Aus dem Paul-Ehrlich-Institut und dem Ferdinand-Blum-Institut
zu Frankfurt a. M. (Dir. Prof. Dr. R. Prigge).

Die onkolytischen Eigenschaften von Viren.

Von
R. Siegert.

(Eingelangt am 31. August 1954.)

Unter „onkolytischen“ Virusarten versteht man solche Vertreter dieser Erregerklasse, die eine zerstörende Wirkung auf Tumoren auszuüben vermögen. Diese Fähigkeit wirkt insofern nicht überraschend, da bekanntlich schon normale Zellen durch die intrazellulär ablaufenden Vermehrungsvorgänge der Viren geschädigt werden. Daher kann eine derartige Auswirkung der Virusvermehrung auch bei entarteten Wirtszellen erwartet werden, zumal deren quantitativ etwas abweichenden Enzymsysteme durch die Virussyntese leichter beeinflussbar erscheinen, als dies bei normalen Zellen der Fall ist.

Die Virusvermehrung in Krebszellen und ihr Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Tumoren verdient aus verschiedensten Gründen größte Beachtung. So können die Viren gleichsam als Sonde zum Studium der Stoffwechselleistungen entarteter Zellen herangezogen werden, da ihre Vermehrungsvorgänge in engstem Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel stehen. Durch Vergleich mit dem Verhalten normaler Zellen dürfte sich nicht nur mancher neue Hinweis auf die Abweichungen des Krebsstoffwechsels von der „Norm“ ergeben, sondern darüber hinaus auch unser Einblick in die Vermehrungsweise der Viren und deren Voraussetzungen erweitern. Schließlich muß besonders daran gedacht werden, ob die onkolytischen Eigenschaften von Viren nicht auch für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht werden können.

Mit dem systematischen Studium der onkolytischen Wirkung von Viren hat man erst in den letzten Jahren begonnen, während man früher der Virusvermehrung im Tumorgewebe größere Beachtung schenkte als der Viruswirkung auf das Tumorstadium. Die vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse haben einige ermutigende Hinweise auf die

Beeinflussung des Tumorwachstums durch die künstliche Infektion mit bestimmten Virusarten ergeben, die im Hinblick auf eine durchaus im Bereich der Möglichkeit liegende praktische Nutzenanwendung beim Menschen allgemeineres Interesse beanspruchen und daher eingehend besprochen werden sollen.

I. Zur Untersuchungsmethodik der virusbedingten Onkolyse.

Die Bewertung des onkolytischen Effektes eines Virus hat natürlich nach den gleichen Grundsätzen zu erfolgen, die man der Beurteilung der Strahlenwirkung oder chemotherapeutischer Agenzien zugrunde legt. So wird die Größenänderung solider Tumoren unter der Viruseinwirkung durch Messungen verfolgt und durch histologische Untersuchungen der Gewebsreaktionen vervollständigt. Einen weiteren Einblick in den Effekt des Virus auf das Geschwulstgewebe vermitteln die Überlebensraten und die Verlängerung der Überlebenszeit virusbehandelter Tumortiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen, und schließlich die Prüfung der Lebensfähigkeit des neoplastischen Gewebes durch Transplantation. Die Beurteilung der Gewebsreaktionen muß ergänzt werden durch Untersuchungen, wie sich das Virus im Tumorgewebe verhält, welche Konzentrationen es dort erreicht und wie lange es dort persistiert. Hierzu muß als Vergleich das Verhalten des Virus in normalen Geweben herangezogen werden.

Die Schwierigkeit der Beurteilung der Proliferationshemmung besteht vor allem darin, daß die weitaus meisten der als onkolytisch erkannten Virusarten hochpathogen sind und zum Tod der Versuchstiere führen. Die Möglichkeit zu einer ausreichenden Beobachtung virusbehandelter Tumoren besteht daher nur bei solchen Tieren, die eine gewisse Resistenz gegenüber der Infektion aufweisen und diese überleben. Wenn die Lebensfähigkeit der Zellen behandelter Tumoren geprüft werden soll, können zur Transplantation der virushaltigen Tumorstückchen nur resistente oder vorher immunisierte Versuchstiere herangezogen werden, da sonst die Tiere der Infektion bereits erliegen, ehe das Ergebnis der Transplantation feststeht.

Die Bewertung des onkolytischen Effektes auf solide transplantable Tumoren stellt aus verschiedenen Gründen ein schwieriges Problem dar. Es muß berücksichtigt werden, daß das neoplastische Gewebe keinesfalls homogen ist, sondern zentrale Nekrosen aufweist. Daher ist die Zugänglichkeit der Zellen für die Virusinfektion in verschiedenen Teilen der Geschwulst unterschiedlich. Man kann daher weder durch histologische Untersuchungen noch durch Transplantation kleiner Tumorstückchen die Wirkung des Virus auf die gesamte Geschwulst zuverlässig beurteilen. Für das Angehen der Transplantation ist eine Mindestzahl lebender

Zellen erforderlich, die z. B. für das Mäusesarkom 180 von *Zahl* und *Drasher* (1947) mit wenigstens 20.000 beziffert wurde. Das Ausbleiben eines Transplantationserfolges berechtigt also nicht zu der Annahme, daß alle Tumorzellen ihre Lebensfähigkeit unter der Viruseinwirkung eingebüßt haben. Beim soliden Tumor ist also weder eine gleichzeitige einheitliche Infektion der Zellen, noch eine zuverlässige Bestimmung der darin enthaltenen Zellzahl, noch eine einwandfreie Beurteilung der zellulären Lebensfähigkeit möglich. Ferner besteht nur geringe Aussicht, den Vorgang der Virusinvasion in das Gewebe studieren und den Mechanismus der Viruswirkung klären zu können.

An Stelle solider Tumoren, die aus organisierten Aggregaten verschiedener Zelltypen bestehen, ist die Verwendung von Suspensionen maligner Zellen von einheitlichem Typ, wie sie in der Ascitesform des *Ehrlich*-Carcinoms zur Verfügung stehen, für viele Fragestellungen des Tumor-Virussystems wesentlich zweckmäßiger (*Ackermann* und *Kurtz*, 1952, *Moore* und *Diamond*, 1952/53, *Koprowska* und *Koprowski*, 1953). In diesem Fall kann die Infektion gleichzeitig bei einer größeren Zahl von Zellen erfolgen, und der Adsorptions- und Vermehrungsvorgang am gleichen Objekt laufend beobachtet werden. Ferner ist eine zahlenmäßige Bestimmung der suspendierten Tumorzellen und des Anteiles der geschädigten Zellen möglich. Die Resultate der nachfolgenden Transplantationen werden nicht durch das Vorkommen unspezifischer Nekrosen in den Kontrollen gestört. Die histologischen und biochemischen Zellveränderungen können schließlich individuell beobachtet werden.

II. Die wichtigsten der bisherigen tierexperimentellen Erfahrungen.

Als erste haben *Levaditi* und *Nicolau* (1922/23) das Verhalten von Viren im Tumorgewebe studiert und zwar zunächst die Vermehrung eines neurotrophen Stammes des *Vakzinevirus* in spontanen Mäuse- und Rattentumoren. Sie stellten fest, daß Epitheliome ein ausgezeichnetes Kulturmedium für dieses Virus darstellen, das sich dort weit stärker anreichert als in Sarkomen. Dieses Ergebnis war insofern nicht überraschend, als das *Vakzinevirus* gegenüber Ektodermalgewebe ganz allgemein eine größere Affinität besitzt als zu Mesodermalgeweben. Die Anwesenheit des infektiösen Agens beeinträchtigte häufig das Proliferationsvermögen von carcinomatösen Geweben; Transplantate wurden nekrotisch und resorbiert. Die Tumorentwicklung konnte sowohl auf dem intramuskulären als auch intravenösen Infektionsweg beeinflußt werden. Wurde das neurotrope *Vakzinevirus* aber in Geschwülste eingebracht, die sich in immunen Wirtstieren entwickelt hatten, so überlebte es nicht lange. Jedoch stellte sich wieder eine Virusvermehrung ein, wenn infizierte Tumorstückchen eines immunen Wirtes auf nicht immune Tiere transplantiert wurden. Das Carcinomgewebe erwarb auch nach mehrmaliger direkter Infektion keine Vakzineimmunität. Aus diesen und anderen Beobachtungen zogen beide Autoren den Schluß, daß Krebszellen unfähig sind zur Entwicklung einer aktiven Immunität und nur passiv an der Wirtsimmunität teilnehmen. Dieser Ansicht schlossen sich auch *Rivers* und *Pearce* (1925/1935)

an, nach deren Erfahrungen das Vakzinevirus trotz immunen Zustandes des Organismus wesentlich länger in *Brown-Pearce*-Tumoren als im Hoden und in anderen normalen Organen überlebt. *Levaditi* und *Schoen* (1936) fanden in jedem Fall bei Kaninchen, die an *Shopeschem* Papillom erkrankt waren, das Vakzinevirus nach intravenöser, intradermaler oder intratumoraler Infektion 5 Tage später im Tumorgewebe vor. *Turner* und *Mulliken* (1947) konnten einen an Mäuse adaptierten Neurovaksinestamm im Mäusesarkom 180 kultivieren. Das Virus erlangte dort eine hohe Konzentration und schien eine gewisse Hemmwirkung auf die Lebensfähigkeit des Tumors auszuüben, da Transplantationen weniger erfolgreich waren als von unbehandelten Geschwülsten. *Turner*, *Mulliken* und *Kritzler* (1948) dehnten ihre Studien auf das Verhalten der lymphatischen Mäuseleukämie 9417 aus. Das Neurovaccinevirus führte nach intravenöser Gabe zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der Leukämiemäuse. Weitere Untersuchungen von *Mulliken* und *Turner* (1950) zeigten, daß das Sarkom 180 bei intravenöser Infektion das Vakzinevirus häufiger aufnimmt als Leber oder Milz. Jedoch wurden unter diesen Infektionsbedingungen keine so hohen Konzentrationen erreicht, wie sie zur Beeinflussung des Tumorwachstums notwendig erscheinen. Bei Mäuseleukämie 9417 waren die Resultate unterschiedlich. Ein Ansteigen der Überlebensrate schien nur bei subakuten Verlaufsformen der Leukämie gewährleistet.

