

# Kann man Arsen als wirksamen Factor für Teerkrebsentwicklung bei Kaninchen annehmen?

Von

**Dr. Yoshisuke Yoshioka.**

*Aus der gyn. Klinik der Universität Okayama (Director: Prof. Dr. Ando)*

*Aus dem chem. Institut derselben Universität (Director: Prof. Dr. Shimiau).*

Eingegangen am 1. März 1927.

Seit Gelingen des experimentellen Teerkrebses durch Yamagiwa und Itchikawa im Jahre 1915, werden über den wirksamen Teerfactor für Krebsentwicklung eifrig Untersuchungen angestellt. A Bayet<sup>1)</sup> nimmt durchaus Arsen als einen solchen Factor an, und zwar aus zwei Gründen, erstens wegen der grossen Aehnlichkeit zwischen Teerkrankheit und chronischer Arsenvergiftung; zweitens a) wegen des stetigen Vorhandenseins von Arsen, auch manchmal in ziemlich grosser Menge, in Kohlen und in allen Produktion derselben, welche einen aethiologischen Zusammenhang mit Krebsentwicklung bei Teerarbeitern etc. haben. b) und weil dasselbe auch in grösserer als normaler Menge in verschiedenen Geweben inclusive der Tumoren und im Harn der Teerarbeiter nachweisbar ist.

Möller<sup>2)</sup> hat eine gegenteilige Anschauung und betont aus drücklich, dass manchmal im Teer vorhandenes Arsen keine Rolle bei Teerkrebsentwicklung spielt.

Leitch und Kennaway<sup>3)</sup> ist es gelungen, durch Arsenlösung künstlich Krebs zu entwickeln. Diese Tatsache scheint auch ein Beweis dafür zu sein, dass Arsen ein wichtiger Teerfactor für Teerkrebsentwicklung ist.

Bayet<sup>4)</sup> nimmt die vorangehende Veränderung des allgemeinen Zustandes des Versuchstieres als eine wichtige Bedingung für Teerkrebsentwicklung an. Nach ihm ist diese allgemeine Veränderung durch Arsen im Teer bedingt. Der Arsengehalt im Teer ist sehr gering. Nach Menetrier und Surmont<sup>5)</sup> ist er auf 0.001 gr per 1 gr Teer geschätzt.

(Dieser Teer stammt von der Apotheke de l'Hôtel-Dieu und ist nach der Methode von Cribier analysiert.) Dieser behauptet, dass durch wiederholte Pinselung mit Teer an Tieren genug Arsen in den Körper eingeführt wird, um eine allgemeine Veränderung hervorzurufen, trotzdem der Arsengehalt gering ist. Die Angaben, welche ein Fehlen oder ein minimales Vorhandensein von Arsen im Teer behaupten, sind von ihm energisch bestritten und er führt sie auf fehlerhafte Analysenmethode zurück.

Auch P. Delbet<sup>6)</sup> äussert dieselbe Meinung wie Bayet und betont, wie wichtig die durch Arsen bedingte Veränderung der chemischen Vorgänge im Organismus für Arsenkrebs ist.

Viele Autoren beschäftigen sich mit den verschiedenen Destillationsprodukten des Teers, auf welche ich nicht ingehen werde.

Die obengenannte Arsentheorie von Bayet ist von Autoren wie Leitch und Kennaway<sup>3)</sup> bestritten worden.

Nach dem heutigen Stand ist die Arsentheorie von Bayet noch nicht klargestellt und bleibt nur eine Hypothese. Es ist also sehr wichtig und interessant, sich mit diesem Problem weiter zu beschäftigen.

