

Erzeugung neurogener Malignome durch einmalige Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff (ÄNH) an neugeborene und junge BD IX-Ratten*

H. DRUCKREY, B. SCHAGEN** und S. IVANKOVIC

Forschergruppe Präventivmedizin am Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Freiburg

Eingegangen am 20. Dezember 1969

Induction of Neurogenic Malignancies by One Single Dose of Ethyl-Nitrosourea (ENU) Given to Newborn and Juvenile BD IX-Strain Rats

Summary. Rats at the age of one, 10 and 30 days received one single dose of ENU ranging from 5 to 80 mg per kg body weight. Out of 296 rats treated 242 later died from malignant and multiple tumors of the nervous system. Brain tumors, ependymomas, oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed gliomas were observed in 144 animals, malignant tumors of the spinal cord in 70, of the cranial nerves in 89, and of the PNS in 140 rats. Nine rats died from tumors of the heart, 7 of which we classified as malignant neurinomas. — In all three age groups clear dose-response relationships were obtained. The sensitivity of the nervous system to the carcinogenic ENU, judged by the tumor yield and the length of the latent period in the respective dosage groups, decreased to about a tenth within the first month after birth. On the other hand, the incidence of nephroblastomas increased with the age at treatment and the dose. Since ENU after a single subcutaneous injection of 20 mg per kg to newborn or 10 days old rats produced almost a 100% yield of malignant tumors of the nervous system, it offers a simple model for morphogenetic, biochemical or immunological studies in neurooncology.

Zusammenfassung. Ratten im Alter von einem, bzw. von 10 und 30 Tagen erhielten eine einmalige Dosis ÄNH von 5 bis zu 80 mg/kg Körpergewicht. 242 von 296 behandelten Ratten starben später an malignen und meist multiplen Tumoren des Nervensystems. Geschwülste des Gehirns, Ependyome, Oligodendrogliome, Astrocytome und Mischgliome wurden in 144 Fällen beobachtet, des Rückenmarks bei 70, von Hirnnerven bei 89 und des PNS bei 140 Ratten. 9 Ratten hatten Herz-Tumoren, die in 7 Fällen als maligne Neurinome klassifiziert wurden. — In allen 3 Altersgruppen ergaben sich klare Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Die Empfindlichkeit des Nervensystems gegen das carcinogene ÄNH, beurteilt nach der Tumor-Ausbeute und der Länge der Latenzzeit in den einzelnen Dosierungsgruppen nahm während des ersten Monats auf etwa den zehnten Teil ab. Auf der anderen Seite stieg die Häufigkeit von Nephroblastomen mit dem Alter bei der Behandlung und der Dosis. Da ÄHN nach einmaliger subcutaner Injektion von 20 mg/kg an neugeborene oder 10 Tage alte Ratten in praktisch allen Fällen zu malignen Tumoren des Nervensystems führte, stellt dies ein sehr einfaches Modell dar für morphogenetische, biochemische und immunologische Untersuchungen in der Neurooncologie.

1. Problemstellung

Die Erzeugung von Krebs kann als „Verstärkerwirkung“ grundsätzlich durch eine einmalige Dosis auch von sehr kurzlebigen Carcinogenen wie z. B. Alkyl-nitrosoharnstoff-Verbindungen regelmässig erreicht werden (Druckrey u. Mitarb., 1964; Druckrey, 1967). Damit wurde es möglich, die Empfindlichkeit in verschiedenen Stadien der pränatalen und postnatalen Entwicklung systematisch

* Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

** Dissertation, Mediz. Fakultät der Universität Freiburg.

zu prüfen. Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, daß die einmalige Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff (ÄNH), 1,2-Diäthylhydrazin, Azo- oder Azoxy-äthan an schwangere Ratten zwischen dem 12. und letzten Tage der Gestation noch in sehr kleiner Dosis von 4% der LD 50 bei praktisch allen Nachkommen zu malignen Tumoren speziell des Nervensystems führt (Ivankovic u. Druckrey, 1968; Druckrey u. Mitarb., 1968 u. 1970). Bisher wurden insgesamt mehr als 1000 Fälle beobachtet.

Die Empfindlichkeit der *Feten* war in den letzten Tagen vor der Geburt am größten. An *erwachsenen* Ratten war dagegen eine etwa 50fach höhere Dosis ÄNH für die gleiche Wirkung erforderlich. Dabei wurde Krebs außer im Nervensystem auch in den verschiedensten Organen beobachtet. Nach der Geburt nimmt also nicht nur die Empfindlichkeit erheblich ab, sondern es ändert sich auch die Lokalisation der Tumoren. Es war daher zu prüfen, *wann* diese Änderungen erfolgen, und ob die in den transplacentaren Versuchen fast ausschließlich beobachtete Entstehung neurogener Malignome auf der neurotrophen Wirkung der Substanzen beruht oder nur auf der besonderen Empfindlichkeit des Nervensystems während der pränatalen Entwicklung. Der damit angesprochene Zeitfaktor hat für die Ursachenforschung des Krebs besondere Bedeutung.

2. Literatur

Neugeborene Tiere, vor allem *Mäuse*, sind im letzten Jahrzehnt häufig zur Prüfung chemischer Carcinogene verwendet worden. Pietra u. Mitarb. (1959) beobachteten nach einmaliger subcutaner Injektion von 30 mcg 7,12-Dimethylbenzanthrazen maligne Lymphome, die bereits nach 105 Tagen auftraten. Doell u. Carnes (1962) erzeugten Lymphome der Thymus durch Urethan. Hepatome konnten durch verschiedene Carcinogene erzeugt werden (Toth u. Mitarb., 1964; Nishizuka u. Mitarb., 1965; Klein u. Weisburger, 1966; Toth u. Shubik, 1967). Die mehrfach beschriebene Entstehung von Lungen-Adenomen kann hier außer Betracht bleiben, weil es gutartige Tumoren sind, die bei zahlreichen Mäusestämmen auch „spontan“ vorkommen. Neurogene Malignome wurden nicht beobachtet.

An neugeborenen *Ratten* konnten Terracini u. Magee (1964) durch einmalige Gabe von Dimethylnitrosamin anaplastische Nierentumoren erzeugen. Urethan führte in Versuchen von Vesselinovitch u. Mihailovich (1968) mit hoher Ausbeute zu malignen Tumoren in verschiedenen Organen, auch im Gehirn und Nervensystem. Della Porta (1968) empfahl die Verwendung neugeborener Tiere als besonders empfindlichen Test und betonte: "The sooner in life treatment is started, the stronger is the carcinogenesis response." In einer kritischen Literatur-Übersicht warnte Toth (1968) vor Verallgemeinerungen und wies mit Recht darauf hin, daß eine Beurteilung nur durch quantitative Vergleichsversuche an neugeborenen und erwachsenen Tieren möglich sei, die meist nicht durchgeführt wurden.

3. Methodik

Um die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche an fetalen und erwachsenen Ratten (Ivankovic u. Druckrey, 1968) zu gewährleisten, wurden die vorliegenden Untersuchungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt, nämlich mit ÄNH bei einmaliger Dosis an BD IX-Ratten. Sie erfolgten streng quantitativ in mehreren Dosierungsgruppen an jeweils 3 Altersklassen.

Das ÄNH wurde von R. Preussmann synthetisiert. Die Spezifikationen für die Identität, Reinheit und Stabilität der Substanz in wäßriger Lösung sind bereits ausführlich mitgeteilt worden (Druckrey u. Mitarb., 1967).

Die verwendeten BD IX-Ratten (CPAH, wildfarben) verhalten sich nach Bruder-Schwester-Inzucht über mehr als 50 Generationen sehr einheitlich und sind daher für quantitative Versuche hervorragend geeignet. O. Stark (mündl. Mittlg.) konnte inzwischen nachweisen, daß Haut-Transplantate bei Geschwistern dieses Stammes anwachsen und toleriert

werden. Die Genotypen und Phänotypen der BD-Stämme wurden bereits beschrieben (Druckrey u. Mitarb., 1962).

Für die vergleichende Prüfung der Empfindlichkeit erschienen die ersten Wochen nach der Geburt von besonderem Interesse. Deswegen erfolgte die einmalige Applikation von ÄNH an Ratten im Alter von einem, 10 und 30 Tagen. Die Dosierungsgruppen umfassen den Bereich von 5–80 mg/kg Körpergewicht mit dem Faktor 2 ansteigend. Die Applikation erfolgte stets in wäßriger 0,9%iger Kochsalzlösung. Insgesamt wurden 296 Ratten verwendet. Die Versuche begannen 1966.

Als Standard-Diät dienten Altromin und Latz-Kekse im Wechsel unter Zufütterung von Salat bzw. Mohrrüben einmal in der Woche. Getränk war Wasser. Die oft sehr charakteristischen klinischen Symptome der Entwicklung von neurogenen Tumoren sowie die Präparation des Nervensystems bei der Sektion wurden bereits eingehend von Ivankovic u. Druckrey (1968) beschrieben. Die histologischen Diagnosen und Klassifizierungen der neurogenen Tumoren verdanken wir Prof. H. J. Zülch, Dozent Dr. W. Wechsler u. Dr. H. D. Mennel vom Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Köln, die der anderen Geschwülste Dozent C. Thomas, Pathologisches Institut in Freiburg. Eine Reihe von Präparaten wurde im eigenen Institut von S. Ivankovic untersucht. Bei der quantitativen Auswertung wurden nur maligne Tumoren berücksichtigt. Die Kontrolle der Malignität erfolgte an mehreren Beispielen durch Transplantation auf Ratten des gleichen Stammes. Sie war stets erfolgreich.

4. Versuche und Ergebnisse

4.1. Neugeborene Ratten

Die Applikation des ÄNH war am ersten Tag nach der Geburt nur durch *subcutane Injektion* möglich. Die Tiere wurden nach der Injektion kurz über die Genitalregion der Muttertiere gestreift, um körperfremde Gerüche zu überdecken. Unter diesen Umständen machte die Aufzucht keine Schwierigkeiten.