Das kaninchenpathogene *Virus III* siedelt sich nach *Rivers* und *Pearce* (1925) im Gewebe des *Brown-Pearce*-Tumor und dessen Metastasen an, vermehrt sich dort und wird bei Tumorphassagen auf neue Wirtstiere übertragen. Die Anwesenheit des Virus im Tumorgewebe konnte sowohl aus der Immunitätsentwicklung des Organismus als auch aus dem Auftreten typischer Einschußkörperchen entnommen werden. Das Virus III überlebte auch bei immunem Zustand der Wirtstiere im Geschwulstgewebe wesentlich länger als im Hoden und in den regionären Lymphknoten. In weiteren Untersuchungen verglichen *Pearce* und *Rivers* (1927) die Malignität virusfreier und virustragender Tumoren bei normalen und vorher immunisierten Kaninchen. *Andrewes* (1940) beobachtete bei einer zufälligen Infektion des *Shopeschen* Kaninchenfibroms mit Virus III eine vorzeitige Rückbildung des Tumors. Bei Mischung des Virus III mit Fibromvirus konnte die Entwicklung von Hautläsionen unterdrückt werden. Dagegen zeigte das Virus III keinen Effekt auf das Kaninchensarkom RS 1.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Gewebsaffinität des *Tollwutvirus* haben *Levaditi* und *Schoen* (1936), *Schoen* (1937) sowie *Levaditi*, *Schoen* und *Reinié* (1937) auch das Verhalten eines frisch isolierten Straßenvutstammes auf den *Brown-Pearce*-Tumor des Kaninchens studiert. Die in die vordere Augenkammer eingimpfte Geschwulst enthielt das Virus nicht nur nach intracerebraler Infektion, sondern auch dann, wenn die Infektion in das andere Auge erfolgt war. So konnten in intraokulären Tumoren, allerdings nur bei Verwendung eines bestimmten Virusstammes, auch *Negrische* Körperchen als Ausdruck der Virusvermehrung nachgewiesen werden. Intraokuläre Passagen infizierter Tumoren gelangen nicht mit der sonst üblichen Regelmäßigkeit, was die Autoren an eine Wirkung des Virus auf die Lebensfähigkeit der Tumorzellen denken ließ. Mit Virus infizierte Tumoren wuchsen auch an anderen Körperstellen, z. B. intratestikulär oder subkutan, aber *Negrische* Körperchen und die Anwesenheit des Virus konnten nur dann nachgewiesen werden, wenn sich die Geschwülste im Gehirn oder in der vorderen Augenkammer entwickelten. Mit Virus-fixe infizierte Tumorstückchen

wuchsen in der vorderen Augenkammer normal, bei den nachfolgenden Tumorpassagen entzog sich aber das infektiöse Agens bald dem Nachweis. In ähnlicher Weise verschwand auch das Straßenvirus beim *Shopeschen* Papillom in den nachfolgenden Transplantaten. Das Tollwutvirus vermehrt sich nach *Koprowska* und *Koprowski* (1953) nicht im *Ehrlich-Ascitestumor* und ist daher auch ohne Einfluß auf die Tumorentwicklung.

Nach Mitteilungen von *Schoen* (1937/38/39) besitzt das *Lymphogranulomavenerereum-Virus* eine elektive Affinität für Sarkomgewebe von Mäusen, wo es in vivo und in vitro günstige Vermehrungsbedingungen findet. Das sowohl subkutan als auch intraperitoneal wachsende *Ehrlichsche* „Mäusesarkom“ wies nach intracerebraler Infektion tumortragender Mäuse einen deutlich höheren Virusgehalt auf als andere Körpergewebe und behielt die hohe Viruskonzentration auch in zahlreichen nachfolgenden Passagen bei. Trotzdem entwickelten sich die infizierten Tumoren ungestört ohne histologische Zeichen einer virusbedingten Schädigung. Aus infiziertem Tumormaterial konnte ein sehr wirksames FREI-Antigen gewonnen werden. Die bevorzugte Ansiedlung des Lymphogranulomavirus in neoplastischem Gewebe ergab sich auch bei zwei epithelialen Spontantumoren, die bei virusinfizierten Mäusen nach 2—3 Monaten aufgetreten waren.

Findlay und *McCallum* (1937) versuchten, das *Gelbfiebertvirus* durch Tumorpassagen in vivo abzuschwächen. Drei der benutzten Stämme vermehrten sich gut im Mäusesarkom 63, aber nicht im Sarkom 37 C. Trotz der festgestellten Tumoraaffinität und der Tatsache, daß Zellnekrosen nach Virusinfektion frühzeitiger aufzutreten schienen, war die Lebensfähigkeit der Transplantate nicht wesentlich beeinträchtigt. Die Virusstämme behielten im allgemeinen ihre Eigenschaften, lediglich ein neurotroper Stamm verlor seine Pathogenität für Affen und Igel.

Das *Herpesvirus* vermehrt sich nach *Levaditi* und *Nicolau* (1922/23), ähnlich wie das Vakzinevirus, gut in Tumoren epithelialen Ursprunges und behält dort seine Virulenz. Zusätzlich soll es aber auch die Fähigkeit besitzen, in Sarkomen zu parasitieren. Dagegen konnten *Levaditi* und *Schoen* (1936) bei Infektion des *Shopeschen* Kaninchenpapilloms im Tumor kein Virus mehr nachweisen, wenn die Tiere an der Herpes-Encephalitis starben. *Moore* (1949) stellte fest, daß das Herpesvirus bei direkter Gabe in das Mäusesarkom 180 dort 5 Tage persistiert, ohne das Tumorstadium zu beeinflussen. Nach 4 Sarkompassagen war es jedoch aus dem Gewebe verschwunden. Auf intracerebralem oder intraperitonealem Weg konnte das Sarkomgewebe nicht infiziert werden, selbst wenn letale Virusdosen verabreicht wurden. Im Mäusecarcinom EO 771 war das Herpesvirus in geringer Konzentration bis zum 7. Tag nach direkter Infektion enthalten.

Levaditi und *Huber* (1936/37) wiesen darauf hin, daß sich ein an Mäuse adaptierter Stamm des klassischen *Geflügelpestvirus* in einem subkutan wachsenden Mäuseepitheliom (Stamm C 63) nach intraperitonealer oder intratumoraler Infektion ansiedelt, dort vermehrt und eine massive Nekrose des Tumors verursacht. Transplantate infizierter Geschwülste sind nicht mehr angegangen. Diese offensichtlich cancerolytische Wirkung veranlaßte *Levaditi*, *Schoen* und *Reinié* (1937) zur Prüfung der Frage, ob das Geflügelpestvirus diese Eigenschaft auch bei Tieren besitzt, die ihm gegenüber resistent sind. Sie infizierten daher Kaninchen mit intraokulär oder intramuskulär wachsenden *Brown-Pearce-Tumoren* auf intravenösem oder intratumoralem Weg. Obwohl sich das Geflügelpestvirus im Tumorgewebe lokalisierte und sich dort wahrscheinlich auch in gewissem Umfang vermehrte, interferierte

es jedoch nicht mit der Tumorphilisation. Bei Transplantationen verloren infizierte Geschwülste rasch ihren Virusgehalt. Diese Unterschiede im Verhalten des Geflügelpestvirus bei den genannten Mäuse- und Kaninchentumoren erklären die Autoren mit der unterschiedlichen natürlichen Resistenz bzw. Empfänglichkeit der beiden Tierarten gegen diese Infektion. Die Bemühungen von *Levaditi* und *Schoen* (1937), das Geflügelpestvirus auch auf Kaninchen zu adaptieren, führten nicht zu dem erwarteten Tumoreffekt. Nach *Hallauer* (1931) überlebt das Geflügelpestvirus für bemerkenswert lange Zeit in Gewebekulturen, die Mäusecarcinomgewebe enthalten, während es bei Anwesenheit anderer Mäusegewebe rasch zugrunde geht.

Moore und *Diamond* (1952) stellten fest, daß Mischungen von *Pseudo-geflügelpestvirus* und Tumorzellen (Sarkom 180) in vitro, die einige Zeit bei $+4^{\circ}\text{C}$ stehen, einen deutlichen Abfall des Haemagglutinintiters zeigen und bei subkutaner Inokulation nicht mehr zu einem Tumorstadium führen. Werden derartige Mischungen jedoch nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ für einige Stunden bei Zimmertemperatur gehalten, so kommt es wieder zu einem Anstieg der Haemagglutinintiter, und nach subkutaner Verimpfung resultiert Tumorstadium. Die Virusadsorption ist demnach mit einer Unterdrückung der Vermehrungsfähigkeit der Tumorzellen verbunden, während die Elution des Newcastlevirus das ursprüngliche Proliferationsvermögen wieder herstellt. Da die Hemmung des Tumorstadiums durch Zugabe von spezifischem Immunsrum zur Viruszellmischung verhindert werden kann, ist erwiesen, daß die Viruspartikel die Hemmwirkung ausüben. Der Grad der Hemmung hängt von der Viruskonzentration und der Zellzahl ab. Der Elutionsprozeß verlief wesentlich langsamer als der Adsorptionsvorgang. Eine Vermehrung des Pseudogeflügelpestvirus konnte weder in vitro noch in vivo im Sarkom 180 nachgewiesen werden, sondern es parasitierte dort nur, ohne die Lebensfähigkeit des Tumors zu beeinträchtigen. Demnach scheint die Wachstumshemmung auf der Anwesenheit der Elementarkörperchen auf der Zelloberfläche zu beruhen in Analogie zu inaktivierten Bakteriophagen, welche während des Adsorptionsstadiums zur Hemmung der Bakterienvermehrung imstande sind. In einer weiteren Studie beschäftigten sich *Moore*, *Diamond*, *Mackay* und *Sabachewsky* (1952) mit dem Verhalten des Newcastlevirus auf die Asciteszellen des ursprünglichen *Ehrlich*-Carcinoms, wobei sich eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Adsorptions- und Elutionsvorgang bei Sarkom-180-Zellen ergab. Wenn die Tumorzellen mit dem Virus nicht in vitro gemischt, sondern getrennt intraperitoneal injiziert wurden, so trat ein Hemmeffekt auf die Tumorentwicklung nur dann ein, wenn zuerst die Virus- und unmittelbar darauf die Zellsuspension verabreicht wurden. Tägliche Virusgaben waren ohne Effekt auf die Entwicklung des Ascites. Weder in vivo noch in vitro zeigten sich Anzeichen für eine Virusvermehrung. Tumorzellen, von denen das Newcastlevirus durch Elution entfernt wurde, konnten durch Zugabe von frischem Virus nicht mehr gehemmt werden. *Southam* und *Epstein* (1953) beobachteten mit dieser Virusart bei Mäuseleukämie AK 4 nur eine geringe Hemmwirkung. Weitere Untersuchungen von *Moore* und *Diamond* (1953) befaßten sich eingehend mit den Adsorptions- und Elutionsvorgängen bei den Zellen des *Ehrlich*-schen Ascitestumors und des Sarkoms 180, wobei sich im Elutionsvermögen deutliche Unterschiede gegenüber dem Influenzavirus ergaben. Verschiedenartigste chemisch-physikalische Vorbehandlungen des Virus führten zu einem Verlust der Hemmwirkung. Bei Tumorzellen, die mit „Receptor Destroying Enzyme“ vorbehandelt waren, konnte auch mit vollaktivem Virus keine Vermehrungshemmung erzielt

werden. Bei Zugabe dieses Enzyms zu einer Virus-Zellmischung wurde das Virus von den Zellen entfernt und damit der Einfluß auf das Tumorstadium beseitigt.

