. Grundsätzlich werden die Unterschiede in der Proliferationsaktivität von der Grösse der Tumorknoten oder Tumorareale, bzw. von dem Ausmass ihrer Gefässversorgung abhängig sein.

Als weitere Faktoren bei der Errechnung von Wachstumsgeschwindigkeiten menschlicher Tumoren aus den Ergebnissen von Inkubationsversuchen haben wir zu berücksichtigen, dass wir mit dieser Methode nur die Proliferationsgrösse und unter Umständen die mittlere Lebensdauer der Tumorzellpopulation erfassen. Diese Proliferationsgrösse muss jedoch nicht unbedingt Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeit des entsprechenden Tumors erlauben, da hierfür die Zahl zugrundegehender Zellen mit ausschlaggebend sein dürfte. Die Teilungsgeschwindigkeit eines Tumors ist nur dann direkt der Wachstumsgeschwindigkeit, d.h. der Volumenzunahme gleichzusetzen, wenn jede der beiden aus einer Zellteilung entstehenden Tochterzellen nach entsprechender Generationszeit zwei weitere zur Teilung befähigte Enkelzellen bildet. Dieser Teilungs- und Wachstumsmechanismus dürfte jedoch nur in den frühesten Stadien des Embryonalwachstums, bzw. in den ersten Zellteilungen nach Implantation sehr wachstumssinsentiver Implantationstumoren, z.B. des Yoshida-Hepatoms AH 130 realisiert sein.

Bei Überschreitung einer bestimmten, sicherlich noch im mikroskopischen Bereich liegenden Tumorgrosse setzen jedoch Differenzierungsprozesse ein und kommt es zu einem Zellverlust durch Zelltod und Zellabschilferung, welche das Tumorwachstum ganz entscheidend beeinflussen dürften.

Zusätzlich müssen Polyploidisierungsprozesse berücksichtigt werden, welche ebenfalls trotz vorher ablaufender DNS-Neubildung die Entstehung weiterer teilungsfähiger Zellen verhindern.

Diese Überlegungen führen zu der Tatsache, dass durch Bestimmung des Markierungsindex nach Inkubation mit ^{3}H-Thymidin nur ein relatives Mass für die Proliferationsaktivität der Tumorzellen in einem bestimmten Teil eines Tumors und zu einer bestimmten Zeit erhalten werden kann. Eine Charakterisierung menschlicher Tumoren, geschweige denn eine exakte Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors allein mittels der Bestimmung von Markierungs- oder Mitoseindex ist unmöglich. In jedem Einzelfalle muss neben diesen mit neuer Methodik erhaltenen Werten das histologische und cytologische Bild des entsprechenden Tumors berücksichtigt werden, wenn eine möglichst allgemein gültige Charakterisierung der verschiedenen Tumortypen erreicht werden soll.

RESUME

(*A*) *De petits fragments de tissu, prélevés par biopsie, sont incubés dans des solutions contenant de la thymidine ^{3}H, soit immédiatement après le prélèvement, soit après congélation et section en coupes de quelques millimètres d'épaisseur. Après des temps variables d'incubation, les échantillons sont étudiés par autoradiographie. Dans certaines conditions, le pourcentage de noyaux marqués fournit des indications sur la vitesse de prolifération des cellules dans les différentes tumeurs. La méthode du marquage à la thymidine est préférable à la mesure de l'index mitotique, parce que le nombre des cellules marquées est élevé, et parce que le comptage des cellules marquées est techniquement plus aisé que la détermination de l'index mitotique. Dans les tumeurs croissant très rapidement, le temps mitotique est si court que les mitoses en cours au moment de la biopsie peuvent déjà être achevées au moment de la fixation, et elles ne peuvent, par conséquent, pas être mises en évidence dans les préparations histologiques.*

(*B*) *Si certaines conditions méthodologiques sont remplies, les résultats de l'étude de tumeurs humaines par cette méthode ont un intérêt, non seulement pour le pathologiste, mais aussi pour l'investigation clinique.*

(1) Pathogénie. *l'étude de la prolifération cellulaire a conduit à des résultats intéressants dans le cancer du poumon, le cancer du col utérin et la maladie de Hodgkin.*

(2) Diagnostic. *la technique de marquage* in vitro *est utilisée, en clinique, pour l'étude de biopsies et de frottis, dans des cas où les techniques de colorations conventionnelles donnent des résultats douteux.*

(3) Traitement. *cette méthode peut, par exemple, donner des indications pour le choix du traitement dans le carcinome de la vessie. A la façon des antibiogrammes en bactériologie, l'effet des agents chimiothérapiques sur les cellules d'une tumeur donnée peut*

être étudié in vitro, *et le traitement peut être choisi en fonction du résultat. De la même façon, les résultats du traitement peuvent être suivis par des études répétées sur du matériel biopsique.*

SUMMARY

(A) *Small tissue samples obtained by biopsy are incubated in 3H-thymidine containing solutions, either immediately after biopsy or after temporary freezing and cutting into several mm thick sections. After variable incubation periods and subsequent fixation and histological processing, the samples are investigated by autoradiography. Under certain conditions, the proportion of labelled cell nuclei yields information on the rate of cell proliferation in the respective tumours. The method of thymidine labelling is preferable to the counting of cells in mitosis because a larger part of the proliferating cell population is measured and because the demonstration of labelled cells is easier and more dependable than the determination of mitotic indices. In extremely fast growing tumours, as for instance the small cell bronchial carcinoma, the mitotic time is so short that the mitosis which are in process during biopsy will be terminated by the time of fixation and can therefore not be demonstrated by histological techniques.*

(*B*) *Certain methodological conditions are fulfilled, the results obtained from incubation experiments with human tumour material are important not only for the pathologist, but also for clinical evaluation:*

(1) Pathogenesis. *the determination of the proliferative patterns and the rates of cell proliferation has led to results which are of importance for our understanding of the development of bronchial carcinomata, carcinomata of the portio uteri, and Hodgkin's disease.*

(2) Cancer diagnosis. *the* in vitro *labelling technique is already clinically used for the evaluation of biopsies and especially cell smears, in cases where the conventional staining techniques yield no clear results.*

(3) Cancer therapy. *the results thus far obtained are, for example, used for the choice of the optimal therapeutic method in the case of bladder carcinomata. In analogy to resistance tests in bacteriology, the effect of certain cytostatic drugs on the cells of a certain tumour can be determined* in vitro *and therapy adjusted according to the result. In a similar way, therapeutic results can be controlled by periodical incubation tests of biopsy material. The different aspects mentioned in this summary will be discussed in detail using examples from this and other laboratories.*

ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst werden die verschiedenen Möglichkeiten zur Durchführung autoradiographischer Untersuchungen an menschlichen Geweben unter Berücksichtigung der dabei auftretenden Strahlengefährdung des Gesamtorganismus besprochen.

Einige der bisher erhaltenen Versuchsergebnisse werden auf ihre Bedeutung für Tumorentstehung und Erfassung des Tumorwachstums geprüft. Weiter wird darauf hingewiesen, dass mit der Bestimmung von Mitose- und Markierungsindices noch keine Aussagen über die Geschwindigkeit des Tumorwachstums verbunden sind, da mit diesen Methoden die Bestimmung der Anzahl absterbender Tumorzellen nicht möglich ist.

Abschliessend wird darauf hengewiesen, dass die Anwendung neuer Methoden zwar neue Gesichtspunkte und Vergleichswerte liefert, dass eine Charakterisierung des einzelnen Tumors nur möglich ist, wenn auch das Ergebnis der konventionellen histologischen und cytologischen Untersuchung entsprechend mitverwertet wird.

LITERATUR

1. R. Lesch, W. Schiessle und W. Oehlert, Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese an menschlichem Excisionsmaterial aus dem Bronchialbaum. *Beitr. path. Anat.* **129,** 295 (1963/64).
2. Baserga, R., G. C. Henegar, W. E. Kisielesky und H. Lisco, Uptake of Tritiated Thymidine by Human Tumors *in vivo*. *Lab. Invest.* **11,** 360 (1965).

2a. R. Baserga und W. E. Kisielesky, Recent observations on cell proliferation and metabolism by radiography with tritiated compounds. *Atompraxis* **8,** 386 (1962).

3. W. Oehlert, P. Dormer and R. Lesch. Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese im überlebenden Tumorgewebe des Menschen. *Beitr. path. Anat.* **128,** 468 (1963).
4. H. A. Johnson and V. P. Bond, A Method of labeling tissues with tritiated thymidine *in vitro* and its use in comparing rates of cell proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the human breast. *Cancer* **14,** 639 (1961).
5. W. H. Wolberg and R. R. Brown, Autoradiographic studies of *in vitro* incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. *Cancer Res.* **22,** 1113 (1962).
6. R. J. Veenema, B. Fingerhut and A. S. Girgis: A possible guide to therapy of bladder tumors. *J. Urol. (Baltimore)* **90,** 736 (1962).
7. H. A. Johnson, J. R. Rubini, E. P. Cronkite and V. P. Bond, Labeling of human tumor cells *in vivo* by tritiated thymidine. *Lab. Invest.* **9,** 460 (1960).
8. P. Kissel, A. Duprez, M. Bessot, J. Schmitt and A. Dollander, Autoradiography *in vivo* of human cancers. *Nature (Lond.)* **210,** 274 (1966).
9. P. Dormer, pers. Mitteilung (1967).
10. B. Choné, Intrakavitäre Radiogoldapplikation im Spiegelbild der Zytodiagnostik und Autoradiographie. *Nucl.-Med., (Stuttgart)* **111,** 285 (1963).

10a. B. Choné Klinisch-experimentelle Untersuchungsergebnisse zum Tumorstoffwechsel *in situ*. Mitt GBK **4,** 189 (1966).

11. M. F. Rajewsky, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours III. Characteristics of a standardised *in vitro* system for the measurement of ^{3}H-thymidine incorporation into tissue explants. *Europ. J. Cancer* **1,** 281 (1965).
12. M. F. Rajewsjy, Zellproliferation in normalen und malignen Geweben: ^{3}H-Thymidin-Einbau *in vitro* unter Standardbedingungen. *Biophysik* **3,** 65 (1966).
13. G. G. Steel and J. P. M. Bensted, *In vitro* studies of cell proliferation in tumours I. Critical appraisal of methods and theoretical considerations. *Europ. J. Cancer* **1,** 275 (1965).
14. P. Dörmer, W. H. Tulinius and W. Oehlert, Untersuchungen über die Generationszeit, DNS-Synthesezeit und Mitosedauer von Zellen der hyperplastischen Epidermis und des Plattenepithelcarcinoms der Maus nach Methylcholanthrenpinselung. *Z. Krebsforsch.* **66,** 11 (1964).
15. O. Fettig und R. Sievers, ^{3}H-Index und mittlere Generationszeit des menschlichen Portiocarcinoms und seiner Vorstufen. *Beitr. path. Anat.* **133,** 83 (1966).
16. W. Schiessle, U. Ernst und W. Oehlert, *Autoradiographische Untersuchungen zur RNS- und DNS-Synthese an bioptisch entnommenem menschlichem Gewebe bei chronischer Bronchitis und Bronchialkarzinom. Radionuklide in der klinischen und experimentellen Onkologie.* Schattauer, Stuttgart (1965).
17. F. Trepel, J. Rastetter, H. Theml and G. Stockhusen, Nukleinsäuresynthese und Zytostaticawirkung in pathologischen Lymphknotenzellen. *Med. Klin.* **61,** 618 (1966).
18. L. M. Lieb and H. Lisco, *In vitro* uptake of tritiated thymidine by carcinoma of the human colon. *Cancer Res.* **26,** 733 (1966).

19. B. Schultze and W. Oehlert, Autoradiographic investigation of incorporation of ^{3}H-Thymidine into cells of different tissues of the rat and the mouse. *Science* **131,** 737 (1960).

20. H. Coons, A. Norman and A. M. Nahum, *in vitro* measurements of human tumor growth. *Cancer* **19,** 1200 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 467–473. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Diffusible Thromboplastins of Human Cancer and Chorion Tissue*

W. A. BOGGUST, R. A. Q. O'MEARA and W. W. FULLERTON

Cancer Research Unit, Department of Experimental Medicine, Trinity College and Saint Luke's Hospital, Dublin, Ireland

HUMAN cancers produce a very labile readily diffusible coagulative factor which induces the formation of fibrin within and around the tumours [1]. Human chorion tissue behaves similarly [2, 3]. The factor is loosely defined as thromboplastic because it induces coagulation in recalcified citrated human plasma and is without direct action upon fibrinogen alone or on citrated plasma before recalcification.

When studied by chromatography upon DEAE-cellulose [3], the thromboplastic property of chorion and cancer extracts was distributed between several chromatographically distinct subfractions shown by electrophoresis on starch-gel to be heterogeneous with regard to their content of different protein species. Gel-filtration studies using Sephadex G.200 [4] revealed that the tissue extracts and subfractions contained members of a common group of thromboplastic components charaterised by the reproducibility of their distribution coefficients.

Variations in the lability of the factor at room temperature and at 60°C are related to the state of the -SH groups in the experimental system, isolated thromboplastic fractions becoming more thermo-stable and less reactive on storage [5]. Lability is restored by cysteine, glutathione, sulphite and hydrosulphite; but not by cystine, thiosulphate or ascorbate. Other thromboplastins, both water-soluble and wholly lipid in character, showed corresponding determination of their thermolability by cysteine.

Two test systems have been used during the investigation. In one procedure, one-stage clotting tests were carried out at 37°C as described by Biggs and Macfarlane [6] using normal citrated blood-bank plasma, thromboplastic fraction and M/40 $CaCl_2$. In the other procedure the test system, intended to represent an artificial tissue fluid in respect to its protein content, has been citrated human plasma diluted 1/6 and set to pH 6·5 with saline and with McIlvaine's citrate phosphate buffer [3]. Such a mixture, when recalcified, will clot spontaneously in 30 minutes and as it will coagulate more rapidly in the presence of added thromboplastin, it can be used after standardisation to assay the concentration and activity of the component added. The results given by the two systems are comparable.

On preincubation of the water-soluble thromboplastins with protamine preparations at concentrations as low as 1/100,000 and with certain quaternary bases, their characteristic activity was markedly diminished, whereas the activity of the test system was unchanged. Synthetic guanidino compounds of the paludrine class likewise showed anti-thromboplastic properties, but these also affected the clotting activity of the test plasma.

The effect of certain antithromboplastic reagents in 0·85% saline solution (0·01 mg/ml, 0·1 ml) when preincubated at 37°C for 30 min

*Presented at the Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours, Rome, April 1967.

Table 1. *Effect of inhibitors on thromboplastic activity of standard chorion extract in buffered plasma substrate*

Inhibitor	Clotting time (min)
Prolothan G	22
C.P.C.	21
C.T.A.B.	27
Triton X 400	22
Vaccenic acid	26
Palmitoleic acid	30
Extraction with ether	12
Extraction with chloroform methanol	13
Diazomethane	30
No inhibitor	12
No thromboplastin:	29–31
Inhibitor without thromboplastin	29–31

with a diluted chorion extract (0·5 ml), prior to carrying out the standard clotting test, is shown (Table 1) for a protamine–glucose preparation (Prolothan G; Evans Medical Ltd.), cetyl-pyridinium chloride (C.P.C.), cetyl-trimethylammonium bromide (C.T.A.B.) and stearyl-dimethylbenzylammonium chloride (Triton X 400).

Inhibition by nitrogenous bases suggested that the thromboplastic function was associated with acidic groupings in the active material. This was supported by the antithromboplastic property of certain pure long-chain fatty acids which was related to their chain-length and degree of unsaturation. Some fatty acids completely neutralised the activity of the thromboplastin [7]. That the thromboplastins were acidic in character had previously been inferred from their retention on DEAE-cellulose and by their precipitation on acidification of their aqueous extracts.

The essential role of free long-chain fatty acids was further demonstrated by the complete inhibition of thromboplasticity induced by exposure of freeze-dried chorion extract to diazomethane in ethereal solution. Diazomethane which is a reagent capable of esterifying carboxylic acids under very mild conditions [8] was also found similarly to inhibit a series of water-soluble thromboplastins (Table 2). The inhibitory fatty acids, therefore, appeared to be in competition with active fatty acids in the thromboplastins. Exhaustive extraction of dried chorion extract by chloroform-methanol or ether in the absence of diazomethane removed negligible amounts of lipid material and had little effect on thromboplasticity (Table 1).

After diazomethane treatment of chorion extract and of its DEAE-cellulose sub-fractions, extraction with ether yielded products containing methyl esters which were saponified with N/1 KOH in 50% aqueous ethanol at 100°C. Acidification followed by extraction with ether, washing and desolvation of the extracts gave mixtures of long-chain fatty acids. In the case of chorion extract, the buff-coloured fatty acid product represented 1·0% by weight of the parent material.

Hydrolysis of ether-extracted chorion extract by reflux with 5N HCl for 24 hr, followed by separation of the free fatty-acids from non-

Table 2. *Effect of diazomethane treatment upon thromboplastins*

Thromboplastin	Clotting times (min)	
	No inhibitor	After diazomethane
Chorion extract	10	30
Difco rabbit brain	5	30
Bovine brain	8	29
Human brain	6	29
No thromboplastin	29–30	—

Table 3. Thromboplastic activity of fatty acid preparations

Fatty acid concentrati (mg/ml)	Clotting times (min) 5·0	1·0	0·5	0·2	0·1	0·05	0·01
Chorion hydrolysate	14	12	10	14	17	22	22
Chorion diazomethane	∞	12	12	19	—	28	—
0·4 M chorion diazomethane	24	10	11	18	21	25	29
2·0 M chorion diazomethane	∞	10	14	16	20	24	29
0·5 N NaOH chor. diazomethane	∞	12	10	17	23	25	29
(1) Chorion diazomethane + human serum albumin	∞	—	12	·22	24	—	29
(2) Chorion hydrolysate + human serum albumin	—	—	10	12	16	22	—
Control (no fatty acid) 29, 30							

(1) H.S.A./F.A. ratio=1/1
(2) H.S.A./F.A. ratio=10/1.

acidic lipoids, gave a product representing 2·6 per cent by weight of the parent material.

For demonstration of their thromboplastic properties, the isolated fatty-acid mixtures were dissolved in hot 0·85% saline, set to pH 7·0 with N/10 NaOH and diluted in saline to concentrations ranging from 5·0 to 0·01 mg/ml. Clotting activities were assayed and are recorded in Table 3. It will be noted that activity is reduced at the higher concentrations.

Pure long-chain fatty acids may be either thromboplastic or antithromboplastic [7], but differ very much in their physical properties from the water-soluble thermolabile tissue thromboplastins. Even in the form of their potassium salts, many fatty acids can be dispersed in aqueous solutions only with difficulty or not at all without the aid of detergents. Hence, the demonstration of thromboplasticity with individual acids is technically difficult. In the presence of human serum proteins, including serum albumin and other proteins, certain fatty acids, including the isolated acid mixtures and their salts form water-soluble adducts which may show both thromboplastic (Table 3) and antithromboplastic properties. These synthetic thromboplastins resemble the aqueous cancer and chorion extracts in being labile both at room temperature and at 60°C. As an example of spontaneous thermolability, Table 4 shows the progressive loss of activity at 37°C when 0·1 ml samples of an incubated mixture in saline at pH 7·0 containing arachidic acid (0·05 mg/ml) and serum albumin (1·0 mg/ml) are added to citrated plasma (0·1 ml) and recalcified with M/40 $CaCl_2$ solution (0·1 ml).

Some physical characteristics of human cancer and chorion extracts have been identified

Table 4. Thermolability of synthetic thromboplastin

Incubation time (min)	Clotting time (sec)
2	166
22	168
60	180
120	210
Control (no thromboplastin):	210

with those of fatty acids and with fatty acid-protein adducts. When a mixture of human serum albumin (50 mg) and linoleic acid (25 mg) was dissolved in 1% potassium carbonate solution at pH 10·5, an opalescent solution was obtained. A portion was dialysed against 0·85% saline and, when assayed, demonstrated negligible thromboplastic activity (Table 5) before resolution into fractions.

Table 5. Thromboplastic activity of linoleic acid–albumin mixture

Linoleic acid (mg/ml)	5·0	0·5	0·05
Clotting time (min)	∞	26	28
Control (no linoleic acid)	31, 32		

The opalescent preparation was fractionated by gel filtration at 5°C on Sephadex G.200 in 0·85% saline containing 0·5% potassium carbonate solution. An LKB Uvicord was used to monitor the u.v. transmittance of the filtrate at λ=253 mμ which was collected automatically in 5 ml fractions. After dialysis against saline, the clotting times of the fractions (0·5 ml portions) were assayed and recorded (Fig. 1).

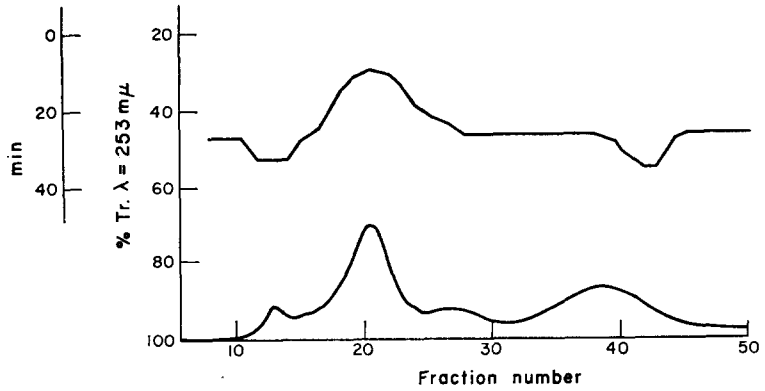


Fig. 1. *Gel filtration of linoleic acid–albumin mixture on Sephadex G.*200.

It is apparent that several discrete u.v. absorbing phases were present and that resolution of the applied solution into thromboplastic and anti-thromboplastic components had occurred with principal activity about Tube No. 20. Hence, the activity of the original linoleic acid-protein mixture may be regarded as an equilibrium of the separated components.

The complexity of the fractionation may be compared with that obtained when linoleic acid without albumin was similarly examined on Sephadex G.200 gel (Fig. 2). The Uvicord record indicated that this unsaturated fatty acid was present in two main phases with peaks at Nos. 12 and 38, together with a minor phase about No. 21. As this gel filtration medium separates solutes in accordance with their physical dimensions, it was inferred that the fatty acid was present in several forms of micelle with distinct and reproducible degrees of aggregation. The fractions showed negligible thromboplastic activity, but were antithromboplastic when incubated (0·5 ml) with a solution of chorion extract (0·1 ml) previously diluted so as to clot in 15 minutes (upper line in figure).

In addition to the small peak at No. 27 corresponding to free albumin (Fig. 1), fractionation of the linoleic acid-albumin mixture revealed a new component at No. 20 which was, therefore, regarded as a thromboplastic adduct of albumin with the fatty acid.

When the fatty acids isolated from chorion extract after acid hydrolysis were similarly combined with albumin and applied to Sephadex G.200, the fractionation shown in Fig. 3 was obtained. Two phases of thromboplastic activity about Nos. 12 and 20 were noted and the absence of appreciable u.v. absorption was attributed to a relative deficiency of unsaturated acids in the isolated mixture.

In such a mixture of fatty acids, one or more components may modify the physical and biophysical properties of another. Thus, linoleate has been shown to solubilise and disperse the much less soluble saturated arachidic acid in the form of its potassium salt. When examined on Sephadex G.200 in N/50 KOH solution (Fig. 4), linoleic acid (dotted line) showed two Uvicord phases at no. 21 and 38, neither of which was thromboplastic. In the

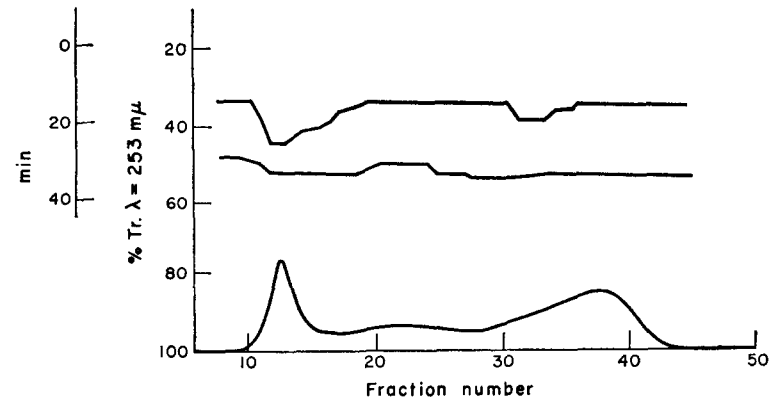


Fig. 2. *Gel filtration of linoleic acid on Sephadex G.*200.

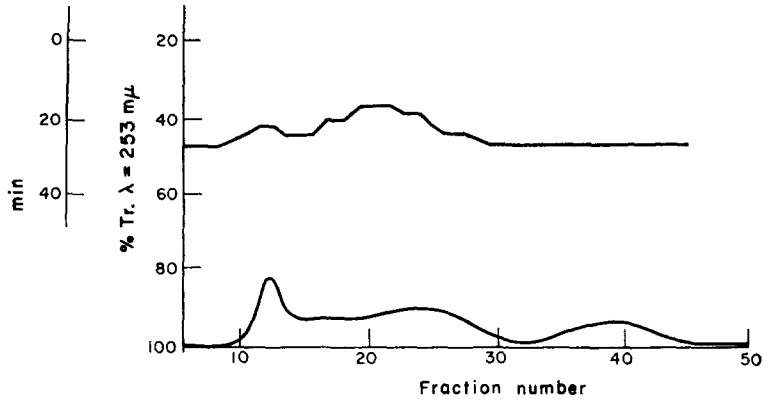


Fig. 3. *Gel filtration of chorion fatty acids with albumin on Sephadex G.*200.

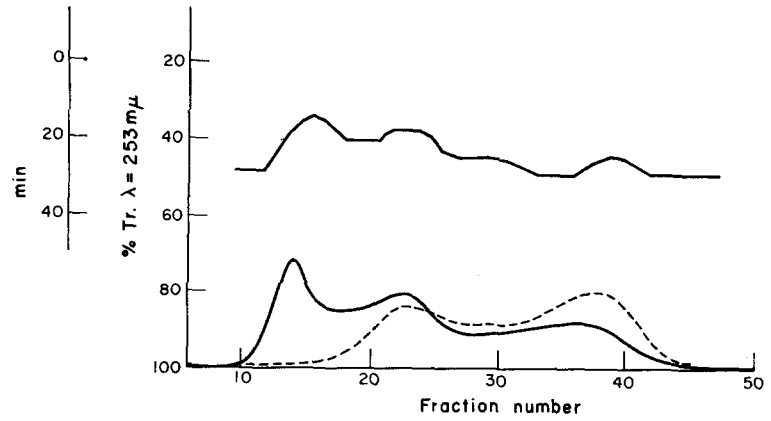


Fig. 4. *Gel filtration of linoleic–arachidic acid mixture on Sephadex G.*200.

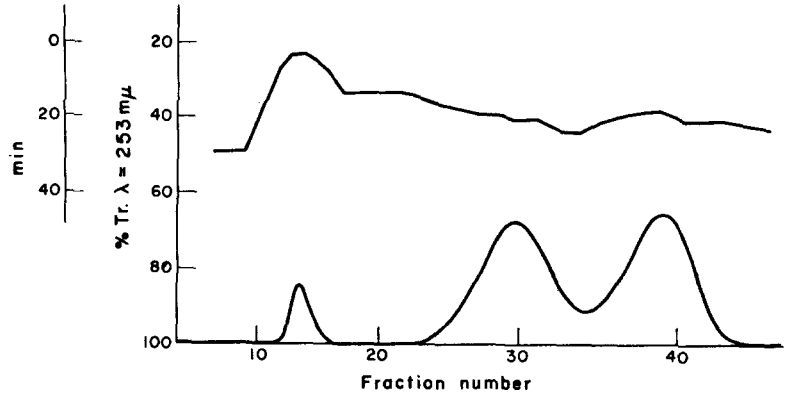


Fig. 5. *Gel filtration of chorion extract on Sephadex G.*200.

presence of added arachidate, however, (linoleic acid, 25 mg+arachidic acid, 12 mg), an extra peak at no. 12 was formed (solid line) and activity was demonstrated in all these phases. This indicated that the arachidate was present in both linoleate phases and had also formed an additional phase of larger micellar dimensions.

Thus, it is inferred that appropriate long-chain fatty acid mixtures, particularly when rendered water-soluble by association with suitable proteins, acquire thromboplastic properties and form products characterised by a wide range of particle sizes.

Not only do such synthetic thromboplastins demonstrate the lability of natural cancer tissue extracts, but they reproduce very closely on Sephadex G.200 gel the particle size ranges characteristic of chorion and cancer extracts. Figure 5 shows a typical fractionation of chorion extract [4] in 0·85% saline. The Uvicord record reveals a sharp resolution of the protein components into three main groups which show little correspondence with the thromboplastic activity which is distributed across almost the entire fractionation. The activity, however, formed a series of recognisable, though less sharply defined, phases which have been many times reproduced. It will be noted that the distribution of the principal activity about No. 12, of the intermediate phase of activity about No. 20 which does not absorb in the u.v., and of the lesser activity about No. 40, corresponds closely with those of the synthetic preparations described above.

It may also be remarked that the presence of albumin has been demonstrated in active thromboplastins isolated from chorion [3] and that the affinity of fatty acids for albumin particularly in the transport of blood-borne lipids, is generally recognised [9].

Acknowledgements—We are indebted to Tenovus for generous financial assistance, to the Medical Research Council of Ireland for the award of a Fellowship (W.W.F.) and a Grant-in-Aid (W.A.B.), and to the Director of the Blood Transfusion Service Board who has made plasma available for our requirements.

RESUME

On a démontré que l'activité thromboplastique des extraits de cancer humain et des extraits tissulaires de chorion est due à la présence d'acides gras à longue chaîne, qui ont été isolés et se sont montrés avoir une action thromboplastique.

L'activité et les autres charactéristiques des thromboplastines hydrosolubles sont liées à leur configuration physique, spécialement en ce qui concerne leur degré d'agrégation et d'association avec des protéines, comme, par exemple, l'albumine sérique.

SUMMARY

It is shown that the thromboplastic activity of human cancer and chorion tissue extracts is due to the presence of free long-chain fatty acids which have been isolated and found to be thromboplastic.

The activity and other characteristic properties of the water-soluble thromboplastins are related to their physical configuration, especially with regard to their degree of aggregation and association with suitable proteins including serum albumin.

ZUSAMMENFASSUNG

Extrakte aus menschlichen Malignomen und aus chorialem Gewebe weisen eine thromboplastische Aktivität auf, die auf ihren Gehalt an langkettigen Fettsäuern zurückgeht. Solche Fettsäuren wurden isoliert und thromboplastisch aktiv gefunden.

Aktivität und andere charakteristische Eigenschaften wasserlöslicher Thromboplastine hängen von ihrer physikalischen ab, besonders vom Grad ihrer Aggregation und Assoziation mit passenden Proteinen, z.B. Serumalbumin.

REFERENCES

1. R. A. Q. O'MEARA, Coagulative properties of cancers. *Irish J. Med. Sci.* **394,** 474 (1958).
2. W. A. BOGGUST, *et al.*, The coagulative factors of normal human and human cancer tissues. *Biochem. J.* **80,** 32P (1961).
3. W. A. BOGGUST, *et al.*, The coagulative factors of normal human and human cancer tissue. *Irish J. Med. Sci.* **477,** 131 (1963).
4. W. A. BOGGUST, *et al.*, Unpublished data (1967).
5. W. A. BOGGUST and R. A. Q. O'MEARA, The thermolability of tissue thromboplastins. *Irish J. Med. Sci.* **481,** 11 (1966).
6. R. BIGGS and R. G. MACFARLANE, Human Blood Coagulation, p. 385. Blackwell, Oxford (1962).
7. W. W. FULLERTON, W. A. BOGGUST and R. A. Q. O'MEARA, Antithromboplastic and thromboplastic activities of fatty acids. *J. Clin. Path.* **20,** 624 (1967).
8. H. VON PECHMANN, Ueber Diazomethan (2, Mittheilung). *Ber.* **28,** 855 (1895).
9. J. POLONOVSKI, in *Symposium on Transport Function of Plasma Proteins* (Edited by P. DESGREY and P. M. DE TRAVERSE) Elsevier, Paris.

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp 475–479. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Decrease to Complete Loss of Ability to Bind Estradiol by a Soluble Macromolecular Fraction of C3H Mammary Tumors*†

G. A. PUCA and F. BRESCIANI
Istituti di Patologia generale di Messina e Napoli

INTRODUCTION

ESTRADIOL-6, 7-^{3}H-17β of high specific radioactivity injected into ovariectomized rodents is taken up and retained by the uterus, vagina [1, 2] and mammary gland [3, 4] with a high degree of selectivity. The hormone reaches high concentrations and is retained without being metabolized by these growth-responsive organs, i.e. which respond with atrophy to ovariectomy and striking cellular increase to subsequent injection of estradiol. In contrast, organs which are not growth-responsive, such as liver, kidney, muscle, bone, lung, intestine and adrenal, do not show the ability to concentrate and retain the hormone of uterus vagina and mammary gland. Fractionation experiments with the uterus [5, 6] and with mammary gland [7] suggest that most of the hormone is bound by non-covalent forces to the nucleus and to the supernatant fraction obtained by centrifugation at 105,000 **g** for 1 hr of the tissue homogenate. Evidence was also found [5–10] suggesting (a) the protein nature of both the nuclear and the cytoplasmatic binding sites, and (b) that the interaction between the hormone and the binding sites has a high degree of stereospecificity.

In previous experiments [3], we have shown that primary autochtonous mammary tumors of C3H mice bind *in vivo* an average of only about 22% estradiol compared to normal mammary glands in the same animal. In comparison, non-growth-responsive organs such as liver, muscle and lung bind about 13%, 8% and 14% compared to normal mammary glands. The distribution of binding values of tumors is skewed, with the mean larger than the median. The highest value of binding capacity of a tumor is 55% of that of the mammary gland. Further experimentation was, however, necessary to investigate the possibility that changes in blood supply of tumors compared to normal counterpart, or alteration of other unknown permeability factors hypothetically involved in estradiol uptake and retention *in vivo*, were at the basis of this decrease; and, in case these changes could be discarded as casual factors, it was desirable to obtain some information on the nature of the decreased estradiol binding ability of mammary tumors. In this paper, we are reporting on the ability to bind estradiol *in vitro* of a soluble cytoplasmic macromolecular fraction from mammary gland and cancer.

MATERIAL AND METHODS

Mammary tumors were obtained from multiparous C3H/HeJ female mice 8–14 months old. Normal mammary glands were obtained

*Research supported by the Consiglio Nazionale della Ricerche, and in Naples by NATO grant No. 257.
†Presented at the Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumors, Rome, April 1967.

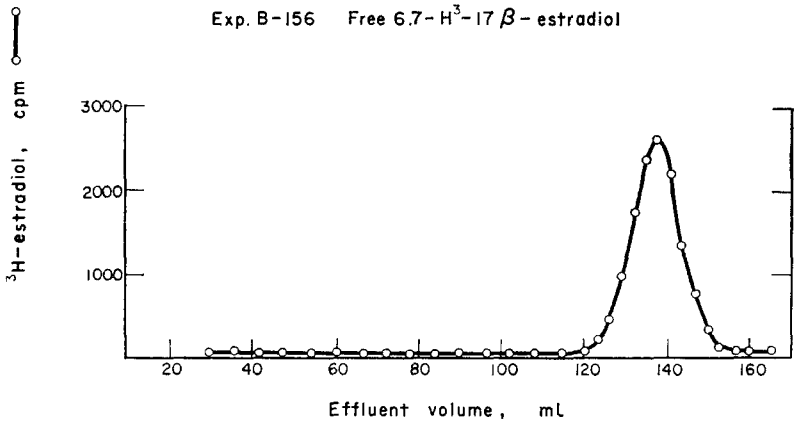


Fig. 1. *Chromatography on Sephadex G-100 of* 6, 7-³H-17-*estradiol.*

from female mice of the same strain, 4–6 months old. Part of the animals were obtained from A.R.S.A.L. (Rome) and part from our own stock. Previous experiments *in vivo* have shown that the ability to bind estradiol of the mammary gland is maintained through the life of the animal [3]. Growth curves of tumors employed have been recorded for the tumors of animals from our own stock. These tumors were aged 1–3 months when used. In general tumors weighed from 1 to several grams when used. Seven or more days after ovariectomy, the animals were killed and the mammary, glands and mammary tumors were dissected. All the following operations were carried out in a cold room at 4°C. The tissues were homogenized in an all-glass Potter-Elvehjem type homogenizer in TKM buffer (10^{-2}M Tris–HCL pH 7·4; 10^{-2}M KCl; 1·5 10^{-3}M $MgCl_2$). After sedimentation of the heavier fractions, the supernatant was centrifuged at 105,000**g** for 1 hr and the clear supernatant resulting from this centrifugation was labeled 105,000**g** supernatant. To about 10 ml of this fraction obtained from 0·5–1 g of fresh weight of mammary glands or tumor, 10^{-2}µg of 17-βestradiol-6, 7-³H (s.a. 34·2 C/mM) were added. After incubation at +4°C for 1 hr, the 105,000**g** supernatant was chromatographed on a column of Sephadex G-100 (1·5×80 cm) equilibrated with TKM buffer. Like others [5], we utilize the molecular sieve property of Sephadex to separate free from bound estradiol. The chromatographic fractions obtained were analyzed for absorbancy at 280 mµ and for radioactivity. Fractions were shaken with ether, and the ether phase containing the estradiol was brought into scintillation vials. After the ether was removed by warm air, the vials were filled with scintillator and the ³H content measured by means of a 725 Nuclear Chicago scintillation counter, according to the usual rules.