Die Bestimmung der akuten Toxizität ergab eine LD 50 von 240 mg/kg, ähnlich wie bei erwachsenen Ratten. Im transplacentalen Versuch waren 80 mg/kg für die Feten bereits letal. Die Empfindlichkeit gegenüber der akuten Giftwirkung nimmt also nach der Geburt auffallend schnell ab. 80 mg/kg wurden gut vertragen. Da ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse an neugeborenen Tieren mit denen nach Exposition am letzten Tag vor der Geburt besonders wichtig erschien, wurden 5 Dosierungsgruppen angesetzt. Die Gesamtzahl der untersuchten neugeborenen Tiere betrug 91.

5 mg/kg. Von 28 behandelten Tieren starben 9 im Alter von 238–809 Tagen an malignen Tumoren des Nervensystems. Die mittlere Absterbezeit betrug 500 Tage. 8 Geschwülste, Ependymome oder Gliome von meist beträchtlicher Ausdehnung (Abb. 1a), lagen im Gehirn. Ein weiteres Tier hatte ein Ependyom des Rückenmarks, das sich über den ganzen Lumbalbereich erstreckte. Tumoren in anderen Organen wurden nicht beobachtet. 19 der 28 Ratten starben ohne Tumor. Die Ausbeute beträgt also rund 32%. Die zahlenmäßigen Ergebnisse sind zur Vereinfachung und besseren Übersicht mit denen aller anderen Dosierungs- und Altersgruppen in der Tab. 1 zusammengefaßt.

10 mg/kg. Es wurden 16 Ratten aufgezogen. 11 von ihnen gingen zwischen dem 161. und 487. Tage an neurogenen Malignomen zugrunde. Die mittlere Induktionszeit war mit 310 Tagen signifikant kürzer als im Versuch mit der halben Dosis. Nur 2 Tiere hatten Hirntumoren, eines davon ein Astrocytom. An Hirnnerven wurden 10 Fälle von malignen Neurinomen beobachtet. 9 betrafen den N. trigeminus (Abb. 2a), in 3 Fällen beidseitig, und 1 den N. stato-acusticus. 2 Ratten hatten Tumoren im Rückenmark und 7 im peripheren Nervensystem (PNS) an

einem Plexus brachialis oder lumbosacralis, am Ischiadicus oder an motorischen Wurzeln. Bei einem weiteren Tumor im Mesenterium konnte der neurogene Ursprung histologisch nachgewiesen werden. Die meisten Ratten hatten zwei Tumoren in verschiedenen Teilen des Nervensystems. 5 Ratten starben ohne Geschwulst.

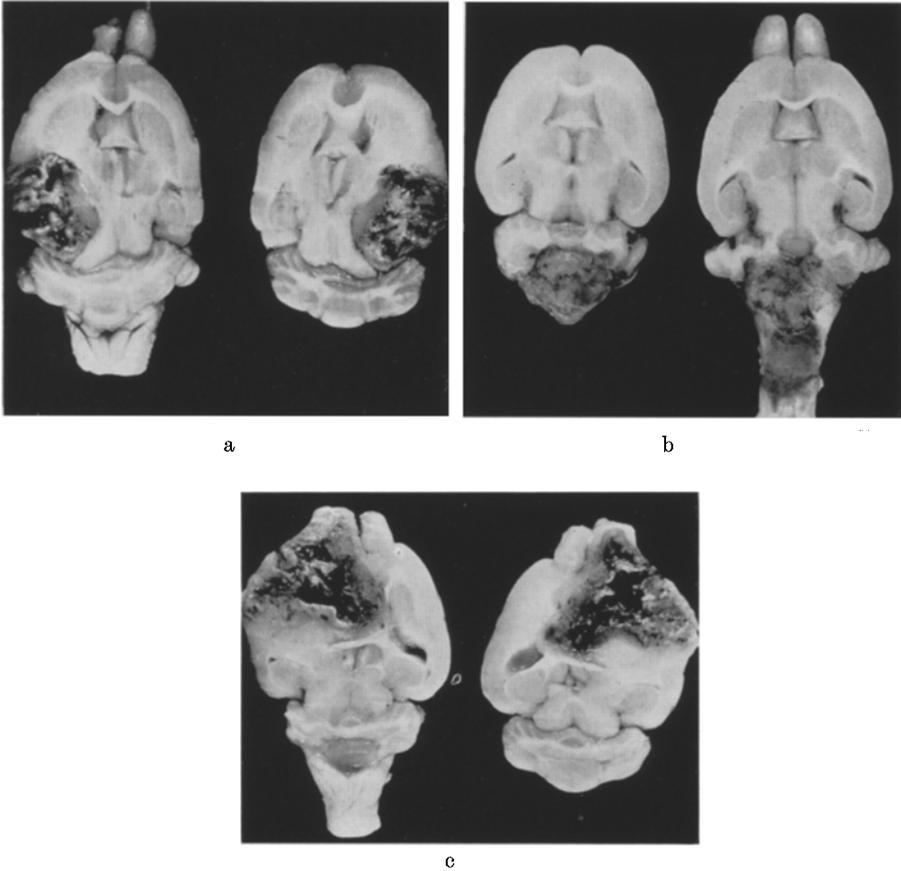


Abb. 1 a—c. Hirntumoren nach einmaliger Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff an neugeborene bzw. 10 Tage alten BD IX-Ratten. a Mischgliom in der Ammonshorn-Region, 5 mg/kg subcutan am 1. Lebenstag, Tod nach 548 Tagen. b Ependymom, 10 mg/kg oral am 10. Tage, Tod nach 468 Tagen. c polymorphes Mischgliom, 10 mg/kg oral am 10. Tage, Tod nach 420 Tagen

20 mg/kg. Hier starben alle eingesetzten 16 Ratten an malignen Tumoren des Nervensystems. Insgesamt wurden 35 Geschwülste beobachtet, im Durchschnitt waren es 2,2 pro Tier. Davon lagen 3 (2 Ependymome und 1 Astrocytom) im Gehirn, 13 an Hirnnerven, 6 im Rückenmark und 12 im PNS. Ein Tier hatte ferner ein pflaumengroßes Nephroblastom. Das Alter beim Tode lag zwischen 187 und 280 Tagen mit einem Mittelwert von 240 Tagen.

40 mg/kg. Bei 15 Ratten wurden 35 neurogene Malignome beobachtet. 5 lagen im Gehirn, 8 an Hirnnerven, meist Trigemini und je 11 im Rückenmark bzw. PNS.

In einem Falle wurde ein Sarkom des Uterus gefunden. Die Absterbezeiten lagen zwischen 133 und 409 Tagen, das mittlere Todesalter war 205 Tage.

80 mg/kg. Alle 16 Ratten starben zwischen dem 98. und 255. Tage an Krebs. Der Mittelwert betrug 183 Tage. 47 Tumoren lagen im Nervensystem, davon 9 im Gehirn, 15 an Hirnnerven, 9 im Rückenmark und 14 im PNS. Die letzteren waren

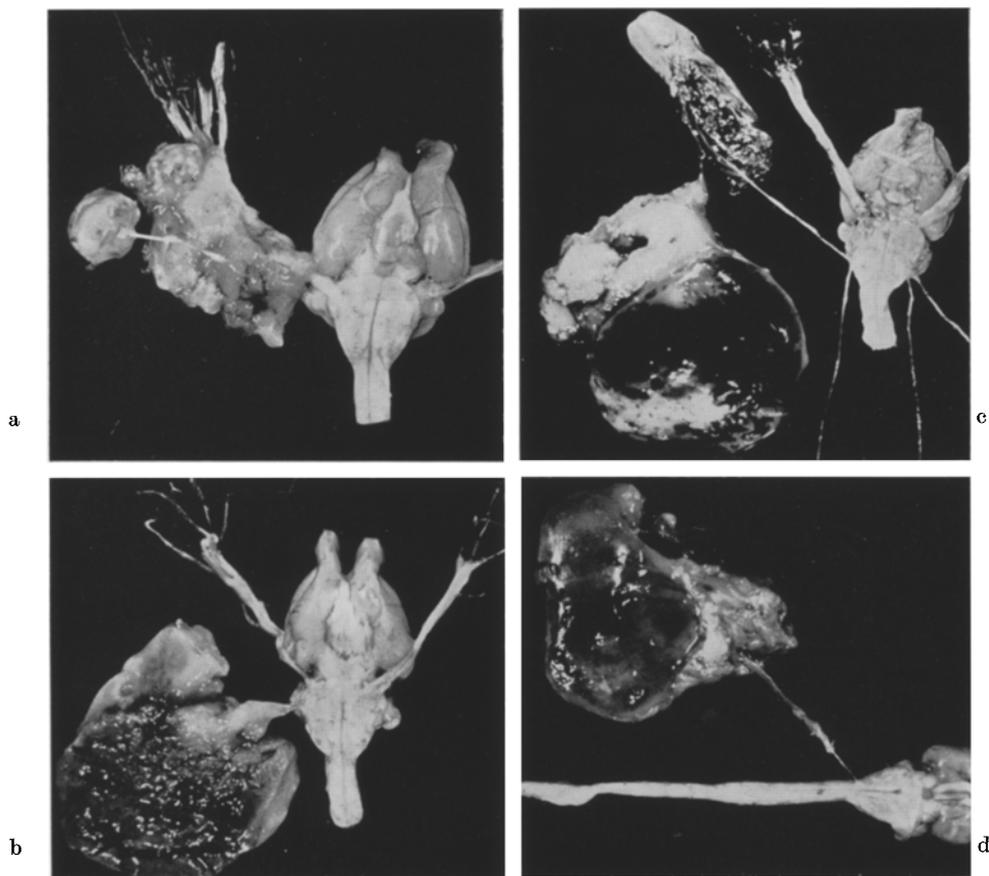


Abb. 2a—d. Maligne Neurinome von Hirnnerven nach einmaliger subcutaner Injektion von Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH) an neugeborene bzw. 10 Tage alte Ratten. a des Ganglion Gasseri und Trigemini, 10 mg/kg am 1. Lebenstag, Tod nach 161 Tagen. b des Statioacusticus 10 mg/kg am 10. Tage, Tod nach 479 Tagen. c des Hypoglossus, 10 mg/kg am 10. Tag, Tod nach 650 Tagen. d des Vagus, 40 mg/kg am 10. Tag, Tod nach 260 Tagen

in 9 Fällen von einem Plexus lumbosacralis ausgegangen, kirsch- bis walnußgroß und meist in das Rückenmark bzw. die Cauda equina vorgewachsen; bei 2 Ratten betrafen sie den Plexus brachialis und bei den restlichen 3 motorische Wurzeln des Rückenmarks. Ein Tier hatte ein malignes Neurinom des Dünndarms. Ferner wurden bei 4 der 16 Ratten große Nephroblastome beobachtet.