Nach Ginder und Friedewald (1951) vermehrt sich das neurotrope *Semliki-Forest-Virus* regelmäßig in der Gewebekultur des Kaninchenfibroms innerhalb von 24—48 Stunden und verursacht in vivo eine rasche Nekrose und Wachstumshemmung, obwohl im normalen Subkutangewebe ausgewachsener Kaninchen anscheinend keine Vermehrung stattfindet. Als Erklärung dieser Diskrepanz wird angenommen, daß die durch das Fibromvirus im Subkutangewebe hervorgerufenen Zellveränderungen die Vermehrung des *Semliki-Forest-Virus* begünstigen. Eine Interferenz konnte nicht nachgewiesen werden, vielmehr gelangen beide Virusarten nebeneinander zur Vermehrung. Das *Semliki-Forest-Virus* persistiert bis zur völligen Rückbildung des Fibroms. Der Hemmeffekt, der durch spezifisches Immuneserum verhindert werden kann, war am deutlichsten, wenn die intramuskuläre Infektion unmittelbar oder innerhalb von 2 Tagen nach der intrakutanen Inokulation des Fibromvirus erfolgte. Wurde das *Semliki-Forest-Virus* zu einem späteren Zeitpunkt gegeben, so war der Erfolg wegen der natürlichen Rückbildung des Fibroms nicht mehr einwandfrei zu beurteilen. Die Infektion führte weder zum Tod noch zur Erkrankung der Kaninchen. Die Vermehrungsfähigkeit des *Semliki-Forest-Virus* wurde schließlich auch an bös- und gutartigen menschlichen Tumoren sowie an normalen Organen in der Gewebekultur geprüft. In gleicher Weise untersuchten auch Ginder und Friedewald (1952) das Verhalten dieses Virus gegenüber dem Kaninchenmyxom in vitro und in vivo. In der Gewebekultur vermehrte es sich in ähnlicher Weise wie im Fibromgewebe. In vivo war die Hemmwirkung auf die Entwicklung der Myxomatose am deutlichsten, wenn das Myxom- und das *Semliki-Forest-Virus* gleichzeitig injiziert wurden. Besonders nach Adaptation des Virus auf Myxomgewebe durch zahlreiche Tierpassagen konnte der Effekt gesteigert und eine signifikante Senkung der Todesrate erreicht werden. Wahrscheinlich beruht die Wirkung auf einer frühzeitigen Nekrose des Myxomgewebes und damit auf einer Reduzierung der Myxomvirämie sowie der metastatischen Myxomläsionen. Jedoch interferiert das *Semliki-Forest-Virus* nach Koprowski und Norton (1950) nicht mit dem Sarkom 180, trotzdem es im neoplastischen Gewebe persistiert, und zeigt keine onkolytische Wirkung auf den Methylcholanthrentumor und das Adenocarcinom. Ebenso vermehrt es sich nach Koprowska und Koprowski (1953) nicht in der Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms und ist ohne Einfluß auf den Lymphoidtumor des Huhnes, Stamm RPL 12 (Sharpless, Davies und Cox, 1950).

Die Wirkung des *Influenzavirus* wurde zuerst von Moore (1949) am Mäusesarkom 180 und am Adenocarcinom EO 771 geprüft, ohne daß unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Tumorbefruchtung eintrat. Der Influenzastamm A (PR 8) vermehrte sich im Sarkom 180 anscheinend nach direkter Inokulation in den ersten 3 Tagen geringfügig, später war seine Anwesenheit allerdings nicht mehr nachweisbar. Die Fähigkeit des Virus, im Adenocarcinom zu parasitieren, war noch begrenzter. Während Lustig und Parodi (1951) die Wirkung des Influenzavirustyps A auf normale und Tumorzellen in vitro untersuchten, wurde die Möglichkeit einer Proliferationshemmung durch den Influenzastamm A (PR 8) erstmals durch Kausche, Landschuetz und Sauthoff (1952) an der Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms erkannt, die sich auch späteren Untersuchern als besonders günstiges Testobjekt erwies. Der Hemmeffekt zeigte sich konzentrationsabhängig,

er ließ sich aber nur bei Inokulation einer Mischung von Tumorzellen und Virus erreichen. *Ackermann* und *Kurtz* (1952) haben den neurotrophen WS-Stamm des Influenzatyphs A durch zahlreiche Serienpassagen an den gleichen Tumorstamm adaptiert und das Virus dort schließlich zur Vermehrung gebracht. Bei Tumorerkrankung setzte die Viruszunahme nach 6 Stunden ein und erreichte ihr Maximum nach 24 Stunden. Die Virusvermehrung im Tumorgewebe war mit einem Verlust der Lebensfähigkeit der Wirtszellen verbunden und führte zu einer Rückbildung oder Zerstörung des Tumors. Auch *Moore* und *Diamond* (1952/53) haben bei 4 Influenzastämmen eine proliferationshemmende Eigenschaft gegenüber dem Sarkom 180 und der Ascitesform des *Ehrlich*-Carcinoms nachgewiesen. Der Erfolg oder Mißerfolg des Tumorstadiums zeigte sich von der Virusmenge und von der Zahl der Tumorzellen abhängig. Das Studium des Adsorptions- und Elutionsvorganges des Virus bei Tumorzellen zeigte manche Ähnlichkeit mit dem Verhalten bei Erythrocyten. Das Influenzavirus wird von beiden Zellarten adsorbiert, worauf die Abnahme des Haemagglutinin- und Infektionstiters hinweist. Im Gegensatz zum Newcastlevirus konnte aber beim Influenzavirus keine Elution von den Tumorzellen nachgewiesen werden. Die mit adsorbiertem Virus behafteten Krebszellen sind in diesem Zustand zur Vermehrung unfähig. Sie erhalten aber diese Fähigkeit wieder, wenn das Virus durch „Receptor Destroying Enzyme“ entfernt wird. Demnach scheint also die Anwesenheit des Virus auf der Zelloberfläche für die Wachstumshemmung verantwortlich zu sein. Mit diesem Enzym vorbehandelte Tumorzellen können das Virus nicht mehr adsorbieren und zeigen daher auch keine Beeinträchtigung ihrer Vermehrungsfähigkeit. Dieser, mit der Wirkung von „Receptor Destroying Enzyme“ auf Erythrocyten parallel verlaufende Befund scheint auf eine Gleichartigkeit der Oberflächenreaktionen hinzuweisen. Durch physikalisch-chemische Schädigungen verschiedenen Grades wurde gezeigt, daß die Hemmwirkung des Virus auf die Tumorzellen eine sehr labile Viruseigenschaft ist. Nach *Koprowska* und *Koprowski* (1953) war die Ausbeute an Ascitesflüssigkeit beim *Ehrlich*-Carcinom nach Behandlung mit dem neurotrophen WS-Stamm geringer als bei unbehandelten Kontrolltieren. Einzelne Versuche sprachen für eine onkolytische Wirkung des Virus, andere Resultate waren zweifelhaft.

Nach *Moore* (1949) zerstört das *Virus der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis* das transplantable Mäusesarkom 180, allerdings nur dann, wenn die Tiere intraperitoneal mit letalen Dosen infiziert werden. Das Virus erreichte zunächst im Tumorgewebe in den ersten 5 Tagen nach der Infektion seine höchste Konzentration, später waren ähnliche Mengen auch im Gehirn enthalten, während die übrigen Organe nur einen geringen Titer aufwiesen. Der Viruseffekt war also mit einer Allgemeininfektion und dem Tod der Versuchstiere verbunden. Daß die onkolytische Wirkung jedoch nicht eine tödliche Allgemeininfektion zur Voraussetzung hat, zeigten *Sharpless*, *Davies* und *Cox* (1950) an dem Beispiel des transplantablen, malignen Lymphoidtumors (RPL 12) des Huhnes, bei dem sie eine Rückbildung der Geschwulst ohne merkliche Schädigung des Wirtes erzielten, wenn die Infektion an der Stelle oder in der Nähe der Tumorerkrankung vorgenommen worden war. Ebenso wirkte sich eine Mischung von Tumorzellen mit Virus, die 1 Stunde bei 4° C aufbewahrt worden war, hemmend auf die Tumorentwicklung aus. Virus, das in zahlreichen Tumorpässagen gehalten worden war, zeigte auch in größerem Abstand vom Tumor noch die gleiche Wirkung wie Virus aus Mäusegehirn, das in die Stelle der Tumorerkrankung direkt injiziert worden

war. Da die verwendeten LD₅₀-Titer die gleichen waren, ist die beobachtete Wirksamkeitsdifferenz eher qualitativer als quantitativer Natur. Die Viruskonzentrationen, die im Tumorgewebe des Huhnes erreicht wurden, wiesen die gleiche Höhe auf wie im infizierten Mäusegehirn. Ferner persistierte das Virus in der Geschwulst länger als im Blut. Von besonderem Interesse war auch die Feststellung, daß die mit Virus behandelten Hühner fast alle immun waren gegenüber homologen Tumortransplantaten, auch wenn sich nach der Erstinokulation unter der Behandlung keine palpablen Geschwülste entwickelt hatten. Der Viruseffekt auf das Mäusesarkom 180, den auch *Koprowski* und *Norton* (1950) bestätigten, wurde von *Moore* und *O'Connor* (1950) in einer weiteren Studie näher analysiert. Nach intraperitonealer Infektion zeigten die Geschwülste in den nächsten 2—3 Tagen noch normales Wachstum, dann aber wurde es gestoppt. Tumortransplantate vom 3. Tag gingen bei vorher immunisierten Mäusen noch zu 50% an gegenüber 100% bei den Kontrolltieren. Transplantate von Geschwülsten vom 6. Tag nach Behandlungsbeginn wuchsen nicht mehr. Die histologische Prüfung zeigte nur noch nekrotisches, nicht mehr lebensfähiges Gewebe. Die Schnelligkeit, mit der der Tumor zerstört wurde, hing offensichtlich von der Menge des inokulierten Virus ab. Alter und Größe der Geschwülste waren ohne Einfluß auf die onkolytische Wirkung. Nach subkutaner Infektion trat die Tumorerstörung zur gleichen Zeit und in der gleichen Ausdehnung ein wie nach intraperitonealer oder intracerebraler Virusinokulation, und die Lebensfähigkeit der Krebszellen war 6 Tage später beseitigt. Das Virus findet also, wenn es in einen empfänglichen Wirt gelangt, den Weg in den Tumor. Da der tumorzerstörende Effekt dieser Virusart immer mit dem Tod der Mäuse verbunden ist, mußten die Transplantate zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der infizierten Neoplasmen auf immune Tiere übertragen werden, da diese sonst der Infektion erliegen, ehe der Erfolg der Überpflanzung beurteilt werden kann. Schutz vor der Infektion wurde erreicht durch Verwendung von Immuns Serum oder durch vorherige aktive Immunisierung. Bei aktiv oder passiv immunisierten Tieren wird das Tumorstadium durch die Infektion nicht beeinflusst. Der wichtigste Faktor scheint demnach die Anwesenheit von aktivem Virus zu sein. *Moore* (1951/52/53) versuchte, die onkolytische Eigenschaft von der unerwünschten neurotrophen zu trennen. Durch fortgesetzte Tumorpässagen gelang eine Veränderung der Affinität für das neoplastische Gewebe, so daß die onkolytische Eigenschaft verstärkt wurde, während der Neurotropismus unverändert erhalten blieb. Bei laufenden Gehirnpässagen verlor dagegen das Virus allmählich seine onkolytische Fähigkeit. Bei Verwendung des Mäusestammes PRI, der gegenüber der Virusinfektion weitgehend resistent ist, verlief die Tumorerstörung ohne Krankheitserscheinungen. Das Virus der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis weist nach *Moore* (1951) eine ähnliche onkolytische Wirkung auch bei 5 anderen transplantablen Mäusetumoren auf. Bei der Mäuseleukämie (Stamm AK 4) wirkt dieses Virus nach *Southam* und *Epstein* (1953) im Sinne einer Hemmung der Leukocytoese und der Organinfiltration.

