

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107228>

Please be advised that this information was generated on 2018-07-08 and may be subject to change.

1227

DOOR VIRUSSEN
GEÏNDUCEERDE LEUKAEMIEËN
BIJ KNAAGDIEREN

L. H. M. VAN GORP

UTRECHT - DEKKER & VAN DE VEGT N.V. - NIJMEGEN



Behoort bij proefschrift L. H. M. van Gorp:
Door virussen geïnduceerde leukaemien bij knaagdieren

DOOR VIRUSSEN GEÏNDUCEERDE LEUKAEMIEËN
/ BIJ KNAAGDIEREN

DOOR VIRUSSEN
GEÏNDUCEERDE LEUKAEMIEËN
BIJ KNAAGDIEREN

ENKELE EXPERIMENTEN MET HET RAUSCHER VIRUS

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. S. J. GEERTS,
HOOGLERAAR IN DE FACULTEITEN DER GENEESKUNDE
EN DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,
VOLGENS HET BESLUIT VAN DE SENAAT
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP 29 JUNI 1966
DES NAMIDDAGS TE 16.00 UUR

DOOR

LEONARDUS HENRICUS MARIA VAN GORP
GEBOREN TE DONGEN



UTRECHT - DEKKER & VAN DE VEGT N.V. - NIJMEGEN

PROMOTOR: PROF. DR. H. J. G. WYERS

Aan mijn Ouders

Aan Rie en de Kinderen

INHOUD

INLEIDING	1
---------------------	---

LITERATUURSTUDIE

HOOFDSTUK I

BESPREKING VAN EEN AANTAL LEUKAEMOGENE VIRUSSEN	5
<i>Het agens van Gross</i>	6
<i>Samenvatting</i>	12
<i>Het agens van Graffi</i>	12
<i>Samenvatting</i>	17
<i>Het agens van Friend</i>	17
<i>Samenvatting</i>	23
<i>Het agens van Bather</i>	24
<i>Het agens van Schoolman en Schwartz</i>	26
<i>Samenvatting</i>	29
<i>Het agens van Moloney</i>	30
<i>Samenvatting</i>	35
<i>Het agens van Stansly</i>	35
<i>Het agens van Breyere-Moloney</i>	36
<i>Het agens van Rauscher</i>	37
<i>Samenvatting</i>	43
<i>Het agens van Rask-Nielsen</i>	44
<i>Leukaemogene agentia, geïsoleerd uit leukaemieën, die geïnduceerd zijn door ioniserende stralen</i>	44
<i>Bespreking der literatuurgegevens</i>	45

ENKELE EXPERIMENTEN MET HET RAUSCHER VIRUS

HOOFDSTUK II

VRAAGSTELLING EN ALGEMENE GEGEVENS	50
--	----

HOOFDSTUK III

DE INVLOED VAN SPLENECTOMIE VÓÓR TOEDIENING VAN HET VIRUS (proef I)	59
---	----

HOOFDSTUK IV

DE INVLOED VAN SPLENECTOMIE NA TOEDIENING VAN HET VIRUS (proef II)	67
--	----

HOOFDSTUK V

DE INVLOED VAN THYMECTOMIE VÓÓR TOEDIENING VAN HET VIRUS (proef III)	74
--	----

HOOFDSTUK VI

A. DE INVLOED VAN THYMECTOMIE NA TOEDIENING VAN HET VIRUS (proef IV)	80
B. ONDERZOEK NAAR DE VOLLEDIGHEID DER THYMECTOMIE (proef V)	87
C. ONDERZOEK NAAR DE EVENTUELE INVLOED VAN THYMECTOMIE OP DE LYMPHATISCHE WEEFSELS EN DE ALGHELE ONTWIKKELING EN GROEI (proef VI)	88

HOOFDSTUK VII

BESPREKING VAN DE RESULTATEN DER PROEVEN	92
--	----

HOOFDSTUK VIII

SAMENVATTING	100
SUMMARY	103

LITERATUURLIJST	105
---------------------------	-----

BIJLAGE

AFBEELDINGEN

Dit proefschrift is voor het grootste deel bewerkt in het laboratorium voor experimentele pathologie (destijds Hoofd Dr. G. J. V. Swaen) van het Pathologisch Anatomisch Instituut (Directeur Prof. Dr. H. J. G. Wyers, later Prof. Dr. P. H. M. Schillings) en het Centrale Dierenlaboratorium (Hoofd Dr. M. J. Dobbelaar) te Nijmegen.

Het onderzoek werd voortgezet in het Pathologisch Anatomisch Instituut (Afdeling Prof. Dr. T. Vossenaar) en het Centrale Dierenlaboratorium (Hoofd P. H. A. Poll, dierenarts) van de Stichting Academisch ziekenhuis te Utrecht.

De statistische bewerking der resultaten geschiedde deels op het Instituut voor Wetenschappelijke Dienstverlening (Hoofd Drs. Ph. van Elteren) te Nijmegen, deels op het Mathematisch Instituut (Afdeling Prof. Dr. G. J. Leppink) te Utrecht.

De microfoto's werden vervaardigd door de Heer A. J. H. Hosemans, fotograaf van het Pathologisch Anatomisch Instituut (Directeur Prof. Dr. A. de Minjer) te Utrecht.

Bij de uitvoering der proeven werd zeer efficiënte hulp verleend door de Heer P. B. Spaan van het Centrale Dierenlaboratorium te Nijmegen. Het materiaal werd voor histologisch onderzoek bewerkt door de dames E. v. d. Vaart, J. Hermans en G. Franssen van het Pathologisch Anatomisch Instituut aldaar.

De tekst-figuren kwamen tot stand met medewerking van de afdeling Medische Illustratie (Hoofd de Heer Chr. van Huyzen) en de afdeling Medische Fotografie (Hoofd de Heer A. Reynen) te Nijmegen.

INLEIDING

Reeds in 1908 toonden Ellermann en Bang aan, dat er een verband bestond tussen virusachtige agentia en de bij kippen spontaan optredende monocyten leukaemie.

Ook bij muizen zijn spontane leukaemieën bekend en sinds bovengenoemde vondst heeft men vele malen tevergeefs getracht met celvrije preparaten van weefsels, afkomstig van leukaemische muizen, deze ziekte bij gezonde soortgenoten te induceren.

Alvorens verder op dit onderwerp in te gaan dient te worden opgemerkt, dat in deze studie met de term „leukaemie” bedoeld wordt een bij muizen en kippen spontaan optredende ziekte, die meestal begint met een locale woekering van lymfhoïde, myeloïde of reticulair cellen. Het proces breidt zich op een later tijdstip naar andere organen uit. Daar deze celwoekeringen niet steeds vergezeld gaan van een leukaemische verandering in het bloed, gaven Ellermann en Bang er de voorkeur aan van leukose te spreken. Het proces toont meer overeenkomst met de ziektebeelden, die in de menselijke pathologie zijn aangeduid als lymfosarcomatose (Kundrat 1893), leukosarcomatose (Sternberg 1905) en sarcoleukaemie (Pappenheim 1911), dan met de leukaemie zoals die bij de mens meestal voorkomt.

Eerst in 1951 boekte Gross belangrijke vooruitgang bij het onderzoek naar een virusachtig leukaemogeen agens bij muizen. In tegenstelling tot zijn voorgangers (Richter en MacDowell 1933; Furth c.s. 1933; Barnes en Furth 1937; Furth c.s. 1938; Rask-Nielsen 1938; Engelbrett-Holm 1948), ging deze onderzoeker aanvankelijk niet uit van ultrafiltraten of van leukaemisch weefsel, dat met glycerol voorbehandeld was, of aan bestraling was blootgesteld, maar van de bovenstaande vloeistof van gecentrifugeerde weefselhomogenaten. Op deze wijze verwachtte hij een hogere concentratie van het agens in zijn preparaat. Gross veronderstelde namelijk, dat in de gebruikte filters (Seitz) een belangrijk deel der eventueel aanwezige viruspartikels achterbleef en er in feite maar weinig in het filtraat kwam. Met hetzelfde doel gebruikte Gross voor de bereiding van een homogenaat leukaemische organen van verscheidene dieren. Hij meende namelijk, dat de hoeveelheid agens bij

de verschillende muizen sterk varieerde en wilde de kans vermijden een virus preparaat te bereiden van een dier, waarin het agens toevallig in zeer geringe concentratie aanwezig was.¹

Gross spoot zijn preparaten niet in bij reeds enkele weken oude of volwassen muizen, zoals tot dan toe gebruikelijk was, maar bij dieren, die maximaal twaalf uren oud waren. Op deze wijze slaagde hij erin om bij ongeveer 60 % der ingespoten muizen een leukaemie te induceren. (De spontane leukaemie frequentie bij deze dieren was slechts 2 %.) Hierna herhaalde Gross zijn experimenten met ultrafiltraten, verkregen door de homogenaten door Berkefeld- en Selasterfilters te voeren. Met deze ultrafiltraten verkreeg hij eenzelfde percentage leukaemieën, als met de celvrije preparaten die door centrifugering waren bereid.

De resultaten van Gross werden aanvankelijk sceptisch ontvangen. Vooral Furth (1951, 1952) had critiek. Hij meende, dat de preparaten niet celvrij waren en nog vitale leukaemische cellen bevatten. Bovendien had Gross zijn preparaten ingespoten bij muizen, die zeer gevoelig waren voor leukaemische cellen afkomstig van de stam, die de organen voor het bereiden van de preparaten had geleverd (donor). In 1937 hadden Furth en Kahn aangetoond, dat onder gunstige omstandigheden slechts één enkele leukaemische cel voldoende is om de ziekte te transplanteren. Verder kleven aan het bereiden van een werkelijk celvrij preparaat grote technische moeilijkheden. Furth dacht dan ook, dat de door Gross geïnduceerde leukaemieën in feite op transplantatie van levende cellen berustten en niet op een virus.

In 1954 toonde Gross echter aan, dat met zijn preparaten ook leukaemie inductie mogelijk was bij dieren, bij wie een transplantaat van leukaemisch weefsel van de donor veel moeilijker aansloeg. Bovendien bleek uit transplantatieproeven, dat de geïnduceerde leukaemieën genetisch zeer verwant waren met de gastheer en niet met de donor.

De activiteit der preparaten nam geleidelijk toe door de geïnduceerde leukaemie telkens celvrij van de ene muizengeneratie op de volgende over te brengen (*seriepasse*). Voor de verschillende achtereenvolgende entingen werd steeds een preparaat gebruikt, dat bereid was uit leukaemische organen van die dieren, waarbij de latentietijd het kortste was geweest.

¹ Aseptisch uitgeprepareerde leukaemische organen werden in een mortier onder toevoeging van een steriele physiologische zoutoplossing minutieus fijn gewreven en hierna door een wijdmazig filter gevoerd, om de grove weefselbestanddelen te verwijderen. Het aldus verkregen homogenaat werd gecentrifugeerd bij een toerental van 3000 per minuut (1400 x g) gedurende vijftien minuten. De afgepipetteerde bovenstaande vloeistof werd nog eens gedurende eenzelfde tijd bij een gelijk toerental gecentrifugeerd en vervolgens bij de proefdieren ingespoten. De bereiding werd uitgevoerd bij 0°C. Alleen organen van muizen, waarin leukaemie in een hoog percentage (90 %) spontaan voorkwam werden gebruikt.

Nadat één der ultrafiltraten op deze wijze achtmaal was gepasseerd, bleek het mogelijk om bij vrijwel 100 % der ingespoten neonatale muizen een leukaemie te induceren. Verder bleek, dat de latentietijd was teruggebracht van acht tot drie maanden (Gross 1957a). Ook was het mogelijk om met dit door *seriepassage* verkregen preparaat de ziekte op te wekken bij ongeveer twee maanden oude muizen. Bovendien traden na injectie bij *ratten* ook leukaemieën op (Gross 1960a en b).

Gross (1958a) nam op grond van de volgende feiten aan, dat het agens een virus is; het passeerde filterporieën, die voor bacteriën niet doorgankelijk zijn, het was ultracentrifugeerbaar en thermolabel, het was te isoleren uit de geïnduceerde tumoren en de activiteit nam toe door *seriepassage*. Ook was het electronenoptische beeld suspect voor een virus (Dmochowski en Grey 1957). Een verdere steun voor het viruskarakter leverden de geslaagde pogingen om het agens in weefselcultures voort te kweken (Gross c.s. 1961; Gross en Dreyfuss 1961).

Na de ontdekking van Gross werden spoedig andere virussen gevonden, die alle na inspuiting bij muizen, ratten of hamsters leidden tot sarcomateuse veranderingen van het reticulo-histiocytaire systeem en die in een aantal gevallen overgingen in „echte” leukaemieën. Deze virussen zijn ten dele van zeer uiteenlopende weefsels afkomstig. Enkele zijn geïsoleerd uit weefsels van dieren met spontane leukaemieën, terwijl andere verkregen werden uit carcinomen en sarcomen, die reeds gedurende jaren bij muizen getransplanteerd waren (zie Bijlage).

Rauscher (1962b) isoleerde een celvrij leukaemogeen agens uit de gezwollen milt van een muis, waarbij subcutaan een maligne lymfoïde tumor was getransplanteerd. Over de histologische veranderingen in deze milt deelt deze onderzoeker niets mee. De getransplanteerde tumor was echter afkomstig van een niet verwante muizenstam en had zich bij deze ontwikkeld na toediening van een ander leukaemogeen preparaat, namelijk het celvrije preparaat bereid door Schoolman en Schwartz (zie blz. 26).

Swaen (1964, 1966) onderzocht de morfologische veranderingen, die optraden na injectie van het Rauscher agens bij pasgeboren *Osborne Mendel ratten*. Het bleek, dat bij het ontstaan der lymfoïde tumoren, de eerste maligne cellen lokaal in de thymus verschenen. Zij prolifereerden snel en gaven aanleiding tot een sterke vergroting van dit orgaan. In verscheidene gevallen was de thymus het enige orgaan waar maligne veranderingen konden worden waargenomen. Niet zelden werd in het bloed een verhoogd aantal lymfoïde cellen gevonden. Vóór de maligne veranderingen in de thymus ontstonden werd op verschillende plaatsen in de schors een locale

atrophie gezien. De eerste tumorcellen verschenen later in de atrophische schorsgebieden. Een andere afwijking, die aan het verschijnen der maligne cellen in de thymus voorafging, was een sterk verhoogde erythropoïese in de milt, gepaard gaande met een aanzienlijke gewichtsstijging van dit orgaan.

De bedoeling van dit proefschrift is gegevens te verstrekken over de rol van milt en thymus bij de inductie van leukaemieën door virussen bij m u i z e n en r a t t e n.

In Hoofdstuk I wordt een literatuuroverzicht gegeven waarin fysieke, chemische en biologische eigenschappen van een aantal leukaemogene virussen vermeld zullen worden. Vooral zal aandacht worden besteed aan de morfologische veranderingen, die ze teweeg brengen.

In de daarop volgende hoofdstukken zal het eigen onderzoek worden besproken. Zij geven een overzicht van de invloed van thymectomie en splenectomie op de inductie van leukaemie met het door Rauscher geïsoleerde agens bij de rat.

In Hoofdstuk II worden vraagstelling en algemene gegevens besproken.

Hoofdstuk III vermeldt de proef, waarbij het effect wordt nagegaan van splenectomie vóór toediening van het agens.

In Hoofdstuk IV wordt het resultaat meegedeeld van splenectomie na toediening van het agens.

In Hoofdstuk V wordt de invloed beschreven van thymectomie vóór toediening van het agens.

Hoofdstuk VI behandelt de invloed van thymectomie na injectie van het agens.

In Hoofdstuk VII worden de resultaten der proeven besproken, terwijl in Hoofdstuk VIII een samenvatting zal worden gegeven.

HOOFDSTUK I

BESPREKING VAN EEN AANTAL LEUKAEMOGENE VIRUSSEN

Tegenwoordig wordt de leukaemie algemeen gezien als een proces van neoplastische aard, dat evenals andere nieuwvormingen kan worden teweeggebracht door verschillende exogene factoren, die slechts tendele bekend zijn. Bij het uiteindelijk effect spelen constitutie en dispositie van het individu een belangrijke rol (Furth 1952; Schillings 1955).

De ontdekking van een ultrafilterbaar leukaemogeen agens (Ellermann en Bang 1908) en van een celvrij sarcoma inducerend agens (Rous 1911) bij kippen, leidde aanvankelijk tot de opvatting, dat virussen als de directe veroorzakers van vele, zo niet alle tumoren dienen te worden opgevat. Alhoewel deze generaliserende virustheorie spoedig naar de achtergrond werd gedrongen door de resultaten van het zeer vruchtbare onderzoek der chemische cancerogenese en later ook door de ontdekking, dat hormonen en bestraling een cancerogene werking bleken te hebben, bleef het speuren naar een eventuele aetiologische rol van virussen toch steeds belangstelling houden. Nadat Shope er in 1932 in geslaagd was een fibromateuse tumor bij konijnen met gefiltreerde homogenaten van deze tumor over te brengen naar gezonde dieren, is de interesse weer sterk opgebloeid. Dit resulteerde weldra in de ontdekking van nieuwe tumorvirussen, zoals o.a. het Shope papilloma virus bij konijnen (1933), de melkfactor bij het mammacarcinoom van muizen (Bittner 1936) en het virus ontdekt door Lucké (1938) bij het niercarcinoom bij kikkers.

Sedert de waarneming van Gross (1951) is het in toenemende mate waarschijnlijk geworden, dat virussen óók een aetiologische rol spelen bij verschillende knaagdierenleukaemieën.

De mededelingen over nieuw ontdekte celvrije leukaemogene agentia volgen elkaar de laatste jaren in een niet bij te houden tempo op. In dit hoofdstuk vindt men een bespreking van de belangrijkste der sedert 1951 ontdekte leukaemogene virussen.

Het agens van Gross.

Zoals reeds in de inleiding vermeld, bereidde Gross werkzame celvrije preparaten uit leukaemisch weefsel van muizen, behorende tot stammen (AKR, C₅₈), waarin leukaemie in een hoog percentage spontaan voorkomt (Gross 1951). Met deze preparaten was het mogelijk de ziekte te induceren bij een groot aantal der neonataal ingespoten muizen van stammen (C₃H, C₅₇/Brown) waarin leukaemie zeer zelden, en pas op oude leeftijd (ouder dan 16 maanden) spontaan optreedt. Met celsuspensies van embryonen en geslachtsklieren van jonge normale tot de AKR en C₅₈ stam behorende muizen en met celvrije preparaten hiervan, bleek het ook mogelijk om een hoog percentage leukaemieën te induceren (Gross 1951; 1953d; 1956b). Bij een gering aantal (3 %) der ingespoten C₃H muizen ontstonden in plaats van leukaemieën parotistumoren of subcutane sarcomen (Gross 1953a en b; 1955).

Door seriepassage van goed werkzame preparaten nam de activiteit geleidelijk toe en na acht passages werd aldus een preparaat verkregen, dat door Gross aangeduid werd als „Passage A”. Dit preparaat deed bij alle C₃H en C₅₇ muizen, die kort na de geboorte subcutaan of intraperitoneaal werden ingespoten, de ziekte reeds na 3 tot 4 maanden ontstaan (Gross 1958b). Bovendien kon met „Passage A” de leukaemie geïnduceerd worden bij muizen, die twee maanden oud waren (Gross 1960a). De latentietijd bleek hierbij echter verlengd tot gemiddeld zes maanden. Door voortzetting der seriepassage was het op den duur ook mogelijk om bij Balb/c muizen en zelfs bij ratten (Sprague Dawley, Osborne Mendel) leukaemieën te induceren (Gross 1961a en b).

De leukaemogene activiteit van de preparaten van Gross verdween bij verhitting op 56°C. gedurende dertig minuten (Gross 1953c). Met aldus behandelde preparaten was het echter nog wel mogelijk parotistumoren te induceren (Gross 1957b). Ook wanneer de preparaten werden behandeld met aethylether verdween de leukaemogene activiteit, terwijl het vermogen om bij C₃H muizen parotistumoren of subcutane sarcomen te induceren behouden bleef (Gross 1956a).

Nadat Gross zijn preparaten door een gradocol membraan met een poriëndiameter van 93 tot 140 mmu. had gevoerd, bleek eveneens alleen het vermogen om parotistumoren te induceren behouden (Gross 1957b). Ook Buffett c.s. (1958) vermeldde, dat met de bovenstaande vloeistof van preparaten, die bij 105.000 x g waren gecentrifugeerd bij pasgeboren AKR muizen geen leukaemieën waren op te wekken, maar nog wel verschillende andere tumoren, zoals speekselklier carcinomen, reticulumcelsarcomen uitgaande van de thymus, adenomatoïde veranderingen van nierschorsubuli, die deze schrijvers als praemaligne beschouwden en soms sarcomen gelocaliseerd in het niermerg. Een nadere omschrijving van deze sarcomen wordt door deze auteurs niet gegeven. Werden de preparaten bij -70°C. of in drooggevroren toestand bewaard, dan bleef de

activiteit vrijwel onbeperkt behouden (Gross 1957b, Moloney 1962). Latarjet (1959) vond geen verandering der leukaemogene activiteit nadat de preparaten met trypsine, chymotrypsine, desoxyribonuclease of ribonuclease, afzonderlijk of gecombineerd, waren behandeld. Hij concludeerde uit deze negatieve bevindingen, dat het leukaemie inducerend agens geen vrij nucleïnezuur was. Hij sloot de mogelijkheid niet uit, dat we met een virus te doen hebben, opgebouwd uit een nucleïnezuur met een eiwitkapsel, daar verschillende eiwitten niet ontleed worden door trypsine en chymotrypsine.

Gross (1961, 1962a) toonde in sera van konijnen en caviae, die waren ingespoten met „Passage A” preparaten, neutraliserende antilichamen aan. De hoogste titers werden verkregen bij konijnen. Het gelukte echter niet om in het serum van geïnfecteerde muizen antilichamen aan te tonen. In tegenstelling tot verschillende andere infectieuze virussen blijkt het Gross agens niet in staat om erythrocyten van verschillende diersoorten te doen agglutineren (Gross 1959b).

Veelvuldige pogingen om het leukaemogene agens van Gross in vitro te kweken mislukten aanvankelijk. Weefselcultures van apennieren of de chorioallantois-membraan van muizenembryonen, besmet met leukaemogene ultrafiltraten of met leukaemisch weefsel, bleken geen leukaemieverwekkend agens meer te bevatten, doch wel een hoge concentratie van een pluripotent agens. Dit bracht bij muizen, behalve carcinomen van de glandula parotis, meestal ook nog andere tumoren teweeg, zoals epitheloïde thymustumoren, bijniermergcarcinomen, mammacarcinomen, subcutane sarcomen, spoelcelsarcomen in botten, hart en nieren en leverhaemangiomen (Stewart c.s. 1957, 1958; Dawe c.s. 1959; Negroni c.s. 1959). Stewart en Eddy (1958) gaven aan dit agens de naam polyoma virus. Vanderputte (1963) zag na injectie van dit polyoma virus bij ratten van de R en Lewis stam echter alleen mesenchymale tumoren ontstaan. Zij waren gelocaliseerd in de nieren, onderhuids, in het schedeldak en in de meningen.

De resultaten van Gross (1961c, 1962a) en Gross en Dreyfuss (1961) schijnen er echter op te wijzen, dat een geringe vermeerdering van het leukaemogene agens wordt verkregen indien het wordt geënt op celcultures van embryonale C₃H muizen. De celvrije kweekvloeistof bleek na enige malen ververst te zijn geweest nog leukaemogene activiteit te bezitten. Er werd in de besmette celkweek geen cytopathogeen effect waargenomen.

Met het electronenmicroscop zijn in leukaemische weefsels van muizen met spontane en met door Gross preparaten geïnduceerde leukaemieën virusachtige partikels waargenomen (Dmochowski en Grey 1957, 1958; Bernhard 1958; Bernhard en Gross 1959). Ook bij ratten die leukaemie hadden gekregen na injectie met Gross preparaten, werden dergelijke vormsels aangetroffen (Dmochowski c.s. 1962; Okano 1963). Zij waren min of meer sferisch en hun afmetingen varieerden van 80 tot 180 mmu. Bij normale muizen werden deze vormsels slechts nu en dan in zeer geringe hoeveelheid gezien. Bernhard (1958) onderscheidde drie morfologische typen namelijk:

- A partikels met helder centrum
- B partikels met een excentrische electronendichte kern
- C partikels met een centrale electronendichte kern.

Of men hier met drie verschillende virussen te maken heeft of met drie ontwikkelingsstadia van eenzelfde virus, is een nog niet uitgemaakte zaak, doch uit waarnemingen van Dalton (1961) is gebleken, dat de laatst genoemde mogelijkheid de meest waarschijnlijke is.

Gross (1961a) vermeldt, dat hij in actieve celvrije preparaten van lymfoïde tumoren, geïnduceerd met zijn agens, vormsels had waargenomen, die kleiner waren dan de bovenbeschreven partikels, doch overigens het aspect hadden van A partikels. In de leukaemische weefsels bleek het grootste deel der viruspartikels gelocaliseerd in intercellulaire spleten, waarbij sommige verbonden waren met de celmembraan. Zij werden nooit in de kern aangetroffen. Bij spontane leukaemieën kwamen de C partikels het meest veelvuldig voor; bij geïnduceerde leukaemieën overwogen daarentegen de A partikels.

Feldman en medewerkers (1963) namen de partikels bovendien waar in het borstklieerepitheel van zwangere muizen, bij wie zich een leukaemie had ontwikkeld na injectie van „Passage A” preparaten. In 1964 deelden Feldman en Gross mede, dat ze eveneens voorkwamen in de speekselklieren.

Uit het onderzoek van Dalton (1961) bleek, dat de virus partikels in zeer grote getale aanwezig waren in het bloedplasma van muizen en ratten bij wie een leukaemie geïnduceerd was met „Passage A” preparaten.

Gross meent, dat in de door hem verkregen celvrije preparaten twee verschillende agentia voorkomen; namelijk een leukaemogeen virus en het polyoma virus (Gross 1957b, 1958a). Verschillende andere onderzoekers delen deze opvatting (Buffett c.s. 1958; Dawe c.s. 1959; Law c.s. 1960).

Als belangrijkste argumenten voor deze mening gelden:

A) het verschil in fysische en chemische eigenschappen, zoals temperatuurgevoeligheid, deeltjesgrootte en gevoeligheid ten opzichte van ether (zie blz. 6).

B) de verschillende electronenmicroscopische beelden. Behalve door de veel kleinere diameter (ongeveer dertig mmu) onderscheidt het polyoma virus zich van de partikels die in leukaemische muizen en ratten worden aangetroffen doordat het niet door een membraan is omgeven. Het polyoma virus is namelijk een sferisch electronendicht vormsel. Het wordt in tegenstelling tot het door Gross geïsoleerde virus voornamelijk intranucleair aangetroffen (Bernhard 1960).

C) het feit, dat antisera, die actief zijn ten opzichte van het polyoma virus geen effect hebben ten aanzien van de leukaemogene component (Rowe 1960).

D) de resultaten van epidemiologisch onderzoek, waaruit blijkt, dat in bepaalde muizenstammen permanent een hoog percentage leukaemieën gevonden wordt, terwijl het aantal besmettingen met polyoma virus sterk varieert (Rowe c.s. 1958). Een besmetting met polyoma virus wordt vastgesteld met de haemagglutinatieremmingstest, die hiertoe zeer geschikt blijkt te zijn. Het polyoma virus is namelijk in tegenstelling tot het Gross virus in staat in vitro erythrocyten van verschillende diersoorten te aggluti-

neren en in het serum van muizen zijn reeds enkele dagen na besmetting met dit virus antilichamen aantoonbaar, die deze agglutinatie tegengaan.

E) de reeds vermelde kweekresultaten in vitro (zie blz. 7).

Uit onderzoekingen van Gross (1960b, 1963, 1964a en b) bleek, dat het cytologisch type van de tumor die optrad na injectie van „Passage A” preparaten voor een belangrijk deel bepaald werd door het genetisch type van de gastheer en verder door het feit of er al dan niet een thymus aanwezig was. Het meest frequent werden woekeringen gezien van lymphoïde cellen. Tweede in frequentie waren woekeringen van zg. stamcellen. Behalve bij een bepaalde muizenstam (Balb/c) kwamen myeloïde celwoekeringen zelden voor. Deze zouden frequenter zijn bij gethymectomeerde muizen en bij ratten (Osborne Mendel, Sprague Dawley). Bij gethymectomeerde muizen zouden zelfs chloromen en woekeringen van monocyten en soms zelfs erythroblastenwoekeringen worden gezien. Bij de Balb/c muizen en ratten kwamen soms reticuluncelsarcomen voor.

De lymphoïde celwoekeringen leidden tot een sterke zwelling van de thymus, de mesenteriale lymphklieren en verder van milt, lever en periphere lymphklieren. Bij microscopisch onderzoek werden behalve in genoemde organen ook elders, zoals in longen en nieren, haarden van lymphoïde cellen gezien. In een aantal gevallen stond vooral de thymuszwelling op de voorgrond. Deze had dan de dood van het dier tot gevolg doordat dit orgaan de gehele thoraxholte ging opvullen. Dit geschiedde vaak voordat een belangrijke uitbreiding van het proces naar elders had kunnen plaats vinden.

Het periphere bloed toonde volgens Gross in gevallen waarbij het proces zich volledig had ontwikkeld, meestal slechts een geringe leukocytose, waarbij een verhoogd aantal lymphoblasten en vooral gemakkelijk laederbare cellen zg. „smudge cells” werden aangetroffen. Quantitatieve gegevens worden echter niet verstrekt. De auteur vermeldt niet of de „smudge cells” vergelijkbaar zijn met de zg. Gumprecht'se Schollen, die vaak bij patiënten lijdende aan een lymphatische leukaemie in bloeduitstrijk preparaten worden aangetroffen. Gewoonlijk bestond er een anaemie. In het beenmerg werd eveneens een groot aantal lymphoblasten en andere onrijpe cellen gevonden, die aldus Gross, mogelijk eveneens tot de lymphatische reeks behoorden.

Bij de myeloïde celwoekeringen werd geen of slechts een geringe thymuszwelling waargenomen. Het periphere bloed toonde bij deze vormen een sterke leukocytose. Er werd een groot aantal myelocytaire elementen van verschillende rijpingsgraad aangetroffen. Bij de erythroblastenleukaemie was bij een laag haemoglobinegehalte een groot aantal kernhoudende rode bloedcellen eveneens van verschillende differentiatiegraad in het periphere bloed aanwezig.

Over localisatie en uitbreiding der stamcelwoekeringen blijft Gross vaag. Ook vertelt hij niet hoe de stamcellen te onderscheiden zijn van monocyten.

De reticulumcelsarcomen gingen gepaard met een aanzienlijke zwelling van milt en lever. Over eventuele veranderingen in het bloed bij deze afwijking worden wij niet ingelicht. Verder is het niet duidelijk hoe de reticulumcellen steeds als zodanig waren te herkennen.

Het onderzoek van Gross leert ons overigens ook niet, hoe en in welke volgorde de verschillende organen worden aangetast. Vooral wat zich in de thymus afspeelt lijkt in dit opzicht van groot belang. Verwijdering van dit orgaan blijkt niet alleen een sterk remmend effect te hebben op de leukaemie-inductie met het Gross agens bij *m u i z e n*, doch beïnvloedt ook het celtype der leukaemie (Levinthal 1959; Gross 1961a, 1963). Goodman c.s. doen in 1963 verslag van de morfologische veranderingen die zij bij C₃H muizen waarnamen op verschillende tijdstippen na injectie van „Passage A” preparaten. Deze preparaten waren ingespoten bij ongeveer 10 dagen oude dieren. Hun aandacht was voornamelijk gericht op de afwijkingen die in de thymus optraden. In de periode van 2½ tot 5 maanden na toediening van het agens namen deze auteurs de volgende, wat zij noemen categorieën van veranderingen waar:

1. locale schorsatrofie
2. proliferatie van lymphoïde cellen
3. lymphosarcoma in situ
4. lymphosarcoma.

Zij namen aan, dat hier sprake was van opeenvolgende fasen.

Eerste fase: De veranderingen van de eerste fase werden na ongeveer 1½ tot 2½ maand waargenomen en waren gekenmerkt door een locale schorsatrofie. Soms was slechts één lobulus in het proces betrokken. De atrophische kwabjes bestonden uit onregelmatig verspreide reticulumcellen, waartussen enkele groepjes lymphocyten. Deze reticulumcellen en lymphocyten hadden eenzelfde aspect als die welke in een normale thymus worden gevonden. Bij de typering der genoemde cellen hielden deze onderzoekers dezelfde criteria aan als door Sainte-Marie en medewerkers (1958) zijn voorgesteld bij hun onderzoek van de normale *r a t t e n t h y m u s*. Hierbij worden de lymphoïde cellen op grond van kern- en cytoplasma verschillen verdeeld in grote, middelgrote en kleine lymphocyten. Bij normale *m u i z e n* en *r a t t e n* blijkt de thymusschors geheel opgebouwd uit lymphocyten, waaronder vanaf de tweede week na de geboorte het aantal kleine vormen sterk overheerst (Miller 1964). Naast duidelijk te onderscheiden reticulumcellen en

lymphocyten vonden Goodman en medewerkers in de atrophische schorsgedeelten ook een groot aantal tussenvormen.

Tweede phase: De veranderingen van de tweede phase werden 3½ tot 5 maanden na injectie van het agens waargenomen. Zij bestonden uit een locale of gegeneraliseerde proliferatie van grote of middelgrote lymphocyten en overgangsvormen tussen lymphoïde en reticulaire elementen. Voornamelijk wanneer deze proliferatie gelocaliseerd voorkwam, werd een groot aantal overgangsvormen aangetroffen.

Derde phase: Ongeveer tezelfder tijd als de veranderingen van de tweede phase namen de auteurs soms beelden waar, die zij beschouwden als *lymphosarcoma in situ*. Hierbij was de normale histologische structuur van de thymus vervangen door een woekering van grote monomorphe cellen, die meestal in syncytiaal verband waren gelegen. Op plaatsen waar dit syncytiaal verband ontbrak waren deze cellen niet te onderscheiden van normale grote lymphocyten. Er waren veel mitosen, doch het proces breidde zich niet uit buiten de kapsel en bleef vaak beperkt tot één kwab. Er trad geen of slechts geringe kwabvergroting op. Het beeld onderscheidde zich, behalve door het syncytiaal verband der gewoekerde cellen ook van de veranderingen der tweede phase, door het grote aantal mitosen, en doordat er veel meer karyorrhexis en phagocytose van kerndebris werd gezien. De schrijvers namen aan, dat deze veranderingen volgden op de proliferatiephase. Dat Goodman en medewerkers deze veranderingen aanduiden met de term *lymphosarcoma in situ* komt ons vreemd voor, daar de eigenschap om een syncytium te vormen niet bekend is van lymphoïde cellen, doch eerder van reticulumcellen.

Vierde phase: De veranderingen van de vierde phase duiden de onderzoekers aan met de term *lymphosarcoma*. Dit onderscheidde zich van het *lymphosarcoma in situ*, doordat de thymuskapsel door de celwoekering doorbroken werd en uitbreiding plaats vond in de omgevende weefsels en naar andere organen, zoals longen, nieren, ovaria, ileum, lymphklieren, milt en beenmerg. Dit beeld werd soms ongeveer op dezelfde tijd waargenomen als de afwijkingen van de tweede en derde phase, doch meestal deed het zich pas na vijf maanden voor. Soms verliep de tumorontwikkeling dus kennelijk zeer snel. Eenmaal werd in de thymus niet een gegeneraliseerde, doch een locale celwoekering met kapsel doorbraak waargenomen. Het miltgewicht bleek nooit verhoogd, voordat dit orgaan in het maligne proces betrokken was. Het beenmerg was alleen dan aangetast, wanneer ook uitbreiding naar de andere organen had plaats gevonden. In de diverse organen was de celwoekering vaak rond bloedvaten gelocaliseerd, doch nooit werd een duidelijke invasie van de vaatwanden gezien. Soms was het bloedbeeld leukaemisch. Nooit werden

maligne celwoekeringen buiten de thymus gevonden zonder dat deze ook in dit orgaan aanwezig waren.

Samenvatting.

Gross isoleerde uit organen van muizen behorende tot stammen waarin spontane leukaemie frequent voorkomt, een leukaemogeen virus. Na seriepassage was het niet alleen mogelijk om met dit virus verschillende reticulaire tumoren en leukaemieën te induceren bij muizenstammen, waarin deze afwijkingen slechts zelden spontaan optreden, doch ook bij ratten.

Op het cytologische type der celwoekering, die optrad na injectie van dit virus, bleken genetische factoren invloed te hebben.

Bij de inductie van lymphoïde tumoren werden de eerste maligne celwoekeringen in de thymus waargenomen. Bij het ontstaan van deze maligne veranderingen in de thymus kon men lichtoptisch verschillende fasen onderscheiden. De eerste fase werd gekenmerkt door een locale atrophie van de thymusschors. Thymectomie oefende niet alleen een sterk remmend effect uit op de leukaemie inductie bij muizen, doch beïnvloedde ook het celtype der geïnduceerde leukaemie. De bij intacte muizen meest frequent optredende lymphoïde leukaemieën werden door thymectomie sterk in aantal gereduceerd, terwijl het ontstaan van myeloïde leukaemieën en andere reticulaire tumoren bevorderd werd.

Het agens van Graffi.

Graffi (1957) bereidde celvrije leukaemogene filtraten uit de volgende transplantabele muizentumoren:

1) Het Ehrlich carcinoma; deze tumor is afkomstig van een adenocarcinoma, dat ongeveer 60 jaar geleden door Ehrlich bij een muis werd aangetroffen. Door Loewenthal en Jahn (1932) is een zogenaamde ascitesvorm ontwikkeld. Zij spoten suspensies van tumorcellen intraperitoneaal in. Na een aantal entingen trad een carcinosis peritonei op met sterke ascites. Het vocht bleek zeer rijk aan tumorcellen.

2) De Landschutzsarcomen I en II; volgens Graffi zijn dit reticuluncelsarcomen, die zowel in solide als in ascitesvorm voorkomen. Over

de oorsprong van deze tumor geeft Graffi ons geen inlichtingen, en we hebben in de literatuur geen nadere gegevens kunnen vinden.

3) Het Sarcoma 37; deze tumor is ontstaan uit een mammacarcinoom en wordt reeds gedurende 60 jaren bij verschillende muizenstammen in serie getransplanteerd. In enkele lijnen trad een sarcomateuse transformatie op. De tumor heeft het aspect van een polymorphcellig sarcoma.

4) De SOV-16 tumor; deze is volgens Graffi een „leukosarcoma”, dat in de thymus van een Agnes Bluhm muis was ontstaan na inspuiting van een celvrij filtraat van het Landschutz sarcoma I. Het werd bij muizen van de Agnes Bluhm stam in serie getransplanteerd. Met uitzondering van de SOV-16 tumor vermeldt Graffi niet bij welke muizenstammen de bovengenoemde tumoren werden getransplanteerd. De verschillende celvrije filtraten werden ingespoten bij pasgeboren en volwassen Agnes Bluhm muizen. Na 113-224 dagen ontstond bij 30-75 % der geïnjecteerde dieren een myeloïde leukaemie, een afwijking, die onder normale omstandigheden bij deze muizenstam slechts zeer zelden voorkomt. Deze myeloïde leukaemieën traden op ongeacht uit welke tumor het toegediende filtraat was bereid. Graffi nam aan, dat de agentia geïsoleerd uit de verschillende tumoren, onderling identiek waren. De term myeloïde leukaemie wordt door Graffi ook gebruikt wanneer alleen in de thymus een woekering van cellen met peroxydase positieve granula optrad zonder uitbreiding naar andere organen of naar het perifere bloed. Een dergelijk lokaal proces trad meestal op na inspuiting van een celvrij filtraat van de SOV-16 tumor. Om verwarring te vermijden lijkt het beter om in deze gevallen van leukosarcoma te spreken. Het preparaat verkregen uit Landschutz sarcoma I bleek het meest actief en werd door Graffi voor verdere experimenten doorgaans gebruikt.

Graffi had de indruk, dat de leukaemogene activiteit toenam door serie-passage, doch quantitative gegevens vermeldt hij niet. Uit het onderzoek van Kruschke en medewerkers (1957) bleek, dat de werkzaamheid van het agens toenam gedurende het verblijf in de hersenen. Zij injecteerden bij pasgeboren muizen celvrije filtraten van hersenen, afkomstig van muizen, waarbij met ultrafiltraten van het Landschutz sarcoma I een myeloïde leukaemie was geïnduceerd. De latentietijd bleek nu verkort van gemiddeld 180 dagen tot ongeveer 80 dagen. Graffi en Gimmy (1957) vonden, dat het agens ook werkzaam was indien het werd ingespoten bij pasgeboren ratten (Wistar).

Het agens bleek ultracentrifugeerbaar bij 120.000 x g (Graffi c.s. 1957). Door verhitting op 56°C. gedurende een half uur werd het volledig geïnactiveerd (Graffi c.s. 1957). Uit een onderzoek van Graffi en Bielka (1957) bleek, dat het agens resistent was tegen bevriezen, doch dat de activiteit door droogvriezen verdween. Wanneer men in

vitro aethylether op het agens liet inwerken verminderde de activiteit (Graffi en Bielka 1959). Eenzelfde effect werd waargenomen van trypsine, papaïne en formaline. Kennelijk vormden eiwitten een belangrijk bestanddeel van dit agens. Uit de verdere bevindingen werd het waarschijnlijk, dat er sprake was van een ribonucleïne zuur, omgeven door een lipoproteïne kapsel (Bielka en Graffi 1959). Ook werd een aanzienlijk activiteitsverlies vastgesteld nadat het agens gedurende een uur was blootgesteld aan ultraviolette bestraling. De leukaemogene werking van op deze manier behandelde filtraten bleek met 50 % verminderd (Graffi c.s. 1957).