Die Steigerung der Dosis hatte also nicht nur eine erhebliche Zunahme der Tumor-Ausbeute von 9 auf 51 zur Folge, sondern auch eine signifikante Ver-

kürzung des mittleren Absterbealters von 500 auf 183 Tage (Tab. 1 u. 3). Auffällig ist ferner das Auftreten von Nephroblastomen bei der höchsten Dosierung. Darauf wird zurückzukommen sein.

4.2. 10 Tage alte Ratten

In diesem Alter beträgt das Körpergewicht der BD IX-Ratten bereits 20 ± 4 g, so daß eine Applikation durch Magensonde möglich war. Deswegen wurde ÄNH vergleichend nach subcutaner und oraler Gabe untersucht. Die niedrigste Dosis von 5 mg/kg kam in Fortfall, weil mit einer Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber neugeborenen Ratten gerechnet werden konnte.

4.21. Subcutane Injektion

10 mg/kg. Von 29 behandelten Ratten starben 21 im Alter von 241–694 Tagen (Mittelwert 500 Tage) an malignen Tumoren ausschließlich des Nervensystems. Sie lagen bei 13 Tieren im Gehirn und gingen in 5 Fällen von Hirnnerven aus, 3 vom Trigeminus und je 1 vom N. stato-acusticus bzw. hypoglossus (Abb. 2 b u. c). 6 Ratten hatten Tumoren des Rückenmarkes (Abb. 3a) und 9 des PNS. Ferner wurde ein kastaniengroßer abdominaler Tumor gefunden, der von einem Mesenterial-Nerven ausging und als malignes Neurinom diagnostiziert wurde. 8 Ratten blieben ohne Tumor.

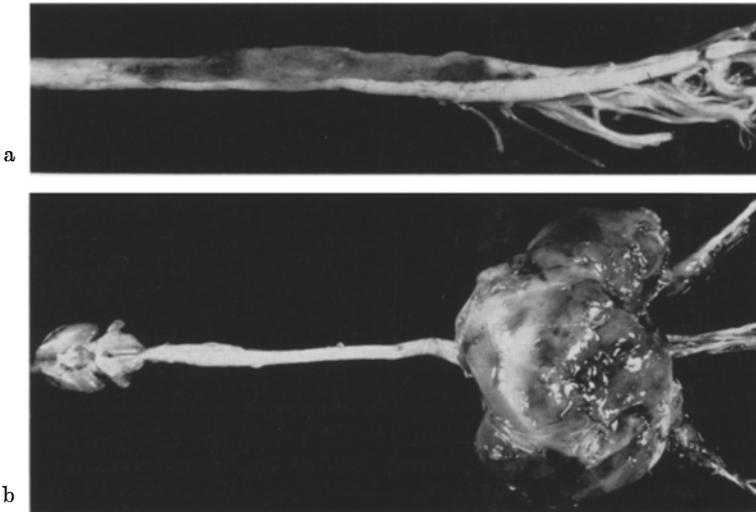


Abb. 3a u. b. Mischgliom des Rückenmarks (a) nach einmaliger s. c. Injektion von 10 mg ÄNH pro kg am 10. Tage, Tod nach 647 Tagen. Malignes Neurinom beider Plexus lumbosacrales (b) mit Ausdehnung auf beide N. ischiadici nach 40 mg/kg i. v. am 30. Tage. Tod nach 280 Tagen

20 mg/kg. 16 von 18 behandelten Ratten entwickelten maligne Tumoren, die im Alter von 181–515 Tagen zum Tode führten. Die mittlere Absterbezeit war 350 Tage. 9 Ratten hatten Tumoren im Gehirn. An Hirnnerven wurden 3 Geschwülste beobachtet, und zwar je ein malignes Neurinom eines N. trigeminus und facialis sowie erstmalig ein Gliom des opticus. 6 Fälle betrafen das Rücken-

mark und 12 das PNS. Die Gesamtzahl der neurogenen Malignome betrug also 30 an 16 Ratten. Ein Tier hatte ferner ein hellzelliges Carcinom eines Ovars. 2 Ratten entwickelten keinen Tumor.

40 mg/kg. Alle 19 Ratten starben nach einer mittleren Induktionszeit von 300 Tagen an neurogenen Malignomen. Sie verteilten sich wie folgt: Gehirn 12, Hirnnerven 7, davon 6 am Trigemini und 1 vom N. vagus ausgehend (Abb. 2d), Rückenmark 7 und PNS ebenfalls 7. Eine Ratte hatte zusätzlich ein hellzelliges Ovarial-Carcinom, eine andere ein subcutanes Sarkom, das einzige, das bei den insgesamt 157 subcutan injizierten Tieren beobachtet wurde.

4.22. Orale Gabe

Die Applikation der wäßrigen Lösung von ÄNH erfolgte durch eine stumpfe, leicht gebogene Metallkanüle, die zwecks genauer Dosierung auf eine Tuberkulinspritze aufgesetzt war. Die Kanüle wurde vorher mit Wasser oder Öl benetzt, um sie gleitfähig zu machen.

10 mg/kg. 23 der 26 behandelten Ratten starben im Alter zwischen 226 und 870 Tagen (Mittelwert 520) an neurogenen Tumoren. 21 von ihnen hatten Geschwülste im Gehirn (Abb. 1 b u. c). Die weiteren Fälle betrafen: Trigemini 3, Rückenmark 4 und PNS 10. Eine Ratte hatte einen Tumor im Rectum (Abb. 4). Es wurde als faserreiches Neurofibrom mit Ausgang von Schwannschen Zellen diagnostiziert. In dieser Serie kam zum ersten Mal ein Tumor im Herzen zur Beobachtung. Er lag im linken Ventrikel, war von glasig-weicher Konsistenz und füllte die Kammer fast vollständig aus (Abb. 5a). Die Diagnose ergab ein malignes Neurinom mit sarkomatösem Anteil. Danach ist ein Ausgang von Fasern des N. vagus anzunehmen. Schließlich wurde je ein Fall von Ovarial-Carcinom und von Sarkom des Uterus gefunden. 3 Ratten blieben negativ.

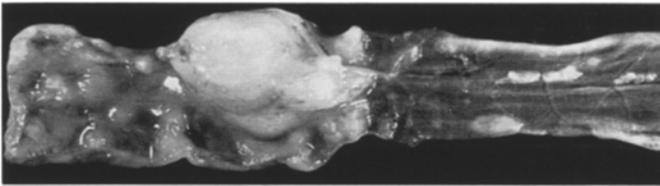


Abb. 4. Neurofibrom des Rectum nach einmaliger oraler Gabe von ÄNH, 10 mg/kg am 10. Tage. Tod nach 479 Tagen

20 mg/kg. Von 18 Tieren entwickelten 17 maligne Tumoren und zwar ausschließlich im Nervensystem. Sie verteilten sich auf Gehirn 14, Trigemini 4, Rückenmark 5 und PNS 15. Außerdem wurde wieder ein Herz-Tumor im linken Ventrikel beobachtet. Auch hier konnte der neurogene Ursprung histologisch gesichert werden. Insgesamt wurden also bei den 17 positiven Ratten 38 verschiedene Tumoren gefunden. Die mittlere Absterbezeit betrug 370 Tage. 1 Tier hatte keine Geschwulst.

40 mg/kg. 19 von 20 behandelten Ratten starben an neurogenen Malignomen. In 13 Fällen lagen sie im Gehirn. 6 gingen vom Trigemini aus und einer vom Bulbus olfactorius, ein entdifferenziertes Neuroblastom. 6 Tumoren lagen im

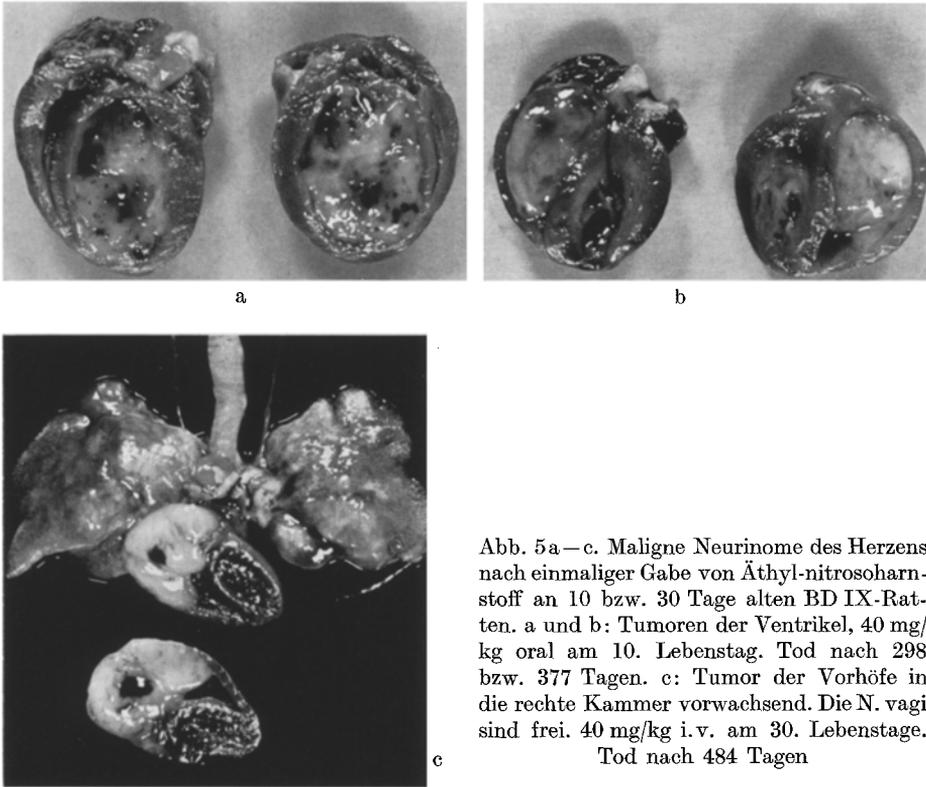


Abb. 5a—c. Maligne Neurinome des Herzens nach einmaliger Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 bzw. 30 Tage alten BD IX-Ratten. a und b: Tumoren der Ventrikel, 40 mg/kg oral am 10. Lebenstag. Tod nach 298 bzw. 377 Tagen. c: Tumor der Vorhöfe in die rechte Kammer vorwachsend. Die N. vagi sind frei. 40 mg/kg i. v. am 30. Lebenstage. Tod nach 484 Tagen