Nach *Koprowski* und *Norton* (1950) interferiert das *Virus der Japanischen B-Encephalitis* trotz seiner Anwesenheit in neoplastischem Gewebe nicht mit dem Sarkom 180 und besitzt keine Wirkung auf den Methylcholanthrentumor und das Adenocarcinom. Auch besteht keine deutliche Wirkung auf das Mäusesarkom 37 und die Ascitesform des *Ehrlich-Carcinoms* (*Koprowski* und *Love*, 1953, *Koprowska* und *Koprowski*, 1953). Dagegen führt es ohne Schädigung des Wirtes zur Rückbildung des Lymphoidtumors des Huhnes (*Sharpless*, *Davies* und *Cox*, 1950).

Das *St.-Louis-Encephalitis*- und das *louping-ill-Virus* erreichen nach *Koprowski* und *Norton* (1950) im Sarkom 180 ähnliche Titer wie im Gehirn. Die Virusinfektion hatte allerdings keinen sichtbaren Effekt auf den Originaltumor, jedoch waren die Transplantate nicht mehr lebensfähig, woraus die interferierende Wirkung hervorging. Auch mit dem Adenocarcinom EO 771 und dem Methyleholanthrentumor schienen beide Virusarten zu interferieren. Das *louping-ill-Virus* hatte dagegen keinen Einfluß auf das osteogene Sarkom (*Wagner*). Wenn auch anfänglich das Tumorstadium unter der Behandlung langsamer war, erreichte die Geschwulst schließlich doch die gleiche Größe wie die Kontrollen. *Koprowski* und *Love* (1953) prüften die Wirkung beider Viren auf das Mäusesarkom 37 und den Ascitestumor an einem Mäusestamm, der gegenüber der Virusinfektion resistent ist, so daß der Hemmeffekt auf die Tumorentwicklung ohne anschließende Transplantationsversuche beurteilt werden konnte. Die beobachtete Hemmwirkung war jedoch geringfügiger als mit dem West-Nile-Virus. In einer eingehenden Studie haben *Koprowska* und *Koprowski* (1953) festgestellt, daß sich die beiden Virusarten zwar in den Asciteszellen des *Ehrlich*-Carcinoms gut vermehren, dennoch aber keinen Antitumoreffekt ausüben, da sich ähnliche Ascitesmengen wie bei den unbehandelten Kontrollen entwickelten, und Transplantate in gleichem Prozentsatz erfolgreich waren. Während die Infektion zum Tode der Mäuse führt, wird dagegen der Lymphoidtumor des Huhnes, Stamm RPL 12, ohne Schädigung des Wirtes zurückgebildet (*Sharpless, Davies* und *Cox*, 1950). Neuerdings haben *Cheever* und *Dickos* (1953) das *St.-Louis-Encephalitis-Virus* in Ascites des *Ehrlich*-Carcinoms in Serienpassagen gezüchtet und die optimalen Vermehrungsbedingungen ermittelt, wobei hohe Virustiter erreicht wurden. Hierbei haben sich Hinweise für einen geringen onkolytischen Effekt ergeben.

Koprowski und *Norton* (1950) beobachteten zuerst den interferierenden Effekt der *West-Nile-Infektion* auf das Mäusesarkom 180, der sich aus den Ergebnissen von Transplantationen virusbehandelter Tumoren ergab, die nicht angingen. Das Virus vermehrt sich im Tumorgewebe und erreichte dort einen höheren Titer als im Blut, der jedoch etwas geringer als im Gehirn war. Zu den gleichen Ergebnissen gelangten diese Autoren auch mit dem *Ilhéus-Virus*, während das *Bunyamwera-Virus* trotz seiner Anwesenheit im neoplastischen Gewebe in keinem einzigen Fall mit der Lebensfähigkeit der Tumorzellen interferierte. Das West-Nile-Virus zeigte eine deutliche onkolytische Wirkung auch auf den Methyleholanthrentumor. Der höhere Virustiter im Geschwulstgewebe als im Blut wies auf die Affinität des Virus zu den neoplastischen Zellen hin. Transplantate virusbehandelter Tumoren gingen nicht an, obwohl die Originaltumoren unter der Viruseinwirkung nicht wesentlich kleiner waren als die Kontrollen. Die gleiche Interferenzwirkung bestand auch gegenüber dem Adenocarcinom EO 771 sowie, wenn auch in wechselndem Ausmaße, gegenüber osteogenen Sarkomen (*Wagner* und *Ridgeway*). Dagegen zeigte das *Bunyamwera-Virus* keinen Effekt auf den Methyleholanthrentumor und das Adenocarcinom, während die Interferenz des *Ilhéus-Virus* gegenüber beiden Tumorarten geringfügig war. Andererseits schien das *Bunyamwera-Virus* mit den osteogenen Sarkomen (*Wagner* und *Ridgeway*) zu interferieren. Während die bisherigen experimentellen Untersuchungen sich fast ausschließlich auf Tiertumoren beziehen, haben *Toolan* und *Moore* (1952) ein menschliches Plattenepithelcarcinom verwendet, das in röntgenbestrahlten Ratten und in Gewebekulturen ein gutes Wachstumsvermögen zeigte. Als Testvirus wurde der Egypt-101-Stamm des West-Nile-Virus ausgewählt, das gegenüber Ratten und Menschen keine besonderen

pathogenen Eigenschaften besitzt. Die Untersuchungen haben eindeutig ergeben, daß sich dieses Virus im menschlichen Plattenepithelcarcinom vermehrt und sowohl in vivo als auch in vitro eine onkolytische Wirkung ausübt. Bei einer weiteren Prüfung der onkolytischen Fähigkeiten des Bunyamwera- und des West-Nile-Virus benutzten *Koprowski* und *Love* (1953) einen Mäusestamm, der gegenüber der Virusinfektion resistent ist. Beide Virusarten bewirkten einen ausgesprochenen Hemmeffekt auf das Sarkom 37 und das *Ehrlich*-Carcinom. Eine ähnliche Wirkung besitzt nach *Koprowska* und *Koprowski* (1953) auch das Ilhéus-Virus auf die Ascitesform des *Ehrlich*-Carcinoms. In dieser Studie wurde nochmals der Hemmeffekt des West-Nile-Virus auf den gleichen Tumor bestätigt. Die Ascitesflüssigkeiten blieben unter der Behandlung deutlich geringer als bei den Kontrolltieren, und Transplantationen verliefen erfolglos. Diese biologischen Beobachtungen wurden auffallenderweise nicht durch die morphologischen Befunde gestützt, da nur eine geringfügige Abnahme der Zahl der Tumorzellen mikroskopisch erkennbar war. Die strenge Affinität des Virus zu den Tumorzellen zeigte sich bei intravenöser Infektion, nach der das Virus in hoher Konzentration aus der Ascitesflüssigkeit gewonnen werden konnte. Weitere Studien wurden an einem Mäusestamm durchgeführt, der gegenüber der letalen Wirkung des Virus resistent war. Unter der Virusbehandlung erlag nur ein geringer Prozentsatz der Tiere dem Neoplasma. Ein Teil der Mäuse überlebte eine Beobachtungszeit von 60 Tagen und war offensichtlich vom Tumor geheilt. Die onkolytische Wirkung der Viren scheint von der Konzentration der malignen Zellen im Inokulum abhängig zu sein. Diese Befunde sind ein zusätzlicher Beweis, daß das West-Nile-Virus eine biologisch wahrnehmbare Interferenz gegenüber dem neoplastischen Prozeß ausübt. Beim Bunyamwera-Virus konnte dagegen der onkolytische Effekt auf das *Ehrlich*-Carcinom sowohl bei Anwendung biologischer als auch morphologischer Kriterien beobachtet werden. In einigen Versuchen entwickelte sich unter der Virusbehandlung überhaupt keine Ascitesflüssigkeit, und die Mehrzahl der Mäuse ging nicht am Tumor zugrunde. Im Ausstrichpräparat ergab sich eine deutliche Zerstörung der Tumorzellen. Diese sorgfältige Studie der morphologischen Zellveränderungen ließ manche Einzelheiten erkennen, die zum Verständnis der onkolytischen Wirkung des Bunyamwera-Virus bedeutsam sind. Dieses Virus besitzt dagegen nach *Southam* und *Epstein* (1953) nur einen geringen Hemmeffekt auf die Mäuseleukämie, Stamm Ak 4. Auf den Lymphoidtumor des Huhnes (RPL 12) ist das Ilhéus-Virus nach *Sharpless*, *Davies* und *Cox* (1950) ohne Einfluß, während das West-Nile-Virus zur Rückbildung dieses Tumors ohne Schädigung des Wirtes führt.

Southam, *Bronstein* und *Webber* (1951) untersuchten die Wirkung des West-Nile- und Ilhéus-Virus auf die Mäuseleukämie Ak 4 und Ak 9421. Während die Ak-4-Leukämie durchschnittlich nach 8 Tagen mit fast 100%iger Sicherheit zum Tode führt, verläuft die Ak-9421-Leukämie weniger akut mit einer mittleren Überlebenszeit von 14 Tagen. Beide neurotrope Virusarten, von denen das West-Nile-Virus etwas virulenter für Mäuse ist als das Ilhéus-Virus, bewirken nach intraperitonealer Injektion eine leichte Leuko- und Lymphopenie und führen meist innerhalb von 8 Tagen zum Tode. Wenn diese beiden Virusarten in einem frühen Entwicklungsstadium bei der weniger akuten Leukämie 9421 verabreicht werden, so sterben die Mäuse häufig an der Encephalitis, bevor die unbehandelten Kontrollmäuse Zeichen einer Leukämie aufweisen. Daher kann man eine Verlängerung der Überlebenszeit und einen Effekt auf die leukämische Erkrankung nur dann beobachten, wenn die Virus-