## Eigene Untersuchung.

Meine Untersuchungen bestehen aus drei Teilen:

### 1. Bestimmung des Arsengehaltes des verschiedenen Organe von Teerkaninchen. Arsenanalysenmethode von Organen:

a) Zerstörung der Organe nach der Methode von Gautier<sup>7)</sup>. Die der Analyse unterworfenen Organe werden in einer Porcellanschale mit der Scheere zerkleinert. Dann setzt man der Gewebemasse Salpetersäure von 30° Baumé (Spec. Gew. 1,264) im Verhältnis von 30 gr  $\text{HNO}_3$  für 50 gr Organmasse zu und erwärmt sie mässig. Allmählich wird die Gewebemasse verflüssigt. Dann wird sie mit der Zeit orangefarbig und verdickt. In diesem Moment nimmt man das Feuer weg und setzt reine Schwefelsäure zu im Verhältnis von 2.5 gr  $\text{H}_2\text{SO}_4$  für 50 gr Organmasse. Die Masse bräunt sich und siedet sehr stark. Man erwärmt dann, bis von der Masse Schwefelsäuredampf auszugehen beginnt. Man fügt Salpetersäure tropfenweise über dem Bodensatz hinzu (5—6 gr  $\text{HNO}_3$  für 50 gr Organmasse.) Die Masse verflüssigt sich von neuem, während sie starken Salpetersäuredampf abgibt. Endlich, wenn Salpetersäure gänzlich zugesetzt worden ist, erhitzt man die Masse, bis die Verkohlung in die Erscheinung tritt. Dann ist also der Zerstörungsprozess der Organe beendet.

Zunächst wird die eben gewonnene Masse in derselben Schale mit sanfter Handhabung pulverisiert und mit Zusatz von siedendem Wasser geführt. Dann wird diese Flüssigkeit abfiltriert. Dem Filtrat werden unter Zusatz von einigentropfen Natrium bisulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ) Schwefelwasserstoffe langsam hineingeleitet. Der gewonnene Niederschlag, welcher durch Sulfür von Arsen und Schwefel etc. bedingt ist, wird auf einem kleinem Stück Filterpapier gesammelt. Ueber diesen Rückstand tropft man ein Drittel Ammoniak mittels eines feinen Glasstäbchens. Der Arsensulfür wird in Ammoniak gelöst und vollständig über dem Wasserbad abgedampft. Der Arsensulfür ist dann umgewandelt in Arsensäure ( $\text{AsH}_3\text{O}_4$ , 1/2 aq.) über dem Wasserbad mit Zusatz von einigen Tropfen Salpetersäure. Man dampft diese Lösung bis zum Trocknen ab, zu dem Zwecke, übrig gebliebene Salpetersäure auszutreiben. Weiter setzt man einige Tropfen Schwefelsäure zu und erwärmt die Masse. Der Ueberschuss von Schwefelsäure ist eben abgetrieben. Die so gewonnene Flüssigkeit wird mit Wasser verdünnt und.

b) eingeführt in den Apparat von Bertrand, eine ideale Modification von Marsh. Das Princip des Bertrand'schen bzw. des Marsh'schen Apparates ist, die Sauerstoff- oder Chlorverbindungen von Arsen in gasige Wasserstoffverbindung umzuwandeln und durch Erhitzen der letzten Arsenspiegel (metallisches Arsen) zu bekommen. Es ist nicht nötig, genaueres darüber anzugeben, weil die Ausführungsweise definitiv ist. Die Differenzierung des Arsenspiegels mit Antimon ist natürlich ausgeführt. Der Arsenspiegel ist gelöst verschwunden durch Zusatz von reiner Salpetersäure, Antimon dagegen nicht.

Ich habe mit obenerwähnter Methode die verschiedenen Organe der drei geteerten Kaninchen auf Araen untersucht. Alle drei Resultate sind so übereinstimmend, dass eines davon anzugeben genügt.

Kaninchen. Weiblich. Körpergewicht 2700 gr. 20 Tage lang geteert.

Organe	Gew. d. Organe in frischem Zustand	As-gehalt d. Organe.
Ohren	27 gr	ca. 1.5 mgr
Milz	5 gr	„ 0.5 mgr
Leber	130 gr	„ 2.5 mgr
Nieren	20 gr	„ 1.0 mgr

Die drei Kaninchen zeigten ohne Ausnahme die typischen Blutbilder und die mikroskopischen Veränderungen der betreffenden Organe, welche ich in einer anderen Dissertation „Ueber einige Untersuchungsergebnisse von Bluteucocyten bei Entwicklung des Kaninchenteerkrebses“<sup>8)</sup>, veröffentlicht habe.