Tabelle 1. Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems durch einmalige Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff an neugeborenen und jungen Ratten

Alter Tag	Applikation	Dosis mg/kg	Ratten		neurogene Malignome				andere Organe
			pos.	neg.	Gehirn	Rückenmark	Hirnnerven	PNS	
1	s. c.	5	9	19	8	1	0	0	0
	s. c.	10	11	5	2	2	10	7	0
	s. c.	20	16	0	3	6	13	12	1
	s. c.	40	15	0	5	11	8	11	1
	s. c.	80	16	0	9	9	15	14	4
10	s. c.	10	21	8	13	6	5	9	0
	oral	10	23	3	21	4	3	10	2
	s. c.	20	16	2	9	6	3	12	1
	oral	20	17	1	14	5	4	15	0
	s. c.	40	19	0	12	7	7	7	2
	oral	40	19	1	13	6	7	19	2
	oral	80	16	0	8	5	6	10	9
30	i. v.	20	18	11	10	0	3	4	6
	i. v.	40	15	3	10	0	4	4	4
	i. v.	80	16	1	7	2	1	6	10
Summe			242	54	144	70	89	140	42

Rückenmark und 19 betrafen das PNS, meist einen Plexus lumbosacralis. In dieser Gruppe wurden 2 Herz-Tumoren beobachtet, und zwar im linken bzw. rechten Ventrikel (Abb. 5b). Beide erwiesen sich histologisch als maligne Neurinome. 2 Ratten hatten Nephroblastome. Die Gesamtzahl der malignen Tumoren betrug 47 an 19 Ratten, pro Ratte also im Durchschnitt 2,5. Die mittlere Absterbezeit war mit 310 Tagen praktisch die gleiche wie nach subcutaner Gabe der gleichen Dosis. 1 Tier blieb negativ.

80 mg/kg. Hier entwickelten alle 16 Ratten maligne Tumoren. Die Fälle verteilten sich auf Gehirn 8, Trigeminus 6, Rückenmark 5 und PNS 10. Der auffälligste Befund war der, daß nach dieser hohen Dosierung bei nicht weniger als 9 von 16 Ratten Nephroblastome von beträchtlicher Größe und z. T. beidseitig beobachtet wurden. Die mittlere Absterbezeit betrug 215 Tage, die Gesamtzahl maligner Tumoren 38, also durchschnittlich 2,5 pro Tier.

Auch in dieser Altersgruppe ist die Zunahme der Tumor-Ausbeute und die Abnahme der Latenzzeit mit steigender Dosis eindeutig erkennbar. Die Ergebnisse waren nach subcutaner Injektion praktisch die gleichen wie nach oraler Gabe (Tab. 1 u. 3). Die Empfindlichkeit der 10 Tage alten Ratten war signifikant geringer als die der neugeborenen Tiere, und zwar entsprechen die Ergebnisse jeder Dosierungsgruppe sowohl nach der Ausbeute an Tumoren als auch nach der Länge der Latenzzeit ziemlich genau denen der um die Hälfte kleineren Dosierung bei den neugeborenen Tieren. In dieser Hinsicht verhalten sich die Empfindlichkeiten also etwa wie 1 : 2. Das gilt indessen ausschließlich für die neurogenen Malignome. Bei den Nephroblastomen ist es dagegen umgekehrt. Besonderes Interesse verdienen die 4 neurogenen Herz-Tumoren, die sämtlich nach oraler Gabe beobachtet wurden.

4.3. 30 Tage alte Ratten

Das mittlere Körpergewicht betrug 60 ± 7 g. In diesem Alter war bereits die intravenöse Injektion in den Schwanz möglich. Sie wurde gewählt, weil die Behandlung in den vorangegangenen transplacentaren Versuchen und an erwachsenen Ratten ebenfalls intravenös erfolgt war. Außerdem schien die Frage interessant, ob die Wirkung des ANH in der postnatalen Carcinogenese von der Applikationsart abhängt. Wegen der zu erwartenden geringeren Empfindlichkeit der 30 Tage alten Ratten wurde 20 mg/kg als kleinste Dosis gewählt.

20 mg/kg. Da mit einer vergleichsweise geringeren Tumor-Ausbeute zu rechnen war, wurde auch in dieser Altersgruppe bei der schwächsten Dosis die größte Tierzahl behandelt, nämlich 29. 18 von ihnen starben im Alter von 270–750 Tagen (Mittelwert 600 Tage) an malignen Tumoren. 10 Ratten hatten Tumoren im Gehirn. In 3 Fällen gingen sie von Hirnnerven aus, je einer vom N. acusticus, facialis bzw. vagus, und 4 lagen im PNS. Rückenmarks-Tumoren wurden in dieser Serie nicht gefunden. Eine Ratte hatte einen Herz-Tumor im linken Ventrikel, der als malignes Neurinom diagnostiziert wurde. Bei einem weiblichen Tier fand sich ein kirschgroßer subcutaner Tumor im Bereich einer Brustdrüse, der zunächst als Mamma-Carcinom imponierte. Die histologische Diagnose ergab einen neurosarkomatösen Misch tumor. Er wurde zur weiteren Klärung auf BD IX-Ratten transplantiert. Die schnell wachsenden Tumoren erwiesen sich als maligne Neurinome. 2 Tiere hatten hellzellige Ovarialcarcinome, 2 weitere Sarkome im Uterus

und 1 ein Sarkom der Leber. Das Vorhandensein von *Cysticercus* konnte ausgeschlossen werden. 11 Ratten blieben ohne Tumor.

40 mg/kg. Von 18 behandelten Ratten entwickelten 15 neurogene Malignome. In 10 Fällen lagen sie im Gehirn, 3 gingen vom Trigeminus aus und 1 vom Vagus. Im Rückenmark wurde kein Tumor gefunden, im PNS 4 Fälle von Geschwülsten des Ischiadicus bzw. Plexus lumbosacralis (Abb. 3b). Eine Ratte hatte einen Tumor im Herzen, der sich über beide Vorhöfe erstreckte, ein Neurinom. Wie die Abb. 5c zeigt, konnten beide N.vagi bis zum Herzen freipräpariert werden. Der Ursprung ist also in den Vorhöfen selbst zu suchen. 3 Ratten hatten Nephroblastome und 1 ein Sarkom des Uterus. 3 Ratten blieben negativ. Die mittlere Absterbezeit betrug 410 Tage.

80 mg/kg. 16 von 17 Ratten starben an malignen Tumoren. Die neurogenen Geschwülste verteilten sich auf: Gehirn 7, N. vagus 1, Rückenmark 2 und PNS 6. In dieser Gruppe wurden sogar 3 Herz-Tumoren beobachtet. In einem Falle handelte es sich um eine Sarkomatose. Bei den beiden anderen, die den rechten Vorhof betrafen, konnte eine histologische Klassifizierung noch nicht gegeben werden. 3 Ratten hatten Carcinome der Ovarien und 2 Sarkome des Uterus. Unter den 16 positiven Tieren hatten nicht weniger als 7 Nephroblastome (Abb. 6), also fast die Hälfte. Eine Ratte blieb ohne Tumor. Die mittlere Absterbezeit war 350 Tage.

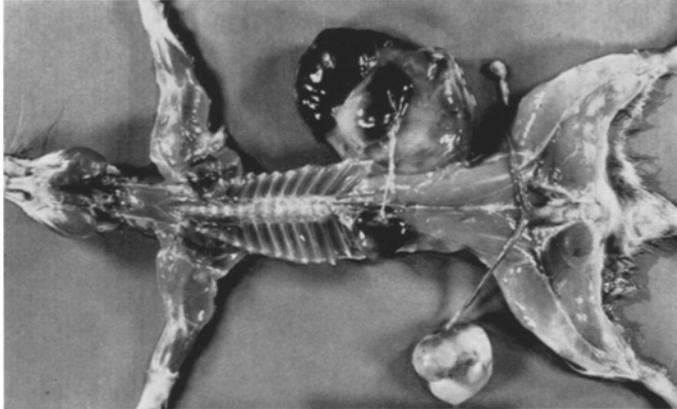


Abb. 6. Ausgedehntes Nephroblastom links und beginnendes der rechten Niere sowie hellzelliges Carcinom eines Ovars nach einmaliger intravenöser Injektion von ANH, 80 mg/kg am 30. Lebenstage. Tod nach 321 Tagen

Bei 30 Tage alten Ratten war die carcinogene Wirkung deutlich schwächer als bei jüngeren Tieren. Die Tumor-Ausbeute und die Länge der Latenzzeit nach der höchsten Dosis von 80 mg/kg entspricht etwa der nach 20 mg/kg bei 10 Tage alten und 10 mg/kg bei neugeborenen Tieren (Tab. 1 u. 3). Die Häufigkeit der extraneuralen Geschwülste nahm dagegen mit steigendem Alter und mit wachsender Dosierung erheblich zu.

5. Die Tumoren

Die Gesamtausbeute an malignen Tumoren betrug 485, die sich auf 242 positive Ratten verteilen. 443 Geschwülste betrafen das Nervensystem (Tab. 1).

5.1. Gehirn, Hirnnerven, Rückenmark und PNS

Die Lokalisation der Tumoren zeigte keine charakteristische Abhängigkeit von der Dosis ANH, wohl aber vom Alter der Ratten bei Gabe des ANH. Die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Systeme ist in Tab. 2 zusammengestellt. Die relative Ausbeute an Hirntumoren steigt von 18% bei neugeborenen auf 53% bei 30 Tage alten Ratten an. Die Häufigkeit von Geschwülsten der Hirnnerven und vor allem im Rückenmark nimmt dagegen ab, während die Zahlen für das PNS etwa gleich bleiben.