RESULTS

Figure 1 shows that free estradiol emerges from the column after a volume of effluent larger than the internal volume of the column. This delay is undoubtedly due to some interaction of the small molecule of the hormone with the dextrane structure of the gel. This effect is advantageous in our case because it further enhances differences with the elution volume of estradiol bound to cellular macromolecules.

Figure 2 shows the typical elution pattern of normal mammary gland 105,000**g** supernatant on Sephadex G-100. There are several peaks of optical density at 280 mµ. The one eluted first contains the large macromolecules excluded from the internal phase of the gel. A substantial amount of estradiol is associated with this first fraction, while the free estradiol in large excess is eluted later, with the same elution volume as found in chromatography of Fig. 1. Estradiol bound to the first macromolecular peak can be easily and totally extracted with non-polar solvents, high or low pH values or high ionic strength, a demonstration that the binding is non-covalent in nature.

Figure 3 shows the typical chromotographic pattern of 105,000**g** supernatants prepared from amounts of mammary tumors equivalent to that used in the chromatography of the normal mammary tissue fraction shown in Fig. 2. While the pattern of optical density at 280 mµ is comparable to that of normal mammary tissue, the first macromolecular peak shows in both cases a greatly decreased ability to bind estradiol. The two tumors shown in Fig. 3 are from a large series of tumors investigated and represent the instances which

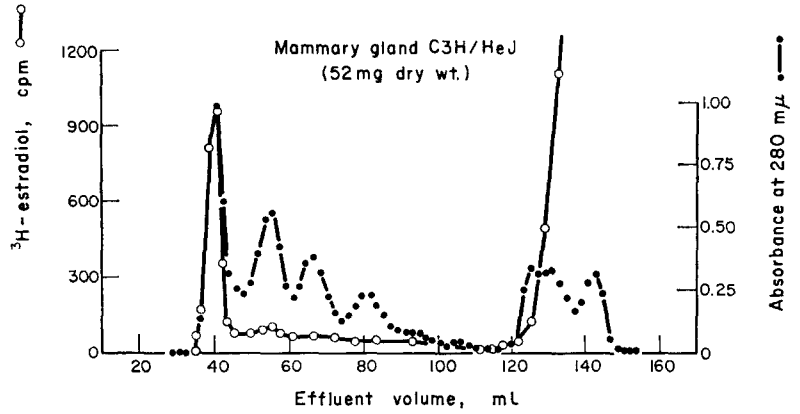


*Fig. 2. Typical chromatographical pattern on Sephadex G*100 *of* 105,000**g** *supernatant of* C3H *mammary gland homogenate to which* 10^{-2}μg *of* 6, 7-^{3}H-17β *estradiol was added prior to chromatography. A substantial amount of hormone is associated with the first (excluded) macromolecular peak, while the free estradiol is eluted later.* d.d.w.=*dry defatted weight.*

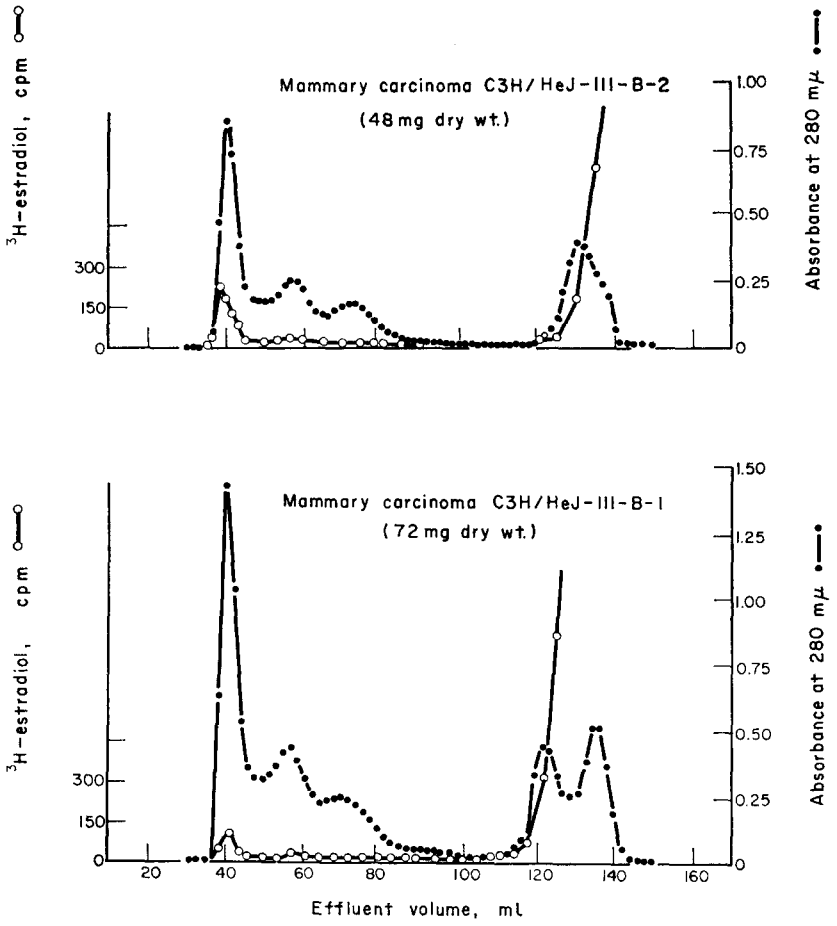


*Fig. 3. Typical elution patterns on Sephadex G-*100 *of* 105,000**g** *supernatants of* C3H *mammary tumors homogenaths to which* 10^{-2}μg *of* 6, 7-^{3}*H*-17β *estradiol was added prior to chromatography. As compared to normal mammary gland, only a small amount of estradiol is associated with the first (excluded) macromolecular peak, while almost all is eluted earlier as free hormone. Mammary carcinoma labeled* 111-*B*-1 *is the tumor which showed the highest binding ability of the series of the tumors investigated,* 111-*B*-2 *showed the lowest.*

showed maximal and minimal binding of estradiol to the first macromolecular peak.

DISCUSSION

The results suggest that the decreased or lost ability of C3H tumors to bind estradiol is not a result of changes in blood supply or permeability but rather depends upon molecular changes regarding binding sites for estradiol. These changes may consist of actual loss of macromolecules carrying such sites, or of alteration of these macromolecules at the binding site(s). This problem is, however, immaterial for a discussion of consequences that such loss of binding ability may be envisaged to have on cellular control mechanisms.

As a high affinity for estradiol is specific of tissues which respond with growth to the hormone, one is naturally brought to consider the presence of binding sites for the hormone as a prerequisite for the hormonal action. From this it follows that when the ability to bind estradiol is pathologically impaired, as in mammary tumors, the prerequisite or the hormonal action is lacking and, as in the case of tissues normally non growth responsive to the hormone, the tissue should be less responsive or not at all. However, this loss of binding sites in mammary tumors corresponds to unlimited growth, and therefore is in some way correlated with facilitation of growth.

On the basis of current ideas on the mechanism of action of estradiol one may see a possible coherent explanation for the known facts and ideas above reported. Talwar *et al.* [5] have suggested that the macromolecules which bind estradiol take part in the repression of transcription. They are supposed to act inhibiting transcription, and to reversibly lose this ability after interaction with estradiol, possibly because of conformational change. Data available at the present on the inhibition of an RNA-polymerase system using enzyme of *E. coli* and calf thymus DNA are, however, rather opposed to this suggestion [11]. A second hypothesis is that these macromolecules directly, or by casually related steps, interfere with translational control. This would be in agreement with data suggesting that translational control is involved in initiation of cell proliferation in tissues which are growth responsive to estradiol [12, 13].

On these premises, it is difficult to avoid suggesting that if these macromolecules with affinity for estradiol exercise an inhibitory control on cell proliferation, whatever the mechanism may be, their decrease to deletion, as found in C3H mammary cancer, should result in an irreversible facilitation to full release of the mechanism initiating cell proliferation; and, at the same time, it should result in partial to total disengagement of growth from hormonal dependence. This tentative hypothesis has the merit of furnishing a unitary, molecular explanation of both carcinogenesis and varied hormone dependence of mammary tumor growth [14], suggesting that they actually represent two aspects of the same basic alteration.

RESUME

Des homogénats de glandes mammaires et de tumeurs mammaires de souris C3H ovariectomisées furent centrifugées à 105.000**g** *pendant une heure, et les surnageants furent mis en contact avec du* 6, 7-^3H-17-β *oestradiol de haute activité spécifique. La chromatographie sur des colonnes de Séphadex G-*100 *permit la séparation de plusieurs pics absorbant à* 280 *mμ. Le premier pic, qui contenait des macromolécules provenant de la phase interne, présentait, à un haut degré, la faculté de lier l'oestradiol, d'une manière non covalente, lorsqu'il était préparé à partir de la glande mammaire normale. Au contraire, le même pic, provenant de tumeurs mammaires, ne présentait cette faculté de fixer l'oestradiol que de façon partielle ou quasi nulle. Cette observation, et des faits établis antérieurement, permettent de présenter une hypothèse unitaire de la carcinogénèse et de la dépendance hormonale des tumeurs mammaires.*

SUMMARY

Supernatants obtained by centrifugation at 105,000**g** *for one hour of homogenates of mammary glands and mammary tumors of ovariectomized C3H mice were put in contact with* 6, 7-H^3-17-β *estradiol of high specific activity* in vitro. *Chromatography on Sephadex G-*100 *columns resolved the preparations in several peaks absorbing at* 280 *mμ. The peak first eluted from Sephadex and containing macromolecules excluded from the internal phase of the gel showed a considerable ability to bind estradiol in a non covalent*

manner when obtained from normal mammary gland. In contrast, the same peak from mammary tumors showed partial to almost complete inabiltiy to bind estradiol, as compared to normal counterpart. A hypothesis is put forth suggesting a possible relevance of this and previous findings to a unitary explanation of both carcinogenesis and varied hormone dependence of mammary tumor growth.

ZUSAMMENFASSUNG

Homogenate von Brustdrüsen und von Mammatumoren ovarektomierter C3H-Mäuse wurden während einer Stunde bei 105'000**g** *zentrifugiert. Die Ueberstände wurden mit* 6, 7-H^3-17-*Oestradiol hoher spezifischer Aktivität zusammengebracht. Durch Chromatographie an Sephadex-G-*100-*Säulen geland es, mehrere Absorptionsgipfel bei* 280 *m abzutrennen. Bei normalen Brustdrüsen besass der erste Gipfel, der die Makromoleküle der inneren Phase enthielt, in hohem Masse die Eigenschaft, Oestradiol zu binden. Bei den Mammatumoren wies der gleiche Gipfel diese Beobachtungen, sowie frühere Befunde, erlauben das Aufstellen einer unitären Hypothese der Carcinogenese und der hormonalen Abhängigkeit von Mammatumoren.*

REFERENCES

1. E. V. Jensen and H. I. Jacobson, Basic Guides to the Mechanism of Estrogen Action. *Rec. Progr. Hormone Res.* **18,** 387 (1962).
2. J. M. Stone, B. Baggett and R. B. Donnelly, The uptake of tritiated Estrogens by various organs of the ovariectomized mouse following intravenous administration. *J. Endocrin.* **27,** 271 (1963).
3. F. Bresciani and G. A. Puca, Fissazione del 17-β estradiolo in ghiandole mammarie e in tumori mammari del topo C3H. *Atti Soc. Ital. Patol.* **IX,** 661 (1965).
4. G. A. Puca, Marco Salvatore and F. Bresciani, Meccanismo della proliferazione nella ghiandola mammaria. Fissazione *in vivo* dell'estradiolo. *Atti Soc Ital. Patol.* **X** (1967).
5. G. P. Talwar, S. J. Segal, A. Evans and O. W. Davidson, The binding of estradiol in the uterus: a mechanism of derepression of RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **52,** 1059 (1964).
6. W. D. Noteboom and J. Gorsky, Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Archs. Biochem. Biophys.* **III,** 559 (1965).
7. G. A. Puca, H. Orii and F. Bresciani, Meccanismo della proliferazione nella ghiandola mammaria. Ripartizione intracellulare dell' estradiolo e sue interazioni deboli con macromolecole. *Atti. Soc. Ital. Patol.* **X** (1967).
8. D. Toft and J. Gorsky, A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **55,** 1574 (1966).
9. E. V. Jensen, Metabolic fate of sex hormones in target tissues with regard to tissue specificity. Proc. 2nd Intern. Congr. Endocr. London (1964). *Excerpta Med. Found,* p. 420, Amsterdam (1965).
10. J. Gorsky, W. D. Noteboom and J. A. Nicolette, Estrogen control of the synthesis of RNA and protein in the uterus. *J. cell. comp. Physiol.* **66/1,** 91 (1965).
11. E. R. De Sombre, B. Feldacker, P. W. Jungblut and E. V. Jensen, Evaluation of the RNA-polymerase inhibition by rat uterus extract. *Fed. Proc.* **25/2,** 286 (1966).
12. W. D. Noteboom and J. Gorsky, An early effect of estrogen on protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **50,** 250 (1963).
13. G. C. Mueller, The role of RNA and protein synthesis in estrogen action. *Mechansim of hormone action,* p. 228. G. Thieme Verlag, Stuttgart, (1965).
14. C. Huggins, Endocrine-induced regression of cancers. *Science,* **156,** 1050 (1967).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 481–490. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Lysosomes in Relation to Cancer Induction and Treatment*

ANTHONY ALLISON
National Institute for Medical Research, Mill Hill, London

THE general theme of this meeting is the biochemistry of cancer, and my allotted task is to discuss lysosomes. All the cancer cells so far studied have been found to contain lysosomes, but remarkably little is known about their properties and in what respects, if any, they differ from the lysosomes of normal cells. On the other hand, there has been interest in the possibility that lysosomes are involved in oncogenesis, and I shall summarize evidence bearing on this problem. Moreover, marked changes have been reported in the lysosomes of tumour cells subjected to certain therapeutic procedures, and these will also be described.

Classes of carcinogenic agents

Agents known to induce cancer fall into three main classes—physical, chemical and viral. The important physical agents are ultraviolet and ionizing radiations. Chemical carcinogens are numerous and structurally diverse, including polybenzenoid hydrocarbons, heterocyclic nitrogen compounds, aromatic amines, steroids, stilbenes, metals, asbestos, silica and alkylating agents. The oncogenic viruses also vary widely in properties: some multiply in the nucleus, others in the cytoplasm; some contain DNA, others RNA; some contain lipid and are assembled in relation to host cell membranes, while others do not contain lipid and appear to be assembled independently of host cell membranes. Many different cell types can undergo malignant changes when exposed to the right inducing agent.

Theories of carcinogenesis

A central problem in cancer research is to find a common mechanism in cells that can be set in motion by such a bewildering variety of oncogenic agents. Broadly, two approaches can be taken. One is to regard viruses as the proximate carcinogenic agents in all cases. Radiations or chemicals are then supposed to activate viruses latent in the tissues and facilitate oncogenesis by the viruses. It seems that the only way in which this hypothesis can be tested is by comparing the effects of chemicals or radiations in animals with and without viruses. However, mice reared under "germ-free" conditions still have viruses [1]. Moreover, although the *presence* of a virus can be recognized, it is never formally possible to prove the *absence* of viruses. Hence there is at present no way of critically testing this hypothesis, and only hypotheses that can be tested are useful.

The second approach is to suppose that the same reaction in cells can be initiated independently by different classes of carcinogenic agents, although two or more can act synergically to bring about the common reaction. There may of course be several mechanisms, but it is worth attempting to explain the observations on the basis of one mechanism. In considering what biochemical events might be involved, it is necessary to recall that cancer cells originate by somatic mutation, in the sense that progeny cells inherit the abnormal growth potential and other properties of malignant cells. It is therefore likely that some change in DNA occurs. Pitot and Heidelberger [2] have argued that protein deletions might be perpetuated, but their argument, based on

*Presented at the Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumors, Rome, April 24–26, 1967.

analogy with control systems which are imperfectly understood even in bacteria, is unconvincing in the present state of knowledge.

Mutations are usually produced in either of two ways: point mutations involve substitutions of one or a few base pairs in DNA, and often lead to the formation of a single abnormal protein; [3] whereas chromosomal mutations involve chromosome breakage and re-union, with deletion, inversion or duplication of pieces of chromosomes much larger than are affected by point mutations, although they may be small and difficult to detect at the level of ordinary chromosome cytology. There are reasons for believing that changes of the latter type are more relevant to carcinogenesis than the former.

Chromosomes and malignancy

It has been known since the pioneer work of Boveri in 1914 and of Winge in 1930 that the chromosome constitution of malignant cells is often abnormal. Heteroploidy and other chromosomal changes help to explain the properties of fully established tumour cell strains, such as lack of differentiation and invasiveness, but they are secondary and cannot be invoked to explain the original transformation to malignancy. However, other evidence suggests that chromosome anomalies precede and lead to malignant changes. Thus, the Ph^1 chromosome, with a partial deletion of chromosome 21, seems to be present before chronic myeloid leukemia develops [4], and may have been produced in some cases by ionizing radiation [5]. Children with Bloom's syndrome and Faconi's anaemia have a marked predisposition to develop leukemia or squamous epithelial tumours [see review by de Grouchy (6)]. When the blood cells or epithelial cells of children with these syndromes are cultured *in vitro*, numerous chromosome breaks and other aberrations are seen. Radiations, chemicals and viruses causing malignancies are known to increase also the rate of production of chromosome rearrangements. If chromosome anomalies are considered an epiphenomenon to malignancy, it must be postulated that all the above-mentioned conditions and treatments independently produce malignant processes and chromosome aberrations. No definite argument can dispose of this concept, but it is simpler to postulate that chromosomal rearrangements come first and are themselves responsible for the malignant process.

Much attention has been given in recent years to direct interactions, e.g. of alkylating agents or hydrocarbon carcinogens with DNA [7] and integration of oncogenic virus genomes in DNA, by analogy with lysogenic prophages. However, the fact that agents can react with DNA *in vitro* does not mean that such reactions occur in living cells. Intercalation of carcinogens between DNA base-pairs would be expected to produce point mutations, rather than chromosomal effects, and, if this mechanism were important, agents such as proflavine (which certainly intercalate) would be expected to be carcinogenic, which they are not. The correlation between carcinogenicity and the capacity of compounds to produce mutations of classical type is poor (see Pitot and Hedelberger [2]). And the variety of oncogenic viruses makes it unlikely that specific interaction with or intergration into host-cell DNA is essential for malignant transformation.

The alternative view is that effects on genetic material are indirect and secondary to some other reaction that can be set in motion in many different types of cell by many different stimuli. In looking for such a mechanism our attention has been concentrated on lysosomes, for theoretical reasons and because of a number of experimental observations. The theoretical reasoning is as follows. The most likely indirect mechanism for producing a deletion of genetic material in somatic cells is release of an enzyme capable of attacking DNA. All cells so far investigated (except erythrocytes) have substantial amounts of DNAase in lysosomes. Although this enzyme has an acid pH optimum, it functions efficiently at physiological pH provided that the ionic strength is not too high. Lysomal DNAase is capable of breaking both strands of a double helix of DNA with a single hit, and 3′-phosphate is released; [8] breaks produced in this way are much less likely to be repaired by the efficient repair mechanisms present in most cells than breaks of single strands releasing 5′-phosphate, such as are produced by alkaline DNAases. Indeed in most cells the alkaline enzyme is present in rather small amounts and there is a natural inhibitor; several of the enzymes formerly thought to be of this type are phosphodiesterases rather than endonucleases proper.

We have observed that isolated interphase chromosomes (polytene chromsomes of *Chironomus*) are readily broken by lysosomal DNAase. When selective damage to lysosomes was produced in human diploid cells, numerous chromosome breaks and other aberrations were observed [9]. We have concluded that DNAase entering the nucleus is responsible for these breaks, but do not yet have direct proof that this is so. However, DNAase rapidly enters

solated nuclei and inhibits DNA-dependent RNA synthesis. [10] Our recent experiments have shown that addition of highly purified lysosomal DNAase to cultured cells under conditions that allow it to enter the cells without being degraded is associated with chromosome breakage, which increases the plausibility of the interpretation.

The hypothesis, then, is simple enough. If lysosomal enzymes can be released and gain access to genetic material without at the same time impairing the capacity of cells to divide, they might produce genetic changes (probably deletions) which result in the particular variety of somatic mutations leading to cancerous growth. It can be objected that this mechanism would be wholly nonspecific. However, specificity could result from the fact that only certain parts of the genetic material would be exposed to enzymic attack, and then only at certain stages in the cycle of cell division, e.g. DNA when it is being replicated. Testing the hypothesis proceeds in several steps. The first requirement is that lysosomes be affected by carcinogenic agents of various types; the second prediction is that if selective release of lysosomal enzymes can be achieved, this procedure will under appropriate conditions lead to malignant transformation.

Chemical agents

We soon obtained evidence that lysosomes could be affected by chemical carcinogens. When we followed the uptake of polybenzenoid hydrocarbons and tricycloquinazoline in living cells by fluorescence microscopy, we found that they were concentrated in lysosomes [11]. No nuclear fluorescence was seen. Experiments of this sort on living cells are valuable because during the course of killing and homogenizing cells marked redistribution of carcinogen could take place. Uptake of hydrocarbons in cytoplasmic particles was described by Graffi [12], who thought that mitochondria were involved, but the disposition of fluorescent organelles in several different cell types corresponds exactly with that of lysosomes, as shown by acid phosphatase staining. It is of interest that, using the fluorescent antibody technique, Tanigaki *et al.* [13] have recently found 2-acetyl-aminofluorene in the cytoplasm of liver cells; no nuclear fluorescence was detected. In dead cells nonspecific cytoplasmic uptake of hydrocarbons into phospholipid-rich regions, and also nuclear fluorescence, are seen.

Noncarcinogenic hydrocarbons are also taken up into lysosomes, so if this process is relevant to carcinogenesis there must be a difference in the metabolism and later effects of active and inactive compounds. Information about this is still scanty, but we have been able to investigate one example in some detail. For many years it has been known that hydrocarbon carcinogens have cytotoxic as well as oncogenic effects. The most remarkable instance of their toxity *in vivo* is the necrosis of rat adrenal cortical cells following administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene—DMBA [14]. It was shown by Boyland *et al.* [15] that the adrenal damage is produced by a metabolite of the carcinogen, namely 7-hydroxymethyl - 12 -hy - methylbenz(a)anthracene(7-OH-12-MBA); but an isomeric metabolite, 12-hydroxymethyl-7-methylbenz(a)anthracene(12-OH-7 - MBA), does not produce adrenal necrosis. We found that *in vitro* incubation with 7-OH-12-MBA caused a rapid release of enzymes from adrenal lysosomes, but not from kidney or liver lysosomes; 12-OH-7-MBA had no detectable effect on adrenal lysosomes [16]. Thus both the compound specificity and the organ specificity are the same for *in vivo* necrosis and *in vitro* release of lysosomal enzymes, and it seems probable that massive release of lysosomal enzymes accounts for adrenal necrosis *in vivo*.

A marked change in the livers of rats after administration of dimethylaminoazobenzene is accompanied by an increase in lysosomal enzymes in the supernatant fraction [17, 18]. Carbon tetrachloride in doses comparable to those found *in vivo* releases enzymes from isolated lysosomes [19]. The only steroids that are effective carcinogens are female sex hormones; low concentrations of these hormones and their stilbene analogue, diethylstilboestrol, increases permeability of lysosomal membranes much more than do other steroids, many of which have the opposite effect [20].

Particulate carcinogens and metals

Particularly interesting with respect to lysosomes are particulate carcinogens such as asbestos, silica and metal powders. Exposure of human subjects or experimental animals to asbestos gives rise to tumours, especially to distinctive mesotheliomas of the pleura or peritoneium. The three main types of asbestos (crocidolite, amosite and chrysotile) are all carcinogenic, and the fibres are fully carcinogenic after extraction with organic solvents, so the effect is not due to the small amounts of hydrocarbons associated with the fibres (see Wagner [21]). The effects of different types of asbestos on cells are quite complex, but there is no doubt that the initial uptake is lysosomal. A detailed comparison has also been made of

the effects of toxic particles (such as silica) and non-toxic particles (such as diamond dust) on cultured cells [22]. Both types of particles were taken up into lysosomes, where the non-toxic particles remained for several days, whereas the silica particles and lysosomal enzymes rapidly escaped into the surrounding cytoplasm, producing severe damage to the cells. It was concluded that the capacity of silica particles to react with and make permeable lysosomal membranes accounts for their toxicity. There is a close parallelism between the capacity of different particles, including different crystalline forms of silica, to react with red cell membranes and their fibrogenicity *in vivo* [23]. We have given reasons for believing that these interactions are due to hydrogen bonding of silicic acid hydroxyl groups with membrane phospholipids [24]. Polyvinylpyridine N-oxide, which like other polymers is taken up into lysosomes, but also readily forms hydrogen bonds with silicic acid, protects against silica toxicity and fibrogenicity.

Thus there is little doubt that the initial effect of silica on cells is lysosomal damage. It is therefore of interest that rats receiving intrathoracic injections of silica developed tumours of the thymus (21), chiefly reticulum-cell sarcomas. These resemble the tumours seen in rats injected with trypan blue [25], which itself becomes localized in lysosomes. The same is true of iron dextran [26], which produces malignant tumours at the site of injection [27], and also carageenan [28, 22]. Powdered nickel oxide or sulphide [29], cobalt [30] and cadmium [31] all produce tumours at the sites of injection. Particles of this type are taken up into lysosomes, as are a number of soluble metal salts [32], some of which are carcinogenic [lead, cadmium].

Co-carcinogenic compounds

Co-carcinogens are materials which themselves have little oncogenic capacity, but which greatly magnify the oncogenic effect of small doses of hydrocarbons. The best characterised co-carcinogens are croton oil, or its highly purified derivative, phorbol A, non-ionic detergents of the Tween and Span group [33] and hyperoxia [34]. Non-ionic detergents of various classes are concentrated in lysosomes and tend to increase the permeability of their membranes [11]. There is good evidence that lysosomes are particularly liable to damage when cells are exposed to high oxygen concentrations [35, 36]. Dilutions of croton oil make lysosomes of cultured cells permeable [11]. G. Weissmann (private communication) has recently found that phorbol A is highly efficient in releasing enzymes from lysosomes *in vitro*. Effects on erythrocyte membranes and those of other cytoplasmic organelles were much less than those on lysosomes. There is a close parallelism between effectiveness of various croton oil derivatives as co-carcinogens and in unstabilizing lysosomal membranes. All these co-carcinogenic agents would therefore be expected to potentiate the effects of low concentrations of hydrocarbons or their derivatives on lysosomal membranes.

Radiation

Several authors have reported effects of radiation on the activities and intracellular distributions of different lysosomal enzymes *in vivo* [37–39] see Brandes [40]). Histochemically detectable changes in organelles containing acid phosphatase have been described in several organs after X-radiation; these are detectable in the neighbourhood 1 to 1·5 krad—that is, not greatly above the lethal dose for the animals in question [40–43]. Release of enzymes from isolated liver lysosomes by ultraviolet or ionizing radiation *in vitro* has been reported by several workers [44–46]. Again, doses of the order of 1 krad produced detectable release of enzymes.

Since my colleagues and I had found that several of the compounds known to induce photosensitization in human skin (e.g. porphyrins or anthracene) are concentrated in lysosomes, we examined the role of lysosomes in photosensitization *in vivo* and *in vitro* [47]. This has provided a method for selectively releasing lysosomal enzymes. If neutral red or some other substance is added to living cells, it is taken up by lysosomes. If the cells are then illuminated by light of the wavelength absorbed by the photosensitizing substance, photo-oxidative damage to lysosomal membranes is produced. Light of these relatively long wavelengths is not injurious to cells except in the presence of the photosensitizer. The extreme sensitivity of lysosomes to photosensitization damage has also been noted by Slater and Riley [48].

Viruses

Effects on lysosomes of virus infection have been reviewed elsewhere [49]. There is now good evidence that on first being taken up into host cells by endocytosis, viruses have their protein coats partially digested by lysosomal enzymes before their nucleic acid can replicate. Later in the replication cycle lysosomes can be seriously damaged, which contributes to cyto-

pathic effects and leads to classical white-plaque formation (failure of uptake of neutral red into the lysosomes of damaged cells). With lesser changes in the permeability of lysosomes there is red-plaque formation where viruses have multiplied (increased uptake of neutral red into lysosomes). With cell-virus interactions leading to malignant transformation, the latter is usual.

Three other phenomena have attracted much attention in recent years. One is the presence of virus-specific antigens in tumour cells, even when no infectious virus can be recovered. This implies persistence of at least part of the virus genome, a finding which can be accommodated into the lysosome hypothesis in at least two ways [49]. Chromosome breakage secondary to lysosomal enzyme realease could facilitate incorporation of viral genome by a process of repair: mechanisms of this type are known to be involved in the integration of transforming DNA in bacteria. Alternatively, persistent release of a viral product that becomes associated with membranes could give lysosomal instability over many generations.

The second phenomenon is increased synthesis of DNA in host cells infected with tumour viruses. There is some doubt whether this is an effect specific for tumour viruses. In any case the increased DNA synthesis is rather like that observed in transformation of lymphocytes or in ova which are activated by fertilization or agents that induce parthenogenetic cleavage. There are strong indications that lysosomes are involved in both these phenomena, as suggested by Allison and Mallucci [50] and Hirschhorn and Hirschhorn [51]. Ribosomes from unfertilized sea urchin eggs do not synthesize protein until they are treated with a protease [52]. Presumably this protease, which in eggs would be of lysosomal type, removes a protein or peptide inhibitor from ribosomes that already contain messenger RNA. Through such mechanisms lytic enzymes can, paradoxically, activate synthesis; probably derepression of RNA and DNA synthesis follows.

The third effect of oncogenic viruses on cells that is now well established is that chromosome aberrations are regularly observed (see Allison [49]. There has been some doubt about the significance of this finding, since chromosome abnormalities have also been observed in cells infected with non-oncogenic viruses such as herpes simplex or measles. The latter is interesting because the virus can produce severe damage to chromosomes even though it multipliesin the cytoplasm. Hence some cytoplasmic event (possibly sosomal enzyme activation) leads to chromosome aberrations. All the non-oncogenic viruses producing chromosomal abnormalities also have cytopathic effects, and this may help to explain why they do not lead to tumour formation. For cells that have undergone the appropriate somatic mutations to produce tumours, the cells must obviously be able to survive and multiply: any virus or other agent that is too damaging cannot be oncogenic. However, the balance between cell damage and oncogenesis must be delicate in many cases, e.g. with polyoma virus in the mouse or physical or chemical carcinogens which damage numerous cells at the same time that they induce malignant changes in a few cells.

Observations that cell transformation by viruses is potentiated by radiation (e.g. Stoker [53]) suggests that the two may work by the same mechanism. Recently it has been reported that cells from patients with Fanconi's anaemia —which develop numerous chromosome aberrations spontaneously—are more readily transformed by simian virus 40 than cells of control human subjects [54]. This result emphasizes the importance of chromosome changes in the early stages of virus oncogenesis.

Effects of lysosomal enzyme release

From the observations that have been summarized there is enough evidence to make lysosomal enzyme activation at least a possible candidate for a common mechanism in cells set in motion by diverse carcinogenic agents. The second stage of testing the hypothesis has therefore been initiated, examining the effects of lysosomal enzyme release on cells. Selective damage to lysosomes was produced by the photosensitization technique mentioned above in a variety of cell types. These experiments were carried out in collaboration with Dr. W. Russell, Dr. P. Black and Dr. K. Sanford.

The first experiments were carried out with BHK21/C13 hamster cells. After lysosomal damage, more of these cells were able to grow as colonies in agar suspension than with control cells. Some of the colonies so obtained showed marked alterations in morphology, with piled up growth of cells of epithelial type. Other colonies showed parallel growth of cells much like that seen in colonies of untransformed cells. However, two clones of both cell types after photosensitization gave tumours in most adult hamsters inoculated subcutaneously with 10^4 cells. The untransformed BHK21/C13 cells showed tumours after inoculation of 10^7 cells. Similar results were obtained in two further experiments of this type. The findings are a little difficult to interpret, in view of the

production of tumours in controls, but it seems clear that there is an increased malignant potential after lysosomal damage, although this is not always associated with morphological changes in cell colonies of the type often thought characteristic of malignant transformation. However, Sanford [55] in a careful study of many different long-term cell cultures, has also found a very imperfect correlation between morphology and the ability of the cells to grow *in vivo*. This was our experience also with one of Sanford's rat embryo cell strains. After photosensitization damage to lysosomes, colonies of cells with the piled-up random growth pattern were obtained, but these failed to produce tumours on inoculation into the anterior chamber of the eye.

With Dr. P. Black weanling hamster kidney cells have been subjected to photosensitization. In extensive experience over several years using these cells for transformation with simian virus 40, Dr. Black has never seen transformation in controls. In one experiment after photosensitization a line of transformed cells was obtained with which tumours were produced in adult hamsters. I have obtained two transformed cell lines from hamster embryo cell subjected to photosensitization; these produced tumours in adult hamsters, which were not seen in control experiments. Other studies with rat embryo cells are in progress.

These investigations will be reported fully elsewhere. They suggest quite strongly that lysosomal damage *can* produce malignant transformation in cells, or facilitate transformation occurring spontaneously. The rates of transformation are lower than those obtained with oncogenic viruses in some of the systems but this is perhaps to be expected. The photosensitization technique produces its effects at one moment in time, whereas that of viruses continues and has a greater chance of affecting cells at a vulnerable stage in the mitotic cycle.

Also relevant are experiments of Buzzatti-Traverso and Visconti di Modrone [56], who found after treatment of *Drosophila* eggs with neutral red and light somatic mutations with mosaicism. Changes of this type are associated with chromosomal abnormalities, and the mechanism of their production may be the same as that we postulate. The production of cancer is, after all, somatic mutation with mosaicism—the malignant cells having a different genetic constitution from the rest.

Malignancy in the Chediak-Higashi syndrome

This is a recessively inherited disease characterized by the presence of large lysosomes and melanosomes in several different cell types. If children with the syndrome do not die of infection early in life, they often develop progressive hyperplasia of the lymphoreticular system which has been defined as malignant [57]. Typically they die in childhood with hepatosplenomegoly and lymphadenopathy, showing at *post mortem* lymphoid infiltration of most organs.

Thus children with congenitally abnormal lysosomes show a greatly increased susceptibility to malignancy. Whether this is associated with persistent infection by a particular microorganism, or is due to spontaneous appearance of chromosome aberrations (as in Bloom's syndrome or Fanconi's anaemia), or is due to some other mechanism, is at present unknown.

Lysosomes and therapy of cancer cells

There is much evidence that lysosomes play an important role in physiological and pathological regressive changes in tissues, e.g. those associated with re-modelling during growth, or following ischaemic injury (see de Duve and Wattiaux [58]). The marked morphological changes in the lysosomes of normal cells following radiation have been mentioned above. Brandes and his colleagues [59, 40] have recently studied lysosomes in mouse mammary gland carcinoma cells submitted to treatment with the alkylating agent Cytoxan or X-radiation. Following both these treatments the concentration and size of lysosomes in treated tissues increased, and the reaction products of the histochemical test for acid phosphatase were detected in the cytoplasm and in intercellular spaces. It was concluded that the Cytoxan and ionizing radiation provoked the release and activation of lysosomal hydrolases and this preceded degradative changes in the tumour cells. These changes were potentiated by concurrent treatment with vitamin A, which labilizes lysosomes.

These observations are of interest in relation to radiation effects and to the possibility that they might be augmented by other more stable agents selectively concentrated in lysosomes. There is evidence that lysosomes may be involved in various chemotherapeutic effects [60] and this field lies open to investigation.

RESUME

Différentes classes d'agents cancérigènes peuvent provoquer, de façon indépendante, des mutations somatiques qui conduisent à une croissance maligne. Il yades raisons de croire qu'il s'agit de mutations chromosomiques plutôt que de mutations géniques, et que celles-ci pourraient résulter d'une activation de la nucléase plutôt que d'une interaction directe des cancérigènes et du matériel génétique. Les lysosomes, qui sont les principaux dépositaires des endonucléases dans la plupart des cellules de mammifères, pourraient donc jouer un rôle dans la cancérogenèse.

Il est établi que des agents chimiques et physiques, de même que les virus, ont un effet sur les lysosomes. Des lésions sélectives des lysosomes semblent être associées à une potentialité accrue de malignité dans les cellules en culture. Les enfants ayant une anomalie congénitale des lysosomes (syndrome de Chédiak-Higashi) ont une tendance à être atteints de réticuloses. Les enfants atteints du syndrome de Bloom ou de l'anémie de Fanconi ont aussi une susceptibilité augmentée pour les affections malignes, et leurs cellules présentent fréquemment, en culture, des cassures et d'autres aberrations chromosomiques. Des modifications des lysosomes ont aussi été décrites dans les cellules de tumeurs traitées par la cyclophosphamide ou par des irradiations.