2. Zunächst habe ich nach derselben Methode den Arsengehalt derselben Organe der drei Kaninchen, bei welchen vorher 2 Monate lang täglich 0.3 cc. von 0.01% iger Arsensäure (Merk) intravenös injiziert waren, bestimmt. Die Versuchstiere sind sehr munter. Die bis zum Abtöten durchgeführten Blutuntersuchungen und die mikroskopische Durchforschung der betreffenden Organe zeigten keine typischen Veränderungen, wie ich in der anderen Dissertation „Ueber einige Untersuchungsergebnisse von Bluteucocyten bei Entwicklung des Kaninchenteerkrebses“ berichtet habe. Die drei Analysenresultate sind sehr ähnlich, so dass eines davon hier anzuführen genügt.

Kaninchen. Weiblich. Körpergewicht 2900 gr.

Organe	Gew. d. Organe in frischem Zustand	As-gehalt d. Organe
Ohren	27.5 gr	negativ
Milz	5 gr	ca. 0.3 mgr
Leber	135 gr	„ 0.3 mgr
Nieren	22 gr	negativ

3. Endlich habe ich das Dialysierverfahren mit Teer ausgeführt und dialysierte Substanzen den Kaninchen intravenös injiziert, um irgendwelche Veränderungen dadurch hervorzurufen.

Die dazu gebrauchte Dialysiermembran ist nach Ostwald angefertigt, u. z. macht man aus mit Collodium dünn überzogenem (Die überzogene Collodiumschicht war nicht gemessen) Filtrierpapier ein Röhrchen, dessen innerer Durchmesser 1.2 cm beträgt. Das zur Dialyse geeignete Kollodium ist auf folgende Weise zubereitet: Es ist eine Modification der Methode Malfitano's von Kopaczewski<sup>9)</sup>, u. z. sind 50 gr. nitrisierte Baumwolle mit 600 Teilen von absolutem Alkohol und 400 Teilen von schwefelsaurem Aether behandelt. In dieses Röhrchen brachte ich 8 gr Teer; es wurde grösstenteils davon an der Innenfläche überzogen. Endlich wurde dieses Röhrchen beiderseits durch Umschlagen der Enden geschlossen und über dieselben ebenso Collodium gezogen. Dieses Röhrchen wurde dann in 220 cc. steriler physiologischer Kochsalzlösung eingetaucht und dialysiert. Nach Verlauf eines Monates wurde des Medium opalescent, reagierte neutral, und Phenol war nicht nachweisbar. Das Arsen wurde in diesem Medium (100 cc. dieses Mediums waren der Analyse unterworfen)

nur spurweise nachgewiesen. Die Kohlsalzlösung und das Filtrierpapier waren natürlich vorher auf Arsen genau kontrolliert und es war keine Spur davon nachgewiesen worden. Das zur Dialyse gebrauchte Kollodium war auch als arsenfrei nachgewiesen. 1 cc. von diesem Medium wurde täglich den drei Kaninchen intravenös injiziert. Es muss besonders darauf aufmerksam gemacht werden, dass es nötig ist, die Versuchstiere streng von geteerten Kaninchen zu trennen, weil die Kaninchen die Gewohnheit haben Teer zu lecken. Alle drei Kaninchen zeigten fast ein gleiches Verhalten. Die täglich durchmusterte Blutuntersuchung zeigte schon vom zehnten Injectionstage an erstaunlicher Weise die typischen Bilder, die ich in der anderen Dissertation<sup>18)</sup> Ueber einige Untersuchungsergebnisse von Blutleucocyten bei Entwicklung des Kaninchenteerkrebses“ mitgeteilt habe. Zwei davon waren spontan am 17. und 21. sten Injectionstage gestorben und das andere wurde am 20. sten Tage abgetöet. Die (Organe Milz, Leber, Nieren, Lymphdrüsen) der drei Kaninchen zeigen dieselben mikroskopischen Bilder wie Teerkaninchen. Der Arsengehalt der Organe eines solchen Kaninchens lautet wie folgt:

Kaninchen. Weiblich. Körpergewicht 2700 gr.