infektion im Spätstadium erfolgt. Durch entsprechendes Variieren des Intervalles zwischen Inokulation der Leukämiezellen und der Virusinfektion konnte im Spätstadium eine temporäre Unterdrückung der leukämischen Zellproliferation erzielt werden. Ferner war die Hemmung der leukämischen Infiltration in Leber und Milz gegenüber der Hepatosplenomegalie der unbehandelten Kontrollmäuse auffallend. Die Virustiter waren in der Milz höher als im Blut. Schließlich wurde der Beweis erbracht, daß die Viren in oder an den leukämischen Zellen anwesend sind. Eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit war zwar konstant, jedoch nicht signifikant. Im Verlauf ihrer Untersuchungen über die Wirkung von 12 neurotrophen Virusarten auf die Ascitesform des *Ehrlich*-Carcinoms beobachteten *Koprowska* und *Koprowski* (1952) wiederholt den onkolytischen Effekt des *Bunyamwera*-Virus. Sie stellten fest, daß bereits 4—5 Tage nach intraperitonealer Virusinfektion keine Tumorzellen mehr im Peritonealexsudat vorhanden waren, und daher Versuche zur Übertragung auf virusimmune Mäuse ergebnislos verliefen. In einer eingehenden Studie untersuchten *Love*, *Koprowski* und *Cox* (1953) cytochemisch und morphologisch den chronologischen Ablauf der durch das *Bunyamwera*-Virus an den Tumorzellen hervorgerufenen Veränderungen und suchten nach Unterschieden zum „physiologischen“ Verhalten nicht infizierter Krebszellen. Die in infizierten Ascitesflüssigkeiten auftretenden Virustiter zeigten, daß eine Vermehrung stattfindet. Der Prozentsatz der Tumorzellen im Ascites begann bereits am 1. Tag nach der Infektion abzusinken, während der Anteil degenerierter Zellen entsprechend anstieg. Am Ende des 3. Tages waren nur noch ganz vereinzelt intakte Tumorzellen anzutreffen, das Exsudat bestand aus entzündlichen Zellen, unter denen große Makrophagen und Lymphocyten vorherrschten. Die Ascitesflüssigkeit wurde in den folgenden 3 Tagen weitgehend resorbiert. Ascitesflüssigkeit vom 3. Tag, die Mäusen subkutan injiziert wurde, löste kein Tumorwachstum mehr aus. In einigen Versuchen waren die Tumorzellen schon am 2. Tag verschwunden und am 3. Tag schon kein Ascites mehr vorhanden. Zur Zeit des Todes zeigten die schließlich der Virusinfektion nach 5—7 Tagen erlegenen Tiere mit ganz wenigen Ausnahmen keine Ascitesflüssigkeit mehr. Das Auftreten einer großen Zahl von degenerierenden Zellen im virusinfizierten Tumor stimmte mit einem signifikanten Abfall in der Zahl der mitotischen Figuren überein. Die degenerativen Veränderungen schienen die Interphase der Tumorzellen zu bevorzugen und eine Hemmung des Beginnes der mitotischen Teilung hervorzurufen. Auf der Höhe des Zerstörungsprozesses waren bei 20% der Tumorzellen 1—6 und mehr Pseudonucleoli vorhanden, deren Größe ihrer Zahl umgekehrt proportional war, während die echten Nucleoli schrumpften, sich teilten oder zerfielen, so daß bis zu 20 in einem einzigen Kern vorkamen. Während dieses Vorganges behielten die Nucleoli ihr Chromatin und waren deshalb leicht von den Pseudonucleoli unterscheidbar. Die Zellperipherie zeigte multiple Knospungen — jede Knospe enthielt einen Nucleolus oder einen Pseudonucleolus — wobei die Mehrzahl der Zellen bemerkenswert vergrößert war, bevor die Knospung abliefe. Die Kernmembran war gespannt und platzte schließlich unter Ausstülpung zahlreicher keulenförmiger Kernfragmente in das Cytoplasma. Das Endresultat erschien wie eine Kolonie von Aktinomyeten. Jede Keule bestand aus einem Nucleolus, umgeben von seiner Membran. Wenn die Kernmembran platzte, erschienen acidophile Körnchen oder nackte Nucleoli, die keine Chromatinmembran hatten, frei im Plasma. Die Ruptur der Kernmembran war gefolgt vom kompletten Zerfall der Zelle. Die resultierenden Bruchstücke der Tumorzellen wurden durch

eine große Zahl von Makrophagen phagocytiert, die im Exsudat auftraten. Schließlich wurde die Ascitesflüssigkeit resorbiert.

III. Charakterisierung der onkolytischen Eigenschaften.

Die weitaus meisten der bisher als onkolytisch erkannten Virusarten sind neurotrop (Tabelle 1), d. h. sie besitzen eine besondere Prädisposition für das Nervengewebe und führen bei der Maus zu einer tödlichen Allgemeininfektion. Die onkolytische Wirkung hat jedoch keinesfalls eine Schädigung des Nervensystems oder eine tödliche Infektion zur Voraussetzung, da zahlreiche andere neurotrope Virusarten trotz schwerer Erkrankung der Mäuse keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit von Tumorzellen erkennen lassen. Die virusbedingte Onkolyse scheint vielmehr weitgehend unabhängig von der *Infektionsempfänglichkeit* des Wirtstieres zu sein, da eine Virusproliferation im Tumor mit einer Rückbildung der Geschwulst auch ohne gleichzeitige merkliche Schädigung des Wirtes möglich ist (*Turner und Mulliken*, 1950 u. a.). So zerstören z. B. die Erreger der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis und der St.-Louis-Encephalitis, des louping-ill- und das West-Nile-Virus nicht nur das Mäusesarkom 180, sondern auch den malignen Lymphoidtumor RPL 12 des Huhnes, obwohl sie für dieses Wirtstier keine nennenswerte Pathogenität besitzen (*Sharpless, Davies und Cox*, 1950). Auch das mäusepathogene Semliki-Forest-Virus beeinträchtigt nicht nur das Kaninchenfibrom und in geringerem Maße auch die Entwicklung des Kaninchenmyxoms, sondern es vermag auch das in röntgenbestrahlten Ratten gezüchtete Mäusesarkom 180 zu zerstören (*Ginder und Friedewald*, 1951/52). Ebenso führt das Virus der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis zur Onkolyse des Mäusesarkoms 180 ohne Schädigung des Wirtes, wenn dieser Tumor auf den gegenüber der Infektion unempfindlichen Mäusestamm PRI transplantiert wird (*Moore*, 1953).

Obwohl Tumorgewebe im allgemeinen gute Kulturbedingungen für die Viren zu bieten scheinen, so weichen diese jedoch in ihrem proliferationshemmenden Verhalten gegenüber Geschwülsten differenten Zelltyps beträchtlich voneinander ab. Die Ergebnisse systematischer Testungen lassen klar erkennen, daß jede der als onkolytisch befundenen Virusarten ein besonderes „*Tumorspektrum*“ aufweist (*Koprowski und Norton*, 1950, *Moore*, 1952, *Koprowska und Koprowski*, 1953). Die onkolytische Wirkung ist eine derart spezifische Eigenschaft, daß sie selbst bei Tumoren gleichen histologischen Typs deutliche Unterschiede erkennen läßt, indem z. B. eine Virusart nur ganz bestimmte Carcinomstämme zerstört, während sie andere Carcinome ebenso wie Sarkome nicht beeinflußt. Interessanterweise verfügen die Erreger der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis und des louping ill, die im Neutralisations- und Komplementbindungstest sowie in der Kreuzimmunitäts-

Tabelle 1. Die wichtigsten der bisher ermittelten onkolytischen Virusarten und die damit getesteten Tumorarten.

Virusart	Tumorart	Wirkung
Vakzinevirus	Nagerepitheliome	+
	Nagersarkome	0
	Mäusesarkom 180	±
	Kaninchenpapillom	0
	Brown-Pearce-Tumor	0
	Mäuseleukämie 1394 u. C. 1498	0
	Mäuseleukämie 9417	±
Virus III	Brown-Pearce-Tumor	±
	Kaninchensarkom RS ₁	0
	Kaninchenfibrom	±
Klass. Geflügelpest	Brown-Pearce-Tumor	0
	Mäusecarcinom C 63	+
Russische Frühjahr-Sommer-Encephalitis	Mäusesarkom 180	+
	Mäuseleukämie Ak 4	+
	Lymphoidtumor des Huhnes RPL 12	+
West-Nile-Virus	Mäusesarkom 180	+
	Methylcholanthren-Tumor	+
	Adenocarcinom EO 771	+
	Osteogene Sarkome (Wagner u. Ridgeway)	+
	Sarkom 37	+
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	±
	Mäuseleukämie Ak 4 u. 9421	±
	Lymphoidtumor des Huhnes RPL 12	+
	Menschl. Epidermoidcarcinom	+
Venez. Pferde-Encephalomyelitis	Mäusesarkom 180	±
	Osteogene Sarkome (Wagner u. Ridgeway)	+
	Methylcholanthren-Tumor	0
	Adenocarcinom EO 771	0
Louping ill	Mäusesarkom 180	+
	Methylcholanthren-Tumor	±
	Adenocarcinom EO 771	±
	Osteogenes Sarkom (Wagner)	0
	Sarkom 37	±
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	0
	Lymphoidtumor des Huhnes RPL 12	+
St.-Louis-Encephalitis	Mäusesarkom 180	+
	Methylcholanthren-Tumor	±
	Adenocarcinom EO 771	±
	Sarkom 37	±
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	0—±
	Lymphoidtumor des Huhnes RPL 12	+

(Fortsetzung von Tabelle 1.)

Virusart	Tumorart	Wirkung
Bunyamwera	Mäusesarkom 180	0
	Methylcholanthren-Tumor	0
	Adenocarcinom EO 771	0
	Osteogene Sarkome (Wagner u. Ridgeway)	±
	Sarkom 37	+
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	+
	Mäuseleukämie Ak 4	±
Semliki-Forest	Mäusesarkom 180	0
	Methylcholanthren-Tumor	0
	Adenocarcinom EO 771	0
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	0
	Kaninchenfibrom	+
	Kaninchenmyxomatose	±
Japan. B-Encephalitis	Mäusesarkom 180	0
	Methylcholanthren-Tumor	0
	Adenocarcinom EO 771	0
	Sarkom 37	0
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	0
	Lymphoidtumor des Huhnes RPL 12	+
Ilhéus	Mäusesarkom 180	+
	Methylcholanthren-Tumor	±
	Adenocarcinom EO 771	±
	Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms	±
	Mäuseleukämie Ak 4 u. 9421	±
	Lymphoidtumor des Huhnes RPL 12	0

+ stark onkolytisch, ± schwach onkolytisch, 0 fehlende Onkolyse.

prüfung eine enge immunbiologische Verwandtschaft aufweisen, über das gleiche Tumorspektrum (Moore, 1951/52). Jedoch besteht keinesfalls immer bei enger Antigenverwandtschaft auch die gleiche Tumoraaffinität, wie das Beispiel der St.-Louis- und Japanischen B-Encephalitisviren zeigt. Der wichtigste Faktor ist die geeignete Tumor-Viruskombination, die in jedem Fall geprüft werden muß und nicht vorausgesagt werden kann. Die bisherigen Erfahrungen reichen daher noch nicht aus zur Beantwortung der Frage, ob eine tumorzerstörende Wirkung nur bestimmten oder allen Viren zukommt, solange sie nicht an der breiten Skala der Tumoren systematisch ausgetestet sind.

An die Annahme, daß rasch wachsendes Embryonalgewebe die Reproduktion von Viren erleichtert, knüpft sich die Überlegung, ob nicht ungewöhnlich rasch wachsende Neoplasmen diejenigen sind, in denen sich ein Virus am erfolgreichsten vermehren und die stärkste onkolytische Wirkung ausüben kann. Die *Vermehrungs- und Wachstumsrate des Tumors*

Tabelle 2. Virus- und Rickettsienarten mit geringfügiger oder fehlender onkolytischer Wirkung im Tierexperiment.