SUMMARY

Different classes of carcinogenic agents may independently produce somatic mutations leading to malignant growth. There are reasons for believing that chromosomal rather than point mutations are involved, and for concluding that these might result from nuclease activation rather than direct interactions of carcinogens with genetic material. The lysosomes, as the main repositories of endonucleases in most mammalian cells, may therefore assume significance in carcinogenesis.

Evidence is adduced that chemical and phsyical agents and viruses all have effects on lysosomes. Selective damage to lysosomes seems to be associated with an increased malignant potential in cultured cells. Children with congenitally abnormal lysosomes (Chédiak-Higashi syndrome) tend to develop reticuloses. Children with Bloom's syndrome or Fanconi's anaemia also have greatly increased susceptibility to malignancy, and their cells frequently show chromosome breakage and other aberrations in culture. Lysosomal changes have also been reported in the cells of tumours treated with Cytoxan or X-irradiation.

ZUSAMMENFASSUNG

1. *Auf der Suche nach einem gemeinsamen Mechanismus der Karzinogenese auf zellulärem Niveau haben wir uns mit Chromosomenmutationen befasst. Solche Mutationen können durch* direkten *Einfluss karzinogener Substanzen oder Viren auf die Chromosomen zustandekommen, oder* indirekt *durch die Wirkung von Enzymen auf die Chromosomen. Unter den Enzymen, die Chromosomen beeinflussen, nimmt die DNS-ase einen besonderen Platz ein und lysosomale DNS-ase hat mehrere bemerkenswerte Eigenschaften. Dieses Enzym ist in den meisten somatischen zellen relativ reichlich vorhanden und kann beide DNS-Ketten gleichzeitig spalten, unter Freisetzung von 3'-Phosphat. Auf diese Weise herbeigeführte Brüche sind viel schwieriger zu reparieren als Brüche einzelner Ketten mit Freisetzung von 5'-Phosphat, wie sie durch pankreatische DNS-ase zustandekommen. Erstere bleiben mit grösserer Wahrscheinlichkeit als Chromosomenmutationen bestehen. Die selektive Aktivierung lysosomaler Enzyme in diploiden menschlichen Zellen führt zu Brüchen und Neuanordnungen von Chromosomen. Es drängt sich deshalb auf, eventuelle Einwirkungen karzinogener Substanzen auf die Lysosomen zu untersuchen.*

2. *Verschiedene karzinogene Substanzen beeinfiussen die Lysosomen. Dies ist besonders leicht festzustellen bei Karzinogenen, die Teilchenstruktur besitzen oder makromelekular sind, wie z.B. Asbest oder Silikat, Eisen-Dextran oder Carragenan. Man weiss von mehreren karzinogenen Chemikalien, dass sie in Lysosomen konzentriert werden oder dass sie die Permeabilitat ihrer Membranen erhöhen, wie z.B. polybenzenoide Kohlenwasserstoffe, Co-Karzinogene wie Phorbol A (aus Krotolon) und Tetrachlorkohlenstoff. Ultraviolette oder ionisierende Strahlen mittlerer Intensität führen —genau wie viele Virusinfektionen— zu lysosomaler Instabilitat. Selektive Aktivierung von Lysosomen in embryonalen oder Nierenzellen führt, jedoch selten, zu maligner Entartung. Somit dürte das Freiwerden*

lysosomaler Enzyme zumindest einen der möglichen Mechanismen bei der Entstehung bösartiger Neoplasien darstellen.

3. *Deutliche Veränderungen der Lysosome, einschliesslich das Freiwerden ihrer Enzyme, wurden in Krebszellen nach Behandlung mit ionisierenden Strahlen und gewissen Medikamenten beschrieben. Die Rolle der Lysosomen in diesen chemotherapeutischen Wirkungen bedarf weiterer Abklärung.*

REFERENCES

1. M. KAJIMA and M. POLLARD, Detection of viruslike particles in germ-free mice. *J. Bact.* **90**, 1448 (1965).
2. H. PITOT and C. HEDELBERGER, Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. *Cancer Res.* **23,** 1094 (1963).
3. E. TERZAGHI, Y. OKADA, G. STREISINGER, J. EMRICH, M. INOUYE and A. TSUGITA, Changes of a sequence of amino acids in phage T4 lysozyme by acridine induced mutations. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **56,** 500 (1966).
4. N. H. KEMP, J. L. STAFFORD and R. TANNER, Chromosome studies during early and terminal chronic myeloid leukaemia. *Brit. med. J.* **1,** 1010 (1964).
5. E. ENGEL, C. M. FLEXNER, M. L. ENGEL de MONTMOLLINI and H. E. FRANK, Blood and skin chromosomal alterations of a clonal type in a leukaemic man previously irradiated for a lung carcinoma. *Cytogenetics, Basel,* **3.**
6. J. DE GROUCHY, Genetic diseases, chromosome rearrangements and malignancy. *Ann. intern. Med.* **65,** 603 (1966).
7. P. BROOKES and P. D. LAWLEY, Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin. *Nature (Lond.)* **202,** 781 (1964).
8. G. BERNARDI and C. SADRON, Studies on acid deoxyribonuclease. 1. Kinetics of the initial degradation of deoxyribonucleic acid by acid deoxyribonuclease. *Biochemistry* **3,** 1411 (1964).
9. A. C. ALLISON and G. R. PATON, Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature (Lond.)* **207,** 1170 (1965).
10. G. C. WIDNELL and J. R. TATA, A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei. *Biochem. J.* **92,** 313 (1964).
11. A. C. ALLISON and L. MALLUCCI, Uptake of hydrocarbon carcinogens by lysosomes. *Nature (Lond.)* **203,** 1024 (1964).
12. A. GRAFFI, Zelluläre Speicherung cancerogener Kohlenwasserstoffe. *Z. Krebsforsch.* **49,** 477 (1939).
13. N. TANIGAKI, M. KITAGAWA, Y. YAGI and D. PRESSMAN, The reaction of specific antibody with 2-acetylaminofluorene fixed in liver cells. *Cancer Res.* **27,** 747 (1967).
14. C. HUGGINS and S. MORII, Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. exp. Med.* **114,** 741 (1961).
15. E. BOYLAND, P. SIMS and C. HUGGINS, Induction of adrenal damage and cancer with metabolites of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Nature (Lond.)* **207,** 816 (1965).
16. A. C. ALLISON and J. DINGLE, Role of lysosomes in adrenal necrosis caused by dimethylbenzanthracene. *Nature (Lond.)* **209,** 303 (1966).
17. L. DECKERS-PASSAU, J. MAISIN, and C. DE DUVE, The influence of azodyes on lysosomal enzymes in rat liver. *Acta. Un. in. Cancr.* **13,** 822 (1957).
18. J. T. NODES and E. REID, Azodye carcinogenesis: ribonucleotides and ribonucleases. *Br. J. Cancer* **17,** 745 (1963).
19. D. H. ALPERS and K. J. ISSELBACHER, The effect of carbon tetrachloride on rat liver lysosomes. *Biochim. biophys. Acta. (Amst.)* **137,** 33 (1967).
20. A. D. BANGHAM, M. M. STANDISH and G. WEISMANN, The action of steroids and strepolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J. molec. Biol.* **13,** 253 (1965).
21. C. J. WAGNER, The induction of tumours by the intrapleural inoculations of various types of asbestos dust. *Perugia Quadrennial Int. Conf. Cancer,* (Edited by by L. SEVERI), **3,** 589 (1966).
22. A. C. ALLISON, J. S. HARINGTON, and M. BIRBECK, An examiantion of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. exp. Med.* **124,** 141 (1966).
23. K. STALDER and W. STÖBER, Haemolytic activity of suspensions of different silica modifications and inert dusts. *Nature (Lond.)* **207,** 874 (1965).
24. T. NASH, A. C. ALLISON and J. S. HARINGTON, Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity, *Nature (Lond.)* **210,** 259 (1966).

25. J. GILLMAN, T. GILLMAN and C. GILBERT, Reticulosis and reticulum cell tumours of the liver produced in rats by trypan blue, with reference to hepatic necrosis and fibrosis. *S. Afr. J. med. Sci.* **14,** 21 (1949).
26. L. GOLDBERG, L. E. MARTINI and A. BATCHELOR, Biochemical changes in the tissues of animals injected with iron: acid phosphatase and other enzymes. *Biochem. J.* **77,** 252 (1960).
27. H. G. RICHMOND, Induction of carcoma in the rat by iron-dextran complex. *Brit med. J.* **i,** 947 (1959).
28. B. D. CATER, The carcinogenic action of carageenin in rats. *Brit. J. Cancer.* **15,** 607 (1961).
29. J. P. W. GILMAN, Metal carcinogenesis. II. A study of the carcinogenic activity of cobalt, copper, iron and nickel compounds. *Cancer Res.* **22,** 158 (1962).
30. J. C. HEATH, The histogenesis of malignant tumours induced by cobalt in the rat. *Brit. J. Cancer* **14,** 478 (1960).
31. J. C. HEATH, M. R. DANIEL, J. T. DINGLE and M. WEBB, Cadmium as a carcinogen. *Nature (Lond.)* **193,** 592 (1962).
32. H. KOENIG, Intravital staining of lysosomes by basic dyes and metallic ions. *J. Histochem. Cytochem.* **11,** 120 (1963).
33. K. SETÄLÄ, Progress in carcinogenesis, tumor-enhancing factors. A bio-assay of skin tumor formation. *Progr. exp. Tumor Res. (Basel)* **1,** 225 (1960).
34. W. E. HESTON and A. W. PRATT, Effect of concentration of oxygen on occurrence of pulmonary tumors in strain A mice. *J. natn. Cancer Inst.* **22,** 707 (1959).
35. A. C. ALLISON, Role of lysosomes in oxygen toxicity. *Nature (Lond.)* **205,** 14 (1965).
36. C. SLEDGE and J. T. DINGLE, Oxygen-induced resorption of cartilage in organ culture. *Nature (Lond.)* **205,** 140 (1965).
37. R. GOUTIER, Effects of X-rays on nucleic acid biosynthesis and on the activity of nucleases in mammalian cells. *Progr. Biophys.* **11,** 53 (1961).
38. R. GOUTIER, M. PIROTTE and R. GOUTIER, Acid deoxyribonuclease and acid phosphatase activities in regenerating rat liver after wholebody X-irradiation. *Radiat Res.* **16,** 728 (1962).
39. E. RAHMAN, Acid phosphatase and β-glucuronidase activities of thymus and spleen of rats after whole-body X-radiation. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **109,** 378 (1962).
40. D. BRANDES, K. W. SLOAN, E. ANTON and F. BLOEDORN, The effect of X-irradiation on the lysosomes of mouse mammary gland carcinomas. *Cancer Res.* **27,** 731 (1967).
41. E. H. KAGAN, R. H. BROWNSON and D. B. SUTER, Radiation induced cytochemical changes in neurons. *Arch. Pathl.* **74,** 195 (1962).
42. J. S. GREENSPAN, M. R. MELAMED and A. G. E. PEARSE, Early changes in irradiated salivary glands and lymph nodes of the rat. *J. Path. Bact.* **88,** 439 (1964).
43. J. PICK, The fine structure of sympathetic neurons in X-irradiated frogs. *J. Cell Biol.* **26,** 335 (1965).
44. G. WEISMANN and J. DINGLE, Release of lysosomal protease by ultra-violet irradiation and inhibition by hydrocortisone. *Exp. Cell Res.* **25,** 207 (1961).
45. I. D. DESAI, P. C. SAWANT and A. L. TAPPEL, Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. *Biochim. biophys. Acta. (Amst.)* **86,** 277 (1964).
46. E. D. WILLS and A. E. WILKINSON, Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. *Biochem. J.* **99,** 657 (1966).
47. A. C. ALLISON, I. A. MAGNUS and M. R. YOUNG, Role of lysosomes and cell membranes in photosensitization. *Nature (Lond.)* **209,** 874 (1966).
48. T. F. SLATER and P. A. RILEY, Photosensitization and lysosomal damage. *Nature (Lond.)* **209,** 151 (1966).
49. A. C. ALLISON, Lysosomes in virus-infected cells. *Perspect. in Virol.* **5,** 29 (1967).
50. A. C. ALLISON and L. MALLUCCI, Lysosomes in dividing cells, with special reference to lymphocytes. *Lancet* **ii,** 1371 (1964).
51. K. HIRSCHHORN and R. HIRSCHHORN, Role of lysosomes in the lymphocyte response. *Lancet* **i,** 1046 (1965).
52. A. MONROY, R. MAGGIO and A. M. RINALDI, Experimentally induced activation of the ribosomes of the unfertilized sea urchin egg. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **54,** 107 (1965).

53. M. G. P. Stoker, Effect of X-irradiation on the susceptibility of cells to transformation by polyoma virus, *Nature (Lond.)* **200,** 756 (1963).
54. G. Todaro, A. Green and M. R. Swift, Susceptibility of human diploid fibroblast strains to transformation by SV40 virus. *Science* **153,** 1252 (1966).
55. K. K. Sanford, Malignant transformation of cells *in vitro*. *Int. Rev. Cytol.* **18,** 249 (1965).
56. A. Buzzati-Traverso and N. Visconti di Modrone, Produzione di mosaici in Drosophila melanogaster con rosso neutro. *Ric. Sci.* **17,** 3 (1947).
57. P. B. Dent, L. A. Fish, J. G. White and R. A. Good, Chediak-Higashi syndrome. Observations on the nature of the associated malignancy. *Lab. Invest.* **15,** 1634 (1966).
58. C. de Duve and R. Wattiaux, Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* **28,** 435 (1966).
59. D. Brandes and E. Anton, The role of lysosomes in cellular lytic processes III. Electron histochemical changes in mammary tumours after treatment with cytoxan and vitamin A. *Lab. Invest.* **15,** 987 (1966).
60. A. C. Allison, On the role of lysosomes in drug action. *Adv. Chemother.* (in press).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 491–495. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Epidemiology of Tumours of the Uterine Cervix*†

LUCIA J. DUNHAM
Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda, Md. 20014, U.S.A.

SPONTANEOUS cancers of the uterine cervix have not been encountered in most species of animals below man, even when large series have been examined [2]. Extensive study of captive wild animals, cattle, horses, swine, dogs, cats, the rodents maintained in scientific laboratories, and primates, has resulted in only a few reports of unequivocal spontaneous cancer in the cervix.

Cancer of the uterine cervix is primarily a disease of the human species, and its frequency in relation to all cancer in females ranges from 5 to 60% in different population groups. Age-adjusted mortality rates per 100,000 females are available from some areas and range from 3 to 64. Dunham and Bailar have prepared a map and accompanying table that shows ranges of risk for cancer of the cervix in nearly 90 population groups [3]. The highest risks are in Latin America, in parts of Africa, and in Asia. The lowest risks are in Israel, in North America, Australia, New Zealand, and Europe, especially Poland and Ireland. Though cancer of the cervix is usually infrequently found in Jewish women, recent data from North Africa suggest that it may not be unusually low among Jews in North Africa [4–6]. Within the United States, cervical cancer is less frequent in white women than in non-white women.

There is an excess risk of cancer of the cervix for populations living in cities compared to rural areas, for populations of high density within industrial environments, and for populations at low rather than high socio-economic levels [7–10]. Cancer of the cervix is more frequent in married women than in single or celibate women [11, 12]. The median age at diagnosis is about 51 years, 13 years younger than the median age at diagnosis of cancer at other sites combined [13].

A working hypothesis in many studies of cancer of the cervix has been that its causes are most likely to be found in the environment of patients. Studies have not indicated that there is an hereditary or familial factor [14, 15]. It has been thought that the social and sexual environments of patients with cervical cancer may be different from those of patients without this cancer. A number of investigators have tried to explain the low frequency of cervical cancer in Jewish women. Jewish women differ from non-Jewish women in their history of intercourse virtually only with circumcised male partners, and the patients' observance of the ritual laws of Niddah, dictating abstinence from intercourse for periods up to seven days after the cessation of menses. Cancer of the cervix has not been investigated from the viewpoint of cultural differences in diet.

There have been disagreements about factors found in past studies associated with cancer of the cervix. For instance, all investigators have not agreed about the significance of such factors in the pregnancy history as ever-pregnant, early age at first pregnancy, or large number of preg-

*Reference no. 1 presents the full report of a National Cancer Institute Study on cancer of the uterus: a rates study, interview study, and pathology study.

†Presented at the "Second International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours", Rome, April 24–26, 1967.

nancies. The factors that characterize the patients in the control groups in a study are the basis for the comparisons with the cancer patients. The way that the control patients were selected to represent the total background population of patients with cancer of the cervix has varied from one interview-type study to another. Control patients are often selected from the same hospitals or clinics as the cancer patients, in the same age groups, at the same socio–economic levels, or are matched by marital status, number of pregnancies, or these in various combinations. Differences in results and conclusions between studies are in part due to differences in the characteristics of the control groups.

Our National Cancer Institute interview study comprised 338 white non-Jews and 96 Jews with cancer of the cervix, and corresponding control groups of 594 and 1583 patients [1]. We selected the control patients for interview from the same age groups and the same hospitals as the cancer patients. We interviewed the large numbers of control patients both in New York City and in Israel, to improve stability in comparisons of factors with those of the cancer patients, especially since there were comparatively few Jewish patients with cancer of the cervix. There were additional control groups, 164 white non-Jews and 230 Jews with cancer of the corpus, and 440 Israeli Jews with cancer of the breast and 65 Israeli Jews with cancer of the ovary. The factors of all control patients were compared with those of patients with cancer of the cervix. At the same time as the interview study, the incidence rates were established, and there was a review and classification of the pathologic diagnoses of more than 98% of the patients with cancer of the cervix who were interviewed.

Data on constitutional and environmental factors of patients were analyzed. Direct associations were not found with most of the factors studied, such as aspects of marriage and marital practises, characteristics of the menstrual history, the history of diseases, operations and treatments related to the female genital and endocrine gland systems, and characteristics of the pregnancy history (Table 1). Uncircumcised male partners were associated with cancer of the cervix in one of three population groups of patients only. The association was noted in relation to control patients without cancer, but not in relation to patients with cancer of the corpus.

In most past studies there has been agreement that cancer of the cervix is somewhat related, statistically, to early age at first marriage or at first intercourse. With the exception of the Jews in New York City there were larger percentages with ages at first intercourse under 20 years among patients with cancer of the cervix than among control patients. It is doubtful that it can be concluded from these data that first intercourse at an early age causes cancer of the cervix. More than half of the patients with cancer of the cervix, except for Sephardi–Orientals, did not have the early ages at first intercourse below 20 years; that is, numerous individual patients did not report the associated factor, and something else must have caused their cancer. The late Dr. Harold F. Dorn, failed to find a relationship of the risk of cervical cancer to the strength of the factor, first intercourse at early ages [16]. The analysis was extended to determine whether factors studied led to comparatively young ages at diagnosis of cancer of the cervix in white non-Jews, but no such effects were found. In theory, if a factor is carcinogenic, its presence should shorten the induction time of the cancer. The latent period of the induction time of cancer of the cervix was not affected, either by early age at first intercourse or by uncircumcised male partners, or other factors analyzed.

Table 1. *Factors in NCI study not significantly associated with cancer of cervix*

Widowhood, divorce, separation
Semipermanent extramarital relationships
More than one marriage
Frequent intercourse
Practice of ritual laws of Niddah (Jewish women)
Abstinence from intercourse in relation to menses
Use of contraceptives
Age at menarche or menopause
Characteristics of the menstrual cycle
Selected past diseases, surgical operations, and types of treatment
Age at first or last pregnancy
Number of pregnancies; crowding of pregnancies
Trimester at termination of pregnancy; method of delivery

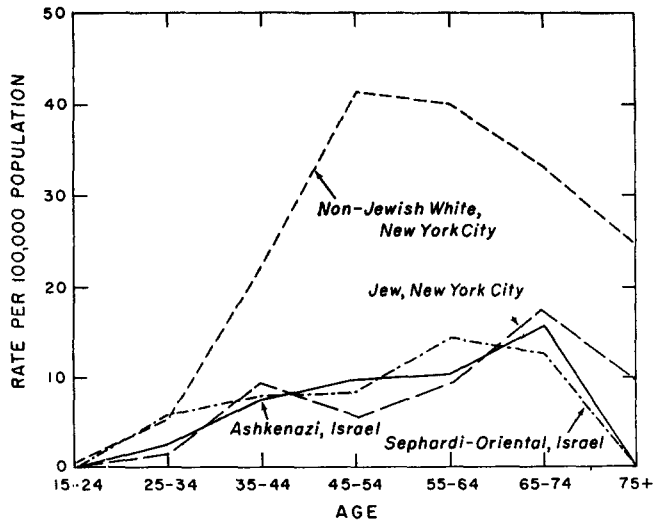


Fig. 1. *Cancer of the uterine cervix by age. Incidence rates for non-Jewish white women and three groups of Jewish women,* 1952–1953.

One of the interesting aspects of the study was the inter-relationship and interdependence of factors related to social and sexual history. Age at first intercourse and circumcision status of partners were related to each other, the percentages of circumcised partners being smaller for the groups with younger than for those with older ages at first intercourse. Median ages at first marriage were considerably younger for all those patients in the study who had more than one marriage than for those patients who had a single marriage only. Three and more pregnancies were associated with first intercourse under age 20, and we found many additional factors that have been suggested as causes of cancer of the cervix that were closely related with each other.

An important part of the National Cancer Institute study was the comparison among the Jewish women in New York City and the Jewish women of Israel. These are three culturally different groups of women, two living within the confines of Israel, Israeli Ashkenazi Jews and Israeli Sephardi–Oriental Jews. The Israeli Ashkenazi had emigrated mainly from Western and Northern European countries, while the Sephardi–Orientals came from parts of the Near East, South-Eastern Europe, and Africa. Rates of cancer of the cervix were almost the same in the three groups, 4·1 in New York City Jews, and 4·7 and 4·9 respectively in the two groups of Israeli Jews. Incidence rates by age of cervical cancer in the three groups of Jews were similar, with the peak incidence at about 65 to 74 years, between 10 and 20 years later than for white non-Jews in New York City (Fig. 1). We assembled the data on a number of factors in the large control groups of Jewish women (Table 2), the data presumably representing cultural characteristics of these population groups. The New York City Jews differed from the Ashkenazi Jews in the percentages of never-married women, first marriage before age 20, first pregnancy before age 25, and total pregnancies 5 or more. There were still

Table 2. *Cultural factors of Jewish control patients in percentages*

	New York City Jews	Israeli Jews	
		Ashkenazi	Sephardi–Orientals
Never married	5·3	2·1	1·3
First marriage before age 20	23·4	17·0	47·6
Non-practice of laws of Niddah	No. info.	68·5	48·0
Married never pregnant	12·8	10·6	6·5
First pregnancy before age 25	56·2	45·9	73·2
Total pregnancies, 5 or more	21·3	30·3	58·3
No formal education	6·9	5·5	45·0
Education at ninth grade level, and above	45·6	46·9	17·3

greater differences between the two subgroups of Israeli Jews, and nearly three times as many of the Sephardi–Oriental as Ashkenazi women reported first marriage before age 20, and also much larger percentages of women in this population reported first pregnancy before age 25 and total pregnancies of five or more. Education grade levels of Ashkenazi and Sephardi–Orientals were widely different. Our conclusions are that the cultural differences between the three groups of Jewish women did not affect the risks of cervical cancer. Possibly Jews have some degree of genetically determined resistance to cancer of the cervix, but this is unproved.

RESUME

Le cancer du col utérin a ses caractéristiques propres, distinctes de celles de tout autre cancer:

(1) *Il est rare chez les mammifères autres que l'homme.*

(2) *Il est plus fréquent dans les pays en voie de développement que dans les pays évolués, dans les populations urbaines que dans les populations rurales, dans les régions à forte population industrielle que dans celles où la population est moins dense, ainsi que dans les classes sociales et économiques inférieures. Il est relativement fréquent chez les Noirs et assez rare chez les Juifs, à l'exception des Juifs d'Afrique du Nord.*

(3) *Une plus grande proportion de malades atteintes de cancer du col utérin que de patientes souffrant d'autres types de cancer présentent certaines caractéristiques liées au mariage et aux pratiques sexuelles, permettant d'établir une éventuelle corrélation entre ceux-ci et la présence du cancer. Cenpendant, on a démontré que les risques de cancer du col ne sont pas augmentés par la présence des facteurs qui ont été étudiés. Les taux de cancer du col utérin ne sont pas supérieurs chez les Juifs où ces caracteristiques existent que dans d'autres groupes de Juifs. Chez les non-Juifs, la présence d'un facteur extrinsèque n'entraîne pas de développement prématuré de cette forme de cancer.*

Le cancer du col est très probablement dû à l'influence de facteurs externes, mais nous n'avons pas encore pu déterminer ses causes exactes.

SUMMARY

Cancer of the cervix has its own distinctive characteristics, separate from any other cancer:

(1) *It is infrequent in mammals below man.*

(2) *It is more frequent in developing than developed countries, urban than rural populations, dense than less dense industrial populations, and at low than high socio-economic levels. It is relatively frequent in Negroes and relatively infrequent in Jews, with the possible exception of Jews in North Africa.*

(3) *Slightly larger proportions of patients with cancer of the cervix than corresponding control patients have reported certain factors related to marriage and sexual practices. However, the risk of cancer of the cervix was not enhanced by the presence of the factors that were investigated. Rates in groups of Jews with large proportions of some of these factors were not greater than rates in other groups of Jews. In non-Jews the presence of a factor did not cause the cancer to develop at an earlier age.*

Cancer of the cervix is very likely an "environmental" cancer at least in part, but we do not know its causes.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Kollumkarzinom ist hauptsächlich eine Krankheit der Menschen. Das höchste Risiko besteht in Lateinamerika und in einigen Gebieten von Afrika und Asien. Ausserdem ist das Kollumkarzinom verhaltnismässig häufig bei Negerinnen in den Vereinigten Staaten. Das niedrigste Risiko besteht in Israel, Nordamerika, Australien, Neuseeland und Europa, besonders Polen und Irland. Neue Angaben aus Nordafrika deuten darauf him, dass Krankheit durchaus nicht so selten unter Jüdinnen in Nordafrika ist wie unter Jüdinnen in Israel. Verschiedene Umstände, die mit geographischen, kulturellen, sozialen und sexuellen Gegebenheiten assoziiert sind, werden untersucht. Die Gültigkeit dieser

Assoziationen scheint bei den vershiedenen Studien zu variieren, zum Teil wegen der verschieden von den Forschern angewandten Methoden. Die Ergebnisse der Untersuchung uber den Gebärmutterkrebs des National Cancer Institute *unterstuetzen nicht die Annahme, nicht dass irgend einer der geprüften Faktoren das Kollumkarzinom verursacht.*

REFERENCES

1. H. L. Stewart, L. J. Dunham, J. Casper, H. F. Dorn, L. B. Thomas, J. H. Edgcomb and A. Symeonidis, Epidemiology of cancers of uterine cervix and corpus, breast and ovary in Israel and New York City. *J. nat. Cancer Inst.* **37,** 1 (1966).
2. E. Cotchin, Spontaneous uterine cancer in animals. *Brit. J. Cancer* **18,** 209, (1964).
3. L. J. Dunham and J. C. Bailar, III. World maps of cancer mortality rates and frequency ratios. To be published.
4. F. Ardoin, Bilan de trois années d'étude statistique du cancer au Maroc, 1954–1957. Personal communication of unpublished data.
5. M. J. Brehant and Mme. Mussini-Montpellier, Esquisse de la physionomie du cancer en Algérie. *Bull Acad. nat. Méd. (Paris)* **145,** 536 (1961).
6. A. Chadli and E. Philippe, La physionomie du cancer en Tunisie. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* **37,** 397 (1960).
7. J. C. Bailar III and S. L. Rice, Geographic variation in uterine cancer incidence in Connecticut. *Publ. Hlth Rep. (Wash.)* **77,** 157 (1962).
8. J. Clemmesen and A. Nielsen, The social distribution of cancer in Copenhagen, 1943 to 1947. *Brit. J. Cancer* **5,** 159 (1951).
9. W. M. Haenszel, S. C. Marcus and E. G. Zimmerer, Cancer morbidity in urban and rural Iowa. Pub. Health Monograph No. 37, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. (1956).
10. P. Stocks, Cancer of the uterine cervix and social conditions. *Brit. J. Cancer* **9,** 487 (1955).
11. F. Gagnon, Etat marital et grossesse dans l'éclosion du cancer du col de l'utérus. *Laval méd.* **20,** 654 (1955).
12. R. S. Taylor, B. E. Carroll and J. W. Lloyd, Mortality among women in 3 Catholic religious orders with special reference to cancer. *Cancer* **12,** 1207 (1959).
13. New York State Department of Health, Bureau of Cancer Control. Annual Report (1955).
14. A. Cresseri, L. Gianferrari, P. Malcovati, G. Morganti and P. E. Beolchini, Genetical researches on uterine cancer. *Acta. genet. (Basel)* **6,** 301 (1956).
15. M. T. Macklin, Etiologic factors in carcinoma of the uterus, especially the cervix. *J. int. Coll. Surg.* **21,** 365 (1954).
16. H. F. Dorn, Some problems arising in prospective and retrospective studies of the etiology of disease. *New Engl. J. Med.* **261,** 571 (1959).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 497–501. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Interference among Polycyclic Hydrocarbons in Experimental Skin Carcinogenesis

C. FINZI, P. DAUDEL and G. PRODI

Istituto di Patologia Generale, Università di Bologna, Italia
Laboratoire Curie, Facultés des Sciences de Paris et d'Orsay, France

CARCINOGENIC hydrocarbons administered to the skin become firmly bound to epidermal proteins [1–3]. This binding was ascertained for similar carcinogenic compounds such as angular benzacridines [4]. Also other carcinogens of quite different structure, like azo dyes [5] and acetylaminofluorene [6] become bound to cell proteins. In the case of polycyclic hydrocarbons [3, 7], angular benzacridines [4] and azo compounds [8], a relationship was established between the amount of protein-bound substance and its carcinogenic activity. As regards polycyclic hydrocarbons and angular benzacridines, in the light of present knowledge, we can state that some relationship exists between molecular constitution, protein binding and carcinogenesis. Those compounds, which possess a region that may react by addition, can be carcinogens and give skin-protein binding: for carcinogenic hydrocarbons related to benzanthracene and benzacridine, this is the mesophenanthrenic or K region. We came to these conclusions through theoretical studies, chemical analyses on reactivity by addition and biological data on carcinogenic activity [9]. Direct experimental evidence that the K region is involved in the formation of protein–hydrocarbon complexes was obtained in two cases [10, 11].

Furthermore, it was found that although the formation of a firm protein binding is necessary to induce carcinogenesis, it is not sufficient in itself to provoke such condition; in fact some polycyclic hydrocarbons like 1,2,3,4-dibenzanthracene [3], antanthrene [12] and perylene [13], which have no carcinogenic power, are nevertheless able to form extensive cell-protein bindings.*

These data led us to assume that polycyclic hydrocarbons may become protein bound either through the K region or another one (possibly in the case of 1,2,3,4-dibenzanthracene, the mesoanthracenic or L region, which can react by addition [7, 15], or an equivalent region for other non carcinogenic compounds like antanthrene or perylene).

Thus, even if direct evidence of protein binding through the L region is not yet available, we believe that there are two reactive regions, K and L, the former alone being important for carcinogenesis.

At this point, it seemed justified to test the inhibition of a given carcinogenic hydrocarbon with an active K region by means of the L region binding of another hydrocarbon. In a previous short-term experiment with C^{14} labelled hydrocarbons [17], no inhibition was exerted by 1,2,3,4-dibenzanthracene and antan-

*1, 2, 3, 4-dibenzanthracene is usually regarded as inactive, although a low incidence of tumours is occasionally seen after its administration by paintings on the mouse skin [14]. This substance proved to be inactive in the experimental conditions under which the present study was performed.

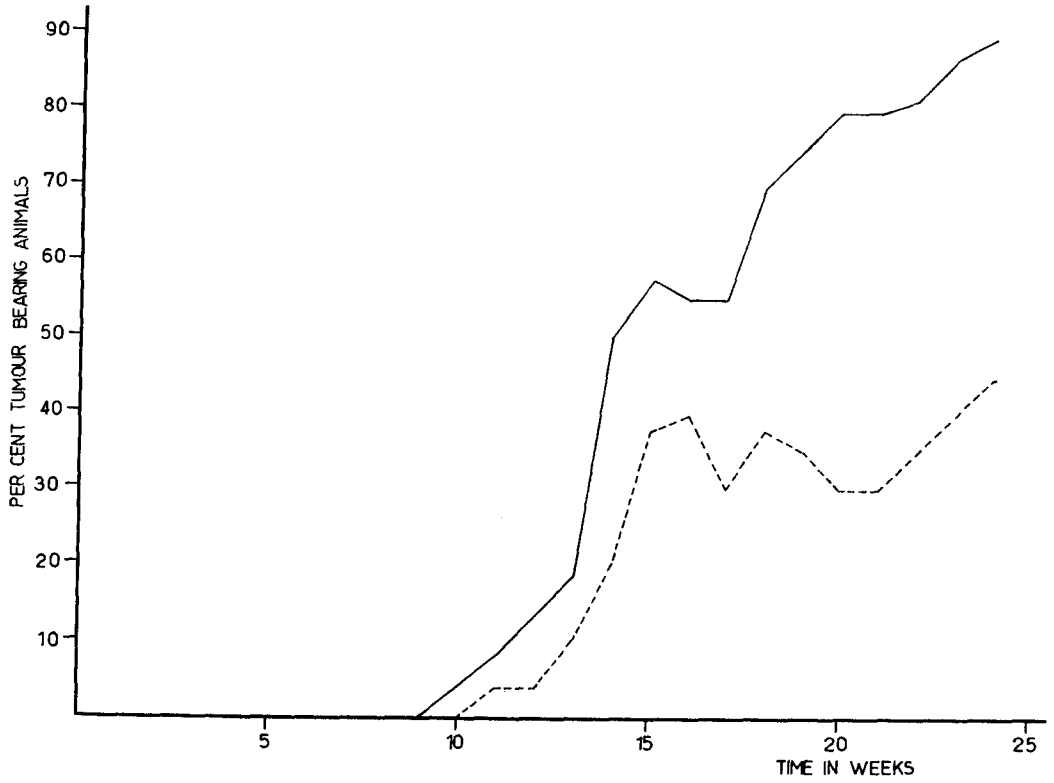


Fig. 1. *Per cent of tumour bearing animals on surviving animals*
Solid line: mice treated with BP *alone.*
Broken line: mice treated with BP *plus* 1,2,3,4-DBA.

threne on the binding of carcinogenic hydrocarbons to proteins. However, the hyperplasia and necrosis caused by the interfering compounds could arise some doubts about these conclusions. It seemed therefore useful to carry out a long-term biological experiment.

The present study deals with the actions of 1,2,3,4-dibenzanthracene (1,2,3,4-DBA) and perylene on mouse skin carcinogenesis induced by benzpyrene (BP).

MATERIALS AND METHODS

One hundred and ninety adult male mice of the Swiss strain were used. The animals were divided into two batches, each subdivided into three groups, as follows:

I batch: Group no. 1—40 animals, treated with alternate paintings of BP and 1,2,3,4-DBA (both in 0·3% benzene solution, two drops in the interscapular region, every two days).

Group no. 2—30 animals, treated with alternate paintings of BP (0·3% in benzene) and benzene, as above.

Group no. 3—20 animals, treated with alternate paintings of 1,2,3,4-DBA (0·3% in benzene) and benzene, as above.

II batch: Group no. 1—40 animals, treated with simultaneous paintings of BP and perylene (both 0·3% in the same benzene solution) every four days.

Group no. 2—40 animals, treated with BP (0·3% in benzene) every four days.

Group no. 3—20 animals, treated with perylene (0·3% in benzene) every four days.

Tumours whose diameter was more than 0·5 mm were recorded weekly. The tumour size, and macroscopic shape and appearance were recorded.

RESULTS

Figure 1 shows the percentage of tumour-bearing mice with regard to survivors, in groups 1 and 2 of the first batch. In the third group, consisting of mice that received paintings with 1,2,3,4-DBA alone, no tumours appeared.

Figure 2 shows the percentage of tumour-bearing mice with regard to survivors in groups 1 and 2 of the second batch. In the third group, consisting of mice that received perylene alone, no tumours were found.

As growth does not show essential differences in the two experiments, the two batches can be considered together. In the two groups painted with BP alone, the incidence of tumours at the end of the experiment reaches 90%; only a slight difference in the latency period between the two groups is observed.