Graffi en medewerkers toonden in sera van konijnen en caviae, die met het agens ingespoten waren neutraliserende en complementbindende antilichamen aan. Deze antisera hadden alleen effect, wanneer men ze op de filtraten liet inwerken voordat deze ingespoten werden en niet wanneer men de sera gelijktijdig of daarna toediende. Uit onderzoekingen van Pasternak en Graffi (1961) bleek, dat in sera van konijnen, die met het „Passage A” virus van Gross waren ingespoten, naast antistoffen hiertegen gericht, ook antistoffen tegen het Graffi agens gevonden werden. Hieruit mogen we concluderen, dat er een antigene verwantschap bestaat tussen beide leukaemogene agentia. Aanvankelijk lukte het niet in het serum van muizen, die ingespoten waren met celvrije filtraten, antilichamen aan te tonen gericht tegen het Graffi agens (Graffi 1957). Dit lukte ook niet bij muizen ingeënt met celvrije filtraten waarvan de activiteit was afgezwakt met formaline of door droogvriezen (Graffi c.s. 1958). De auteurs vermelden niet tot welke stam de gebruikte muizen behoren en ook delen zij niet de leeftijd van de dieren mede.

Pasternak toonde in 1965 echter aan, dat er een specifieke transplantatie immuniteit ten opzichte van de „Graffi leukaemie” was opgetreden bij muizen (C₅₇ Black, XVIII), die op volwassen leeftijd waren ingespoten. De preparaten bevatten het agens in zeer hoge concentratie, maar vrijwel geen andere bestanddelen, zoals bijvoorbeeld cytoplasma fragmenten. Zij waren verkregen door bloedplasma van Agnes Bluhm muizen met de „Graffi leukaemie” gefractioneerd te centrifugeren. Het bleek nu, dat transplantaten van leukaemisch weefsel na injectie van deze preparaten niet meer aansloegen. Verder bleek ook, dat er antilichamen aantoonbaar waren op de celmembraan van gesuspendeerde tumorcellen wanneer de tumorcelsuspensies samengebracht werden met de sera van deze dieren. Hierbij werd gebruik gemaakt van de indirecte immunofluorescentie techniek. Bij toevoeging van overmaat complement trad lysis van deze cellen op. Aan de hand van deze laatste bevindingen lijkt het waarschijnlijk, dat het Graffi agens bij muizen wel degelijk aanleiding geeft tot de ontwikkeling van specifieke antilichamen. En ook lijkt het erop, dat zich in de geïnduceerde tumoren antigenen bevinden, die immunologisch verwant zijn met het agens.

Graffi en medewerkers (1959) konden geen agens meer aantonen in het medium van herhaaldelijk ververste cultures van muizenfibroblasten. Deze kweken waren besmet met een celbrij van weefsel afkomstig van muizen lijdende aan de „Graffi leukaemie”. Wel bleek de kweekvloeistof polyoma virus te bevatten. Wanneer celvrije preparaten van de kweekvloeistof bij ratten werden ingespoten ontstonden geen leukaemieën, doch wel multipole mesenchymale tumoren, zoals botsarcomen in schedel, wervelkolom en extremiteten en spoelcelsarcomen in beide nieren. Krause en medewerkers (1962) slaagden er wel in om het leukaemogene agens *in vitro* te kweken. De kweekvloeistof van meermalen ververste cultures van leukaemische lymphklieren, afkomstig van muizen inge-

spoten met het Graffi agens bleek een sterke leukaemogene werking te hebben.

Met het electronenmicroscop toonden Heine en medewerkers (1957) en ook Graffi c.s. (1960) virusachtige partikels aan in leukaemisch weefsel van muizen geïnjecteerd met het Graffi agens. Het grootste aantal van deze partikels bleek extracellulair te liggen. Een aantal van deze partikels was met de kernmembraan verbonden. Verder werden er enkele intracytoplasmatisch gezien. Nooit werden ze in de kern waargenomen. De meeste partikels konden geïdentificeerd worden als type A, B of C (zie blz. 7).

Uit de onderzoeken van Graffi (1957) blijkt, dat het door hem geïsoleerde virus bij Agnes Bluhm muizen uitsluitend aanleiding geeft tot het ontstaan van myeloïde leukaemieën, waaronder een groot aantal (70 %) chloroleukaemieën, een vorm die Graffi nooit spontaan aantroef in de Agnes Bluhm stam. Ook bij ratten met dit virus ingespoten, bleken alleen myeloïde leukaemieën te ontstaan (Graffi en Gimmy 1957). Het aantal dieren bij dit onderzoek betrokken was echter te gering (9) om conclusies te mogen trekken. Gross (1964a) diende het agens van Graffi toe aan C₃H en aan Balb/c muizen. Bij 75 % der ingespoten C₃H muizen ontwikkelde zich een lymphatische leukaemie en bij 25 % een stamcellen leukaemie. Ook bleek bij de meesten (58 %) der ingespoten Balb/c muizen de lymphatische vorm op te treden, doch verder werd ook een aantal myeloïde (27 %) en stamcellen leukaemieën (15 %) geïnduceerd. Er kwamen geen chloroleukaemieën voor. Uit onderzoeken van Fiore Donati (1964) bleek eveneens dat het leukaemie type dat ontstond na toediening van het Graffi virus, grotendeels bepaald werd door de genetische constitutie van het proefdier. Deze auteur vond, dat met dit agens bij AKR-muizen vrijwel alleen lymphatische leukaemieën geïnduceerd worden, terwijl bij C₅₇/Black en DBA/2-muizen behalve lymphatische ook een aantal stamcellen- en myeloïde leukaemieën optraden. Onder de bij Agnes Bluhm muizen geïnduceerde myeloïde leukaemieën kwamen zowel acute als chronische vormen voor (Graffi 1957). Meestal trad zwelling van lymphklieren, milt, thymus en lever op. Vooral de cervicale en mesenteriale lymphklieren namen sterk in grootte toe. Zoals eerder reeds vermeld, stond de thymuszwellling vooral op de voorgrond bij muizen ingespoten met celvrije filtraten van de SOV-16 tumor.

Het perifere bloed toonde kortere of langere tijd na injectie meestal een zeer sterke leukocytose. Het aantal leukocyten liep soms op tot 300.000/mm³ (normaal 15.000/mm³). Graffi nam zowel myeloblastaire als myelocyttaire vormen waar. Vooral in gevallen waar de thymuszwellling sterk op de voorgrond trad, bleef de leukocytose vaak achterwege.

De bevindingen van het cytologisch onderzoek van bloed en beenmerg, verricht op verschillende tijdstippen na injectie, gaven Graffi aanvankelijk de

indruk, dat de eerste maligne veranderingen in de cellen van de granulocytaire reeks in het beenmerg optraden. De maligne cellen zouden volgens Graffi uitzwermen en zich gaan nestelen in lymphklieren, milt, thymus en lever en daar sterk in aantal toenemen. In het eindstadium der ziekte werden behalve haarden in deze organen ook myeloïde cellen op andere plaatsen zoals in longen, nieren en ovaria gevonden.

Fey (1957) onderscheidde bij de veranderingen, die in het perifere bloed optraden na injectie van het virus drie fasen. In de initiële fase, die na 5 dagen optrad, bleek het aantal granulocyten bij differentiële telling verhoogd tot 30 % (volgens Dunn 1954 bedraagt dit getal bij normale muizen ongeveer 20 %). Onder de granulocyten kwamen veel onrijpe vormen voor. Na ongeveer één maand daalde het aantal leukocyten echter en werden zelfs subnormale waarden (10 %) gevonden. In de hierna volgende intermediaire fase werd weer een normaal bloedbeeld aangetroffen. Voorafgegaan door een geringe linksverschuiving in het eindstadium van de intermediaire fase volgde na 5-8 maanden plotseling een zeer aanzienlijke stijging van het aantal granulocytaire vormen, waarbij een sterke linksverschuiving werd gezien (terminale fase). De initiële fase beschouwde Fey als een leukaemoïde reactie op het virus, zoals ook bij andere infecties wordt gezien. De term leukaemoïde reactie lijkt ons bij zo'n geringe verhoging van het aantal cellen echter minder op zijn plaats. Wellicht is het beter te spreken van een niet specifieke reactieve leukocytose.

Aan de primaire rol van het beenmerg bij het ontstaan der myeloïde leukaemie ging Graffi twijfelen, nadat hij met Fey had aangetoond, dat splenectomie direct vóór of na toediening van het virus een sterk remmend effect had op de leukaemie inductie. Zij gebruikten voor deze proef pasgeboren *A g n e s B l u h m m u i z e n*. Vond de miltextirpatie pas een of twee maanden na injectie plaats, dan werd geen duidelijk effect waargenomen (Fey en Graffi 1958). Graffi meende de belangrijke rol van de milt te moeten verklaren door aan te nemen, dat de eerste maligne veranderingen in dit orgaan optraden en niet in het beenmerg. (In de milt vindt vooral bij jonge muizen en ratten onder normale omstandigheden een aanzienlijke granulocyto- en erythropoïese plaats.)

Door de verschillende onderzoekers van dit agens is niet nagegaan of thymectomie invloed had op het ontstaan der myeloïde celwoekering en leukaemie.

Samenvatting.

Graffi vond, dat in celvrije filtraten van een aantal transplantabele tumoren bij muizen een leukaemogeen virus aanwezig was.

Dit virus bleek zowel bij pasgeboren en volwassen muizen, als bij pasgeboren ratten werkzaam te zijn. Bij Agnes Bluhm muizen en bij ratten (Wistar) induceerde dit virus myeloïde leukaemieën. Bij 70 % der muizen werd een chloroleukaemie waargenomen, die in deze muizenstam nooit spontaan voorkomt. De leukaemische veranderingen in het bloed werden voorafgegaan door een reactieve leukocytose. Door de onderzoekers is niet uitvoerig nagegaan hoe en in welke volgorde de diverse organen door maligne myeloïde cellen werden aangetast.

Splenectomie verricht bij muizen direct vóór of na toediening van het virus bleek een sterk remmend effect te hebben op het ontstaan der myeloïde leukaemieën.

Het cytologische type der celwoekeringen werd voor een belangrijk deel bepaald door genetische factoren. Bij sommige muizenstammen traden geen myeloïde, maar lymphatische- en stamcellen leukaemieën op.

Er bleek een antigene verwantschap te bestaan tussen het Graffi virus en het Gross virus.

De ultrastructuren van het Graffi virus en het Gross virus komen in grote lijnen overeen.

Het agens van Friend.

Friend toonde in 1957 een leukaemogeen agens met viruseigenschappen aan in een celvrij preparaat bereid uit milten van Swiss muizen, die binnen 24 uur na de geboorte waren geïnjecteerd met een ultrafiltraat van een Ehrlich ascites carcinoom, een gelijksoortige tumor dus, waaruit Graffi een leukaemogeen agens geïsoleerd had. De tumor was getransplanteerd bij Swiss muizen. De muizen, ingespoten met het celvrije materiaal, werden op de leeftijd van veertien maanden gedood. Er werd geen carcinoom gevonden, doch wel toonden zij zwelling van milt en lever. Friend diende celsuspensies en ultrafiltraten van de gezwollen milten intraperitoneaal toe aan volwassen muizen van dezelfde stam. Reeds na twee tot drie weken trad bij deze dieren een aanzienlijke miltzwelling op. In het perifere bloed ontstond een leukocytose. Gedurende de eerste twee tot drie maanden na injectie toonden de

dieren geen andere ziekteverschijnselen. Vervolgens vermagerden zij sterk, werden binnen enkele dagen anaemisch en overleden spoedig. Bij obductie werd een sterke zwelling van milt, lever en lymphklieren gevonden. Histologisch bleken vooral deze organen en het beenmerg doorwoerd met grote lymphoïde cellen. Verder werden dergelijke celwoekeringen ook gevonden in longen en nieren. Dieren bij wie een celsuspensie toegediend was, toonden een evenlange overlevingstijd, als dieren met het celvrije filtraat. Blijkbaar berustte de tumorontwikkeling na toediening der celsuspensies dus niet op celtransplantatie, maar ook op het overbrengen van een ultrafilterbaar agens.

Friend evenals andere onderzoekers van dit agens kwamen tot het inzicht, dat het geïnduceerde ziekteproces een *tweefasisch* beloop had (Friend 1957; Metcalf 1959; Buffett en Furth 1959; Miller 1961 en Gross 1964b). De twee ziektefasen gingen geleidelijk in elkaar over. Het meest essentiële verschil tussen de eerste en de tweede phase bleek uit de resultaten van transplantatieproeven.

De eerste phase was in hoofdzaak gekenmerkt door een reticulumcelproliferatie en een sterke toename der haemopoïese in de milt, terwijl in het periphere bloed een aanzienlijke leukocytose optrad. De miltszwelling, geaccentueerd door sterke bloedstuwung, leidde tot een groot aantal sterfgevallen aan miltruptuur. Miller (1961) toonde aan, dat het proces in dit eerste stadium niet transplantabel was. Bij muizen ontwikkelde zich geen tumor op de plaats waar miltweefsel geïmplanteed werd, afkomstig van dieren, die in de eerste phase der ziekte verkeerden. Wel ontstonden laat (enkele maanden) na de transplantatie dezelfde veranderingen als na toediening van het celvrije agens. Dat deze afwijkingen moesten worden toegeschreven aan in het weefseltransplantaat aanwezig agens, leidde men af uit de vrij lange latentietijd. Indien ze zouden berusten op een succesvolle cellulaire gezweltransplantatie, dan zou men namelijk verwachten, dat zich bij dit type tumor reeds na ongeveer een week een gezwel ontwikkelde op de implantatie plaats. In deze eerste phase kan men ons inziens niet spreken van een duidelijk neoplasma. Beter is het in dit stadium, zoals verschillende onderzoekers ook doen, te spreken van „Friend-ziekte”.

Voorafgegaan door een tijdelijke daling van het leukocytenaantal in het periphere bloed zette de tweede phase in, die zich van de eerste onderscheidde door een anaemie en door een sterke leverzwelling. Bovendien werd een nog sterkere leukocytose gevonden dan in de eerste phase. De overgang van de eerste phase naar de tweede werd gemarkeerd door het optreden van een sterftepiek ten gevolge van miltruptuur. Transplantatieproeven met milt- of leverweefsel uit deze tweede ziektephase afkomstig bleken succesvol. Behalve

de ontwikkeling van een reticulumcelsarcoom op de plaats waar getransplanteerd was, traden bij de proefdieren gesystematiseerde reticulumcelwoekeringen op, waarbij soms een leukaemisch bloedbeeld ontstond (Buffett 1959; Buffett en Furth 1959; Friend en Haddat 1960).

Mirand en medewerkers (1961, 1963) toonden aan, dat er in de milt reeds enkele dagen na injectie een selectief verhoogde opname van radio-actief ijzer plaats vond. De toename duurde voort tot het tijdstip waarop de splenomegalie zich maximaal had ontwikkeld. Verder bleek, dat bij muizen waarbij de milt enkele dagen na toediening van het agens verwijderd was, de erythroblastosis en voorbijgaande leukocytose, zoals die bij niet geopereerde dieren tijdens de eerste phase gezien werden, uitbleven. Volgens Metcalf c.s. (1959) heeft thymectomie kort na toediening van het agens geen duidelijke invloed op het beloop van het geïnduceerde ziekteproces.

Zowel Metcalf als Mirand verrichtten een systematisch lichtmicroscopisch onderzoek naar de veranderingen die optraden bij muizen op verschillende tijdstippen na injectie van het Friendagens. Zij dienden het agens toe aan jongvolwassen Swiss muizen.

Eerste phase: Hierin bleken de histologische veranderingen reeds na vier dagen in de milt te beginnen. Er ontstonden multifocale woekeringen van grote polygonale cellen met bleke blazige kernen, waarin één of meer duidelijke nucleoli voorkwamen. Het cytoplasma was relatief overvloedig en blauwgrijs. Zij werden beschouwd als reticulumcellen. Na ongeveer één week werden dergelijke cellen eveneens in de lever aangetroffen. Volgens de auteurs waren zij alleen intrasinusoïdaal gelegen. Metcalf beschouwde het beeld als suggestief voor een haematogene uitzaaiing vanuit de milt. Hiertegen pleit echter de bevinding van Mirand, dat deze cellen bij gesplenectomeerde dieren op dezelfde tijd in de lever verschenen als bij intacte muizen. Voornamelijk rond reticulumcelhaarden in de milt werd op dit tijdstip een ophoping gezien van in verschillende rijpingsstadia verkerende erythroblasten. De lymfklieren toonden omstreeks deze tijd proliferatie van het sinusendotheel. Verder vermeldde Metcalf en medewerkers een toename van het thymusmerg, waarbij zij in het midden lieten of deze absoluut was of slechts relatief ten gevolge van een schorsatrofie. Ook in het beenmerg was het aantal cellen vermeerderd. Deze hyperplasie betrof volgens Metcalf c.s. vooral het erythropoietische en granulocytopoietische systeem, doch ook werden kleine haarden van reticulumcellen met bovenbeschreven aspect aangetroffen. Volgens Mirand c.s. die de verschillende celreeksen in beenmerguitstrijken quantitatief bepaalden zou het granulocytopoietische systeem echter niet bij deze celtoename betrokken zijn.

Veranderingen in het bloed: Niettegenstaande het feit, dat gedurende de eerste vier weken na injectie van het agens normale haematocriet waarden gevonden werden, toonde het perifere bloed reeds na twee dagen een erythroblastose. Deze was aanvankelijk van zeer korte duur, zodat tussen de derde en zevende dag, zoals ook bij normale muizen, slechts sporadisch kernhoudende rode bloedcellen in het bloed werden aangetroffen. Vanaf de zevende dag kwamen deze echter weer in toenemende mate te voorschijn. Hun aantal bereikte ongeveer een maand na injectie een maximum van ongeveer 3.000.000 per mm^3 . De meeste waren volwassen normoblasten. Enkele uren na toediening van het agens bestond er in het perifere bloed een voorbijgaande lymphopenie. Deze bleek een indicatie te zijn voor het aanslaan der virusinfectie. Alleen in de gevallen waar lymphopenie optrad volgde later splenomegalie. Bij controle dieren, die met celvrije preparaten van normale milten waren ingespoten bleef deze lymphopenie achterwege. Hieruit concludeerden de schrijvers, dat er geen sprake was van een stress phenomeen. Volgens gegevens van Metcalf c.s. werd twee dagen na injectie de lymphopenie gevolgd door een progressieve leukocytose. Hierbij bestond alleen een toename van lymphocyten en rondkernige cellen. Deze laatste hadden de omvang van grote lymphocyten en monocytten. De grote mononucleaire leukocyten waren sterk laedeerbaar. Zij bezaten weinig tot matig veel grijsblauw cytoplasma zonder granula. Zowel kern als cytoplasma kleurden zich minder intensief dan bij normale lymphocyten het geval was. Soms werden mitosen waargenomen. Deze auteurs beschouwden dit celtype als typisch voor de Friendziekte en duiden ze aan als „Friendcellen”. Mirand en medewerkers zeggen deze cellen echter niet te hebben waargenomen. Zij vermeldden rijpe en onrijpe vormen zowel in de lymphocyttaire als in de granulocyttaire reeks, doch stelden expliciet dat er geen pathologische cellen voorkwamen. Bij hun experimenten bereikte de leukocytose na twintig dagen een hoogtepunt. Het aantal leukocyten bedroeg nu ongeveer tienmaal zoveel als normaal. Hierna vond een geleidelijke daling plaats. De auteurs beschouwden deze leukocytose als reactief en spraken van een leukaemoïde reactie.

Gedurende de tweede tot vierde week ruptuureerde vaak de milt. Dit had dan de dood tengevolge. Indien de dieren dit stadium echter overleefden traden geleidelijk de veranderingen der tweede phase op.

Tweede phase: Bij histologisch onderzoek bleek dat in de tweede phase de reticulumcelwoekeringen in de milt zich langzamerhand uitbreidden, zodat tenslotte vrijwel de gehele rode pulpa door deze cellen ingenomen werd. Verspreid bleven echter nog erythropoiese haardjes aanwezig. De lymphfollikels gingen atrophieren, doch de milt als geheel bleef in grootte toenemen.

Ongeveer drie maanden na injectie werd een maximaal gewicht van 1½ tot 5 gram bereikt (het normale gewicht bedraagt ongeveer ½ gram). De milt werd zacht van consistentie en kreeg stompe randen. Het sneevlak was bruinrood tot grijswit en toonde haarden van ischaemische necrose. Bovendien werd in deze fase een vergroting van de lever merkbaar. Deze werd veroorzaakt door toename der reeds beschreven intrasinusoïdale celproliferatie. De prolifererende cellen beschouwden de schrijvers als reticulumcellen omdat ze zo sterk leken op de cellen, die in de milt gezien werden. Op de duur breidde deze celwoekering zich ook buiten de sinusoiden uit en kreeg het orgaan een bleek fijnkorrelig aspect. Eenzelfde celwoekering werd ook gezien in de longcapillairen en glomeruluslissen. Behalve intravasaal werden echter ook in het interstitiële weefsel van nier en long dergelijke op reticulumcellen gelijkende elementen aangetroffen. In de longen der muizen, die rond deze tijd stierven, bevonden zich naast de beschreven celwoekeringen ook haemorrhagische infarcten, die volgens Metcalf en zijn medeauteurs veroorzaakt waren door reticulumcelembolieën.

Vergeleken met de eerste fase bleek ook in het beenmerg het aantal van deze reticulaire elementen verhoogd, doch het erythrocytopoietische en het granulocytopoietische weefsel bleef in de meerderheid. Slechts zelden bestond er een flinke lymphkliervergroting. Over het histologische beeld der lymphklieren werden geen mededelingen gedaan. Van de thymus werd slechts vermeld, dat het gewicht van dit orgaan bij muizen, die in het tweede stadium der ziekte overleden, afgenomen was.

Over veranderingen in de thymus worden we beter ingelicht door Siegler en Rich (1964). Zij dienden het agens toe aan jongvolwassen Swiss muizen en maakten de dieren af gedurende een periode van 1½ tot 2½ maand na injectie. Het merendeel toonde een geringe bilaterale atrophie van de thymuschors. Bij 44 % der muizen, die na 2½ maand werden afgemaakt, waren echter tevens praemaligne of maligne veranderingen in minstens één van beide thymuskwabben aanwezig. De schrijvers verstonden onder een praemaligne afwijking het optreden van locale woekeringen van lymphoïde cellen in de atrophische schorsgebieden. Als maligne afwijking beschreven zij de beelden die Goodman c.s. na injectie van het Gross virus hadden waargenomen (zie blz. 10) en door deze laatste auteurs als lymphosarcoma in situ en lymphosarcoma werden onderscheiden. Een enkele maal vonden Siegler en Rich naast de maligne veranderingen in de thymus ook een woekering van lymphoïde cellen in de milt. Volgens deze auteurs deden zich in de andere organen geen afwijkingen voor. Hun resultaten weken in dit opzicht dus belangrijk af van die der andere onderzoekers. Uit hun proeven zou men afleiden, dat de eerste

afwijkingen in de thymus optraden. We moeten echter rekening houden met de mogelijkheid, dat tijdens een vroeger stadium in de andere organen wel degelijk veranderingen voorkwamen. Uit proeven van Buffett en Furth (1959) en Gross (1964b), met weliswaar andere muizenstammen (DBA/2, C57 Brown) is namelijk gebleken, dat de celproliferatie tijdens de eerste phase in de milt veel minder intensief kan zijn, zodat dit orgaan niet ruptureert en vrijwel alle dieren deze phase overleven. Uit onderzoekingen van Mirand en Grace (1962) bleek, dat hetzelfde gebeurt bij *ratten* (Sprague Dawley; Osborne Mendel). Bij 60 % van deze dieren ontwikkelde zich na enkele maanden een lymphatische leukaemie. Een sterke vergroting van de thymus stond op de voorgrond, zodat men veronderstellen mag, dat de thymus een belangrijke rol gespeeld had bij de tumorinductie.

Bloedveranderingen: Tijdens de tweede phase trad een vrij snelle daling der haematocriet op, zodat twee maanden na injectie waarden van 25 tot 30 % werden bereikt. Tevens werd in het perifere bloed een progressieve stijging van het leukocytenaantal waargenomen. Spoedig werden waarden van 150.000/mm³ en hoger bereikt, zodat van een uitgesproken leukaemisch bloedbeeld gesproken mocht worden (normale waarde bij muizen 15.000/mm³). Volgens Metcalf waren 10 tot 20 % der leukocyten „Friendcellen” en de overige vrijwel allemaal lymphocyttaire elementen. Het aantal erythroblasten nam daarentegen geleidelijk weer af, doch daalde hierbij niet tot de norm en was zelfs hoger dan men op grond van de ernst der anaemie zou mogen verwachten.

Het agens kon in serie overgeënt worden bij volwassen Swiss muizen, DBA/2 muizen en Balb/c muizen (Friend 1957; Fieldsteel 1963).

Behalve ultrafilterbaar bleek het agens thermolabiel. Na verhitting op 56°C. gedurende 30 minuten was de leukaemogene werkzaamheid der preparaten geheel verdwenen (Friend 1957). Bij -70°C. bleef het leukaemie inducerend vermogen echter gedurende minstens één jaar ongewijzigd. Ook bleek de werkzaamheid der preparaten onveranderd, nadat ze drie maanden in drooggevroren toestand bewaard waren. Hoge doses röntgenstralen en ultraviolette stralen hadden evenmin invloed op de activiteit (Friend 1957; Latarjet 1962).

In sera van konijnen, ingespoten met celvrije preparaten of celsuspensies van gezwollen milten, afkomstig van dieren bij wie het Friendagens was toegediend, werden na enkele maanden specifieke neutraliserende antilichamen aangetoond. Werden celvrije preparaten in vitro blootgesteld aan de inwerking van deze sera, dan bleek het vermogen om de Friendziekte te induceren sterk verminderd, hetgeen zich uitte in het uitblijven of in het significant later optreden van de ziekte. Ook bleek het mogelijk om muizen actief te immuniseren tegen de Friendziekte, door ze in te enten met viruspreparaten

die met formaline waren voorbehandeld (Friend 1959). Of de antisera en de actieve immunisatie eveneens een remmend effect hadden op de later optredende maligne veranderingen (tweede phase) wordt ons uit de onderzoeken van Friend (1957) en Fieldsteel (1963) niet duidelijk.

Moeizame pogingen om het agens te kweken in celcultures van muizenembryonen hadden slechts een pover resultaat. Slechts nu en dan bleek het mogelijk om met de kweekvloeistof of met de gekweekte cellen zelf, de ziekte bij muizen te induceren (Moore en Friend 1958; Latarjet c.s. 1961). Er werd in de besmette celkweken geen cytopathogeen effect waargenomen.

De Harven en Friend (1958) namen met het electronenmicroscop in lever en milt van muizen met de Friendleukaemie virusachtige partikels waar. De meeste der partikels waren van het type C en bleken gelocaliseerd in intercellulaire spleten (zie classificatie volgens Bernhard blz. 7). In het cytoplasma van tumorcellen kwamen ook wel A partikels voor. De gemiddelde diameter der viruspartikels bedroeg 87 m μ . Dalton (1961) vond, dat de partikels behalve in tumorcellen ook voorkwamen in ogenschijnlijk normale megakaryocyten van milt en beenmerg. Ze bleken gelocaliseerd in cytoplasmavacuolen. Volgens deze onderzoekers was hun morphologisch aspect vrijwel identiek met dat van de viruspartikels bij de Gross leukaemie.

Samenvatting.

Friend isoleerde in 1957 een leukaemogeen virus uit gezwollen milten van Swiss muizen, die binnen 24 uur na de geboorte waren geïnjecteerd met een celvrij preparaat van een Ehrlich-ascites tumor.

Na injectie van het Friendvirus bij muizen ontwikkelde zich een ziekteproces met een tweephasisch beloop.

De eerste phase was gekenmerkt door een gesystematiseerde niet transplanteerbare reticulumcelproliferatie. Deze reticulumcelproliferatie was het meest uitgesproken in de milt en ging hier gepaard met een sterke erythropoïese, die niet secundair was aan een anaemie. Reeds in dit stadium werd in het periphere bloed een groot aantal erythroblasten en leukocyten aangetroffen. De leukocytose werd volgens sommige auteurs veroorzaakt door toename van het aantal lymphocyten en door het verschijnen van atypische lymphoïde of monocytoïde elementen, die Friendcellen worden genoemd. Andere auteurs namen in deze phase echter een vermeerdering waar van zowel elementen van de granulocytair als van de lymphocytair reeks. In de lymphocytair reeks

kwamen volgens hen geen pathologische vormen voor en met name geen Friendcellen. Zij namen waar, dat de leukocytose in dit stadium van voorbijgaande aard was en spraken van een leukaemoïde reactie. Bij bepaalde muizenstammen en ratten treedt de eerste ziektephase veel minder sterk op de voorgrond.

De tweede phase begon pas na ongeveer één maand. De reticulumcelwoekering, die in dit stadium vooral in de milt en de lever gevonden werd bleek wèl transplantabel te zijn. Het aantal lymphoïde of monocytoïde cellen in het perifere bloed steeg tijdens deze phase progressief. De term leukaemie is voor dit ziektestadium gerechtvaardigd.

Uit de resultaten van sommige onderzoekers blijkt, dat bij muizen de eerste maligne veranderingen in de thymus kunnen optreden en bij ratten staat een thymuszwellung zelfs op de voorgrond.

Het electronenoptische beeld van het Friend virus toont sterke gelijkenis met het Gross virus en het virus van Graffi.

Het agens van Bather.

Bather (1961) bereidde evenals Graffi (zie blz. 13) een celvrij preparaat uit *Sarcoma 37* en spoot dit in bij jongvolwassen Swiss muizen van een waarschijnlijk niet geheel zuivere stam. De tumor was getransplanteerd bij Swiss muizen. Na tien dagen werd bij de dieren, die met het celvrije preparaat waren ingespoten, palpatoir een progressieve miltvergroting vastgesteld. De meeste muizen stierven na 30 tot 50 dagen. Bij obductie bleken behalve de milt en de lever soms ook de lymphklieren en de thymus gezwollen. Een milt-ruptuur werd nooit gevonden.

Bij histologisch onderzoek werden in de rode pulpa der milt en in de lever woekeringen gezien van erythroblasten en grote mononucleaire cellen. De laatste hadden volgens Bather hetzelfde aspect als de cellen die na injectie van het Friend virus werden waargenomen (zie blz. 19). De auteur sprak echter niet van reticulumcellen, zoals de onderzoekers doen, die met het Friend virus werkten, maar van jonge monocytoïde cellen. In de lever bleef de proliferatie van deze monocytoïde elementen niet beperkt tot de sinussen, doch breidde deze zich uit in het parenchym. In de gezwollen lymphklieren en de thymus werden eveneens woekeringen van monocytoïde cellen waargenomen.

Het perifere bloed toonde vanaf de twintigste dag na injectie een progres-

sieve daling van de haematocrietwaarden. Na dertig dagen trad een snelle stijging van het aantal leukocyten op en een meer geleidelijke toename der erythroblasten. Alle celreeksen van het witte systeem, die onder normale omstandigheden in het bloed worden aangetroffen, waren bij de leukocytose betrokken, doch ook waren veel cellen aanwezig met het aspect van „Friend-cellen” (zie blz. 20).

Bather beschouwde deze elementen als van monocytoïd karakter. Men krijgt de indruk, dat hij dit celtype als pathologisch opvatte, hoewel hij hieromtrent vaag is.

Over afwijkingen in het beenmerg en andere organen geeft Bather geen inlichtingen.

Het geïnduceerde proces kwam dus in verschillende opzichten overeen met de ziekte, die bij Swiss muizen werd waargenomen na injectie van het Friend-virus (zie blz. 19).

De erythroblastose die na toediening van het Bather agens werd gezien, leidde echter zoals bij de „Friendleukaemie” niet tot een miltruptuur. De erythroblastose bestond gelijktijdig met de kennelijk maligne woekeringen der monocytoïde cellen. Hetzelfde geldt voor de leukaemoïde reactie, dat wil zeggen voor het optreden van een verhoogd aantal, kwalitatief normale, leukocyten in het bloed.

De gedachte komt op, dat het proces geïnduceerd met het door Bather geïsoleerde virus zeer grote gelijkenis toont met de veranderingen na toediening van het Friend virus. Ook kunnen twee fasen herkend worden, al is het onderscheid niet zo duidelijk.

Men kan zich voorstellen, dat de proliferatie der monocytoïde of reticulumcellen ten gevolge van afwijkende proefomstandigheden, zoals o.a. het gebruik van een niet geheel zuivere Swiss stam, snel een maligne karakter kreeg en tot de dood der muizen leidde voordat een miltruptuur kon optreden. Dit verklaart het ogenschijnlijk éénphasisch beloop. Want hoewel de miltruptuur op zich zelf geen wezenlijke betekenis had, markeerde zij bij de „Friendleukaemie” de overgang van de eerste naar de tweede fase (zie blz. 20).

Bather verrichtte geen transplantatieproeven waaruit een eventueel tweefasisch karakter van het proces, dat met zijn virus geïnduceerd werd, duidelijk zou kunnen blijken.

Het agens van Schoolman en Schwartz.

Schoolman en Schwartz toonden een leukaemogeen agens aan in ultrafiltraten van hersenen van leukaemische Swiss en C₃Heb muizen (Schoolman c.s. 1957; Schwartz c.s. 1959). In deze stammen treedt slechts zeer sporadisch spontaan leukaemie op en dan nog maar alleen bij dieren die ouder zijn dan zes maanden. Werden jongvolwassen muizen van genoemde stammen met de hersenfiltraten ingespoten, dan ontwikkelden zich in 40 tot 75 % maligne lymphoïde tumoren, die voor een klein deel vergezeld gingen van een leukaemisch bloedbeeld. Een sterke zwelling van lever en mesenteriale lymphklieren stond op de voorgrond en vaak waren nieren en genitalia interna in het proces betrokken. De perifere lymphklieren waren meestal slechts weinig of in het geheel niet vergroot. Bij 30 % der zieke dieren werd een *thymuszwelling* waargenomen. De latentieperiode was opmerkelijk kort. De tumor werd vaak reeds binnen twee weken na injectie klinisch manifest. Zeer merkwaardig was, dat celvrije preparaten van deze pathologisch veranderde organen, in tegenstelling tot ultrafiltraten van de hersenen, geen leukaemogene werking toonden.

Rauscher (1962a) kreeg met celvrije preparaten van leukaemische Swiss muizen ook een aantal positieve resultaten bij Balb/c muizen. Het agens bleek dus niet stamspecifiek te zijn.

Door verhitting der celvrije hersenfiltraten op 56°C. gedurende 45 minuten vond volledige inactivering plaats (Schoolman c.s. 1957).

Na seriepassage door de hersenen van resistente muizen (DBA) bleek de activiteit geheel behouden (Schwartz 1958). Het agens vermenigvuldigde zich dus blijkbaar in hersenweefsel zonder schade toe te brengen aan de gastheer.

Het bleek mogelijk Swiss en C₃Heb muizen zowel actief als passief te immuniseren tegen het agens, aanwezig in de celvrije hersenfiltraten. Maduras c.s. (1958) verkregen bij deze muizen een specifieke immuniteit door ze in te enten met hersenfiltraten die aan U.V. stralen waren blootgesteld. Schwartz en medewerkers (1959) toonden ook in sera van geënte konijnen specifieke antistoffen aan. Met deze sera konden de muizen passief worden geïmmuniseerd. Deze immuniteit remde de ontwikkeling van lymphoïde tumoren minder sterk na intraperitoneale injectie van tumorcellsuspensies dan de inductie van deze tumoren door middel van de celvrije hersenpreparaten. Maduras en Schwartz meenden, dat het agens aanwezig was in de tumorcellen en daardoor moeilijk te bereiken voor de antilichamen. Volgens deze auteurs zou het ook mogelijk zijn, dat een deel der ingespoten tumorcellen autonoom geworden was en onafhankelijk van de aanwezigheid van het agens ging prolifereren.

Manaker c.s. (1962) toonden in de kweekvloeistof van verscheidene malen ververste cultures van Schoolman-Schwartz tumoren een ultrafiltrabel leukaemogeen agens aan. Dit agens bleek vooral werkzaam na intraperitoneale injectie bij Balb/c en Swiss muizen.

Ook konden bij verschillende andere muizenstammen en bij Osborne Mendel ratten op deze wijze leukaemieën geïnduceerd worden. De latentieperiode was aanmerkelijk langer dan na toediening van het oorspronkelijke Schoolman-Schwartz agens. Het maligne lymfhoïde proces, dat optrad na inspuiting van de cultuurvloeistof bleef echter niet hoofdzakelijk beperkt tot de mesenteriale lymphklieren en omgevende weefsels. Soms bleek het voornamelijk in de thymus gelocaliseerd te zijn met eventuele uitbreiding in het voorste mediastinum. Vaak was het meer gegeneraliseerd. Wegens deze verschillen meende Manaker, dat het in vitro gekweekte agens een variant was van het originele Schoolman-Schwartz agens. Hij paste seriepassage toe en noemde het agens naar de geïnduceerde thymustumor, die hij voor de kweek gebruikt had „C-60”.

De ultrastructuur van het C-60 agens is beschreven door Dalton en medewerkers (1961). Zij vonden virusachtige partikels met een gemiddelde diameter van 100 mmu. in cytoplasma vacuolen van ogenschijnlijk normale megakaryocyten. Een groot aantal van deze partikels bezat een electronendichte kern met een gemiddelde diameter van 58 mmu. Zij behoorden dus blijkbaar tot het type C van Bernhard (zie blz. 7). De partikels werden ook waargenomen aan de buitenzijde van maligne lymfhoïde cellen, verbonden met de celmembraan.

Uit onderzoeken van Sincovics en medewerkers (1960) bleek, dat met ultrafiltraten van leukaemische organen, de werkzaamheid van hersenfiltraten werd geremd. De remmende werking werd veroorzaakt door een thermolabele, niet ultracentrifugeerbare factor. Verder bleek, dat wel tumorinductie plaats vond, wanneer celvrije preparaten van leukaemische organen en celvrije door verhitting geïnactiverde ultrafiltraten van hersenen gelijktijdig werden ingespoten. Zoals reeds vermeld, waren de ultrafiltraten van leukaemische organen op zichzelf inactief.

Sincovics c.s. gaven de volgende verklaring voor hun bevindingen: In celvrije filtraten van de leukaemische organen is het leukaemogeen virus wel degelijk aanwezig. Dit virus verliest zijn activiteit door een neutraliserende factor, waaraan het reversibel is gebonden. Het geïnactiverde virus in de hersenfiltraten is nog in staat de neutraliserende factor te binden. Wordt het in overmaat aan het ultrafiltraat der leukaemische organen toegevoegd, dan krijgt het hierin aanwezig virus vrij spel. Omtrent de aard van de neutraliserende factor is niets met enige zekerheid bekend. Het is volgens Sincovics zeer onwaarschijnlijk, dat we met een antilichaam te maken hebben, daar deze factor bij verhitting op 56°C. reeds geïnactiveerd werd.

Bij histologisch onderzoek werden door Schoolman en Schwartz twee typen tumoren onderscheiden, terwijl zij ook mengvormen aantroffen. Het eerste type was opgebouwd uit uniforme cellen met een relatief grote ronde kern en slechts weinig basophil cytoplasma. Ofschoon zij aan de mogelijkheid van lymphoblasten dachten, waren de cellen hiervoor te onrijp en de auteurs spraken liever van stamcellen. Het andere tumortype was gekenmerkt door een uitgesproken kernpolymorphie. Onder de kernen werden zowel ronde als ingedeukte exemplaren gevonden. Tevens waren grote nucleoli aanwezig. Er bestond geen nieuwvorming van reticulumvezels. Schoolman en Schwartz duiden dit type aan als lymphoblastoma. In de milt was de gehele prae-

existente structuur verdwenen en vervangen door tumorcellen. Ook het leverparenchym bleek tendele verdrongen door maligne lymfoïde cellen. In ruim 4 % der gevallen verschenen jonge lymfoïde cellen in het perifere bloed.

Volgens Szanto en medewerkers (1958) werden de eerste maligne celwoekeringen histologisch reeds na vier dagen waargenomen. Deze zouden zich in de verschillende organen tegelijkertijd voordoen.