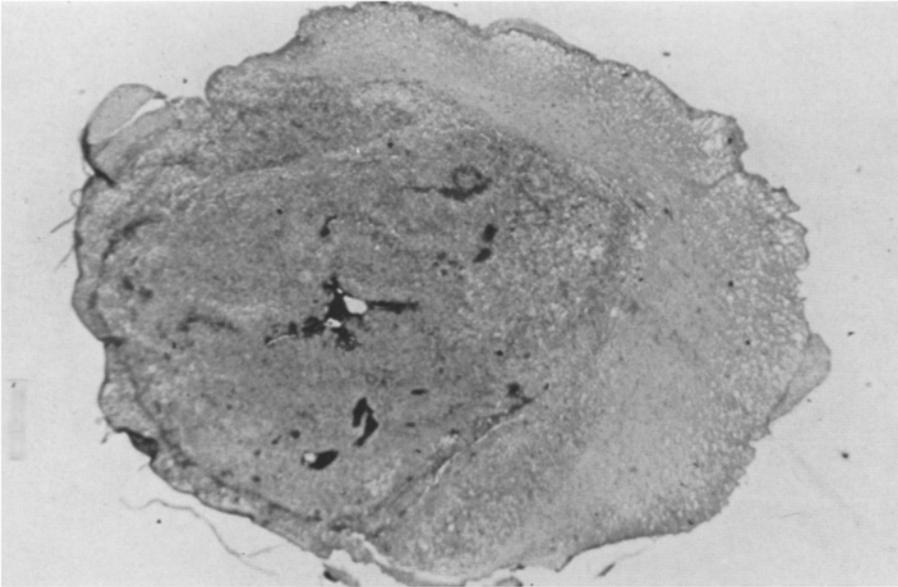
Tabelle 2. Prozentuale Verteilung der Malignome im Nervensystem, abhängig vom Alter der BD IX-Ratten bei einmaliger Gabe von ANH

Alter Tage	Prozent Malignome			
	Gehirn	Hirn- Nerv	Rücken- mark	PNS
1	18	32	20	30
10	37	14	16	33
30	53	16	4	27

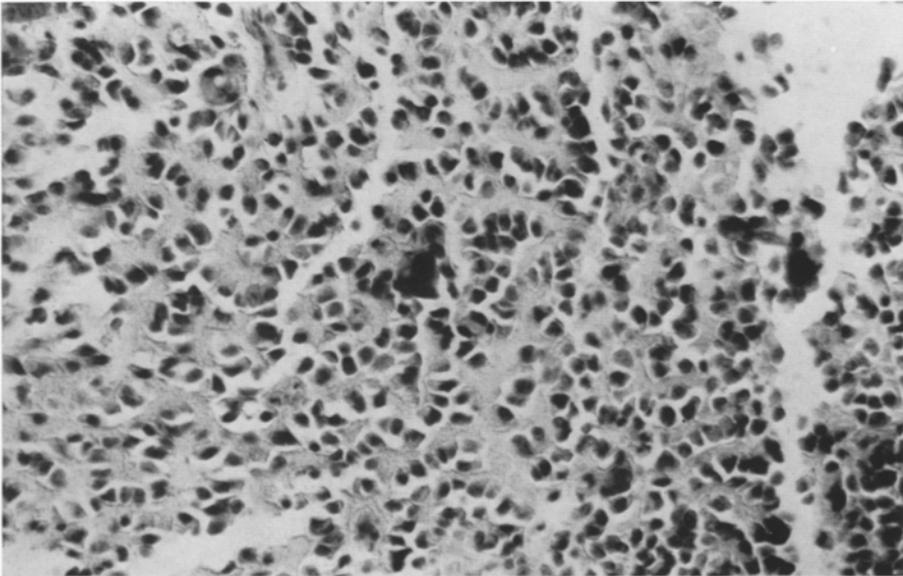
Hirntumoren wurden in 144 Fällen (32%) beobachtet. Sie fanden sich in allen Teilen des Gehirns und waren meist von beträchtlicher Größe. Die in den vorausgegangenen transplacentalen Versuchen auffällige Häufung der Lokalisation im Bereich des Ammonshorn war hier nicht erkennbar. Histologisch fanden sich praktisch die gleichen Geschwulsttypen. Da sie bereits ausführlich beschrieben wurden (Ivankovic u. Druckrey, 1968; Wechsler u. Mitarb., 1969 sowie Zülch, 1969), kann hier auf eine nochmalige Darstellung verzichtet werden. Bemerkenswert war die relative Häufigkeit von Ependymomen. Ferner wurden Oligodendrogliome, vereinzelt auch reine Astrocytome, meist aber gemischte Gliome und gliös-mesodermale Kompositionstumoren gefunden, sowie in wenigen Fällen Medulloblastome.

Im *Rückenmark* lagen 89 Tumoren (20%). Sie erstreckten sich lanzettförmig über einen weiten Bereich und lagen meist im Lumbalmark (Abb. 3a). Vereinzelt beobachtete Geschwülste des cervicalen Teils waren nur klein, weil sie bald zum Tode führten. Die histologische Untersuchung ergab Oligodendrogliome, pleomorphe Gliome, Medulloblastome oder Ependymome (Abb. 7), häufig aber auch maligne Neurinome, die offenbar von motorischen Wurzeln ausgingen. Geschwülste der Plexus brachiales oder lumbosacrales waren oft in das Rückenmark eingewachsen (Abb. 3b), wurden aber bei der Auswertung dem PNS zugeordnet.

Von *Hirnnerven* gingen 70 Geschwülste (16%) aus. Die überwiegende Mehrzahl betraf die N. trigemini bzw. ganglion Gasseri (Abb. 2a). Diese Tumoren waren meist sehr ausgedehnt und unter Zerstörung der Knochen in die Nasenhöhle oder Orbita vorgewachsen. Andere Hirnnerven waren nur selten betroffen. Eine Geschwulst des Vagus (Abb. 2d) wurde bei 4, des Stato-acusticus (Abb. 2b) bei 3 und des Facialis bei 2 Ratten beobachtet. Je ein Tumor ging vom Olfactorius und vom Hypoglossus (Abb. 2c) aus. In allen Fällen waren es maligne Neurinome.



a



b

Abb. 7 a – c. Rückenmarks-Tumoren nach einmaliger s. c. Injektion von Äthyl-nitrosoharnstoff an junge BD IX-Ratten. a und b: Ependymom, 40 mg/kg am 10. Tage, H.E. 12,5 bzw. 160fach.

Schließlich wurde bei der histologischen Untersuchung ein Gliom eines N. opticus gefunden.

Als auffälliger Befund sei vermerkt, daß bei den im Alter von 30 Tagen behandelten 64 Ratten nur 3 Trigeminstumoren beobachtet wurden. Ihre Häufigkeit war in der pränatalen Carcinogenese mit 175 von 197 Geschwülsten der Hirn-

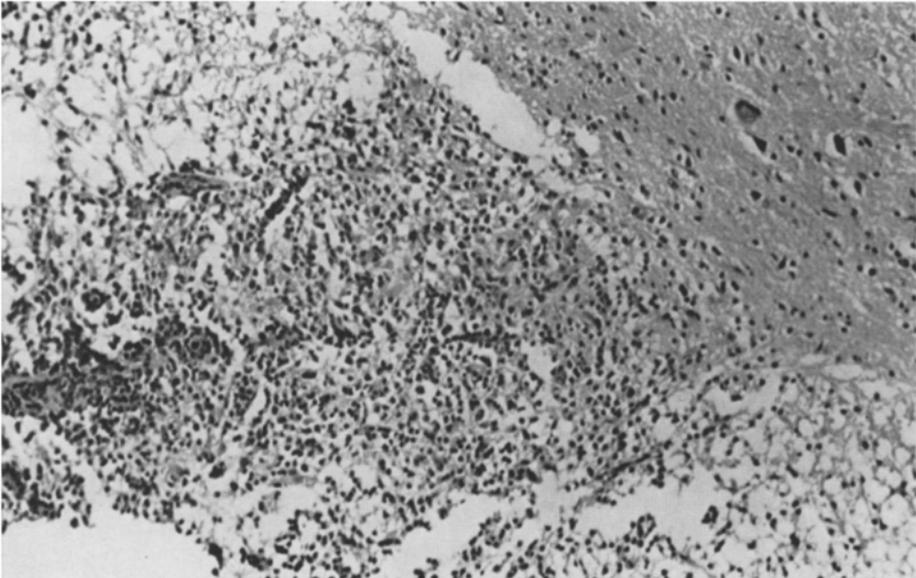


Abb. 7c: Oligodendro-Astrocytom, 40 mg/kg am 1. Tag, H.E. 125fach

nerven sehr hoch (Ivankovic u. Druckrey, 1968). Auch nach Gabe des ÄNH an neugeborene Ratten kamen sie fast ausschließlich vor, während in der Altersgruppe von 10 Tagen bereits in 6 von 35 Fällen andere Hirnnerven betroffen waren. Die Empfindlichkeit der N. trigemini nimmt also nach der Geburt erheblich ab. Darauf, sowie auf die vereinzelte Beobachtung maligner Tumoren des Olfactorius, Opticus und Statoacusticus, die bei der pränatalen Carcinogenese durch ÄNH niemals befallen waren, wird später eingegangen werden.

Im *PNS* fanden sich 140 Malignome (32%). Sie gingen meist vom Plexus lumbosacralis aus, erreichten eine beträchtliche Größe (Abb. 3) und waren von serösen oder blutigen Cysten durchsetzt. In anderen Fällen betrafen sie nur einen N. ischiadicus oder femoralis. Tumoren des Plexus brachialis waren weniger ausgedehnt und von fester Konsistenz. Einige solitäre Geschwülste im Thorax oder Bauchraum, die zunächst als Sarkome erschienen, konnten durch sorgfältige Präparation auf den Vagus bzw. auf motorische Nerven bezogen werden. Die histologische Untersuchung ergab in allen Fällen maligne Neurinome. Die Transplantation auf andere BD IX-Ratten führte stets zu schnell wachsenden Geschwülsten des gleichen Typs.