In the groups painted with benzpyrene and a non carcinogenic compound, a notable decrease in the percentage of tumour-bearing

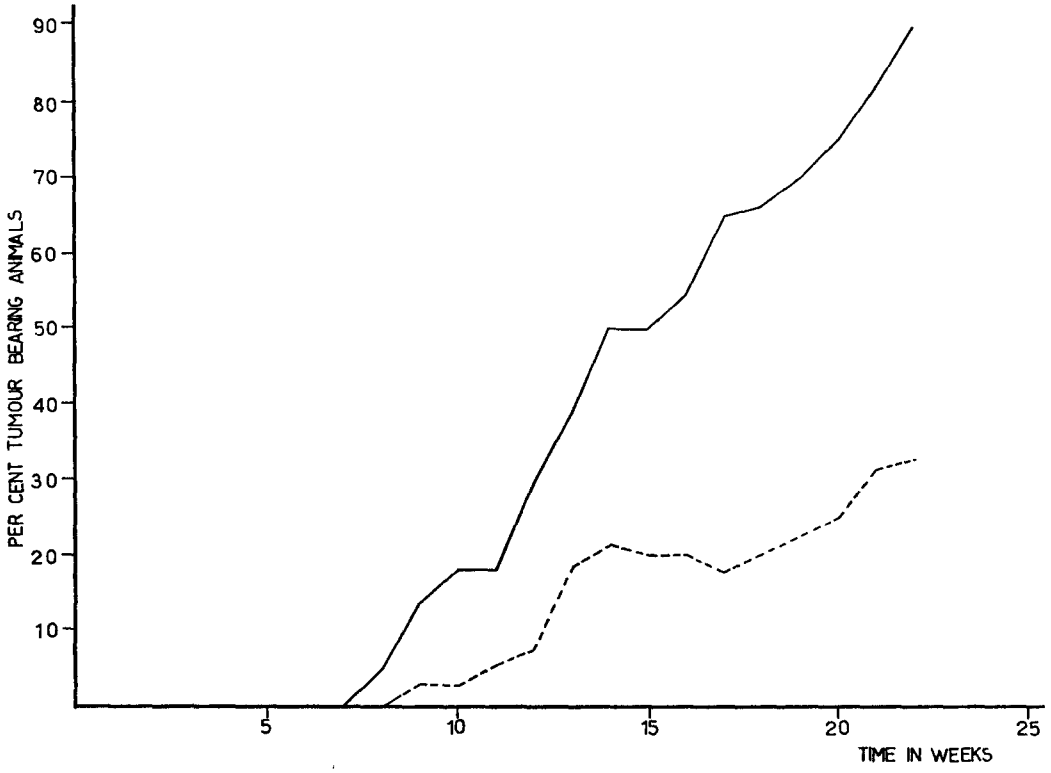


Fig. 2. Per cent of tumour bearing animals on surviving animals.
Solid line: mice treated with BP *alone.*
Broken line: mice treated with BP *plus perylene.*

mice is observed, either in the case of 1,2,3,4-DBA or perylene. In fact, at the end of the experiment, there is a 45% incidence in the first case and a 33% incidence in the second, compared with the 90% in the groups painted with BP alone. In previous periods of treatment this difference is even more relevant. As regards the tumour incidence in the tumour-bearing mice, it is constantly lower in the groups receiving the double treatment, and the ratio between the average number of tumours in the tumours-bearing mice, respectively in the BP and in the double treatment groups, is 1·3 to 1·6 with no important changes during the different periods and in both experiments.

When the tumours are divided into sets according to their diameter, in the two groups painted with BP, plus 1,2,3,4-DBA or perylene, the incidence is uniformly shifted towards lower values in comparison with that found in the two control groups, painted with BP alone. On the contrary, the latency period does not seem altered, nor does the tumour macroscopic appearance seem to reveal any difference.

The mortality is about the same in the groups 1 and 2 of the two experiences, and is noticeably increased in the last four weeks, reaching 50% of the animals at the end of the treatment.

DISCUSSION

1,2,3,4-DBA and perylene determine an evident inhibition on the BP carcinogenesis, as concerns the percentage of tumour-bearing mice, the number of tumours and their size.

Some other data are available about the interference between structurally similar carcinogenic, weekly carcinogenic and non carcinogenic compounds, in relation to the carcinogenic power (Lacassagne *et al.* [18]; Rudali *et al.* [19]; Wartman *et al.* [20]; Steiner and Falk [21]; Hill *et al.* [22]; Kotin *et al.* [23]). Lately Huggins and Pataki [24] have reported that the 7,12-dimethyl-1,2, benzanthracene mammary carcinogenesis is largely inhibited by oral administration of different aromatic hydrocarbons, as chrysene, retene, 6-amino-chrysene, benzanthracene, 3,9-dimethyl-benzanthracene and 6,8-dimethyl-benzanthracene.

The hypothesis that the inhibitory action can be explained on the ground of a competition between the two substances at the level of the cell receptor, is reported by some of the above mentioned authors (Lacassagne *et al.*, Steiner and Falk, Kotin *et al.*): this hypothesis is tenable if one knows that the substance used as inhibitor can effectively be bound to the cell. In the present experiment we took care

to choose, as inhibitors, hydrocarbons that are well known concerning their binding characteristics. Our data are therefore in agreement, and substantiate, the hypothesis of a competition at the cellular level: moreover, they suggest that the inhibition can be explained as a competitive reaction of the L region of the non carcinogenic compounds and the K region of the carcinogenic ones towards the receptor.

Nevertheless some points must be taken into account:

(1) It is not yet demonstrated that the carcinogenic and non carcinogenic substances can be bound to the same receptor. In fact Abell and Heidelberger [25] seem to be in favour of the existence of different receptors.

(2) As concerns the mechanism of binding with the proteins, the reaction through K is really demonstrated, but the reaction through L is not so, even if, for many reasons, it must be considered highly probable [15, 7].

(3) The present data can be interpreted also on the ground of an inhibitory action on the already formed tumours.

Moreover, it must be considered that, in the picture of a hypothesis based on a competition at the level of the substrate, the latter is not necessarily a protein: the binding with proteins, which is now satisfactorily known, is only an index of the aptitude of polycyclic hydrocarbons to react with the substrate. In fact it has been recently demonstrated that the hydrocarbons can react with nucleic acids: in particular, the amount of different carcinogens bound to DNA is proportional to their carcinogenic power [26].

RESUME

L'induction des tumeurs dans la peau de la souris, au moyen d'un traitement avec des solutions de benzopyrène, est nettement inhibée par un traitement simultané de 1,2,3,4-*dybenzanthracène ou de pérylène, substances non cancérigènes et ayant une capacité de s'unir, de façon stable, aux protéines cellulaires.*

L'on discute cette donnée sur la base d'une interférence possible au niveau du récepteur cellulaire entre les hydrocarbures cancérigènes, dotés d'une région K active, et les hydrocarbures non cancérigènes, ayant la capacité de s'unir au substrat à travers une région L active.

SUMMARY

The tumour induction in mice skin by treatment with benzene solutions of benzpyrene is clearly inhibited by treating at the same time with 1,2,3,4-DBA *or perylene, compounds which are not carcinogenic but are able to bind firmly to cell proteins. The result is discussed on the basis of a possible interference at the level of the cell receptor between carcinogenic hydrocarbons with a reactive K region and noncarcinorgenic hydrocarbons with an active L region.*

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von Benzpyren-induzierten Hauttumoren wird durch gleichzeitige Behandlung der Mäuse mit 1,2,3,4-*Dibenzanthrazen oder Perilen deutlich gehemmt. Die beiden letzteren Substanzen sind nicht karzinogen; sie werden aber stabil an Zellproteine gebunden. In der Diskussion wird auf ein mögliches Interferenz-Phaenomen an Zellrezeptoren hingewiesen, wobei zwischen den karzinogenen Kohlenwasserstoffen mit einer reaktiven K-Region und den nicht karzinogenen Kohlenwasserstoffen mit einer reaktiven L-Region eine Kompetition bestehen könnte.*

REFERENCES

1. E. C. Miller, Studies on the formation of protein bound derivatives of 3,4-benzpyrene in the epidermal fraction of mouse skin. *Cancer Res.* **11,** 100 (1951).
2. W. B. Wiest and C. Heidelberger, The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissue constituents I. Methods. *Cancer Res.* **13,** 246 (1953).
3. C. Heidelberger and M. G. Moldenhauer, The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissue constituents — IV. A quantitative study of the binding to skin proteins of several C^{14}-labelled hydrocarbons. *Cancer Res.* **16,** 442 (1956).
4. P. Daudel, B. Chenon, N. P. Buu-Hoi, P. Jaquignon, A. Lacassagne, G. Prodi, G. Vallée, R. Vasquez and F. Zajdela, Relation entre le pouvoir cancérogène des molécules conjuguées et leur fixation sur les protéines cellulaires. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **42,** 135 (1960).

5. E. C. MILLER and J. A. MILLER, The presence and significance of bound aminoazo dyes in the liver of rats fed *p*-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **7,** 468 (1947).
6. J. H. WEISBURGER, E. K. WEISBURGER and H. P. MORRIS, The effect of riboflavine on the metabolism of 2-acetylaminofluorene-9-C^{14} in rats. *J. nat. Cancer Inst.* **15,** 37 (1954).
7. V. T. OLIVEIRO and C. HEIDELBERG, The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissue V. Some structural requirements for binding of 1,2,5,6-dibenzanthracene. *Cancer Res.* **18,** 1094 (1958).
8. E. C. MILLER, J. A. MILLER, R. W. SAPP and G. M. WEBER, Studies on the protein-bound aminoazo dyes formed *in vivo* from 4-dimethylaminoazobenzene and its C-monomethyl derivatives. *Cancer Res.* **9,** 336 (1949).
9. A. PULLMAN and B. PULLMAN, *Cancérisation par les Substances Chimiques et Structure Moléculaire*, Masson, Paris (1955).
10. P. M. BHARGAVA, H. I. ADLER and C. HEIDELBERGER, Studies on the skin protein-bound compounds following topical application of 1,2,5,6-dibenzanthracene-9, 10-C^{14} *J. Amer. chem. Soc.* **77,** 2877 (1955).
11. P. DAUDEL, B. MUEL, G. LACROIX and G. PRODI, Recherche de métabolites liés aux protéines de peau de souris badigeonnée par du 3,4-benzopyrène. *J. Chim. Phys.* 263 (1962).
12. P. DAUDEL, F. NECTOUX, L. PICHAT and G. PRODI, Fixation sur les protéines cellulaires de l'anthanthrène marqué par du radiocarbone. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **251,** 1049 (1960).
13. P. DAUDEL, A. JACQUIER, A. NAKAJIMA and N. FOSSAR, Etude de la fixation du pérylène radiocarboné sur les protéines cellulaires. *C. R. Acad. Sci.* **257,** 2910 (1963).
14. W. C. HUEPER and W. D. CONWAY, *Chemical Carcigonesis and Cancers*, C. C. Thomas, Springfield, Illinois (1964).
15. A. PULLMAN, Structure électronique et activité cancérogène des hydrocarbures. aromatiques. *Bull. Soc. Chim.* 595 (1954).
16. O. CHALVET, R. DAUDEL and C. MOSER, A note on the interaction of carcinogenic molecules with cellular proteins. *Cancer Res.* **18,** 1033 (1958).
17. P. DAUDEL and G. PRODI, Relation entre le pouvoir cancérogène des molécules conjuguées et leur effet inhibiteur eu égard à leur fixation sur les protéines cellulaires. *Acta. Un. int. Cancr.* **19,** 522 (1963).
18. A. LACASSAGNE, N. P. BUU-HOI and P. CAGNANT, Association d'hydrocarbures polycycliques et mécanisme de la cancérisation. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **138,** 16 (1944).
19. G. RUDALI, N. P. BUU-HOI, A. LACASSAGNE and J. LECOCQ, Variation du pouvoir cancérigene du 9:10-dimèthylbenzanthracène en fonction de quelques facteurs physiques et chimiques. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **140,** 234 (1946).
20. W. B. WARTMAN, P. SHUBIK, W. T. HILL, B. B. REEB, D. W. STANGER and B. RIEGEL, Delay of Methyl-Cholanthrene carcinogenesis by 1,2,5,6-Dibenzofluorene. *Cancer Res.* **10,** 247 (1950).
21. P. E. STEINER and H. L. FALK, Summation and inhibition effects of weak and strong carcinogenic hydrocarbons: 1,2-benzanthracene, chrisene, 1,2,5,6-dibenzanthracene, and 20-methylcholanthrene. *Cancer Res.* **11,** 56 (1951).
22. W. T. HILL, D. W. STANGER, A. PIZZO, B. RIEGEL, P. SHUBIK and W. B. WARTMAN, Inhibition of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene skin carcinogenesis in mice by polycyclic hydrocarbons. *Cancer Res.* **11,** 892 (1951).
23. P. KOTIN, H. L. FALK, W. LIJNSKY and L. ZECHMEISTER, Inhibition of the effect of some carcinogens by their partially hydrogenated derivatives. *Science* **123,** 102 (1956).
24. C. HUGGINS and J. PATAKI, Aromatic azoderivatives preventing mammary cancer and adrenal injury from 7, 12 Dimethylbenz(a)anthracene. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **53,** 791 (1965).
25. C. W. ABELL and C. HEIDELBERGER, Interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues. — VIII. Binding of tritium-labelled hydrocarbons to the soluble proteins of mouse skin. *Cancer Res.* **22,** 931 (1962).
26. P. BROOKES, Quantitative aspects of the reaction of some carcinogens with nucleic acids and the possible significance of such reactions in the process of carcinogenesis *Cancer Res.* **26,** 1994 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 503–509. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Untersuchungen an der Rattenleber über unspezifische und tumorspezifische Stoffwechselveränderungen nach Applikation von Diäthylnitrosamin (DÄNA)

G. SYDOW

Institut für Krebsforschung
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
Experimenteller Bereich
Berlin-Buch, Deutschland

EINLEITUNG

VIELE Kanzerogene zeigen während ihrer toxischen Einwirkung auf ein Gewebe mehrere verschiedenartige Wirkungsmechanismen. Bei der krebserregenden Wirkung dieser Stoffe handelt es sich eindeutig um eine Summationswirkung [1, 2], die keine Reversibilität zuläßt. Hieraus muß gefolgert werden, daß alle Stoffwechselveränderungen, die nach Verabfolgung kanzerogener Noxen in dem hiervon betroffenen Gewebe auftreten und die zur Krebsentstehung Beziehung haben, mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls irreversibler Art sein müssen. Dieser Tatbestand, auf den besonders aus dem Arbeitskreis von Druckrey [3, 4] schon vor mehreren Jahren hingewiesen wurde, findet zur Zeit immer noch zu wenig Berücksichtigung bei der Begutachtung diesbezüglicher Versuchsergebnisse. Auch von unserer Seite wurden diese Fakten in einigen Versuchen mit DÄNA nicht ausreichend beachtet [5, 6].

In der vorliegenden Publikation wird von weiteren Untersuchungen über die Wirkung des DÄNA nach einmaliger wie auch langzeitiger Applikation auf den Stoffwechsel der Rattenleber berichtet. In diesen Versuchen wurde besonders die Frage in den Mittelpunkt gestellt, inwieweit einige nach Verabfolgung dieses Kanzerogens auftretende Stoffwechselveränderungen auf eine unspezifische oder tumorspezifische Wirkung zurückzuführen sind.

MATERIAL UND METHODIK

In die Versuche gelangten Ratten beiderlei Geschlechts aus unserer Wistar-Zucht mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 200 g. Die einmalige Applikation von 40 mg DÄNA pro Tier (in 1 ml Wasser gelöst), erfolgte mit der Schlundsonde, die langzeitige Verabreichung von täglich 1 mg DÄNA pro Tier mit dem Trinkwasser.

Im Kurzversuch (40 mg DÄNA) wurden die Tiere 4 bzw. 30 Tage nach Applikation des Kanzerogens, im Langfütterungsversuch (80 oder 130 mg DÄNA) sofort nach der letzten DÄNA-Gabe bzw. 30 oder 90 Tage nach Kanzerogenstop getötet. Durch diese Versuchsanordnung sollte einerseits das Auftreten der Konzentrations-, Kumulations- und Sum-

Tabelle 1. *Stoffwechsel der Rattenleber nach* DÄNA-*Applikation sowie Stoffwechsel primärer und transplantabler* DÄNA-*Hepatome*

Gewebeart	Anzahl der Versuche*	Applizierte Dosis in mg	Tage nach Applikation	g Leber pro 100 g Körpergewicht	mg Protein†	% Glykogen‡	G6Pase§
normale Rattenleber	6	0	—	3,2±0,3†† (5)	96±9	6,1±1,9 (5)	620± 60 (5)
DÄNA-Leber	6	40	4	2,3±0,1	85± 2	1,8±0,8	210±60
DÄNA-Leber	10	40	30	3,2±0,5	89±13	7,7±1,4	620±95
DÄNA-Leber	5	80	90	3,9±0,3	96± 9	5,6±1,6	540±80
DÄNA-Leber	5	130	0	5,6±2,9	95±17	4,8±2,0	370±135 (3)
DÄNA-Leber	5	130	30	6,7±2,1	96± 8	5,6±2,7	480±95
primäres DÄNA-Hepatom	5	130	30	—	88± 8	1,0±0,8	170± 60
transplant DÄNA-Hepatom	5	—	—	—	77± 5	0	<20
transplant DÄNA-Hepatom	5	—	—	—	87± 4	0	0
primäres DÄNA-Hepatom	1	130	30	3,5‡‡	90	1,3	210
primäres DÄNA-Hepatom	1	130	30	3,3‡‡	85	0,6	80
primäres DÄNA-Hepatom	1	130	30	1,3‡‡	100	1,0	240
primäres DÄNA-Hepatom	1	130	30	1,3‡‡	80	2,2	150
primäres DÄNA-Hepatom	1	130	30	2,3‡‡	87	0,0	170

Arginase¶	Hexokinase‖	Glukokinase‖	Glykolyse der hochtourigen Überstände bei unterschiedlichem Substratangebot**				
			1mM Glukose	100mM Glukose	10mM Glukose +0,2 I.Einh. Hexokinase	100mM Fructose	100mM Galaktose
81±19 (5)	39±16	167±58	36±18	260±75 (10)	370±95 (3)	202±48 (10)	40±19 (9)
73±15 (4)	94±17	12±10	84±26	127±22	410±168 (3)	208±31	84±20 (5)
64±23 (8)	46±10	141±23	27± 7	217±50	335±97 (6)	168±38	31±14 (9)
91±10	49±17	147±42	26± 8	226±41	318±20	166±20	42 (2)
64± 8	50±13	71±36	41±23	165±59	440±120 (3)	157±30	45±26
75± 9	40±10	127±72	29±10	164±47	335 (3)	141±40	29± 6
37±19	69±17	36±26	74±28	118±36	384±145	178±69	42±12 (4)
<3,0	86±36	0	84±35	91±37	440±120 (3)	147±63	45±12
0	176±49	0	173±47	177±19 (3)	630±100	302±72	63±14
29	78	26	37	73	180	80	28
17	85	7	83	94	350	185	40
60	53	43	58	126	350	160	49
23	48	77	80	168	495	200	54
54	79	26	111	128	550	270	—

*Bei anderer Anzahl an Versuchen ist diese in Klammern unter den ensprechenden Werten angeführt
†mg Protein der Überstandsfraktion · g Gewebe^{-1}
‡als Hexose bestimmt
§µMol Substratumsatz · Stunde^{-1} · g Gewebe^{-1}
¶mMol Substratumsatz · Stunde^{-1} · g Gewebe^{-1}
‖µMol Substratumsatz · Stunde^{-1} · 100 mg Protein der Überstandsfraktion^{-1}
**µMol gebildete Milchsäure · Stunde^{-1} · 100 mg Protein der Überstandsfraktion^{-1}
††Mittlewert mit Standardabweichung
‡‡Tumorgewicht

mationswirkung, andererseits aber auch die Trennung zwischen diesen verschiedenen Wirkungsarten erreicht werden.

Die Entnahme der Lebern, Herstellung der Homogenate und hochtourigen Überstände, sowie die Bestimmung des Glykogengehaltes, der Hexokinase- (EC 2.7.1.1) und Glukokinaseaktivität (EC 2.7.1.2) und der Glykolyse erfolgte nach bereits beschriebener Methodik [7]. Die Aktivität der G6Pase (EC 3.1.3.9) wurde nach Swanson [8] und der Proteingehalt der Überstände nach Itzhaki und Gill [9] bestimmt. Die Arginaseaktivität wurde in den Gesamthomogenaten in einer Endverdünnung von 1 : 300 und bei pH 9,5 (280 mM Arginin, 2 mM Mn^{2+}) ermittelt, wobei der gebildete Harnstoff nach Engel und Engel [10] bestimmt wurde. Die Enzymaktivitäten wurden auf 1 g Gewebe oder 100 mg Protein der Überstandsfraktion bezogen und sind in µMol oder mMol Substratumsatz pro Stunde für eine Inkubationstemperatur von 37°C angegeben. Die Milchsäurebildung wurde bei 37°C ermittelt und für 100 mg Protein der Überstandsfraktion berechnet.

ERGEBNISSE

Alle Befunde sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Als Ergänzung zu den darin enthaltenen Mittelwerten mit Standardabweichungen sind im unteren Teil dieser Tabelle noch alle Einzelwerte der 5 primären Hepatome angeführt. Dies schien erforderlich, da speziell hier größere Differenzen zwischen den einzelnen Hepatomen auftraten (s. auch 11).

Wie erkennbar ist, treten 4 Tage nach einmaliger Applikation von 40 mg DÄNA — zu diesem Zeitpunkt zeigt sich die größte Wirkung — starke Veränderungen des Stoffwechsels auf. Während das Gewicht der Leber, der Glykogengehalt und die Aktivität der G6Pase und Glukokinase eine weitgehende Verminderung erfahren, zeigen Hexokinase und Glykolyse erhöhe Werte. 30 Tage nach der Kanzerogengabe hat sich der Stoffwechsel wieder normalisiert.

Tiere, die nach Verabfolgung von 80 mg DÄNA aus dem Versuch genommen und erst nach 90tägiger normaler Fütterung getötet wurden, zeigen keinerlei erwähnenswerte Stoffwechselveränderungen, obwohl die Lebern dieser Ratten schon teilweise mehrere kleinere Hepatome enthielten; nur ein geringer Anstieg des Lebergewichtes ist nachweisbar.

Werden die Untersuchungen direkt im Anschluß an eine langzeitige DÄNA-Verabreichung (130 mg) vorgenommen, treten Aktivitätsverluste bei verschiedenen Enzymen auf, allerdings nicht in so ausgeprägter Form. Im Gegensatz zur Wirkung der einmaligen Dosis von 40 mg DÄNA ist anstelle der Abnahme ein Anstieg des Lebergewichtes und nur eine sehr geringe Erhöhung der glykolytischen Aktivität zu verzeichnen. Nach Kanzerogenstop ist ebenfalls 30 Tage später eine starke Tendenz zur Normalisierung des Stoffwechsels erkennbar; lediglich das Lebergewicht erhöht sich weiter.

Die primären Hepatome waren nur Lebern von Tieren entnommen worden, die 130 mg DÄNA und im Anschluß daran noch 30 Tage normale Fütterung erhalten hatten. Hierdurch sollte jede unspezifische toxische Beeinflussung durch das Kanzerogen ausgeschlossen werden. Der Stoffwechsel dieser Hepatome ist fast mit dem der Rattenlebern nach 40 mg DÄNA-Appilkation zu vergleichen. Es zeigt sich ein starker Verlust des Glykogengehaltes, der Glukokinase-, der Arginase- und der G6Pase-Aktivität, während Hexokinaseaktivität und Glykolyse (mit 1 mM Glukose) eine geringe Erhöhung aufweisen. Trotz der starken Schwankungen zwischen den Einzelwerten besteht gegenüber der, den Tumor umgebenden präkanzerösen Leber (30 Tage nach Applikation von 130 mg DÄNA) ein deutlicher Unterschied, dessen Signifikanz bei den oben erwähnten Stoffwechselmerkmalen bei etwa $P=0{,}01$ liegt.

In transplantablen Hepatomen tritt der Verlust spezifischer Funktionen des Ursprungsgewebes noch deutlicher hervor. Hierin kommt die weitere Entdifferenzierung des Gewebes durch die Transplantation zum Ausdruck. Alle Fermente, die mit einer organspezifischen Funktion verbunden sind, wie die G6Pase, Arginase und Glukokinase sind gar nicht mehr oder nur noch in geringer Aktivität vorhanden, während Hexokinaseaktivität und Glykolyse weiter ansteigen.

Im Gegensatz zu den leberspezifischen Enzymen reagieren die glykolytischen Enzyme— soweit dies aus der Milchsäurebildung gefolgert werden kann—auf DÄNA-Einwirkung mit einer Erhöhung und nicht mit einer Verminderung ihrer Aktivität. Inwieweit die Fruktokinase und Fruktolyse Veränderungen erfahren, ist anhand der Milchsäurebildung aus Fruktose nicht zu entnehmen, da selbst in den transplantierten Hepatomen ein starker Abbau der Fruktose zu Milchsäure erfolgt, der in diesem Fall jedoch sicherlich nur mit Hilfe der Hexokinase und nicht über die Fruktokinase abläuft. Galaktose wird in jedem Fall nur in geringer Menge verstoffwechselt.

Ferner ist aus den Versuchsergebnissen die

schon früher beschriebene enge Beziehung zwischen Hexokinaseaktivität und Glykolyse erkennbar [7]. Jede eindeutige Veränderung der Hexokinaseaktivität, wie sie 4 Tage nach Verabfolgung von 40 mg DÄNA oder in den transplantierten Hepatomen auftritt, wird von einer Änderung der Milchsäurebildung (mit 1 mM Glukose als Substrat) begleitet. Zwei der Primärhepatome machen hierbei allerdings eine Ausnahme. Wird die Glukosekonzentration stark erhöht (100 mM), so daß die Glukokinase an der Phosphorylierung der Glukose mitwirkt, ist jede Veränderung der Glukokinaseaktivität an der gebildeten Milchsäuremenge erkennbar. Der Zusatz von Hefe-Hexokinase (10 mM Glukose+0,2 I. Einheiten Hexokinase) führt bei allen Gewebeüberständen zu einer starken Steigerung der Glykolyse. Hierin kommt nochmals die limitierende Rolle der Hexokinase zum Ausdruck. Die Erhöhung der Phosphofruktokinaseaktivität im Krebsgewebe, die von anderen Autoren [12, 13] schon beschrieben wurde, konnte von uns bestätigt werden*. Die Phosphofruktokinasereaktion scheint den zweiten begrenzenden Schritt für die Glykolyse der Leber und Hepatome darzustellen. Eine Korrelation zwischen Wachstumsrate und Glykolyse war bei einem Vergleich der beiden transplantablen Hepatome nicht feststellbar.

DISKUSSION

Wie aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen hervorgeht, sind alle von uns ermittelten Veränderungen des Stoffwechsels, die vor dem Entstehen der Tumoren nach DÄNA-Applikation auftreten, auf eine unspezifische toxische Wirkung des Kanzerogens zurückzuführen. Dies wird besonders bei einem Vergleich zwischen den Werten nach Einwirken von 40 mg DÄNA und denen der primären Hepatome deutlich. Während am 4. Tag nach einmaliger Kanzerogengabe der Stoffwechsel des Lebergewebes stark verändert ist, sich jedoch einige Wochen später wieder vollständig normalisiert, ist der Verlust organspezifischer Funktionen in den Hepatomen irreversibler Art. In jedem der beiden Fälle liegt diesen Veränderungen eine völlig andere Ursache zugrunde: einmal ist es die reine Konzentrationswirkung des Giftes und zum anderen die Transformation des Gewebes. Sicherlich ist das Auftreten gleichartiger Stoffwechseländerungen als Grund dafür anzusehen, daß noch von vielen Autoren die unspezifische toxische Wirkung einer Substanz als kanzerogene Wirkung angesehen wird.

Die Aktivität nur eines Enzyms jeder Zellfraktion während des Verlaufs der Krebsentstehung zu verfolgen, um hieraus Schlüsse über den intrazellulären Angriffspunkt kanzerogener Noxen abzuleiten, scheint nach unseren Befunden wenig gerechtfertigt zu sein. Ähnlich wie die Verfütterung von 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol [14] wirkt auch DÄNA-Applikation auf jedes der fast ausschließlich bei der Leber im strukturfreien Überstand lokalisierten Enzyme—Arginase, Glukokinase und Hexokinase—verschieden. Dies trifft für die unspezifische toxische wie auch für die transformierende Wirkung des Kanzerogens zu. Die Reversibilität der ermittelten Stoffwechselveränderungen nach Stop der Kanzerogenapplikation stimmt gut mit elektronenmikroskopischen Befunden anderer Verfasser [15] überein, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine weitgehende Normalisierung des Aufbaues der Zellstrukturen beobachten konnten.

Von Reid [16, 17] wird allerdings die Ansicht vertreten, daß die Reversibilität einer Veränderung nach Kanzerogenstop nicht unbedingt etwas über ihre Bedeutung für den Prozeß der Krebsentstehung aussagt, da bereits wenige Zellen in irreversibler Weise verändert sein können, aus denen sich später die Tumoren entwickeln. Dieser Einwand kann nicht völlig entkräftet werden; zur weiteren Klärung dieses Problems könnten histochemische Untersuchungen beitragen. Wir vertreten jedoch die Auffassung, daß der oder die Prozesse, die primär für die Kanzerisierung verantwortlich sind, kurzfristig ablaufen und irreversibel sein müssen. Hierfür spricht auch die Entstehung von Tumoren nach einmaliger oder kurzfristiger Kanzerogenapplikation, ohne daß an derartig betroffenen Geweben innerhalb der Latenzzeit bedeutsame histologische und biochemische Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

Ob der entscheidende Angriffspunkt der Kanzerogene bei den Proteinen oder den Nukleinsäuren der Zelle zu suchen ist, kann noch nicht beantwortet werden. Auch hier ergibt sich wieder die Schwierigkeit, aus einer Vielzahl der beobachteten Reaktionen und Veränderungen [18] die herauszufinden, die für die Krebsentwicklung verantwortlich sind. Trotzdem sind wir der Meinung, daß alle, nach Verabfolgung von kanzerogenen Stoffen auftretenden Veränderungen an Nukleinsäuren und Proteinen auf ihre Reversibilität geprüft werden sollten. Darüber hinaus neigen wir

*noch unpublizierte Ergebnisse

ebenfalls wie Pitot [19, 20] zu der Ansicht, daß das ungehemmte Wachstum der Tumorzelle auf Störungen der hierfür verantwortlichen Kontrollmechanismen beruht und die Suche nach gestörten Enzymregulationen vielleicht am ehesten einen Fortschritt bei der Lösung des Tumorproblems bringt.

RESUME

On a étudié, chez le rat, l'effet d'une administration unique, pérorale, de 40 *mg de diéthylnitrosoamine* (DENA) *et l'effet d'une administration répétée de* 1 *mg de* DENA *par jour (dose totale:* 80 *ou* 130 *mg par rat) sur le taux du glycogène, sur l'activité de l'hexokinase, de la glucokinase, de l'arginase et de la glucose*(6)*-phosphatase, ainsi que sur la glycolyse du foie. On a fait ces études soit immédiatement après l'administration des substances cancérigènes, soit quelques semaines après cette administration. De plus, on a étudié les mêmes paramètres métaboliques dans les hépatomes* DENA *primaires et dans des hépatomes* DENA *transplantés. Les altérations métaboliques, constatées après l'administration unique de* DENA, *ou après son administration répétée, mais avant le développement des hépatomes, étaient, dans une large mesure, réversibles. Ce n'est que dans les hépatomes primaires et dans les hépatomes transplantés que des altérations irréversibles du métabolisme purent être mises en évidence.*

Ces constatations, confirmant les résultats obtenus avec d'autres substances cancérigènes, nous ont amené aux conclusions suivantes:

(1) *De nombreuses altérations métaboliques, observées dans le foie du rat, pendant la précancérose, par les méthodes biochimiques habituelles, semblent n'avoir aucun rapport causal avec la cancérogenèse.*

(2) *Ce n'est qu'après l'élimination complète de toutes les réactions secondaires non spécifiques d'une substance cancérigène administrée qu'il est possible de mettre éventuellement en évidence des altérations spécifiques du métabolisme pendant la cancérogenèse.*

SUMMARY

The effect in rats of one single peroral administration of 40 *mg diethylnitrosamine* (DENA) *as well as of continued administration of* 1 *mg daily of* DENA (*total dose* 80 *or* 130 *mg per rat*), *on the glycogen content, hexokinase, glucokinase, arginase, and G-*6*-Pase activity and on the glycolysis of rat liver has been investigated, both immediately after application of the carcinogenic agent and several weeks after discontinuation of the application. The same metabolic parameters were also determined in primary and transplantable* DENA *hepatomas. Changes in metabolism following single and continued application of* DENA *prior to development of hepatomas were to a large extent reversible. Only in primary and in transplantable hepatomas did metabolic changes prove to be irreversible.*

Based on these and on earlier results obtained with other carcinogenic agents, it is concluded that:

(1) *numerous metabolic changes observed during precancerosis by conventional biochemical methods on the rat liver do not appear to be in causal relationship with the origin of cancer;*

(2) *It is only after complete elimination of all secondary non-specific reactions of the applied carcinogenic agents that one may be able to show specific alterations in metabolism during cancerogenesis.*

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung einer einmaligen peroralen Applikation von 40 *mg Diäthylnitrosamin* (DÄNA) *pro Ratte sowie die Wirkung einer langzeitigen Verabreichung von täglich* 1 *mg* DÄNA (*Gesamtdosis* 80 *bzw.* 130 *mg pro Ratte*) *auf den Glykogengehalt, die Hexokinase-, Glukokinase-, Arginase- und G*6*Pase-Aktivität wie auch auf die Glykolyse der Rattenleber untersucht. Dies erfolgte einmal direkt im Anschluß an die Kanzerogenapplikation, zum anderen mehrere Wochen nach Kanzerogenstop. Außerdem wurden dieselben Stoffwechselparameter in primären und transplantierten* DÄNA-*Hepatomen bestimmt.*

Die nach einmaliger oder langzeitiger Applikation von DÄNA *vor der Entwicklung von Hepatomen ermittelten Veränderungen des Stoffwechsels waren weitgehend reversibel. Nur in primären und transplantierten Hepatomen konnten irreversible Stoffwechselveränderungen nachgewiesen werden.*

Unter Einbeziehung der auch mit anderen Kanzerogenen erhobenen Befunde wird folgende Ansicht vertreten:

(1) *Zahlreiche, während der Präkanzerose mit üblicher biochemischer Methodik an der Rattenleber beobachtete Stoffwechselveränderungen scheinen mit der Krebsentstehung in keinem kausalen Zusammenhang zu stehen.*

(2) *Für den Zeitraum der Kanzerogenese können nur bei vollständiger Eliminierung aller unspezifischen Nebenwirkungen der applizierten Kanzerogene Aussagen über tumorspezifische Veränderungen des Stoffwechsels gemacht werden.*

LITERATUR

1. A. Graffi und H. Bielka, *Probleme der experimentellen Krebsforschung.* Akademische Verlagsges., Leipzig (1959).
2. D. Schmähl, *Enstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren.* Editio Cantor K. G., Aulendorf i. Württ. (1963).
3. U. Consbruch und D. Schmähl, Der Lactoflavingehalt der Leber von Ratten nach Verfütterung mit 4-Dimethylaminoazobenzol. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **290,** 28 (1952).
4. H. Druckrey, F. Bresciani und H. Schneider, Atmung und Glykolyse der Rattenleber während der Behandlung mit 4-Dimethylaminoazobenzol. *Z. Naturforsch.* **13b,** 516 (1958).
5. G. Sydow, Veränderungen im Glukokinase- und Hexokinasegehalt der Rattenleber nach Fasten, während der Carcinogenese sowie in primären und transplantierten Hepatomen. *Acta biol. med. germ.* **13,** 154 (1964).
6. G. Sydow und K.-H. Horn, Der Einfluß von Diäthylnitrosamin auf Glukosephosphorylierende Fermente der Mäuseleber. *Acta biol. med. germ.* **14,** 246 (1965).
7. G. Sydow, Beziehungen zwischen Hexokinaseaktivität und Glykolyse in Rattenleber und Hepatomen. *Z. Naturforsch.* **21b,** 232 (1966).
8. M. A. Swanson, Phosphates of liver—I. Glucose-6-phosphatase. *J. biol. Chem.* **184,** 647 (1950).
9. R. F. Itzhaki and D. M. Gill, A micro-biuret method for estimating proteins. *Analyt. Biochem.* **9,** 401 (1964).
10. M. G. Engel and F. L. Engel, The colorimetric microdetermination of urea nitrogen by the xanthydrol method. *J. biol. Chem.* **167,** 535 (1947).
11. R. M. Sharma, Ch. Sharma, A. J. Donnelly, H. P. Morris and S. Weinhouse, Glucose–ATP Phosphotransferases during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **25,** 193 (1965).
12. R. E. Olson, Oxidation of C^{14}-labeled carbohydrate intermediates in tumor and normal tissue. *Cancer Res.* **11,** 571 (1961).
13. C. E. Shonk, H. P. Morris and G. E. Boxer, Patterns of glycolytic enzymes in rat liver and hepatoma. *Cancer Res.* **25,** 671 (1965).
14. G. Sydow und H. Sydow, Die Wirkung einmaliger bzw. langfristiger Applikation von 3′-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol auf einige Stoffwechselfunktionen der Rattenleber. *Arch. Geschwulstforsch.* **28,** 341 (1967).
15. D. J. Svoboda and J. Higginson, Ultrastructural changes in liver cells during carcinogenesis. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **7,** 70 (1966).
16. E. Reid, Significant-biochemical effects of hepatocarcinogens in rat: A review. *Cancer Res.* **22,** 398 (1962).
17. E. Reid, *Biochemical Approaches to Cancer.* Pergamon Press, Oxford (1965).
18. E. C. Miller and J. A. Miller, Mechanism of chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* **18,** 805 (1966).
19. H. C. Pitot, The regulation of enzyme synthesis and its role in the neoplastic process. *Molekulare Biologie des malignen Wachstums,* Springer-Verlag (1966).
20. H. C. Pitot, Some biochemical aspects of malignancy. *Ann. Rev. Biochem.* **35,** 335 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 511–518. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Preservation of the Leukemogenic Activity and Elimination of Contaminants During Purification of Rauscher Virus

PH. CHENAILLE, A. TAVITIAN and M. BOIRON

Laboratoire d'Hématologie Expérimentale
Institut de Recherches sur les Leucémies, Hôpital Saint-Louis, Paris Xe

INTRODUCTION

SEVERAL methods have been applied to the purification of murine leukemia viruses and particularly to the purification of Rauscher virus. One of the first to be used was differential centrifugation in a potassium citrate buffer [1]. Unfortunately it allows only a partial purification and it is accompanied by a noticeable inactivation of the biological activity of the virus as shown by Ziegel and Rauscher [2] and ourselves [3]. Centrifugation in a density gradient in salt solutions such as Caesium chloride [4, 5] Rubidium chloride [5] potassium citrate and potassium tartrate [5] increases the purity of the virus, but does not prevent its partial inactivation. Centrifugation in a density gradient in non ionic solutions such as polysucrose (Ficoll) [6], polyglucose [6], sucrose [7] seems to be the best method for the preservation of the biological activity of the virus during the purification process.