Uit bovenstaande blijkt, dat het maligne lymfoïde proces, geïnduceerd met het Schoolman-Schwartz agens, opmerkelijk verschilde van het proces opgewekt met de andere leukaemogene virussen. Opmerkelijk was de korte latentietijd; immers na vier dagen waren de eerste maligne celwoekeringen reeds histologisch zichtbaar. Bij de andere leukaemie virussen wordt de latentietijd in maanden uitgedrukt. Een andere bijzonderheid is de localisatie van het proces, dat een sterke voorkeur toonde voor de buikorganen. In een vrij groot aantal gevallen werd ook een zwelling van de thymus gezien. Ware het niet, dat een intracerebrale injectie dezelfde resultaten opleverde als een intraperitoneale toediening, dan zou men aan de zuiverheid der gebruikte preparaten gaan twifelen en veronderstellen dat er sprake is geweest van tumorceltransplantatie. Dit te meer, daar enkele der afbeeldingen in de publicaties deze twijfel versterken. Sommige proefdieren tonen namelijk een subcutaan lymfosaroom op de plaats waar het preparaat ingespoten werd. Opgemerkt moet worden, dat niet duidelijk blijkt, of uitvoerig gezocht is naar eventuele histologische veranderingen in de hersenen, gebruikt voor de bereiding der preparaten. Het is mogelijk dat hier lymfoïde celwoekeringen aanwezig waren. Het lijkt ons van belang om te vermelden, dat Law (1959) in tegenstelling tot Schoolman en Schwartz geen leukaemogeen virus kon aantonen in hersenen van leukaemische Swiss en C₃Heb muizen.

Behalve met muizenhersenen deden Schwartz en medewerkers ook proeven met hersenen van leukaemie patiënten (Schwartz c.s. 1957; 1958). Het bleek, dat hierin eveneens een ultrafiltrabel en thermolabiel agens aanwezig was, dat drie tot vier weken na inspuiting bij AKR muizen een leukaemie deed ontstaan. Dit agens kon in serie gepasseerd worden via de hersenen van deze muizen. De geïnduceerde leukaemie toonde eenzelfde beeld als die op oude leeftijd bij deze muizenstam vaak gezien wordt. Een gegeneraliseerde woekering van lymfoïde cellen ging vaak gepaard met een leukaemisch bloedbeeld. Het agens zou voorkomen zowel in de hersenen van patiënten met een acute myeloblasten, lymfoblasten als monoblasten leukaemie. De celvrije hersenfiltraten leken werkzamer, naarmate het ziektebeloop foudryanter was geweest. In hersenen van patiënten met andere aandoeningen kon het agens niet aangetoond worden.

Volgens Greenspan en Schwartz (1961) bestond er een immunologische verwantschap tussen het agens aanwezig in leukaemische muizen en dat in de hersenen van leukaemie patiënten. Zij gebruikten de in 1958 door Ovary geïntroduceerde techniek voor het aantonen van specifieke antilichamen. Deze berust op het optreden van een anaphylactische huidreactie op de plaats waar het antigeen bij passief gesensibiliseerde caviae intracutaan wordt ingespoten. De caviae werden passief gesensibiliseerd door ze intraperitoneaal in te spuiten met sera van leukaemie patiënten of van leukaemische muizen. In beide gevallen trad bij deze dieren een positieve huidreactie op met zowel celvrije hersenpreparaten van leukaemie patiënten als met die van leukaemische muizenorganen. Het resultaat van deze test zou volgens deze onderzoekers een duidelijke bevestiging geven van de opvattingen van anderen (o.a. Gross), dat zowel de leukaemie bij de mens als bij de andere zoogdieren door een virus wordt veroorzaakt.

Uit de opzet van de proeven van Greenspan en Schwartz valt echter niet af te leiden of de positieve uitkomst inderdaad berustte op een reactie tussen een virus en de hier tegen gerichte antilichamen. Men kan zich voorstellen, dat er sprake was van een reactie tussen een niet virusachtig, voor leukaemische cellen specifiek antigeen en de daartegen gevormde antilichamen.

Evenmin als Law (1959) de bevindingen van Schoolman en Schwartz omtrent het voorkomen van een leukaemie inducerend virus in muizenhersenen kon bevestigen, is Swaen (1960) erin geslaagd de positieve resultaten van Schoolman en Schwartz verkregen met ultrafiltraten van hersenen van leukaemie patiënten te reproduceren.

Samenvatting.

Volgens Schoolman en Schwartz komt in de hersenen van Swiss en C₃Heb muizen een leukaemogeen virus voor. De leukaemie met dit virus geïnduceerd zou zich van de andere tot nu toe besproken vormen onderscheiden door de bijzonder korte latentieperiode. De lymfhoïde tumoren die ontstaan, schijnen voornamelijk abdominaal gelocaliseerd te zijn en in de thymus. Uit deze tumoren werden geen actieve celvrije preparaten verkregen, doch Sincovics en medewerkers maakten het aannemelijk, dat het virus in geneutraliseerde vorm aanwezig was. De neutralisatie werd veroorzaakt door een niet corpusculaire factor. Deze bleek ultrafiltreerbaar te zijn en werd geïnactiveerd door verhitting op 56°C. gedurende een half uur. Volgens Sincovics was dit geen antilichaam in de gewone betekenis van het woord. In het celvrije medium van een in vitro gekweekte Schoolman-Schwartz tumor bleek een leukaemogeen virus voor te komen, dat zich van het virus aanwezig in hersenweefsel, onderscheidde. Behalve voor verschillende muizenstammen bleek het ook leukaemogeen voor ratten en had het een veel langere latentietijd. Verder was

de maligne lymfhoïde celwoekering, die optrad na toediening van het gekweekte agens meestal meer gegeneraliseerd. Als dit niet het geval was bleef het proces beperkt tot de thymus en het voorste mediastinum. Dit beeld komt overeen met dat na toediening van andere leukaemogene virussen, zoals het virus van Gross en het Graffi virus. Volgens Manaker was het in vitro gekweekte agens een variant van het originele Schoolman-Schwartz agens en hij duidde deze variant aan als „C-60". De ultrastructuur van het C-60 agens werd bestudeerd door Dalton en medewerkers. Het electronenmicroscopische beeld kwam zowel wat betreft vorm als localisatie der partikels in grote trekken overeen met dat der reeds besproken leukaemogene agentia.

Behalve in muizenhersenen komt er volgens Schoolman en Schwartz ook een leukaemie inducerend virus voor in de hersenen van patiënten met een acute leukaemie. Andere onderzoekers, zoals Law en Swaen hebben noch in hersenen van leukaemische Swiss en C₃Heb muizen, noch in hersenen van leukaemie patiënten een leukaemogeen virus kunnen aantonen.

Het agens van Moloney.

Moloney (1959) verkreeg een leukaemogeen agens met viruseigenschappen uit S a r c o m a 37, eenzelfde tumor dus waaruit ook Graffi (1957) en Bather (1961) een celvrij leukaemie inducerend agens hebben afgezonderd (zie blz. 13 en blz. 24). Het gebruikte Sarcoma 37 was verschillende malen bij Balb/c muizen in serie getransplanteerd. De leukaemieën, die Moloney waarnam, waren van het lymphatische type.

Acht maanden oude muizen bleken even ontvankelijk voor het Moloney agens als pasgeboren dieren. Verder bleek leukaemie inductie mogelijk bij acht verschillende muizenstammen. De ziekte trad bij alle ingespoten dieren op. Ook r a t t e n, die kort na de geboorte werden ingespoten, ontwikkelden in een hoog percentage leukaemieën. Zelfs ontstonden bij enkele h a m s t e r s reticulumcelsarcomen, wanneer deze dieren bij de geboorte waren ingespoten (Moloney 1962).

Door seriepassage (zie blz. 2) bleek het mogelijk de latentietijd te verkorten van zes maanden tot tien weken. Voor deze seriepassage werden pasgeboren Balb/c muizen gebruikt.

Het agens was ultracentrifugeerbaar, thermolabiel en werd in vitro volledig geïnactiveerd door aethylether (Dalton 1961; Moloney 1962; Gross 1964a).

Zeer werkzame specifieke antisera werden verkregen door konijnen in te spuiten met geconcentreerde celvrije leukaemogene preparaten (Moloney 1962). Deze geconcentreerde preparaten werden bereid door gefractioneerde ultracentrifugatie van bloedplasma of van homogenaten van gezwollen organen der leukaemische dieren. Het serum van muizen, ingeënt met celvrije preparaten, die waren voorbehandeld met formaline, bleek neutraliserende antilichamen te bevatten (Moloney 1962). Verder kon er een kruisreactie aangetoond worden tussen antisera opgewekt met het Friendvirus en sera tegen het agens van Moloney (Moloney 1962). In 1965 vond Gross, dat konijnen-antisera tegen het Passage A agens eveneens een neutraliserend effect hadden op het agens van Moloney.

Uit experimenten van Klein en Klein (1964) en Haughton (1965) werd het waarschijnlijk, dat evenals bij de „Graffi leukaemie” in de tumoren geïnduceerd met het Moloney agens, antigenen voorkwamen, die met dit agens immunologisch verwant waren. Zij pasten bij hun onderzoek dezelfde technieken toe als Pasternak bij zijn experimenten met het Graffi agens (zie blz. 14).

Manaker c.s. (1960) slaagden erin het agens te kweken in cultures van miltcellen, afkomstig van normale jonge Balb/c muizen. Met de celvrije kweekvloeistof van herhaalde malen verwerste cultures konden leukaemieën worden opgewekt. Er werd geen cytopathogeen effect waargenomen. Ook werden gunstige kweekresultaten vermeld door Ginsburg en Sachs (1961) en Salaman en medewerkers (1961). Zij slaagden erin het agens van Moloney voort te kweken in cultures van muizeniercellen (Swiss stam) en cellen van muizenembryonen (CBA stam). Ginsburg en Sachs toonden eveneens een leukaemogene werking aan van het celvrije medium van in vitro gekweekte lymfoïde cellen, afkomstig van tumoren, die ontstaan waren na toediening van het Moloney agens.

Bij electronenoptisch onderzoek werden in geïnduceerde lymfoïde tumoren en in door ultracentrifugatie verkregen sedimenten van tumorhomogenaten, virusachtige partikels gevonden met een diameter van 65 tot 100 m μ . Ze bezaten een dubbele membraan en in de meeste van hen was een electronendichte kern aanwezig met een diameter van 48 tot 60 m μ . (Dalton 1961). Het waren dus voornamelijk C partikels volgens de classificatie van Bernhard (zie blz. 7). Deze C partikels waren in het tumorweefsel intercellulair gelocaliseerd en bleken soms met de celmembraan verbonden te zijn. Verder waren ze aanwezig in cytoplasmavacuolen van ogenschijnlijk normale megakaryocyten in milt en beenmerg. Partikels van het type A werden soms in het cytoplasma der tumorcellen waargenomen. Door negatieve kleuring¹ toe te passen toonden Dalton en medewerkers in 1962 aan, dat een deel der C partikels was opgebouwd uit een hexagonaal kopgedeelte en een cilindervormige staart. De diameter van het kopgedeelte varieerde van 100 tot 150 m μ ., terwijl de staartlengte ongeveer 250 m μ . bedroeg. Partikels met deze configuratie werden zowel in weefselcoupes als in ultracentrifugaten van plasma gezien. Ze kwamen ook voor in cytoplasmavacuolen der megakaryocyten. De onderzoekers namen op grond van deze bevindingen aan, dat deze configuratie in vivo voorkomt en geen artefact is.

Uit de resultaten van chemische analyses van geconcentreerde viruspreparaten is het waarschijnlijk geworden, dat het Moloney agens ribonucleïnezuur bevat (Moloney 1962).

¹ Bij de negatieve kleuring worden de partikels niet gekleurd, maar ingebed in electronendicht materiaal. Het resultaat is een omgekeerd contrast.

Bij proeven met het Moloney virus bleek niet alleen de gebruikte muizenstam van belang, maar bovendien het wel of niet aanwezig zijn van de thymus. Door variëren van deze factoren konden zowel lymphatische, stamcel- als myeloïde leukaemieën geïnduceerd worden (Moloney 1960a; 1960b; Dunn c.s. 1961; Gross 1964a).

Bij de lymphatische- en stamcelleukaemie bestond er meestal een sterke vergroting van milt, lever, lymphklieren en van de thymus. Bij 90 tot 95 % der intacte muizen was de thymus sterk vergroot. Bij C₃H muizen stond de thymuszwellung zelfs op de voorgrond (Gross 1964a).

Uit de beschrijving, die Moloney gaf van de lymphatische leukaemie bleek, dat behalve in bovengenoemde organen ook elders, o.a. in longen, nieren, speekselklieren en meningen, woekeringen voorkwamen van cellen met ronde of licht ingedeukte kern en een smalle basophile cytoplasmazoom. Er werden veel mitosen gezien. Het aantal leukocyten in het perifere bloed bleek gemiddeld driemaal hoger dan normaal. Het haemoglobine gehalte en de haematocrietwaarde toonden een daling van gemiddeld 30 %.

Indien bij muizen intraperitoneaal cellen werden ingespoten van een oorspronkelijk spontane en door transplantatie in stand gehouden lymphoïde tumor, ontwikkelde zich een vrijwel gelijk beeld als na inspuiting van celvrije preparaten. Er trad dan echter geen of slechts een geringe thymuszwellung op.

Over localisatie en uitbreiding van de maligne cellen bij de geïnduceerde myeloïde leukaemieën worden door geen der auteurs gegevens verstrekt. Bij ratten bleek de geïnduceerde leukaemie volgens Dunn en Moloney (1961) steeds van het lymphatische type te zijn. Bij een groot aantal der proefdieren werd macroscopisch alleen een sterke thymuszwellung gezien. Het gewicht van dit orgaan nam tot gemiddeld 7,5 gram toe (normaal gemiddeld 0,6 gram). De tumorcellen waren groter dan lymphocyten en monomorph. De chromatinerijke kern nam het grootste deel van deze cellen in. Het cytoplasma was eveneens basofiel en bevatte geen korrels.

Dunn en medewerkers (1961) namen bij muizen (Balb/c) de eerste lichtmicroscopische veranderingen pas na acht weken waar. De dieren waren intraperitoneaal ingespoten op de leeftijd van zes weken. Na acht weken kwamen frequent granulocyten voor in het cytoplasma der megakaryocyten in milt en beenmerg. Dit beeld was echter niet pathognomisch voor de virusinfectie daar het ook, hoewel belangrijk minder vaak, bij controle muizen werd gezien. Verder bestond er een miltvergroting. Histologisch bleek deze te berusten op een proliferatie van alle cellen van de rode pulpa, doch vooral imponeerde de vermeerdering van het aantal megakaryocyten. Het miltgewicht bleek drie- tot viervoudig toegenomen. In de thymus deed zich een reeks

veranderingen voor: Het meest frequent werd locale schorsatrophie gezien. In een aantal gevallen bleek echter één der thymuskwabben vergroot en diffuus doorwoekerd met lymphoïde cellen. De celwoekering bleef binnen de kapsel beperkt. Dunn en medewerkers beschouwden deze celwoekering toch als neoplastisch. We zouden dus met Goodman c.s. (1963 zie blz. 10), die eenzelfde beeld waarnamen na injectie van het Gross agens, kunnen spreken van een lymphosarcoma in situ. Ook troffen Dunn c.s. bij de dieren, die acht weken na de injectie werden gedood, enkele gevallen aan, waar de gehele thymus sterk gezwollen was door een lymphoïde celwoekering, die de kapsel had doorbroken en zich uitbreidde in de omgevende weefsels. Zij spraken hier evenals Goodman en medewerkers van een lymphosarcoma.

Soms werd in het merg der lymphklieren een focale reticulumcelproliferatie gezien. De reticulumcelhaarden waren omgeven door een lymphocytenzoom. Het beeld kwam overeen met de veranderingen, die Potter (1943) heeft beschreven bij een bepaalde muizenstam (C58), waarin spontane leukaemie in een hoog percentage voorkomt. Deze afwijking staat bekend als de „Potter's lesion” en wordt door een aantal auteurs als praemaligne beschouwd (Potter 1943; Arnesen 1958). Dunn en medewerkers vermelden echter dat slechts éénmaal maligne celwoekeringen buiten de thymus gevonden werden, z o n d e r dat dit orgaan maligne veranderingen toonde. Wel waren in dit geval haarden van grote schuimcellen en cholesterolkristallen in de thymus aanwezig. Dergelijke celhaarden kwamen soms ook voor in een thymus met maligne veranderingen, zij werden echter nooit onder normale omstandigheden gezien.

Een dergelijk onderzoek door Dunn en Moloney (1961) bij r a t t e n vericht leverde ongeveer dezelfde resultaten op. Zij kregen hierbij de indruk, dat de eerste neoplastische veranderingen, voorafgegaan door schorsatrophie, in het thymus m e r g optraden. Soms werd een proliferatie van lymphoïde elementen gezien rondom conglomeraten van grote gevacuoliseerde cellen, die deze onderzoekers opvatten als van epitheliale oorsprong. Evenals bij de m u i z e n bleek een m i l t v e r g r o t i n g te ontstaan, veroorzaakt door toename der haemopoiese in dit orgaan. Bij deze dieren toonde echter vooral de erythropoietische reeks een verhoogde activiteit, terwijl bij de muizen, zoals boven reeds vermeld, vooral een toename van het aantal megakaryocyten op de voorgrond stond. Verder beperkte de toename der haemopoiese zich bij de ratten niet alleen tot de milt, zoals bij muizen het geval was, maar werd deze ook in het beenmerg waargenomen. In tegenstelling tot in de milt waren de verschillende haemopoietische systemen hier in gelijke mate bij de proliferatie betrokken. Een ander verschil met de veranderingen bij muizen, was het ont-

breken van leukocyten in de megakaryocyten. In de lymphklieren der geïjiceerde ratten deden zich geen duidelijke veranderingen voor. Met name ontbrak hier de „Potter's lesion”.

Bij hun experimenten met ratten besteedden Dunn en Moloney bijzondere aandacht aan de endocriene organen, doch zij konden hierin geen duidelijke veranderingen aantonen.

Wanneer het Moloney agens bij gethymectomeerde muizen (Balb/c) werd ingespoten, bleek de latentieperiode significant verlengd te zijn en trad een groter aantal myeloïde leukaemieën op dan bij intacte dieren. Verder deden zich gevallen voor van het zogenaamde reticulumcelsarcoma type B (Dunn c.s. 1961). Onder reticulumcelsarcoma type B verstaat Dunn (1954) een maligne reticulose met granulomateus karakter. De laesie is gekenmerkt door een woekering van polymorphe reticulumcellen, waartussen verspreid lymphocyten, plasmacellen en soms enkele granulocyten voorkomen. Onder de granulocyten worden slechts weinig of geen eosinofielen aangetroffen. Een deel der reticulumcellen bezit twee kernen, waardoor ze volgens Dunn aan Sternberg-Reed cellen herinneren. Er worden kleine necrosehaarden en soms micro-abscesjes gezien. Fibrosis staat niet op de voorgrond. De afwijking wordt meestal het eerst in de mesenteriale lymphklieren en Peyerse plagues waargenomen. De normale lymphklierstructuur gaat verloren, doch het proces beperkt zich binnen de kapsel. Vaak wordt uitbreiding naar para-aortale lymphklieren, milt, lever, beenmerg, nieren en ovaria gezien. De afwijking wordt ook wel aangeduid als „Hodgkin's like-lesion”.

Samenvatting.

Moloney isoleerde evenals Graffi een leukaemogeen agens met viruseigenschappen uit een fibrosarcoma (S 37), dat gedurende twintig jaren bij muizen was getransplanteerd. Met dit agens werden, afhankelijk van de gebruikte muizenstam zowel lymphatisch als stamcel- en myeloïde leukaemieën geïnduceerd.

Bij ratten traden na toediening van dit agens steeds lymphoïde celwoekeringen op, waarbij het bloed tenslotte leukaemisch werd.

Het bleek, dat bij de genese van de lymphatische leukaemie, de eerste maligne celwoekeringen vrijwel steeds in de thymus ontstonden. Vóór de maligne veranderingen trad atrophie van de thymusschors op. Dit gold voor muizen en ratten. Uit mededelingen van verschillende onderzoekers blijkt niet

of de thymus ook een dergelijke rol speelt bij de inductie van myeloïde- en stamcelleukaemieën.

Voordat de maligne veranderingen in de thymus ontstonden trad bij muizen en ratten een verhoogde haemopoietische activiteit op in de milt. Bij ratten werd de toename der haemopoiese ook in het beenmerg waargenomen. Uit de literatuurgegevens wordt het echter niet geheel duidelijk, of het geïnduceerde ziekteproces een tweefasisch beloop had, zoals bij de ontwikkeling van de Friendleukaemie werd gezien (zie blz. 18). Het leek echter wel, dat iets dergelijks ook hier bestond. Bij muizen trad na toediening van het agens in de lymfklieren de zogenaamde „Potter's lesion" op. Deze laesie was gekenmerkt door focale reticulumcelproliferaties in het merg, omgeven door een lymfocytenzoom. Door verschillende auteurs wordt deze afwijking als praemaligne beschouwd. De belangrijke rol, die de thymus vervulde bij de leukaemie inductie kwam vooral naar voren, wanneer het agens toegediend werd aan gethymectomeerde muizen. Het bleek, dat niet alleen een toename van de latentietijd optrad, doch ook een hoger percentage myeloïde leukaemieën. In een aantal gevallen ontstond een maligne reticulose met granulomateus karakter.

Uit immunologisch onderzoek is gebleken, dat er een antigene verwantschap bestaat tussen het Moloney virus en de virussen van Friend en Gross.

De ultrastructuur van het Moloney virus toonde in negatief gekleurde preparaten verschillen ten opzichte van het Gross virus. Het bleek namelijk opgebouwd te zijn uit een veelhoekig kopgedeelte en een cilindervormige staart. Het Gross virus bleek daarentegen ook in preparaten, die op deze wijze gekleurd waren, sferisch te zijn.

Het agens van Stansly.

Stansly c.s. (1961) injecteerden bij pasgeboren Balb/c muizen een celvrij preparaat, dat evenals de agentia van Graffi (zie blz. 12) en Friend (zie blz. 17) verkregen was uit een Ehrlich ascites carcinoom. Na ongeveer een jaar ontstonden bij 20 % der proefdieren reticulumcelsarcomen. Over localisatie en uitbreiding van deze tumoren wordt door de auteurs niets meegedeeld.

Door seriepassages van celvrije miltpreparaten werd de latentietijd verkort van 12 tot 5½ à 8 maanden en steeg het percentage positieve resultaten tot 100.

Het histologisch beeld der tumoren kwam overeen met dat van het reticulumsarcoma type B (zie blz. 34). In sommige tumoren werden echter ook structuren gevonden met het aspect van een lymphosarcoma.

Het agens van Breyere en Moloney.

Dit agens bleek aanwezig in een plasmaceltumor, ontstaan bij een volwassen C₃H muis, die enkele weken na de geboorte was behandeld met methylcholanthreen (medegedeeld door Moloney in 1962).

De tumor werd in deze muizenstam vele malen getransplanteerd. Aanvankelijk ontwikkelde zich echter geen tumor op de plaats waar het transplantaat was aangebracht, doch wel in de ovaria. Dit deed het vermoeden ontstaan, dat er een celvrij agens in het spel was. Pas nadat de tumor was getransplanteerd bij Balb/c muizen slaagde men erin een dergelijk agens aan te tonen. Met de celvrije preparaten werden echter geen plasmaceltumoren geïnduceerd, doch lymphosarcomen.

Aanvankelijk was het aantal positieve resultaten nog gering, maar na seriepassage ontwikkelden zich bij 80 tot 100 % der geïnjecteerde muizen gegeneraliseerde lymphosarcomen. Veranderingen in het bloed worden niet vermeld. Dit bleek niet alleen het geval bij pasgeboren Balb/c muizen, maar ook bij jongvolwassen dieren van deze stam. Bovendien was het agens nu actief bij pasgeboren C₃H muizen en bij ratten (Osborne Mendel). Het resultaat was hier eveneens bij vrijwel alle ingespoten dieren positief. Bij de ratten stond de thymuszwellings het meest op de voorgrond.

De activiteit der preparaten bleef onaangetaast, indien ze in diepgevroren toestand (—70°C.) werden bewaard.

Electronenoptisch werden in leukaemisch weefsel en in ogenschijnlijke normale megakaryocyten virusachtige partikels waargenomen met een diameter van 100 m μ . In de megakaryocyten bleken alleen C partikels (zie Bernhard, blz. 7) aanwezig te zijn. In de tumoren kwamen C en A partikels voor. De A partikels bevonden zich in cytoplasmavacuolen.

Het agens van Rauscher.

Rauscher (1962b) bereidde een celvrij leukaemogeen preparaat uit een homogenaat van milt, lymphklieren en thymus van Balb/c muizen. Bij deze dieren was een zeer agressief groeiende en zich snel uitbreidende lymphoïde tumor getransplanteerd, die oorspronkelijk bij Swiss muizen was ontstaan na inspuiting van Schoolman Schwartz preparaten.

Nadat het door Rauscher bereide celvrije preparaat een aantal malen intraperitoneaal was overgeënt kon hiermee bij 90 tot 100 % van zowel pasgeboren als drie maanden oude muizen een ziekteproces geïnduceerd worden. Dit begon reeds 10 à 15 dagen na injectie met een sterke toename der erythropoiese en, zij het in mindere mate, ook van de granulocytopoiese in milt en lever. Over eventuele veranderingen in het beenmerg geeft de auteur geen inlichtingen. Milt en lever namen als gevolg van de verhoogde erythropoietische activiteit sterk in omvang toe. Een groot aantal dieren stierf 25 tot 30 dagen na de injectie aan een miltruptuur. Rauscher onderzocht niet of het proces in deze eerste phase te transplanteren was. Bij de dieren, die deze erythropoietische phase overleefden, ontwikkelden zich na 30 tot 45 dagen in milt, lever, lymphklieren en thymus maligne lymphoïde tumoren. Dit ging in een aantal gevallen vergezeld van een leukaemisch bloedbeeld. Deze tumoren bleken zeer gemakkelijk te transplanteren. Het aantal dieren, dat het erythropoietische stadium overleefde, bleek toe te nemen naarmate de dosis van het agens kleiner en/of de leeftijd van het proefdier, waarop het werd ingespoten, hoger was. De gevoeligheid voor deze preparaten bleek bijzonder groot bij acht verschillende muizenstammen en ook was het mogelijk om leukaemie te induceren bij Osborne Mendel ratten (Rauscher 1962) en Ratten (Swan 1964, 1966). Door seriepassage werd de activiteit der preparaten verhoogd (Rauscher 1962).

De preparaten bleken volledig geïnactiveerd te worden door verhitting op 56°C. gedurende 30 minuten (Rauscher 1962). Ook bleek inwerking van aethylether en formaline de werkzaamheid geheel tot verdwijning te brengen (Rauscher 1962).

Het lukte aanvankelijk niet om met konijnenantiseren tegen de preparaten van Friend en Moloney de werkzaamheid van de Rauscher preparaten in belangrijke mate te verminderen (Rauscher 1962). In 1964 slaagde Gross erin om met konijnenantiseren tegen Friendpreparaten de activiteit der Rauscher preparaten te remmen (Gross 1964b). Deze antiseren bleken alleen een remmende werking te hebben op de inductie van de eerste phase van het proces. Ze hadden geen invloed op de maligne lymphoïde celwoekeringen der tweede phase. Hun remmende werkzaamheid op de afwijkingen na toediening van het Friend virus was echter zowel tegen de eerste als tegen de tweede ziektephase ge-

richt. Gross (1964b) meende op grond van deze resultaten te mogen aannemen, dat in de preparaten van Friend en van Rauscher twee verschillende agentia voorkomen, namelijk één dat verantwoordelijk is voor de veranderingen der eerste phase, die vooral gekenmerkt was door de verhoogde erythropoïese en een tweede agens, dat de maligne celwoekeringen der tweede phase induceert. Volgens Gross zouden de preparaten van Friend en Rauscher onderling kwalitatief identiek zijn. In de Rauscherpreparaten zou echter het agens, verantwoordelijk voor de maligne lymfoïde celwoekeringen, in hogere concentratie voorkomen. Dit agens zou identiek zijn of althans nauw verwant met het „Passage A” virus van Gross en het virus van Graffi. Gross stelt voor om dit agens „leukemia virus type A” te noemen.

Fink en Rauscher (1964) verkregen bij muizen een volledige immuniteit door inenting met preparaten, die waren voorbehandeld met formaline. Deze immuniteit bleek te berusten op het ontstaan van humorale antilichamen. Er kon geen cellulaire immuniteit worden aangetoond. De auteurs maakten gebruik van het Freund adjuvans. Werd dit niet toegevoegd, dan trad er geen immuniteit op. Met adjuvans alleen bleek ook een beperkte mate van immuniteit opwekbaar. Als meest waarschijnlijke verklaring voor dit laatste phenomeen namen de auteurs aan, dat het agens in latente vorm aanwezig was bij de gebruikte muizen. Deze behoorden namelijk tot de stam (Balb/c) waaruit het agens oorspronkelijk werd geïsoleerd. Volgens hen moeten we dus aannemen, dat het leukaemogene agens niet via het getransplanteerde lymphoblastoom naar deze muizen was overgebracht, maar er tevoren al in aanwezig was.

Door middel van de immunofluorescentie techniek kon Fink (1963) specifieke antigenen aantonen in lymfoïde tumoren, bij muizen en ratten, geïnduceerd met het door Rauscher geïsoleerde agens. De specifieke fluorescentie werd hierbij vooral in de cellkernen, en in veel mindere mate in het cytoplasma der tumorcellen gezien. Eveneens werd bij geïnfecteerde dieren fluorescentie gevonden in de kernen van normale megakaryocyten.

Electronenoptische onderzoeken werden verricht door Dalton (1962) en Zeigel en Rauscher (1963) Dalton onderzocht weefsels en bloedplasma van muizen in de eerste en tweede phase der ziekte. Reeds in de eerste phase werden zowel in het bloedplasma als in de cytoplasmavacuolen van ogenschijnlijk normale beenmergmegakaryocyten een groot aantal virusachtige partikels van het type C gevonden (classificatie volgens Bernhard 1958, zie blz. 7). In de kernen werden zij niet waargenomen. In de tweede phase werden de partikels ook intercellulair gevonden in de lymfoïde tumoren. Bovendien kwamen hier zowel type A als type C partikels voor, die aan de buitenzijde met de kernmembraan verbonden waren. Zeigel en Rauscher toonden met negatieve kleuring aan, dat de viruspartikels waren opgebouwd uit een hexagonaal kopgedeelte met een diameter van ongeveer 120 m μ . en een staart die maximaal 500 m μ . lang was. Een dergelijk beeld werd ook waargenomen bij het agens, geïsoleerd door Moloney (zie blz. 31).

Uit onderzoeken van Peries en medewerkers (1964) bleek, dat het Rauscher agens zich *in vitro* vermenigvuldigde in muizeniercellen. Zij kweekten niercellen van Balb/c muizen, die zeven dagen tevoren met het agens waren ingespoten. Het bleek mogelijk om met de kweekvloeistof van twintig maal ververste cultures leukaemieën te induceren bij pasgeboren muizen. In de celkweeken werd geen cytopathogeen effect waargenomen. De latentieperiode was echter vrij lang vergeleken met de muizen, die met het niet

gekweekte agens waren ingespoten. Bovendien trad geen ruptuur van de milt op, zodat de meeste dieren de eerste fase van het ziekteproces overleefden. Zij bleken na 2^{1/2} tot 3^{1/2} maand leukaemie te krijgen. Kennelijk was het agens in de kweekvloeistof dus in een betrekkelijk lage concentratie of in verzwakte vorm aanwezig.

Zoals reeds vermeld bleek uit het onderzoek van Rauscher, dat de eerste fase van de ziekte, die met zijn agens bij muizen werd geïnduceerd gekenmerkt was door een sterke zwelling van milt en lever, veroorzaakt door een toegenomen haemopoiese (Rauscher 1962). Deze toename betrof vooral het rode systeem en tevens verschenen een groot aantal kernhoudende rode cellen in het perifere bloed. Naast de erythroblastose werd in het bloed ook een leukocytose gevonden. Hierover is Rauscher echter vaag in zijn publicatie en hij deelt niet mee welke celtypen erbij betrokken waren. In de lymfklieren, waarin bij jonge muizen onder normale omstandigheden vaak enige haemopoiese gevonden wordt, bleek volgens Rauscher voornamelijk de activiteit van het granulocytopenoietische systeem verhoogd. Dit ging meestal gepaard met een geringe lymfklierzwelling. In de thymus werden aan het einde van deze eerste fase, behalve schorsatrofie, geen afwijkingen gevonden.

De snelheid, waarmee de veranderingen tot stand kwamen, hing enerzijds af van de gebruikte stam en diersoort en anderzijds van de dosisgrootte en de leeftijd waarop het agens werd toegediend. Bij ratten bleek de top der haemopoiese lager te liggen en later bereikt te worden dan bij de meeste muizenstammen. Ook trad geen miltruptuur op (Swan 1964, 1966). Zonder duidelijke overgang werd de tweede ziektephase bereikt. Er traden lymfoïde tumoren op in thymus, milt en lymfklieren. Verder werden pathologische lymfoïde celhaarden gevonden in verschillende andere organen, zoals longen, nieren en lever. In de lever bleken de tumorcelhaarden vooral in het periportale weefsel gelocaliseerd. Ook in het bloed werd meestal een groot aantal maligne lymfoïde cellen aangetroffen.

Siegler en Rich (1964) bestudeerden de opeenvolgende histologische veranderingen bij muizen (Balb/c), die op de leeftijd van vier tot zes weken met het agens waren geïnjecteerd. Na enkele dagen namen zij in de rode miltpulpa een multifocale proliferatie van reticulumcellen waar. Na ongeveer twee weken trad ook een verhoogde erythropoiese op, hetgeen gepaard ging met een aanzienlijke vergroting van de milt. Dit orgaan werd 30 à 40 maal zwaarder. Hoewel er bij deze muizen, waarschijnlijk doordat ze vrij lang na de geboorte werden ingespoten, geen miltruptuur optrad, bestonden er naast de beschreven celproliferatie necrose-haarden en haemorrhagieën in de rode pulpa. In de leversinusoïden en in het perifere bloed werd een groot aantal kernhoudende cellen van het rode systeem aangetroffen. Op het tijdstip dat de veranderingen

gen in de milt een hoogtepunt hadden bereikt, toonden beide thymuskwabben (zoals Rauscher ook had gevonden) een duidelijke atrophie, waarbij een depletie van schorslymphocyten op de voorgrond stond. Ongeveer 2½ maand na de injectie werd in de thymus een woekering van lymfoïde cellen aangetroffen, die leidde tot verdwijning der praeëxistente schors-merg verdeling. De onderzoekers beschouwden deze celwoekering als het begin van het maligne proces, en dus als het begin van de tweede phase. In een aantal gevallen bleken de maligne veranderingen tot één kwab beperkt te zijn. Soms was de hele thymus in het maligne proces betrokken en breidde dit zich uit in het mediastinum. Dit zijn dus dezelfde veranderingen, die bij muizen optraden na toediening van het Gross virus (Goodman en medewerkers 1963) en van het Moloney virus (Dunn 1961).

Levy c.s. (1965) verkregen echter andere resultaten. Zij dienden het Rauscher agens kort na de geboorte toe aan Wistar ratten en aan C57/Black- en Balb/c muizen. Deze laatste waren ook door Siegler en Rich gebruikt. In het tweede stadium der geïnduceerde ziekte traden bij de muizen geen lymfoïde tumoren op, zoals door Rauscher gezien was, doch tumoren van de granulocytopoietische reeks in het beenmerg, die overgingen in een myeloïde leukaemie. Een enkele maal toonde deze het beeld van een chloroleukaemie. Soms waren zowel het granulocytopoietische als het erythropoietische systeem bij deze celwoekering betrokken. De eerste verandering in het beenmerg was een rijpingsremming. Deze werd gevolgd door een woekering van de onrijpe cellen, die aanvankelijk tot het beenmerg beperkt bleef. Later breidde het proces zich uit over het gehele organisme en ontstond een myeloïde leukaemie. Ook in de thymus werden granulocytopoietische celhaarden aangetroffen. Zij werden echter voornamelijk rond de bloedvaten gevonden. De thymus was bovendien nooit vergroot, maar toonde daarentegen atrophie.

Bij alle ingespoten ratten werden door Levy en medewerkers weer wel lymfoïde tumoren waargenomen. Deze gingen meestal over in een lymfatische leukaemie. Steeds bleek de thymus vergroot, en soms bleef het maligne proces tot het mediastinum beperkt, terwijl leukaemische veranderingen in het bloed ontbraken.

Peries en medewerkers induceerden met het in vitro gekweekte agens bij Balb/c muizen, evenals Levy c.s. met het originele niet gekweekte agens, myeloblasten en erythroblastenleukaemieën. Onder de eerste kwamen enkele chloroleukaemieën voor. Verder werden ongedifferentieerde vormen waargenomen. Lymfoïde tumoren werden door de auteurs echter niet gezien.

Swaen (1964, 1966) vond evenals Levy en medewerkers (1965), dat na toediening van het door Rauscher geïsoleerde agens bij ratten in verreweg

de meeste gevallen lymphoïde celwoekeringen ontstonden, die bij deze dieren eveneens voorafgegaan werden door een stadium van verhoogde haemopoïese in milt en beenmerg. Hij diende het agens toe aan pasgeboren Osborne Mendel ratten en gaf een gedetailleerde beschrijving van de veranderingen die in het reticulohistiocytaire systeem optraden.

Eerste phase: De eerste veranderingen van deze phase werden reeds na enkele dagen in de lymphklieren gezien. De kiemcentra ontstonden hier eerder, terwijl de reticulumcelproliferatie gepaard gaande met aanmaak van plasmacellen en lymphocyten duidelijk sterker was dan bij controle dieren van dezelfde leeftijd. In de milt trad na ongeveer 25 dagen een verhoging van de haemopoïese op. Deze toename betrof vooral de erythropoïese. Het hoogtepunt werd 50 à 60 dagen na inspuiting bereikt. In de lever, waarin bij jonge ratten normaliter enige haemopoïese gevonden wordt, verdween de bloedcelvorming op het normale tijdstip. Ook werd geen tijdelijke hyperplasie gezien. In het beenmerg werd daarentegen wel een duidelijke toename der haemopoïese gezien. Deze toename toonde echter geen voorkeur voor een bepaald systeem. In de thymusschors was na ongeveer veertien dagen een verhoging van het aantal macrophagen waargenomen, die gepaard ging met het verdwijnen van corticale lymphocyten. Er trad dus atrophie op, zich in hoofdzaak beperkend tot de schors. De indruk bestond echter, dat ook het merg smaller werd. Opmerkelijk was, dat de schorsatrophie beperkt bleef tot een aantal lobuli en niet diffuus was. Het thymusgewicht bleek na dertig à veertig dagen duidelijk afgenomen te zijn.

De erythropoïetische activiteit in de milt werd na enige tijd weer minder, zonder echter tot het normale niveau terug te keren. Merkwaardig was het, dat tot nu toe geen verandering in de normale celverhoudingen van het periphere bloed opgetreden was.

Tweede phase: Na 60 à 70 dagen werd lokaal in de peripherie van atrophische thymuskwabjes een sterke proliferatie van grote lymphoïde cellen gezien. Deze lymphoïde elementen deelden zich sterk en gingen de nog resterende thymusstructuren vervangen om vervolgens per continuitatem door te groeien in de omgevende weefsels. De bevindingen van Swaen komen op dit punt niet geheel overeen met hetgeen Dunn en Moloney (1961) hadden waargenomen na toediening van het Moloney virus aan Osborne Mendel ratten. Volgens deze auteurs ontstond de maligne celwoekering niet in de thymusschors, doch in het merg. In dit stadium kwamen ook maligne cellen voor in milt, lever, lymphklieren, beenmerg, Peyersche plaques en andere organen zoals longen, nieren en hersenvliezen. Bovendien ontstond er anaemie en werd het bloedbeeld leukaemisch.

De uitbreiding der lymfoïde celwoekering varieerde sterk. In verscheidene gevallen werden ze alleen in de thymus gevonden, zonder dat er uitzwerping van de tumorcellen naar elders had plaats gevonden. Nooit werden tumorcellen buiten de thymus aangetroffen, zonder dat ook in dit orgaan maligne veranderingen aanwezig waren. Blijkbaar waren de lymfoïde cellen in de thymusschors gevoeliger voor tumorinductie met dit agens dan de lymfoïde cellen elders in het lichaam. Binnen de lymphatische tumoren bestond een grote variatie in celgrootte en kernstructuur der maligne cellen. Slechts bij één van de 180 ingespoten dieren kwam een myeloïde celwoekering voor, namelijk een chloroleukaemie.

Bij enkele dieren (ongeveer 10 %) werd in de thymus een ander type neoplasma gezien. Deze tumor ontstond in de uiterst periphere delen of in het merg. De tumorcellen bezaten veel korrelig en eosinofiel cytoplasma en een relatief kleine grofgestructureerde kern. De cytoplasmakorrels toonden een diastase resistente positieve P.A.S. reactie. De cellen lagen vaak dicht opeen, zonder dat er een duidelijke begrenzing zichtbaar was, doch ook kwamen gebieden voor, waar ze duidelijk begrensd bleken te zijn. Plaatselijk waren de tumorcellen spoelvormig en in gewervelde bundels gerangschikt. Volgens Swaen had men hier te maken met tumoren van de epitheliale component der thymus. Tumoren van dit type waren nog niet eerder beschreven na injectie van het Rauscher agens. Het gecombineerde voorkomen van een lymfoïde en een epitheliale tumor in de thymus was niet ongewoon. In de gevallen waar de maligne lymfoïde celwoekering zich ook buiten de thymus verspreid had, werd deze combinatie echter nooit gezien. Swaen meent, dat de lymfoïde tumoren door hun snellere groei en door hun grotere agressiviteit het epitheliale neoplasma overwoekeren. Om het merkwaardige feit te verklaren, dat behalve de lymfoïde tumor ook de epitheliale neoplasmata in de thymus ontstaan, geeft de auteur de volgende suggestie. Wanneer men ervan uitgaat, dat de thymuslymphocyten uit de epitheliale component van de thymus ontstaan, een opvatting die vele aanhangers heeft (Baillif 1949; Auerbach 1963), kan men veronderstellen, dat de veranderingen die tot kwaadaardigheid leiden, primair in het epitheel of tegelijkertijd in het epitheel en de thymuslymphocyten plaats vinden en hierdoor aanleiding geven tot het optreden van beide tumorsoorten.