5.2. Neurogene Tumoren im Herzen und anderen Organen

Herz-Tumoren wurden bei 9 Ratten gefunden. Bei den am 1. Lebenstag mit ÄNH behandelten 91 Tieren war ebenso wie in den vorangegangenen pränatalen Versuchen keiner, in der Altersgruppe von 10 Tagen waren es 4 von 145, sämtlich nach oraler Gabe, und bei den im Alter von 30 Tagen intravenös behandelten Ratten sogar 5 von 64, also 8%. Die Empfindlichkeit nimmt demnach mit dem Alter deutlich zu. Diese Frage wird weiter untersucht. Die meisten Tumoren

wurden erst nach dem Aufschneiden des Herzens festgestellt. Dann zeigte sich, daß sie einen Ventrikel bzw. Vorhof weitgehend ausfüllten und als unmittelbare Todesursache angesehen werden mußten (Abb. 5).

In 6 der 9 Fälle konnten der neurogene Ursprung und die Diagnose Neurinom histologisch gesichert werden (Zülch, Mennel). Die Malignität kommt durch das infiltrative Wachstum zum Ausdruck (Abb. 8). Bei einer weiteren Ratte handelte

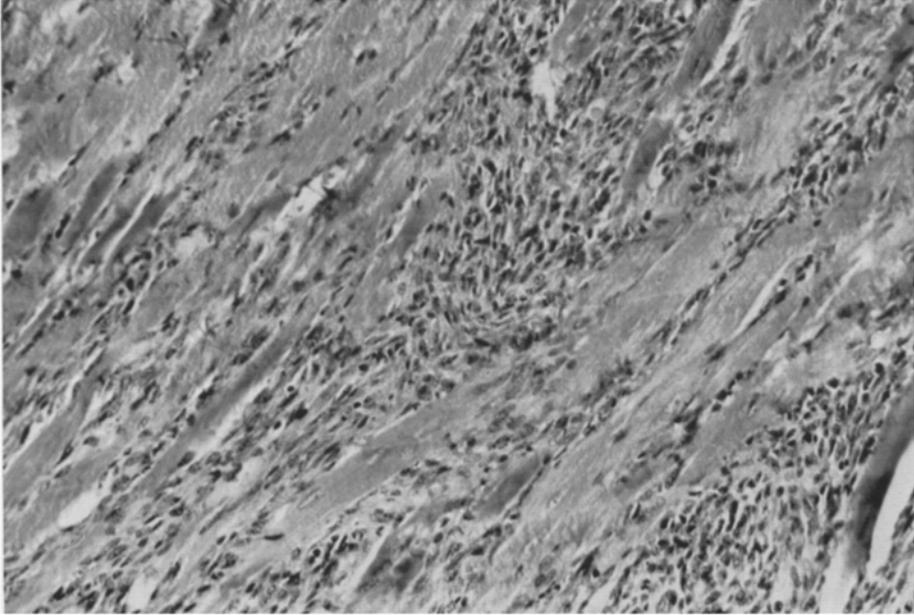


Abb. 8. Herz, malignes Neurinom bei einer Ratte, erzeugt durch einmalige orale Gabe von ÄNH, 40 mg/kg am 10. Lebenstag. H.E. 150fach

es sich um eine Sarkomatose der Herzmuskulatur, und in 2 Fällen steht die Zuordnung noch aus. Es sei vermerkt, daß wir seitdem auch nach Gabe von 1-Aryl-3,3-dialkyltriazinen an junge Ratten eine ganze Reihe von Herz-Tumoren ähnlicher Art beobachtet haben. Sie verdienen besondere Beachtung, zumal sie leicht übersehen werden. Über die Histologie wird Mennel gesondert berichten. Herz-Tumoren sind bei Ratten extrem selten (Strauss u. Merliss, 1945; Prichard, 1951), solche neurogenen Ursprungs bisher überhaupt nicht beschrieben. Kürzlich berichteten Vesselinowitsch u. Mihailovich (1968) über 5 Fälle von Herz-Tumoren bei 160 Ratten, die kurz nach der Geburt mit Urethan behandelt waren. Die Diagnose lautete: Anitschkow-Zell-Sarkome.

Neurogene Tumoren wurden ferner bei je 2 Tieren im Darm (Abb. 4) bzw. im Mesenterium gefunden und in einem Falle an einer Brustdrüse. Sie sind zwar extrem selten, kommen aber doch praktisch vor. Im Hinblick auf die neurotrophe Wirkung des ÄNH erscheint die Annahme eines Kausalzusammenhangs als hinreichend begründet.

5.3 Andere maligne Tumoren

Im Gegensatz zu den Malignomen des Nervensystems nahm die Häufigkeit von Geschwülsten anderer Organe mit dem Alter, in dem das ÄNH gegeben wurde, eindeutig zu. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, wurden in der 1. Altersgruppe unter insgesamt 91 Ratten nur 6 Fälle (7%) beobachtet, bei den am 10. Lebenstage behandelten Tieren sind es 16 von 146 (11%) und bei den 30 Tage alten Ratten 20

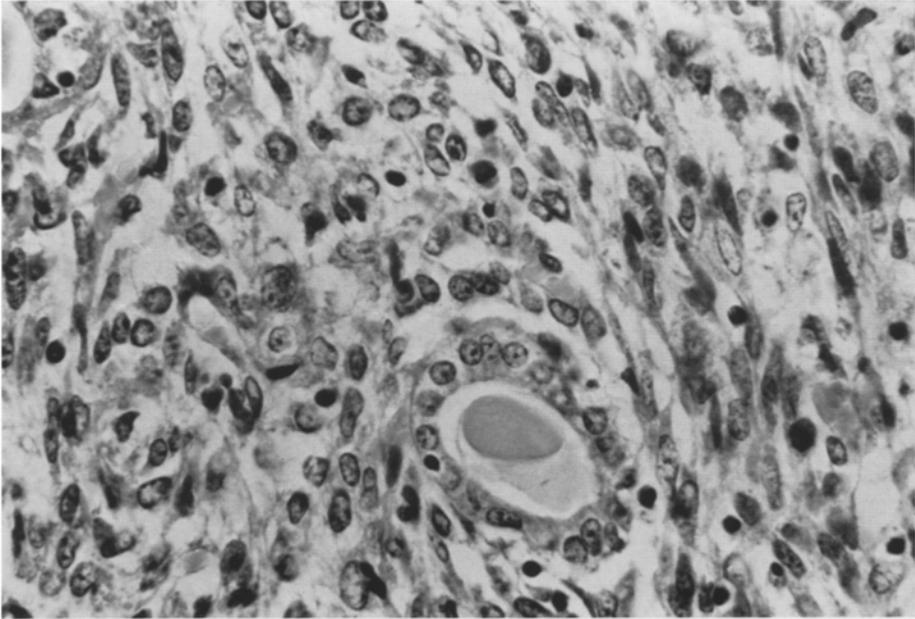


Abb. 9. Sarkomartiges Nephroblastom bei einer Ratte nach oraler Gabe von 40 mg/kg ÄNH am 10. Lebenstag. H.E. 500fach

von 64 oder 31%. In Vergleichsversuchen an erwachsenen Ratten mit MNH und ÄNH wurden sogar mehr als 60% der Tumoren außerhalb des Nervensystems gefunden. Die hohe Empfindlichkeit der Feten und neugeborenen Ratten gegenüber der carcinogenen Wirkung des ÄNH gilt also nur für das Nervensystem und läßt keine Verallgemeinerung zu. Für andere Organe ist sie in anderen, und anscheinend recht charakteristischen Altersstufen zu suchen. Diese wichtige Frage wird weiter geprüft. Außer dem Lebensalter hat nach den Ergebnissen der Tab. 1 auch die Dosis eine erhebliche Bedeutung für die Lokalisation der Geschwulstbildungen. Ihre Häufigkeit in anderen Organen außerhalb des Nervensystems nimmt in allen Altersgruppen mit der Dosis zu.

Die *Nieren*-Tumoren haben im Hinblick auf ihre Häufigkeit beim kindlichen Krebs besonderes Interesse. Sie wurden in den vorliegenden Versuchen als Nephroblastome bezeichnet. Histologisch waren es adeno-sarkomatöse Misch-tumoren (Abb. 6 u. 9) vom Typ der Wilms-Tumoren. Sie erreichten meist eine beträchtliche Größe mit Gewichten von 10–50 g und kamen nicht selten beidseitig vor. Neben weißen und festen Tumorknoten fanden sich blutig gefärbte,

sehr weiche Partien. Die Geschwülste ließen sich leicht transplantieren. Die Abhängigkeit ihres Vorkommens vom Alter der Ratten im Zeitpunkt der Behandlung ist eindeutig. In der 1. Altersgruppe waren es 5 von 91, in der zweiten Gruppe 11 von 146 und bei 30 Tage alten Tieren 11 von 64. 20 der insgesamt 27 Nephroblastome wurden in den Versuchen mit der höchsten Dosis von 80 mg/kg beobachtet.

Lediglich vermerkt sei der gelegentliche Befund von Tumoren im weiblichen Genitalapparat, der schon in den pränatalen Versuchen beobachtet wurde. Hier wie dort waren es hellzellige Carcinome der Ovarien, oft beidseitig, und Sarkome des Uterus. Die Zahl der Fälle betrug insgesamt 12, 8 davon in den Ovarien.