We purified the Rauscher virus by means of an ultracentrifugation in sucrose [8], followed by centrifugation in a sucrose gradient.

The aim of this work was to determine the fate of the leukemogenic activity of the virus during the course of this purification procedure, and to determine the degree of purification obtained by comparison with other techniques such as precipitation by ammonium sulfate, differential centrifugation in a citrate buffer, centrifugation in a Ficoll gradient.

MATERIAL AND METHODS

(A) *Virus source*

RV was obtained from two sources:

— *Tissue culture grown RV (CRV).* Monolayers of JLS V5 cell line [9, 10], were obtained in casein hydrolysate medium supplemented with 15% calf serum. The supernatant, rich in virus particles, was collected approximately 44 hr after the initiation of the culture. Labeled virus was produced by adding phosphate-free casein hydrolysate medium containing 5 μc of $H_3P^{32}O_4$ per milliliter on to a growing JLS V5 cell layer; the supernatant was collected as above.

— *Mouse plasma RV (MRV).* One month old BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with 0·1 ml of a RV suspension (average titer: 10^4 to 10^5 ED_{50}/ml) and sacrificed 4–5 weeks later. The blood was collected and mixed with a negligible volume of heparin solution in distilled water. Final heparin concentration was 10 to 15 i.u. per milliliter of blood.

(B) *Description of the purification procedure*

It included 3 steps, all carried out at + 4°C:

(1) *Clarification.* Tissue culture supernatant or plasma was first clarified by 3 successive low speed centrifugations: 1200 g for 20 min; 2400 g for 20 min; 10,000 g during 2 min. The supernatant fluid was collected each time.

(2) *Ultracentrifugation in* 0·25 M *sucrose.* The clarified virus suspension was added to an equal volume of a solution containing 0·5 M purified

sucrose buffered with 15×10^{-4} M Tris–HCl, pH 7·2. This mixture was then centrifuged for 90 min at 56,000 g and the virus pellet was resuspended with a teflon pestle homogenizer in 0·5 to 1 ml of a 0·025 M sucrose solution buffered in the same way, i.e. about one hundredth of the initial volume.

(3) *Rate-zonal centrifugation in sucrose.* A 5–20% w/v sucrose gradient (in Tris–HCl) was preformed over 4·5 ml of a 40% sucrose solution; the virus suspension from step 2 was immediately layered and centrifuged 15–40 min at 25,000 rev/min in a Spinco SW 25 rotor. Approximately 60 fractions were collected by puncturing the bottom of the tube.

(C) *Other techniques of purification assayed for comparison*

(1) *Precipitation by ammonium sulfate.* This technique can be performed only when crude RV has been previously cleared of most of the surrounding proteins.

When using CRV, a casein hydrolysate medium supplemented with 0·5% calf serum was added in replacement of the growth medium 20 hr before collection. The supernatant was concentrated ten times in Visking cellophane tubes by dialysis against polyvinyl pyrrolidone. This concentrated fluid was precipitated with an equal volume of saturated $(NH_4)_2SO_4$ solution neutralized with NH_4OH at 0°. The precipitate was collected by low speed centrifugation and resuspended in 1–5 ml of sodium citrate buffer 0·05 M at pH 6·8.

When using MRV, the plasma was filtrated through a 60×5 cm Sephadex G 200 column, the eluent was sodium citrate buffer 0·05 M at pH 6·8. The virus was, as demonstrated by a bioassay, eluted with the external volume of the column after 15 to 20 hr at +4°C, in a volume equal to the initial volume of plasma and was cleared of 80–85% of the plasma proteins. It was subsequently precipitated by ammonium sulfate.

(2) *Differential centrifugation in potassium citrate* 0·153 M. This was performed according to the technique described by Moloney [1].

(3) *Rate-zonal centrifugation in ficoll.* The technique of Oroszlan *et al.* [6] was used.

(D) *Criteria of purification*

(1) *Radioactive contaminants.* For practical convenience, the radioactive contaminants were prepared from cell cultures *in vitro* and added to the CRV.

The principle of this method is based on the assumption that contaminants surrounding CRV are not specific of JLS V5 supernatants but similar to those present in supernatants of other cell cultures. The supernatant of unlabeled JLS V5 cell culture was mixed with the supernatant of mouse embryo fibroblasts (MEF) labeled with P^{33} for a long period of time in order to label all the contaminants. Purification of the mixture was achieved as previously described. The specific activity was determined at each purification step. If one assumes that labeled MEF and unlabeled JLS V5 contaminants are equally eliminated, a decrease in specific activity corresponds to a preferential loss of contaminants as compared to loss of the unlabeled virus pool and assesses the value of the purification procedure.

MEF were prepared in the same way as JLS V5 cell cultures, except that the medium was phosphate-free and contained 10μc of $H_3P^{32}O_4$ per milliliter. Three to four days after completion of the monolayers, the culture fluid was collected and centrifuged twice at 2000 g during 5 min. The supernatant containing the "particulate contaminants" was mixed with an equal volume of unlabeled JLS V5 culture supernatant. The purification was conducted as previously; at each step, aliquots were taken and measured for radioactivity in a Tricarb liquid scintillator. In order to determine the specific activity, the phosphorus content of each sample was determined by the Horecker [11] method adapted to a micro-method in our laboratory.

In addition, to evaluate the capacity of adsorption of mineral phosphates ("soluble contaminants") on the virus, a Tris casein hydrolysate medium plus 10μc/ml of $H_3P^{32}O_4$ was mixed with JLS V5 culture supernatant or leukemic mouse plasma and the purification was conducted as previously described.

(2) *Titrations of RV leukemogenic capacity.* Bioassays were performed by the spleen-weight method [2, 10]. The infective titer (ED 50/0·1 ml) was calculated by the Reed–Muench method. The standard deviation of this method was ± 0·25 to 0·33 log. Titrations were made at each step of purification on the various virus samples diluted to the initial volume of plasma. Titrations were exclusively performed with mouse plasma, since the infectivity of the cultured virus is very low [12].

(3) *Electron microscopy.* The negative staining technique of Brenner and Horne [13] was employed for detecting viruses in each sample examined.

RESULTS

Purification of virus

Rate-zonal centrifugation in sucrose, performed with CRV or MRV previously clarified and ultracentrifuged, showed two bands after

15 min of centrifugation: an upper band with a lower sedimentation rate separated from a bottom band which was located at the interphase between the 40% sucrose solution and the 20–5% w/v density gradient.

These 2 bands were visible to the naked eye when a sufficient amount of virus was employed. Their position was also determined by radioactivity with labeled CRV (Fig. 1).

logically similar and intact leukemic virus particles were seen in both bands.

To compare the density and appreciate the stability of these two bands, their buoyant density was determined separately by an equilibrium centrifugation in preformed 60–15% w/v sucrose gradient. An average buoyant density of 1·175 g/ml was found for both (Fig. 3).

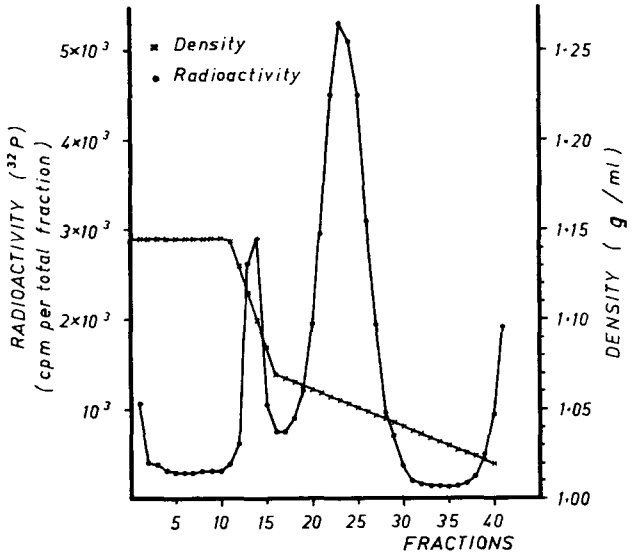


Fig. 1. Rate-zonal centrifugation in sucrose of P^{32} labeled RV extracted from JLS V5 cell culture supernatants and concentrated by ultra centrifugation in sucrose 0·25 M. *Centrifugation in SW* 25 *rotor at* 25,000 *rev/min for* 15 *min.*

When the centrifugation time was extended to 40 min, both bands merged into the interphase (Fig. 2).

There was also some material close to the meniscus which has not been thoroughly investigated and which showed no tendency to migrate.

After dialysis, the two sucrose bands were examined in the electron microscope; morphologically similar and intact leukemic virus particles were seen in both bands.

CRV and MRV gave identical profiles, sedimentation rate and buoyant density.

Elimination of radioactive contaminants

During the two first steps of the purification procedure, most of the contaminants were eliminated, as appreciated by electron microscopy. For that reason measures concerning the elimination of radioactive contaminating material were done only after the second step;

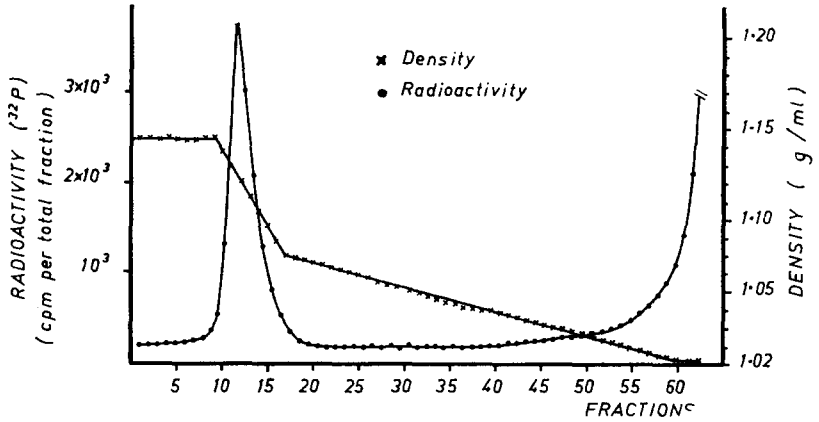


Fig. 2. Rate-zonal centrifugation in sucrose of P^{32} labeled RV extracted from JLS V5 cell culture supernatants and concentrated by ultra centrifugation in sucrose 0·25 M. *Centrifugation in SW* 25 *rotor at* 25,000 *rev/min for* 40 *min.*

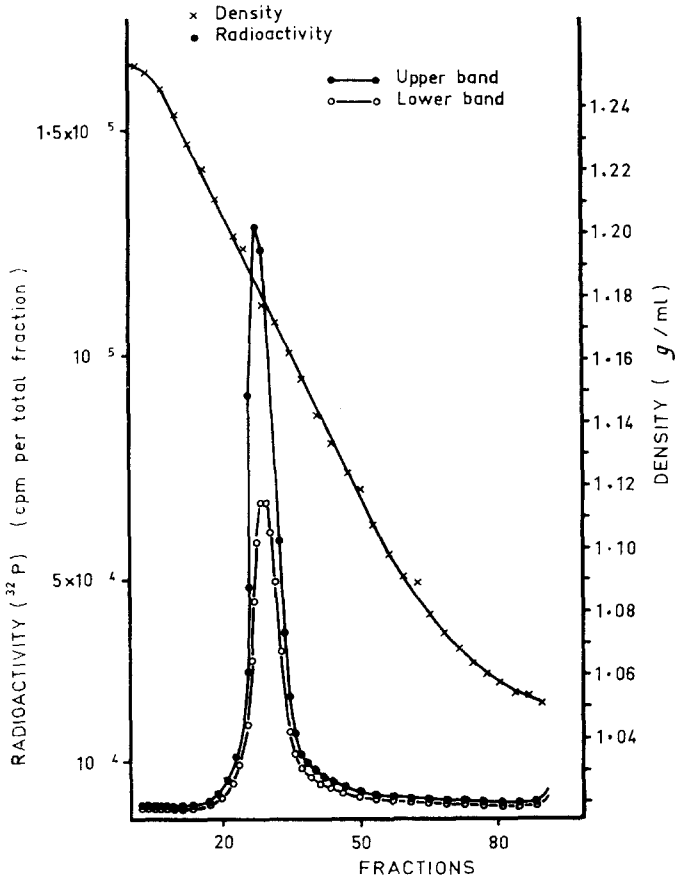


Fig. 3. Relayering of the dialyzed sucrose bands of P^{32} labeled RV in a 60–15 % w/v sucrose density gradient in Tris-HCl and centrifugation at equilibrium (20 hr at 33,000 rev/min in SW 39 Spinco rotor).

so that the value of the criteria for the purification procedure was thus more severe, since we took as 100 the percentage of radioactivity remaining after this step.

Table 1 (experiments 1 and 4) shows that after rate-zonal centrifugation in sucrose the specific activity of the mixture (unlabeled CRV plus labeled contaminants) markedly decreased indicating that 95–98% of the contaminating material present at step 2 of purification

Table 1. Rauscher virus extracted from supernatants of JLS V5 cell cultures BALB/c mouse plasma: elimination of radioactive contaminants occurring after rate-zonal centrifugation in sucrose or Ficoll

Experiments	P^{32} labeled contaminants*	Virus source	Method used for virus concentration	Specific activity (counts/min μg P)			
				Before rate-zonal centrifugation	After rate-zonal centrifugation in sucrose		After rate-zonal centrifugation in Ficoll†
					Upper band	Lower band	
1	SC	CRV	sucrose 0·25 M	950	19	47	
2	SC	CRV	$(NH4)_2SO_4$	20,000	580	570	
3	SC	MRV	sucrose 0·25 M	1,430	57	71	
4	PC	CRV	sucrose 0·25 M	17,000	450	500	700
5	PC	CRV	$(NH4)_2 SO_4$	45,000	1580	3150	1600

*Soluble contaminants (SC), particulate contaminants (PC). For details concerning the contaminants, see material and methods.

†Only the middle band was assayed.

was eliminated. In addition a similar decrease in specific activity occurred whatever "particulate contaminants" or "soluble contaminants" were used. Therefore it may be suggested that the residual contamination was due to an adsorption of small molecules on to the virus membrane, probably adsorbed from the very first purification step. Experiment number 3 indicates that elimination of "soluble contaminants" with MRV is similar to that obtained with CRV.

Appreciation of the leukemogenic potency

Virus leukemogenic activity was determined with infectious MRV (a) before and after ultracentrifugation in 0·25 M sucrose: Table 2

Table 2. *Rauscher virus extracted from BALB/c mouse plasma: conservation of leukemogenic activity after ultracentrifugation in sucrose* 0·25 M

Experiment	Leukemogenic activity (ED 50/0·1 ml)*	
	After clarification	After ultracentrifugation
1	3900	2800
2	4600	5000
3	10,000	10,000

*The volume of each sample submitted to titration was previously adjusted to the original plasma volume with a 0·025 M sucrose solution buffered with 15×10^{-4} Tris–HCl, pH 7·2.

shows that there was no loss of activity during this step. (b) before and after rate-zonal centrifugation in sucrose. The unique band formed after centrifugation for 40 min was titrated. The results of this experiment are presented in Table 3 (experiments 1 and 2) and demonstrate that the leukemogenic activity of RV remains practically unimpaired. Moreover, the two sucrose bands obtained after 15 min of centrifugation were also assayed separately for infectivity. The results of two experiments demonstrate that nearly all the leukemogenic activity was located in the upper band : 1000 and 3150 ED 50/0·1 ml in the upper band as compared to 3 and 1·5 ED 50/0·1 ml in the lower band.

Comparison with results obtained by other techniques

(a) *Differential centrifugation in potassium citrate (Moloney's technique).* Bioassay demonstrated (Table 4) that this technique strongly diminished the leukemogenic activity of MRV.

(b) *Precipitation with ammonium sulfate.* On the contrary, precipitation with ammonium sulfate proved to conserve satisfactorily the leukomogenic activity of MRV (Table 4). The virus thus obtained was submitted to a rate-zonal centrifugation in sucrose and tested for residual radioactive contamination (Table 1, experiments 2 and 5) and leukemogenic activity (Table 3, experiment 3). Results were similar to those obtained when RV was concentrated by ultracentrifugation in 0·25 M sucrose.

(c) *Rate-zonal centrifugation in Ficoll.* RV previously ultracentrifuged in 0·25 M sucrose or precipitated with ammonium sulfate was submitted to a rate-zonal centrifugation in Ficoll and sedimented in three bands, as described by Oroszlan *et al.* [6]. The complete viral particles were concentrated in the middle band as shown by electron microscopy.

Results of titrations performed with the Ficoll middle band are presented in Table 3 and show that there was no loss of activity.

The value of residual contamination is given in table 1 (experiments 4 and 5). The decrease

Table 3. *Rauscher virus extracted from BALB/c mouse plasma: conservation of leukemogenic activity after purification by rate-zonal centrifugation in sucrose or Ficoll*

Experiment	Leukemogenic activity (ED 50/0·1 ml)*		
	Before rate-zonal centrifugation†	After rate-zonal centrifugation in sucrose‡	After rate-zonal centrifugation in Ficoll§
1	5750	5500	5600
2	10,000	10,000	10,000
3	3170	3200	3200

*The volume of each sample submitted to titration was previously adjusted to the original plasma volume with a 0·025 M sucrose solution buffered with 15×10^{-4} Tris–HCL, pH 7·2.

†Experiments 1 and 2 relate to virus concentrated by ultracentrifugation in 0·25 M sucrose. Experiment 3 relates to virus precipitated by ammonium sulfate.

‡Centrifugation for 40 min at 25,000 rpm.

§Titration relates to the middle band alone.

Table 4. Rauscher virus extracted from BALB/c mouse plasma: leukemogenic activity after precipitation by ammonium sulfate or ultracentrifugation in potassium citrate

Experiment	Leukemogenic activity (ED_{50}/0·1 ml*)	
	Clarified plasma	The same after gel filtration on sephadex and precipitation by ammonium sulfate
1	300	270
2	10,000	9900
3	1100	1000
		The same after ultracentrifugation (90 min at 56,000 *g*)
4	720	45
5	1500	70
6	4800	800
7	4800	750
8	13,500	1260
9	1200	75

*The volume of each sample submitted to titration was previously adjusted to the original plasma volume with sodium citrate buffer, 0·05 M, pH 6·8.

in specific activity was about the same as that obtained after rate centrifugation in sucrose.

DISCUSSION

The purification of Rauscher virus in sucrose allows the preservation of nearly the entire biological activity of the virus. It discards the major part (95–98%) of cellular contaminants labeled with P^{32} and attached to the viral particle.

It should be noted that in the present study, the biological activity was determined on MRV and the elimination of contaminants appreciated on CRV. However, it seems reasonable to extend to MRV the results which were obtained with CRV and *vice versa,* since, except for the leukemogenic potential, the identity of RV from both *in vivo* and *in vitro* sources, has been demonstrated by several reports, dealing with the morphology in the electron microscope [2, 12], the buoyant density in CsCl [4] and in sucrose (present work) the sedimentation rate (present work), and the characteristics of the RNA [7].

The value of the method of purification of Rauscher virus in a sucrose solution, which was already emphasized by Oroszlan *et al.* [6] and Duesberg *et al.* [7] is fully confirmed by the present study.

The other purification methods seem to be less satisfactory.

Differential centrifugation in potassium citrate according to Moloney's method inactivates most of the virus. This inactivation seems to result from the virus concentration by high speed centrifugation in salt solutions, for it is not observed when the virus is exposed to potassium citrate without ultracentrifugation [15], whereas ultracentrifugation in non ionic solutions does not significantly affect the virus infectivity.

Precipitation by ammonium sulfate, although conserving entirely the leukemogenic activity of the virus, has some drawbacks, since it needs long and elaborate operations due to the fact that it requires a virus suspension poor in proteins which would otherwise precipitate with the virus. Rate-zonal centrifugation in Ficoll brings about a satisfactory purification of RV, as already emphasized by Oroszlan *et al.* [6] but, in our opinion, appears less convenient than sucrose gradient: it cannot be submitted to dialysis and the virus band obtained cannot be examined directly in the electron microscope unless it is diluted and recentrifuged again in order to obtain a viral pellet free of polymer. Moreover, Ficoll solutions adsorb u.v. light waves and prevent optical density measurements. In addition, it can be pointed out that sucrose gradient gives a sharp resolution of the RV bands in a shorter period of time, since 15 min is sufficient to obtain a good separation of the active virus particles.

An interesting data brought about in the present study is that the two virus bands obtained by rate centrifugation in sucrose contain a similar concentration of apparently intact virions when examined in the electron microscope. However according to the bioassay, the upper virus band alone is infective. With respect to this technique, infective and non infective virus particles would have different sedimentation rates. On the contrary, they occupy a single position after equilibrium centrifugation in sucrose. The density of the two virus populations being the same, the particles may differ with regard to size or shape. Further investigations are necessary to clear up that fact.

Concerning the virus purity test, one can assume that radioactive contamination on the virus band was probably due to an adsorption of mineral phosphates into the virus, since the percentage of residual contamination persisting after the last purification step was almost the same when "particulate contaminants" or "soluble contaminants" were used. It appears

that complete RV purification cannot be achieved by the usual centrifugation technique. Other methods based on different principles, such as electrophoresis, may be useful for solving this problem.

Acknowledgements — We are grateful to Mrs. M. Gobet for her apt technical assistance.

This investigation was supported by contact CR/66-218 from "Action concentrée Cancers et Leucémies" of "Institut National de la Santé et de la Recherche Medicalé".

RESUME

Le virus leucémique de Rauscher, extrait du plasma de souris leucémiques BALB/c ou de surnageant de la lignée JLS V5 chroniquement infectée par ce virus, a été purifié par trois centrifugations à faible vitesse, suivies par une ultra-centrifugation en sucrose 0,25 M, *et finalement par une centrifugation en gradient de sucrose. A la suite de ces opérations, le pouvoir leucémogène du virus était presque entièrement préservé (perte de* 1 *à* 2%), *et environ* 95–98% *des contaminants cellulaires marqués par le* 32 *P étaient éliminés. Des deux bandes virales obtenues dans le gradient sucrose, la supérieure seule s'est montrée infectieuse. La contamination résiduelle a été prouvée comme due principalement à une adsorption sur la coque virale de phosphates minéraux.*

La valeur de cette méthode a été comparée à celle d'autres procédés de purification (centrifugation différentielle en citrate de potassium, précipitation par le sulfate d'ammonium, centrifugation en gradient de Ficoll).

SUMMARY

Rauscher murine leukemia virus (RV) extracted from leukemic BALB/c mouse plasma or JLS V5 cell culture supernatants was purified by three low speed centrifugations, followed by ultracentrifugation in sucrose 0·25 M *and finally rate-zonal centrifugation in sucrose. At the end of this purification procedure, the leukemogenic activity was almost entirely preserved (loss of* 1 *to* 2%) *and about* 95–98% *of the radioactive contaminants were eliminated. Two viral bands were obtained by rate centrifugation in sucrose; the upper one was only infective. The residual contamination was proved to be mainly due to an adsorption of mineral phosphates.*

The value of this method was compared with other purification procedures (differential centrifugation in potassium citrate, precipitation by ammonium sulfate, rate-zonal centrifugation in Ficoll).

ZUSAMMENFASSUNG

Aus leukämischem BALB/c Mausplasma oder aus JLS V5-Zellkulturüberstand extrahiertes Rauschersches Mäuseleukämievirus wurde durch dreimaliges Zentrifugieren bei niedriger Drehzahl gereinigt. Es folgte eine Ultrazentrifugation in Sucrose 0,25 M *und schliesslich zonales Sedimentieren in einem Sucrose-gradienten. Im Anschluss an diese Reinigung war die leukämogene Aktivität noch fast vollständig erhalten (nur* 1–2% *Verlust); 95–98% der radioaktiven Verunreinigungen waren eliminiert. Durch die zonale Zentrifugation in Sucrose wurden zwei virale Streifen erhalten, wovon nur der obere infektiös war. Die verbleibenden Verunreinigungen bestanden hauptsächlich aus einer Absorption mineraler Phosphate.*

Der Wert dieser Methode wurde mit anderen Reinigungsverfahren verglichen (Differenzialzentrifugieren in Kaliumzitratlösung, Ausfällung durch Ammoniumsulfat, zonales Zentrifugieren in Ficoll Lösung).

REFERENCES

1. J. B. Moloney, Biological studies on a lymphoïd-leukemia virus extracted from sarcoma 37 — I. Origin and introductory investigations. *J. nat. Cancer Inst.* **24,** 933 (1960).
2. R. F. Zeigel and F. J. Rauscher, Electron microscopic and bioassay studies on a murine leukemia virus (Rauscher) — I. Effects of physicochemical treatments on the morphology and biological activity of the virus. *J. nat. Cancer Inst.* **32,** 1277 (1964).

3. J. P. Levy, S. Oppenheim, P. Chenaille, D. Silvestre, A. Tavitian and M. Boiron, Quantitative study of Rauscher virus inactivation by different physical and chemical agents. *J. nat. Cancer Inst.* **38,** 553 (1967).
4. P. Chenaille, J. P. Levy, M. Boiron and J. Bernard, Isolement du virus de la leucémie murine de Rauscher dans un gradient de densité de chlorure de césium. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **258,** 3129 (1964).
5. T. E. O'Connor, F. J. Rauscher and R. F. Zeigel, Density gradient centrifugation of a murine leukemia virus. *Science* **144,** 1144 (1964).
6. S. Oroszlan, L. W. Johns and M. A. Rich, Ultracentrifugation of a murine leukemia virus in polymer density gradient. *Virology* **26,** 638 (1965).
7. P. H. Duesberg and W. S. Robinson, Nucléic acid and proteins isolated from the Rauscher mouse leukemia virus (MLV). *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **55,** 219 (1966).
8. P. Chenaille, J. P. Levy, A. Tavitian and M. Boiron, A routine method for concentration and partial purification of a murine leukaemia virus (Rauscher). *Nature, (Lond.)* **213,** 107 (1967).
9. B. S. Wright and J. C. Lasfargues, Multiplication of the Rauscher leukemia virus in a mixed culture of mouse spleen and thymus cells. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **5,** 70 (1964).
10. C. Bernard, D. Silvestre, J. Tanzer, J. Peries and M. Boiron, Analyse d'une lignée cellulaire produisant de façon continue le virus leucémique de Rauscher *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **40,** 513 (1965).
11. B. L. Horecker, T. S. Ma and E. Haas, Note on the determination of microquantities of organic phosphorus. *J. biol. Chem.* **136,** 775 (1940).
12. J. P. Levy, D. Silvestre, J. C. Leclerc and M. Boiron, Quantitative electron microscope investigations on Rauscher virus. *Virology* **29,** 681 (1966).
13. S. Brenner and R. W. Horne, A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **34,** 103 (1959).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 519–530. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Epidermal Cell Population Kinetics after a Single Application of some Hyperplasia-producing Substances

KJELL ELGJO

Institutt for generell og eksperimentell patologi, Universitetet i Oslo, Norway

INTRODUCTION

BOTH the growth of the normal epidermis [1–7] and the early changes observed after a single application of carcinogenic and non-carcinogenic hyperplasia-producing substances to the skin [8, 9] can be explained by assuming a negative feedback mechanism to be the basic regulatory principle of the growth of the epidermal cell population. The latter investigations, however, have been confined to the early changes only, and little is known about the growth of the epidermal cell population during the remaining period of the process of cancerization. The aim of the present study is to follow different growth parameters in the epidermal cell population for a prolonged period of time after a single application of some hyperplasia-producing agents.

Three different growth parameters have been followed, i.e. the mitotic count, the mitotic rate, and the mitotic duration. These terms are often used with different meanings by various authors. In this paper the following definitions will be used:

Mitotic count: the number of mitoses observed microscopically per unit length of the interfollicular epidermis in paraffin sections.

Mitotic rate: the number of cells arrested in mitosis by Colcemid per unit length of the interfollicular epidermis per unit time, which is here considered to represent the number of cells that enter into mitosis per unit time per unit length.

Mitotic duration: (mitotic count/mitotic rate) as defined above. This estimate is considered to represent the average time spent in visible mitosis.

MATERIALS

Hairless mice (hr/hr) of both sexes were used in all experiments. The mice and the histology of their skin have been described by several authors [8, 10–12]. The animals used in the experiments were about 3-months-old at the start of the experiments.

Three different compounds were used as hyperplasia-producing agents, i.e. benzene, cantharidin, and 20-methylcholanthrene. Benzene alone is not tumorigenic when applied to the skin, but slight hyperplasia can usually be observed after a single application. Cantharidin has no carcinogenic effects on the skin, but a single application of solutions with a concentration of 0·063% or more is followed by increased cell loss and hyperplasia [9]. In the present study a solution of 0·063% cantharidin in benzene was used. 20-methylcholanthrene is a hydrocarbon and a complete carcinogen which has been extensively tested [13, 14]. In the present study a solution of 1% methylcholanthrene in benzene was used. Such a single application provokes tumours in about 30% of hairless mice after a delay of 10 months or more.

METHOD

The compounds were applied by means of a special pair of forceps, as described by Iversen [15]. This is an instrument with a square metal frame measuring 10×20 mm at the end of one branch, and with a rubber sponge at the other. A flap of the skin is kept between the metal square and the sponge and the compounds are applied to the area of skin confined within the metal frame. Six drops (0·03 ml) of the various agents were applied. The area thus treated was marked with Indian ink. Mitoses were counted in 40 successive microscope vision fields with objective 100 and eye-piece 8, avoiding vision fields with hair follicles and keratin-filled cysts. With this magnification 40 microscope vision fields correspond to 6 mm epidermis. The reasons for counting mitoses in this way have been discussed in another paper [16]. To estimate the mitotic rate and the mitotic duration the stathmokinetic method was chosen, using Colcemid "CIBA" as the stathmokinetic agent.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Groups of 8 mice were used in all experiments. Four of the mice were injected at 8.30 a.m. with 0·1 Colcemid intraperitoneally and killed 4 hr later. Of the remaining 4 animals, two were killed simultaneously with the injection of Colcemid, the other two 4 hr later. After killing the animals by neck fracture the skin was immediately flayed off, spread on a frame of cardboard, and fixed in Bouin's solution. After fixation and dehydration the specimens were embedded in paraffin, cut in sections of 5–7μ and stained with Celestine blue—Mayers haemalum.

EXPERIMENTS AND RESULTS

(*A*) *Unpainted animals.* The reliability of the method in unpainted mice was tested by using 25 groups of 8 mice. The results were as follows (for further details, see ref. 16):

(1) Animals without Colcemid: Mean number of mitoses per 6 mm interfollicular epidermis: $6 \cdot 74 \pm 1 \cdot 29$.

(2) Animals killed 4 hr after injection of Colcemid: Mean number of mitosis per 6 mm interfollicular epidermis: $25 \cdot 22 \pm 3 \cdot 66$.

(3) Mitotic rate per 6 mm interfollicular epidermis per hour: $6 \cdot 36 \pm 1 \cdot 19$.

(4) Mitotic duration (hr): $1 \cdot 07 \pm 0 \cdot 016$.

(*B*) *Benzene.* All animals were treated with 6 drops of benzene on the right side of the back. Groups of 8 mice were killed at the following time period: 1–5, 5–9, and 9–13 hr after the application (i.e. Colcemid was injected 1, 5, and 9 hr after the application and the respective groups killed 4 hr later), and 1, 2, 3, 4, 7, 9, and 13 days, and 3, 4, and 5 weeks after the application.

The results are shown in Table 1, and in Figs. 1 and 2. The application provoked an initial, but small, rise in the mitotic rate, reaching a maximum about 11–13 hr after the application. The initial reaction was followed by a period of about 9 days of increased mitotic duration. This period corresponded approximately to the time during which the epidermis was hyperplastic. During the rest of the period the mitotic rate and the mitotic count remained within the normal range, whereas the mitotic duration was slightly shorter than normal by the 3rd and the 4th week.

Table 1. *Single application of* 6 *drops of benzene*

Time after application	Mean mitotic count without colcemid	SD of the mean	Mean mitotic count after colcemid	SD of the mean	Mitotic rate	Mitotic duration
1–5 hr	5·75	4·40	34·00	16·03	8·50	0·68
5–9 hr	6·00	2·94	37·75	8·29	9·44	0·64
9–13 hr	9·00	3·37	52·25	3·86	13·06	0·69
1 day	11·25	4·03	19·75	6·08	4·94	2·28
2 days	7·00	2·94	17·25	9·48	4·31	1·62
3 days	6·25	2·36	12·25	0·50	3·06	2·04
4 days	10·25	2·63	22·50	10·08	5·63	1·82
7 days	11·75	2·87	25·50	2·83	6·38	1·84
9 days	8·25	1·26	28·50	7·77	7·13	1·16
13 days	6·75	1·71	25·50	6·61	6·38	1·06
3 weeks	8·25	3·30	33·25	8·31	5·56	0·99
4 weeks	7·75	2·63	31·25	4·79	7·81	0·99
5 weeks	7·00	4·69	27·00	15·94	6·75	1·04

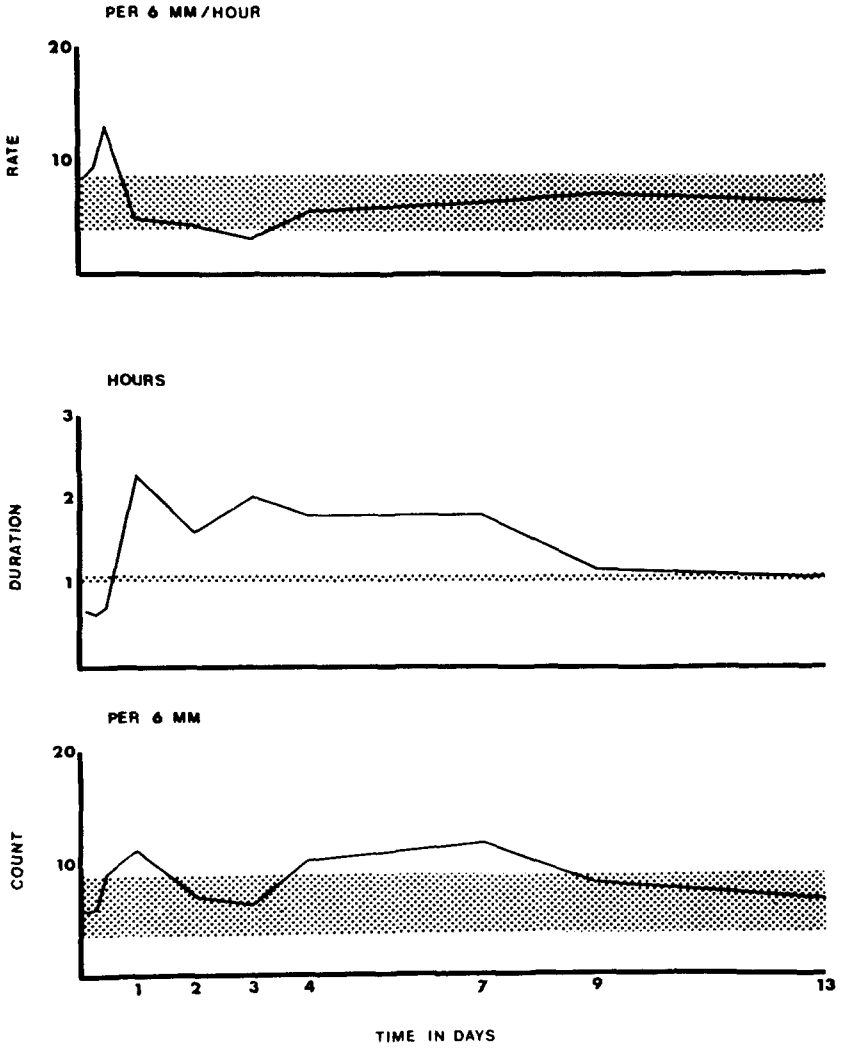


Fig. 1. *The mitotic rate, duration, and count during the first* 13 *days after a single application of benzene. The dotted areas represent* ± 2 *standard errors of the method.*

(C) *Cantharidin.* The animals were treated with 6 drops of 0·063% cantharidin in benzene on the right side of the back. Groups of 8 mice were killed at the following time periods: 1–5, 5–9, and 9–13 hr, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, and 14 days, and 3, 5, 6, and 7 weeks after the application. The results are shown in Table 2, and in Figs. 3 and 4. The application of cantharidin provoked an initial rise in the mitotic rate which attained a maximum 2 days after the application. This reaction was followed by a period of about 14 days of prolonged mitotic duration. This period corresponded approximately to the time during which the epidermis was hyperplastic. After this time the mitotic rate and the mitotic count were within the normal range, whereas the mitotic duration was slightly prolonged by the 5th week.