In de endocriene organen werden bij het onderzoek van Swaen geen veranderingen vastgesteld.

Samenvatting.

Rauscher toonde aan, dat er een leukaemogene virus aanwezig was in lymfatische organen van een Balb/c muis, waarbij een zeer agressief groeiende lymfoïde tumor was getransplanteerd. Deze tumor was oorspronkelijk bij Swiss muizen ontstaan na toediening van Schoolman-Schwartz preparaten. Met het door Rauscher geïsoleerde virus werd evenals met de agentia van Friend en Moleny bij muizen en ratten een ziekte geïnduceerd met een tweefasisch beloop.

De eerste fase bij muizen was gekenmerkt door een sterke toename der haemopoïese, waarbij vooral het erythropoëtische systeem in lever en milt betrokken was. Deze veranderingen gingen vergezeld van een erythroblastose en leukocytose in het perifere bloed. Bij ratten werden in deze fase alleen veranderingen in de milt waargenomen. Ook traden tijdens dit stadium geen veranderingen op in het perifere bloed. Uit het onderzoek van Swaen (1964, 1966) met Osborne Mendel ratten bleek, dat de veranderingen van de milt in de eerste fase niet progressief waren en zelfs na enige tijd weer afnamen. De tweede fase werd gekenmerkt door het optreden van maligne tumoren. Hierbij was vaak sprake van maligne woekeringen van haemopoëtische cellen, die het bloed overstromden, zodat men kan spreken van een leukaemie.

Siegler en Rich (1963) en Swaen (1964, 1966) troffen bij de inductie van lymfoïde tumoren de eerste maligne celwoekeringen in de thymus aan. Deze werden voorafgegaan door een atrophie van de thymusschors. Swaen toonde aan, dat deze atrophie niet overal gelijktijdig in de schors voorkwam en dat de eerste lymfoïde celwoekeringen in de atrophische schorsgebieden gezien werden. Uit dit onderzoek van Swaen bleek verder, dat in de thymus van ratten, behalve maligne woekeringen van lymfoïde cellen, ook epitheliale tumoren optraden.

Voorts is gebleken, dat na toediening van Rauscher preparaten in plaats van maligne lymfoïde celwoekeringen en leukaemieën, myeloïde leukaemieën kunnen ontstaan. Zo verkregen Levy c.s. en Peries en medewerkers bij alle ingespoten Balb/c muizen een myeloïde leukaemie, terwijl Rauscher evenals Siegler en Rich bij dezelfde muizenstam steeds lymfoïde tumoren en leukaemieën zagen optreden.

Volgens Gross (1964b) bestaat er een immunologische verwantschap tussen het leukaemogene agens van Friend en het Rauscher agens. Het electronen-optische beeld van het Rauscher agens toont overeenkomst met dat van de andere tot nu toe besproken leukaemogene virussen. Er zijn echter ook verschillen. In negatief gekleurde preparaten bleek het Rauscher agens opge-

bouwd uit een veelhoekig kopedeelte en een cilindervormige staart. Het Gross agens, dat eveneens op deze wijze is onderzocht, toont, zoals reeds vermeld, deze configuratie niet (zie blz. 35).

Het agens van Rask-Nielsen.

Deze onderzoekster trachtte een bij C B A muizen ontstane en in vitro gekweekte plasmacel tumor te transplanteren bij twee maanden oude bastaardmuizen. Zij slaagde hierin echter niet. Wel trad bij de vrouwelijke dieren amyloïdosis op in vrijwel alle organen en bovendien hyperplasie van de melkklieren.

Wanneer de bastaardmuizen werden ingespoten met een celvrij preparaat van dit hyperplastische mammaweefsel, dan ontstonden er spoedig reticulumcelsarcomen, waaraan de muizen reeds na 25 tot 42 dagen succombeerden (Rask-Nielsen 1963).

Volgens de schrijfster waren deze reticulumcelsarcomen ongedifferentieerd en zeer gemakkelijk te transplanteren. In het serum der muizen, waarbij zich de tumor had ontwikkeld bleken paraproteïnen aanwezig te zijn.

In ultracentrifugaten van plasma en milthomogenaten werden door middel van negatieve kleuring virusachtige partikels gevonden, die een staart bezaten. Rask-Nielsen geeft geen nadere beschrijving van deze partikels, doch de ultrastructuur zou vrijwel identiek zijn met die van het Moloney virus en het virus van Rauscher.

Wanneer men muizen 1½ tot 4½ week tevoren intraperitoneaal inspoot met dergelijke ultrafiltraten, dan bleek de overlevingstijd na subcutane implantatie van tumorcellen significant verlengd. Dit zou erop wijzen, dat met het agens een zekere immuniteit opgewekt werd ten opzichte van de hiermee geïnduceerde tumor. Iets dergelijks is, zoals we gezien hebben, ook aangetoond voor het Graffi- en het Moloney virus (zie resp. blz. 14 en blz. 31).

*Leukaemogene agentia, geïsoleerd uit leukaemieën,
die geïnduceerd zijn door ioniserende stralen.*

Gross (1958c) isoleerde een celvrij leukaemogeen agens uit weefsels van C₃H muizen, bij wie een lymphatische leukaemie was geïnduceerd door middel

van röntgenstralen. Spontane leukaemie komt bij deze muizen zeer zelden voor.

Seriepassage had een aanzienlijke verhoging der leukaemogene werkzaamheid van dit agens tot gevolg (Gross 1959a). De verkregen preparaten duidde Gross aan met „Passage X”.

Lieberman en Kaplan (1959) gebruikten een andere stam (C57/Black), maar verkregen dezelfde resultaten als Gross.

Met „Passage X” preparaten werden bij konijnen antisera verkregen, die niet alleen ten opzichte van „Passage X”, maar ook ten opzichte van „Passage A” preparaten van Gross een neutraliserend effect toonden (Gross 1964a).

Jenkins en Upton vermeldden in 1962, dat zij een celvrij leukaemogeen filtraat hadden verkregen uit weefsels van R.I.F. muizen, waarbij door röntgenstralen een myeloïde leukaemie was geïnduceerd. In deze muizenstam treedt leukaemie slechts zelden spontaan op. Indien zij dit filtraat inspotten bij muizen van dezelfde stam, trad eveneens een myeloïde leukaemie op.

Bespreking der literatuurgegevens.

Uit de voorafgaande bladzijden is gebleken, dat een betrekkelijk groot aantal leukaemogene agentia verkregen is uit weefsels van muizen. In het algemeen wordt aangenomen, dat men met virussen te maken heeft en wel op grond van de volgende eigenschappen. De agentia zijn: 1) ultrafiltreerbaar, 2) ultracentrifugeerbaar, 3) thermolabiel, 4) te isoleren uit organen van dieren aan wie ze zijn toegediend, 5) in serie overentbaar bij geschikte proefdieren, 6) in vitro kweekbaar en 7) in staat specifieke immuniteit op te wekken bij geïnfecteerde dieren.

Merkwaardig is, dat een aantal der besproken virussen van zo sterk uiteenlopende weefsels afkomstig is (zie Bijlage).

Er zijn leukaemogene virussen geïsoleerd uit weefsels van leukaemische muizen. Hiertoe behoren de „Passage A” en „Passage X” virussen van Gross, een der preparaten van Graffi, het Schoolman-Schwartz virus en het virus van Rauscher. Gross bereidde het „Passage A” virus uit leukaemische organen van muizen, die behoren tot een stam, waarin leukaemie zeer frequent spontaan voorkomt. Uit zijn onderzoekingen bleek, dat met celvrije preparaten van zowel embryonen als van geslachtsklieren van gezonde jonge dieren van deze

stam ook leukaemieën konden worden geïnduceerd. Het lijkt dus voor de hand te liggen, dat virussen een aetiologische rol spelen bij de zogenaamde spontane leukaemieën bij muizen.

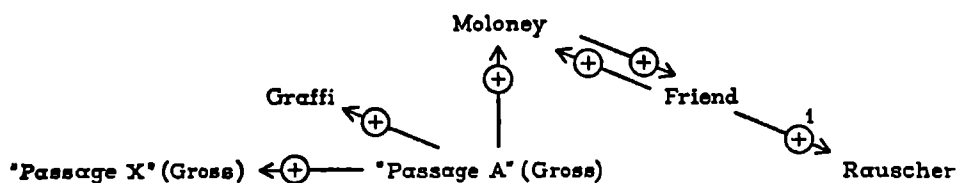
Andere virussen waren afgezonderd uit reticuluncelsarcomen (een der Graffi preparaten) en plasmacytomen (de virussen van Breyere-Moloney en van Rask-Nielsen).

Behalve virussen geïsoleerd uit bepaalde lijnen van het Ehrlich carcinoma, zoals een der preparaten van Graffi en het virus van Stansly, zijn er celvrije leukaemogene preparaten bereid uit een polymorphocellig sarcoma (S37). Tot de laatste behoort, behalve de preparaten van Moloney en Bather, weer een der Graffi preparaten. Het virus van Friend werd aangetoond bij muizen, bij wie zonder succes een Ehrlich ascites tumor was getransplanteerd. Het is zeer waarschijnlijk, dat de virussen geïsoleerd uit deze niet reticulaire tumoren geen aetiologische relatie hebben met deze neoplasmata, maar beschouwd moeten worden als toevallige „gasten”, die zich in de tumoren kennelijk gemakkelijk vermenigvuldigen.

Er is geen correlatie tussen de morphologische veranderingen, die de virussen teweegbrengen en het weefsel waaruit ze zijn bereid. Zowel agentia geïsoleerd uit leukaemisch weefsel als virussen uit de getransplanteerde carcinomen en sarcomen induceren leukaemieën van morphologisch geheel vergelijkbaar type. Dit wordt zeer duidelijk gedemonstreerd door de verschillende celvrije preparaten van Graffi. Deze onderzoeker verkreeg bij muizen en ratten eenzelfde type leukaemie met zowel preparaten bereid uit het Ehrlich carcinoma, het Sarcoma 37, als uit reticuluncelsarcomen (Landschutz Sarcoma I en II). Volgens Graffi kwam in elk der verschillende preparaten hetzelfde virus voor.

Op grond van de sterke overeenkomst tussen de geïnduceerde tumoren veronderstelt Gross, dat er in wezen slechts één leukaemogeen virus bestaat. Hij noemt dit agens „Leukemia virus type A”. Van dit virus komen volgens hem verscheidene varianten voor. De veronderstelling van Gross wordt gesteund door de, afgezien van kleine variaties, onderling vrijwel identieke fysische eigenschappen der uit verschillende bron verkregen agentia. Verder pleit hiervoor ook de immunologische verwantschap, die blijkt te bestaan tussen een aantal der besproken virussen (zie figuur 1). Als een apart virus beschouwt Gross het „Friend disease inducing agent”. Dit virus kan volgens hem als contaminant aanwezig zijn. In de preparaten van Friend en van Rauscher komt dit agens volgens Gross in hoge concentratie voor.

FIGUUR 1.



Overzicht van de immunologische relaties tussen de leukaemie virussen voor zover bekend. Alle antisera zijn verkregen bij konijnen. Het virus, dat als antigeen gebruikt is, staat vermeld aan het begin der pijlen. De pijlen wijzen naar het agens, dat in *vitro* door het antiserum wordt geneutraliseerd.

1 Alleen remming van de haemopoietische phase.

De genetische samenstelling van de gastheer speelt een belangrijke rol bij het celtype van het neoplasma, dat door een leukaemie virus wordt geïnduceerd. De morphologische veranderingen, die optreden na injectie van een leukaeomogeen virus zijn niet voor alle agentia even uitvoerig onderzocht. Op grond van de verschillende gegevens komt een patroon naar voren, dat we nog even willen schetsen.

Men kan twee fasen onderscheiden n.l.:

- 1) Een hyperplasie van het haemopoietische stelsel. Deze uit zich in een vergroting van milt en lever. De toename der haemopoiese gaat niet steeds gepaard met veranderingen in het perifere bloed.
- 2) De ontwikkeling van het maligne proces. Dit kan lokaal blijven of zich uitbreiden over het hele organisme.

In de tweede phase schijnt de thymus vaak een bijzonder belangrijke rol te spelen. Niet steeds zijn beide fasen even gemakkelijk te onderscheiden. Soms vallen ze voor een deel samen. Soms lijkt de eerste phase te ontbreken. Volgens de opvattingen van Gross is het „Friend disease inducing virus” verantwoordelijk voor de eerste phase, terwijl het „Leukemia virus type A” de veranderingen der tweede phase induceert.

Gross (1956b, 1958a) meent, dat muizen een latent leukaemie virus herbergen. Het viraal nucleïnezuur zou volgens hem opgenomen zijn in het celgenoom. Als „parasitair gen” zou het via de geslachtscellen van generatie op generatie worden overgedragen. Volgens de opvatting van Gross wordt dus met het virus nieuw genetisch materiaal aangevoerd en opgenomen in het genoom van de gastheercel. Men spreekt in dit verband van transformatie van

de cel (Potter 1964). Als model voor deze transformatie wordt de lysogene bacterie opgevat. Onder geëigende omstandigheden veroorzaken bacteriophagen namelijk geen lysis van de bacterie, maar worden zij opgenomen in het genoom van de bacterie en overgedragen op de afstammelingen (Lwoff c.s. 1950).

ENKELE EXPERIMENTEN MET HET RAUSCHER VIRUS

HOOFDSTUK II

VRAAGSTELLING EN ALGEMENE GEGEVENS

In het voorafgaande hebben we gezien, dat na toediening van leukaemogene virussen bij muizen en ratten een ziekteproces kan optreden met een tweefasisch beloop.

In de eerste phase staat de vergroting van de milt op de voorgrond, die veroorzaakt wordt door toename der haemopoiese. Een miltruptuur kan tot de dood leiden (Friend 1957; Rauscher 1963). Swaen (1964, 1966) toonde bij ratten aan, dat de miltzwellling niet steeds progressief was, en na enige tijd weer kon afnemen.

De tweede phase is gekenmerkt door het optreden van maligne afwijkingen. Vaak ontstaan lymphoïde neoplasieën. Bij deze laatste schijnt de thymus een belangrijke rol te spelen (Goodman c.s. 1963; Swaen 1964, 1966; Siegler en Rich 1964). Het ligt dus voor de hand na te gaan welke invloed splenectomie en thymectomie hebben op de tumorgenese na injectie van een leukaemie virus. Nagegaan werd het effect van splenectomie en thymectomie zowel vóór als na de toediening. Deze proeven zullen in de volgende hoofdstukken worden besproken.

Om practische redenen was het niet mogelijk de experimenten gelijktijdig uit te voeren. Er werd echter getracht de omstandigheden zoveel mogelijk gelijk te houden. De factoren, die hiervoor van belang waren, zullen om herhalingen te voorkomen, in dit hoofdstuk worden besproken. Ook zullen de bevindingen, voor zover deze bij de diverse experimenten overeenkwamen, hier worden vermeld.

Proefdieren.

Als proefdieren werden Osborne Mendel ratten gebruikt. Deze waren afkomstig van een twaalftal dieren, die door toedoen van Rauscher en Swaen verkregen waren van het „National Cancer Institute” te Bethesda U.S.A. De Osborne Mendel ratten werden aldaar sedert jaren onderling gekruist zonder dat er ratten van een andere bron bij werden gebracht. Zij waren dus onderling sterk verwant, maar behoorden niet tot een zuivere stam in de juiste

betekenis van het woord. De keuze van deze rat werd bepaald door het feit, dat Rauscher en Swaen ook de Osborne Mendel stam hadden gebruikt, zodat vergelijking der proeven met hun experimenten beter mogelijk was.

De pasgeboren dieren bleven vier weken bij de moeder en werden dan gespeend. Mannelijke en vrouwelijke ratten werden gescheiden gehouden. Iedere kooi bevatte zes tot zeven dieren. Nooit werden ratten, die met het virus waren ingespoten in één kooi samengebracht met niet ingespoten dieren. Moederdieren, die jongen hadden gevoed aan wie het virus was toegediend, werden gedood nadat de jongen waren gespeend.

In de Osborne Mendel stam treden zelden spontaan tumoren op. Bij 100 ratten, die gedurende 24 maanden werden geobserveerd, kwamen deze nooit voor binnen de leeftijd van 1 jaar. Bij 2 oudere dieren werd een mamma-carcinoom gevonden. Spontane woekeringen van reticulair cellen of daarvan afgeleide elementen werden niet waargenomen.

Er kwam bij deze ratten regelmatig een matig aantal pneumoniegevallen voor. Deze traden op omstreeks de derde maand. Meestal was deze ziekte niet fataal, maar werd ze chronisch. Resten in de vorm van abscessen werden bij oude ratten gevonden. Dit type pneumonie wordt ook in andere rattenstammen aangetroffen en men meent, dat ze veroorzaakt worden door een mycoplasma.

De dieren bevonden zich in een vertrek, waarvan temperatuur en vochtigheid constant werden gehouden. De kooien waren van metaal en hadden losse bodems. Het voedsel bestond uit R.M.H. geperste korrels en kraanwater ad libitum.

Virus.

Als leukaemogeen agens werd het Rauscher virus gebruikt. Dit was afkomstig van het „National Cancer Institute” te Bethesda U.S.A. De preparaten waren door Rauscher bereid en in koolzuursneeuw naar Nederland opgestuurd. Bij aankomst was steeds nog vaste koolzuur aanwezig. Na ontvangst werden de ampullen bij -90°C . bewaard in een mengsel van propyleenglycol en vaste koolzuur. De ampullen bevonden zich steeds in de vloeistof. Het virus was reeds verscheidene malen in serie overgeënt in de Osborne Mendel stam. Rauscher bereidde de preparaten als volgt:

Gezwollen organen van leukaemische dieren werden steriel verwijderd en onder toevoeging van steriele physiologische zoutoplossing fijngemaakt in een homogenisator (omnimix). De aldus verkregen suspensie werd gedurende 20 minuten gecentrifugeerd bij $18.000 \times g$. Het middelste $2/3$ deel der bovenstaande vloeistof werd afgepipetteerd en gedurende 20 minuten gecentrifugeerd bij $23.000 \times g$ om de zware celbestanddelen te verwijderen. Hierna werd het

virus gesedimenteerd (30.000 x g gedurende 60 minuten). Het sediment werd tenslotte gesuspenseerd in een oplossing van 0,05 M kaliumcitraat en bewaard in glazen ampullen.

Om praktische redenen was het niet mogelijk alle proeven met één en hetzelfde viruspreparaat uit te voeren. Wel werd voor iedere proef één en dezelfde charge gebruikt. Kort voor het gebruik werd de inhoud der benodigde ampullen bij kamertemperatuur ontdooid. Hierna werd het preparaat 1:3 verdund met steriel fysiologisch zout. Indien voor een proef verscheidene ampullen nodig waren, werd de inhoud daarvan samengebracht vóór het verdunnen. Het verdunde preparaat werd intraperitoneaal ingespoten.

Om terugvloeiën te voorkomen werd de injectie verricht via een lang subcutaan insteekkanaal. Het wondje werd niet afgedekt. De diertjes werden terstond bij de moeder teruggebracht.

Uit andere proeven was gebleken, dat de gevoeligheid der ratten voor dit tumorvirus merkbaar afnam wanneer het werd toegediend na de leeftijd van 3 tot 4 dagen. Werde het virus ingespoten bij dieren, die ouder waren dan 14 dagen, dan ontwikkelde zich nog slechts sporadisch een reticulaire tumor. Een dergelijk neoplasma werd waargenomen bij 2 van de ongeveer 200 ratten bij wie het virus na deze leeftijd was ingespoten. De dieren waren gedurende 2 jaren geobserveerd. Met deze bevindingen moest rekening worden gehouden bij de opstelling der proeven. Het virus werd nooit ingespoten bij dieren, die ouder waren dan 4 dagen. De tijdstippen, die in de diverse tabellen en grafieken zullen worden vermeld geven steeds aan het aantal dagen volgend op de datum der virusinjectie.

Statistisch bleek het geslacht geen aantoonbare invloed te hebben op de tumorinductie.

Splenectomie en thymectomie.

De techniek der operaties zal in de betreffende hoofdstukken worden besproken.

Een aantal ratten stierf als direct gevolg van de operatie. Verder gingen er dieren verloren door kannibalisme en pneumonieën. Voor elk der proeven werd van zoveel ratten uitgegaan, dat verwacht mocht worden, dat er ondanks deze complicaties per proefgroep 30 tot 40 zouden overblijven. Dit aantal verdiende de voorkeur in verband met de statistische bewerking der resultaten. De dieren van één nest werden niet gelijkmatig over de diverse proefgroepen verdeeld. Dit leek overbodig omdat tijdens andere proeven (Swaen 1964; Van Gorp en Swaen 1964) geen duidelijk verschil werd aangetoond tussen de nesten onderling in gevoeligheid voor dit tumorvirus. Wel werd bij de

diverse proeven steeds uitgegaan van een ongeveer gelijk aantal nesten voor de samenstelling van elk der groepen.

Pathologie.

De dieren werden met aether gedood wanneer zij duidelijke ziekteverschijnselen toonden, zoals bloedinkjes op de oogleden, anaemie, ernstige vermagering, incontinentie, paralyse der achterpoten en dyspnoe. Ondanks dagelijkse controle stierf toch ongeveer 15 % der ratten onverwacht aan de ziekte. Het proces gaf dus kennelijk vrij dikwijls aanleiding tot slechts weinig fysieke symptomen. Alvorens de dieren te doden werd via een hartpunctie bloed afgenomen. Hier van werd meestal de haematocrietwaarde bepaald. In een aantal gevallen werd het leukocytengetal nagegaan. Verder werden meestal uitstrijkpreparaten vervaardigd. Onmiddellijk na de dood werd obductie verricht. Thymus en milt werden gewogen. Van deze organen werden deppreparaten gemaakt, die evenals de uitstrijkpreparaten van het bloed werden gekleurd volgens May-Grünwald Giemsa. Thymus, milt, Peyersche plaques, diverse lymphklieren, lever, beenmerg (sternum), longen, nieren en hersenen werden geheel of gedeeltelijk in Zenker formaline gefixeerd en tot histologische coupes (8 μ) verwerkt. Als routine werd de haematoxyline-eosine kleuring toegepast.

Er werden bij de ingespoten ratten maligne woekeringen gezien van zowel de lymphatische- als van de granulocytaire reeks. Bij 180 (56 %) van de in totaal 324 ingespoten ratten, betrokken bij de experimenten die in de volgende hoofdstukken zullen worden besproken, werd een lymphocytair neoplasma gevonden. Bij 21 (6 %) van deze dieren ontstond een granulocytaire tumor.

Maligne woekeringen der lymphocyttaire reeks.

Macroscopisch werd steeds een lymphklierzwellling waargenomen. Vooral waren de mediastinale, cervicale, retroperitoneale en mesenteriale lymphklieren vaak gezwollen. Bij de dieren, bij wie milt of thymus niet waren verwijderd, werd zeer frequent een vergroting van deze organen gezien. Dat de tumor van de thymus was uitgegaan, was te zien doordat de vorm van dit orgaan in grote trekken bewaard was gebleven. Steeds was het gezwel opgebouwd uit twee kegelvormige kwabben, waarvan de top in het bovenste mediastinum was gelegen. Het gewicht van de thymus was ongeveer 3 tot 40 maal verhoogd. Het miltgewicht was omstreeks 2 tot 20 maal toegenomen. Niet zelden was er een hepatomegalie.

De gezwollen thymus vulde soms de gehele thoraxholte op. Een deel van oesophagus, trachea, grote vaten en hartbasis bleken dan in de tumor opgenomen te zijn.

Aan het oppervlak van milt en nieren kwamen niet zelden grijswitte, soms licht verheven, enkele millimetersgrote vlekjes voor. Soms werden ook op het schedeldak grijze verdikkingen gezien. Subpleuraal, op het periost en subcutaan werden frequent puntvormige bloedinkjes aangetroffen.

Bij microscopisch onderzoek bleek er een sterke variatie te bestaan in grootte en kernstructuur der cellen. Soms leken ze meer op rijpe lymphocyten, soms op zeer jonge lymphatische cellen, die zeer nauw verwant waren of mogelijk zelfs identiek met reticulumcellen. De meeste tumoren toonden een rijpingsgraad, die tussen deze celtypen in lag. Bij de bestudering van de cytologische details bleken de met May-Grünwald Giemsa gekleurde deppreparaten van thymus en milt een zeer belangrijk hulpmiddel te zijn.

De thymus was meestal geheel doorwoerd met lymphoïde cellen, zodat de oorspronkelijke structuur niet meer was te herkennen. Soms was er nog een aanduiding van een kapsel, doch deze werd op vele plaatsen door de tumor doorbroken. Vaak had er uitbreiding plaats gevonden in het omgevende vetweefsel, de spieren langs de wervelkolom, de pleurae, het pericard en enkele malen zelfs in de thoraxwand. Enkele malen varieerde het beeld van de thymus sterk van plaats tot plaats. Naast atrophische kwabjes kwamen gezwollen lobuli voor, die diffuus met lymphoïde cellen waren doorwoerd. Bij een deel van deze bleef de tumor binnen de kapsel beperkt (zie afb. 1 en 2).

In de lymphklieren kwamen de maligne celwoekeringen voor in schors en merg, maar de lymphfollikels waren soms nog te herkennen. Ook hier was uitbreiding in kapsel en omgevende weefsels niet ongewoon.

De milt toonde vaak nog herkenbare lymphfollikels. Zij waren vergroot. De rode pulpa was diffuus doorwoerd met tumorcellen, doch verspreid waren nog haemopoietische hardjes aanwezig, waarin vooral het grote aantal megakaryocyten imponeerde. De kapsel werd door de tumorcellen geïnfiltreerd en ook woekerden deze langs de hilusvaten naar buiten.

In de lever was vooral het periportale weefsel geïnfiltreerd. De driehoekjes van Kiernan waren vergroot en zeer celrijk. Vaten en galwegen bleven intact. Herhaalde malen echter kwamen de tumorcellen in het parenchym voor, waar ze soms grote velden en strengen vormden, die de leverbalkjes verdrongen.

De Peyersche plaques waren gezwollen door proliferatie van lymphoïde cellen, die de mucosa en muscularis infiltreerden en voortwoekerden in de subserosa. Ook hier waren de lymphfollikels soms nog te herkennen.

De mergholten van het sternum waren diffuus met lymphoïde cellen doorwoerd en verwijd door atrophie van beenbalkjes en corticalis. Verspreid werden nog haemopoiese resten gevonden, waarin evenals bij de milt, het

betrekkelijk groot aantal megakaryocyten opviel. De tumorcellen infiltreerden het periost en de daarnaast gelegen spieren via de adventitia der intredende vaten. Soms bleek de corticalis van het bot over grote afstanden verdwenen te zijn (zie afb. 3).

In de longen werden de tumorhaarden vaak peribronchiaal en perivasculair gezien. Soms strekten zij zich over grote afstanden subpleuraal uit. De alveolaireschotten waren meestal in geringe mate diffuus verdikt, door ophoping van lymfoïde cellen (zie afb. 4 en 5). Niet zelden bleek, dat de tumorcellen per continuitatem vanuit de thymus de longen waren binnengegroeid. Dat vond plaats via de hilus en transpleuraal.

De lymfoïde celhaarden kwamen in de nieren vooral voor in het interstitium en het peripelvaire vet. Soms ging dit gepaard met verlies van het parenchym, maar in het algemeen werd dit evenals de vaten gespaard. Een enkele maal werden de lymfoïde cellen in de glomeruli aangetroffen (zie afb. 6).

In de hersenen zelf werden geen tumorhaarden gezien. Wel toonde de leptomeninx betrekkelijk vaak diffuse verdikkingen door ophopingen van lymfoïde elementen. Deze zetten zich langs vaten voort naar centraler gelegen gebieden (zie afb. 7).

Van enkele ratten met paralyse en incontinentie werd de lumbale wervelkolom histologisch onderzocht. Rond het myelum waren dichte ophopingen van tumorcellen aanwezig, die zich langs zenuwen een eindweegs buiten de wervelkolom voortzetten. Zij bereikten het ruggemergkanaal vanuit de mergholten der wervels. De corticalis der wervels bleek over grote afstanden verdwenen te zijn.

In de uitstrijkpreparaten van het periphere bloed werden frequent onrijpe lymfoïde cellen aangetroffen, die voor een deel gemakkelijk laedeerbaar waren en daardoor leken op de z.g. „Gumprecht'se Schollen”, die bij patiënten met lymphatische leukaemie worden gezien (zie afb. 8). Niet alle ratten, waarbij maligne lymfoïde celwoekeringen aanwezig waren, toonden een leukaemisch bloedbeeld. De haematocrietwaarden waren vaak sterk afgenomen. Deze varieerden van 9 tot 35 (normaal 40 tot 50). In deze gevallen bleek het beenmerg steeds doorwoekerd te zijn met tumorcellen. In enkele gevallen werd nagegaan of de anaemie een haemolytisch karakter had. De Coombs test bleek steeds negatief te zijn.¹

Bij de afzonderlijke bespreking der verschillende proeven zal de uitbreiding

¹ Dit onderzoek werd uitgevoerd op het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Ned. Rode Kruis te Amsterdam. Hoofd Prof. Dr. J. J. van Loghem jr.

der lymphoïde celwoekeringen in de diverse organen en de frequentie der leukaemische bloedveranderingen in tabellen worden weergegeven.

Maligne woekeringen van de granulocytopoietische reeks.

Hiertoe werden de gevallen gerekend, waarbij infiltratieve woekeringen werden gevonden van granulocytaire elementen. Behalve in het beenmerg werden dergelijke celwoekeringen gevonden in milt, lever, lymphklieren, thymus, Peyersche plaques, longen en nieren. Steeds kon in minstens één dezer localisaties een duidelijke infiltrerende groei geconstateerd worden. Differentiatie ten opzichte van een sterke vorm van extramedullaire haemopoïese berustte op het vóórkomen van de celhaarden in weefsels waarin normaliter nooit haemopoïetische activiteit wordt gevonden, zoals bv. in skeletspieren en speekselklieren. Verder kon men het proces van extramedullaire haemopoïese onderscheiden door het vrij uniforme karakter der celproliferatie. De verschillende cellen toonden een ongeveer gelijke rijpingsgraad.

Zoals reeds vermeld werd dit type tumor, vergeleken met het lymphocytair neoplasma, betrekkelijk zelden waargenomen.

Macroscopisch werd bij alle niet gesplenectomeerde dieren een vergrote milt aangetroffen. Niet zelden waren een aantal lymphklieren en de lever gezwollen. Soms waren thymus, nieren en plaques van Peyer vergroot. De thymuszwelling was steeds slechts gering. Opvallend was de bleekgele tint der lymphatische organen. In één geval waren deze grasgroen.

De mergholten van het sternum waren diffuus doorwoekerd met granulocytaire elementen. Beenbalkjes en corticalis waren atrophisch. De erythropoïese was sterk teruggedrongen of vrijwel verdwenen. Diffuus verspreid werden nog opmerkelijk veel megakaryocyten gezien. In verscheidene gevallen breidde de celwoekering zich uit in periost en omgevende spieren.

In de milt kwamen de tumorcellen voor in rode en witte pulpa. Een deel der lymphfollikels was door de celwoekering vervangen. In de rode pulpa was de erythropoïese teruggedrongen. Ook hier kwamen diffuus verspreid nog opmerkelijk veel megakaryocyten voor. Niet zelden breidde de tumor zich uit in de kapsel en het verweefsel, dat de hilusvaten omgeeft.

In de lever kwamen de granulocytaire haarden steeds voor in het periportale weefsel. Slechts nu en dan werden ze tevens in de sinussoïden aangetroffen. Soms waren zeer onrijpe, op reticulumcellen gelijkende elementen in de meerderheid. In deze gevallen vormden de tumorhaarden brede velden en strengen, die de leverbalkjes uiteendrongen. De Kiernansche driehoekjes waren zeer celrijk en vergroot. Nu en dan werden galgangen en vaatwanden

aangetast. Wat de uitbreiding in dit orgaan betreft, onderscheidde dit type tumor zich dus, anders dan bij de mens het geval is, meestal niet van het lymphocyttaire neoplasma.

De praeëxistente structuren der lymphklieren waren geheel of voor een belangrijk deel vervangen door een dichte woekering van granulocyttaire elementen. Infiltratie van kapsel en omgevende weefsels was niet ongewoon (zie afb. 9).

De thymus toonde steeds een sterke atrophie. De schors-merg verdeling was geheel verdwenen. De granulocyttaire haarden werden vooral aangetroffen in de periphere delen en pericapsulair. Soms kwamen ze centraal voor, gelocaliseerd rond bloedvaten.

In de Peyersche plaques kwamen de tumorcellen meestal haardsgewijs voor. Soms hadden ze het lymphatische weefsel voor een belangrijk deel vervangen en werd uitbreiding gezien in mucosa, muscularis en subserosa.

De alveolairschotten der longen waren licht verbreed door ophopingen van granulocyttaire elementen. Ook kwamen deze voor in het lymphatische weefsel, dat in dit orgaan peribronchiaal en subpleuraal aanwezig is.

Nu en dan werden de tumorcellen gevonden in het slijmvlies van bronchi, trachea en larynx.

De tumorcellen kwamen in de nieren voornamelijk interstitieel voor. Soms werden ze in het peripelvaire vet aangetroffen en in de pyelumwand.

De hersenen toonden nooit duidelijke afwijkingen.

Van geen der 22 ratten met een granulocytair neoplasma werd het aantal leukocyten quantitatief bepaald. Wij beschikten over een bloeditstrijk van 15 dieren. In 4 gevallen bleek er een duidelijke leukocytose te bestaan, waarbij vrijwel alle kernhoudende bloedcellen bestonden uit myelocyten (zie afb. 10). Bij 16 ratten werd de haematocrietwaarde bepaald. Deze was duidelijk verlaagd bij 13 dieren. De waarden varieerden van 9 tot 21 (normaal 40 tot 50).

Osteomyeloreticulose.

Bij 5 (1,5 %) der 324 ingespoten ratten werd een zg. osteomyeloreticulose waargenomen.

In de coupes door het sternum bleken corticalis en bestaande beenbalkjes verbreed te zijn. Tevens werden nieuwgevormde beenbalkjes gevonden. In het beenmerg werden zowel abnormaal celrijke gebieden als celarme fibreuse partijen aangetroffen. Soms was te zien, dat het bindweefsel overging in de jonge beenbalkjes. Het bindweefsel vormde een netwerk, dat als het ware het patroon der toekomstige beenvorming weergaf (zie afb. 11 en 13). Het was

in de coupes uiteraard niet mogelijk om alle beenmergcellen te classificeren. Soms waren er veel onrijpe elementen aanwezig, die sterke gelijkenis toonden met reticulumcellen. Er kwam een groot aantal reuscellen voor met eosinofiel cytoplasma en 3 tot 8 hyperchromatische kernen. Zij deden sterk denken aan pathologische megakaryocyten (zie afb. 12). In de zilverimpregnatie werden, vaak in de omgeving van een aantal nieuwgevormde botbalkjes, veel reticuline vezels aangetroffen (zie afb. 14). In de lever, in een aantal lymphklieren en bij de dieren, waarbij dit orgaan niet was verwijderd ook in de milt, werd een duidelijk verhoogde haemopoiese aangetroffen. Bij deze haemopoiese waren zowel de granulocyttaire als de erythropoietische celreeks betrokken, terwijl ook de indruk bestond, dat het aantal megakaryocyten groter was dan bij ratten onder normale omstandigheden in deze organen wordt gezien. Soms waren veel onrijpe, op reticulumcellen gelijkende elementen aanwezig (zie afb. 15 en 16). In de zilverimpregnatie werden tussen de haemopoietische cellen nieuwgevormde reticuline vezels gevonden. Soms was de haemopoietische activiteit ook aanwezig in de perifere delen van de thymus en in het pericapsulaire gebied van dit orgaan. De haematocrietwaarde was steeds sterk gedaald. Het totale beeld toonde sterke overeenkomsten met de osteomyeloreticulose bij de mens. In 3 gevallen ging deze afwijking gepaard met infiltrerende granulocyttaire woekeringen. Bij één rat kwam de afwijking gecombineerd voor met een lymphosarcomatose.

Sommige der auteurs, onder wie Rohr, die deze afwijking bij de mens hebben bestudeerd, beschouwen het proces als een maligne reticulose. Volgens hen kan het proces overgaan in een myeloblastenleukaemie. Dameshek (1951) laat zich niet uit over de aard van de afwijking en spreekt van een myeloproliferatieve ziekte, die kan overgaan in een leukaemie. Volgens andere onderzoekers (Apitz 1939; Kuipers 1960) berusten de veranderingen op een ontsteking. Kuipers' gedachten gingen uit naar een ontsteking op basis van een auto-immuun proces.

HOOFDSTUK III

DE INVLOED VAN SPLENECTOMIE VÓÓR TOEDIENING VAN HET VIRUS

(Proef I)

Zoals uit de literatuurstudie is gebleken treedt na injectie van het Rauscher virus een vergroting van de milt op. Deze berust op een belangrijke toename der haemopoiese. De toename betreft vooral de erythropoiese. Het proces bereikt een maximum, waarna het langzaam afneemt. Kortere of langere tijd hierna treden bij het ingespoten dier maligne veranderingen op. Het is goed voorstelbaar, dat de veranderingen in de milt slechts een begeleidend verschijnsel zijn, en niet van wezenlijk belang voor de tumorgenese. Ten einde dit probleem te benaderen werd de invloed nagegaan van splenectomie op de tumorinductie. Daar het zeer wel mogelijk leek, dat het tijdstip waarop de milt werd verwijderd van belang is, werd de splenectomie zowel vóór als ná de virusinjectie verricht. De eerstgenoemde proefopstelling wordt in dit hoofdstuk besproken.

Materiaal en methoden.

Alle ratten die voor deze proef werden gebruikt behoorden tot de Osborne Mendel stam.

De splenectomie werd uitgevoerd onder aethernarcose. Via een incisie direct onder de linker ribbenboog, evenwijdig aan het spierbundelbeloop der musculus obliquus abdominis externus, werd de milt na onderbinding der toevoerende vaten losgeknipt van het ligamentum gastrolienale. De wond werd gesloten met zijden hechtingen. De operatie nam ongeveer 2 minuten in beslag.

Uit proefoperaties was gebleken, dat een betrekkelijk groot aantal ratten (15 tot 20 %) overleed tijdens of direct na de operatie. Dit verlies werd veroorzaakt door bloedingen in het operatiegebied, of doordat de geopereerde jongen werden opgevreten door de moeder. Ook bij de niet geopereerde ratten kwam kannibalisme voor, doch in veel geringere mate.

Bij deze proef waren twee groepen van ratten betrokken. Bij één werd de milt binnen drie dagen na de geboorte verwijderd. De ratten van de andere

groep werden niet geopereerd. Beide groepen werden met het virus op de 3e tot de 4e dag na de geboorte intraperitoneaal ingespoten.

Om de administrering te vereenvoudigen werd de splenectomie steeds verricht bij alle leden van de verschillende nesten. Wij meenden dat deze handelwijze geoorloofd was, omdat uit andere proeven niets van een speciale nestgevoeligheid was gebleken (zie Hoofdstuk II). De groep niet geopereerde ratten bestond aanvankelijk uit 40 jongen van 4 nesten. De gesplenectomeerde groep was oorspronkelijk samengesteld uit de 55 jongen van 5 nesten.

Behalve door bovengenoemde complicaties werd het aantal ratten gereduceerd door het optreden van pneumonieën. Deze deden zich voor vanaf ongeveer 2½ maand na de injectie. Ze werden in beide groepen in evenredig aantal waargenomen. De ratten, waarbij een pneumonie werd geconstateerd, werden nooit betrokken bij de beoordeling der resultaten, ook niet wanneer er naast de pneumonie een neoplasma werd gevonden.

De twee groepen waren tenslotte als volgt samengesteld: Geen splenectomie, injectie op de 3e tot 4e dag na de geboorte: 33 ratten; splenectomie binnen 3 dagen na de geboorte, injectie op de 3e tot 4e dag na de geboorte: 42 ratten.

De dieren werden gedurende ongeveer één jaar geobserveerd.

Bevindingen en resultaten.

Er werden zowel gevallen waargenomen van een lymphocytair neoplasma als van maligne woekeringen van het granulocytotoetische systeem. Bij één rat menen wij, dat we met een reticuluncelsarcoma te maken hadden. De frequentie waarin de verschillende tumortypen werden aangetroffen is weergegeven in tabel 1.

In enkele gevallen was typering niet mogelijk wegens sterke autolyse.

TABEL 1.
Frequentie waarin de verschillende typen neoplasma werden aangetroffen.