Anopheles B	Menschl. Pneumonitis	Ri. akari (Rickettsialpox)
Bwamba	Mumps	Ri. burneti (Q-Fieber)
Coxsackie A	Ornithose	Ri. conori (Marseille-
Dengue	Passos I u. II	fieber)
Encephalomyocarditis	Pferde-Encephalomye-	Ri. mooseri (murines
(MM oder Columbia SK)	litis (östlich u. westlich)	Fleckfieber)
Gelbfieber	Poliomyelitis (Lansing)	Ri. pijperi (Südafrikan.
Herpes simplex	Pseudo-Geflügelpest	Zeckenbißfieber)
Hundestaupe	Pseudo-Rabies	Ri. prowazeki (klass.
Hunde-Hepatitis	Rinder-Encephalitis	Fleckfieber)
Influenza	Sabethes	Ri. rickettsi (Rocky
(pneumo- und neurotrop)	Schweine-Influenza	Mountain spotted fever)
Katzen-Pneumonitis	Schweinepest	
Kumba	Tollwut	
Leucocelaneus	Uganda S	
Lymphogranuloma ven.	Zika	
Mäuse-Encephalomyelitis		
(GD VII, Theiler)		

scheint jedoch ohne Bedeutung für seine jeweilige Resistenz gegenüber der Viruswirkung zu sein, wie aus den Untersuchungen mit dem Erreger der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis an Geschwülsten mit verschiedener Wachstumsintensität hervorgeht (*Moore*, 1951/52). Eine Entscheidung der Frage, ob das Alter und die Größe der Geschwulst von Einfluß auf die Empfindlichkeit für den Destruktionsprozeß sind, ist noch nicht möglich, da die hierüber angestellten Beobachtungen zu keinen einheitlichen Ergebnissen geführt haben. Ältere leukämische Prozesse bei Hühnern scheinen jedoch weniger empfänglich für die Virustherapie zu sein als frische Veränderungen (*Sharpless, Davies und Cox*, 1950).

Der Tumoreffekt zeigt sich nur bei Anwesenheit von *aktivem Virus*, da er weder bei Formol- oder Ultraviolettlicht-behandelten noch hitze-inaktivierten Elementarkörperchen in Erscheinung tritt (*Ginder und Friedewald*, 1951, *Moore und Diamond*, 1953). Ferner antworten Geschwülste in aktiv oder passiv immunisierten Tieren nicht auf die Infektion mit homologem Virus (*Kuwata*, 1951, *Moore und O'Connor*, 1950), das sich in diesem Fall nicht im Tumor vermehren und die zur Onkolyse notwendigen Konzentrationen erreichen kann. Die wichtigsten Voraussetzungen für die Tumorerstörung bestehen also in aktivem Virus und in einem gegen die Virusinfektion ungeschützten Organismus (*Moore*, 1951/52). Das Virus findet in einem empfänglichen Organismus sowohl nach intravenöser, intraperitonealer, intracerebraler als auch subkutaner Infektion seinen Weg in den Tumor. Es bestehen deutliche Affinitäten zwischen einzelnen Virusarten und bestimmten Tumoren, worauf schon *Levaditi und Nicolau* (1923) an dem Beispiel des Vakzinevirus hingewiesen

haben. Die *selektive Lokalisation* des Virus im Tumorgewebe (Oncotropismus) kann man daran erkennen, daß es dort z. B. nach intravenöser Gabe eine höhere Konzentration aufweist als zur gleichen Zeit im Normalgewebe und dort auch dann noch persistiert, wenn das Blut und andere Organe bereits virusfrei sind. Selbst hitzeinaktiviertes Vakzinevirus sammelt sich noch im Mäusesarkom 180 an (*Moore, Turner und Mulliken, 1950*). Für diese selektive Anreicherung von Viren im Tumorgewebe gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Sie kann auf einer erhöhten Durchlässigkeit der Kapillaren beruhen, die die Geschwulst versorgen. Ferner ist eine besondere Affinität und eine bevorzugte Adsorption des Virus an neoplastische Zellen vom zirkulierenden Plasma oder Lymphstrom aus denkbar. Der ausschlaggebende Faktor scheint jedoch in den meisten Fällen die Möglichkeit zu sein, daß die Virusvermehrung in den Tumorzellen stärker ist als in normalem Gewebe.

Die selektive Anreicherung gibt jedoch noch keinen Hinweis auf eine *onkolytische Auswirkung*, da manche Virusarten zwar Konzentrationen erreichen können, die denen onkolytisch wirkender Viren vergleichbar sind, ohne dabei aber die Lebensfähigkeit bestimmter Geschwülste zu beeinträchtigen. So können manche Erreger, wie z. B. das Vakzinevirus, in neoplastischen Geweben längere Zeit ohne merkliche Beeinflussung des biologischen Verhaltens des Tumors parasitieren. Ihre örtliche Anwesenheit kann auch dann noch ohne Einfluß auf das Geschwulstwachstum sein, wenn sie, wie z. B. das Virus III im *Brown-Pearce-Tumor*, durch Transplantationen viele Generationen mit übertragen werden (*Rivers und Pearce, 1925/27*). Neben den onkolytischen Viren, die sich im Tumorgewebe vermehren und es dabei zerstören, gibt es andere Viren, die sich ohne Beeinflussung der Lebensfähigkeit der Geschwulst vermehren und schließlich noch eine 3. Gruppe, die dort ohne Vermehrung persistiert. Die Übergänge im Verhalten dieser einzelnen Virusgruppen sind fließend (*Southam und Moore, 1952*). Bei ausbleibender Virusvermehrung muß daran gedacht werden, daß das Virus im Tierkörper vielleicht rasch verändert oder durch die in allen Geweben vorhandenen Hemmstoffe der verschiedensten Art beeinträchtigt wird und dadurch keine Möglichkeit mehr hat, mit den Tumorzellen zu reagieren.

Besonders wichtig im Hinblick auf die angestrebte Virusbehandlung menschlicher Tumoren ist die Beobachtung, daß die onkolytische Wirkung z. B. des Virus der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis auf das Mäusesarkom 180 durch fortgesetzte Passagen in Tumor- oder Gehirngewebe quantitativ ansteigt oder abfällt. Ein Virus kann durch allmähliche *Adaptation* auch qualitativ in seiner Aktivität derart modifiziert werden, daß es schließlich eine Geschwulstart zerstört, die ursprünglich gegen den Ausgangsstamm resistent war (*Ackermann und Kurtz, 1952 u. a.*). Dagegen sind Versuche, die störende neurotrope von der erwünschten onko-

lytischen Eigenschaft durch entsprechende Passagen zu trennen oder abzuschwächen, bisher fehlgeschlagen. Im Zusammenhang mit diesen Erfahrungen bespricht *Moore* (1951) einige Erklärungsmöglichkeiten für die stufenweise auftretende Virusmodifikation. Falls die ursprüngliche Viruspopulation aus qualitativ unterschiedlichen Partikeln zusammengesetzt ist, könnte dieser Vorgang das Resultat einer allmählichen Selektion darstellen. Hierbei müßten die neurotrophen Partikel in ihrer Zahl konstant bleiben, während die für den Tumoreffekt verantwortlichen je nach der gewählten Maßnahme zu- oder abnehmen. Es ist aber durchaus auch möglich, daß sich das Virus im Tumor anfänglich ohne besondere Schädigung seiner Wirtszelle zu reproduzieren vermag, jedoch mit zunehmender Passagezahl im Tumorgewebe allmählich die Fähigkeit zur Schädigung und Zerstörung der Wirtszellen erwirbt. Da eine Viruspopulation bekanntlich aus Individuen mit unterschiedlichen Vermehrungsarten bestehen kann, muß schließlich auch daran gedacht werden, ob nicht die tumoraffinen Elementarkörperchen rascher an empfindliche Zellen adsorbiert und dort vermehrt werden.

Für die Destruktion einer Geschwulst ist natürlich eine gewisse *Zeit* erforderlich, die sich jedoch nur auf wenige Tage erstreckt. Das Virus kann nach der Infektion — wie das Beispiel des Erregers der Russischen Frühjahr-Sommer-Encephalitis beim Sarkom 180 zeigt (*Moore*, 1949, 1951/52) — bereits in hohen Konzentrationen im Tumorgewebe erscheinen und sich dort in den ersten 3 Tagen zu hohen Titern vermehren, die längere Zeit persistieren. In Auswirkung der örtlichen Virusvermehrung kommt es dann bis zum 6. Tag zur kompletten Tumorzerstörung. Die hierfür notwendige Zeit hängt von der inokulierten Virusmenge ab. So kann bei hohen Viruskonzentrationen die vollständige Zerstörung des neoplastischen Gewebes bereits in 3 Tagen erreicht sein, bei kleinen Dosen sind 8 Tage erforderlich. Ähnliche Beziehungen zwischen Viruskonzentration und onkolytischem Effekt haben auch *Koprowski* und *Norton* (1950) festgestellt. Für die onkolytische Reaktion scheint eine hohe Mindestkonzentration erforderlich zu sein. Die im Gewebe erreichten Virustiter sind bei täglichen Virusgaben nicht höher als nach einmaliger Infektion (*Turner* und *Mulliken*, 1950, u. a.).

Der *Mechanismus der Tumورهemmung* ist noch völlig unbekannt. Alle bisherigen Erklärungsversuche sind rein spekulativer Natur. Die Hemmwirkung ist sicherlich ein komplexer Vorgang, der aus zahlreichen Einzelfaktoren besteht, unter denen aber die spezifische Eigenschaft des infektiösen Agens der wichtigste ist. Für die Annahme, daß die Zerstörung in erster Linie die Folge der Virusaktivität ist, sprechen die selektive Anreicherung des Virus im neoplastischen Gewebe und die der Virusinvasion folgende gewebliche Schädigung, ferner die Möglichkeit einer Steigerung des onkolytischen Effektes durch Adaptation und

schließlich noch die Tatsache, daß nur relativ wenige Virusarten eine Proliferationshemmung bei ganz verschiedenen Tumoren auszuüben vermögen, während die Mehrzahl der Viren trotz einer ähnlichen Pathogenität für den Wirt völlig wirkungslos ist.

Wenn die Onkolyse voraussetzt, daß das Virus in die Tumorzellen eindringt und sich dort vermehrt, so scheint es durchaus möglich zu sein, daß sie die Folge einer Interferenz mit den intrazellulären Stoffwechselvorgängen darstellt. Die Proliferationshemmung würde demnach im Sinne eines kompetitiven *biochemischen Antagonismus* zustande kommen (Turner und Mulliken, 1948/50), d. h. das Virus könnte als hochkomplexer Antimetabolit bezeichnet werden, der bei seiner Synthese besondere Stufen des Zellstoffwechsels blockiert oder mit der Zelle darum konkurriert. Damit wäre die tumorzerstörende Wirkung des Virus dem Effekt von chemischen Stoffwechselantagonisten ähnlich. Die Entscheidung aber, ob die Anwesenheit und Vermehrung des Virus im Tumorgewebe einen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Geschwulstzellen hat, scheint sowohl von den individuellen Eigenschaften des Erregers als auch von denen des Neoplasmas abzuhängen.