Organe	Gew. d. Organe in frischem Zustand	As-gehalt
Milz	5 gr	Spuren
Leber	130 gr	Spuren
Nieren	20 gr	negativ

### Zusammenfassung.

Die obenangeführten Ergebnisse kann ich folgendermassen zusammenfassen:

1. Wie ich in der anderen Dissertation „Ueber einige Untersuchungsergebnisse von Blutleucocyten bei Entwicklung des Kaninchenteerkrebses“ berichtet habe, scheinen die betreffenden typischen Blutbilder sehr enge Beziehungen zur Teerkrebsentwicklung zu haben. Die dialysierten Substanzen scheinen sehr nahe verwandt mit solchen Substanzen zu sein, welche bei Teerapplication durch die Haut hindurch in die Blutbahn übergehen und eine typische Blutveränderung hervorzurufen im Stande sind, weil beide Arten von Substanzen die betreffenden typischen Veränderungen bedingen.

2. Die Substanzen, welche typische Blutbilder hervorzurufen im Stande sind, sind entgegen der Hypothese von Bayet ganz unabhängig von Arsen aus folgenden Gründen: Erstens können die dialysierten Substanzen typische Blutbilder hervorrufen, trotzdem Arsen in denselben nur ganz minimal nachgewiesen worden ist. Die Organe der mit dialysierten Substanzen injizierten Kaninchen sind fast als arsenfrei nachgewiesen, obgleich sie dieselben typischen mikroskopischen Bilder wie in teerapplicierten Fällen zeigen. Zweitens Kann die Arseninjection keine typischen Blutbilder hervorrufen.

3. Die die typischen Blutbilder hervorrufenden Substanzen scheinen grosse Affinität mit Arsen zu haben, weil die Organe bei teerapplizierten Kaninchen einen ziemlich grossen Arsengehalt zeigen, obgleich er keinen directen Zusammenhang mit typischen Blutbildern hat.

4. Durch weitere Untersuchungen der dialysierten Substanzen kann man vielleicht den cancerogenen Factor des Teers entdecken.

Zum Schluss dieser Arbeit bin ich verpflichtet, meinen herzlichen Dank für die freundliche Anleitung den Herren Professoren Dr. Ando und Dr. Shimizu auszusprechen.

### Literatur.

- 1) **A. Bayet**, Le rôle de l'arsenic dans le cancer du goudron. *Congres du cancer*, Strasbourg, 23—24 Juillet 1923. 2) **Möller (Else)**, Histologische Untersuchungen über den Ausgangspunkt der experimentellen Teerkrebsbildung. *Zeitschr. f. Krebsfor.* Bd. 12, 1923. 3) **Leitch and Kennaway**, Experimental production of cancer by arsenic. *The british medical journal*, London, 9 dec. 1922. 4) **A. Bayet**, Cancer du goudron et cancer arsenical. *Le cancer*, Bruxelles, 1923, t. 1. 5) **P. Menetrier et J. Surmont**, Cancer du goudron chez le lapin. *Bulltin du cancer*, 1922, t. 11. 6) **P. Delbet**, Ce que l'on connait sur les causes du cancer. *Bulltin du cancer*, 1923, t. 12. 7) **A. Gautier**, siehe M. Francois: *Maniquations de chemie analytique appliquée*, 1919. 8) **Y. Yoshioka**, Ueber einige Untersuchungsergebnisse von Blutleucocyten bei Entwicklung des Kaninchenteerkrebses. *Kumamoto-Igaku-Zasshi*, März 1927. **W. Kopiczewski**, *Théorie & pratique des colloides in biologie & in médecine* Paris, 1923.