6. Quantitative Auswertung

6.1. Dosis-Wirkungsbeziehungen

Die Eintragung der mit ansteigenden Latenzzeiten zunehmenden Summenhäufigkeiten von malignen Tumoren in ein log Wahrscheinlichkeitsnetz ergab in allen Alters- und Dosierungsgruppen praktisch lineare Regressionen. Als Beispiel

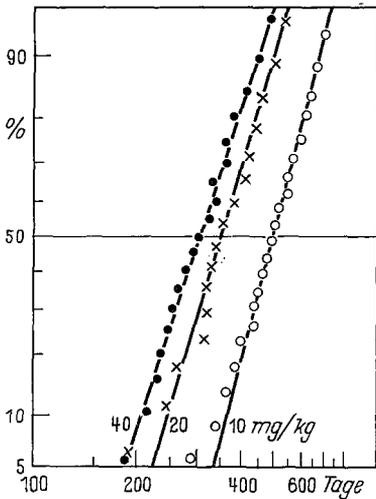


Abb. 10. Latenzzeiten von neurogenen Malignomen bei 10 Tage alten BD IX-Ratten nach einmaliger subcutaner Injektion von Äthyl-nitrosoharnstoff. Ordinate: Summenzahl von Ratten mit Krebs, Prozent. Abszisse: Latenzzeiten bis zum Tode in Tagen

sind in der Abb. 10 die Ergebnisse der Versuche nach subcutaner Injektion von ÄNH an 10 Tage alten Ratten wiedergegeben. Sie lassen bereits die Dosis-Wirkungsbeziehungen klar erkennen. Die Wirkungsgeraden der drei Dosierungen von 10, 20 und 40 mg/kg verlaufen praktisch parallel und sehr steil. Die Standard-Abweichungen der Einzelbeobachtungen betragen etwa $\pm 20\%$, die Streuungen der Mittelwerte liegen bei $\pm 5\%$. Es erscheint interessant, daß die einzelnen Fälle sich unabhängig von der Lokalisation der Tumoren in die zugehörigen Normalverteilungen einordnen, wie wir das bereits an mehreren Beispielen nachgewiesen haben (Druckrey u. Mitarb., 1964; Druckrey, 1967). Dies läßt auf einen gleichartigen Mechanismus der carcinogenen Primärwirkung schließen.

Die durch Abb. 10 belegte Homogenität der Ergebnisse begründet die Beurteilung der *Mittelwerte*. In der Tab. 3 ist die Abhängigkeit der Ausbeute an

malignen Tumoren und der mittleren Latenzzeit von der Dosis in allen 3 Altersgruppen zusammengestellt. Mit steigender Dosis wächst die Anzahl von Geschwülsten sowohl in der Gruppe als auch im Durchschnitt pro einzelne Ratte (von 0,3 bis 2,9, multiple Tumoren), während die Länge der Latenzzeit stetig kürzer wird. Auf die Zunahme von Krebsfällen außerhalb des Nervensystems wurde bereits hingewiesen. Wichtig erscheinen die Unterschiede der Ergebnisse

in den 3 Altersgruppen. Bei neugeborenen Ratten sind 10 mg/kg nach Ausbeute und Latenzzeit sogar wirksamer als 20 mg/kg an 10 Tage alten Ratten oder 80 mg/kg bei Gabe im Alter von 30 Tagen. Die carcinogene Wirksamkeit des ÄNH bzw. die Empfindlichkeit der Ratten nimmt also schon im 1. Lebensmonat auf etwa den zehnten Teil ab. Das gilt aber nur für das Nervensystem. Die Empfindlichkeit der Nieren verhält sich entgegengesetzt, die Häufigkeit von Nephroblastomen wächst mit dem Alter der Tiere im Zeitpunkt der Behandlung signifikant an.

Tabelle 3. Ausbeute an malignen Tumoren im Nervensystem bzw. in den Nieren und Länge der Latenzzeit in Abhängigkeit von der Dosis Äthyl-nitrosoharnstoff und dem Alter der Ratten bei der einmaligen Applikation

Applika- tion Tag	Dosis mg/kg	maligne Tumoren					Durch- schnitt pro Ratte	t 50 Latenzzeit Tage
		Ratten	Nerven- system Anzahl	Nephro- blastom Anzahl	Summe			
1	5	9/28	9	0	9	0,3	500	
	10	11/16	21	0	21	1,3	310	
	20	16/16	34	1	35	2,2	240	
	40	15/15	35	0	35	2,3	205	
	80	16/16	47	4	51	2,9	183	
10	10	44/55	71	0	71	1,3	510	
	20	33/36	68	0	68	1,9	360	
	40	38/39	78	2	80	2,1	300	
	80	16/16	29	9	38	2,4	215	
30	20	18/29	17	1	18	0,6	600	
	40	15/18	18	3	21	1,2	410	
	80	16/17	16	7	23	1,4	350	

Grundsätzlich beweisen die Ergebnisse auch dieser Versuche, daß eine einzige kleine Dosis von wenigen Prozent der LD 50 zur Erzeugung von Krebs genügt, obwohl das hochreaktive ÄNH im Organismus schnell zerstört wird. Die carcinogene Primärwirkung verläuft also praktisch zeitlos und startet die Krebsentstehung, die dann als beschleunigter Prozeß autonom mit noch unbekanntem Mechanismen, aber eindeutig abhängig von der Dosis und der altersgebundenen Empfindlichkeit der betroffenen Organe fortschreitet. Der damit angesprochene Zeitfaktor bedarf der näheren Untersuchung.

6.2. Dosis und Latenzzeit

Quantitative Versuche mit verschiedenen Carcinogenen an erwachsenen Ratten (Druckrey, 1967) hatten für die Abhängigkeit der mittleren Induktionszeit (t) von der Dosierung (d) im doppelt log Netz regelmäßig lineare Regressionen ergeben. Sie entsprechen der allgemeinen Gleichung

$$dt^n = \text{konst.}$$

Der Wert des Exponenten n , der den tangens des Anstiegswinkels angibt, war bei der Carcinogenese – im Gegensatz zu reversiblen pharmakologischen Wirkungen – stets größer als 1 und lag meist zwischen 2 und 4. Danach ist die Erzeugung von

Krebs grundsätzlich als beschleunigter Vorgang oder als „Verstärkerwirkung“ zu verstehen. Es war zu prüfen, ob das auch bei den vorliegenden Versuchen zutrifft.

Die Ergebnisse sind in der Abb. 11 dargestellt. In allen 3 Altersgruppen wurde unabhängig von der verschiedenen Applikationsart eine lineare Abhängigkeit des log Latenzzeit von dem log Dosis gemäß der oben gegebenen Gleichung gefunden. Der tangens des Anstiegswinkels beträgt im Versuch an neugeborenen Ratten $n = 3$, an 10 Tage alten Tieren 2,7 und an 30 Tage alten Ratten 2,6. Im transplacentalen Versuch wurde $n = 3,6$ beobachtet (Ivankovic u. Druckrey, 1968). Die Abnahme der Empfindlichkeit mit steigendem Lebensalter kommt also auch in den stetig abfallenden tangens-Werten zum Ausdruck. Am deutlichsten sind indessen die Unterschiede der Latenzzeiten bei den einzelnen Dosierungen in den 3 Altersgruppen aus der Abb. 11 und der Tab. 3 zu entnehmen.

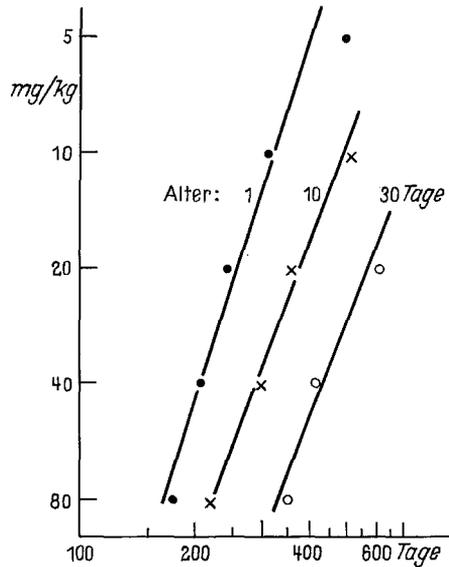


Abb. 11. Abhängigkeit der mittleren Latenzzeiten von der Dosis Äthyl-nitrosoharnstoff bei 3 Gruppen von BD IX-Ratten, die im Alter von 1; bzw. 30 Tagen eine einmalige Dosis erhielten. 443 neurogene Malignome bei 242 Tieren

7. Diskussion

Die quantitativ durchgeführten Versuche haben an einem Material von 296 BD IX-Ratten gezeigt, daß die Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems auch postnatal durch eine einmalige Dosis ÄNH mit großer Sicherheit möglich ist. Die Wirkung war praktisch unabhängig davon, ob die Applikation subcutan, oral oder intravenös erfolgte. Da die einmalige subcutane Injektion an jungen Ratten technisch viel leichter ist als die intravenöse an schwangeren Ratten, ist damit eine sehr einfache Methode gegeben, die als Modell für morphogenetische, biochemische und immunbiologische Studien bei der Entwicklung neuroepithelialer Tumoren dienen kann. Auffällig ist das Fehlen lokaler Sarkome an der subcutanen Injektionsstelle, zumal sie an erwachsenen Ratten bei allerdings höherer Dosierung

in etwa der Hälfte der Fälle beobachtet wurden (noch nicht abgeschlossene Versuche).

Die Empfindlichkeit des Nervensystems gegenüber der carcinogenen Wirkung des ÄNH nimmt mit dem Lebensalter erheblich ab. Während sie bei Neugeborenen noch fast die gleiche ist wie bei Feten in der letzten Woche vor der Geburt, sinkt sie bei Gabe an 10 und 30 Tage alten Ratten gemessen an der Tumor-Ausbeute und der Länge der Latenzzeit beträchtlich, gemessen an der für eine bestimmte Wirkungsgröße erforderlichen Dosis fast auf den zehnten Teil.

Mit zunehmendem Lebensalter bei der Behandlung ändert sich auch die Lokalisation der Tumoren im Nervensystem. Wie die Tab. 2 zeigt, nimmt die relative Häufigkeit der Hirntumoren von 18 auf 53% zu, während die der Geschwülste an Hirnnerven und im Rückenmark erheblich geringer wird. Die Empfindlichkeit der Hirnnerven und des Rückenmarks scheint also bei neugeborenen Ratten am größten zu sein.