	Geen splenectomie: 33 ratten *		Splenectomie binnen 3 dagen na de geboorte: 42 ratten *	
	Aantal	%	Aantal	%
Lymphocytair neoplasma	16	48	13	31
Granulocytair neoplasma	3	9	7	17
Reticuluncelsarcoma	1	3	0	0
Beoordeling niet mogelijk (autolyse)	1	3	3	7

* Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

Lymphocytair neoplasma.

Macroscopisch bleken steeds een deel of alle lymphklieren gezwollen te zijn. Bij de dieren bij wie de milt niet was verwijderd, was dit orgaan meestal vergroot. In ruim de helft der gevallen was de thymus gezwollen. Voor een nadere beschrijving der morphologische veranderingen verwijzen wij naar Hoofdstuk II.

In de tabellen 2 en 3 wordt de frequentie vermeld, waarin de lymphoïde celwoekeringen in de diverse organen werden aangetroffen. Het was niet mogelijk om in alle gevallen elk der betreffende organen histologisch te onderzoeken. Dit kwam door autolyse, het zoekraken van weefselstukjes of doordat in sommige gevallen werd vergeten het weefsel uit te snijden. Niettemin beschikten we steeds over voldoende orgaancoupees om een indruk te krijgen van de uitbreiding der maligne veranderingen.

Uit de tabellen blijkt, dat er geen duidelijk verschil is tussen de twee groepen in de mate waarin de diverse organen in het proces zijn betrokken.

Het aantal leukocyten in het periphere bloed werd bij deze proef nooit kwantitatief bepaald. In tabel 4 zijn dié gevallen opgenomen, waarin bij bestudering der uitstrijkpreparaten van het periphere bloed een duidelijke leukocytose kon worden vastgesteld en vrijwel alle witte bloedcellen tot de lymphatische reeks behoorden.

TABEL 2.

Vóórkomen van lymphoïde celwoekeringen in de diverse organen bij ratten gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een lymphocytair neoplasma.

Aantal ratten *	Geen splenectomie			Splenectomie binnen 3 dagen na de geboorte		
	16			13**		
Onderzocht orgaan	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Thymus	13	12	92	12	12	100
Lymphklieren	16	16	100	12	12	100
Milt	16	13	81	—	—	—
Miltrest	—	—	—	2	1	50
Lever	15	12	80	11	10	91
Peyersche plaques	8	5	63	10	5	50
Beenmerg (sternum)	11	8	73	12	8	67
Longen	12	10	83	10	9	90
Nieren	12	5	42	10	4	40
Leptomeninx	10	3	30	8	3	38

* Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

** Bij twee ratten werd een miltrest gevonden.

TABEL 3.

Vóórkomen van lymphoïde celwoekeringen in de diverse lymphklieren bij ratten gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een lymphocytair neoplasma.

Onderzochte lymphoglandulae	Geen splenectomie			Splenectomie binnen 3 dagen na de geboorte		
	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Aantal ratten *	16			13		
Cerv. super.	11	10	91	11	10	91
Cerv. profund.	9	7	78	10	8	80
Mediastin.	11	8	73	10	9	90
Axillar.	11	7	64	11	8	73
Mesenter.	11	8	73	10	10	100
Retroperiton.	10	9	90	11	10	91
Inguinal.	10	5	50	10	7	70

* Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

TABEL 4.

Frequentie der leukaemische bloedveranderingen bij de ratten met een lymphocytair neoplasma.

	Aantal ratten *	Onderzocht	+	%
Geen splenectomie	16	7	4	57
Splenectomie binnen 3 dagen na geboorte	13	6	4	67

* Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

Zoals uit Tabel 2 blijkt werden slechts bij één der niet geopereerde ratten geen maligne afwijkingen gevonden in de thymus. Dit dier werd 3 maanden na de injectie gedood onder het beeld van een lymphosarcomatose. Het gewicht van de thymus bedroeg 120 mgr. Onder normale omstandigheden zou men op deze leeftijd een thymusgewicht verwachten van omstreeks 400 mgr. Bij histologisch onderzoek der seriecoupes manifesteerde de atrophie zich door versmalling der lobuli en lymphocytendepletie op verschillende plaatsen in de schors. In principe was de schors-merg verdeling nog aanwezig.

Bij een andere rat van deze groep, wegens symptomen van een neoplasma gedood 10 maanden na de injectie, werd in het sternum een celarm, licht

fibreus merg gevonden, waarin veel wijde en bloedrijke capillairen voorkwamen. Een deel der beenmergcellen toonde een sterke gelijkenis met reticulumcellen, andere waren granulocytair elementen van verschillende rijpingsgraad en meerkernige op megakaryocyten gelijkende cellen. In de zilverimpregnatie werd hier en daar in de omgeving der beenbalkjes vermeerdering gezien van reticulumvezels. In milt, lever en bijna alle lymphklieren werd een sterke extramedullaire haemopoiese aangetroffen. Er werden zowel erythro- als leukopoiese gevonden, terwijl de indruk bestond, dat ook het aantal megakaryocyten groter was dan men bij ratten in deze localisaties onder normale omstandigheden aantreft. Het miltgewicht was ongeveer viermaal toegenomen. Het beeld paste geheel bij een osteomyeloreticulose. In thymus, mediastinale en retroperitoneale lymphklieren werd een lymphosarcoma gevonden. We hadden hier dus te maken met een gecombineerd vóórkomen van een lymphocytair neoplasma en osteomyeloreticulose.

Granulocytair neoplasma.

Dit type tumor werd zowel bij de niet geopereerde ratten als bij de ratten bij wie de milt was verwijderd veel minder frequent gezien dan het lymphocytair neoplasma (zie Tabel 1). Bij de laatste groep kwam de afwijking tweemaal zo frequent voor als bij de eerste groep, doch dit verschil is niet significant. De granulocytair woekeringen kwamen voor in beenmerg, lever, lymphklieren, thymus, Peyersche plaques, nieren, longen en bij de dieren bij wie dit orgaan niet was verwijderd, ook in de milt.

Voor een nadere bespreking der morphologische veranderingen verwijzen we naar Hoofdstuk II. Het aantal gevallen, waarin dit type neoplasma werd aangetroffen is te gering om te kunnen nagaan of er een verschil was tussen de gesplenectomeerde en niet gesplenectomeerde dieren, wat betreft de mate waarin de diverse organen in het proces waren betrokken.

Bij één der gesplenectomeerde ratten toonden de coupes door het beenmerg (sternum) het beeld van een osteomyeloreticulose. Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar Hoofdstuk II.

Reticulumcelsarcoma.

Dit type neoplasma werd waargenomen bij één der niet gesplenectomeerde ratten (zie Tabel 1). Het dier werd op de 145e dag na de injectie gedood wegens anaemie (haematocrietwaarde 28). De milt en een aantal lymphklieren waren gezwollen en bleken doorwoekerd te zijn met grote cellen, die relatief veel cytoplasma bezaten en een blazige kern met een of twee duidelijke nucleoli. Het cytoplasma was blauwrood. In de zilverimpregnatie (Laguesse)

werden tussen de tumorcellen nieuwgevormde reticuline vezels aangetroffen (zie afb. 17 en 18). De thymus toonde geen maligne afwijkingen. Wel was er een extreme atrophie met volledige verdwijning der schors-merg verdeling en aanzienlijke versmalling der lobuli. Het gewicht van dit orgaan bedroeg slechts 80 mgr. Onder normale omstandigheden zou men op deze leeftijd een thymusgewicht verwachten van ongeveer 300 mgr. In de uitstrijkpreparaten van het perifere bloed werden geen leukaemische veranderingen gevonden. Het beenmerg werd niet onderzocht.

In tabel 5 vindt men het totale aantal gevallen vermeld, waarin bij de twee groepen gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de virusinjectie een neoplasma was geconstateerd. In figuur 2 zijn deze bevindingen in grafiek gebracht. In Tabel 6 worden de afzonderlijke latentietijden weergegeven, met vermelding van het type neoplasma.

TABEL 5.

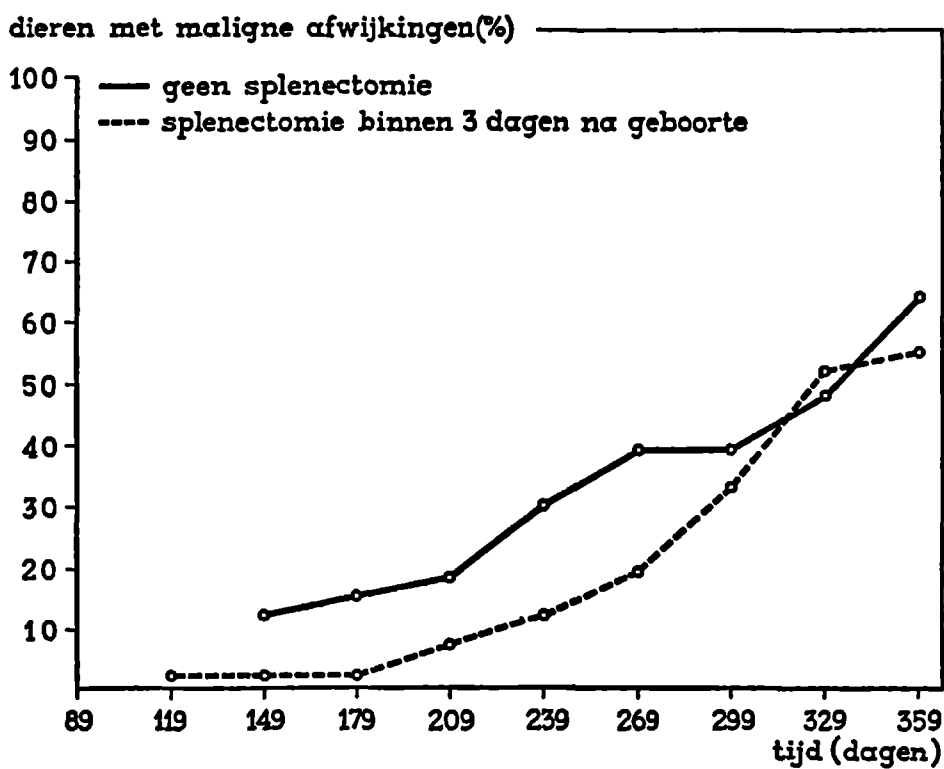
Aantal ratten *	Geen splenectomie		Splenectomie binnen 3 dagen na de geboorte	
	33		42	
Ratten onverwacht overleden of gedood wegens symptomen van een neoplasma:	Cumulatief		Cumulatief	
89 dagen	Aantal	%	Aantal	%
119 "	0	0	0	0
149 "	4	12	1	2
179 "	5	15	1	2
209 "	6	18	3	7
239 "	10	30	5	12
269 "	13	39	8	19
299 "	13	39	14	33
329 "	16	48	22	52
359 " na injectie	21	64	23**	55

* Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

** Bij twee van deze ratten werd een miltrest gevonden.

Bij statistisch onderzoek bleek, dat er op de diverse tijdstippen na injectie van het virus geen significant verschil bestond tussen het totaal aantal ratten der gesplenectomeerde groep, bij wie een neoplasma was geconstateerd en het totaal aantal gevallen van tumorinductie in de niet gesplenectomeerde groep (Kolmogorov-Smirnov toets der gegevens van Tabel 6, waarin de individuele latentietijden zijn vermeld). Ook bleek, dat er geen invloed aanwijsbaar was

FIGUUR 2.



Cumulatief percentage ratten bij wie gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de injectie een neoplasma was geconstateerd. Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

van splenectomie op het type der geïnduceerde tumor (zie Tabel 1, die de frequentie weergeeft waarin de verschillende typen neoplasma werden aangetroffen). Het granulocytair neoplasma treedt over het algemeen later na de injectie op dan het lymphocytair neoplasma (zie gegevens van Tabel 6).

Korte samenvatting.

Met de in dit hoofdstuk besproken proef werd de invloed nagegaan van splenectomie vóór toediening van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij Osborne Mendel ratten. De proef werd uitgevoerd met twee groepen van ratten. Bij één van deze groepen werd de milt binnen 3 dagen na de geboorte verwijderd. De ratten van beide groepen werden tussen de 3e en 4e dag na de geboorte intraperitoneaal met het virus ingespoten. De dieren werden

TABEL 6.

Afzonderlijke latentietijden.

l = lymfocytair neoplasma

g = granulocytair neoplasma

r = reticuluncelsarcoma

(o) = osteomyeloreticulose

a = classificatie niet mogelijk wegens autolyse

Geen splenectomie *			Splenectomie binnen 3 dagen * na de geboorte		
1.	120	dg. l	1.	99	dg. l
2.	121	" l	2.	186	" l
3.	139	" l	3.	190	" l
4.	145	" r	4.	210	" l
5.	161	" l	5.	210	" a
6.	187	" l	6.	252	" g
7.	204	" l	7.	257	" l
8.	216	" l	8.	257	" l
9.	217	" l	9.	274	" g
10.	223	" l	10.	276	" a
11.	247	" l	11.	289	" l
12.	252	" l	12.	290	" g
13.	258	" a	13.	299	" l
14.	316	" g	14.	299	" l
15.	318	" l	15.	304	" l
16.	328	" l	16.	307	" g
17.	338	" l	17.	309	" l
18.	338	" g	18.	312	" l
19.	342	" l (o)	19.	313	" a
20.	347	" l	20.	317	" l
21.	356	" g	21.	322	" g
			22.	325	" g
			23.	345	" g (o)

* Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

gedurende ongeveer een jaar geobserveerd en gedood bij symptomen van een neoplasma. Er kon geen significante invloed aangetoond worden van splenectomie op de tumorinductie.

HOOFDSTUK IV

DE INVLOED VAN SPLENECTOMIE NA TOEDIENING VAN HET VIRUS

(Proef II)

Zoals uit de resultaten van Proef I (zie Hoofdstuk III) is gebleken, kon er geen invloed worden aangetoond van splenectomie vóór injectie van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij Osborne Mendel ratten. Fey en Graffi (1958) vonden, dat de leukaemie inductie bij muizen sterk geremd wordt, wanneer de milt werd verwijderd, kort na toediening van het Graffi virus. In dit hoofdstuk zal worden nagegaan wat het effect is van splenectomie ná toediening van het Rauscher virus bij ratten.

Materiaal en methoden.

Het gebruikte virus was reeds verscheidene malen in serie overgeënt in de Osborne Mendel stam. Het werd ons door Rauscher toegestuurd. De techniek der bereiding is beschreven in Hoofdstuk II.

Voor de operatietechniek verwijzen we naar Hoofdstuk III.

De proef werd uitgevoerd met 3 groepen van Osborne Mendel ratten. Bij elke groep werd het virus binnen 3 dagen na de geboorte intraperitoneaal ingespoten. Bij 2 der groepen werd respectievelijk 1 en 50 dagen na de geboorte de milt verwijderd. Zoals in Hoofdstuk III reeds is vermeld, was bij proefoperaties gebleken, dat een betrekkelijk groot aantal dieren (15 tot 20 %) tijdens of kort na de operatie overleed. Evenals bij proef 1 (zie Hoofdstuk III) werden, teneinde de administratie te vergemakkelijken, steeds alle leden der diverse nesten geopereerd. Voor elke groep werden 5 willekeurige nesten genomen (per nest gemiddeld 9 jongen). Behalve als rechtstreeks gevolg van de operatie of door kannibalisme werd het aantal ratten gereduceerd door het optreden van pneumonieën. Het totaal aantal pneumoniegevallen bedroeg 12. Zij kwamen in de verschillende groepen in evenredig aantal voor. Zij manifesteerden zich vanaf ongeveer 3 maanden na de injectie. De ratten, bij wie een pneumonie werd geconstateerd, werden niet betrokken bij de uiteindelijke beoordeling der resultaten, ook niet wanneer gelijktijdig een neoplasma werd aangetroffen.

Als gevolg van de beschreven complicaties waren de proefgroepen tenslotte als volgt samengesteld: Injectie binnen 3 dagen na de geboorte, doch geen splenectomie: 37 ratten; injectie binnen 3 dagen na de geboorte, splenectomie 1 dag na de injectie: 29 ratten; injectie binnen 3 dagen na de geboorte, splenectomie 50 dagen na de injectie: 31 ratten.

De ratten werden geobserveerd gedurende één jaar.

Bevindingen en resultaten.

Er ontstonden zowel lymfocyttaire als granulocyttaire tumoren. De frequentie waarin deze werden aangetroffen, wordt vermeld in tabel 7.

TABEL 7.
Frequentie waarin de verschillende typen neoplasmata werden aangetroffen.

	Geen splenectomie: 37 ratten *		Splenectomie 1 dag na injectie van het virus: 29 ratten *		Splenectomie 50 dagen na injectie van het virus: 31 ratten *	
	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%
Lymfocytair neoplasma	25	68	21	72	22	71
Granulocytair neoplasma	4	11	2	7	6	19
Beoordeling niet mogelijk (autolyse)	3	8	2	7	2	6

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

Lymfocytair neoplasma.

Steeds was een variërend aantal lymfklieren gezwollen. Bij de ratten, bij wie dit orgaan niet was verwijderd, was de milt meestal duidelijk vergroot. Zeer frequent werd een thymuszwelling waargenomen. Een nadere beschrijving der morfologische veranderingen treft men aan in Hoofdstuk II. De frequentie waarin de lymfoïde celwoekeringen in de diverse organen werd gevonden, is weergegeven in de tabellen 8 en 9. Wegens autolyse, het zoekraken van weefselstukjes of doordat enkele malen vergeten werd het weefsel uit te snijden, konden niet steeds alle organen histologisch worden onderzocht. Niettemin stonden per geval voldoende orgaancoupees ter beschikking om een indruk te krijgen over de uitbreiding der maligne veranderingen. Het blijkt, dat er geen duidelijk verschil is tussen de 3 groepen wat betreft de uitbreiding der maligne celwoekering.

Het aantal leukocyten werd tijdens deze proef nooit kwantitatief bepaald.

TABEL 8.

Vóórkomen van lymfhoïde celwoekeringen in de diverse organen bij ratten gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een lymfocytair neoplasma.

	Geen splenectomie			Splenectomie 1 dag na injectie van het virus			Splenectomie 50 dagen na injectie van het virus		
Aantal ratten *	25			21**			22***		
Onderzocht orgaan	Aantal	+	%	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Thymus	25	24	96	20	20	100	17	16	94
Lymphklieren	25	25	100	20	20	100	20	20	100
Milt	25	24	96	—	—	—	—	—	—
Miltrest	—	—	—	2	2	100	1	1	100
Lever	25	24	96	20	20	100	20	19	95
Peyersche plaques	21	12	57	17	14	82	17	15	88
Beenmerg (sternum)	22	18	82	16	9	56	16	10	63
Longen	25	23	92	17	15	88	19	15	79
Nieren	21	12	57	16	8	50	19	11	58
Leptomeninx	19	7	37	16	5	31	17	5	29

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

** Bij twee van deze ratten werd een miltrest gevonden.

*** Bij één van deze ratten werd een miltrest gevonden.

TABEL 9.

Vóórkomen van lymfhoïde celwoekeringen in de diverse lymphklieren bij ratten, gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een lymfocytair neoplasma.

	Geen splenectomie			Splenectomie 1 dag na injectie van het virus			Splenectomie 50 dagen na injectie van het virus		
Aantal ratten *	25			21			22		
Onderzochte lymphoglandulae	Aantal	+	%	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Cerv. super.	25	18	72	20	18	90	20	17	85
Cerv. profund.	24	15	63	20	15	75	20	13	65
Mediastin.	21	18	86	19	17	89	19	15	79
Axillar.	24	14	58	20	14	70	20	13	65
Mesenter.	24	17	71	20	14	70	20	14	70
Retroperiton.	24	23	96	20	19	95	20	17	85
Inguinal.	23	10	43	19	9	47	20	9	45

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

In tabel 10 zijn die gevallen opgenomen, waarbij aan de hand van het onderzoek der uitstrijkpreparaten van het perifere bloed een duidelijke leukocytose kon worden vastgesteld en vrijwel alle witte bloedcellen tot de lymphatische reeks behoorden.

TABEL 10.
Frequentie der leukaemische bloedveranderingen bij de ratten
met een lymphocytair neoplasma.

	Aantal ratten *	Onderzocht	+	%
Geen splenectomie	25	17	11	65
Splenectomie 1 dag na injectie	21	10	6	60
Splenectomie 50 dagen na injectie	22	13	9	69

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

Bij 2 ratten met uitgebreide lymphoïde celwoekeringen in lymphklieren en parenchymateuse organen, werden in de verschillende seriecoupes door de thymus geen maligne afwijkingen gevonden (zie Tabel 8). Bij één van deze, een niet gesplenectomeerd dier, dat wegens paralyse werd gedood 5 maanden na de injectie, toonde de thymus in het geheel geen duidelijke afwijkingen. Hier en daar bestond schorsatrofie, maar dat is voor deze leeftijd normaal. Het gewicht van de thymus bedroeg 240 mgr, hetgeen eveneens ongeveer normaal was voor de leeftijd. Bij de andere rat was de milt 50 dagen na de injectie verwijderd. Het dier werd 7 maanden na de injectie gedood wegens anaemie en puntvormige bloedinkjes op de oogleden. De thymus woog slechts 70 mgr., hetgeen belangrijk minder is dan men onder normale omstandigheden op deze leeftijd zou verwachten (gemiddeld 150 tot 200 mgr.). In de seriecoupes bleken de thymuslobjes sterk versmald te zijn. In de perifere delen waren even weinig lymphoïde elementen aanwezig als in het centrum, zodat er geen sprake was van een schors-merg verdeling. We hebben hier dus kennelijk met dieren te maken, waarbij de maligne lymphoïde celwoekering buiten de thymus is ontstaan.

Granulocytair neoplasma.

De granulocytair woekeringen werden gevonden in beenmerg, lever, lymphklieren, thymus, Peyersche plaques, nieren, longen, en indien dit orgaan niet was verwijderd ook in de milt. Bij één rat waren de lymphklieren grasgroen. Bij twee ratten, beiden gesplenectomeerd op de leeftijd van 50 dagen, roonde het beenmerg (sternum) het beeld van een osteomyeloreticulose. Voor

nadere morphologische bijzonderheden verwijzen we naar Hoofdstuk II.

Het aantal granulocyttaire neoplasmata bleek niet voldoende om een eventueel verschil in de uitbreiding van het proces te kunnen aantonen tussen de niet geopereerde en gesplenectomeerde dieren.

Het totaal aantal gevallen, waarin bij de 3 groepen gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de virusinjectie een neoplasma was geconstateerd, vindt men vermeld in Tabel 11. Deze bevindingen zijn in grafiek gebracht in Figuur 3. De afzonderlijke latentietijden met vermelding van het type neoplasma treft men aan in Tabel 12.

TABEL 11.

	Geen splenectomie	Splenectomie 1 dag na injectie	Splenectomie 50 dagen na injectie	Totaal aantal gesplenectomeerde ratten
Aantal ratten *	37	29	31	60
Ratten onverwacht overleden, of gedood wegens symptomen van een neoplasma:				
89 dagen	Cumulatief Aantal %	Cumulatief Aantal %	Cumulatief Aantal %	Cumulatief Aantal %
119	1 3	2 7	3 10	5 8
149 "	2 5	3 10	5 16	8 13
179 "	6 16	3 10	8 26	11 18
209 "	11 30	5 17	11 35	16 27
239 "	17 46	12 41	16 52	28 47
269 "	24 65	12 41	19 61	31 52
299 "	26 70	16 55	24 77	40 67
329 "	30 81	19 66	29 94	48 80
359 " na	32 86	25** 86	30***97	55 92
injectie				

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

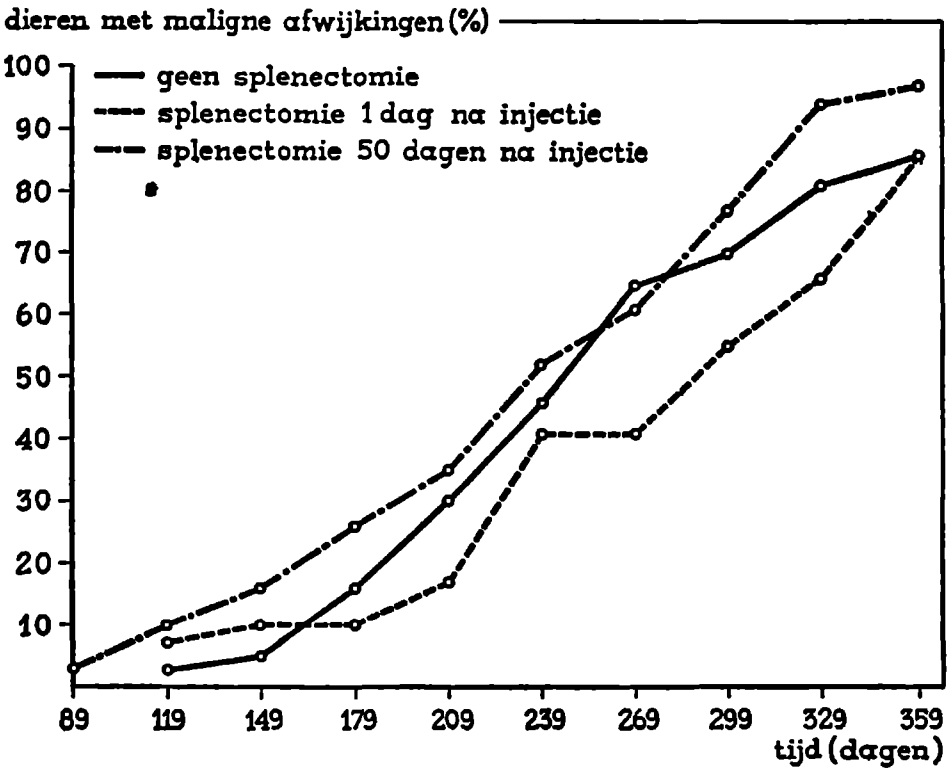
** Bij drie van deze ratten werd een miltrest gevonden.

*** Bij twee van deze ratten werd een miltrest gevonden.

Bij statistisch onderzoek bleek, dat er op de diverse tijdstippen na injectie van het virus geen significant verschil was tussen het totaal aantal ratten der beide gesplenectomeerde groepen, bij wie een neoplasma was geconstateerd en het totaal aantal gevallen van tumorinductie in de niet gesplenectomeerde groep (Kolmogorov-Smirnov toets van de gegevens van Tabel 8, waarin de individuele latentietijden zijn vermeld). Het maakte geen verschil of de milt 1 of 50 dagen na injectie was verwijderd.

Ook bleek, dat splenectomie, of deze nu 1 of 50 dagen na de injectie had

FIGUUR 3.



Cumulatief percentage ratten bij wie gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de injectie een neoplasma was geconstateerd. Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

plaats gevonden, geen aanwijsbare invloed had op het type der geïnduceerde tumor (zie gegevens van Tabel 7, waarin de frequentie is vermeld van deze twee typen neoplasma). Het granulocytair neoplasma trad over het algemeen duidelijk later na de virustoediening op dan de maligne lymphoïde celwoekering (zie Tabel 12).

Korte samenvatting.

Met de in dit hoofdstuk besproken proef werd de invloed nagegaan van splenectomie ná toediening van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij de Osborne Mendel rat. De proef werd uitgevoerd met drie groepen. Bij alle drie de groepen werd het virus binnen 3 dagen na de geboorte intra-peritoneaal ingespoten. Bij twee van deze groepen werd de milt respectievelijk

TABEL 12.

Afzonderlijke latentietijden.

l = lymphocytair neoplasma

g = granulocytair neoplasma

(o) = osteomyeloreticulose

a = classificatie niet mogelijk wegens autolyse

Geen splenectomie *			Splenectomie 1 dag *			Splenectomie 50 dagen *		
			na injectie van het virus			na injectie van het virus		
1.	118	dg. l	1.	112	dg. l	1.	88	dg. l
2.	122	" l	2.	112	" l	2.	104	" l
3.	150	" l	3.	132	" l	3.	108	" l
4.	150	" l	4.	196	" l	4.	122	" l
5.	160	" a	5.	202	" l	5.	140	" l
6.	179	" l	6.	215	" l	6.	151	" l
7.	185	" l	7.	217	" l	7.	151	" a
8.	193	" l	8.	223	" l	8.	168	" l
9.	193	" g	9.	223	" l	9.	168	" l
10.	199	" l	10.	236	" l	10.	196	" l
11.	202	" l	11.	237	" l	11.	196	" l
12.	215	" l	12.	237	" l	12.	199	" l
13.	215	" l	13.	276	" l	13.	215	" l
14.	215	" l	14.	277	" l	14.	217	" l
15.	215	" g	15.	287	" l	15.	220	" l
16.	216	" l	16.	292	" l	16.	220	" l
17.	216	" l	17.	308	" l	17.	237	" l
18.	241	" l	18.	313	" g	18.	255	" l
19.	241	" l	19.	313	" a	19.	255	" g
20.	251	" l	20.	337	" l	20.	265	" l
21.	255	" g	21.	339	" l	21.	285	" g
22.	258	" l	22.	339	" g	22.	285	" g
23.	258	" l	23.	345	" a	23.	290	" g (o)
24.	263	" a	24.	353	" l	24.	293	" l
25.	283	" a	25.	353	" l	25.	307	" l
26.	290	" g				26.	313	" g (o)
27.	308	" l				27.	320	" l
28.	313	" l				28.	320	" l
29.	314	" l				29.	320	" g
30.	314	" l				30.	336	" a
31.	343	" l						
32.	353	" l						

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

1 en 50 dagen na de virustoediening verwijderd. De ratten werden gedurende ongeveer een jaar geobserveerd. Zij werden gedood bij het optreden van symptomen, die op de aanwezigheid van een neoplasma wezen. Er werd geen significante invloed aangetoond van splenectomie op de tumorinductie.

HOOFDSTUK V

DE INVLOED VAN THYMECTOMIE VÓÓR TOEDIENING VAN HET VIRUS

(Proef III)

Uit experimenten van Gross (1961a, 1963a) was gebleken, dat thymectomie zowel vóór als na toediening van het door hem geïsoleerde virus een remmend effect had op de leukaemie inductie bij muizen. Bovendien werd door thymectomie het celtype der geïnduceerde leukaemie beïnvloed.

Met de proef, die in dit hoofdstuk zal worden besproken, werd nagegaan, of de verwijdering van de thymus vóór injectie van het Rauscher virus invloed heeft op de leukaemie inductie bij ratten.

Materiaal en methoden.

Het toegediende virus was reeds verscheidene malen in de Osborne Mendel stam in serie overgeënt. Het preparaat was door Rauscher bereid en werd vanuit Amerika opgestuurd. Nadere gegevens der bereiding staan vermeld in Hoofdstuk II.

De proef werd uitgevoerd met Osborne Mendel ratten.

De thymectomie werd verricht binnen de leeftijd van 3 dagen en geschiedde als volgt: nadat een mediane huisincisie was gemaakt, reikende van mondbodem tot het niveau van de 3e à 4e rib, werd het sternum gekliefd vanaf het jugulum tot aan de bovenrand van de 3e rib. Op deze wijze werd een goed overzicht verkregen van het gehele gebied vanaf hartbasis tot mondbodem. Het orgaan werd uitgezogen met behulp van een vacuümpomp. De thoraxwand werd gesloten met een zijden hechting. De operatie nam één tot twee minuten in beslag. Uit proefoperaties was gebleken, dat de mortaliteit van de operatie bijzonder hoog was. Ongeveer 65 % der pasgeboren ratten stierf tijdens of kort na de operatie. Het overlijden was meestal het gevolg van bloedingen. Bloedverlies wordt door ratten op deze leeftijd bijzonder moeilijk verdragen. Verder werd een aantal der ratjes het slachtoffer van kannibalisme. Aan deze jonge leeftijd waren we echter gebonden omdat anders het tijdstip der virusinjectie te laat zou vallen om bij een voldoende aantal der ratten

tumorinductie te verkrijgen. De gevoeligheid voor dit tumorvirus neemt namelijk sterk af naarmate het op oudere leeftijd wordt toegediend (zie Hoofdstuk II).

Andere onderzoekers vermelden een veel lager sterfte percentage. Zij passen echter een andere operatietechniek toe: de thymus wordt weggezogen via een kleine dwarsincisie van de thoraxwand. Het operatieterrein kan dan echter niet voldoende worden overzien. Uit bestudering der seriecouples door het gebied van hartbasis tot mondbodem was gebleken, dat de thymus bij Osborne Mendel ratten uitlopers kan hebben tot aan hartbasis, mondbodem en tussen de spieren langs de wervelkolom. Om de verwijdering zo volledig mogelijk te verrichten was een ruim overzicht van dit hele gebied dus een eerste vereiste.

De proef werd uitgevoerd met twee groepen. Bij de ratten van één groep werd de thymus verwijderd binnen drie dagen na de geboorte. De ratten van beide groepen werden op de leeftijd van 3 tot 4 dagen intraperitoneaal met het virus ingespoten. De groep, bij wie de thymus verwijderd was, bestond oorspronkelijk uit 90 ratten. Deze waren van 9 nesten afkomstig. De thymectomie werd verricht bij alle ratten der diverse nesten. Dit vereenvoudigde de administrering. Deze handelwijze werd niet bezwaarlijk geacht omdat gebleken was, dat de gevoeligheid voor tumorinductie tussen diverse nesten onderling niet significant verschilt (zie Hoofdstuk II). Het aantal ratten per nest, dat tijdens of direct na de operatie overleed, bedroeg 5 tot 7. In totaal overleefden 35 dieren deze ingreep. Voor de samenstelling van de niet geopereerde groep werd van een achttal nesten uitgegaan, met 80 jongen in totaal. Door van elk nest ongeveer 6 dieren te doden, werd dit aantal tot circa 35 gereduceerd. Een onvoorziene complicatie vormde het grote aantal sterfgevallen 1 tot 3 dagen na de injectie. Hierdoor werd het aantal ratten vrijwel gehalveerd. De overleden dieren werden geobduceerd en histologisch onderzocht. Duidelijke morphologische afwijkingen werden niet gevonden, doch het onderzoek werd sterk bemoeilijkt o.a. door autolyse.

Tenslotte waren de proefgroepen als volgt samengesteld: Thymectomie binnen 3 dagen na de geboorte, injectie op de leeftijd van 3 tot 4 dagen: 15 ratten; geen thymectomie, injectie op de leeftijd van 3 tot 4 dagen: 18 ratten.

In dit hoofdstuk zullen de bevindingen worden medegedeeld van een observatieperiode van 7 maanden.

Bevindingen en resultaten.

Evenals bij de vorige proeven zullen eerst de morphologische veranderingen worden medegedeeld.

Het geïnduceerde neoplasma bleek steeds van het lymphatische type te zijn. De maligne cellen waren in diverse lymphatische weefsels en parenchymateuse organen aanwezig. Bij de niet geopereerde dieren was de thymus in ruim de helft der gevallen gezwollen. Bij histologisch onderzoek bleek dit orgaan echter steeds in het maligne proces betrokken te zijn. Het aantal dieren waarbij zich een neoplasma had ontwikkeld was betrekkelijk gering. Het bedroeg in de niet geopereerde en geopereerde groep respectievelijk slechts 6 en 8. In de tabellen 13 en 14 wordt een overzicht gegeven van de uitbreiding van het proces over de verschillende organen. Het was niet steeds mogelijk alle organen histologisch te onderzoeken. De oorzaken hiervan waren autolyse, het zoekraken van weefselstukjes, of doordat soms vergeten werd het weefsel uit te snijden. In tabel 15 is het aantal ratten vermeld bij wie een leukaemisch bloedbeeld werd gevonden. Het aantal leukocyten werd niet quantitatief bepaald. De leukaemische bloedveranderingen werden geconstateerd bij onderzoek der uitstrijkpreparaten. Er was een duidelijke leukocytose, waarbij vrijwel alle kernhoudende bloedcellen tot de lymphatische reeks behoorden. Het blijkt dat er geen duidelijk verschil is tussen de twee groepen wat betreft de uitbreiding der maligne celwoekering.

Er werden bij de geopereerde dieren geen structuren gevonden, die als thymusweefsel waren te herkennen.

TABEL 13.

Vóórkomen van lymphoïde celwoekeringen in de diverse organen, bij ratten gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een neoplasma.

Aantal dieren *	Geen thymectomie			Thymectomie binnen 3 dagen na de geboorte		
	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Onderzochte organen						
Thymus	6	6	100	—	—	—
Lymphklieren	6	6	100	8	8	100
Milt	6	5	83	8	8	100
Lever	6	5	83	7	6	86
Peyersche plaque	4	2	50	6	2	33
Beenmerg (sternum)	6	5	83	7	7	100
Longen	6	6	100	7	7	100
Nieren	5	2	40	7	2	29
Leptomeninx	5	0	0	7	0	0

* Alle ratten waren op de 3e tot 4e dag na de geboorte met het virus ingespoten.

TABEL 14.

Vóórkomen van lymphoïde celwoekeringen in de diverse lymphklieren bij ratten gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een neoplasma.

Onderzochte lymphoglandulae	Geen thymectomie			Thymectomie binnen 3 dagen na de geboorte		
	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Aantal ratten *	6			8		
Cerv. super.	6	5	83	7	5	71
Cerv. profund.	5	4	80	6	4	67
Mediast.	6	4	67	6	4	67
Axill.	5	4	80	6	6	100
Mesenter.	5	3	60	5	4	80
Retroperiton.	5	4	80	7	6	86
Inguinal.	4	2	50	6	2	33

* Alle ratten waren op de 3e tot 4e dag na de geboorte met het virus ingespoten.

TABEL 15.

Frequentie der leukaemische bloedveranderingen.

	Aantal ratten *	Onderzocht	+	%
Geen thymectomie	6	5	3	60
Thymectomie binnen 3 dagen na de geboorte	8	6	4	67

* Alle ratten waren op de 3e tot 4e dag na de geboorte met het virus ingespoten.

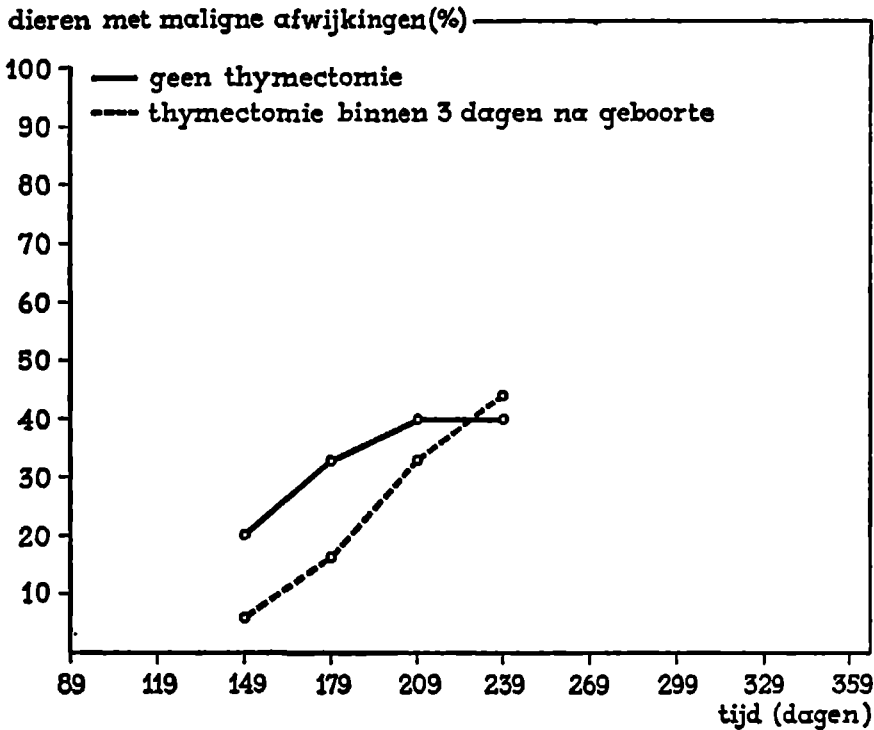
TABEL 16.

Ratten onverwacht overleden, of gedood wegens symptomen van een neoplasma:	Geen thymectomie		Thymectomie binnen 3 dagen na de geboorte	
	Aantal	%	Aantal	%
89 dagen	0	0	0	0
119 "	0	0	0	0
149 "	3	20	1	6
179 "	5	33	3	17
209 "	6	40	6	33
239 " na injectie	6	40	8	44

* Bij alle ratten werd het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

In tabel 16 is het totale aantal ratten weergegeven, bij wie gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de injectie een neoplasma was geconstateerd. In figuur 4 zijn deze bevindingen in grafiek gebracht. In tabel 17 worden de afzonderlijke latentietijden vermeld en het type neoplasma.

FIGUUR 4.



Cumulatief percentage ratten bij wie gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de injectie een neoplasma was geconstateerd. Bij alle ratten was het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

Bij statistisch onderzoek bleek, dat er op de diverse tijdstippen na de virus-injectie geen significant verschil bestond tussen het totaal aantal ratten der gethymectomeerde groep, bij wie een neoplasma was geconstateerd en het totaal aantal gevallen van tumorinductie in de niet gethymectomeerde groep (Kolmogorov-Smirnov toets der gegevens van tabel 17, waarin de individuele latentietijden staan vermeld). Ook werd geen invloed aangetoond van thymectomie op het type der geïnduceerde tumor.

TABEL 17.
 Afzonderlijke latentietijden in dagen.
 1 = lymphatisch neoplasma

Geen thymectomie	Thymectomie binnen 3 dagen na de geboorte
1. 121 dg. 1	1. 148 dg. 1
2. 137 " 1	2. 152 " 1
3. 149 " 1	3. 174 " 1
4. 157 " 1	4. 190 " 1
5. 175 " 1	5. 193 " 1
6. 190 " 1	6. 199 " 1
	7. 216 " 1
	8. 217 " 1

* Bij alle ratten werd het virus op de 3e tot 4e dag na de geboorte ingespoten.