内容大意

家兎「テール」癌發生ニ於テ砒素ヲ其發生成分ト見做シ得ベキカ

岡山醫科大學産婦人科教室(主任安藤教授)

同 醫化學教室(主任清水教授)

吉岡好助

1915年山極、市川兩氏が「テール」癌發生ニ成功セシ以來學者ハ「テール」ノ癌發生成分ニ就キ熱心ニ研究ヲ開始セリ、A. Bayetハ砒素ヲ以テ癌發生成分ナリト力説ス、併シ又之ニ反對ノ説ヲ唱フル學者モ少カラザルモ之トテ深キ根柢アリテ反對スル所因ニアラズ、之ヲ要スルニ「テール」ノ癌發生成分ガ砒素ナルヤ否ヤハ現今全ク不明ナリトス、而シテ斯ノ如キ問題ヲ解決スルハ癌發生研究上極メテ重要ナリ、余ハ次ニ述ブル余ノ研究ニヨリ Bayetノ砒素說ハ家兎ニ於テハ全然誤リナルニハアラザルヤ且癌發生成分ハ今後如何ニシテ之ヲ發見シ得ベキカノ指針ヲ得タリ。

余ノ研究ハ三部ヨリナル。(1)「テール」ヲ塗布セル家兎ノ諸器關ニ就キ其砒素含有量ヲ測定セリ、余ノ實驗セル三家兎ハ總テ余ノ論文(「テール」癌發生ニ於ケル血液白血球ニ關スル一ノ研究、熊本醫學會雜誌3月發行、1927)ニ發表セル特種ノ白血球像ノ變化竝ニ諸器關ノ變化ヲ示セリ。

(2) 0.01% 亞砒酸 0.3 cc. ヲ2箇月間毎日靜脈内ニ注射セル三家兎ニ就キ諸器關ノ砒素量ヲ測定セリ、實驗三家兎ハ總テ特種ノ白血球像ノ變化竝ニ諸器關ノ變化ヲ示サズ

(3)「テール」ヲオストワルド氏濾膜ヲ用ヒ生理的食鹽水ヲ「メヂウム」トシ濾膜分析ヲ施シ之ヲ三家兎ニ注射シ白血球像竝ニ諸器關ノ變化ヲ研究シ且諸器關ノ砒素量ヲ測定セリ、家兎ハ三頭トモ同一變化ヲ示ス、驚ベキハ注射後10日日ヨリ特意ナル白血球像ノ變化ヲ示セリ、二家兎ハ死亡シー一家兎ハ之ヲ撲殺シ諸器關ヲ鏡檢スルニ又「テール」家兎ニ於ケルト同一變化ヲ示セリ。

上述諸實驗ヨリ次ノ結論ヲ下シ得ベシ。

(1) 余ハ既發表ノ論文ニ於テ特種ノ白血球像變化ガ「テール」癌發生ト極メテ密接ナル關係アルヲ論ゼリ而シテ濾膜分析ニヨリ得シ物質ハ斯ノ如キ特種變化ヲ與フルヲ以テ斯ル濾膜分析ニヨリ得シ物質ハ「テール」塗布ニ際シ皮膚ヲ通シ血中ニ入り特種ノ變化ヲ惹起スル物質ト極メテ近似ナルベシ。

(2) 特種白血球像ノ變化ヲ惹起スル物質ハ家兎ニ於テハ Bayetノ說ニ反シ砒素ナラズ、何トナレバ(イ)濾膜分析ニヨリ得シ物質ハ砒素ノ存在極微ナルニ係ラズ特種ノ白血球像竝ニ諸器關ノ變化ヲ惹起ス、此際諸器關ニハ砒素ノ存在ヲ證明シ得ズ。(ロ)砒素ノ連續少量注射ハ特種ノ白血球竝ニ諸器關ノ變化ヲ來サズ。

(3) 特種ナル白血球像竝ニ諸器關ノ變化ヲ惹起スル物質ハ砒素ト親和シ易キモノノ如シ、是レ「テール」塗布ノ諸器關ハ比較的多量ノ砒素ヲ有スルヲ以テナリ、此際砒素ハ特種變化ト直接關係ナシ。

(4) 濾膜分析ニヨリ得ラルル物質ニ就キ研究セバ「テール」ノ癌發生成分ヲ發見シ得ラルベキカ。(自抄)