(D) *Methylcholanthrene.* The animals were treated with 6 drops of 1% methylcholanthrene in benzene on the right side of the back. Groups of 8 mice were killed at the following time periods: 1–5, 5–9, and 9–13 hr, 1, 2, 3, 5, 7, 9, and 11 days, and 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 25, and 27 weeks after the application.

The results are shown in Table 3, and in Figs. 5 and 6. The application of methylcholanthrene was followed by a blockage of the cell divisions lasting for about 12 hr. The period of blocking was followed by a rise in the mitotic rate, attaining a maximum 2 days after the application. This first rise in the mitotic rate was followed by another rise about 5 days later, and by a third, but small, rise about 14 days after the application. After the 2nd week the mitotic rate remained within normal limits. The periods of increased mitotic rates were accompanied by relative decreases in the mitotic duration, but except for a short period 14 days after the application the mitotic duration was continually longer than

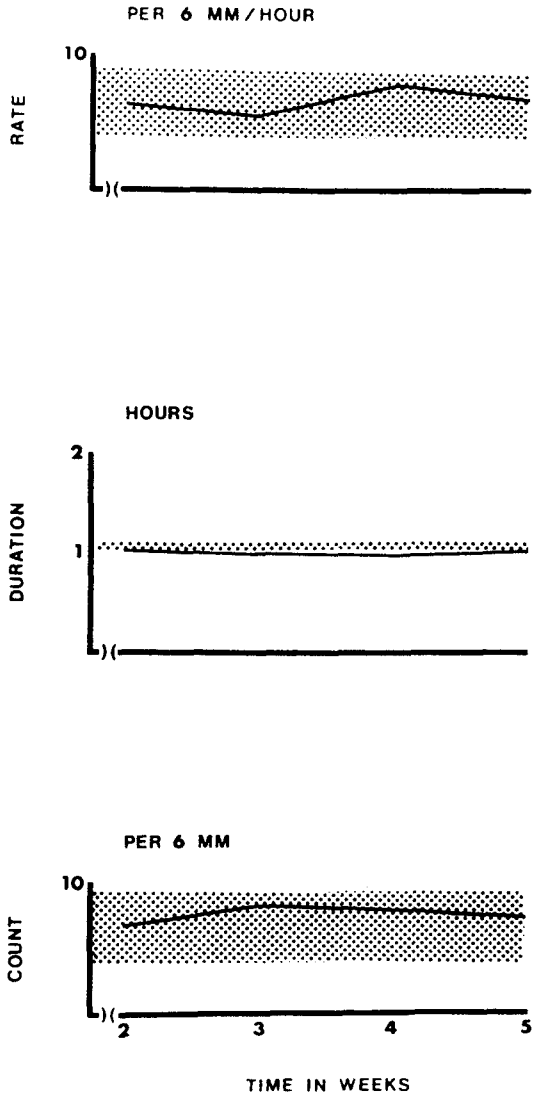


Fig. 2. The mitotic rate, duration, and count from the 3rd to the 5th week inclusive, after a single application of benzene. The dotted areas represent ± 2 *standard errors of the method.*

Table 2. Single application of 6 drops of 0·063% *cantharidin in benzene*

Time after application	Mean mitotic count without colcemid	S.D. of the mean	Mean mitotic count after colcemid	S.D of the mean	Mitotic rate	Mitotic duration
1–5 hr	9·75	10·69	21·00	10·86	5·25	1·86
5–9 hr	9·00	2·71	20·00	4·90	5·00	1·80
9–13 hr	14·75	2·99	35·75	10·56	8·94	1·65
1 day	13·75	7·93	45·50	14·06	11·38	1·21
2 days	11·25	3·78	63·25	20·76	15·81	0·71
3 days	16·25	6·18	51·25	14·03	12·81	1·27
5 days	8·75	4·27	32·25	9·78	8·06	1·09
7 days	9·75	1·26	27·25	3·59	6·81	1·43
9 days	6·75	0·50	17·25	2·50	4·31	1·57
11 days	6·25	1·26	19·25	6·65	4·81	1·30
14 days	8·25	2·57	32·50	2·08	8·13	1·02
3 weeks	7·50	3·11	27·75	3·50	6·94	1·08
5 weeks	7·50	1·29	23·00	4·16	5·75	1·30
6 weeks	7·25	2·36	23·75	4·11	6·44	1·13
7 weeks	6·00	1·00	21·00	3·56	5·25	1·14

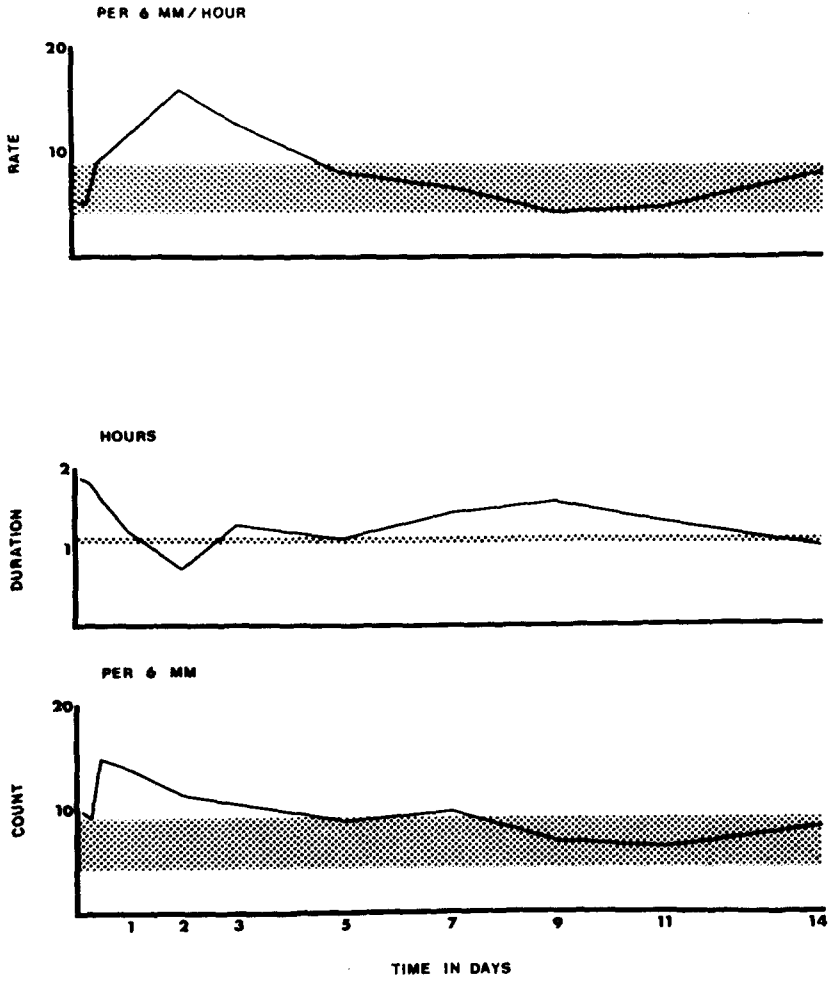


Fig. 3. *The mitotic rate, duration, and count during the first days after a single application of cantharidin in benzene. The dotted areas represent* ± 2 *standard errors of the method.*

Table 3. *Single application of* 6 *drops of* 1% *methylcholanthrene in benzene*

Time after application	Mean mitotic count without colcemid	S.D. of mean	Mean mitotic count after colcemid	S.D. of mean	Mitotic rate	Mitotic duration
1–5 hr	2·75	2·22	10·50	2·08	2·63	1·05
5–9 hr	5·00	1·83	12·75	5·19	3·19	1·57
9–13 hr	8·25	3·78	12·25	0·96	3·06	2·70
1 day	8·75	4·98	31·50	12·04	7·88	1·11
2 days	19·50	2·38	65·00	4·69	16·25	1·20
3 days	21·50	4·27	43·25	9·25	10·81	1·99
5 days	19·00	3·16	37·25	6·90	9·31	2·04
7 days	13·00	4·16	51·75	12·01	12·93	1·01
9 days	11·50	2·00	21·50	8·39	5·38	2·14
11 days	9·50	2·88	21·00	2·83	5·25	1·81
14 days	8·75	1·89	36·35	17·56	9·06	0·97
3 weeks	13·00	1·41	33·50	7·59	8·38	1·55
4 weeks	8·25	1·89	20·25	6·45	5·06	1·63
5 weeks	9·25	4·72	23·00	6·16	5·75	1·61
6 weeks	7·25	2·22	22·25	4·03	5·56	1·30
7 weeks	10·00	5·23	25·25	9·19	6·31	1·58
8 weeks	8·75	0·50	32·50	4·66	8·12	1·08
9 weeks	10·25	5·74	24·00	8·17	6·00	1·71
10 weeks	6·00	1·41	23·00	3·19	5·75	1·04
11 weeks	6·25	4·89	21·50	1·92	5·38	1·16
25 weeks	6·50	1·29	26·50	3·00	6·63	0·98
27 weeks	6·50	0·57	26·50	6·91	6·63	0·98

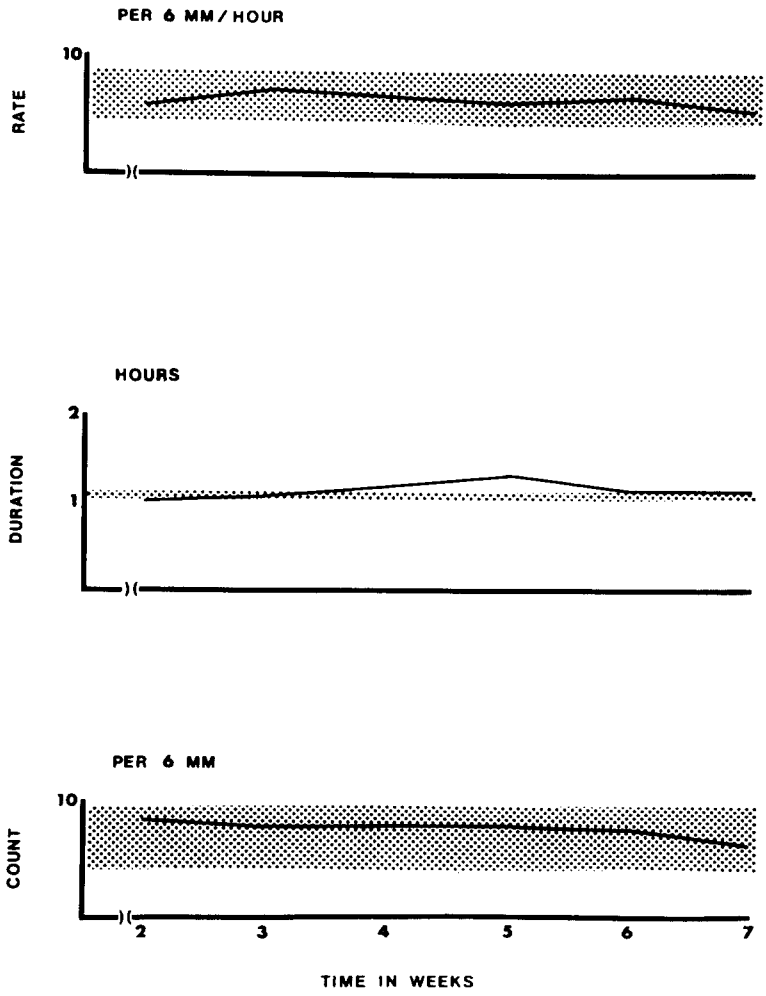


Fig. 4. The mitotic rate, duration, and count from the 3rd to the 7th week inclusive after a single application of cantharidin in benzene. The dotted areas represent ±2 standard errors of the method.

normal for about 11 weeks. The period of prolonged mitotic duration thus lasted much longer than the epidermal hyperplasia.

COMMENTS ON THE METHOD

The mitotic rate has been estimated by means of the equation: $R=C/t$, where R is the average mitotic rate, and C the number of arrested mitoses t hr after the injection of the Colcemid.

The number of mitosis observed in the epidermis of mice not injected with Colcemid, is a product of the mitotic rate and the mitotic duration. Hence, the mitotic duration can be calculated by means of the equation: $D=M/R$, where D is the mitotic duration, M the mitotic count, and R the mitotic rate.

The theoretical foundations of these equations [17] and their practical applications in biology have been discussed by several investigators [16, 18, 19, 20, 21]. The method should be used with precaution, especially in periods of rapid growth. Several conditions must be fulfilled to give the equations a precise meaning [18]. In this study, the method has been controlled at different times during the experiments (for further details and discussion, see ref. 16). It was found that the method can be used, but the interpretation of the results can only be tentative when the variations in the rate of cell proliferation is rapid, e.g. immediately after the application of the agents.

DISCUSSION

Iversen and Evensen [8] and Iversen and Bjerknes [4] have shown that a sudden cell loss followed by a compensatory increase in the cell proliferation can fully explain the transient epidermal hyperplasia observed after a single application of hyperplasia-producing agents to the mouse skin. These investigations give indirect evidence for the concept of growth regulation by means of a negative feedback mechanism, as suggested by Weiss and Kavanau [22]. This concept has naturally led to a search for specific substances capable of

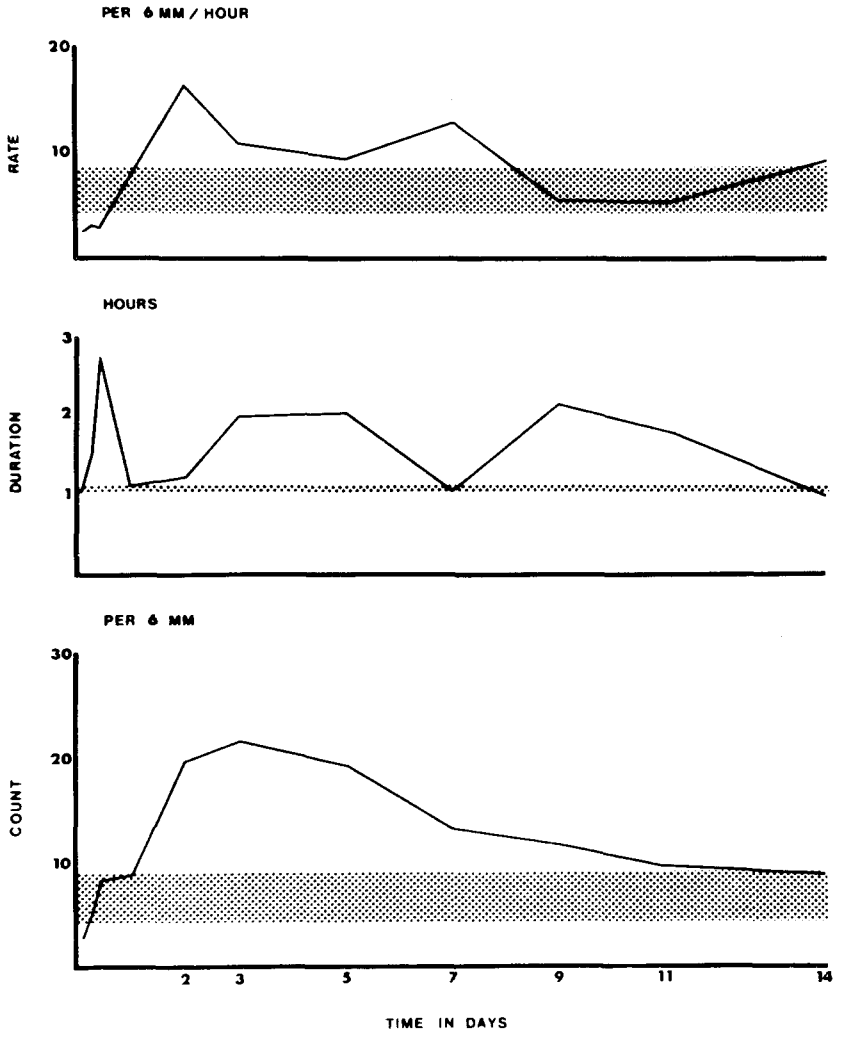


Fig. 5. The mitotic rate, duration, and count during the first 14 days after a single application of 1% methylcholanthrene in benzene. The dotted areas represent ±2 standard errors of the method.

governing the rate of cell proliferation by inhibition. Such inhibiting factors have been demonstrated in the liver and the kidney [23], and in the epidermis, [24]. Later work has shown that the inhibiting factor in the epidermis, named chalone by Bullough [24], is tissue-specific, but species-unspecific [5, 7, 25, 26]. Most probably the epidermal chalone is produced in the differentiating cells, but it is not known yet to which extent and in which way the production of chalone(s) is connected with the process of differentiation. The growth-regulating control system proposed by Weiss and Kavanau [22] is a closed circuit, in which the basal cells, the differentiating cells, and the chalone are the interdependent constituents. The regulatory mechanism in such cybernetic systems can be of various kinds. The control can be of a proportional, derivative, or integral type. The difference between these types of controls has been succinctly explained by Iversen and Bjerknes [4]:

> In a system with proportional feedback, the strength of the feedback signal is directly proportional to the output value. In a system with derivative feedback, the strength of the feedback signal is dependent on the velocity of the variations in the output. In a system with integral feedback, the strength of the feedback signal depends upon the summation of the output during a certain time interval.

The mitotic rate. In the experiments presented in this paper the mitotic rate was considerably increased shortly after application of any of the 3 agents. After application of benzene the rise in the mitotic rate began as early as 4 hr after the treatment and reached a maximum value within 12 hr, whereafter it rapidly dropped to values below the normal limits by the 3rd day. During the rest of the experimental period the mitotic rate remained within the normal range.

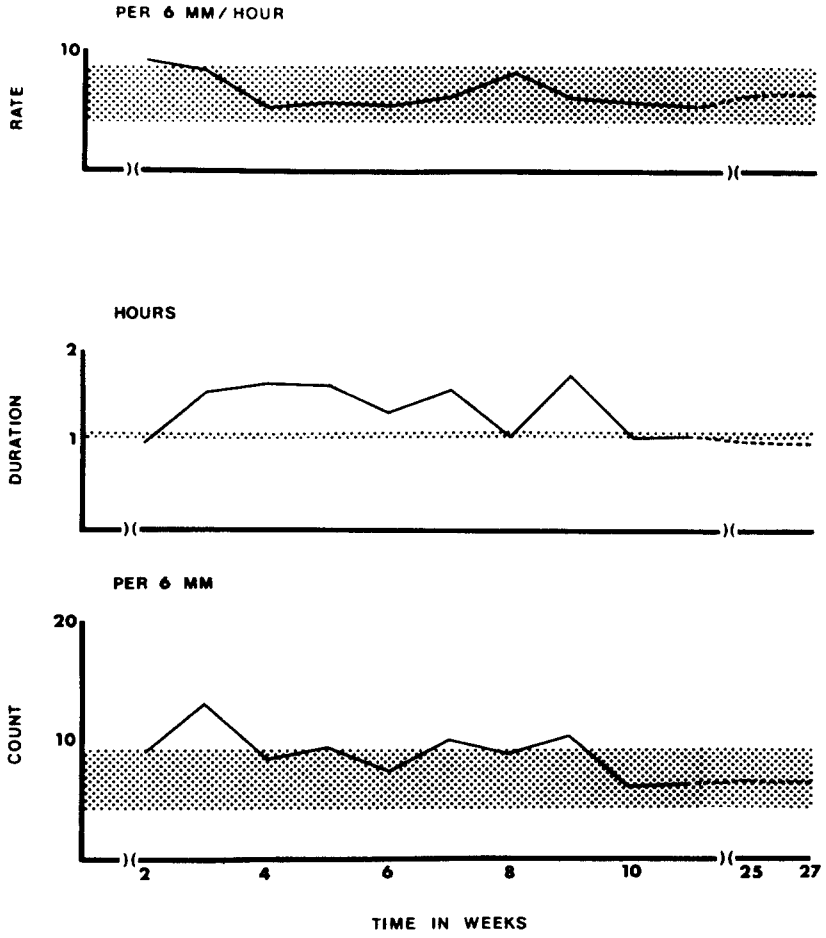


Fig. 6. *The mitotic rate, duration, and count from the 3rd to the 27th week inclusive, after a single application of* 1% *methylcholanthrene in benzene. The dotted areas represent* ± 2 *standard errors of the method.*

After application of cantharidin the rise in the mitotic rate started after about 9 hr. It then went up to values 3 times the normal 2 days after the application. The subsequent decrease of the mitotic rate proceeded slowly for about 5 days, whereafter it remained within the normal range for the rest of the experimental period.

The blockage of the cell divisions after application of methylcholanthrene lasted for about 12 hr. This blockage thus lasted longer than that observed after some unspecific injury [26]. After the blockage the mitotic rate increased to values 3 times the normal by the 2nd day. The subsequent decrease in the mitotic rate was interrupted by a second increase on the 7th day, and by a small increase 14 days after the application.

The transient rise in the mitotic rate found after application of any of the 3 agents is suggestive of a regenerative reaction compensating for a sudden cell loss. The findings thus confirm the observations made by Iversen and Evensen [8]. From a cybernetic point of view the variations in the mitotic rate can be looked upon as damped oscillations in a closed control system with negative feedback. After application of benzene or cantharidin the oscillations were short-lived. After application of methylcholanthrene they were fairly long-lasting, as the mitotic rate was not within the normal range until about 2 weeks after the treatment.

The mitotic duration. The variations in the mitotic duration are more difficult to interpret. The mitotic duration found during the blockage of the cell divisions after application of methylcholanthrene was estimated to be about 1 hr. This value is nonsensical, as all mitoses in the basal cells were blocked at that time. However, the mitotic duration during this time interval was calculated from a very low mitotic rate and a still lower mitotic count, and it should probably be disregarded. Evensen [8] found that the mitotic duration was "infinite"

during the blockage provoked by methylcholanthrene, and this observation is more in conformity with the actual situation.

After application of benzene or cantharidin the period of increased mitotic duration coincided with the period during which the epidermis was hyperplastic. This prolonged mitotic duration can possibly be related to an increased concentration of chalone in the basal layer as a consequence of the increased number of differentiating cells. Thus Bullough and Laurence [27] have found that the presence of high concentrations of extracted epidermal chalone prolong the mitotic duration in the epidermal cell population. This hypothesis does not, however, explain the remarkably long-lasting prolongation of the mitotic duration after application of methylcholanthrene, as the period of increased mitotic duration lasted much longer than the epidermal hyperplasia.

The mitotic count. It is evident that this parameter gives very inaccurate information about the rate of cell proliferation, as the mitotic count is a function of both the mitotic rate and the mitotic duration. Only when the mitotic duration is about normal for a prolonged period of time can the mitotic count give reliable information about the mitotic rate [28]. This observation may account for some of the inconsistencies between earlier works concerning the reaction of the epidermal cell population after application of hyperplasia-producing agents [29–34].

Relationship between mitotic rate and mitotic duration. Apart from the period of blockage observed after application of methycholanthrene, there seemed to exist an inverse relationship between the mitotic rate and the mitotic duration during the first two weeks after application of any of the agents. After treatment with benzene or cantharidin, the mitotic duration was significantly shorter than normal during the periods of increased mitotic rate. After application of methylcholanthrene, however, the mitotic duration decreased only relatively during the periods of increasing mitotic rate.

Even in other regenerating or growing tissues and organs [20, 21, 35] a certain inverse relationship between the mitotic duration and the mitotic rate can be perceived. The findings presented in this study suggest that this need not imply some simple linear inverse relationship between these two parameters, each mitotic rate having its corresponding mitotic duration, but rather that the control systems can be different for the two parameters. Variations in the mitotic rate were only observed immediately after the application. It is therefore possible that this parameter is regulated by a derivative feedback principle. The mitotic duration, on the other hand, apparently responded both with absolute or relative decreases during the initial period, when the relative number of differentiating cells were decreased, and with an increase during the period of epidermal hyperplasia. Accordingly, the mitotic duration appears to be regulated by a proportional feedback principle. This hypothesis might explain why the inverse relationship between these two parameters can be perceived only during periods of varying mitotic rates.

None of the hypotheses considered above account for the long period of increased mitotic duration found after the application of methylcholanthrene. It might be possible that this phenomenon can be related to some disturbance of the maturation of the differentiating cells, as suggested by several authors [31, 33, 34, 36], or to an altered sensitivity to Colcemid [37]. It is also possible that changes in the dermis induced by the carcinogen can be of importance for the population kinetics of the epidermal cell population [38–40]. Thus, the long-lasting prolongation of the mitotic duration after application of methycholanthrene can be conceived of in many ways. The fact remains that the enduring effect of methylcholanthrene on the mitotic duration cannot be easily understood only by the concept of a regenerative reaction in an epidermal cell population functioning as a cybernetic system. Some more fundamental changes are probably involved.

Concluding remarks. The response of the epidermal cell population to a single application of benzene or cantharidin is compatible with a simple regenerative reaction and can well be explained in terms of cybernetics. This applies also to the initial reaction after application of methycholanthrene, while the later variations of the growth parameters, after application of this agent, cannot readily be explained in this way. Some other mechanisms appear to be involved. The experiments suggest that some inverse relationship exists between the mitotic rate and the mitotic duration. Furthermore, the findings indicate that the mitotic rate may be regulated mainly by a derivative type, and the mitotic duration by a proportional type of negative feedback control.

RESUME

On a examiné les effets initiaux et les effets à long terme d'une application unique, au niveau de la surface cutanée des souris hairless (hr/hr), de benzène, de cantharidine ou de 20-méthylcholanthrène en solution dans du benzène. Les paramètres obtenus ont été évalués au moyen de la méthode à la colcémide, laquelle est brièvement discutée. Les réactions des cellules épidermiques ont été interprétées en tant que phénomène biologique et dans des termes de cybernétique. Le benzène, comme la cantharidine, provoque des altérations dans le dynamisme de la population épidermique, ce qui est compatible avec une simple réaction régénératrice et peut être facilement expliqué en termes de cybernétique. Après application de méthylcholanthrène, la réaction initiale se trouvait aussi en conformité avec ce concept, alors que les altérations ultérieures s'expliquaient beaucoup moins comme une réaction régénératrice. D'autres mécanismes semblent devoir être impliqués. Une relation inverse entre le taux mitotique et la durée mitotique pouvait être discernée dans toutes les réactions interpretées comme de simple réactions de régénération. Les modifications dans les divers paramètres de croissance indiquaient que, d'une part, le taux mitotique pouvait être régularisé par un type de dérivé du "negative feedback control" et que, d'autre part, la durée mitotique pouvait l'être par un type proportionel de ce même phénomène.

SUMMARY

The initial and the long term effects of a single topical surface application to the skin of hairless mice (hr/hr) of benzene, cantharidin in benzene, and 21-methylcholanthrene in benzene, have been examined. The growth parameters have been evaluated by means of the Colcemid method, which is briefly discussed. The reactions of the epidermal cell population have been interpreted as biological phenomena and in terms of cybernetics. Both benzene and cantharidin provoke alterations in the dynamics of the epidermal cell population that are well compatible with a simple regenerative reaction and can readily be explained in terms of cybernetics. The initial reaction after application of methylcholanthrene was also in conformity with this concept, while the later alterations cannot well be explained as a regenerative reaction. Some other mechanisms appear to be involved. An inverse relationship between the mitotic rate and the mitotic duration could be discerned in all reactions that could be interpreted as simple regenerative reactions. The alterations in the various growth parameters indicated that the mitotic rate might be regulated by a derivative type of negative feedback control, and the mitotic duration by a proportional type.

ZUSAMMENFASSUNG

Die anfänglichen und langandauernden Wirkungen bei oberflächlichen Applikationen von Benzen, Cantharidin in Benzen und 20-Methylcholanthren in Benzen auf die Haut haarloser Mäuse (hr/hr) wurden untersucht. Die Wachstums-parameter wurden mit Hilfe der Colcemid-Methode bewertet. Die Reaktion der Epidermiszellen wurden von kybernetischen und biologischen Standpunkt gedeutet. Beide Substanzen, Benzen und Cantharidin, lösen Veränderungen in der Dynamik der Epidermiszellen, die man vom kybernetischen Standpunkt erklären kann, aus. Die Anfängliche Reaktion auf die Applikation von Methylcholanthren stand ebenfalls mit dieser Auffassung im Einklang. Später, aber, wurde, trotz einer schnellen Zellproliferation, eine erhebliche Verlängerung der Dauer des mitotischen Prozesses gefunden. Diese Veränderungen konnten nicht mit einem einfachen kybernetischen System in Übereinstimmung gebracht werden. Es müssen also einige andere Mekanismen angenommen werden, um die Veränderungen der Wachstumsparameter während der letzten Wochen der Behandlung mit Methylcholanthren zu erklären.

REFERENCES

1. W. S. Bullough and E. B. Laurence, The control of epidermal mitotic activity in the mouse. *Proc. roy. Soc.* B **151,** 517 (1960).
2. E. H. Mercer, *Keratin and Keratinization.* Pergamon Press, London (1961).
3. O. H. Iversen, The regulation of cell numbers in epidermis. A cybernetic point of view. *Acta path. microbiol. scand.* Suppl. 148 (1961).
4. O. H. Iversen and R. Bjerknes, Kinetics of epidermal reaction to carcinogens. *Acta path. microbiol. scand.* Suppl. 165 (1963).

5. W. S. Bullough, Growth regulation by tissue-specific factors, or chalones. In *Cellular Control Mechanisms and Cancer.* (Edited by P. Emmelot and O. Mühlbock) Elsevier, Amsterdam (1964).
6. W. S. Bullough and T. Rytömaa, Mitotic homeostasis. *Nature (Lond.)* **205,** 573 (1965).
7. W. S. Bullough, E. B. Laurence, O. H. Iversen and K. Elgjo, The vertebrate epidermal chalone. *Nature (Lond.)* **214,** 578 (1967).
8. O. H. Iversen and A. Evensen, Experimental skin carcinogenesis in mice. *Acta path. microbiol. scand.* Suppl. 156 (1962).
9. O. Skjaeggestad, Experimental epidermal hyperplasia in mice. Relation to carcinogenesis. *Acta path. microbiol. scand.* Suppl. 169 (1964).
10. F. A. Crew and L. Mirskaia, The character "hairlessness" in the mouse. *J. Genet.* **25,** 17 (1932).
11. L. T. David, The external expression and comparative dermal histology of hereditary hairlessness in mammals. *Z. Zellforsch.* **14,** 616 (1932).
12. W. Montagna, H. B. Chase and H. P. Melaragno, The skin of hairless mice — I. The formation of cysts and the distribution of lipids. *J. invest. Derm.* **19,** 83 (1952).
13. J. L. Hartwell, *Survey of Compounds which have been Tested for Carcinogenic Activity.* United States Government Printing Office, Washington (1951).
14. P. Shubik and J. L. Hartwell, *Survey of Compounds which have been Tested for Carcinogenic Activity.* Suppl. 1. United States Government Printing Office, Washington (1957).
15. O. H. Iversen, Cell metabolism in experimental skin carcinogenesis. *Acta path. microbiol. scand.* **50,** 17 (1960).
16. K. Elgjo, Epidermal Cell Population Kinetics in Chemically Induced Hyperplasia. Thesis. Universitetsforlaget, Oslo (1966).
17. J. G. Hoffman, Wright's hypothesis: Its relation to volume growth of tissue cells and mitotic index. *Science* **106,** 343 (1947).
18. O. J. Eigsti and P. Dustin, Jr., *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology, and Chemistry.* The Iowa College Press, Ames (1955).
19. P. Leblond and B. E. Walker, Renewal of cell populations. *Physiol. Rev.* **36,** 255 (1956).
20. J. Bartman, Analyse par la méthode stathmocinétique de la régénération rénale après intoxication par les sels de chrome. *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.* **25,** 234 (1960).
21. P. Dustin, Jr. and J. Bartman, Action de la colcémide sur le rein en régénération. *Path. et. Biol.* **9,** 485 (1961).
22. P. Weiss and J. L. Kavanau, A model of growth and growth control in mathematical terms. *J. gen. Physiol.* **41,** 1 (1957).
23. H. Sætren, A principle of auto-regulation of growth. Production of organ specific mitose-inhibitors in kidney and liver. *Exp. Cell. Res.* **11,** 229 (1956).
24. W. S. Bullough, The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* **37,** 307 (1962).
25. W. S. Bullough, C. L. Hewett and E. B. Laurence, The epidermal chalone: A preliminary attempt at isolation. *Exp. Cell Res.* **36,** 192 (1964).
26. O. H. Iversen and K. Elgjo, The effect of chalone on the mitotic rate and the mitotic duration in hairless mouse epidermis. In *Symp. on Control of the Cellular Growth in the Adult Organism.* (Edited by H. Teir and T. Rytömaa) Academic Press, London (1967).
27. W. S. Bullough and E. B. Laurence, Duration of epidermal mitosis *in vitro.* *Exp. Cell Res.* **35,** 629 (1964).
28. A. Evensen, Significance of mitotic duration in evaluating kinetics of cellular proliferation. *Nature (Lond.)* **195,** 718 (1962).
29. B. D. Pullinger, The first effects on mouse skin of some polycyclic hydrocarbons. *J. Path. Bact.* **50,** 463 (1940).
30. H. C. Reller and Z. K. Cooper, Mitotic incidence in the first 48 hr of methylcholanthrene epidermal carcinogenesis. *Cancer Res.* **4,** 236 (1944).
31. K. Setälä, K. Dammert, H. Setälä, L. Merenmies and P. Holsti, Morphologische Hautveränderungen bei Mäusen, hervorgerufen durch nich-ioniserbare oberflächenaktive tumorauslösende (tumour promoting) Substanzen. *Z. Krebsforsch.* **61,** 548 (1957).

32. K. DAMMERT, Zur Histologie der Chemishen Hautcarcinogenese im Lichte der Zweiphasenhypothese untersucht am Mäusen. *Acta path. microbiol. scand.* Suppl. 124, (1957).
33. K. SETÄLÄ, O. NYYSSÖNEN and B. LINDROOS, Mechanism of experimental tumorigenesis XIV. Low mitotic activity and delayed maturation as characteristics of malignancy in mouse epidermis. *Europ. J. Cancer.* **1,** 92 (1962).
34. K. SETÄLÄ, O. NYYSSÖNEN, B. LINDROOS and E. NISKANEN, Verlängerte Lebensdauer der Tochterzellen bzw. herabgesetzte Mitoserate der Basalzellen als Ausdruck des Carcinogeneffekts in Mäuseepidermis. *Naturwissenschaften* **48,** 673 (1961).
35. J. POST and J. HOFFMAN, Changes in the replication times and patterns of the liver cell during the life of the rat. *Exp. Cell Res.* **36,** 111 (1964).
36. I. BERENBLUM, Some recent advances in skin carcinogenesis. *Ann. roy. Coll. Surg. Engl.* **21,** 339 (1957).
37. K. SETÄLÄ, Differences in pharmacodynamic response to colchicine between benign and malignant epidermal hyperplasia. *Acta Radiol.* Suppl. 237 (1965).
38. L. KREYBERG, Om prekankrøse åreforandringer. *Med. Revue* **45,** 419 (1928).
39. J. W. ORR, The changes antecedent to tumour formation during the treatment of mouse skin with carcinogenic hydrocarbons. *J. Path. Bact.* **46,** 495 (1938).
40. R. E. BILLINGHAM and W. K. SILVERS, Some unsolved problems in the biology of skin. In *Biology of the Skin.* (Edited by A. G. LYNE and B. F. SHORT) Angus & Robertson, Sydney (1965).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 531–535. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Observations on Tumour Cells in the Circulating Blood before and after Chemotherapy

L. DÖBRÖSSY
Research Institute of Oncopathology, Budapest, Hungary

INTRODUCTION

THE FACT that malignant cells may enter the blood stream of a significant number of patients with malignant tumours is well known [1]. A variety of technics has been developed to isolate these malignant cells from the blood. The aim of this present investigation was to test the effect of chemotherapeutic agents on the tumour cells circulating in the blood.

METHODS

The examinations were carried out in model experiments. Two groups of 30 CB/Wistar rats each weighing 150–200g. were injected intravenously in three repeated series with a known number of Walker 256 carcinosarcoma cells obtained from the ascitic fluid of tumour bearing rats. The tumour cells were suspended in isotonic saline and were counted in a haemocytometer prior to injection. The total number of cells injected ranged from two to three million cells/rat. The inoculations were made into the tail vein. Concurrently with the intravenous inoculation of tumour cells, members of each group of animals (15–15 rats) were treated with 1×60 mg/kg Degranol [2] or 1×400 mg/kg dibromo-dulcitol (DBD) [3, 4], respectively; similar numbers of untreated animals were utilized as controls.

The rats were killed at various intervals after administration of drugs (1 hr to 18 days) by exsanguination. The isolation of the circulating tumour cells was carried out by the silicone-flotation method according to Seal [5]. The smears were obtained by the Papanicolaou technique. The number of tumour cells recovered was determined by counting the cells found on each of the two smears prepared from the blood of each rat. The average number of cells per field* was recorded. The fate of the intravenously inoculated tumour cells was followed up by autopsy; the lungs were examined histologically in semiserial sections.