Wie von Love, Koprowski und Cox (1953) an dem Beispiel des Bunyamwera-Virus bei den Carcinomzellen der Ascitesform des Ehrlich-Tumors gezeigt wurde, scheint der Zerstörungsprozeß die *intermitotische Phase* der Tumorzellen zu betreffen und in einer Art zellulärer Hypertrophie und anormaler mitotischer Teilung zu bestehen, die zur vollständigen Zellzerstörung führt. Das von diesen Autoren beobachtete Auftreten von Pseudonucleoli in virusinfizierten Tumorzellen ist in seiner Bedeutung noch unklar. Der Hemmeffekt auf die Tumorzellen scheint aber nicht nur bei der Virusvermehrung, sondern nach Untersuchungen von Moore, Diamond und Sabachewski (1952) sowie Moore und Diamond (1953) an Tumorzell-Virusmischungen *in vitro* bereits schon nach *Adsorption der Elementarkörperchen* an die Zelloberfläche einzutreten, ohne daß eine intrazelluläre Virusvermehrung erfolgt.

Es muß jedoch ferner noch in Betracht gezogen werden, daß die Virusinfektion auch auf *indirekten Wegen* das Tumorwachstum zu beeinflussen vermag. Es können Gefäßläsionen entstehen, die zur ischämischen Nekrose führen oder durch entzündliche Reaktionen (Exsudat, Entzündungsstellen) eine absolute oder relative Verringerung der Zahl der Krebszellen bewirken. Hierzu könnten ferner Phagocytose, enzymatische Verdauung, Veränderung des Elektrolytgleichgewichtes oder des osmotischen Druckes und die toxische Wirkung zerfallender Gewebsprodukte beitragen (Love, Koprowski und Cox, 1953). Im Falle der Ascitesform des Ehrlich-Carcinoms waren schließlich noch die Agglutination und Präzipitation maligner Zellen in Betracht zu ziehen. Die Viruswirkung scheint in mancher Hinsicht dem Einfluß physikalischer und chemischer Einwirkungen in der

Herbeiführung einer unspezifischen Degeneration zu gleichen, die sowohl neoplastische als auch normale Zellen umfaßt.

Von besonderem Interesse sowohl im Hinblick auf die Virusvermehrung als auch auf die Biologie der Tumorzelle ist ferner die Frage, ob die Krebszellen eine aktive *Immunität* zu entwickeln vermögen oder ob sie nur passiv an der Wirtsimmunität teilnehmen. *Rivers* und *Pearce* (1925) bestätigen die Feststellung von *Levaditi* und *Nicolau* (1923), daß maligne Zellen unfähig sind, eine aktive Immunität gegen Viren zu entwickeln, woraus die lange Anwesenheit von Viren in Tumorgeweben zu erklären wäre. Die immunologische Antwort der Krebszellen auf die Virusinfektion scheint jedoch noch keineswegs befriedigend untersucht.

IV. Behandlungsversuche mit onkolytischen Viren beim Menschen.

Die onkolytischen Eigenschaften einiger Virusarten wurden bereits auch beim Menschen studiert. Die Beobachtungen bezogen sich anfänglich auf den Einfluß zufälliger Virusinfektionen oder Schutzimpfungen bei Tumorkranken. Die recht hoffnungsvollen tierexperimentellen Ergebnisse veranlaßten aber bald einige Autoren zu systematischen klinischen Behandlungsversuchen. Zur künstlichen Infektion wurden im wesentlichen nur solche Virusarten ausgewählt, die eine onkolytische Wirkung auf Tiertumoren erkennen ließen. Ferner durften es nur solche Erreger sein, gegen die keine weitverbreitete Immunität besteht und die sich im menschlichen Organismus ohne schwere Schädigung des Wirtes zu vermehren vermögen. Die zur Virusbehandlung herangezogenen Patienten hatten neoplastische Erkrankungen, die inoperabel waren und weder auf röntgenologische noch chemotherapeutische Behandlung reagierten. Ferner handelte es sich im wesentlichen nur um solche Fälle, deren Krankheitsverlauf objektiv beurteilt werden konnte.

Als erster berichtete *De Pace* (1912) von einem unerwarteten Heilerfolg mit *Tollwutvakzine* bei 2 von 5 Krebskranken. Wenn es sich hierbei auch nur um abgetötete Vakzine gehandelt hat, der man keine direkte Viruswirkung zusprechen kann, so soll in diesem Zusammenhang jedoch noch auf gleichlautende Erfahrungen von *Park* (1950) sowie *Higgins* und *Park* (1951) hingewiesen werden, die 30 an malignen Melanomen erkrankte Patienten ebenfalls mit Tollwutvakzine behandelt hatten. Bei 6 Fällen nahmen die Hautmelanome an Größe deutlich ab und wurden flacher. Die Entwicklung neuer Metastasen schien verzögert. Histologisch zeigten frische Hautmetastasen den stärksten Effekt, der in Nekrose und Degeneration bestand. In einem Fall war die Natur des Tumors nicht mehr zu erkennen. Es konnte jedoch nicht sicher entschieden werden, ob die Rückbildung frischer Hautmetastasen von einer direkten Wirkung auf die Tumorzellen oder auf die Gefäßversorgung herrührte. Der Haupteffekt äußerte sich jedenfalls in einer abnehmenden Vaskularisierung. Wenn frische Metastasen 1—2 Monate nach ihrer Rückbildung entfernt wurden, erschienen sie wie pigmentierte Hautnarben. Durch sorgfältige Untersuchung konnten jedoch gewöhnlich einige wenige Krebs-

zellen entdeckt werden. Die Beobachtungszeit bei diesen Patienten war allerdings zu gering, um etwas über die Dauer des Erfolges aussagen zu können.

Hosters und Mitarbeiter (1949) beobachteten eine zufällige Rückbildung von *Hodgkinscher* Lymphogranulomatose während einer *Virushepatitis*. *Bierman*, *Hammon*, *Eddie*, *Meyer* und *Shimkin* (1950) hatten das *Lymphogranuloma-venereum-Virus* 5 Patienten mit metastatischen neoplastischen Erkrankungen intravenös verabreicht; 5 weitere Fälle, die an Lymphom oder lymphatischer Leukämie erkrankt waren, erhielten das Virus der *Katzen-Agranulocytose* intramuskulär oder intrakutan. Deutliche, aber nur temporäre klinische Remissionen von 1—6 Monaten wurden bei 3 an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Kindern unter dem Einfluß einer *Varicelleninfektion* gesehen. In keinem Fall wurde jedoch ein bleibender günstiger Effekt auf den neoplastischen Prozeß erzielt.

Southam und *Moore* (1951) erprobten den Einfluß der auf intravenösem oder intramuskulärem Weg zugeführten künstlichen Infektion mit *West-Nile*-, *Ilhéus*- und *Bunyamwera-Virus* bei zahlreichen Patienten mit inoperablen Neoplasmen in der Hoffnung, das Tumorstadium in ähnlicher Weise wie im Tierexperiment hemmen zu können, obwohl der Verlauf derartiger Virusinfektionen beim Menschen damals noch unbekannt war. Dabei wurden das Verhalten und die Verteilung des Virus sowie die Antikörperbildung eingehend geprüft. Das West-Nile-Virus rief asymptomatische Infektionen bei 5 von 21 Patienten hervor; die Infektion mit dem Ilhéus-Virus ging bei 9 von 19 Fällen an und verursachte aber bei 3 Personen eine milde Enzephalitis. Das Bunyamwera-Virus führte bei 1 Patienten zu einer sehr schweren Enzephalitis mit geistiger Störung, es vermochte dagegen 3 weitere Personen nicht zu infizieren. Trotzdem bei einigen Kranken die Lokalisation der 3 Viren im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, wurde kein signifikanter Effekt auf das Wachstum der Neoplasmen erzielt. Auch vorherige Cortisongaben erhöhten nicht die Empfindlichkeit gegenüber dem Virus.

In einer anschließenden Studie untersuchten *Southam* und *Moore* (1952) das Verhalten weiterer Viren. Die bei einem Patienten mit *Vakzinevirus* versuchte Infektion ging nicht an, da dieser 6 Jahre vorher vakziniert worden war. 9 mit *Newcastlevirus* behandelte Fälle zeigten außer Initialfieber mit Anorexie und Nausea keine weiteren klinischen Reaktionen. Trotzdem eine Virusvermehrung bei diesen Personen aus einer persistierenden Virusausscheidung im Urin zu entnehmen war, wurde weder eine Lokalisation des Virus im Tumorgewebe noch ein Hemmeffekt beobachtet. Dagegen wiesen 4 Patienten aus einer Gruppe von 34 Kranken bei Infektion mit *Egypt-101-Virus* eine vorübergehende objektive Rückbildung an Tumormasse auf. Dieses Virus, das nach immunologischen Kriterien identisch mit dem West-Nile-Virus ist, zeigte eine selektive Lokalisation in bestimmten neoplastischen Geweben. Bei 2 weiteren Fällen trat eine leichte Enzephalitis auf. Ein überzeugender substantieller, therapeutischer Effekt ist jedoch ausgeblieben.

V. Voraussetzungen und Möglichkeiten für die Geschwulstbehandlung mit onkolytischen Viren.

Die bisher bei menschlichen Tumoren klinisch erprobten Virusarten waren zwar ohne eindeutigen therapeutischen Effekt. Die Feststellung aber, daß sich einige dieser Erreger auch beim Menschen selektiv in Geschwülsten anreichern und zu einer vorübergehenden Rückbildung führen

können, zeigt, daß ein Behandlungserfolg nicht außerhalb der Möglichkeiten liegt. Diese Hoffnung ist um so berechtigter, als die bisherigen Behandlungsversuche beim Menschen unter ungünstigen Voraussetzungen vorgenommen werden mußten. Da noch kein Hinweis vorliegt, welche Viren bei menschlichen Tumoren onkolytisch wirken, hat man einfach einige im Tierexperiment erprobte Erreger nach den bereits erwähnten Gesichtspunkten ausgewählt. Die Erfolgsaussichten waren aber von vornherein sehr gering, da das „Tumorspektrum“ der einzelnen Virusarten sehr eng ist und nicht vorausgesagt werden kann. Ferner waren von einzelnen Erregern weder ihre Vermehrungsfähigkeit noch ihre pathologische Auswirkung auf den menschlichen Organismus bekannt. Derart dem Zufall überlassene Behandlungsversuche gestatten natürlich kein Urteil über die Möglichkeit einer Tumorbbeeinflussung durch künstliche Virusinfektionen. Hierzu müssen erst durch systematisches Vorgehen die Voraussetzungen geschaffen werden.

Für weitere Behandlungsversuche am Menschen sollten vorerst nur solche Virusarten herangezogen werden, deren onkolytische Wirkung auf die jeweilige Tumorart in vorausgegangenen Testversuchen erwiesen ist, und die entweder keine hohe Pathogenität aufweisen, oder aber einer antibiotischen Behandlung zugänglich sind, damit unerwartete Nebenwirkungen der künstlichen Infektion sofort unterbunden werden können. Ferner kommen nur solche Virusarten in Frage, gegen die keine allgemein verbreitete Immunität besteht.