Korte samenvatting.

Met de proef besproken in dit hoofdstuk werd de invloed nagegaan van thymectomie vóór toediening van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij Osborne Mendel ratten. De proef werd uitgevoerd met 2 groepen. Bij een groep werd de thymus binnen 3 dagen na de geboorte verwijderd. Bij beide groepen werd het virus intraperitoneaal ingespoten op de leeftijd van 3 tot 4 dagen. De ratten werden gedurende 7 maanden geobserveerd en gedood bij symptomen, die wezen op de aanwezigheid van een neoplasma. Er werd geen significante invloed aangetoond van thymectomie op de tumorinductie.

HOOFDSTUK VI

A. DE INVLOED VAN THYMECTOMIE NA TOEDIENING VAN HET VIRUS

(Proef IV)

Zoals uit het vorige hoofdstuk is gebleken, kon geen duidelijke invloed aangetoond worden van thymectomie vóór toediening van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij ratten. Uit de literatuur is bekend, dat de leukaemie inductie door het Gross virus bij muizen sterk geremd wordt door thymectomie. De remmende invloed werd waargenomen zowel wanneer de thymectomie werd verricht vóór als ná de toediening van het virus (Gross 1961a, 1963). In deze proef zal het effect worden nagegaan van thymectomie na toediening van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij ratten.

Materiaal en methoden.

Het toegediende virus was reeds verschillende malen in serie overgeënt in de Osborne Mendel stam. Het preparaat werd ons door Rauscher toegezonden. De techniek der bereiding is beschreven in Hoofdstuk II.

Voor de techniek der thymectomie verwijzen we naar Hoofdstuk V.

De proef werd uitgevoerd met 3 groepen Osborne Mendel ratten. Bij alle dieren werd het virus binnen 3 dagen na de geboorte intraperitoneaal ingespoten. Bij 2 groepen werd de thymus respectievelijk 10 en 50 dagen na de injectie verwijderd. Uit proefoperaties was namelijk gebleken, dat thymectomie door 10 dagen oude ratten veel beter werd verdragen dan door pasgeboren ratten, zodat het vroegste tijdstip der thymectomie naar deze leeftijd werd verschoven. De groep niet geopereerde dieren was oorspronkelijk samengesteld uit 45 ratten, die het totaal aantal pasgeborenen waren van 5 nesten. De gethymectomeerde groepen bestonden aanvankelijk elk uit 60 ratten, die het volledig aantal jongen waren van 6 nesten. Zoals in de voorgaande proeven werden steeds alle jongen van de verschillende nesten geopereerd. Dit vereenvoudigde de administratie. We achten deze handelwijze geoorloofd, omdat er geen speciale nestgevoeligheid was aangetoond voor het tumorvirus (zie Hoofdstuk II).

Het aantal ratten, dat tijdens of direct na de operatie stierf bij de groep, die 10 dagen na de injectie werd gethymectomeerd, bedroeg 8 (13 %) en bij de groep, waarbij de thymus op de leeftijd van 50 dagen werd verwijderd 14 (23 %).

Behalve als rechtstreeks gevolg van de operaties of door kannibalisme werd het aantal ratten gereduceerd door het optreden van pneumonieën. Zij deden zich voor vanaf ongeveer 3 maanden na de virusinjectie. Onder de ongeveer 90 gethymectomeerde ratten, die de vroege complicaties hadden doorstaan, kwamen 16 (18 %) gevallen van pneumonie voor, terwijl het aantal bij de niet geopereerde ratten 3 (7 %) bedroeg. De dieren bij wie een pneumonie werd geconstateerd werden niet betrokken bij de uiteindelijke beoordeling der resultaten, ook niet wanneer er een neoplasma aanwezig bleek te zijn. Als gevolg van de diverse verwickelingen waren de groepen tenslotte als volgt samengesteld. Injectie binnen 3 dagen na de geboorte, geen thymectomie: 40 ratten; injectie binnen 3 dagen na de geboorte, thymectomie 10 dagen na de injectie: 34 ratten; injectie binnen 3 dagen na de geboorte, thymectomie 50 dagen na de injectie: 45 ratten.

Bevindingen en resultaten.

Opmerkelijk waren de korte latentieperioden. Deze bleken meer dan de helft korter te zijn dan de latentietijden die werden waargenomen bij de experimenten, die besproken zijn in Hoofdstuk III, IV en V. Het geïnduceerde neoplasma bleek zowel bij de niet geopereerde dieren als bij de dieren bij wie de thymus was verwijderd, steeds van het lymphatische type te zijn. Bij de niet geopereerde dieren imponeerde de thymuszwellung vrijwel altijd bijzonder sterk. Het gemiddelde gewicht van dit orgaan was ongeveer 15 tot 25 maal verhoogd. Voor nadere morphologische bijzonderheden verwijzen we naar Hoofdstuk II.

In de tabellen 18 en 19 wordt de frequentie weergegeven waarin de diverse organen in het maligne proces waren betrokken. Deze gegevens hebben betrekking op de dieren, die werden gedood wegens symptomen, die op een neoplasma wezen of hieraan onverwacht waren overleden. Hun aantal bedroeg na ongeveer 5 maanden 37 bij de niet geopereerde ratten. Bij de ratten, bij wie de thymus 10 en 50 dagen na de injectie was verwijderd was dit aantal respectievelijk 9 en 18. Wegens autolyse, het verloren gaan van weefselstukjes of doordat soms werd vergeten het weefsel uit te snijden, was het niet mogelijk om elk der betreffende organen te onderzoeken. Niettemin konden in alle gevallen voldoende weefsels worden onderzocht om een betrouwbare indruk te krijgen over de uitbreiding van het proces. Het aantal ratten met

TABEL 18.

Vóórkomen van lymphoïde celwoekeringen in de diverse organen bij de ratten, gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een neoplasma.

Onderzocht orgaan	Geen thymectomie			Thymectomie 10 dagen na injectie van het virus			Thymectomie 50 dagen na injectie van het virus		
	Aantal	+	%	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Aantal ratten *	37			9			18		
Thymus	37	37	100	—	—	—	—	—	—
Thymus(rest?)	—	—	—	2	2**	100	4	4***	100
Lymphklieren	37	37	100	8	8	100	17	17	100
Milt	33	22	67	9	9	100	17	16	94
Lever	30	20	67	9	9	100	18	16	89
Peyersche plaques	21	15	71	6	3	50	7	3	43
Beenmerg (sternum)	23	14	61	9	9	100	16	12	75
Longen	27	22	81	9	8	89	16	13	81
Nieren	22	8	36	8	2	25	12	4	33
Leptomeninx	16	2	13	7	4	57	12	5	42

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

** Dit maligne veranderde thymusweefsel werd aangetroffen bij microscopisch onderzoek. Voor nadere gegevens verwijzen we naar de tekst op blz. 84.

*** Drie ratten toonden een grote mediastinale tumor, die suspect was voor een thymusgezwel. Voor nadere gegevens zie tekst op blz. 84 en 85.

Eén rat toonde maligne veranderd thymusweefsel bij histologisch onderzoek. Voor nadere gegevens wordt verwezen naar de tekst op blz. 85.

TABEL 19.

Vóórkomen van lymphoïde celwoekeringen in de diverse lymphklieren bij ratten, gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een lymphocytair neoplasma.

Onderzochte lymphoglandulae	Geen thymectomie			Thymectomie 10 dagen na injectie van het virus			Thymectomie 50 dagen na injectie van het virus		
	Aantal	+	%	Aantal	+	%	Aantal	+	%
Aantal ratten *	37			9			18		
Cerv. super.	25	21	84	8	8	100	16	14	88
Cerv. profund.	23	17	74	8	8	100	15	11	73
Mediastin.	25	22	88	8	8	100	15	10	67
Axillar.	25	16	64	7	7	100	17	11	65
Mesenter.	25	18	72	6	6	100	17	14	82
Retroperiton.	25	18	72	7	7	100	16	12	75
Inguinal.	24	12	50	7	7	100	16	7	44

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

TABEL 20.
Frequentie der leukaemische bloedveranderingen.

	Aantal ratten *	Onderzocht	+	%
Geen thymectomie	37	19	12	63
Thymectomie 10 dagen na injectie	9	8	6	75
Thymectomie 50 dagen na injectie	18	12	9	75

* Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.

een leukaemisch bloedbeeld is vermeld in tabel 20. Het aantal leukocyten varieerde van 40.000 tot ontelbaar vele per mm^3 . Normaal bedraagt dit aantal ten hoogste 20.000 per mm^3 . Er werd geen differentiële telling verricht, maar bij de beoordeling der uitstrijkpreparaten was het zonder meer duidelijk, dat minstens 90 % der witte bloedcellen tot de lymphatische reeks behoorde.

Men krijgt de indruk, dat de orgaanuitbreiding bij de niet geopereerde dieren over het algemeen geringer was, dan bij de ratten, bij wie de thymus was verwijderd. Dit komt vooral tot uiting ten opzichte van de ratten bij wie de thymus 10 dagen na de injectie was verwijderd (zie Tabel 18 en 19).

De thymuszwellung bij de niet geopereerde dieren had tot gevolg, dat er meestal een ernstige dyspnoe ontstond. Het leek erop, dat we met een betrekkelijk vroeg optredend symptoom te maken hadden, waardoor de ziekte bij de niet geopereerde dieren korter na de injectie manifest werd. Hier hangt misschien ook mee samen, dat de orgaanuitbreiding bij deze dieren over het algemeen geringer was, dan bij de dieren bij wie de thymus was verwijderd. Bij enkelen der onverwacht overleden ratten bleken de maligne veranderingen namelijk beperkt te zijn tot de thymus en zijn regionale lymphklieren. Vanwege deze bevindingen werd op de 160e dag na de injectie, toen bij vrijwel alle niet geopereerde ratten een neoplasma was geconstateerd, besloten de proef te beëindigen. Alle nog levende dieren werden gedood en uitvoerig histologisch onderzocht. Bij de 3 dieren, overgebleven in de groep van 40, waarbij geen thymectomie was verricht, werden geen maligne afwijkingen gevonden. Van de 25 ratten, die nog resten in de groep van 34, waarbij thymectomie was verricht 10 dagen na de injectie, toonden er 4 een neoplasma. Onder de 27 ratten overgebleven van de groep van 45, bij wie 50 dagen na de injectie de thymus was verwijderd, bleken er 3 een neoplasma te hebben.

In tabel 21 treft men een overzicht aan van deze bevindingen. In figuur 5 zijn deze in grafiek gebracht. Deze figuur heeft alleen betrekking op de ratten, gedood wegens ziektesymptomen of „spontaan” gestorven ten gevolge van een neoplasma. In tabel 22 zijn de afzonderlijke latentietijden weergegeven.

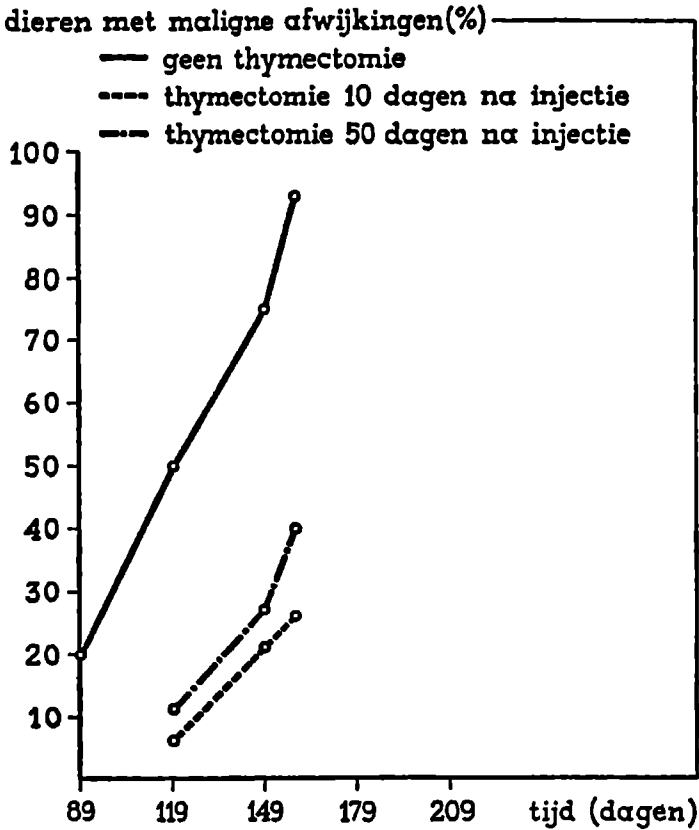
TABEL 21.

	Geen thymectomie		Thymectomie 10 dagen na injectie		Thymectomie 50 dagen na injectie		Totaal aantal gethymectomeerde ratten	
Aantal ratten *	40		34		45		79	
Ratten onverwacht overleden, of gedood wegens symptomen van een neoplasma:	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%
89 dagen	8	20	0	0	0	0	0	0
119 "	20	50	2	6	5	11	7	9
149 "	30	75	7	21	12	27	19	24
159 " na injectie (cumulatieve gegevens)	37	93	9**	26	18***	40	27	34
Gevallen van neoplasma bij ratten, gedood op de 160e dag na injectie	0		4****		1		5	
Totaal aantal ratten waarbij een neoplasma werd geconstateerd	37	93	13	38	19	42	32	41

- * Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten.
- ** Twee der ratten toonden bij histologisch onderzoek maligne veranderd thymusweefsel. Voor nadere gegevens verwijzen we naar de tekst op blz. 84.
- *** Bij drie der ratten werd een grote mediastiane tumor aangetroffen, die suspect was voor een thymusgezwel. Nadere gegevens treft men aan in de tekst op blz. 84 en 85. Eén der ratten toonde naast een uitgebreide lymphosarcomatose, een tumor in de thymusstreek, die suspect was voor een thymusgezwel. Voor nadere gegevens wordt verwezen naar de tekst op blz. 85.
- **** Bij één der ratten bleek een lymphosarcoma aanwezig te zijn, dat beperkt was tot de thymusstreek. De tumor werd aangetroffen bij histologisch onderzoek. Het beeld was suspect voor een thymusgezwel. Zie tekst op blz. 84.

Zoals uit de tabellen 18 en 21 blijkt, werd bij 7 ratten, die tot de gethymectomeerde groepen behoorden, thymusweefsel aangetroffen. Bij 2 ratten, geopereerd 10 dagen na de injectie en gedood onder het beeld van lymphosarcomatose, werd in de coupes door het bovenste mediastinum een lymphatische tumor aangetroffen, die een lobulaire bouw toonde, zoals vaak in een thymusgezwel wordt gevonden. Bij één der ratten van deze groep, gedood op de 160e dag na de injectie, werd een lymphatisch gezwel waargenomen, dat beperkt was tot de thymusstreek. De tumor werd gevonden bij microscopisch onderzoek en toonde eveneens een lobulaire bouw. Bij 3 ratten van de groep, waarbij 50 dagen na de injectie thymectomie was verricht, werd een grote mediastinale tumor aangetroffen, die wegens de lobulaire bouw zeer verdacht

FIGUUR 5.



Cumulatief percentage ratten bij wie gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen na de injectie een neoplasma was geconstateerd. Bij alle ratten was het virus binnen 3 dagen na de geboorte ingespoten. De proef werd beëindigd op de 160ste dag na de injectie.

was voor een thymusgezwel. De dieren werden gedood wegens ernstige dyspnoe. Eén rat van deze groep, gedood onder het beeld van lymphosarcomatose, toonde een tumor in de thymusstreek, die wegens de lobulaire bouw sterk herinnerde aan thymusweefsel. Waarschijnlijk was de thymectomie bij deze dieren niet volledig geweest. Al deze dieren zijn echter bij de beoordeling der resultaten van de proef beschouwd als radicaal geopereerd.

Bij de ratten, die 50 dagen na de injectie werden geopereerd, bleek de thymus vrij stevig van consistentie te zijn. Het orgaan werd meestal verwijderd in fragmenten, die voldoende intact waren voor histologisch onderzoek. Bij 56 der 60 dieren, bij wie de thymus op de 50e dag na injectie was ver-

TABEL 22.

Afzonderlijke latentietijden in dagen bij ratten, gedood wegens ziektesymptomen of onverwacht gestorven t.g.v. een neoplasma.

l = lymphocytair neoplasma

a = classificatie niet mogelijk wegens autolyse

Geen thymectomie			Thymectomie 10 dagen na injectie			Thymectomie 50 dagen na injectie		
1.	63	dg. a	1.	92	dg. l	1.	91	dg. l
2.	72	" l	2.	113	" l	2.	102	" l
3.	72	" l	3.	124	" a	3.	104	" l
4.	72	" l	4.	132	" l	4.	105	" l
5.	74	" l	5.	141	" l	5.	114	" l
6.	75	" l	6.	146	" l	6.	125	" l
7.	81	" l	7.	147	" l	7.	135	" l
8.	87	" l	8.	151	" l	8.	138	" l
9.	93	" l	9.	155	" l	9.	139	" l
10.	94	" l				10.	139	" l
11.	95	" l				11.	145	" a
12.	98	" l				12.	145	" l
13.	101	" l				13.	150	" a
14.	101	" l				14.	150	" l
15.	102	" l				15.	153	" l
16.	109	" l				16.	153	" l
17.	111	" l				17.	157	" l
18.	113	" l				18.	158	" l
19.	115	" l						
20.	119	" l						
21.	124	" l						
22.	126	" l						
23.	130	" l						
24.	131	" l						
25.	136	" l						
26.	138	" l						
27.	139	" l						
28.	142	" l						
29.	145	" l						
30.	146	" l						
31.	150	" l						
32.	151	" l						
33.	152	" a						
34.	153	" l						
35.	154	" l						
36.	157	" l						
37.	158	" l						

wijderd, toonde dit orgaan locale schorsatrophie. Deze wordt onder normale omstandigheden op deze leeftijd niet waargenomen. Bij één thymus bleek de praëxistente structuur geheel vervangen door een dichte woekering van lymphoïde cellen, die zich uitbreidde buiten de kapsel. Het beeld paste geheel bij een lymphosarcoma. Toen deze rat 3½ maand later werd gedood, is bij histologisch onderzoek niets meer van een maligne proces gebleken. Kennelijk was deze maligne tumor bij de thymectomie geheel verwijderd.

Bij de gethymectomeerde ratten manifesteerde het proces zich over het algemeen later na de injectie, dan bij de niet geopereerde dieren (zie tabel 22 waarin de individuele latentietijden zijn weergegeven). Hieruit mag echter niet zonder meer worden geconcludeerd, dat bij de ratten, bij wie de thymus was verwijderd, de maligne veranderingen op een later tijdstip waren ontstaan. Het is namelijk zeer goed mogelijk, dat de ziekte bij de gethymectomeerde dieren later manifest werd, omdat er geen mediastinale tumor ontstond, die voldoende groot was om dyspnoe en eventueel de dood te kunnen veroorzaken. De dyspnoe was bij de niet geopereerde dieren vaak een vroeg optredend symptoom, waardoor de ziekte relatief kort na de injectie manifest werd. Men mag dus bij de beoordeling van het effect van thymectomie op de tumorinductie niet afgaan op het verschil in latentietijd. Alleen vergelijking van het totaal aantal ratten met een neoplasma in de drie groepen gevonden na het beëindigen der proef, geeft een juist beeld van het resultaat der thymectomie. Wanneer men deze aantallen vergelijkt, blijkt de thymectomie een duidelijk remmende invloed te hebben. Het aantal ratten met een neoplasma in de groepen, bij wie de thymus is verwijderd, is namelijk zeer significant lager, dan bij de niet geopereerde groepen (Student test der gegevens van tabel 21). Het maakt geen verschil of de thymectomie vroeg (10 dagen) of laat (50 dagen) na de toediening van het virus wordt verricht.

B. ONDERZOEK NAAR DE VOLLEDIGHEID VAN DE THYMECTOMIE

(Proef V)

Zoals reeds vermeld, werd bij 7 der in totaal 32 gethymectomeerde ratten, waarbij een neoplasma was opgetreden, een mediastinale tumor aangetroffen, die suspect was voor een thymusgezwel. Kennelijk is de thymectomie bij deze dieren niet volledig geweest. Soms was het wegens structurele veranderingen moeilijk om met zekerheid uit te maken of we met maligne veranderd thymusweefsel of met lymphklieren te maken hadden.

Om een indruk te krijgen van het percentage thymusresten, werd de volledigheid van de thymectomie getoetst bij Osborne Mendel ratten, die niet met het virus waren ingespoten. Hiertoe werden 65 ratten onderzocht, die op de leeftijd van 3 dagen waren gethymectomeerd. De dieren werden gedood, toen ze 50 dagen oud waren. Bij macroscopisch onderzoek was nooit thymusweefsel te herkennen. Het gebied tussen hartbasis en mondbodem werd histologisch op serie onderzocht. Bij 50 ratten (77 %) bleken microscopisch aantoonbare thymusresten aanwezig te zijn. Zij kwamen vooral voor ter hoogte van de larynx en bij de hartbasis. De thymus bleek dus meestal niet volledig verwijderd te zijn.

Op grond van deze bevindingen mag ons inziens worden aangenomen, dat ook onder de gethymectomeerde ratten van proef IV een hoog percentage thymusresten vóórkam. Mogelijk moeten de leukaemie gevallen bij deze dieren worden toegeschreven aan thymusweefsel, dat bij de operatie was achtergebleven. In de gevallen, waarin deze met zekerheid konden worden aangetoond, bleken de thymusresten steeds maligne veranderingen te tonen.

C. ONDERZOEK NAAR DE EVENTUELE INVLOED VAN THYMECTOMIE OP DE LYMPHATISCHE WEEFSELS EN DE ALGHEELE ONTWIKKELING EN GROEI

(Proef VI)

Volgens Metcalf (1958) vormt het thymusepitheel bij muizen een stof, die de lymphopoïese in de diverse lymphatische weefsels stimuleert. Mogelijk geldt hetzelfde voor de rattenthymus en speelt deze „lymphopoïese stimulerende factor” een rol bij de leukaemie inductie. Men kan zich zelfs voorstellen, dat deze factor toeneemt onder invloed van het virus. Uit de proeven van Swaen (1964, 1966) is namelijk gebleken, dat bij de ingespoten ratten proliferatie van het thymusepitheel kan optreden. We kunnen niet uitsluiten, dat de epitheelproliferatie ook tijdens proef IV heeft bestaan, doch zich aan de waarneming onttrok, doordat het epitheel schuil ging onder de lymphoïde celwoekeringen.

Voor het onderzoek naar afwijkingen in de lymphatische weefsels bij gethymectomeerde ratten, waarbij het virus niet was toegediend, werd uitgegaan van twee groepen van respectievelijk ongeveer 25 en 30 Osborne Mendel ratten. Bij de laatste groep werd de thymus op de leeftijd van 3 dagen verwijderd. Het aantal dieren werd gereduceerd door kannibalisme en sterfte als direct gevolg van de operatie. Bij de gethymectomeerde dieren werden twee gevallen van pneumonie geconstateerd na respectievelijk 40 en 110 dagen.

Bij de niet geopereerde dieren werden geen pneumonieën waargenomen. De dieren met pneumonie werden niet betrokken bij de beoordeling der resultaten. Elk der groepen was als gevolg der diverse complicaties tenslotte samengesteld uit ongeveer 20 ratten. De geopereerde en niet geopereerde ratten werden in groepjes van 3 tot 4 willekeurig gekozen dieren gedood na respectievelijk 10, 20, 60, 100 en 140 dagen. Bij bestudering der lymphatische weefsels konden geen duidelijke verschillen worden vastgesteld tussen de dieren van beide groepen.

Ogenschijnlijk is er geen verschil in groei en ontwikkeling tussen ratten bij wie de thymus op jonge leeftijd is verwijderd en niet geopereerde ratten. Om hieromtrent meer exacte gegevens te verkrijgen werd het gemiddelde lichaamsgewicht van Osborne Mendel ratten, bij wie de thymus op de leeftijd van 3 dagen was verwijderd gedurende ongeveer 4½ maand vergeleken met het gemiddelde gewicht van niet geopereerde dieren. De geopereerde en niet geopereerde dieren behoorden respectievelijk tot een groep van 20 ratten, afkomstig van 3 nesten en 15 ratten afkomstig van 4 nesten. Zoals blijkt uit figuur 6 kwamen de gewichtscurven vrijwel geheel overeen.

Korte samenvatting.

In dit hoofdstuk werd de invloed nagegaan van thymectomie ná toediening van het Rauscher virus op de leukaemie inductie bij ratten (Proef IV). De proef werd uitgevoerd met 3 groepen Osborne Mendel ratten. Bij elke groep werd het virus binnen 3 dagen na de geboorte toegediend. Bij twee werd de thymus respectievelijk 10 en 50 dagen na de virusinjectie verwijderd. Het bleek, dat thymectomie een sterk remmende invloed had op het ontstaan der maligne lymphoïde celwoekeringen. Het maakte echter geen verschil of de thymus kort (10 dagen) of lang (50 dagen) na de injectie werd verwijderd.

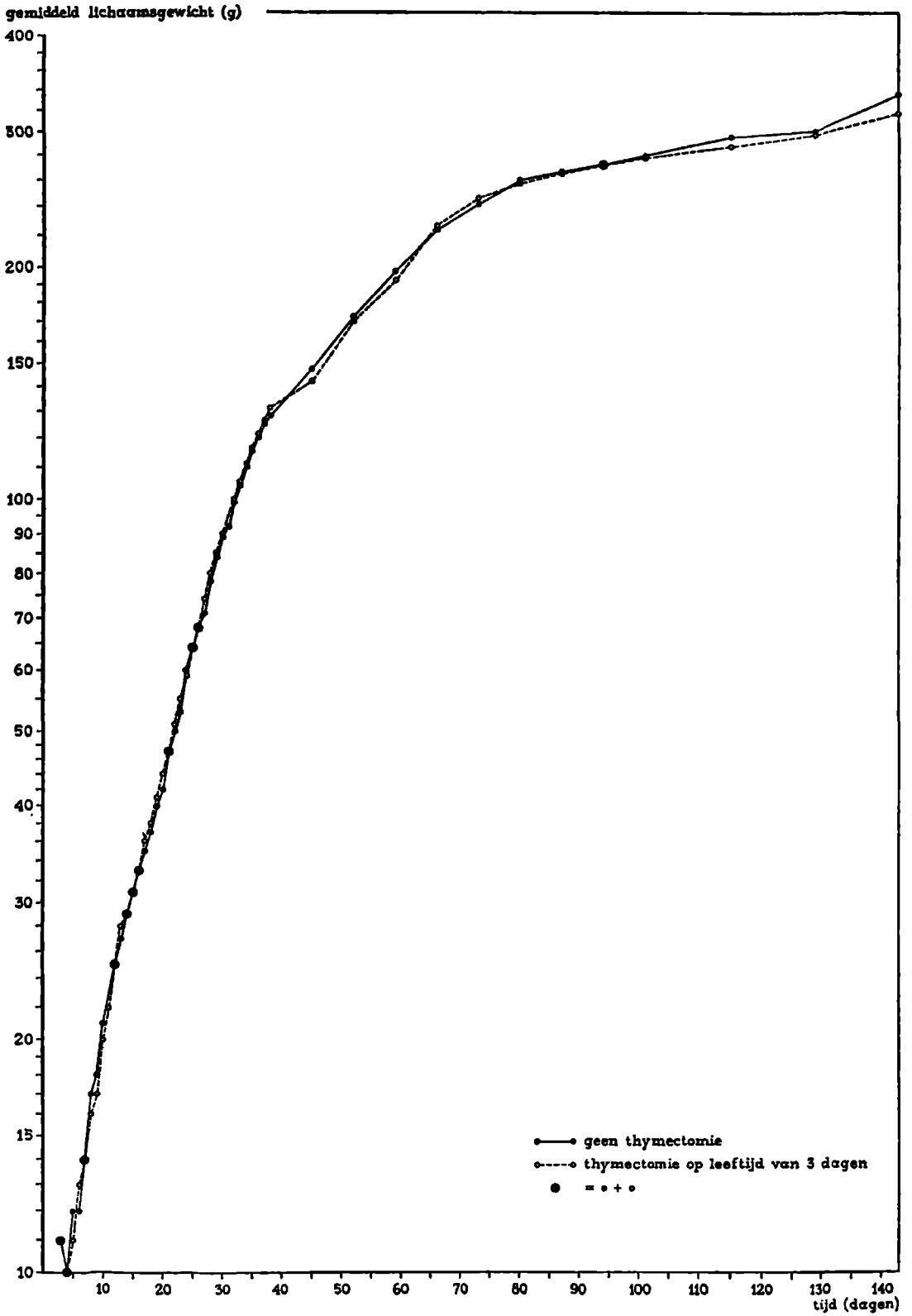
Bij histologisch onderzoek van het thymusweefsel, dat 50 dagen na de injectie was verwijderd, werd éénmaal een lymphosarcoma geconstateerd. Toen deze rat 3 maanden later werd geobduceerd, bleek bij histologisch onderzoek geen spoor van een tumor meer aanwezig te zijn.

Bij 22 % der gethymectomeerde ratten, bij wie een neoplasma was ontstaan werd maligne veranderd thymusweefsel aangetroffen, zodat we mogen aannemen, dat de thymectomie onvolledig is geweest.

Bij de overige ratten was het vaak niet mogelijk om met zekerheid uit te maken of we met maligne veranderd thymusweefsel te maken hadden of met lymphklieren waarvan de praeëxistente structuur door de neoplastische celwoekering verloren was gegaan.

Om een indruk te krijgen van de volledigheid der thymectomie werd een

FIGUUR 6.



afzonderlijke proef ingezet met niet ingespoten ratten (Proef V). Het bleek, dat de thymectomie in een hoog percentage (77 %) onvolledig was geweest.

Verder werd een onderzoek verricht naar eventuele veranderingen in de lymphatische weefsels als gevolg van thymectomie bij ratten bij wie het virus niet was toegediend (Proef VI). Ook werd nagegaan of thymectomie op jonge leeftijd invloed heeft op gewicht, groei, etc. Er konden bij de gethymectomeerde ratten noch wat de ontwikkeling der lymphatische organen, noch wat de algehele lichaamsontwikkeling betreft duidelijke afwijkingen worden vastgesteld.

Wel traden er bij de gethymectomeerde ratten frequenter pneumonieën op, dan bij de dieren, waarbij de thymus niet was verwijderd. Dit kwam vooral sterk tot uiting bij de ratten, bij wie het virus was toegediend. De pneumonieën traden op, wanneer de ratten ongeveer 3 maanden oud waren, zodat het niet waarschijnlijk is, dat ze een direct gevolg waren van de thymectomie. Mogelijk hangt de hoge pneumoniefrequentie samen met een verminderde weerstand tegen infecties als gevolg van functionele minderwaardigheid van het ogenschijnlijk normale lymphatische apparaat bij gethymectomeerde dieren.

FIGUUR 6.

Logarithmische curven van het gemiddelde lichaamsgewicht van niet geopereerde ratten en van ratten bij wie de thymus was verwijderd op de leeftijd van 3 dagen. De geopereerde en niet geopereerde dieren behoorden elk tot een groep van ongeveer 20. De ratten werden voor het eerst gewogen op de leeftijd van 3 dagen.

HOOFDSTUK VII

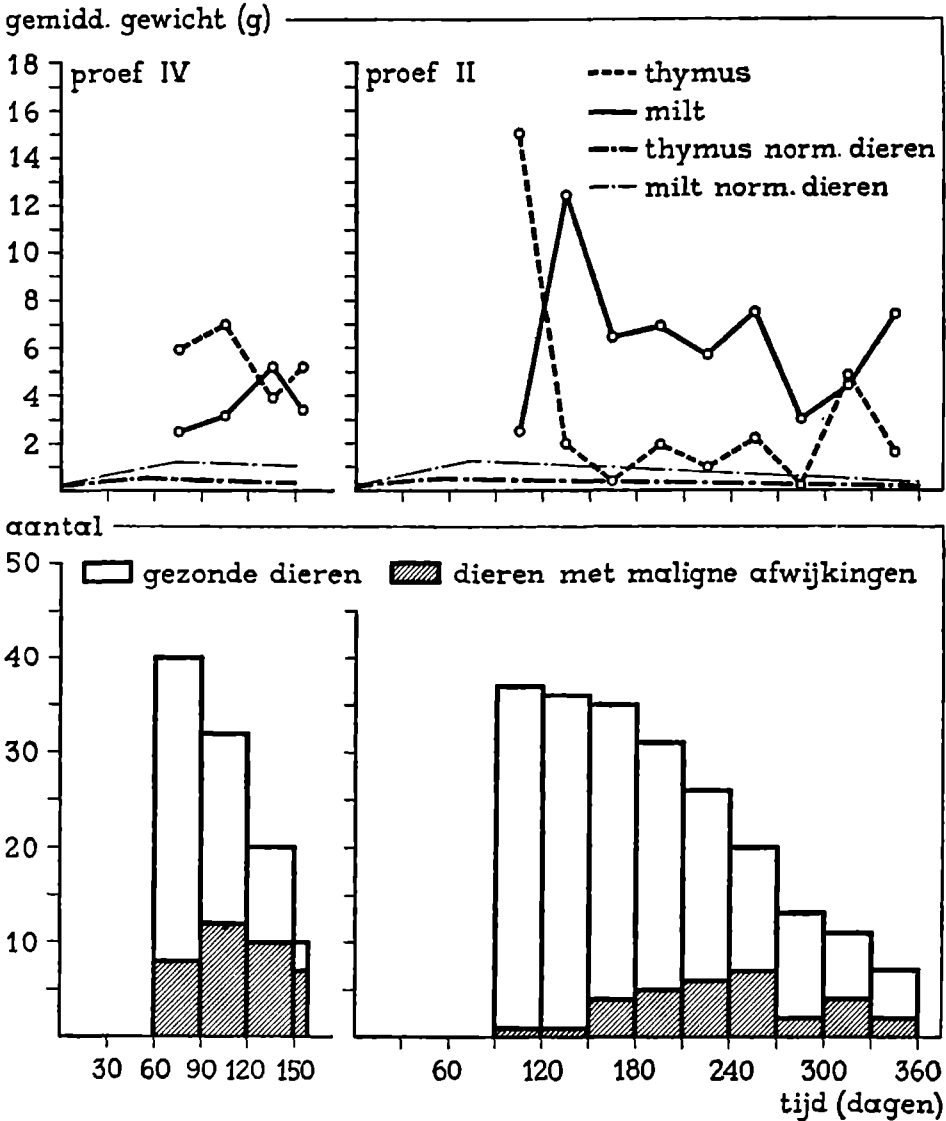
BESPREKING VAN DE RESULTATEN DER PROEVEN

Het morphologische beeld van het maligne proces, dat met het Rauscher virus bij de ratten werd geïnduceerd bij onze experimenten in het voorgaande besproken, was meestal goed in overeenstemming met de bevindingen van de andere onderzoekers. In de overgrote meerderheid der gevallen ontstond een lymphosarcomatose, waarbij maligne veranderingen werden aangetroffen in de thymus. Diverse onderzoekers o.a. Siegler en Rich (1964), Swaen (1964, 1966) hadden gevonden, dat zowel bij ratten als muizen de eerste maligne lymphoïde celwoekeringen ontstaan in de thymus. In 60 tot 70 % der gevallen had het proces aanleiding gegeven tot leukaemische veranderingen in het perifere bloed. Ook waren er veel punten van overeenstemming met hetgeen bij ratten gevonden was na inspuiting van het Gross virus (Goodman c.s. 1963; Gross 1964a en b) en het virus van Moloney (Moloney 1960a en b; Dunn en Moloney 1961). Er werden echter enkele verschilpunten opgemerkt. Bij de bespreking van deze verschillen zullen speciaal de resultaten van proef II (zie Hoofdstuk IV) worden vergeleken met die van proef IV (zie Hoofdstuk VI), daar ze hier het duidelijkst naar voren kwamen. Bij beide proeven werden de viruspreparaten in gelijke verdunning en op dezelfde leeftijd ingespoten. In tegenstelling tot de bevindingen van proef II stemden die van proef IV geheel overeen met de meeste literatuurgegevens over het Rauscher virus.

Eén der verschilpunten was het vóórkomen van een lymphocytair neoplasma, zonder dat de thymus maligne afwijkingen toonde. Dit was het geval bij 2 van de 68 ratten van proef II, bij wie een lymphocytair neoplasma was ontstaan. Eenzelfde bevinding werd ook éénmaal gedaan door Dunn en Moloney (1961) na toediening van het Moloney virus bij muizen. Het blijkt dus, dat een leukaemogeen virus, ogenschijnlijk buiten de thymus om, werkzaam kan zijn op het lymphatische weefsel.

Verder bleek, dat in proef II de thymuszwellings gewoonlijk veel minder sterk was dan in proef IV. Dit is weergegeven in figuur 7.

FIGUUR 7.



De gegevens hebben betrekking op de groep niet geopereerde (contrôle) ratten van proef IV en proef II. Bij alle dieren was het virus ingespoten binnen 3 dagen na de geboorte. In de onderste helft van de figuur is het aantal ratten weergegeven, bij wie gedurende opeenvolgende periodes van 30 dagen een neoplasma was geconstateerd. De dieren waren gedood wegens symptomen van een neoplasma of onverwacht aan een tumor gestorven. In de bovenste helft van de figuur wordt het gemiddelde gewicht van thymus en milt der ratten met maligne afwijkingen vergeleken met het gemiddelde gewicht van deze organen bij normale dieren. Onder de ratten van proef II waarop deze figuur betrekking heeft, kwamen 3 dieren voor met een granulocytair neoplasma. De laatste werden gedood respectievelijk 193, 255 en 290 dagen na de virusinfectie. Bij alle overige ratten was de tumor van lymfocytair aard. Proef IV werd beëindigd op de 160ste dag na de injectie.

Uit figuur 7 valt ook af te lezen, dat de gemiddelde latentieperiode bij proef II ruim tweemaal zo lang was als bij proef IV.

Een ander opmerkelijk verschil was het relatief hoge aantal ratten met een granulocytair neoplasma. Een dergelijk neoplasma werd waargenomen bij 12 van de in totaal 97 ingespoten ratten van proef II. In proef IV traden alleen lymphocyttaire tumoren op. Swaen nam slechts bij 1 op de 180 ratten, die met het Rauscher virus waren ingespoten, een granulocyttaire tumor waar. Levy et al. (1965) inducerden bij hun proeven met het Rauscher virus bij ratten alleen lymphatische tumoren.

Welke factoren bij genoemde verschillen een rol spelen is moeilijk aan te geven. Het is bekend, dat de genetische constitutie van groot belang is zowel voor latentieperiode en mate van thymuszwellung als voor het type neoplasma (Gross 1963, 1964a en b; Moloney 1960a en b; Fiore-Donati 1964). Het is echter zeer onwaarschijnlijk, dat deze factor een rol heeft gespeeld bij onze experimenten. Het Rauscher virus werd steeds ingespoten bij dezelfde ratten (Osborne Mendel). Als mogelijke oorzaak blijft over een verandering in het viruspreparaat. Hier biedt misschien de waarneming van Peries en medewerkers (1965) een aanknopingspunt. Deze onderzoekers spoten het Rauscher virus in bij muizen (Balb/c), nadat het in vitro was gekweekt. Zij stelden bij deze dieren steeds een myeloïde leukaemie vast. Siegler en Rich (1964) vonden echter bij dezelfde muizenstam na injectie van het niet gekweekte agens steeds een lymphocyttaire tumor. Bovendien was de gemiddelde latentieperiode ruim de helft korter dan bij de proeven van Peries c.s. Het is mogelijk dat het viruspreparaat, bereid uit de kweekvloeistof, verschilde van het oorspronkelijk agens, hetzij doordat er tijdens het kweken een verandering was opgetreden in het virus zelf, en/of doordat de concentratie gewijzigd was. Wellicht hebben beide factoren invloed op de mate en de volgorde waarin de diverse reticulaire en haemopoietische weefsels worden aangetast. Voor geen van beide factoren beschikken we in onze experimenten over exacte gegevens. Volgens Rauscher (persoonlijke mededeling) is de bereiding van het viruspreparaat bij alle door ons gebruikte charges op dezelfde wijze geschied en werd steeds uitgegaan van hetzelfde soort weefsel (leukaemische thymus). Niettemin verschilden, zoals reeds vermeld, de latentietijden bij de verschillende proeven aanzienlijk. Rauscher (1963) toonde aan, dat de latentietijd afnam, naarmate de dosering van het door hem geïsoleerde virus hoger was. Mogelijk vormt dit een aanwijzing, dat de virusconcentratie in de diverse gebruikte preparaten wel degelijk varieerde.

In tegenstelling tot de bevindingen van Swaen (1964, 1966) werd bij onze experimenten met het Rauscher virus nooit een epitheliaal thymuszwell

gezien. Dit kan zeer goed samenhangen met de verschillende proefopstelling. Swaen doodde de ratten op van tevoren vastgestelde tijdstippen en vaak lang voor het klinisch manifest worden der leukaemie. Bij onze experimenten werden de dieren gedood, wanneer ze moribund waren. Het proces was dus steeds in een vergevorderd stadium, zodat het mogelijk is, dat eventuele epitheliale celproliferaties overwoekerd waren door de lymphocyttaire tumor.