RESULTS

In the untreated animals (Fig. 1), the number of tumour cells detectable in the peripheral blood proved to be the greatest within 1–3 hr after intravenous inoculation of the Walker 256 tumour cell suspension. From this time the number of circulating tumour cells decreased rapidly, but they were not removed from the circulating blood completely. It was interesting that, after this temporary decrease, a large number of tumour cells reappeared in the peripheral blood between 7 and 14 days. Accordingly, a biphasic curve of cell recovery was observed. The crosses in Fig. 1 record the presence of naked-eye metastases at autopsy.

The occurence of tumour nodules in the lungs and lymphnodes discovered at autopsy by histological investigation is shown in greater detail in Table 1.

In animals inoculated with Walker ascites

*A microscopic field for a $20\times$ magnification.

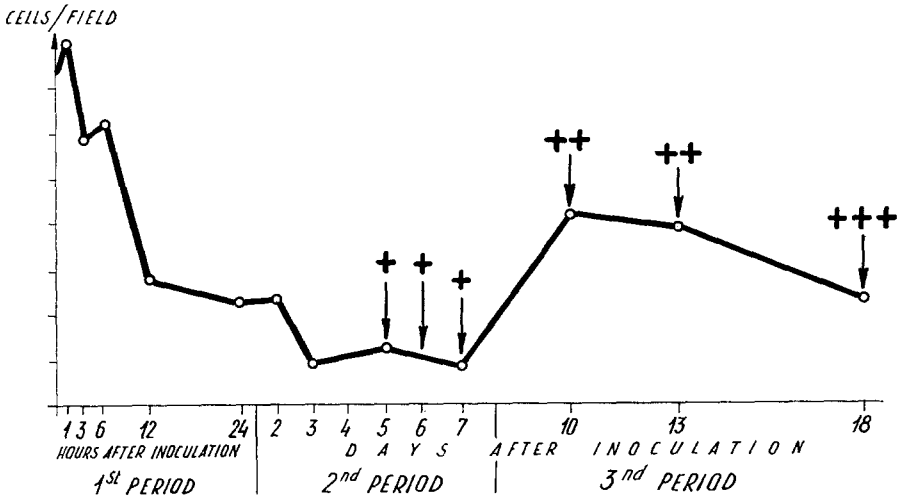


Fig. 1. Correlation of tumour-cell recovery and metastasis formation. (The arrows show the time of the appearance of tumour nodules found at autopsy; the number of + is in direct ratio to the degree of spreading). Note the biphasic curve of cell recovery in connection with metastasis formation.

Table 1. The appearance of tumour nodules in lung and lymphnodes

		Hours					Days									
Time after inoculation		1	3	6	12	24	2	3	4	5	6	7	10	13	18	
Tumour cells in the blood*		+++	+++	+++	++	++	++	+	+	++	+	+	+++	+++	++	
Tumour-takes	in lungs	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	++	+++	+++	
	in lymph-nodes	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	++	

*Grading of tumour cell recovery: + = 1·0; ++ = 1·0–3·0; +++ = 3·0 } Cells/field

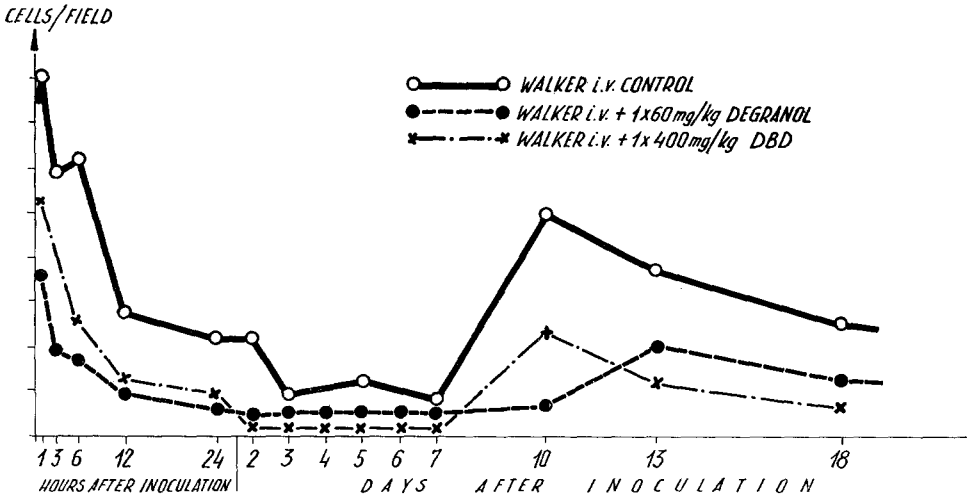
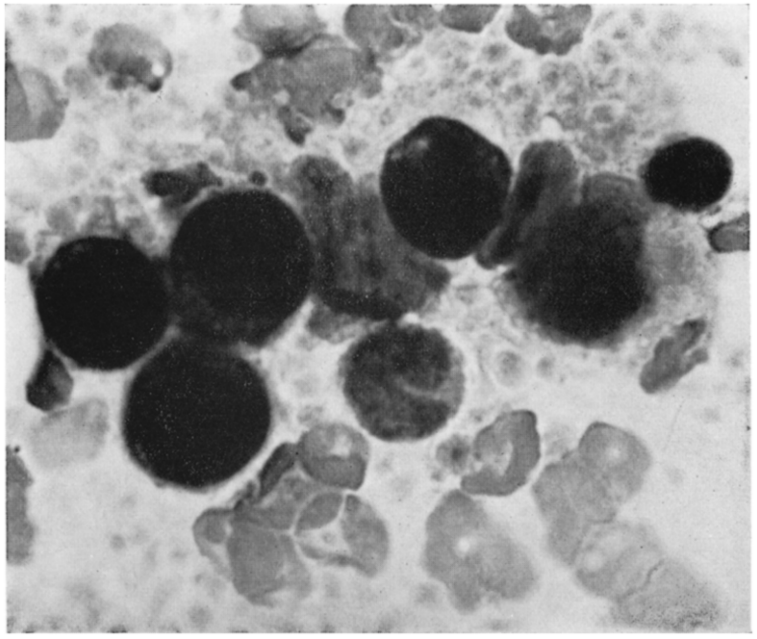
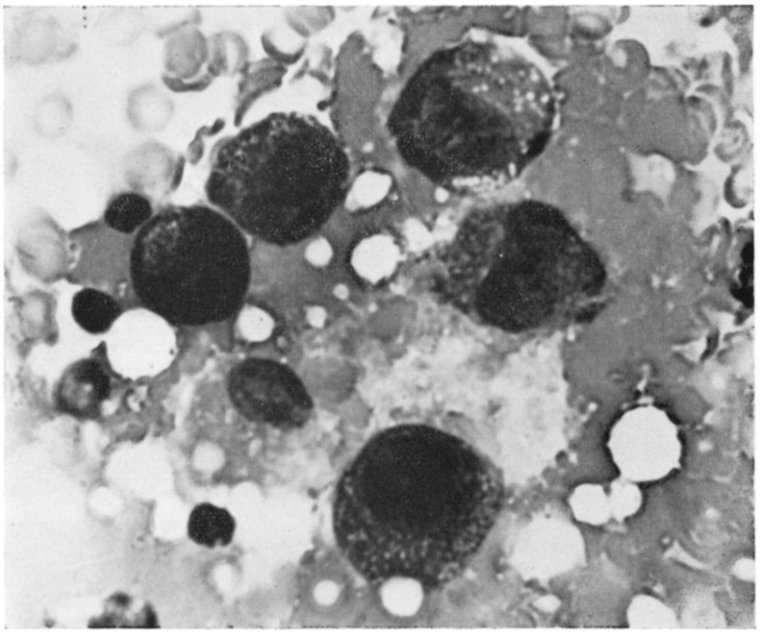


Fig. 2. Effect of a single dose of Degranol or dibromo-dulcitol (DBD) on tumour-cell recovery.



(*a*)



(*b*)

Fig. 3. *Walker-cells isolated from the peripheral blood* (*a*) *before and* (*b*) 24 *hr after treatment with Degranol.* (*Seal's method; smear; Papanicolaou staining;* ×530).

(to face p. 532)

tumour cells (Fig. 2) after Degranol and dibromo-dulcitol treatment, the number of detectable circulating tumour cells was diminished in the first period (within 1–3 hr after inoculation). The tumour cells were not removed totally from the circulating blood either in the second or in the third period, but their numbers remained far below those of the control series.

Metastases were not seen in animals receiving the chemotherapeutic agents.

DISCUSSION

The disappearance of the tumour cells from the peripheral blood within 1–3 hr after intravenous inoculation can be explained by embolic arrest and lodgement of circulating tumour cells in the narrow capillary network of organs, primarily in the lungs [6–8]. Some of the circulating tumour cells pass through the capillaries unarrested. They are detectable in the peripheral blood although in decreased numbers, during the second period of the process [8–11]. The reappearance of a large number of tumour cells in the peripheral blood after the seventh day following inoculation (the third period of the process) is coincident with the time of the appearance of tumour nodules in the lungs and lymphnodes discovered by autopsy and histological investigation (see Fig. 1 and Table 1). This seems to be a secondary out-flow of tumour cells from the "takes" developing after intravenous inoculation and is directly related to metastasis-formation [12].

Both Degranol and dibromo-dulcitol reduced the number of circulating tumour cells; in our former experiments [13], we have seen the same effect of VE-8 on Vx-2 rabbit carcinoma cells. The effect of the two chemotherapeutic agents seems to be different; for example, after Degranol-treatment the decrease in the number of detectable tumour cells ensues sooner than in animals treated with dibromo-dulcitol. On the other hand, the effect of dibromo-dulcitol seems to manifest itself a little later and is more intensive. It must be emphasized that in these experiments the single dose of Degranol administered was near the LD_{50}, whereas the dose of dibromo-dulcitol was only about one third of it. Because of this, definite conclusions regarding the comparative intensity and durability of effect of the two agents cannot be drawn. Clarification of these differences needs further investigation.

Our previous experiments with light and electron microscopic studies of the tumour cells isolated from the peripheral blood have revealed that the circulating tumour cells undergo some damage in the blood stream [14]. In the cells isolated from the blood of treated animals we have seen more serious damage (vacuolisation of cytoplasm, indistinct cell and nuclear membranes, pyknosis, naked nuclei, nuclear deformities, multinucleation, etc.), (Figs. 3a and 3b). These are similar to the cytomorphological changes which have been observed histologically and in tissue culture in our Institute in several solid and ascitic tumours treated with the same chemotherapeutic agents [15, 16]. As a result of the damage, the viability, vitality and growing potential of circulating tumour cells must obviously be impaired. The destruction of tumour cells in the blood stream and the metastasis-inhibition observed by Kellner and Németh [17] in Walker and Guérin tumour-bearing animals after treatment with chemotherapeutic agents are in accord with our results.

A few clinical investigations suggest that some effects of chemotherapeutic agents are similar to those mentioned above [1]. In this field, the author has had no experience at present.

Acknowledgements—The valuable technical assistance of Miss Maria Pfan is gratefully acknowledged.

We are much indebted to Dr. A. J. Salsbury for his assistance in the preparation of the manuscript.

RESUME

Le but du présent travail était l'élucidation des effets chimiothérapiques sur les cellules tumorales circulant dans le sang.

Nos examens ont été pratiqués sur des expériences modèles. Un nombre connu de cellules tumorales, de la forme ascitique du carcino-sarcome 256 *de Walker ont été injectées à des rats CB/Wistar, par voie intraveineuse. En même temps, quelques groupes d'animaux ont été traités par une dose unique de Degranol, à raison de* 60 *mg/kg, ou de dibromo-dulcitol, à raison de* 400 *mg/kg. Pour l'isolement des cellules tumorales, nous avons appliqué la méthode de Seal. La prise des cellules tumorales inoculées intraveineusement dans les divers organes, surtout dans les poumons, a été étudiée histologiquement.*

Une dose unique de Degranol, ou de dibromo-dulcitol, abaisse le nombre des celleles tumorales démontrables dans le sang; mais, tout en produisant une lésion considérable des cellules elles-mêmes, elle ne peut empêcher la prise des cellules tumorales.

SUMMARY

The aim of our present investigation was to test the effect of chemotherapeutic agents on tumour cells circulating in the blood. The examinations were carried out in model experiments. CB/Wistar rats were injected intravenously with a known number of Walker 256 *carcinosarcoma cells obtained from the ascitic fluid of tumour bearing animals. Concurrently with this, the members of each group of animals were treated with* 1×60 *mg/kg Degranol or* 1×400 *mg/kg dibromo-dulcitol, respectively. The isolation of the circulating tumour cells was carried out by Seal's method. The formation of "takes" in the organs, and especially in the lungs, after intravenous inoculation of tumour cells were followed up histologically. Our experiments have revealed that a single dose of Degranol or dibromo-dulcitol decreases the number of the tumour cells detectable in the peripheral blood and also has a damaging action on them.*

ZUSAMMENFASSUNG

Der Zweck unserer Arbeit war, die Wirkung von Chemotherapeutika auf die im Blut kreisenden Tumorzellen zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden mit Modell-Experimenten durchgeführt. Eine bekannte Anzahl von Tumorzellen des in Ascites-Form wachsenden Walker Carcinosarkoms 256 *wurde in CB/Wistar Ratten intravenös injiziert. Gleichzeitig wurden einzelne Tiergruppen mit* 1×60 *mg/kg Degranol, bzw.* 1×400 *mg/kg Dibromo-Dulcitol behandelt. Zur Isolierung und Zählung der Tumorzellen wurde die Seal'sche Methode verwendet. Die Ansiedlung der intravenös inokulierten Tumorzellen in den verschiedenen Organen, besonders in den Lungen wurde histologisch verfolgt.*

Eine einmalige Dosis von Degranol oder Dibromdulcit vermindert die Zahl der im Blut nachweisbaren Tumorzellen. Obwohl die untersuchten Substanzen eine ziemlich bedeutende Zellschädigung ausüben, vermögen sie die Ansiedlung der Tumorzellen nicht zu verhindern.

REFERENCES

1. W. H. Cole, G. O. McDonald, S. S. Roberts and H. W. Southwick, *Dissemination of Cancer.* Appleton-Century-Crofts Int. New York (1965).
2. B. Kellner, L. Németh und C. Sellei, Die biologische, hämatologische und geschwulsthemmende wirkung eines neuen Strickstoff-Last-Derivatives 1,6-bis-(B-chlor-äthylamino)-1,6-desoxy-D-mannit-dichlorhydrat (BCM). *Naturwissenschaften* **42,** 21 (1955).
3. B. Kellner, L. Németh, L. Institoris and P. Horvath, 1,6-Di-bromo-1,6-dideoxy-dulcitol; a new antitumoral agent. *Nature (Lond.)* **213,** 402 (1967).
4. B. Kellner, L. Németh, J. Sugár, E. Gati, I. Palyi and L. Döbrössy, Pharmacology of 1,6-Dibromo-1,6-dideoxy-dulcitol and its cytostatic effect in transplantable tumours. *Arzneimittel-Forsch* (in press).
5. S. H. Seal, Silocone flotation: a simple quantative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood. *Cancer* **12,** 590 (1959).
6. B. Kellner, Progression of tumour growth and formation of metastases. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **10,** 337 (1961).
7. S. Wood, Jr., Experimental studies of the intravascular dissemination of ascitic V_2 carcinoma cells in rabbit. *Bull schweiz. Akad. med. Wiss.* **20,** 92 (1964).
8. I. Zeidman, The fate of circulating tumour cells. *Acta cytol. (Philad.)* **9,** 136 (1965).
9. J. D. Griffiths and A. J. Salsbury, The fate of circulating Walker 256 tumour cells injected intravenously in rats. *Brit. J. Cancer* **17,** 546 (1963).
10. I. W. Hengesh, E. A. McGrew and S. Nanos, Malignant cells in the peripheral blood of experimental animals. *Acta cytol. (Philad.)* **6,** 143 (1962).
11. E. E. Selecki, A study of the metastatic distribution of Ehrlich ascites tumour cells in mice. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **37,** 489 (1959).

12. H. SATO, Cancer cells in the circulating blood: With reference to cancer metastases. *Bull. Wld. Hlth Org.* **26,** 675 (1962).
13. L. NÉMETH, L. DÖBRÖSSY, F. GÁL and L. NÉMETH JR., Effect of Vinblastine-sulphate (VR-8) on Vx-2 rabbit carcinoma. *Neoplasma* (*Bratisl.*) **12,** 357 (1965).
14. J. SUGÁR, J. TÓTH and L. DÖBRÖSSY, Electron microscopic study of malignant tumour cells circulating in the blood. *Acta. cytol.* (*Philad.*) (in press).
15. B. KELLNER, Histologic changes and their chronological sequences induced in transplanted tumours by nitrogen mustard gas and BCM. *Acta biol. Acad. Sci. hung.* **7,** 215 (1956).
16. I. PÁLYI, Effects of antitumour agents on cell morphology in tissue cultures (Degranol, Mannitol-Myleran, Dibromo Mannitol, Dibromo-Dulcitol). *Neoplasma* (*Bratisl.*) **14,** 159 (1967).
17. B. KELLNER and L. NÉMETH, Effects of some chemotherapeutic agents on intravenously inoculated tumours. *Z. Krebsforsch.* **68,** 250 (1966).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 537–543. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Pathology of Ovarian Neoplasms in Rats and Mice

R. L. CARTER

Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, London, S.W.3.

INTRODUCTION

OVARIAN tumours in rats and mice are infrequently seen. The first examples were reported by Tyzzer [1], Jobling [2], Haaland [3], Slye *et al.* [4], and Bullock and Curtis [5], but some of these accounts are not easy to evaluate. Comparatively few illustrations are available, different stystems of nomenclature are employed, and the origin and genetic characteristics of the animals used are not always adequately described. This last point is particularly important since, in the absence of such information, comparison of results from different series (particularly with respect to incidence) is difficult or impossible. But despite problems of this kind it is clear that most of the tumours reported by the early workers showed a consistent histological pattern. Tyzzer [1] emphasised that the tumours seen in the mouse "differed considerably from the more common types of ovarian tumour in the human being" and Slyle *et al.* regarded most of them as "solid atypical papillary adenomata". The descriptions suggest that the majority of these tumours would now be classified as granulosa cell lesions, a group which (in man) was only just beginning to be defined at this time. Early accounts of spontaneous ovarian tumours in the rat are fewer in number but at least 3 of the 5 lesions described by Bullock and Curtis should probably be regarded as granulosa-theca cell tumours.

It has subsequently been shown that ovarian tumours can be induced experimentally in rats and mice by procedures such as X-irradiation [6–9], transplantation of ovaries into the spleen of gonadectomised recipients [10, 11], and treatment with chemical carcinogens, notably 9 : 10-dimethyl-1 : 2-benzanthracene (DMBA) [12–18]. Almost all the tumours which have been induced have been granulosa-theca cell lesions and it is generally considered that other types of ovarian tumour are extremely rare.

The chance observation of two apparently spontaneous ovarian lesions in close succession —an anaplastic sarcoma and a teratoma— prompted a re-examination of all ovarian tumours reported in this Department over the last 15 years to see whether the types of tumour were as stereotyped as the literature suggested. Although a preponderance of granulosa-theca cell lesions was found, there was also an unexpectedly wide range of other ovarian neoplasms. Our data do not permit us to express accurately the occurrence of ovarian tumours in terms of strain- and age-related incidence since the observation of these lesions was incidental to, and not the main object of, the general work of the Department. For the same reason, our information on ovarian tumours is not accompanied by parallel data on other endocrine organs in the same animal; the main purpose of this paper is to describe the histopathological range of ovarian tumours which may be encountered in rats and mice.

MATERIALS AND METHODS

Histological reports from records made between 1951 and 1966 were examined from approximately 300 female rats and 3,000 female mice. All the rats were of the Chester Beatty stock strain, derived originally from Wistar animals. This strain has been random-

bred within a closed colony for 25 years, during which time selection has been made for vigour and large size. A majority of the mice were of random-bred Chester Beatty stock strain and these, too, are exceptionally large. Smaller numbers of random-bred Swiss albino mice and of certain inbred strains—BALB/c, CBA ,and '101'—were also involved in the necropsy series. Since 1961 a standard post-mortem technique has been used [19] in which complete records of negative as well as positive findings are recorded.

All ovarian lesions were re-examined and non-neoplastic conditions such as cysts and haematomas were excluded. Ovaries with lymphomatous infiltration, arising as a consequence of generalised lymphocytic neoplasms, were also discarded. Twenty-one primary tumours remained for study, 18 of which arose in mice and 3 in rats. No secondary tumours were encountered. Sections were cut at 5 μ from several levels of each block and stained by the following methods: haematoxylin and eosin; haematoxylin and Van Gieson; Masson's trichome; silver impregnation (Gordon and Sweet) for reticulin fibres; periodic acid—Schiff (McManus) for glycogen and glycoproteins.

Experimental details relating to each animal were abstracted and the animals were placed in one of the following groups—animals which received no treatment at any time [3]; animals which received inert substances such as saline or polyethylene glycol [2]; animals treated with substances of known but varying carcinogenic activity which have *no* recorded effect on mammalian ovarian tissues [9]; animals treated with carcinogens known to be capable of inducing ovarian neoplasms [7].

RESULTS

The different types of tumour which were observed are listed in Table 1 together with relevant experimental details. Although tumours of the granulosa-theca cell group predominated, it is clear that a wide range of other types of tumour may also be encountered if sufficient numbers of animals are examined.

Histological findings

(1) *Granulosa-theca cell tumours.* Fourteen neoplasms, 13 from mice and 1 from a rat, fell into this category. All were unilateral and several were large, measuring up to 20 mm dia.; normal ovarian tissues were usually difficult or impossible to identify.

In three instances, there were co-existing blood-filled cysts, but these were clearly separate from the tumours themselves. All the tumours were solid and varied considerably in histological appearance. Four patterns were defined which covered the broad spectrum of granulosa and theca-cell lesions:—

(*a*) *Follicular arrangement* (*Figs.* 1 *and* 2). Granulosa cells predominated and structures resembling normal Graafian follicles were often seen, complete with Call-Exner bodies. Stromal elements were usually scanty and arranged as a delicate framework encircling clumps of tumour cells.

(*b*) *Adenomatous arrangement* (*Figs.* 3–5). These tumours were more pleomorphic and sometimes gave rise to considerable problems in diagnosis. In some tumours, the cells formed simple rosettes encircling a central space (Fig. 3), while in others more complex adenomatous patterns were seen (Figs. 4 and 5), producing, in one instance, a remarkable appearance which resembled testicular tubules (Fig. 5). The diagnosis of arrhenoblastoma was considered but this was ultimately changed in favour of a granulosa cell tumour. The reticulin pattern was characteristic of a granulosa cell lesion and cells resembling interstitial elements were not convincingly demonstrated.

(*c*) *Cylindromatous or Trabecular arrangement* (*Figs.* 6 *and* 7). The tumour cells showed no tendency to organise into folicular or adenomatous structures and grew as solid cords and masses. Granulosa cells predominated in most regions but obvious theca cells were beginning to be more prominent (Fig. 7), showing hyalinisation and a rather characteristic whorled appearance. Reticulin preparations were somewhat intermediate, some parts showing features typical of granulosa cell lesions while others were more characteristic of thecomas.

(*d*) *Thecomatous arrangement* (*Figs.* 8 *and* 9). These tumours contained a preponderance of theca cells, showing whorling and a tendency to form a nodular pattern. The reticulin fibres showed the typical pericellular arrangement.

Luteinisation (*Fig.* 19) was a variable feature most commonly seen in adenomatous and trabecular types of lesions. Extensive changes, involving almost all the tumour, were seen in some instances.

(2) *Adenocarcinomas* (*Fig* 11). Two unilateral adenocarcinomas were encountered, both in mice. Histological appearances were similar to solid ovarian carcinomas occurring in human beings and consisted of irregular columns of tumour cells. One of the tumours contained

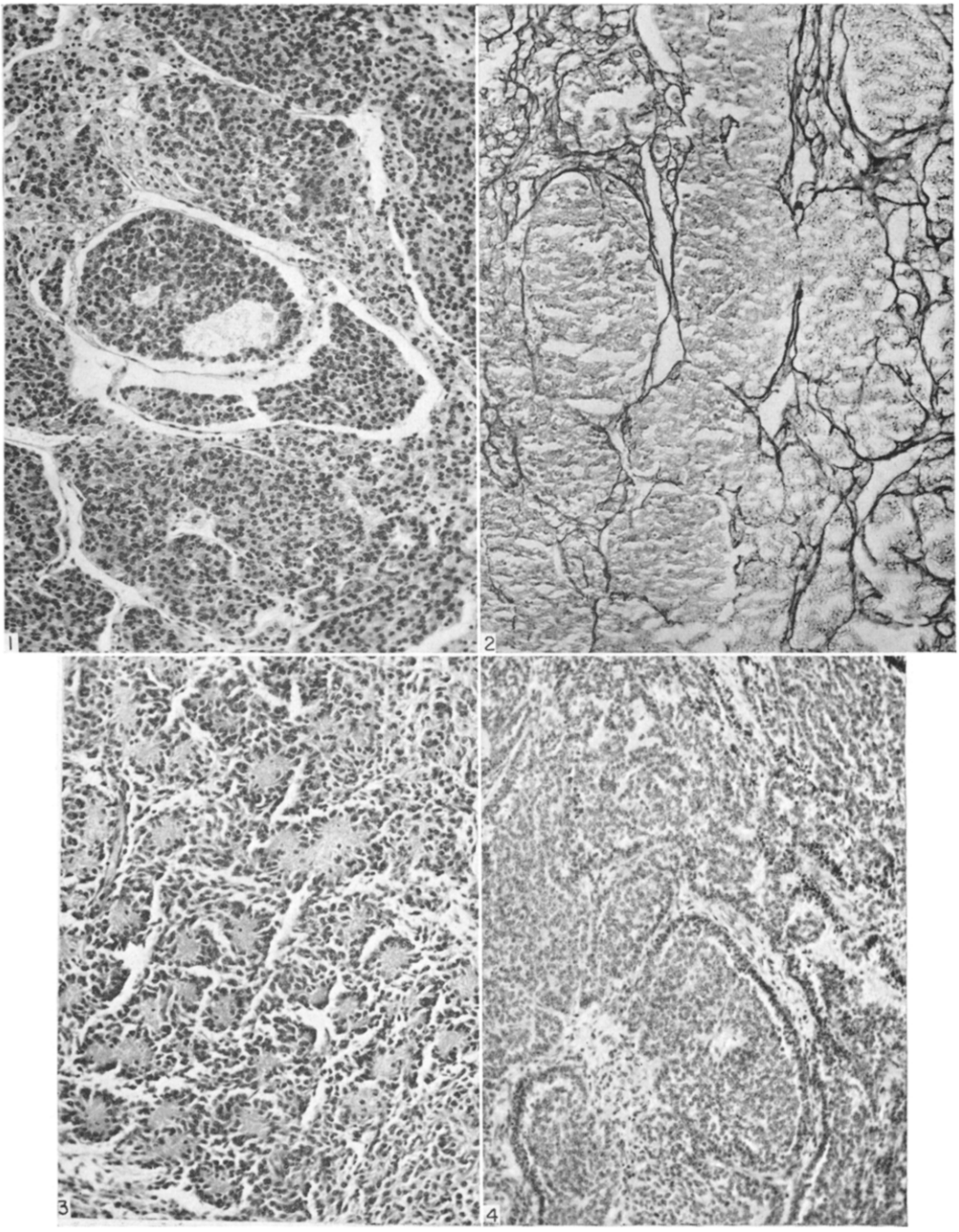


Fig. 1. *Granulosa-theca cell tumour; follicular arrangement. Mouse. Granulosa cells predominate and form structures which resemble normal Graafian follicles.**

Fig. 2. *As above; the same tumour stained for reticulin fibres. These form a delicate framework encircling clumps of tumour cells.* (*cf. Fig.* 9.).

Fig. 3. *Granulosa-theca cell tumour; adenomatous arrangement. Mouse. Granulosa cells form simple rosettes.*

Fig. 4. *Granulosa-theca cell tumour; adenomatous arrangement. Mouse. A more complex pattern in which adenomatous regions merge with solid trabecular zones.*

*All photomicrographs are × 160 and are stained with haematoxylin and eosin unless otherwise stated.

(to face p. 538)

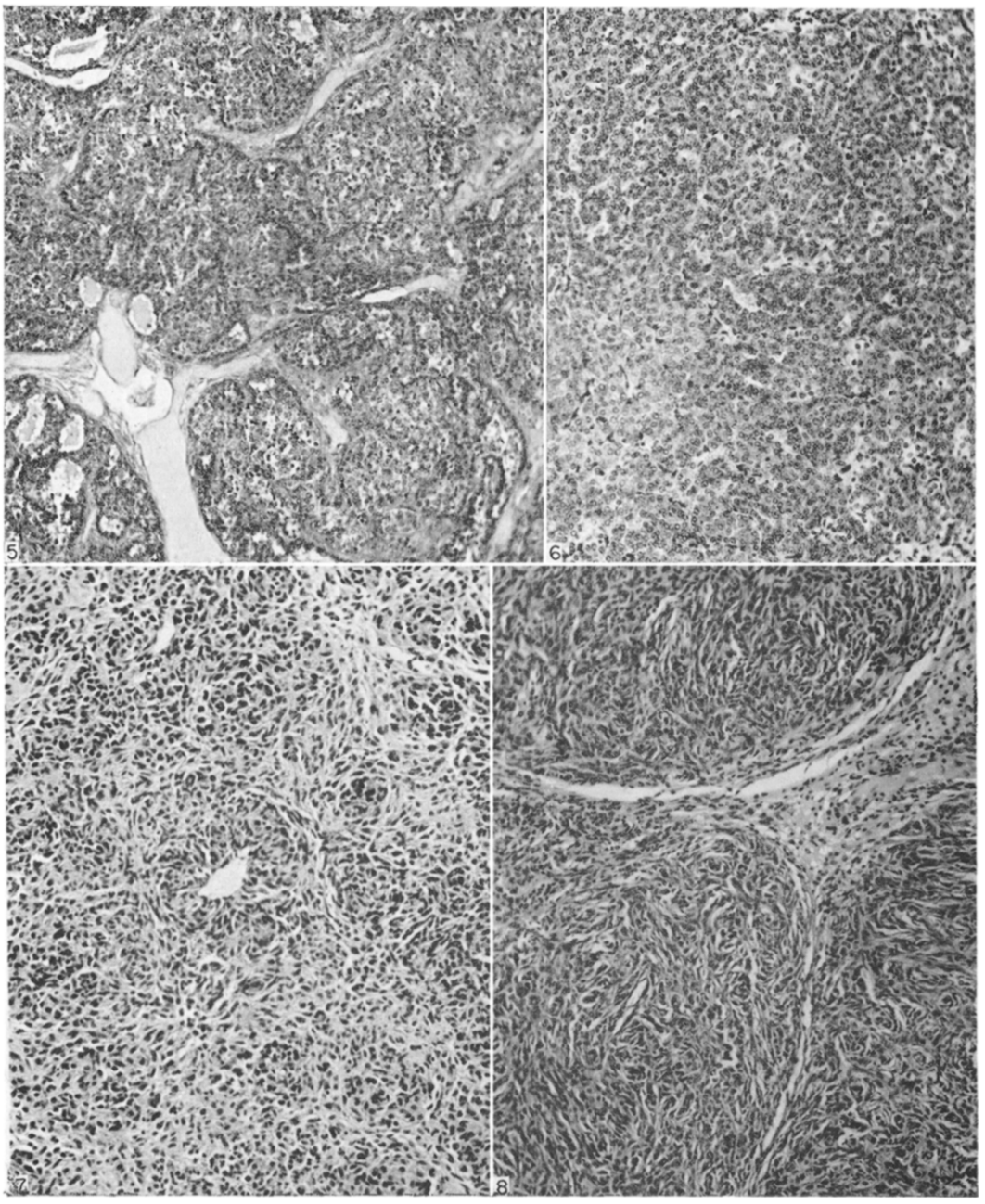


Fig. 5. *Granulosa-theca cell tumours; adenomatous arrangement. Mouse. An elaborate adenomatous pattern which at first sight resembles an arrhenoblastoma.*

Fig. 6. *Granulosa-theca cell tumour; trabecular arrangement. Mouse. Granulosa cells show no organisation and grow as solid sheets.*

Fig. 7. *Granulosa-theca cell tumour; trabecular pattern. Mouse. Thecal elements predominate in this field.*

Fig. 8. *Granulosa-theca cell tumour; thecomatous arrangement. Rat. This tumour is composed almost entirely of theca cells, showing whorling and a nodular configuration.*

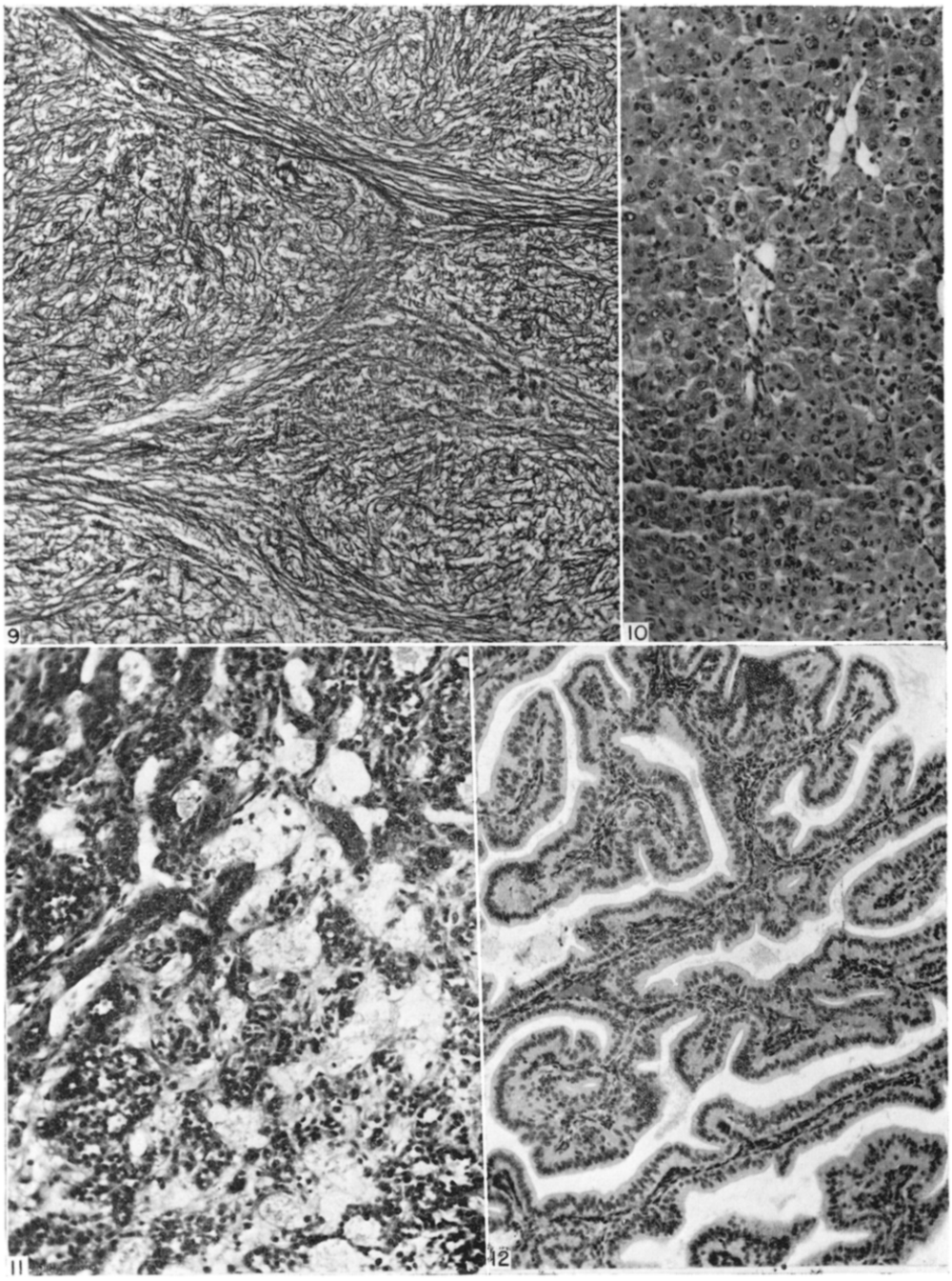


Fig. 9. *The same tumour as Fig.* 8, *stained for reticulin fibres. There is a dense pericellular arrangement of reticulin fibres quite different from that seen in tumours composed predominantly of granulosa cells.* (*cf. Fig.*2).