Besonderes Interesse verdienen die malignen Neurinome (Schwannome) des Ganglion Gasseri und Trigeminus, die ähnlich wie in den pränatalen Versuchen (Ivankovic u. Druckrey, 1968) auch nach Gabe an neugeborene Ratten sehr häufig und im Bereich der Hirnnerven fast ausschließlich vorkamen. Nach Untersuchungen von Meyerson u. Person (1969) an Schaf-Feten ist die Aktivität des Trigeminus schon im 2. Drittel der pränatalen Entwicklung nachweisbar. Mit zunehmendem Alter bei der Behandlung sinkt die relative Häufigkeit der Trigeminus-Tumoren, und es treten mehr und mehr Geschwülste anderer Hirnnerven in Erscheinung. In der Altersgruppe von 30 Tagen wurden trotz der höheren Dosierung bei insgesamt 49 Ratten nur noch 3 Fälle von Trigeminus-Tumoren beobachtet. Die anderen betrafen meist den Vagus oder Facialis, bei einer Ratte auch den Hypoglossus, an denen auch im pränatalen Versuch schon Tumoren gefunden wurden. Auffällig war das Vorkommen von 3 malignen Neurinomen des Statoacusticus, einem Gliom des Opticus und einem Neuroblastom des Olfactorius bulbus, die in den pränatalen Versuchen in keinem einzigen Falle auftraten. Die Funktion dieser Sinnesnerven dürfte erst postnatal einsetzen. Am Bulbus olfactorius des Kaninchens werden nach Untersuchungen von Schwartz (1967) erst am 2. Tage nach der Geburt Aktionsströme meßbar. Diese Sachverhalte deuten darauf hin, daß die Empfindlichkeit gegenüber der neurotrop carcinogenen Substanz nicht von der relativen Größe oder Zellteilungsrate der einzelnen Teile des Nervensystems abhängt, sondern vielmehr von ihrer Differenzierung und funktionellen Aktivität.

Eine interessante Parallele dazu ist das häufige Vorkommen von Ovarialcarcinomen bei Ratten, die während der Schwangerschaft mit ÄNH behandelt wurden (Ivankovic, 1969; Alexandrov, 1969). Ferner sei die Beobachtung von Huggins u. Mitarb. (1961 u. 1962) erwähnt, daß Brustkrebs an Ratten auffallend schnell und regelmäßig durch eine einzige orale Dosis 20-Methylcholanthren oder 7,12-Dimethyl-1,2-benzanthrazen erzeugt werden kann, wenn sie zwischen dem 40. und 70. Lebenstage gegeben wird, nicht aber vorher oder später. Es scheint also für jedes Organ eine charakteristische Periode der höchsten Empfindlichkeit für carcinogene Agentien zu geben. Beim Nervensystem liegt sie offenbar kurz vor oder nach der Geburt, für die Nieren nach den vorliegenden Ergebnissen deutlich später (Tab. 1 u. 3). Hier liegen wichtige Probleme, die weiter untersucht werden.

Die Annahme, daß neugeborene Tiere grundsätzlich für carcinogene Substanzen empfindlicher seien und daher als „Schnelltest“ dienen können, muß als unzulässige Verallgemeinerung abgelehnt werden.

Abschließend sei vermerkt, daß zwar eine große Zahl von Tumoren des Nervensystems bereits im jugendlichen Alter auftraten, vor allem bei den Ratten, die kurz nach der Geburt behandelt waren. Dem entsprechen die Ergebnisse der früheren transplacentalen Versuche an BD IX-Ratten (Ivankovic u. Druckrey, 1968), die inzwischen an 9 anderen BD-Stämmen bestätigt werden konnten (Druckrey u. Mitarb., 1970). Die Gabe des ÄNH an 10 und 30 Tage alten Tieren führte aber zu erheblich längeren Latenzzeiten. Hier traten die meisten Tumoren erst nach mehr als einem Jahr auf, in Einzelfällen sogar nach über 2 Jahren bis zu 870 Tagen, also erst im zweiten oder letzten Drittel des Lebens. Daraus folgt, daß auch im mittleren oder höheren Alter erscheinende Geschwülste schon in früher Jugend verursacht sein können. Je früher der Krebs auftritt, um so früher ist nach den vorliegenden Ergebnissen die Einwirkung des causalen Agens zu vermuten, unter Umständen sogar schon während der pränatalen Entwicklung.

Im Falle des hier untersuchten ÄNH genügte bereits eine einmalige und sehr kleine Dosis, die überhaupt keine akuten Symptome verursachte oder zu histologisch erkennbaren Frühschäden am Nervensystem führte. Auch bei den später verstorbenen Ratten waren in den geschwulstfreien Teilen des Nervensystems morphologisch keine Veränderungen festzustellen, die als Präcancerosen gedeutet werden konnten. Die Entwicklung der Tumoren erfolgte nach langer Latenz offenbar sprunghaft mit sehr schnellem Wachstum und führte dann bei den Ratten in wenigen Wochen zum Tode. Die carcinogene Primärwirkung und die ihr während der Latenzzeit folgenden relevanten Prozesse sind daher im molekularen Bereich des genetischen Materials zu suchen. In dieser Hinsicht besteht volle Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen, die chemische Veränderungen von Nucleinsäuren (DNS) durch alkylierende Carcinogene zweifelsfrei nachgewiesen haben, und denen der hier durchgeführten pharmakologischen Versuche. Damit wird zugleich verständlich, daß die Primäreffekte irreversibel sind und auch nach einmaliger Dosis als Verstärkerwirkung „mit Zins und Zinseszins“ schließlich zu Krebs führen können.

Literatur

- Alexandrov, V. A.: Uterine, vaginal and mammary tumors induced by nitrosoureas in pregnant rats. *Nature (Lond.)* **222**, 1064–1065 (1969).
- Della Porta, G.: Use of newborn and infant animals in carcinogenicity. *Food. Cosmet. Toxicol.* **6**, 243–252 (1968).
- Doell, R. G., Carnes, W. H.: Urethane induction of thymic lymphoma in C 57 mice. *Nature (Lond.)* **194**, 588–589 (1962).
- Druckrey, H.: Quantitative aspects in chemical carcinogenesis, in: *Potential carcinogenic hazards from drugs*, edited by René Truhaut. *UICC Monogr. Series*, **7**, 60–77 (1967).
- Danneberg, P., Dischler, W., Steinhoff, D.: Reinzucht von 10 Rattenstämmen (BD-Stämme) und Analyse des genetischen Pigmentierungssystems. *Arzneimittel-Forsch.* **12**, 911–919 (1962).
- Ivankovic, S., Preussmann, R.: Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff. *Z. Krebsforsch.* **66**, 389–408 (1965).
- — Landschütz, C., Stekar, J., Brunner, U., Schagen, B.: 1,2-diethylhydrazine, azo-, and azoxyethane in rats. *Experientia (Basel)* **24**, 561–562 (1968).

- Druckrey, H., Landschütz, Ch., Ivankovic, S.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. II. Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. *Z. Krebsforsch.* **73**, 371–386 (1970).
- Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmähl, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.* **69**, 103–201 (1967).
- Steinhoff, D., Preussmann, R., Ivankovic, S.: Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. *Z. Krebsforsch.* **66**, 1–10 (1964).
- Huggins, C., Grand, L. C., Brillantes, F. P.: Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature (Lond.)* **189**, 204–207 (1961).
- Yang, N. C.: Induction and extinction of mammary cancer. *Science* **137**, 257–262 (1962).
- Ivankovic, S.: Erzeugung von Genitalkrebs bei trächtigen Ratten. *Arzneimittel-Forsch.* **19**, 1040–1041 (1969).
- Druckrey, H.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I. Äthyl-nitroso-harnstoff an BD IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.* **71**, 320–360 (1968).
- Klein, M., Weisburger, E. K.: Carcinogenic effect of N-hydroxy-N-2-fluorenylacetamide, 2',4'-dimethyl-acetanilide and 2',4',6'-trimethylacetanilide on liver in suckling mice. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **122**, 111–114 (1966).
- Meyerson, B. A., Person, H. E.: Evoked unitary and gross electric activity in the cerebral cortex in early prenatal ontogeny. *Nature (Lond.)* **221**, 1248–1249 (1969).
- Nishizuka, Y., Ito, K., Nakakuki, K.: Liver tumor induction by a single injection of o-aminoazotoluene to newborn mice. *Gann* **56**, 135 (1965).
- Pietra, G., Spencer, K., Shubik, P.: Response of newly born mice to a chemical carcinogen. *Nature (Lond.)* **183**, 1689 (1959).
- Prichard, R. W.: Tumors of the heart. *Arch. Path.* **51**, 98–128 (1951).
- Schagen, B.: Erzeugung von Krebs durch einmalige Dosis Äthylnitroso-harnstoff an neugeborenen BD-Ratten. *Mediz. Dissertation Freiburg* 1970.
- Schwartz, P.: Die postnatale Entwicklung der Bursttätigkeit im bulbus olfactorius beim Kaninchen. *Experientia (Basel)* **23**, 725 (1967).
- Strauss, R., Merliss, R.: Primary tumor of heart. *Arch. Path.* **39**, 74–78 (1945).
- Terracini, B., Magee, P. N.: Renal tumors in rats following injection of DMNA at birth. *Nature (Lond.)* **202**, 502–503 (1964).
- Toth, B.: A critical review of experiments in chemical carcinogenesis using newborn animals. *Cancer Res.* **28**, 727–738 (1968).
- Magee, P. N., Shubik, P.: Carcinogenesis study with dimethylnitrosamine administered orally to adult and subcutaneously to newborn BALB/c mice. *Cancer Res.* **24**, 1712–1716 (1964).
- Shubik, P.: Carcinogenesis in AKR-mice injected at birth with benzo(a)pyrene and dimethylnitrosamine. *Cancer Res.* **27**, 43–51 (1967).
- Vesselinovitch, S. D., Mihailovich, N.: The induction of benign and malignant liver tumors by urethane in newborn rats. *Cancer Res.* **28**, 881–887 (1968).
- Mihailovich, N.: The development of neurogenic neoplasms, embryonal kidney tumors, Harderian-gland adenomas, Anitschkow-cell sarcomas of the heart, and other neoplasms in urethan-treated newborn rats. *Cancer Res.* **28**, 888–897 (1968).
- Wechsler, W., Kleihues, P., Matsumoto, S., Zülch, K. J., Ivankovic, S., Preussmann, R., Druckrey, H.: Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **159**, 360–408 (1969).
- Zülch, K. J.: Gibt es Beziehungen in den Befunden der experimentellen und spontanen neurogenen Tumoren? *Arzneimittel-Forsch.* **19**, 1503–1507 (1969).

Prof. Dr. H. Druckrey
Leiter der Forschergruppe Präventivmedizin
am Max-Planck-Institut f. Immunbiologie
D-7800 Freiburg/Brsg., Stefan-Meier-Str. 8