Een bijzondere waarneming tijdens de experimenten was het vóórkomen van osteomyeloreticulosen. Deze afwijking werd, voor zover ons bekend, nog niet beschreven bij experimenten met leukaemogene virussen bij knaagdieren. Deze afwijking komt ook bij de mens voor en wordt door sommigen onder wie Rohr (1956) als maligne beschouwd. Het proces kan overgaan in een myeloïde leukaemie. Een osteomyeloreticulose werd waargenomen bij 4 der 324 ratten bij wie het Rauscher virus was ingespoten. In 3 gevallen ging de afwijking gepaard met infiltrerende granulocyttaire woekeringen, die als leukaemie geassocieerd werden. Bij één rat kwam de afwijking gecombineerd voor met een lymphosarcomatose. Het is opmerkelijk, dat met hetzelfde virus zowel lymphatische en myeloïde leukaemieën als osteomyeloreticulosen geïnduceerd kunnen worden en ook combinaties van deze afwijkingen. Deze waarneming biedt steun voor de opvatting van Rohr (1956), dat de myeloïde leukaemie en de osteomyeloreticulose bij de mens eenzelfde aetiologie hebben.

Zoals reeds vermeld, blijkt vooral de milt betrokken te zijn bij de verhoogde haemopoietische activiteit, die waargenomen wordt tijdens de eerste fase van het proces dat optreedt bij ratten, ingespoten met het Rauscher virus. De toename der activiteit betreft vooral de erythropoïese. Opmerkelijk is dat in de lever, waar bij jonge ratten onder normale omstandigheden erythropoïese vóórkomt, geen veranderingen optreden. De bloedvorming verdwijnt hier ook op het normale tijdstip. Ook in het beenmerg wordt celhyperplasie gezien, maar deze is betrekkelijk gering en beperkt zich niet tot één bepaalde celreeks. Welk selectief mechanisme hier een rol speelt is niet duidelijk. Het lijkt erop, dat het virus een bijzondere affiniteit heeft voor de milt en speciaal voor de erythropoietische cellen in dit orgaan. Een andere mogelijkheid is, dat deze cellen het meest gevoelig zijn voor het virus. Om te weten te komen of de milt een speciale rol speelt bij de veranderingen der tweede fase, dus bij de eigenlijke tumorinductie, werd het effect van splenectomie nagegaan. Neemt men aan, dat het virus in miltcellen veranderingen teweegbrengt, die essentieel zijn voor de tumorinductie, dan zal deze verhinderd worden, wanneer men de milt verwijdert vóór toediening van het virus. Veronderstelt men, dat het virus een bijzondere affiniteit heeft voor

de milt, zodat dit orgaan zou gaan optreden als een soort virusreservoir, dat van belang is voor de inductie van de maligne veranderingen, dan zou het effect van splenectomie vóór de virustoediening zijn, dat de tumorinductie vertraagd wordt. Men zou dan eveneens een vertragend effect verwachten van splenectomie ná de virusinjectie. Zoals uit de resultaten van proef I en II is gebleken heeft splenectomie, of deze nu vóór of ná de virustoediening wordt verricht, geen duidelijke invloed op de inductie der maligne veranderingen. Het maakt zelfs geen verschil of de milt vroeg (1 dag) of laat (50 dagen) na de virusinjectie wordt verwijderd. Men mag dus concluderen, dat de milt geen speciale rol speelt bij het ontstaan van de neoplastische veranderingen na toediening van het Rauscher virus bij ratten.

Deze bevindingen komen niet overeen met het resultaat, dat Fey en Graffi bereikten door splenectomie bij muizen aan wie het Graffi virus was toegediend. Deze onderzoekers werkten echter met een muizenstam, waarbij alleen myeloïde leukaemieën werden geïnduceerd. Zij namen waar, dat de miltverwijdering een sterk remmend effect had wanneer deze direct vóór of na de virusinjectie werd verricht. Er kon geen invloed worden aangetoond van splenectomie 50 dagen na de injectie. Mogelijk berusten de afwijkende resultaten van Fey en Graffi op het verschillende type virus, het gebruik van een andere diersoort en het verschillende type van het geïnduceerde neoplasma.

Uit de resultaten van proef III (zie Hoofdstuk IV) is gebleken dat het ontstaan van maligne afwijkingen onder invloed van het Rauscher virus niet wordt beïnvloed door de thymus te verwijderen vóór toediening van het agens. Deze bevinding is niet in overeenstemming met de waarneming van Gross (1961a, 1963). Deze onderzoeker constateerde een duidelijke remming van de tumorinductie onder invloed van het door hem geïsoleerde agens bij muizen wanneer de thymus vóór de inspuiting van het virus werd verwijderd. Het ligt voor de hand dit afwijkend resultaat toe te schrijven aan het gebruik van een ander proefdier en een ander virus.

Thymectomie bij ratten, uitgevoerd ná de injectie van het Rauscher virus heeft een sterk remmend effect op de tumorinductie. Dit bleek uit de resultaten van proef IV (zie Hoofdstuk VI). Een dergelijk effect was reeds bekend van thymectomie ná toediening van het Gross virus en het virus van Moloney bij muizen (Levinthal 1959; Gross 1961a, 1963; Moloney 1960a en b).

Om het verschillende effect van onze thymectomieproeven te verklaren kan men de volgende mogelijkheden overwegen:

1. De gebruikte viruspreparaten waren niet geheel vergelijkbaar. Een aan-

wijzing hiervoor vormt het feit, dat de gemiddelde latentieperiode bij proef III meer dan de helft langer was dan bij proef IV. Zoals hierboven reeds uiteengezet, zou dit kunnen berusten op een verschil in virusconcentratie. Deze zou op haar beurt weer invloed hebben op de mate en volgorde waarin de diverse organen worden aangetast en eventueel op de rol die de thymus speelt bij de tumorinductie.

2. De tijdsrelatie tussen het moment waarop het Rauscher virus wordt ingespoten en het tijdstip van de thymectomie is zeer belangrijk. Hierdoor wordt bepaald of de thymus de tumorinductie wel of niet beïnvloedt.

Naar aanleiding van de waarneming, dat de leukaemogenese vrijwel altijd begint in de thymus, hebben sommige onderzoekers (Dunn en Moloney 1961; Swaen 1966) verondersteld, dat de lymphocyten in de thymus het meest gevoelig zijn voor tumorinductie onder invloed van een virus. Mogelijk heeft het virus een grotere affiniteit voor deze lymphocyten, dan voor de lymphocyten elders in het lichaam. In deze richting verder speculerend kan men zich voorstellen, dat het grootste deel van het ingespoten Rauscher virus terecht komt in de thymus met als gevolg, dat de concentratie in de andere reticulaire weefsels, op het tijdstip dat deze gevoelig zijn voor tumorinductie, te gering is om hier maligne veranderingen teweeg te brengen.

Wordt de thymus echter verwijderd vóór de virusinjectie, dan zal een belangrijk grotere hoeveelheid van het virus de overige reticulaire weefsels bereiken, waar het zijn werking kan ontplooien.

Omtrent het mechanisme der remmende invloed van thymectomie ná injectie van het virus op de leukaemie inductie kan men de volgende mogelijkheden overwegen:

1. Dit berust op verwijdering der cellen, die het meest ontvankelijk zijn voor maligne verandering onder invloed van het virus. Hiervoor zou kunnen pleiten de waarneming, dat bij één der ratten 5 maanden ná de injectie van het virus geen maligne afwijkingen werden gevonden, hoewel in de thymus, die 50 dagen ná de injectie was verwijderd, een lymphosarcoma was aangetroffen. Het virus had dus betrekkelijk kort na de injectie maligne veranderingen teweeg gebracht in de thymus. De tumor was bij de thymectomie kennelijk volledig verwijderd en 3½ maand later konden er geen maligne veranderingen worden aangetoond in de diverse reticulaire weefsels buiten de thymus (zie Hoofdstuk VI). De veronderstelling, dat de lymphocyten in de thymus bijzonder ontvankelijk zijn voor de tumorinductie past ook bij de literatuurgegevens, dat thymectomie bij muizen niet alleen een sterk remmend effect heeft op de leukaemie inductie onder invloed van het Gross virus en het virus van Moloney, maar ook het celttype der geïnduceerde leukaemie

beïnvloedt. Behalve een aanzienlijke verlenging van de latentietijd werden er meer myeloïde leukaemieën waargenomen. Een effect van thymectomie op het type tumor werd door ons niet waargenomen. Dit kan echter goed samenhangen met het feit, dat de proef om reeds genoemde redenen betrekkelijk vroeg werd beëindigd. De myeloïde leukaemieën verschijnen gewoonlijk laat en hadden misschien geen kans gehad om zich te ontwikkelen.

2. Het virus vermenigvuldigt zich vooral in de thymus, zodat door het wegnemen van dit orgaan de bron van het leukaemogene agens wordt verwijderd. Uit proeven, die voorafgegaan waren aan onze in het voorgaande besproken experimenten, was gebleken, dat slechts zeer sporadisch leukaemieën werden waargenomen bij ratten die ingespoten waren ná de leeftijd van 14 dagen (zie Hoofdstuk II). Hieruit kan men afleiden, dat een eventuele „virusbron” van geen belang is bij ratten die ouder zijn dan 14 dagen. Uit de resultaten van proef IV (zie Hoofdstuk VI) bleek, dat verwijdering van de thymus bij een dier, dat ongeveer 50 dagen oud is, nog een duidelijk remmend effect heeft op de leukaemie inductie. De remmende werking was evengroot als van thymectomie op jonge leeftijd (ongeveer 10 dagen). Deze twee waarnemingen zijn niet met elkaar te rijmen, indien het effect der thymectomie zou berusten op het verwijderen der virusbron. Het is echter mogelijk, dat de thymus als virusbron van belang is om een eventuele immuuntolerantie, verkregen doordat de ratten kort na de geboorte werden ingespoten, in stand te houden. Verwijdering van de thymus zou kunnen leiden tot verlies van de immuuntolerantie en eliminatie van het virus. Uit proeven van Miller (1959) met het Gross virus is echter bekend, dat althans bij muizen ook virusproductie plaats vindt, wanneer de thymus ná de toediening van het agens is verwijderd.

3. Het virus brengt in de thymus afwijkingen teweeg, die aanleiding geven tot veranderingen elders in het lichaam, met name in de lymphatische weefsels. In dit verband wordt gedacht aan proliferatie van het thymusepitheel. Volgens Metcalf produceert dit epitheel onder normale omstandigheden een stof, die de lymphopoïese in de diverse weefsels stimuleert. Mogelijk speelt deze niet cellulaire factor een rol bij de leukaemie inductie. Zoals blijkt uit het resultaat van proef VI (zie Hoofdstuk VI) kon bij de ratten geen invloed aangetoond worden van thymectomie op de ontwikkeling der lymphatische organen. Ratten bij wie de thymus kort na de geboorte was verwijderd, onderscheidden zich ook niet in ontwikkeling en groei van ratten bij wie geen thymectomie was verricht (proef VI, zie Hoofdstuk VI). De enige bevinding, die op een eventuele insufficiëntie van het lymphatisch apparaat bij gethymectomeerde ratten zou kunnen wijzen, was het frequenter vóórkomen van pneumonieën bij deze dieren. Mogelijk speelt een onder invloed van het virus verhoogde

productie van een factor, die de lymphopoïese bevordert, een rol bij de tumor-inductie. Bij deze veronderstelling past dezelfde waarneming, die gerefereerd werd onder 1. Het uitblijven van maligne afwijkingen in de diverse reticulaire organen, lang nadat een maligne veranderde thymus was verwijderd, zou kunnen berusten op het wegnemen van deze humorale factor. Dat er onder invloed van het virus proliferatie van het thymusepitheel kan optreden is gebleken uit het onderzoek van Swaen (1964, 1966). Men kan niet uitsluiten, dat epitheelproliferatie ook tijdens onze experimenten heeft bestaan, doch zich aan de waarneming onttrok, doordat het epitheel schuil ging onder de lymphoïde celwoekeringen.

4. Door het virus ontstaan veranderingen in de thymus, waardoor de belangrijke rol die dit orgaan speelt bij het immunologisch reactievermogen van het lichaam, wordt verstoord. Sommigen, waaronder Miller en Dukor (1964) veronderstellen, dat in het organisme voortdurend cellen ontstaan met abnormale antigene eigenschappen, waartoe ook tumorcellen behoren. Deze abnormale cellen zouden bij een goed functionerende thymus worden geëlimineerd door immunologische processen. Deze veronderstelling houdt onder meer in, dat een goed functionerende thymus van belang is bij het voorkómen van neoplasmata. Indien dit ook van toepassing zou zijn op de leukaemie, dan zou men verwachten, dat door verwijdering van de thymus de leukaemiefrequentie toeneemt. Een tegengesteld effect werd echter gevonden zowel bij de „spontane” leukaemie, als bij de leukaemie geïnduceerd door een virus.

Aan de hand van bovenstaande overwegingen wordt het waarschijnlijk geacht, dat de belangrijke rol, die de thymus speelt bij de leukaemie inductie moet worden toegeschreven aan de bijzonder sterke gevoeligheid der lymphocyten in de thymus voor leukaemogene virussen. Mogelijk hangt deze sterke gevoeligheid samen met een sterke affiniteit van de leukaemogene virussen voor deze lymphocyten. Wellicht moet ook aan een verhoogde productie door de thymus van een humorale factor een rol worden toegekend bij de tumor-inductie. Het is zeer goed denkbaar dat deze factor zijn werking vooral ontplooit in de thymus zelf (de Vries (1965)). Het betrekkelijk hoge aantal leukaemie gevallen onder de gethymectomeerde ratten menen wij te kunnen toeschrijven aan thymusweefsel, dat bij de operatie is achtergebleven. Zoals uit proef V (zie Hoofdstuk VI) is gebleken werden bij een zeer hoog percentage der gethymectomeerde ratten thymusresten aangetroffen.

HOOFDSTUK VIII

SAMENVATTING

In deze dissertatie werden, voorafgegaan door een bespreking van de literatuur, die betrekking heeft op een aantal leukaemogene virussen, de resultaten meegedeeld van enkele experimenten met het Rauscher virus.

Na een algemene inleiding werd in Hoofdstuk I een literatuuroverzicht gegeven, waarin fysische, chemische en biologische eigenschappen werden vermeld van een tiental leukaemogene virussen. Vooral werd aandacht besteed aan de morphologische veranderingen, die deze agentia teweegbrengen bij enkele knaagdiersoorten (muizen, ratten en hamsters). Uit de diverse literatuurgegevens werd het waarschijnlijk, dat de verschillende agentia álle behoren tot een groep van nauw aan elkaar verwante virussen. Zij kunnen aanleiding geven tot maligne woekeringen van reticulaire cellen of daarvan afgeleide elementen. Bij het celtype der leukaemie, die door een dergelijk virus wordt geïnduceerd, spelen genetische factoren een belangrijke rol. Uit onderzoekingen waarbij de morphologische veranderingen en hun transplanteerbaarheid werden onderzocht op diverse tijdstippen na toediening van een leukaemogeen preparaat was gebleken, dat men twee fasen kan onderscheiden. De eerste fase is gekenmerkt door een hyperplasie van de haemopoietische weefsels. Deze kan aanleiding geven tot een zwelling van lever en milt. De verhoogde haemopoietische activiteit gaat niet steeds gepaard met veranderingen in het perifere bloed. In de tweede fase ontwikkelt zich het maligne proces. Dit kan lokaal blijven of zich uitbreiden over het gehele organisme en gepaard gaan met leukaemische veranderingen in het perifere bloed. Het bleek, dat bij het ontstaan van een lymphatische leukaemie, de eerste maligne lymphoïde celwoekeringen lokaal in de thymus worden gevonden. De maligne veranderingen worden voorafgegaan door een atrophie op verschillende plaatsen in de thymusschors. Naar aanleiding der resultaten van Gross wordt het mogelijk geacht, dat de veranderingen der eerste fase worden teweeggebracht door een apart virus. Dit virus kan als contaminant aanwezig zijn in de diverse celvrije leukaemogene preparaten. Vooral in de preparaten van Friend en van

Rauscher zou dit agens volgens Gross in hoge concentratie vóórkomen. Het proces, dat met deze preparaten bij muizen en ratten wordt geïnduceerd is gekenmerkt door een bijzonder sterke haemopoietische activiteit. Bij ratten beperkt deze zich, althans na toediening van het Rauscher virus, voornamelijk tot de milt en blijkt vooral de erythropoiese in het proces betrokken te zijn.

In Hoofdstuk II werd de vraagstelling bij de diverse experimenten besproken en mededeling gedaan van gegevens, die van betekenis waren voor alle proeven. Tevens werden de morphologische afwijkingen beschreven. Het bleek, dat met het Rauscher virus bij Osborne Mendel ratten zowel lymphatische en myeloïde leukaemieën als een osteomyeloreticulose kunnen worden geïnduceerd en combinaties van deze afwijkingen. Het aantal lymphatische leukaemieën was sterk in de meerderheid. Een enkele maal werd een reticulumsarcoom gevonden.

In de Hoofdstukken III en IV werd de invloed nagegaan van splenectomie, respectievelijk vóór en ná toediening van het Rauscher virus, op de leukaemie inductie bij Osborne Mendel ratten (proef I en II). Het bleek, dat de splenectomie of deze nu vóór of op verschillende tijdstippen ná de virusinjectie werd uitgevoerd, geen duidelijke invloed had op het ontstaan der maligne veranderingen.

In Hoofdstuk V en VI werd het resultaat meegedeeld van thymectomie respectievelijk vóór en ná injectie van het Rauscher agens (proef III en IV). Er werd geen effect op de leukaemie inductie waargenomen, wanneer de thymus werd verwijderd vóórdat het virus werd toegediend. Thymectomie ná de virustoediening had een sterk remmende invloed op de leukaemie inductie. Het maakte geen verschil of de thymus vroeg (10 dagen) of laat (50 dagen) ná de virusinjectie werd verwijderd.

In Hoofdstuk VII werden de resultaten der verschillende proeven besproken. Getracht werd een verklaring te vinden voor het feit, dat met viruspreparaten, die steeds op dezelfde wijze en uit hetzelfde soort materiaal waren verkregen, leukaemieën werden geïnduceerd van verschillend type. Hoewel daarvoor geen exacte gegevens aanwezig waren, werd het mogelijk geacht, dat concentratieverschillen tussen de diverse gebruikte preparaten hierbij een rol spelen. Ook het feit, dat bij het gebruik van sommige viruspreparaten de thymuszwellung meestal veel minder sterk was, dan in de literatuur wordt aangegeven werd in verband gebracht met mogelijke concentratieverschillen.

Een bijzondere waarneming was het optreden van osteomyeloreticulosen. Deze afwijking is, zover ons bekend, nog niet eerder beschreven bij experimenten met leukaemogene virussen bij knaagdieren.

Uit de resultaten van proef I en II werd geconcludeerd, dat de milt geen

bijzondere rol speelt bij de leukaemie inductie bij ratten door het Rauscher virus.

Factoren, die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor het mechanisme der remmende invloed van thymectomie op de leukaemie inductie, werden besproken. Het meest waarschijnlijk werd geacht, dat deze berust op het wegnemen der cellen, die bijzonder gevoelig zijn voor tumorinductie onder invloed van het virus.

SUMMARY

After a general introduction, the literature concerning leukaemogenic viruses is reviewed (chapter I). Attention is paid to physical, chemical and biological properties. In particular the morphological changes are discussed that are caused by these agents in some species of rodents.

From the study of the literature it seems probable that the different agents, all belong to a group of viruses that are closely related to each other. They may give rise to malignant proliferations of reticular cells or their descendants. Genetical factors are of great importance for the determination of the celltype of the leukaemia induced by these viruses.

By experiments concerning the morphological alterations and their transplantability, it has become apparent that two phases can be distinguished. The first phase is characterised by a hyperplasia of the haemopoetic tissues. This may result in an increase in size of spleen and liver. The increased haemopoetic activity is sometimes accompanied by changes in the peripheral blood. In the second phase malignancy develops. This may remain local or may spread over the whole organism leading to leukaemic changes in the peripheral blood.

It became apparent that when lymphatic leukaemia arose, the first malignant changes were confined to local areas of the thymus. These changes were preceded by a focal atrophy of the cortex of the thymus.

From experiments by Gross it seems conceivable that the changes in the first phase are caused by a virus different from the leukaemia virus proper. The virus may be present as a contaminant in several cellfree leukaemic extracts. It is postulated that in particular the Friend and Rauscher preparations are highly contaminated. The changes induced with these extracts in mice and rats is characterised by a very pronounced haemopoetic activity. In rats this activity is confined, at least after the injection of the Rauscher virus, to the spleen. Especially the erythropoiesis is involved.

In the second part of this thesis a number of experiments with the Rauscher agent are reported. For all experiments Osborne Mendel rats were used.

In the second chapter general data concerning these experiments are given. Apparently the Rauscher virus was capable of inducing lymphatic leukaemia, myeloid leukaemia, reticulumcel sarcoma as well as osteomyeloreticulosis.

Besides combinations of these diseases were found. The lymphatic leukaemias were the most frequent. The histology of these conditions is reported. In all but three of the total number (180) of lymphatic leukaemias the thymus appeared to be involved in the process.

In the chapters III and IV the effect of splenectomy upon the leukaemogenesis is investigated. The spleen was removed before as well as after the injection of the Rauscher virus. In the latter group, animals were splenectomised on the first and on the 50th day following administration of the agent. It became evident that splenectomy did not influence the induction of the malignant changes.

In chapter V and VI results are presented of thymectomy prior to and after the injection of the Rauscher agent. No effect upon the induction of leukaemia was observed when the thymus was removed before the virus was injected. When the thymus was removed after the virus was administered, an inhibiting effect upon the leukaemia induction became apparent. It was of no concern whether the animal was thymectomised 10 days or 50 days after the administration of the virus.

In chapter VII the results of the various experiments are discussed.

It is concluded that the presence of the spleen and in consequence the hyperplasia of the haemopoetic system which is seen in this organ during the first stage of the process is not of paramount importance to the leukaemia induction by the Rauscher agent.

Factors possibly responsible for the inhibiting effect of thymectomy following virus injection upon the leukaemia induction are discussed.

The inhibition is considered to result most likely from the removal of the thymic lymphocytes, which are apparently most sensible to the virus action.

An explanation is sought for the observation that thymectomy prior to virus injection does not influence the tumor induction.

The dissimilarity in latency period and celltype of the leukaemia induced among the animals of the different experiments is tentatively explained by a difference in virus concentration of the batches used.

The occurrence of osteomyeloreticulosis seems of particular interest. This phenomenon was not described before in rodents injected with leukaemogenic viruses.

LITERATUURLIJST

- Apitz, K. (1939) Zur Histogenese der Knochenveränderungen bei Osteoklerotischer Anaemie. *Verh. Path. Gesellsch.* 31: 486.
- Arnesen, K. (1958) Preleukemic and early leukemic changes in the thymus of mice. A study of the AKR/O strain. *Acta Path. et microbiol. Scand.* 43: 350-363.
- Auerbach, R. (1961) Experimental analysis of the origin of cell types in the development of the mouse thymus. *Developmental Biol.* 3: 336-354.
- Baillif, R. N. (1949) Thymic involution and regeneration in albino rat following injection of acid colloidal substances. *Am. J. Anat.* 84: 457-510.
- Barnes, W. A., and Furth, J. (1937) A transmissible leukemia in mice with atypical cells. *Am. J. Cancer* 30: 75-94.
- Bather, R. (1961) Observation on murine monocytic leukaemia induced by a virus isolated from S37 sarcoma. *The British J. of Cancer* 15: 114-119.
- Bernhard, W. (1958) Electron Microscopy of tumor cells and tumor viruses. A review. *Cancer Research* 18: 491-509.
- Bernhard, W. (1960) The detection and study of tumor viruses with the Electron Microscope. *Cancer Research* 20: 712-727.
- Bernhard, W., and Gross, L. (1959) Présence de particules d'aspect viral dans les tissus tumoraux de souris atteintes de leucémies induites. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 248: 160-163.
- Bitner, J. J. (1936) Some possible effects of nursing on mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84: 162.
- Buffett, R. F. (1959) Transplantable reticulum-cell sarcoma variant of Friend's disease leukemia. *Proc. Am. Ass. Cancer Research* 3: 10.
- Buffett, R. F., Commerford, S. L., Furth, J., and Hunter, M. J. (1958) Agent in Ak leukemic tissues, not sedimented at 105.000 g, causing neoplastic and non neoplastic lesions. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 99: 401-407.
- Buffett, R. F., and Furth, J. (1959) A transplantable reticulum-cell sarcoma variant of Friend's viral leukemia. *Cancer Research* 19: 1063-1069.
- Dalton, A. J., Law, L. W., Moloney, J. B., and Manaker, R. A. (1961) An electron microscopic study of a series of murine lymphoid neoplasms. *J. Nat. Canc. Inst.* 27: 747-791.
- Dalton, A. J., Haguenu, F., and Moloney, J. B. (1962) Morphology of particles associated with murine leukemia revealed by negative staining. Preliminary Report. *J. Nat. Canc. Inst.* 29: 1177-1180.
- Dameshek, W. (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndroms. *Blood* 6: 373-375.

- Dawe, C. J., Law, L. W. and Dunn, T. B. (1959) Studies of parotid-tumor agent in cultures of leukemic tissues of mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 23: 717-797.
- de Harven, E., and Friend, C. (1958) Electron microscopic study of a cell-free induced leukemia of the mouse; A preliminary report. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.* 4: 151-156.
- de Harven, E., and Friend, C. (1960) Further electron microscopic studies of a mouse leukemia induced by cell-free filtrates. *J. of Biophys. and Biochem. Cytology* 4: 151-155.
- Dmochowski, L., and Grey, C. E. (1957) Electron microscopy of tumours of known and suspected viral etiology. *Tex. Rep. Biol. and Med.* 15: 704-756.
- Dmochowski, L., and Grey, C. E. (1957b) Subcellular structures of possible viral origin in some mammalian tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68: 559-615.
- Dmochowski, L., and Grey, C. E. (1958) Studies on submicroscopic structures of leukemia of known or suspected viral origin. A review. *Blood* 13: 1017-1042.
- Dmochowski, L., Gross, L., and Padgett, F. (1962) Electron microscopic studies of rat leukemia induced with mouse leukemia virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 110: 504-508.
- Dunn, T. B. (1954) Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice with a classification and discussion of neoplasms. *J. Nat. Canc. Inst.* 14: 1281-1433.
- Dunn, T. B. (1961) The conservative pathologist and the morphology of tumours produced by three cancer viruses in mice. *Tex. Reports of Biol. and Med.* 19: 217-231.
- Dunn, T. B., Moloney, J. B., Green, A. W., and Arnold, B. (1961) Pathogenesis of a virus-induced leukemia in laboratory mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 26: 189-222.
- Dunn, T. B., and Moloney, J. B. (1961) Pathogenesis of a virus-induced leukemia in rats. *Proc. Int. Conf. on the morphological precursors of cancer; Perugia.* 259-268.
- Ellermann, V., und Bang, O. (1908) Experimentelle Leukämie bei Hühner. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Erste Abteilung* 46: 595-609.
- Engelbreth-Holm, J. (1948) Is it possible to transmit or accelerate the development of mouse leukemia by tissue extracts? *Blood* 3: 862-866.
- Feldman, D. G., Gross, L., and Dreyfuss, Y. (1963) Electron microscopic study of the Passage A mouse leukemia virus in mammary glands of pregnant, virus injected C₃H(F) mice. *Cancer Research* 23: 1604-1607.
- Feldman, D. G., and Gross, L. (1964) Electron microscopic study of the mouse leukemia virus (Gross) and of tissues from mice with virus-induced leukemia. *Cancer Research* 24: 1760-1784.
- Fey, F. (1957) Untersuchungen zur Pathogenese der durch Zellfreie Tumorfiltrate erzeugten Leukämien der Maus. *Naturwissenschaften* 44: 541.
- Fey, F., and Graffi, A. (1958) Beeinflussung der myeloischen Filtratleukämie der Maus durch Splenektomie. *Naturwissenschaften* 45: 471-472.
- Fieldsteel, A. H. (1963) Viral studies on generalised Friend disease and a tumor variant in Balb/C and related hybrid mice. *Cancer Research* 23: 355-362.

- Fink, M. A., and Rauscher, F. J. (1964) Immune reaction to a murine leukemia virus I. Induction of immunity to infection with virus in the natural host. *J. Nat. Canc. Inst.* 32: 1075-1082.
- Fiore-Donati, L. (1964) Influence of host factors on development and type of leukemia induced in mice by Graffi-virus. *J. Nat. Canc. Inst.* 32: 1083-1107.
- Friend, C. H. (1957) Cell-free transmission in adult Swiss-mice of a disease having the character of a leukemia. *J. Exp. Med.* 105: 307-318.
- Friend, C. H. (1959) Immunological relationship of filterable agent causing leukemia in adult mice. *J. Exp. Med.* 109: 217-228.
- Friend, C. H., and Haddad, J. P. (1960) Tumor formation with transplants of spleen or liver from mice with virus induced leukemia. *J. Nat. Canc. Inst.* 25: 1279.
- Furth, J. (1951) Recent studies on the etiology and nature of leukemia. *Blood* 6: 964-975.
- Furth, J. (1952) Recent experimental studies and current concepts on the etiology and nature of leukemia. *Proc. Inst. Med. Chicago.* 19: 95-104.
- Furth, J., Seibold, H. R., and Rathbone, R. R. (1933) Experimental studies on lymphomatosis of mice. *Am. J. Cancer* 19: 521-604.
- Furth, J., and Kahn, M. C. (1937) The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am. J. Cancer* 31: 276-282.
- Furth, J., Tuggle, A., and Breedis, C. (1938) Quantitative studies on the effect of X-rays on neoplastic cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 38: 490-492.
- Ginsberg, H., and Sachs, L. (1961) In vitro culture of a mammalian leukemia virus. *Virology* 13: 380-382.
- Goodman, S. B. (1963) The histogenesis of Gross's viral induced mouse leukemia. *Cancer Research* 23: 1634-1640.
- Gorp, L. H. M. van, en Swaen, G. J. V. (1964) De leukemogenese bij de rat na injectie van het Rauscher virus en de beïnvloeding hiervan door thymectomie. Veertiende jaarboek van Kankeronderzoek en Kankerbestrijding in Nederland. 159-163.
- Graffi, A. (1957) Chloroleukemia of mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68: 540-558.
- Graffi, A., and Bielka, H. (1957) Zum Verhalten des leukämogenen agens aus filtrierbaren Mäusetumoren gegenüber Glycerin und Gefriertrocknung. *Naturwissenschaften* 44: 382.
- Graffi, A., and Bielka, H. (1959) Versuche zur Frage der Beteiligung von Lipoiden am Aufbau des Virus der myeloische Leukämie der Maus. *Acta Biol. et Med. Germ.* 3: 511-512.
- Graffi, A., and Gimmy, J. (1957) Erzeugung von Leukosen bei der Ratte durch ein leukämogenes Agens der Maus. *Naturwissenschaften* 44: 518.
- Graffi, A., Fey, F., and Hoffmann, F. (1958) Weitere Untersuchungen zur immunologische Charakterisierung des Agens der myeloischen Leukämie der Maus. *Naturwissenschaften* 45: 471.
- Graffi, A., Heine, U., Helmcke, J. G., Bierwolf, D., and Randt, A. (1960) Über den elektronenmikroskopischen nachweis von viruspartikeln bei der myeloische leukämie der Maus nach injektion zellfreier tumorfiltrate. *Klinische Wochenschr.* 38: 254-262.
- Greenspan, I., and Schwartz, S. C. (1961) Demonstration of specific antibody reaction to leukemic tissue extracts. *Proc. Am. Ass. Cancer Research* 3: 230.

- Gross, L. (1951) "Spontaneous" leukemia developing in C₃H mice, following inoculation in infancy, with Ak-leukemic extracts or Ak-embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 76: 27-32.
- Gross, L. (1953a) A filterable agent, recovered from Ak-leukemic extracts causing salivary gland carcinoma in C₃H-mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 88: 362-368.
- Gross, L. (1953b) Necktumours, or leukemia, developing in adult C₃H-mice, following inoculation in early infancy, with filtered (Berkefeld N) or centrifuged (144.000 g) Ak-leukemic extracts. *Cancer* 6: 948-957.
- Gross, L. (1953c) Biological properties of the mouse leukemia agent. *Cancer* 6: 153-158.
- Gross, L. (1953d) Presence of leukemic agent in normal testes and ovaries of young mice of Ak-line. *Acta Haemat.* 10: 18-26.
- Gross, L. (1954) Transmission of Ak-leukemic agent into newborn mice of C₅₇ Brown/cd inbred line. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68: 734-739.
- Gross, L. (1955) Induction of parotid carcinomas and/or subcutaneous sarcoma in C₃H-mice with normal C₃H organ extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 88: 362-368.
- Gross, L. (1956a) Influence of ether in vitro on pathogenic properties of mouse leukemic extracts. *Acta Haemat.* 15: 273-277.
- Gross, L. (1956b) Viral (egg-born) etiology of mouse leukemia. *Cancer* 9: 778-791.
- Gross, L. (1957a) Development and serial cell-free passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 94: 767.
- Gross, L. (1957b) Studies on the nature and biological properties of a transmissible agent causing leukemia following inoculation into newborn mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68: 501-521.
- Gross, L. (1958a) The etiology of cancer and allied disease. Development of a concept based on recent experiments dealing with a cell-free transmission of mouse-leukemia. *Biol. Med. J.* 2: 1-5.
- Gross, L. (1958b) High susceptibility of 1 to 14 days old C₃H mice to "Passage A" leukemia filtrates. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 97: 300-304.
- Gross, L. (1958c) Attempt to recover filterable agent from X-ray induced leukemia. *Acta Haemat.* 19: 353-361.
- Gross, L. (1959a) Serial cell-free passage of a radiationactivated mouse leukemia agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 100: 102-105.
- Gross, L. (1959b) Agglutination action of heat-inactivated Passage A mouse leukemia filtrates on mouse blood cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 101: 113-117.
- Gross, L. (1960a) Biological and pathogenic properties of a mouse leukemia virus. *Acta Haemat.* 23: 259-275.
- Gross, L. (1960b) Development of myeloid (chloro-) leukemia in thymectomized C₃H mice following inoculation of lymphatic leukemia virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* 103: 509-514.
- Gross, L. (1961a) International series of monographs on pure and applied biology. Vol. II; Oncogenic viruses. 153-231. London.
- Gross, L. (1961b) Induction of leukemia in rats with mouse leukemia (Passage A) virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 106: 890-893.
- Gross, L. (1962) In: Tumor viruses of murine origin. Ciba Foundation Symposium (G. E. W. Wolstenholme and Maeve O'connor ed.) pp. 165-166. London.

- Gross, L. (1963) Pathogenic potency and host range of the mouse leukemia virus. *Acta Haemat.* 27: 1-15.
- Gross, L. (1964a) How many different viruses causing leukemia in mice? *Acta Haemat.* 32: 44-62.
- Gross, L. (1964b) Attempt at classification of mouse leukemia viruses. *Acta Haemat.* 32: 81-88.
- Gross, L. (1965) Neutralization in vitro of mouse leukemia virus by specific immune serum. Importance of virus titration. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 119: 420-427.
- Gross, L., Dreyfuss, Y., and Moor, L. A. (1961) Attempt to propagate "Passage A" mouse leukemia viruses on normal mouse embryo-cells in tissue cultures. *Proc. Am. Ass. Cancer Research* 3: 231.
- Houghton, G. (1965) Moloney virus induced leukemia of mice: measurement in vitro of specific antigen. *Science* 147: 506-527.
- Heine, H., Graffi, A., Helmcke, J. C., und Randt, A. (1957) Virusartige Partikeln in Zellfrei Übertragbare Mäuseleukämie. *Naturwissenschaften.* 44: 449-450.
- Jenkins, V. K., and Upton, A. C. (1962) Cell-free transmission of radiogenic myeloid leukemia in the mouse. *Cancer Research* 23: 1740-1755.
- Klein, E., and Klein, G. (1964) Antigenic properties of lymphoma induced by the Moloney agent. *J. Nat. Cancer Inst.* 32: 547-568.
- Krause, L., Krüger, A., and Graffi, A. (1960) Unpublished. Geciteerd uit Miller, J. F. A. P. *Nature* 187: 703.
- Krischke, W., Graffi, A., und Krischke, E. (1957) Untersuchungen über eine Anreicherung des leukämogenen Agens aus Mäusetumoren in Gehirn. *Naturwissenschaften* 44: 400.
- Kuipers, F. C. (1960) Over osteomyeloreticulose. *Acad. Proefschrift Leiden.*
- Kundrat (1893) *Wiener Klin. Wochenschrift* 12 u. 13.
- Latarjet, R. (1959) In "Carcinogenesis: Mechanisms of Action" Ciba Foundation Symposium (G. E. W. Wolstenholme, ed.) pp. 274-299. Boston.
- Latarjet, R., et Chamaillard, L. (1962) Inactivation du virus de Friend par les rayons X et ultraviolette. *Bulletin du Cancer* 49: 382-389.
- Law, L. W. (1959) Some aspects of the etiology of leukemia. *Canad. Cancer. Conferences* 3: 145-169.
- Law, L. W., Rowe, W. P., and Hartley, J. W. (1960) Studies on mouse polyoma virus infection V. Relation of virus infection to lymphocytic neoplasma of the mouse. *J. Exp. Med.* 111: 517-523.
- Levinthal, J. D., Buffett, R. F., and Furth, J. (1959) Prevention of viral lymphoid leukemia of mice by thymectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 100: 610-614.
- Levy, J. P., Boiron, M., Lasneret, J., et Oppenheim, Stella (1965) Histogenèse des leucémies induites par le virus de Rauscher. *C.R. Acad. Sc. Paris* 260: 3511-3514.
- Lieberman, M., and Kaplan, H. S. (1959) Leukemogenic activity of filtrates from radiation-induced lymphoid tumors of mice. *Science* 130: 387-388.

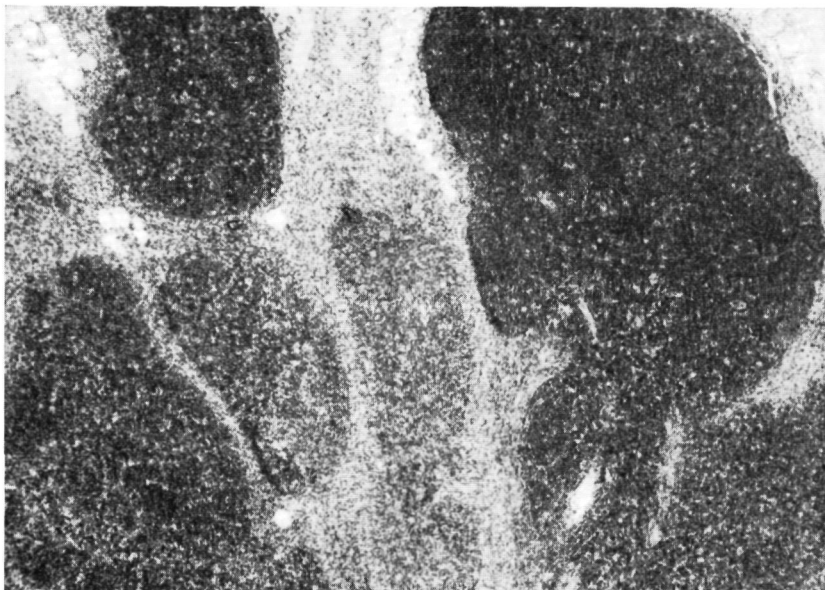
- Lucké, B. (1938) Carcinoma in the leopard frog; its probable causation by a virus. *J. Exp. Med.* 18: 457-468.
- Lwoff, A., Siminovitch, L., and Kjeldgaard, N. (1950) Induction de la production de bacteriophages chez une bacterie lysogène. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 79: 815-859.
- Maduros, B. P., Schwartz, S. O., and Schoolman, H. M. (1958) Studies in leukemia XI. Active immunisation of C₃H x 101 mice against induction of leukemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99: 222-223.
- Manaker, R. A., Strother, P. C., Miller, A. A., and Piczk, C. V. (1960) Behaviour in vitro of a mouse lymphoid-leukemia virus. *J. Nat. Canc. Inst.* 25: 1411.
- Metcalf, D., Buffett, R. F., and Furth, J. (1959) Pathogenesis of mouse leukemia caused by Friend virus. *Cancer Research* 19: 52-58.
- Miller, J. F. A. P. (1961) Etiology and pathogenesis of mouse leukemia. *Advances in Cancer Research* 6: 291-368.
- Miller, J. F. A. P., and Dukor, P. (1964) *Die Biologie des Thymus*. Basel.
- Mirand, E. A., and Grace, J. T., Jr. (1962) Induction of leukemia in rats with Friend virus. *Virology* 17: 364-366.
- Mirand, E. A., and Grace, J. T., Jr. (1963) Further characterization of the Friend virus disease. *Acta Unio Internationalis contra cancerum* 19: 351-355.
- Mirand, E. A., Hoffmann, J. G., Grace, J. T., Jr., and Trudel, P. J. (1961) Modification of the Friend virus disease by splenectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 824-828.
- Moloney, J. B. (1959) Preliminary studies on a mouse lymphoid leukemia virus extracted from sarcoma-37 (Abstract). *Proc. Am. Ass. Canc. Research* 3: 44.
- Moloney, J. B. (1960a) Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from Sarcoma-37 I. Origin and introductory investigations. *J. Nat. Canc. Inst.* 24: 933-951.
- Moloney, J. B. (1960b) Properties of a leukemia virus. *Symposia Tumor Viruses; Nat. Canc. Inst. Monograph no. 4*: pp. 7-33.
- Moloney, J. B. (1962) The murine leukemias. *Fed. Proc.* 21: 19-31.
- Moore, A. E., and Friend, G. (1958) Attempts at growing the mouse leukemia virus in tissue culture. *Proc. Am. Ass. Cancer Research* 2: 328.
- Negróni, G., Doumashkin, R., and Chesterman, F. C. (1959) A "Polyoma" virus derived from a mouse leukaemia. *Brit. Med. J.* ii. 1359-1360.
- Okano, H. (1963) An electron microscopic study of leukemia induced in rats with Gross virus. *Cancer Research* 23: 1169-1175.
- Pappenheim, A. (1911) *Atlas der menschliches Blutzellen*.
- Pasternak, G. (1965) Serological studies on cells of Graffi virus induced myeloid leukemia in mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 34: 71-83.
- Pasternak, G., and Graffi, A. (1961) Versuche zum Nachweis gemeinsamer Antigenenkomponenten beim Virus der myeloischen und der lymphatischen Leukämie der Maus. *Zeitschr. für Naturf.* 16: 73-74.
- Peries, J., Levy, J. P., Boiron, M., and Bernhard, J. (1964) Multiplication of Rauscher virus in cultures of mouse kidney cells. *Nature* 203: 672-673.