Fig. 10. *Granulosa-theca cell tumour; Mouse. There is marked luteinisation.*

Fig. 11. *Adenocarcinoma; mouse. A poorly-differentiated tumour, showing considerable production of mucin.*

Fig. 12. *Cystadenoma; mouse. This tumour shows a florid papilliferous pattern.*

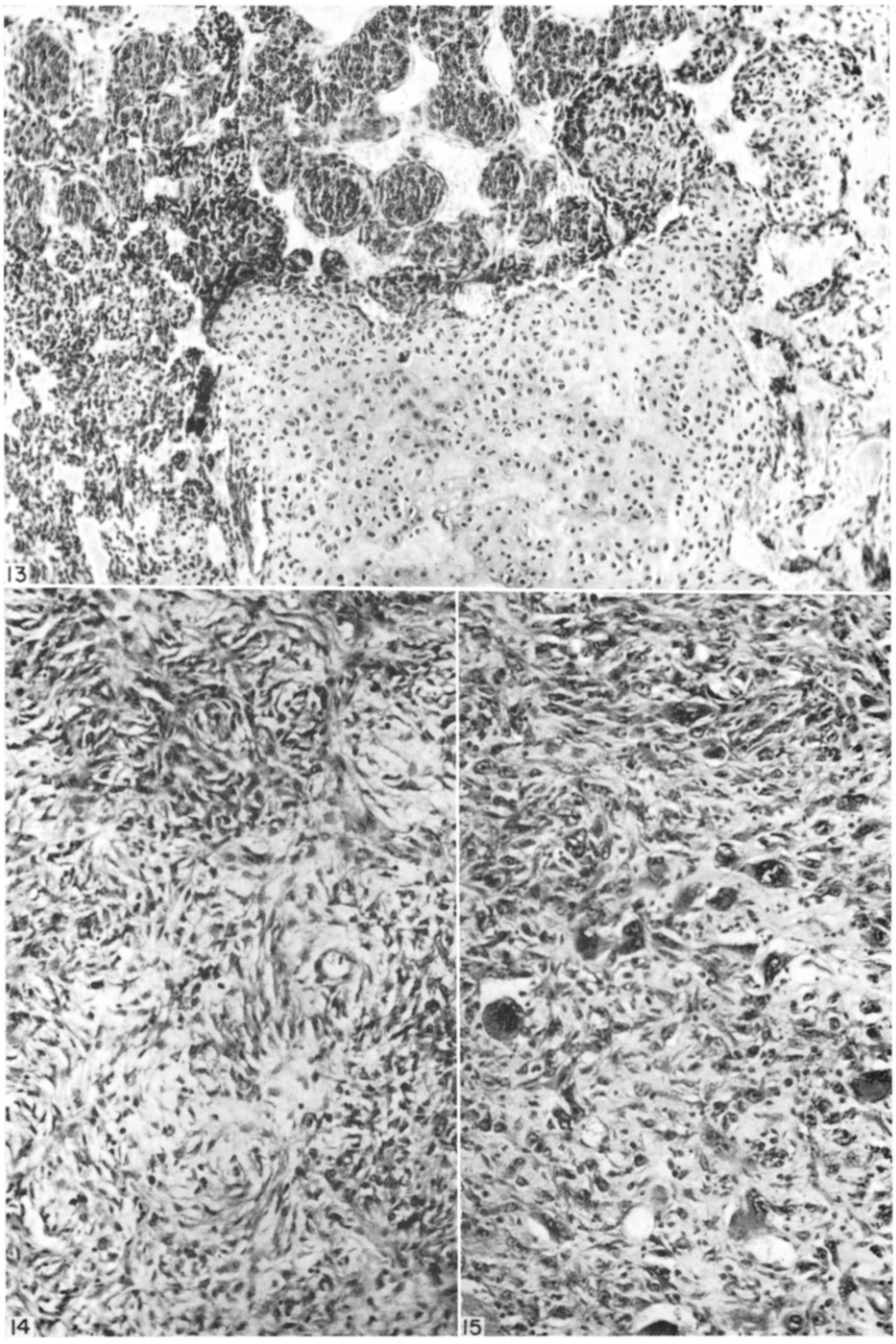


Fig. 13. *Teratoma; mouse. A representative field showing clumps of epithelial-like cells together with well-differentiated cartilage.*

Fig. 14. *Spindle cell sarcoma; mouse. A well-differentiated fibrosarcoma.*

Fig. 15. *Pleomorphic sarcoma; rat. An anaplastic sarcoma showing little formation of collagen.*

numerous mucus-secreting elements.

(3) *Cystadenomas* (*Fig.* 12). Two examples were seen. One, from a rat, was a simple cystadenoma with no unusual features. The other, from a mouse, showed a florid papilliferous pattern. No evidence of malignancy was seen in either tumour.

(4) *Teratoma* (*Fig.* 13). This was encountered once, in a mouse. Normal ovarian tissues were replaced by epithelial cells, spindle-like cells, cartilage and scattered lymphoid cells. Epithelial cells and cartilage predominated, the former lying in clumps, enclosed by a fine basement membrane, separated by blood-filled spaces. Such an arrangement was reminiscent of certain endocrine glands, notably the adrenal, but this remains no more than an impression and the exact nature of these cells is still uncertain. The other main component was cartilage, which appeared to be well differentiated. Serial sections were made through the whole tumour but no fresh teratomatous elements were identified.

(5) *Sarcomas* (*Figs.* 14 *and* 15). Two sarcomas were seen, an anaplastic sarcoma, obtained from a rat, and a fibrosarcoma from a mouse. The anaplastic lesion, measuring approximately 12 mm dia., consisted of sheets of pleomorphic cells, many of them binucleate and multinucleate; mitoses were common. Patches of myxomatous degeneration were present in several areas and, in some regions, thin-walled blood vessels were prominent. By contrast, the sarcoma obtained from the mouse was a well differentiated spindle cell lesion with quite marked formation of collagen. Both tumours contained an extensive reticulin framework and this, together with the absence of any trace of a nodular arrangement, suggested that they were probably derived from non-specialised ovarian stroma.

DISCUSSION

These results confirm the suspicion that ovaries from rats and mice develop a wider spectrum of tumours than has hitherto been suspected. The predominance of granulosa and theca cell lesions has long been familiar (see Introduction) but the fact that as many as one third of ovarian tumours may be of other histological types is worth emphasising.

The aetiology of many of the tumours encountered in the present work is obscure and, in general, it is difficult to establish any correlation between the treatment which the animals were given (see Table 1) and the subsequent development of ovarian neoplasms. Five animals either had no treatment at all, or received an inactive vehicle such as saline or polyethylene glycol. Of the remainder, there is no evidence at the present time to incriminate crocidolite asbestos, silicates, nitrosoanabasine, allyl isopropyl acetamide, 1:2 benzanthracene and tobacco smoke condensate as *ovarian* carcinogens, although most of them induce tumours in a variety of other mammalian tissues.

Four of the substances listed in Table 1 are known to be carcinogenic for the ovary, but their relevance in the present context is probably slight. Thus, 2-acetylaminofluorene produces ovarian tumours in mice parabiosed to gonadectomised litter mates but apparently not in intact animals [20]. Treatment with DMBA unquestionably increases the incidence of granulosa cell neoplasms in rats and mice [21, 22] but its effects are only consistently seen in certain inbred strains of mice [13, 17, 18]. Testosterone propionate induces granulosa cell tumours in rats [23] but the single animal reported here which received testosterone developed an anaplastic sarcoma. Lastly, zinc salts are known to produce gonadal teratomas in cockerels [24] but no carcinogenic effect on ovaries, or on mammalian gonads, has yet been detailed. It seems likely, therefore, that the various treatments had little or no effect in producing most of the tumours which were encountered.

Before the histological findings are discussed in detail, it should be emphasised that the criteria used for histological diagnosis and also the nomenclature are based on human material. It is perhaps fortunate that the morphology of rodent and human ovarian tumours is so similar, although this inevitably means that problems of classification are likely to be considerable. The taxonomy of ovarian tumours is notoriously difficult [25, 26] and retrospective studies in animal tumours, usually unsupported by information concerning structural or functional changes in other parts of the genital and endocrine systems, present formidable problems.

The granulosa-theca cell lesions which were seen in the present study showed the wide range of appearances which is characteristic of these tumours. The arrangement of the reticulin fibres was often helpful [27], although tumours with 'mixed' reticulin patterns, typical of both granulosa and theca cell lesions, were sometimes seen. The tumours which showed a predominance of thecal cells were regarded as thecomas rather than fibromas mainly because of (a) the characteristic arrangement of the

Table 1. *Distribution of ovarian tumours in rats and mice*

Species	Strain	Treatment	Age at Post-Mortem (weeks)	Type of ovarian neoplasm
Mouse	Stock	Silicates 5mg/0·2ml saline s.c.* × 12	65	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Stock	Allyl isopropyl acetamide 2·5mg/0·25ml distilled water s.c. × 40	57 57	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Stock	Allyl isopropyl acetamide 2·5mg/0·25ml distilled water s.c. × 40	57	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Stock	Nitrosoanabasine 2mg/0·1ml distilled water i.p. × 36	74	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Stock	2-acetylaminofluorene 50μg in aqueous gelatin s.c. × 1 at <24hr	55	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Stock	2-acetylaminoflourene 50μg in aqueous gelatin s.c. × 1 at<24hr	40	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Stock	Crocidolite 20mg/0·5ml saline i.p. × 1	98	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	BALB/c	Untreated	57	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	BALB/c	9:10 dimethyl 1:2 benzanthracene 40μg in 0·02ml 1% aqueous gelatin s.c. × 1 at <24hr	33	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	BALB/c	1:2 benzanthracene 50μg in 0·02ml 1% aqueous gelatin s.c. × 1 at <24hr	40	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	Swiss albino ICI/SPF	Air-cured tobacco tar 60mg/0·3ml acetone applied to dorsal skin × 3 weekly throughout life	88	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	CBA	$ZnCl_2$ 100mg/1 in drinking water for 8/52 followed by 0·2ml of 0·025% benzopyrene applied to dorsal skin × 24	15	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	CBA	Untreated	18	Granulosa-theca cell tumour
Rat	Stock	Saline 0·25ml s.c. × 8	99	Granulosa-theca cell tumour
Mouse	CBA	Untreated	73	Adenocarcinoma
Mouse	Swiss albino ICI/SPF	Air-cured tobacco tar 60mg/0·3ml acetone applied to dorsal skin × 3 weekly throughout life	88	Adenocarcinoma
Mouse	Swiss albino ICI/SPF	Air-cured tobacco tar 60mg/0·3ml acetone applied to dorsal skin × 3 weekly throughout life	49	Cystadenoma
Rat	Stock	1% 2-acetylaminofluorene in diet for 1 year	50	Cystadenoma
Mouse	BALB/c	9:10 dimethyl 1:2 benzanthracene 40μ in 0·02ml 1% aqueous gelatin s.c. × 1 at 24hr	41	Teratoma
Mouse	'101'	Polyethylene glycol 0·2ml s.c. × 8	98	Fibrosarcoma
Rat	Stock	Testosterone propionate	42	Anaplastic sarcoma

**Abbreviations:* s.c.=subcutaneous; i.p.=intraperitoneal.

reticulin, forming a fine pericellular network, (b) the frequency of hyalinisation and whorling and (c) the presence of a few granulosa cell elements. None of these criteria are sufficient, in isolation, but they combine to make at least a tentative diagnosis of thecoma. It should however, be stressed that, in human beings, a distinction between thecoma and fibroma on purely histological grounds is often impossible [28–30].

The cystadenoma and adenocarcinoma which were encountered merit no particular comment. They closely resembled the corresponding human lesions although, in general, cystic neoplasms are apparently extremly rare in rats and mice.

A few teratomas have been reported previously and it is interesting that in 2 of the 3 tumours described by Slye *et al.* [4] and by Fawcett [31], cartilage was a prominent feature. The different cellular components of such teratomas appear to be strikingly stable since they are not modified by serial transplantation [32, 33].

Ovarian sarcomas in rats and mice have rarely been described although bilateral sarcomas were recorded in the reviews by Slye *et al.* and by Bullock and Curtis (*loc. cit*]. Sarcomas were also briefly mentioned by Heidenhain [34] and by Kirby [35] but no illustrations of such lesions have been found. The two tumours described here showed typical features of pleomorphic and spindle cell lesions and their interest lies in their origin whether from specialised or non-specialised ovarian stroma.

Apart from lymphomatous infiltrates seen in ovaries from animals with generalised lymphocytic neoplasms, true metastatic tumours appear to be extremely rare in ovaries from

rats and mice. None were observed in the present series and only occasional examples have been found in the literature [4]. One explanation of this may be that most of the metastatic tumours seen in human ovaries are derived from primary neoplasms of the gastro-intestinal tract; such lesions are rare in rats and mice [36] and it is doubtful whether transcoelomic spread ever occurs.

Acknowledgements—I am indebted to Dr. F. J. C. Roe, Dr. C. E. Dukes and Dr. N. F. C. Gowing for their help in preparing this manuscript; to Mr. K. G. Moreman and his staff for the photomicrographs; and to Mr. George Munroe for technical assistance.

This investigation has been supported by grants to the Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, from the Medical Research Council, the British Empire Cancer Campaign for Research, and the Public Health Service Research Grant (Ca-03188-10) from the National Cancer Institute, U.S. Public Health Service.

RESUME

L'examen histopathologique de 21 *tumeurs primaires de l'ovaire d'une importante série de rats et de souris a été pratiqué. La revue des résultats montre la présence de néoplasmes divers et inattendus. Les tumeurs de la granulosa et les thécomes prédominaient, mais un tiers des tumeurs examinées étaient de types différents et comprenaient des adénocarcinomes, cysta-des dénomes, des tératomes et des sarcomes. Aucune tumeur secondaire n'a été observée. Ces néplasmes ont été décrits de façon détaillée et on en a discuté les diagnostics différentiels. Des facteurs étiologiques possible ont été considérés, et on a conclu que, à la lumière de nos connaissances actuelles, la plupart des tumeurs ovariennes considérées étaient spontanées.*

SUMMARY

The histopathology of 21 *primary ovarian tumours from a large series of rats and mice has been reviewed and an unexpectedly diverse range of neoplasms has emerged. Granulosa-theca cell tumours predominated but one-third of the tumours encountered were of other types, including adenocarcinoma, cystadenoma, teratoma and sarcoma. No secondary tumours were seen. These neoplasms are described in detail and their differential diagnosis is discussed. Possible aetiological factors are considered and it is concluded that in the light of present knowledge, most of the ovarian tumours presented are 'spontaneous' lesions.*

ZUSAMMENFASSUNG

Die Histopathologie von 21 *primären Ovarialtumoren aus einer grossen Reihe von Ratten und Mäusen wurde untersucht und dabei festgestellt, dass eine ganze Skala unerwartet verschiedenartiger Neoplasmen vorlag. Granulosa-Thecazelltumoren herrschten vor, aber etwa ein Drittel der untersuchten Geschwülste setzte sich aus anderen Typen zusammen: Adenokarzinomen, Zystadenomen, Teratomen und Sarkomen. Sekundäre Tumoren wurden nicht gefunden. Die Neoplasmen werden ausführlich beschrieben und ihre Differentialdiagnose diskutiert. Mögliche ätiologische Faktoren werden erörtert, und der Autor gelangt zum Schluss, im Lichte der heutigen Kenntnisse seien die meisten der besprochenen Ovarialtumoren als "Spontanläsionen" zu betrachten.*

REFERENCES

1. J. G. Tyzzer, A series of spontaneous tumors in mice with observations on the influence of heredity and the frequency of their occurrence. *J. med. Res.* **22,** 479 (1909).
2. J. W. Jobling, Multiple tumors in mice. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **6,** 10 (1909).
3. M. Haaland, In 4th *Scientific Report of Imperial Cancer Research Fund*, p. 1. (1911).
4. M. Slye, H. F. Holmes and H. G. Wells, Primary spontaneous tumors of the ovary in mice. *J. Cancer Res.* **5,** 295 (1920).
5. F. D. Bullock and M. R. Curtis, Spontaneous tumors of the rat. *J. Cancer Res.* **14,** 1 (1930).

6. J. Furth and O. B. Furth, Neoplastic diseases produced in mice by general irradiation with X-rays — I. Incidence and types of neoplasm. *Amer. J. Cancer* **28,** 54 (1936).
7. J. Furth and J. S. Butterworth, Neoplastic diseases occurring among mice subjected to general irradiation with X-rays — II. Ovarian tumors and associated lesions. *Amer. J. Cancer* **28,** 66 (1936).
8. J. Furth and M. C. Boon, Induction of ovarian tumors in mice with X-rays. *Cancer Res.* **7,** 241 (1947).
9. N. Haran-Ghera, J. Furth, F. R. Buffett and K. Yokoro, Studies on the pathogenesis of neoplasms by ionising radiation. II. Neoplasms of endocrine organs. *Cancer Res.* **19,** 1181 (1959).
10. M. S. Biskind and G. R. Biskind, Development of tumors in the rat ovary after transplantation into the spleen. *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* **55,** 176 (1944).
11. M. H. Li and W. U. Gardner, Further studies on the pathogenesis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res.* **9,** 35 (1849).
12. J. S. Howell, J. Marchant and J. W. Orr, Induction of ovarian tumours in mice with 9, 10:dimethyl 1:2 benzanthracene. *Brit. J. Cancer* **8,** 635 (1954).
13. J. Marchant, The chemical induction of ovarian tumours in mice. *Brit. J Cancer* **11,** 452 (1957).
14. J. Marchant, The development of ovarian tumours in ovaires grafted from mice pre-treated with dimethyl-benzanthracene. Inhibition by the presence of normal tissue. *Brit. J. Cancer* **14,** 514 (1960).
15. J. Marchant, The development of ovarian tumours in ovaries grafted from mice pre-treated with dimethyl-benzanthracene. The effects of the grafting operation itself and the effects of grafting ovaries from mice at early stages in pre-treatment with carcinogens. *Brit. J. Cancer* **14,** 519 (1960).
16. J. Marchant, The effect of hypophysectomy on the development of ovarian tumours in mice treated with dimethylbenzanthracene. *Brit. J. Cancer* **15,** 821 (1961).
17. J. K. Mody, The action of four carcinogenic hydrocarbons on the ovaries of IF mice and the histogenesis of the induced tumours. *Brit. J. Cancer* **14,** 256 (1960).
18. C. Biancifiori, G. M. Bonser and F. Caschera, Ovarian and mammary tumours in intact C3Hb virgin mice following a limited dose of four carcinogenic chemicals. *Brit. J. Cancer* **15,** 270 (1961).
19. F. J. C. Roe, Spontaneous tumours in rats and mice. *Food and Cosmet. Toxicol.* **3,** 707 (1965).
20. F. Bielshowsky and W. H. Hall, Carcinogenesis in parabiotic rats. *Brit. J. Cancer* **5,** 331 (1951).
21. J. Engelbreth-Holm and H. Lefèvre, Acceleration of the development of leukaemias and mammary carcinomas in mice by 9, 10:dimethyl-1, 2-benzanthracene. *Cancer Res.* **1,** 102 (1941).
22. R. Rask-Nielsen, Local and remote tumours in Street strain mice following subcutaneous injection of large doses of four different carcinogenic hydrocarbons. *Brit. J. Cancer* **4,** 124 (1950).
23. T. Vanha-Perttula and V. K. Hopsu, High incidence of malignancies in persistent estrous rats. *Acta Path. microbiol. scand.* **64,** 284 (1965).
24. J. Guthrie, Attempts to produce seminomata in the albino rat by inoculation of hydrocarbons and other carcinogens into normally situated and ectopic testes. *Brit. J. Cancer* **10,** 134 (1956).
25. L. A. Emge, Classifying ovarian tumors. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **68,** 348 (1954).
26. R. A. Willis, *The Pathology of Tumours.* 3rd edition. Butterworth, London (1960).
27. H. F. Traut and A Marchetti, A consideration of the so called 'granulosa' and 'theca cell' tumors of the ovary. *Surg. Gynet. Obstet.* 70, 632 (1940).
28. R. W. Burslem, F. A. Langley and A. S. Woodcock, A clinic pathological study of oestrogenic ovarian tumours. *Cancer* **7,** 522 (1954).
29. M. Haines and C. W. Taylor, *Gynaecological Pathology.* Churchill, London (1962).
30. J. M. Morris and R. E. Sculley, *Endocrine Pathology of the Ovary.* Mosby, St Louis (1958).
31. D. W. Fawcett, Bilateral ovarian teratomas in a mouse. *Cancer Res.* **10,** 705 (1950).

32. E. F. FEKETE and M. A. FERRIGNO, Studies on a transplantable teratoma of the mouse. *Cancer Res.* **12,** 438 (1952).
33. E. B. JACKSON and A. M. BRUES, Studies on a transplantable embryoma of the mouse. *Cancer Res.* **1,** 494 (1941).
34. L. HEIDENHAIN, Spontantumoren bei Mäusen und die ätiologische seite des Krebsproblems. *Z. Krebforsch.* **28,** 443 (1929).
35. A. H. M. KIRBY, Studies in carcinogenesis with azo compounds. *Cancer Res.* **7,** 333 (1947).
36. U. F. ROWLATT, Neoplasms of the alimentary canal in rats and mice. In *The Pathology of Rats and Mice.* E. COTCHIN and F. J. C. ROE, Eds. Blackwell, Oxford (1967).

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 545–546. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Letter to the Editor

Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Patterns of Gynaecological Specimens on Starch Gel Electrophoresis*

M. ISHIHARA

Department of Obstetrics and Gynaecology, Branch Hospital, Faculty of Medicine Nagoya University, 2 Higashimonzen-cho, Higashi-ku, Nagoya, Japan

THE BIOCHEMICAL changes in cancer tissues have been studied recently from the viewpoint of isoenzymatic patterns of various enzymes. For instance the distribution of lactate dehydrogenase (LDH) in mammalian and stomach tissues is now well documented [1–4]. These isoenzymes have been separated electrophoretically and chromatographically, and have been shown to possess distinct physical, chemical and immunological properties [5]. The existence of different proportions of M (occurring in muscle) and H (occurring in heart) subunits in LDH has been established in the enzyme extracted from various tissues [6].

The present study offers a comparison of LDH isoenzyme patterns of normal and malignant tissues obtained on starch gel electrophoresis. All the tissues originated from the female genital organs. There were 20 specimens of human tissues which included normal uterus, ovary, uterine body cancer, uterine cervical cancer, ovarian cancer and vulvar cancer. The samples were collected between 10 min to 1 hr after surgical removal and placed in liquid nitrogen or solid carbon dioxide. The tissue was weighed, suspended in 0·25 M Mannitol solution containing 0·1 mg EDTA/ml at pH 7·4 and homogenized with an Ultra-Turrax for two 5-sec periods. When necessary the homogenization was completed by brief grinding with a Potter-Elvehjem homogenizer. The final concentration of the homogenates was 100 mg/ml. The extracts were centrifuged at 144,000 × **g** for 30 min. All the procedures were carried out at 0–5°C. The supernatants were frozen at —20°C until used.

Starch gel electrophoresis was performed according to the method of Fine *et al.* [7]. The gel was made up in barbiturate buffer, pH 7·4, the concentration was 12%. The electrode solution also was made up in barbiturate buffer. Electrophoresis was by 2 V/cm for 16 hr at 5°C. The staining technique was as follows: 1% agar in 0·1 M Tris-HCL buffer, pH 8·0, 15 ml, containing 0·75 ml of 0·2 M lithium lactate, 5 mg nicotinamide adenine di-nucleotide(NAD), 0·75 mg *N*-methyl phenozonium methosulphate (PMS), and 3 mg 3-(4, 5-dimethyl thiozolyl-2) 2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was poured over a slice of starch gel and incubated for 30 min at 37°C in the dark. The starch gel

*Supported by a grant from World Health Organization.

was washed with a mixture of methanol, acetic acid and water in proportion of 5, 1 and 5 respectively after incubation.

The results were as follows: The uterine endometrium had a higher H_4 concentration than the uterine cervix. The uterine muscle had a lower H_4 and M_4 concentration. The normal ovary had a much lower M_4 concentration.

In malignant tumours the following results were obtained: endometrial adenocarcinoma showed a lower M_4 and H_4 concentration than normal uterine endometrium. Ovarian cancer (carcinoma simplex) showed a higher M_4 and lower H_4 concentration than the normal ovary. Vulvar and uterine cervical squamous cell carcinoma (well differentiated form) showed a very much higher M_4 and lower M_1H_3, H_4 concentration than the uterine cervix.

DISCUSSION

According to Yasin and Bergel [4], there exists, in stomach carcinoma, a consistent increase in the relative proportions of M subunits. They have also mentioned different isoenzyme patterns of the various gastric specimens. Kaplan [6] has also mentioned that the M-type of LDH isoenzyme is more prevalent in tumours. Our study could also confirm the isoenzymatic difference between normal and malignant tissues from the uterus, ovary and vulva. Uterine endometrium showed the H-type isoenzymatic pattern. However, the endometrium is much subject to hormonal influence. It is known that oestradiol administration to immature female rats and rabbits results in a selective synthesis of M subunits relative to H subunits in the uterus [8]. The important problem is to determine which patterns are indicative of a precancer or metaplasia of tissue. The carcinogenesis may be associated with the isoenzymatic pattern. It is not known whether the isoenzymatic pattern changes from M- to H-type during carcinogenesis. We hope to study these problems in the future.

REFERENCES

1. P. G. W. Plagemann, F. W. Gregory and F. Wróblenski, The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase—I. Distribution of lactic dehydrogenases in rabbit and human tissues. *J. Biol. Chem.* **235,** 2282 (1960).
2. R. Richterich, P. Schafroth and H. Albi, A study of lactic dehydrogenase isoenzyme patterns of human tissues by adsorption-elution on Sephadex-DEAE. *Clin. Chim. Acta.* **8,** 179 (1963).
3. E. S. Vessell and A. G. Bearn, Isoenzymes of lactic dehydrogenase in human tissues. *J. Clin. Invest.* **40,** 586 (1961).
4. R. Yasin and F. Bergel, Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in human normal and malignant gastric mucosa. *Europ. J. Cancer,* **1,** 203 (1965).
5. J. S. Nisselbaum and O. Bodansky, Purification, kinetic and immunological studies of the major variants of lactic dehydrogenase from human liver, hepatoma and erythrocytes; comparison with the major variant of human heart lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **238,** 969 (1963).
6. R. D. Cahn, N. O. Kaplan, L. Levine and E. Zwilling, Nature and development of lactic dehydrogenases. *Science* **136,** 962 (1962).
7. I. H. Fine, N. O. Kaplan and D. Kuftinic, Developmental changes of mammalian lactic dehydrogenases. *Biochemistry* **2,** 116 (1963).
8. T. L. Goodfriend and N. O. Kaplan, Effects of hormone administration on lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **239,** 130 (1964).

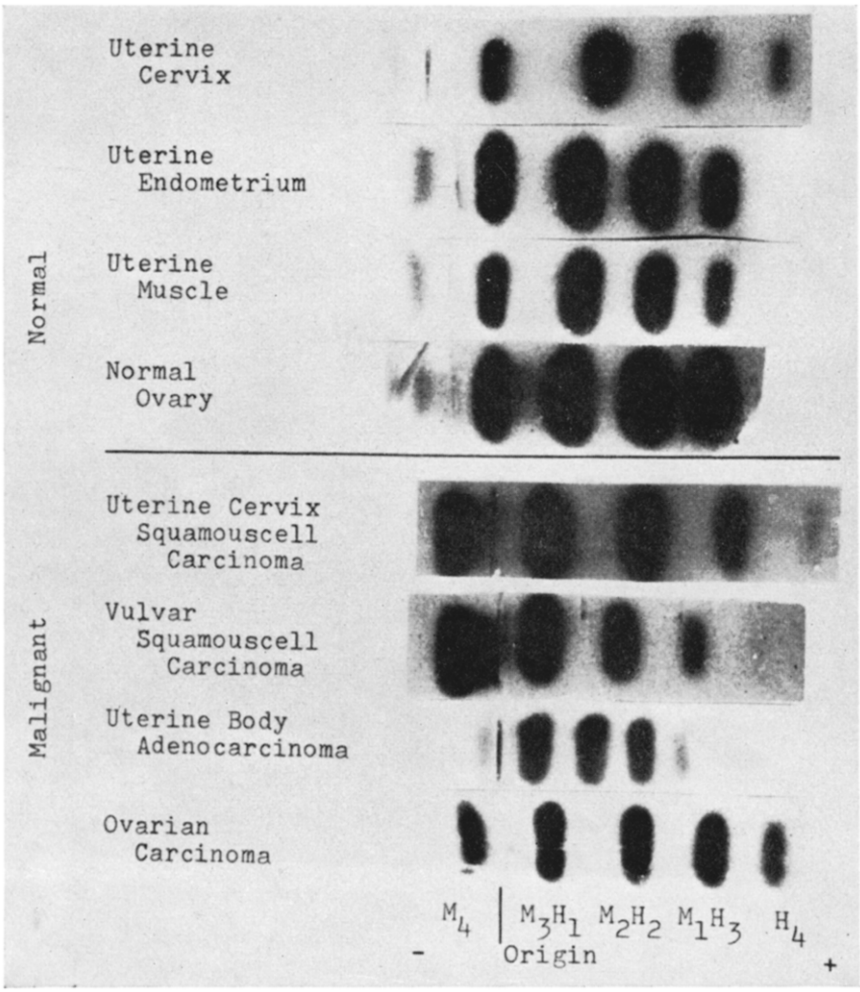


Fig. 1. *LDH isoenzyme patterns of human tissues.*

(to face p. 546)

Europ. J. Cancer Vol. 3, pp. 547-549. Pergamon Press 1968. Printed in Great Britain

Announcements

INFORMATION is requested on the existence of human tumour banks in Europe and other continents. Specifically, are there any such banks functioning at present or are there plans to establish some?

The function of a human tumour bank is to keep samples of human tumour tissues in a state permitting biochemical and pathological studies and to make them available to qualified research people.

Please send the information to H. J. TAGNON, M.D., Editor of this Journal.

Organisation Europeenne de recherche sur le traitement du cancer (O.E.R.T.C.)

Groupe Europeen de chimiothérapie anticancéreuse (G.E.C.A.)

I **Seminaire sur les bases scientifiques de la chimiothérapie des cancers humains** *Vendredi* 22 *Mars* 1968

Des exposés seront donnés par des cancérologues et pharmacologues qui traiteront des principaux problèmes scientifiques posés par la chimiothérapie des cancers humains.

Les auditeurs sont priés de s'inscrire avant le 15 Janvier 1968 auprès du Professeur G. Mathé, Institut de Cancérologie et d'Immunogénétique, Hôpital Paul-Brousse, 14, avenue Paul Vaillant Couturier, 94, Villejuif (France).

II **Réunion annuelle plénière du G.E.C.A. et de ses groupes coopérateurs** *Samedi* 23 *Mars* 1968

(1) Rapport des Secrétaires des Groupes Coopérateurs du G.E.C.A.

(2) Séance Scientifique sur "les associations de composés en chimiothérapie anticancéreuse".

Les exposés seront choisis par un Comité de sélection parmi les communications proposées, et dont le titre, et un résumé de 10 lignes, auront été adressés au Professeur G. Mathé, Institut de Cancérologie et d'Immunogénétique, Hôpital Paul Brousse, 14, avenue Paul Vaillant Couturier, 94, Villejuif.

III **Une affiche speciale** donnera ultérieurement les programmes scientifiques détaillés des deux journées.

World Health Organization

Research Training Fellowships 1969

International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

APPLICATIONS for training fellowships in 1969 are invited from junior scientists wishing to be trained in any aspect of cancer research. The Agency is especially interested in receiving applications for training in epidemiology, biostatistics and all aspects of environmental biology.

Applicants should preferably be already engaged in research in medical or allied sciences and intend to pursue a career in cancer research.

Successful fellows will be expected to hold their fellowships for one to two years in a suitable research institution abroad. Fellows will, in general, be selected from applicants with less than five years post doctoral experience in medicine or the natural sciences. They must have an adequate knowledge, both written and spoken, of the language of the country in which their fellowship is tenable.

Stipends will vary according to the cost of living in the country of study. The cost of travel for the applicant and, in certain circumstances, that of his wife and children will be met.

Fellowship application forms and more detailed information are available from:

The Chief of the Education and Fellowship Programme

International Agency for Research on Cancer

16, avenue Maréchal-Foch
69-LYON (6e)
France

Applications must reach the Agency not later than 31 May 1968

European Journal of Cancer

Journal Européen de Cancérologie

Europäische Zeitschrift für Cancerologie

Aidé par un subside du Ministère de l'Education Nationale de Belgique

Founder Members	Membres Fondateurs	Gründungsmitglieder
J L Amiel, *Paris*	P Loustalot, *Basel*	D Schwartz, *Paris*
R Ceppellini, *Torino*	R Martin, *Bruxelles*	P Sträuli, *Zürich*
S Garattini, *Milano*	G Mathé, *Paris*	H J Tagnon, *Bruxelles*
A Haddow, *London*	O Mühlbock, *Amsterdam*	D W Van Bekkum, *Rijswijk*
A Leonardi, *Milano*	K Munk, *Heidelberg*	H A Van Gilse, *Rotterdam*
H Lettré, *Heidelberg*	W Sachsenmaier, *Heidelberg*	W Verly, *Liège*

Editorial Board — Comite de Redaction — Redaktionskomitee

Editor—Rédacteur-en-Chef—Hauptredaktor
H J Tagnon, *Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgique*

Regional Editors—Editeurs Régionaux—Auswärtige Sekretäre
A Leonardi, *Istituto di Ricerche Farmacologiche, Mario Negri, Milano, Italia*
G Mathé, *Institut de Cancérologie et d'Immunogénétique, Hôpital Paul Brousse, Villejuif-Seine, France*
L M Van Putten, *Radiobiological Institute TNO, Rijswijk, Nederland*
W Bollag, *Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz*
H Lettre, *Institut für Experimentelle Krebsforschung der Universität, Heidelberg, Deutschland*

Associate Editors—Secrétaires-Adjoints—Sekretäre
P Brookes, *Chester Beatty Research Institute, London, England*
Y Kenis, *Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgique*

Corresponding Editors—Secrétaires Correspondants—Korrespondierende Sekretäre
J H Burchenal, *Sloan Kettering Institute, New York, N.Y., U.S.A.*
J Leiter, *National Institutes of Health, Bethesda, Md, U.S.A.*

Technical Editor — Editeur Technique — Teknische Sekretärin
J. Leroy, *Bruxelles, Belgique*

Editorial Advisory Board — Conseil Scientifique — Wissenschaftlicher Beirat

Belgique
A Bertinchamps, *Bruxelles*
H Betz, *Liège*
J Brachet, *Bruxelles*
H Dancot, *Bruxelles*
P Dustin, *Bruxelles*
C Gompel, *Bruxelles*
J Maisin, *Louvain*
S Simon, *Bruxelles*
W Smets, *Bruxelles*

Danmark
J Clemmesen, *Kobenhavn*

Deutschland
H E Bock, *Tübingen*
E Hecker, *Heidelberg*
K E Scheer, *Heidelberg*
H Wrba, *Heidelberg*

France
J Bernard, *Paris*
M Bessis, *Paris*
Y Cachin, *Paris*
M Dargent, *Lyon*
J Delarue, *Paris*
J Driessens, *Lille*
P Grabar, *Paris*
F Haguenau, *Paris*
A Lacassagne, *Paris*
A P Lachapele, *Bordeaux*
F Lacour, *Paris*
A Lwoff, *Paris*
M Tubiana, *Par's*
E Wolff, *Paris*

Great Britain
F Bergel, *London*
W Davis, *London*
R Doll, *London*
L A Elson, *London*
D A G Galton, *London*
J S Mitchell, *Cambridge*
G Negroni, *London*
P R Peacock, *Glasgow*
R W Raven, *London*
G H Timmis, *London*

Italia
E Anglesio, *Torino*
E Ciaranfi, *Milano*
F Gavosto, *Torino*
C Maltoni, *Bologna*
A Marmont, *Genova*
V Palma, *Milano*
E Polli, *Milano*
L Severi, *Perugia*
E Storti, *Modena*

Nederland
K Breur, *Amsterdam*
L Meinsma, *Amsterdam*
H O Nieweg, *Groningen*
W F Stenfort Kroese, *Rotterdam*

S.S.S.R.
N P Napalkov, *Leningrad*

Suisse
S Barandun, *Bern*
H Bloch, *Basel*
H Cottier, *Bern*
H Isliker, *Lausanne*
G Martz, *Zürich*
P Maurice, *Genève*

Sverige
G Klein, *Stockholm*

Publishing Offices: Headington Hill Hall, Oxford (Oxford 64881)

Subscription rates

(A) £14 ($40.00) per annum for libraries, research establishments and all other multiple-reader institutions

(B) £5 5s. ($15) per annum for individuals who write directly to the publisher and certify that the journal is for their personal use

Six issues published bi-monthly

Tarifs d'abonnement

(A) £14 par année pour les Bibliothèques, les Instituts de Recherche et tout groupe de lecteurs formé au sein d'un organisme

(B) £5 5s. par année pour les personnes qui écrivent directement à l'éditeur et certifient que le journal est pour leur usage personnel

Six numéros: périodicité bimensuelle

Copyright © 1967, Pergamon Press Ltd.

Abonnementpreise

(A) Jahresbezugpreis £14 Für Bibliotheken, Forschungsinstitute und Institute mit zahlreichem Leserkreis

(B) Jahresbezugpreis £5 5s. Für Einzelbezüge, die sich unmittelbar an den Verlag wenden mit der Bestätigung, die Zeitschrift für persönliche Zwecke zu gebrauchen

Sechs Hefte. Erscheint zweimonatlich

PERGAMON PRESS LIMITED

Headington Hill Hall
Oxford, England

44-01 21st Street
Long Island City, N.Y. 11101, U.S.A.