Wenn man die beim Tier getroffene Feststellung, daß jede Virusart ihr besonderes „Tumorspektrum“ besitzt, berücksichtigt, so wird man ein ähnlich unterschiedliches Verhalten auch bei menschlichen Geschwülsten erwarten dürfen, zumal diese auch eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der medikamentösen Behandlung mit Cytostatica zeigen. Dies bedeutet, daß man jetzt zu einer systematischen Testung der Viren an menschlichen Tumoren übergehen muß. Es ist durchaus denkbar, daß auf diese Weise Virusarten aufgefunden werden, die ohne besondere Pathogenität für den Menschen dennoch onkolytisch sind und zu ähnlichen klinischen Resultaten führen, wie sie im Tierexperiment beobachtet wurden. Bei der Testung kann man sich der Erfahrung bedienen, daß viele menschliche Neoplasmen so gut wie Normalgewebe in mit Röntgenbestrahlung oder Cortisongaben vorbehandelten heterologen Wirten gedeihen oder in Bruteiern gezüchtet werden können (*Toolan* und *Moore*, 1952, *Toolan*, 1953, *Sommers* und Mitarbeiter, 1953).

Ebenso wie das verschiedenartige „Wirkungsspektrum“ der Antibiotica häufig eine Empfindlichkeitsprüfung der Bakterien zur Auswahl des wirksamsten Präparates erforderlich macht, so darf man auch die Wahl des Virus nicht dem Zufall überlassen, sondern es muß vorher getestet werden, welcher Erreger in dem speziellen Fall eine onkolytische

Wirkung besitzt. Erst bei einem derart gezielten Vorgehen, das wegen der Umständlichkeit der Methodik vorerst nicht routinemäßig durchgeführt werden kann und einen erheblichen Zeitverlust bedeutet, wird man die Leistungsfähigkeit der menschlichen Tumorbehandlung mit Viren beurteilen können. Entscheidend ist die Frage, ob beim Menschen eine komplette Onkolyse erzielt werden kann, die die Voraussetzung für eine endgültige Heilung darstellt. Andernfalls ist höchstens ein temporärer Effekt zu erwarten.

Die Ergebnisse der Tierexperimente enthalten manche Hinweise für die Möglichkeit der Virusadaptation an Tumorgewebe, mit der eine erhebliche Steigerung des onkolytischen Effektes einhergehen kann. Es ist daher durchaus die Hoffnung berechtigt, daß ähnliche Resultate auch durch fortgesetzte Viruspassagen in menschlichen Tumoren zu erzielen sind, wozu die genannten Züchtungsmethoden ebenso wie die Gewebekulturen zur Verfügung stehen. Auf diesem Weg dürfte auch eine Herabsetzung der pathologischen Auswirkung auf den Gesamtorganismus und eine stärkere Beschränkung der Infektion auf den neoplastischen Prozeß zu erreichen sein als dies bei der Geschwulstbehandlung mit „Teilungsgiften“ möglich ist, deren Anwendungsmöglichkeiten durch unerwünschte Nebenwirkungen auf das normale Proliferationsgewebe stark eingeschränkt werden.

Während bei chemotherapeutischen Agenzien wiederholte Gaben über längere Zeit notwendig sind, ist bei einer Virusbehandlung von Tumoren nach tierexperimentellen Erfahrungen eine einmalige Infektionsdosis im allgemeinen ausreichend, da auch durch mehrmalige Virusgaben keine höheren Titer im neoplastischen Gewebe erzielt werden können. Kurze Zeit nach der künstlichen Infektion wird der Organismus immun, so daß damit der Vermehrungsprozeß des Erregers sein Ende findet. Die Immunitätsentwicklung schränkt also die Dauer der Einwirkungsmöglichkeit des Virus auf den neoplastischen Prozeß ein. Um die Einwirkung auf das Tumorgewebe zu erhöhen, muß an die Möglichkeit einer fraktionierten Behandlung mit antigenetisch verschiedenen onkolytischen Viren gedacht werden, die natürlich keine gegenseitige Interferenz aufweisen dürfen. Die Patienten unterscheiden sich aber in der Infektionsempfänglichkeit, da die Virusvermehrung durch verschiedenste Abwehrmechanismen unterdrückt werden kann. Auch für diese Fälle wäre eine fraktionierte Behandlung unerlässlich. Bei einem großen Teil der sich in ärztliche Behandlung begebenden Krebskranken ist das Leiden wegen seiner Lokalisation, Ausdehnung, Metastasierung und Generalisierung weder einem operativen Eingriff noch einer Strahlenbehandlung mit genügendem Erfolg zugänglich. Eine entscheidende Wendung in der Krebstherapie ist nur von einer Behandlungsmethode zu erwarten, die nicht nur lokal wirkt, sondern vor allem auch die im

Körper verstreut liegenden Kolonien entarteter Zellen erreicht und deren malignes Wachstum beeinträchtigt. Diese Möglichkeit ist bei den Viren nicht von der Hand zu weisen, da sie sich im virämischen Stadium über die Blutbahn ausbreiten und in alle Gewebe einzudringen vermögen, wobei ihre bekannte Organspezifität und selektive Lokalisation unter Umständen mit Vorteil ausgenutzt werden könnten.

Die Möglichkeit des therapeutischen Gebrauches von Viren ist also noch keineswegs ausgeschöpft. Die bis jetzt zu übersehenden Erfolgsaussichten lassen es durchaus als lohnend erscheinen und verpflichten deshalb bei der gegenwärtigen therapeutischen Hilflosigkeit dazu, den bisher eingeschlagenen Weg in systematischer Weise fortzusetzen.

Literatur.

- Ackermann, W. W.* and *H. Kurtz*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **81**, 421 (1952). — *Andrewes, C. H.*: J. Path. a. Bacter. (Brit.) **50**, 227 (1940). — *Bierman, H. R.*, *W. McD. Hammon*, *B. U. Eddie*, *K. F. Meyer* and *M. B. Shinkin*: Cancer Res. (Am.) **10**, 203 (1950). — *Cheever, F. S.* and *J. Dickos*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **83**, 822 (1953). — *De Pace, N. G.*: Ginecologia **9**, 82 (1912). — *Findlay, G. M.* and *F. O. McCallum*: Tr. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg. **30**, 507 (1937). — *Ginder, D. R.* and *W. F. Friedewald*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **77**, 272 (1951); **79**, 615 (1952). — *Hallauer, C.*: Z. Hyg. **113**, 61 (1931). — *Higgins, G. K.* and *G. T. Park*: Amer. J. Path. **27**, 728 (1951). — *Hoster, H. A.*, *R. P. Zanes* and *E. von Haam*: Cancer Res. (Am.) **9**, 473 (1949). — *Kaufman, N.*, *L. C. Prieto*, *E. J. Mason* and *T. D. Kinney*: Amer. J. Path. **28**, 561 (1952). — *Kausche, G. A.*, *Ch. Landschuetz* und *R. Sauthoff*: Z. Naturforsch. **7 b**, 33 (1952). — *Koprowski, H.* and *T. W. Norton*: Cancer (Am.) **3**, 874 (1950). — *Koprowska, I.* and *H. Koprowski*: Feder. Proc. (Am.) **11**, 420 (1952). — Cancer Res. (Am.) **13**, 651 (1953). — *Koprowski, H.* and *R. Love*: Proc. amer. Assoc. Cancer Res. **1**, 30 (1953). — *Kuwata, C.*: Science **114**, 640 (1951). — *Levaditi, C.* et *S. Nicolau*: C. r. Soc. Biol. **86**, 928 (1922); **87**, 498 (1922). — Ann. Inst. Pasteur (Par.) **37**, 443, 474 (1923). — *Levaditi, C.* et *R. Schoen*: C. r. Soc. Biol. **122**, 736 (1936). — C. r. Acad. Sci. **202**, 702 (1936). — C. r. Soc. Biol. **125**, 607 (1937). — *Levaditi, C.*, *R. Schoen* et *L. Reinié*: Ann. Inst. Pasteur (Par.) **58**, 353 (1937). — C. r. Soc. Biol. **124**, 711 (1937). — *Levaditi, C.* et *P. Huber*: C. r. Acad. Sci. **202**, 2018 (1936). — Rev. Immunol. (Fr.) **3**, 5 (1937). — *Love, R.* and *H. Koprowski*: Fed. Proc. (Am.) **11**, 421 (1952). — *Love, R.*, *H. Koprowski* and *H. R. Cox*: Cancer Res. (Am.) **13**, 350 (1953). — *Lustig, E. S.* und *A. S. Pörodi*: Rev. Soc. Argentina Biol. **27**, 324 (1951). — *Moore, A. E.*: Cancer (Am.) **2**, 516, 525 (1949). — *Moore, A. E.* and *Sh. O'Connor*: Cancer (Am.) **3**, 886 (1950). — *Moore, A. E.*: Cancer (Am.) **4**, 375 (1951). — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) **76**, 749 (1951). — Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 945 (1951/52). — Proc. amer. Assoc. Cancer Res. **1**, 39 (1953). — *Moore, A.*, *E. L. C. Diamond*, *H. H. Mackay* and *L. Sabachewsky*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **81**, 498 (1952). — *Moore, A. E.* and *L. C. Diamond*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **79**, 663 (1952). — J. Immunol. (Am.) **71**, 441 (1953). — *Park, G. T.*: Arch. Dermatol. a. Syph. (Am.) **62**, 694 (1950). — *Pearce, L.* and *T. M. Rivers*: J. exper. Med. (Am.) **46**, 65, 81 (1927). — *Reilly, H. Ch.*: Cancer Res. **13**, 821 (1953). — *Rivers, Th. M.* and *L. Pearce*: J. exper. Med. (Am.) **42**, 523 (1925);

55, 69 (1935). — *Schoen, R.*: C. r. Soc. Biol. **125**, 845 (1937). — C. r. Acad. Sci. **204**, 1903 (1937). — C. r. Soc. Biol. **125**, 939 (1937); **128**, 135 (1938). — Ann. Inst. Pasteur (Par.) **60**, 499 (1938); **62**, 260 (1939). — (1950). — *Sharpless, G. R., M. C. Davies and H. R. Cox*: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.) **73**, 270 (1950). — *Sommers, Sh. C., B. A. Sullivan and Sh. Warren*: Cancer Res. (Am.) **12**, 915 (1953). — *Southam, Ch. M., B. Bronstein and L. F. Webber*: Cancer Res. (Am.) **11**, 669 (1951). — *Southam, Ch. M. and A. E. Moore*: Amer. J. Trop. Med. **31**, 724 (1951). — Cancer (Am.) **5**, 1025 (1952). — *Southam, Ch. M. and J. D. Epstein*: Cancer Res. (Am.) **13**, 581 (1953). — *Toolan, H. W. and A. E. Moore*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **79**, 697 (1952). — *Toolan, H. W.*: Cancer Res. (Am.) **13**, 389 (1953). — *Turner, I. C. and B. Mulliken*: Cancer Res. (Am.) **7**, 774 (1947). — Cancer (Am.) **3**, 354 (1950). — *Turner, I. C., B. Mulliken and R. A. Kritzler*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **69**, 304 (1948). — *Zahl, P. A. and M. L. Drasher*: Cancer Res. (Am.) **7**, 658 (1947).