- Potter, J. S., c.s. (1943) Histological changes preceeding spontaneous lymphatic leukemia in mice. *Am. J. Path.* 19: 239-249.
- Potter, V. R. (1964) Biochemical perspectives in cancer research. *Cancer Research* 24: 1085-1098.
- Rask-Nielsen, R. (1963) Evidence of murine virus-induced, paraproteinproducing leukemia and its relation to other virus induced leukemias. *Nature* 200: 440-453.
- Rask-Nielsen, H. C., and Rask-Nielsen, R. (1938) Further studies on a transmissible myeloid leukosis in white mice II. *Acta Path. and microbiol. Scand.* 15: 169-175.
- Rauscher, F. J. (1962a) Geciteerd uit Moloney: The murine leukemias. *Fed. Proc.* 21: 19-31.
- Rauscher, F. J. (1962b) A virus-induced disease of mice characterized by erythrocytopoiesis and lymphoid leukemia. *J. Nat. Canc. Inst.* 29: 515-543.
- Rauscher, F. J. (1963) Pathogenesis of murine stem-cell leukemia induced by a newly isolated virus. *Acta Union internationale contre le cancer* 19: 368-373.
- Richter, M. N., and Mac Dowell, E. C. (1933) Studies on mouse leukemia VII. The relation of cell death to the potency of inoculated cell suspensions. *J. Exp. Med.* 57: 1-20.
- Rohr, K. (1956) Myelofibrose und Osteomyelosklerose. *Acta Haemat.* 15: 207-234.
- Rous, P. (1910) A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common Fowl). *J. Exp. Med.* 12: 696-705.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Brodsky, I., Huebner, R. J., and Law, L. W. (1958) Observations on the spread of mouse polyoma virus infection. *Nature* 182: 1617.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Brodsky, I., and Huebner, R. J. (1959) Studies of mouse polyoma virus infection I. Procedures for quantitation and detection of virus. *J. Exp. Med.* 109: 379-391.
- Sainte-Marie, G., and Leblond, C. P. (1958) Tentative pattern for renewal of lymphocytes in cortex of the rat thymus. *Proc. Exp. Biol. and Med.* 97: 263-274.
- Salaman, M. H., Rowson, K. E. K., and Harvey, J. J. (1962) In: *Ciba Foundation Symposium; Tumour viruses of murine origin.* G. E. W. Wolstenholme and Maevae Oconner, ed. pp. 214-226.
- Schillings, P. H. M. (1955) De problematiek der leukaemieën, 5e Jaarboek van Kankeronderzoek en Kankerbestrijding in Nederland. pp. 33-44.
- Schoolman, H. M., Spurrier, W., Schwartz, S. O., and Szanto, P. B. (1957) The induction of leukemia in Swiss mice by means of cell-free filtrates of leukemic mouse.
- Schwartz, S. O., Schoolman, H. M., and Szanto, P. B. (1957) The induction of leukemia in AKR mice by means of cell-free filtrates. *Cancer Research* 218-221.
- Schwartz, S. O., Schoolman, H. M., Spurrier, W., and Le Roy, Y. (1958) Leukemia VIII. Leukemogenic effect of brain filtrates after serial passage through mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97: 397-399.
- Schwartz, S. O., Schoolman, H. M., and Spurrier, W. (1959) Studies in leukemia X. The induction of leukemia in adult C₃H mice by means of cell-free brain filtrates. *J. Lab. Clin. Med.* 53: 233-240.
- Schwartz, S. O., Spurrier, W., and Schoolman, H. M. (1959) Studies in leukemia X. Passive immunisation of C₃H mice. *J. Lab. Clin. Med.* 54: 562-565.

- Stewart, S. E., Eddy, B. E., Gochenour, A. M., Borgese, N. G., and Grubbs, G. E. (1957) The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumor by tissue culture. *Virology* 3: 380-400.
- Stewart, S. E., Eddy, B. E., and Borgese, N. G. (1958) Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J. Nat. Canc. Inst.* 20: 1223-1243.
- Shope, R. E. (1932) A filterable virus causing tumor-like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatosum. *J. Exp. Med.* 56: 803-822.
- Shope, R. E. (1933) Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* 58: 607-624.
- Siegler, R., and Rich, M. A. (1964) Comparative pathogenesis of murine viral lymphoma. *Cancer Research* 24: 1406-1418.
- Sinkovics, J. G., Spurrier, W. A., and Schwartz, S. O. (1960) Studies in leukemia XII. Interference and reactivation experiments with cell-free tissue extracts of leukemic Swiss mice. *Blood* 15: 95-102.
- Stansly, P. G., Ramsey, D. S., and Soule, H. D. (1961) Experiments on the transplantation of a reticulum-cell sarcoma in Balb/c mice (abstr.). *Proc. Am. Ass. Cancer Research* 3: 210.
- Sternberg, C. (1905) *Handb. d. Spez. Path. Anat. u. Hist.* Henke-Lubarsch Bd. I, Erster Teil: Blut und Lymphknoten (1927).
- Szanto, P. B., Schwartz, S. O., Schoolman, H. M., and Spurrier, W. (1958) The pathogenesis of experimental lymphoblastoma induced in C₃Heb mice by means of cell-free brain filtrates. *Am. J. Path.* 34: 600.
- Swaen, G. J. V. (1964) Pathogenese van een door het Rauscher virus geïnduceerde leukaemie bij ratten. *Ned. T. v. G.* 35: 1686-1687.
- Swaen, G. J. V. (1964) De variatie van de door het Rauscher virus geïnduceerde tumoren. *Ned. T. v. G.* 46: 2232-2233.
- Swaen, G. J. V. (1966) To be published. Development of thymic neoplasms in Rats inoculated with a murine leukemia virus. *J. Nat. Cancer Inst.*
- VandePutte, M. (1963) De oncogene werking van het SE polyoma virus. *Acad. Proefschrift Leuven.*
- Vigier, Ph., et Goldé, A. (1962) Culture in vitro du virus de Friend. *Bulletin de Cancer* 49: 374-381.
- Vries, M. J. de, (1965) Boerhave-Cursus "The thymus".
- Zeigel, R. F., and Rauscher, F. J. (1963) Electron microscopic and bioassay studies on a murine leukemia virus (Rauscher). Preliminary Report. *J. Nat. Canc. Inst.* 30: 207-217.

AFBEELDINGEN

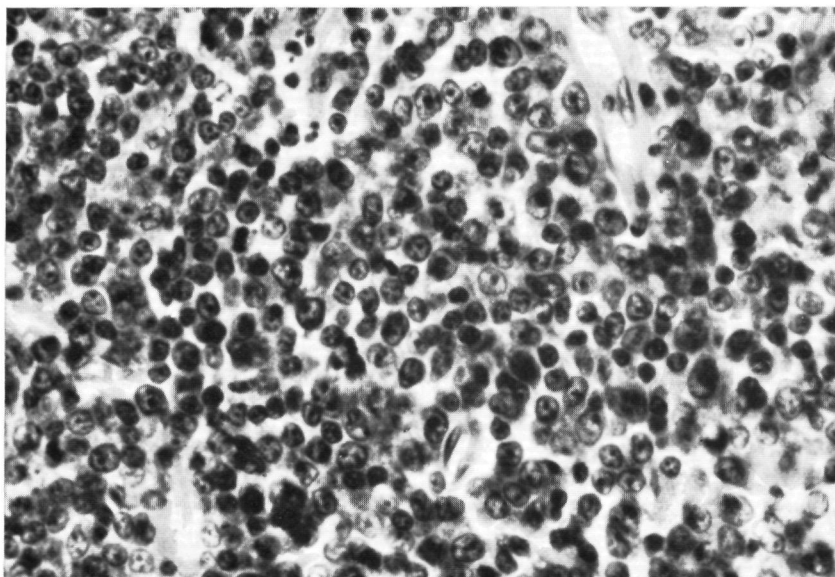
AFBEELDING 1.



Thymus Osborne Mendel rat 241 dagen na de virusinjectie. In het centrum twee atrophische kwabjes zonder schors-merg verdeling. Het linker is voor een deel doorwoekerd met tumorcellen. De overige kwabjes zijn gezwollen en diffuus met tumorcellen doorwoekerd. Er is geen duidelijke infiltrerende groei. De thymuskapsel is fibreus verdikt en onregelmatig begrensd ten opzichte van het omgevende verweefsel (zie links boven).

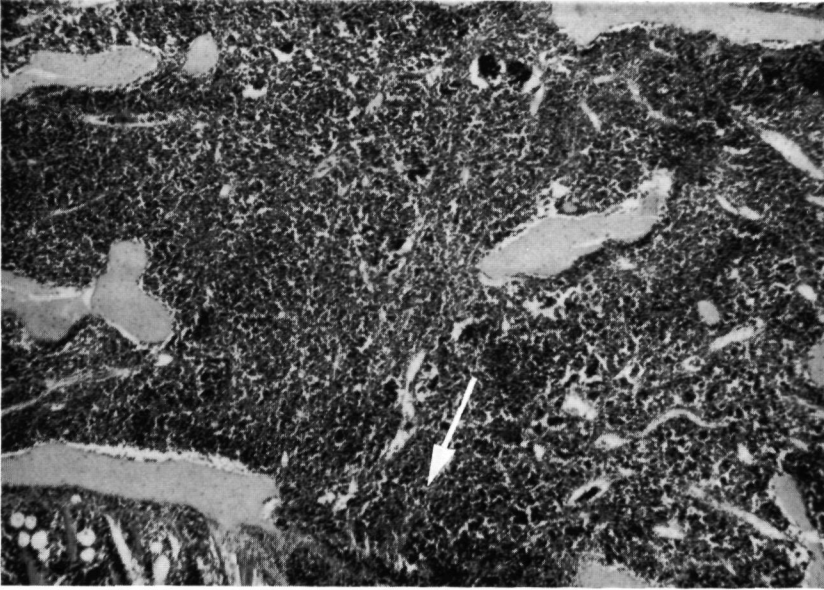
H.E. 40 x.

AFBEELDING 2.



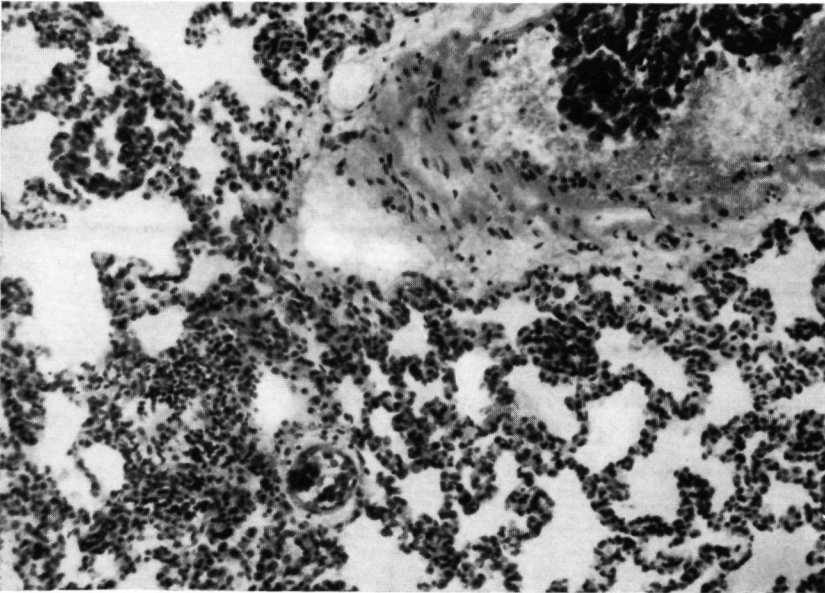
Detailopname van een gebied uit één der gezwollen kwabjes van afb. 1. Woekering van relatief grote lymphoïde cellen. Enkele mitosen. H.E. 400 x.

AFBEELDING 3.



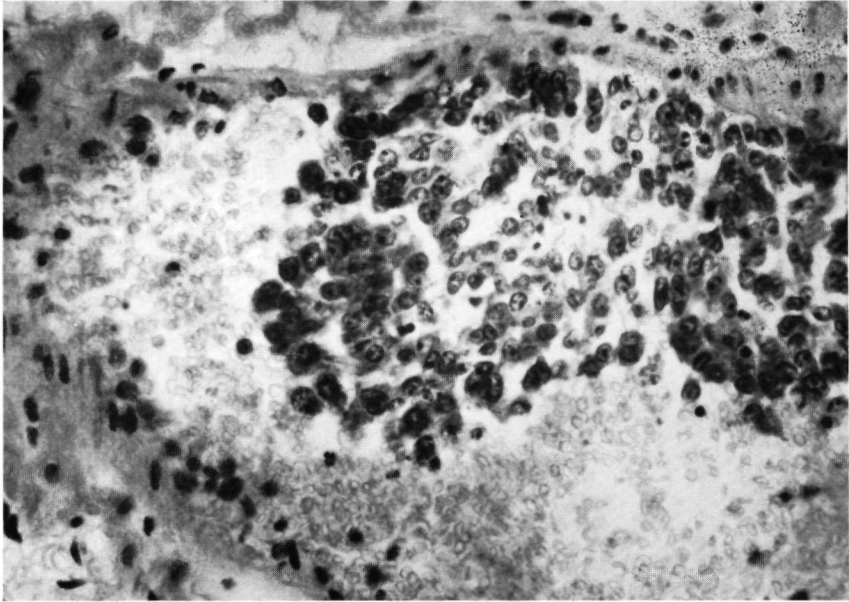
Sternum Osborne Mendel rat 132 dagen na virusinfectie. De mergholte is diffuus doorwoekerd met tumorcellen. De pijl wijst naar een defect in de corticalis, waarlangs de tumor zich uitbreidt in het omgevende spier- en vetweefsel (zie links onder). H.E. 40 x.

AFBEELDING 4.



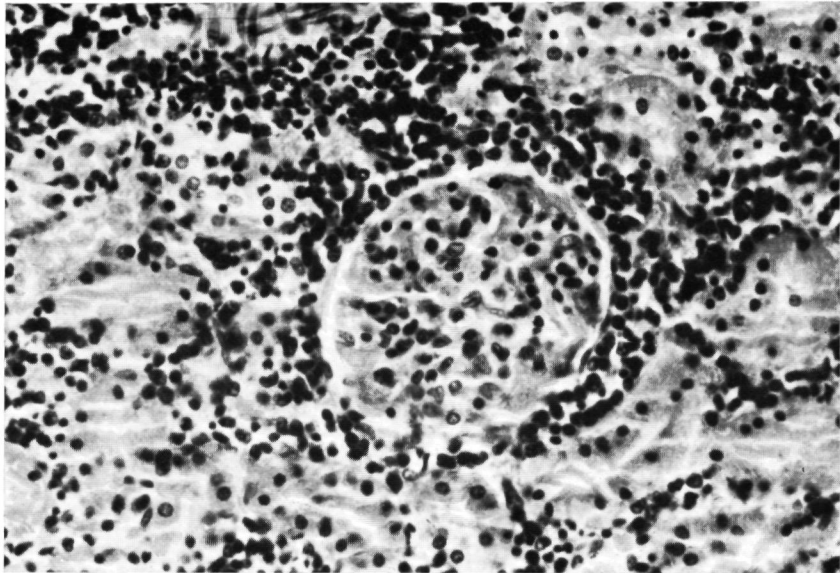
Long Osborne Mendel rat 299 dagen na virusinfectie. Celrijke alveolaire schotten. Tumorcellen in bloedvaten (zie rechts boven en links beneden van het centrum). H.E. 100 x.

AFBEELDING 5.



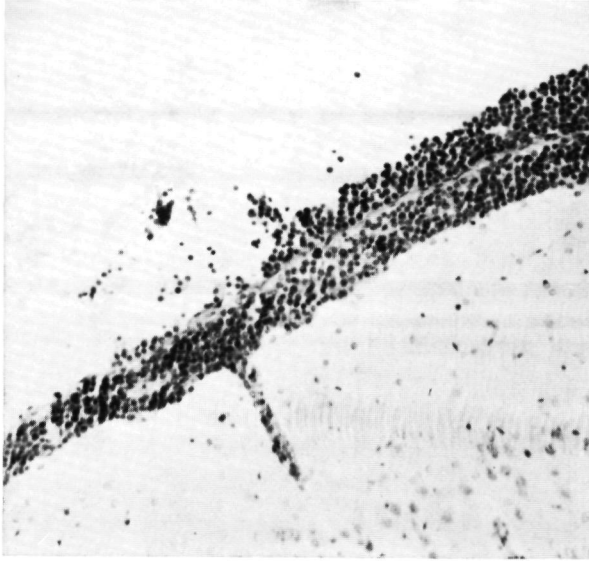
Detailopname van zelfde long als afb. 4. Tumorcellen in een bloedvat. Het zijn grote mononucleaire elementen, die plaatselijk in syncytiaal verband lijken te liggen. H.E. 250 x.

AFBEELDING 6.



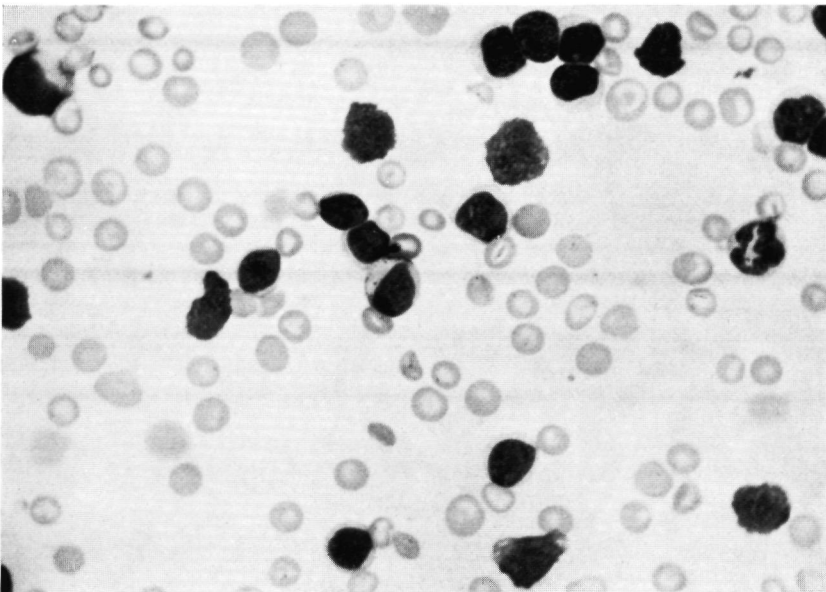
Nier Osborne Mendel rat 190 dagen na virusinjectie. Interstitiële woekering van lymfhoïde cellen. Enkele tumorcellen in glomerulus. H.E. 250 x.

AFBEELDING 7.



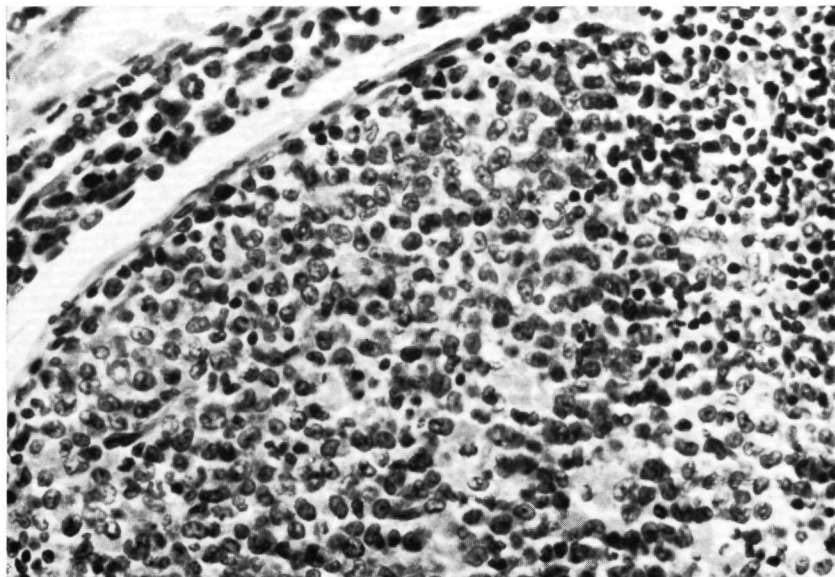
Hersenen Osborne Mendel rat 236 dagen na virusinfectie. Leptomeninx verdikt door ophoping van lymfhoïde cellen. De celwoekering zet zich perivasculair voort naar centraal. H.E. 100 x.

AFBEELDING 8.



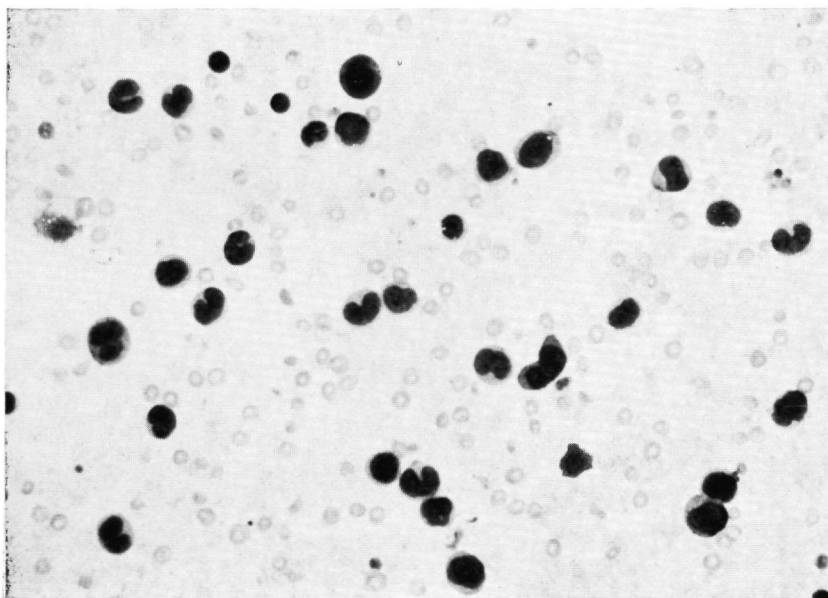
Perifere bloed Osborne Mendel rat 289 dagen na virusinfectie. Vrijwel alle witte bloedcellen zijn lymfhoïde elementen. Onder deze komen verscheidene gelaedeerde exemplaren voor. May-Grünwald Giemsa 400 x.

AFBEELDING 9.



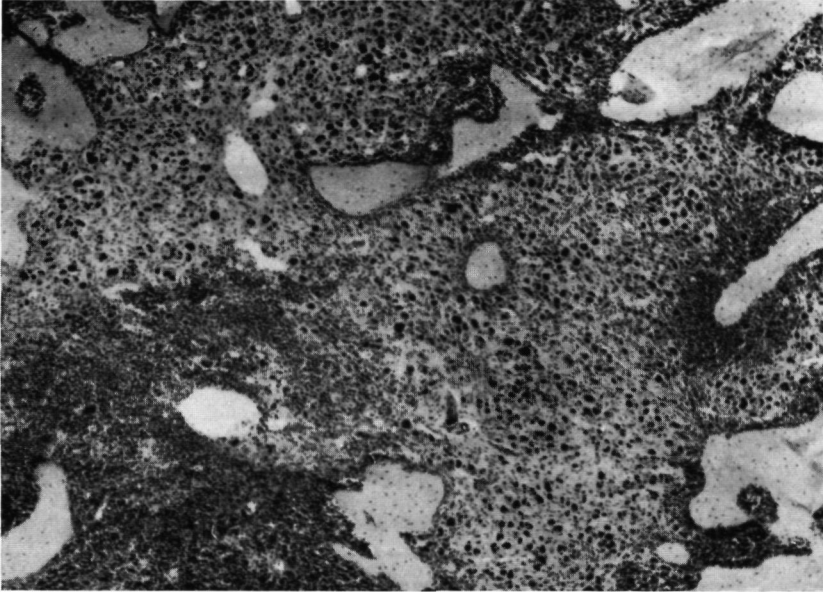
Lymphklier Osborne Mendel rat 290 dagen na virusinfectie. Woekering van onrijpe granulocyttaire elementen. Rechts boven restanten van lymphatisch weefsel. Links boven infiltratie van omgevend weefsel. H.E. 250 x.

AFBEELDING 10.



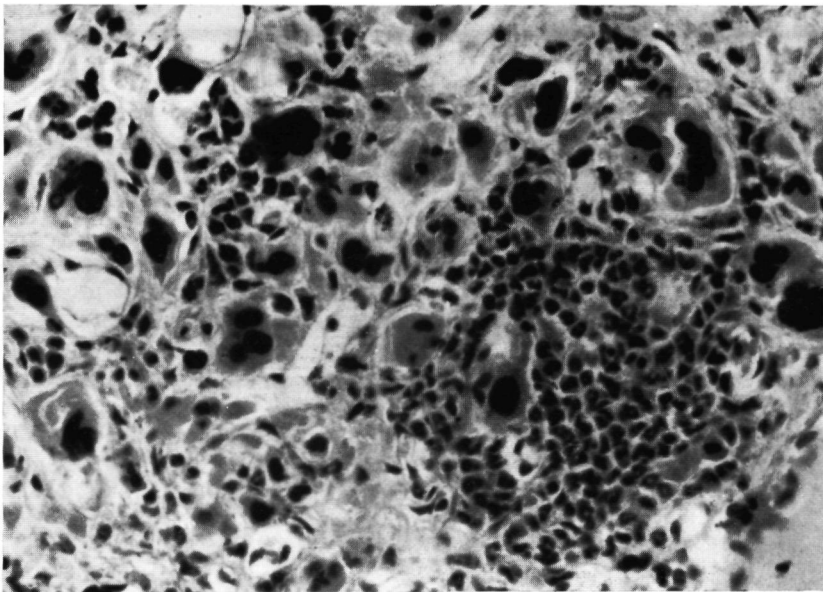
Periphere bloed Osborne Mendel rat 339 dagen na virusinfectie. Vrijwel alle witte bloedcellen zijn jonge myeloïde elementen. May-Grünwald Giemsa 250 x.

AFBEELDING 11.



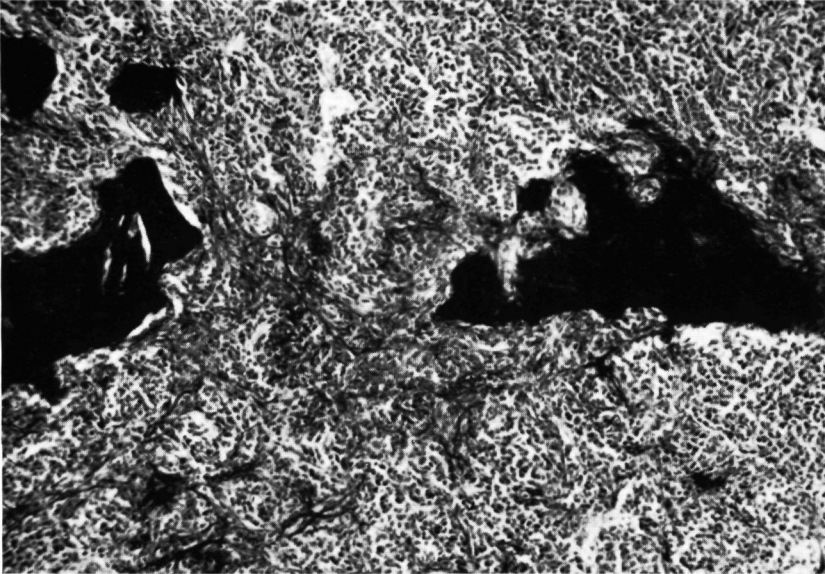
Sternum Osborne Mendel rat 290 dagen na virusinjectie. Fibreuze betrekkelijk celarme mergpartijen, waarin veel reuscellen, naast abnormaal celrijke gebieden (links onder in de figuur en rondom enkele botbalkjes). Het aantal botbalkjes is toegenomen. Zij zijn opgebouwd uit jong beenweefsel en betrekkelijk grillig van vorm. De optische lege ruimten in het merg zijn dunwandige vaten. H.E. 40 x.

AFBEELDING 12.



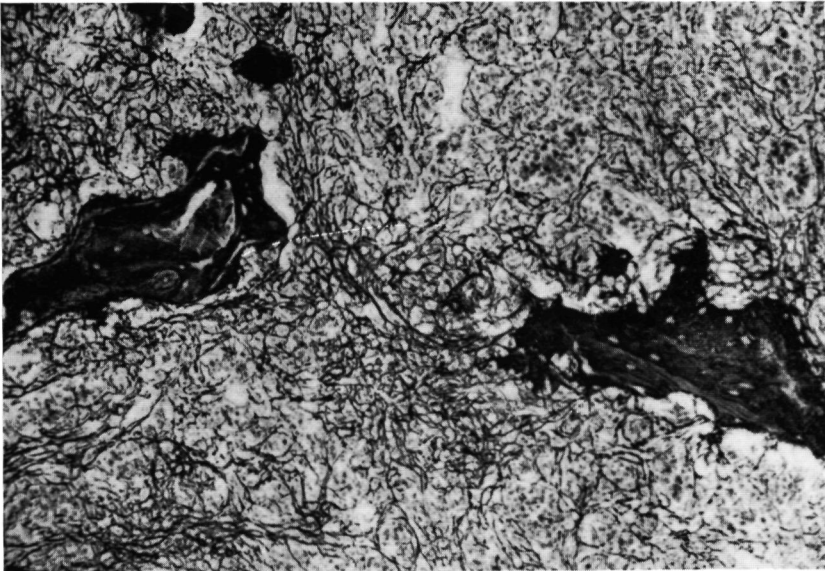
Zelfde sternum als afb. 11. Detailopname van fibreus betrekkelijk celarm gebied. Op megakaryocyten gelijkende reuscellen met hyperchromatische kernen. Rechts onder een ophoping van granulocyttaire elementen. H.E. 250 x.

AFBEELDING 13.



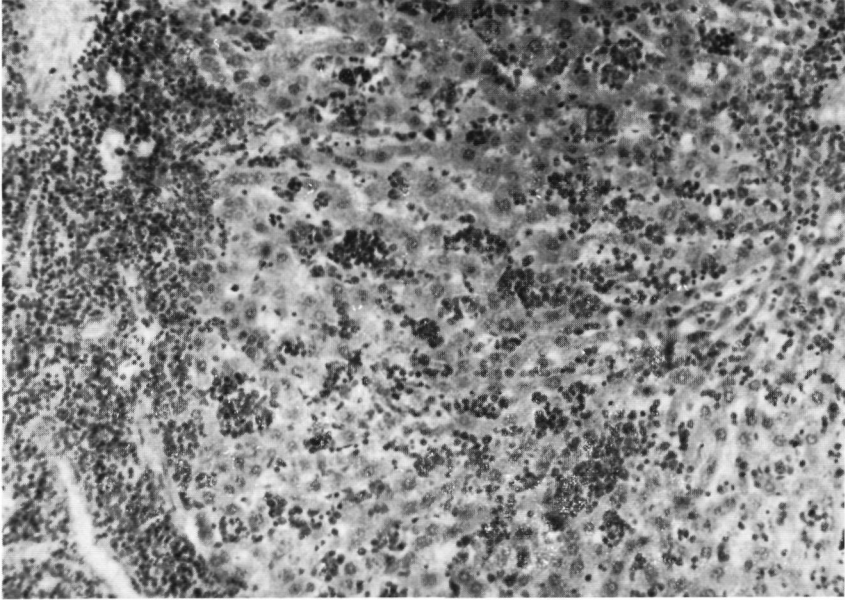
Sternum Osborne Mendel rat 342 dagen na virusinfectie. Zeer celrijk merg, waarin een ijl fibreus netwerk. Het bindweefsel gaat over in de jonge beenbalkjes (donker gekleurd).
v. Gieson 100 x.

AFBEELDING 14.



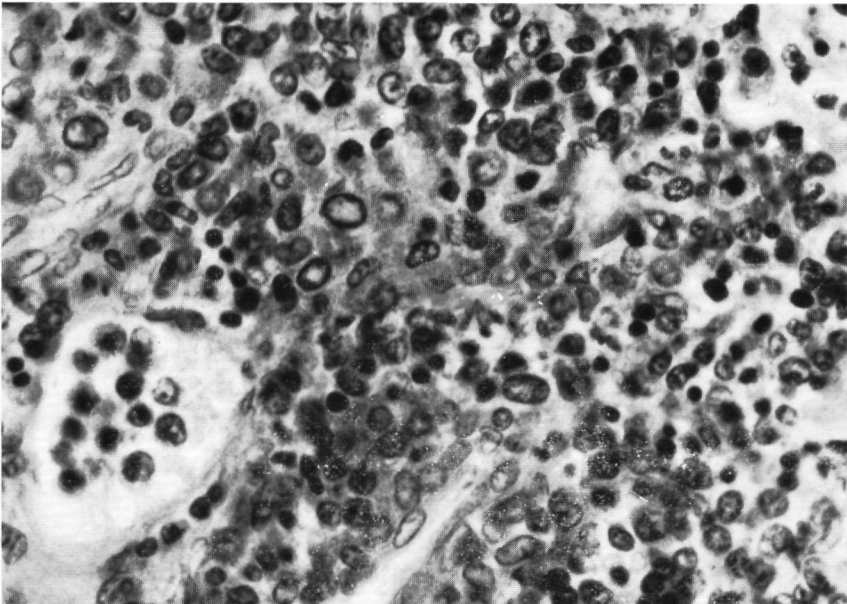
Zelfde sternum als afb. 13. Abnormaal celrijk merg waarin sterk vermeerderde hoeveelheid reticulumvezels overgaande in jonge beenbalkjes (donker gekleurd). Gomori 100 x.

AFBEELDING 15.



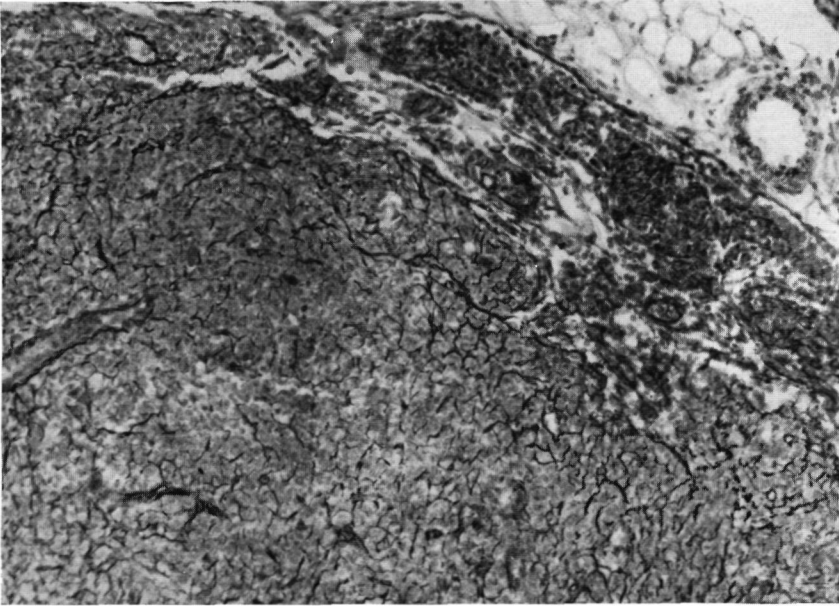
Lever Osborne Mendel rat 313 dagen na de virusinfectie. Extramedullaire haemopoiese in periportaal weefsel en tussen de levercelbalkjes bij osteomyeloreticulose. H.E. 100 x.

AFBEELDING 16.



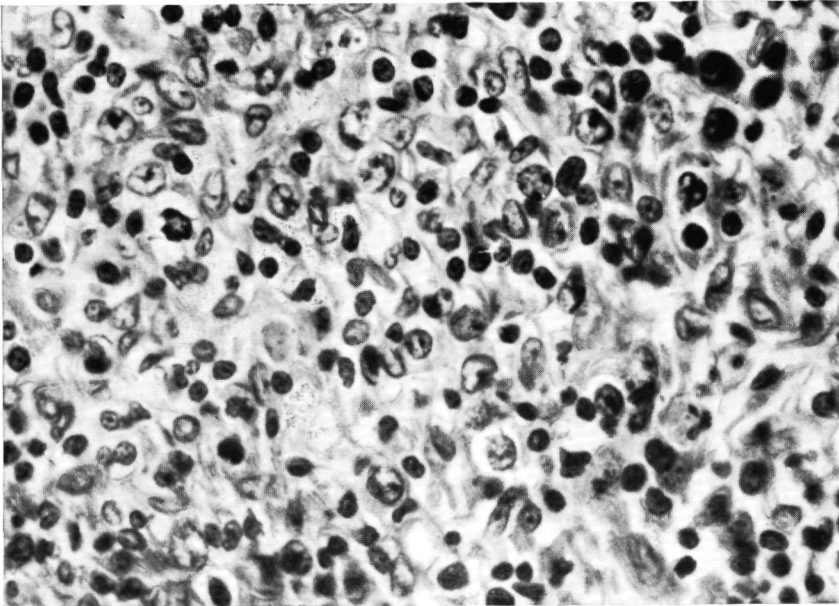
Detailopname van dezelfde lever als afb. 15. Haemopoietische activiteit in periportaal weefsel. Vrij grote, op reticulumcellen gelijkende elementen waartussen kleine ronde cellen met hyperchromatische kern (erythroblasten). Jonge haemopoietische cellen worden aangetroffen in een bloedvat (zie links onder). H.E. 400 x.

AFBEELDING 17.



Lymphklier Osborne Mendel rat 145 dagen na de virusinjectie. Reticulumcelsarcoma.
Nieuwgevormde reticulumvezels. Laguesse 100 x.

AFBEELDING 18.



Detailopname van zelfde lymphklier als afb. 17. Polymorphe reticulumcellen waartussen
verspreid lymphoïde elementen. H.E. 400 x.

ERRATA

Blz. 53, 20e regel onder *Pathologie*
21 lees 22

Blz. 71, 5e regel onder Tabel 11
Tabel 8 lees Tabel 12

Blz. 95, 12e regel van boven
4 lees 5

Blz. 95, 19e regel van boven
Rohr (1956) lees Dameshek (1951)

Blz. 96, na spatie 1e regel
(zie Hoofdstuk IV) lees (zie Hoofdstuk V)

STELLINGEN

I

Bij de bepaling van het celtype der leukaemie geïnduceerd door een leukaemogeen virus, spelen genetische eigenschappen van de gastheer een belangrijke rol.

II

De lymphocyten in de thymus van muizen en ratten zijn bijzonder gevoelig voor tumorinductie onder invloed van een leukaemogeen virus.

III

De verhoogde haemopoietische activiteit in de milt, die bij muizen en ratten wordt waargenomen na toediening van leukaemogene virussen heeft geen bijzondere betekenis voor het ontstaan der leukaemie.

IV

De osteomyeloreticulose en de myeloïde leukaemie bij de mens hebben eenzelfde aetiologie.

V

Een onderverdeling van het Hodgkin-granuloma (Jackson en Parker) met als criterium de quantitative verhouding tussen rijpe lymphocyten en reticulumcellen, heeft prognostische betekenis.

VI

Het granuloma gangraenescens dient te worden opgevat als een maligne reticulose.

VII

Alvorens te besluiten tot de virale oorsprong van intranucleaire inclusions dient histochemisch en electronenoptisch onderzoek te zijn verricht.

VIII

Mesenchymale hersengezwellen komen in een aanzienlijk hoger percentage voor dan men vroeger heeft gemeend.

IX

Spontane pneumothorax bij jonge mensen berust vaak op histiocytose.

X

Bij de behandeling van basaalcelcarcinomen, dient de voorkeur te worden gegeven aan de chirurgische therapie.

XI

Het optreden van gedissemineerde intravasculaire bloedstolling bij irreversibele haemorrhagische shock kan voorkomen worden door het toedienen van vasodilaterende medicamenten.

XII

Het lijkt waarschijnlijk, dat er bij de mens onder normale omstandigheden een continue fibrinevorming en fibrinolyse plaats heeft.



