

Viren, virusähnliche und auf Viren hinweisende Strukturen beim Karzinom des Nasopharynx*

W. Arnold¹ und F. Huth²

¹ Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. K. H. Vosteen),
Moorenstraße 5, 4000 Düsseldorf, Bundesrepublik Deutschland

² Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. W. Hort),
Moorenstraße 5, 4000 Düsseldorf, Bundesrepublik Deutschland

Viruses, Virus-Like and Virus-Related Structures in Nasopharyngeal Carcinoma

Summary. Five cases of nasopharyngeal carcinoma with typically elevated EB-virus-antigen-titer were studied by light- and electron microscopic methods. Within the cytoplasm corona viruses in different forms, regular capsid-like particles with a diameter of 60 nm, tubuloreticular aggregates, and pathologic alterations of the membranes of the endoplasmatic reticulum could be found. The nuclei of the tumor cells often showed particles within the nucleoplasm with an average diameter of 100 nm containing a central core; the appearance of the particles is similar to that of herpes viruses as shown in the literature concerning EB-viruses. Atypic mitoses are common as well as free nucleoplasma-like condensates within the ground cytoplasm. Multiple doubling of the membranes of the endoplasmatic reticulum are characteristic for the tumor cell cytoplasm. Myelin figures are often situated within the enlarged tubules of the E. R., within mitochondria and within the nuclei. The results are discussed concerning the possible viral etiology of nasopharyngeal carcinoma. We do not believe that the particles found within the nucleoplasm have a relation to nuclear pores. The arguments are discussed.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma – Corona viruses – Herpes-like particles – Tubular aggregates – Nuclear pores – Atypic mitoses

Zusammenfassung. Biopsiematerial von fünf Patienten mit lymphoepitheliale Karzinom des Nasopharynx wurde licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Es werden charakteristische Befunde an den großen, hellen, epithelialen Tumorzellen beschrieben und besonders auf virusähnliche Partikel im Kern und im Cytoplasma hingewiesen. Es wird die Frage aufgeworfen, ob in den mit großer Wahrscheinlichkeit virusinduzierten lymphoepithelialen Karzinomen des Nasopharynx nicht notwendigerweise Viruskapside oder kapsidähnliche Strukturen vorhanden sein müssen, wenn die Träger derartiger Tumoren einen hohen

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ar 120/1)

und charakteristischen Antikörpertiter gegen Kapselproteine von Epstein-Barr-Viren besitzen.

Die im Nucleoplasma epithelialer Tumorzellen angetroffenen virusähnlichen Einschlußkörper haben sowohl eine auffallende Ähnlichkeit mit den Viren der Herpesgruppe, aber auch eine gewisse Ähnlichkeit mit Kernporen. Die im Cytoplasma entdeckten tubulären Aggregate und bläschenförmigen Kapside lassen sich zum großen Teil der RNS-Virusgruppe der Coronaviren zuordnen, regelmäßig anzutreffende doppelmembranbegrenzte Bläschen mit einem konstanten Durchmesser von 60 nm können nicht mit der hierzu notwendigen Sicherheit typisiert werden. Andere, der im Cytoplasma epithelialer Tumorzellen, mesenchymaler Zellen und in Endothelzellen gefundenen tubulären Aggregationen besitzen eine große Ähnlichkeit mit den bekannten endoplasmatischen, tubuloretikulären Einschlüssen, wie man sie gehäuft bei autoaggressiven Systemerkrankungen (Lupus erythematosus) in peripheren Blutlymphozyten und bei der Herpes-simplex-Encephalitis antrifft.

Schlüsselwörter: Karzinom des Nasopharynx — Coronaviren — Herpesvirusähnliche Partikel — Tubuläre Aggregate — Kernporen — Atypische Mitosen

Zur morphologischen Differenzierung der Nasopharynxkarzinome liegen Referate in großer Zahl vor. Seit den ersten Beschreibungen des lymphoepithelialen Karzinoms an den Gaumentonsillen und im Rachen durch Schmincke (1921), Regaud und Reverchon (1921) sowie Reverchon und Coutard (1921) werden die von Quick und Cutler (1927) erstmals definierten Übergangsepithelkarzinome wie auch anaplastischen Karzinome (indifferenzzellige Karzinome) vom verhornenden oder nicht verhornenden Plattenepithelkarzinom des Epipharynx abgegrenzt (Simmons und Ariel, 1949; Cappell, 1934; Doerr, 1956, 1961). Yeh (1962) lehnt dagegen die Abgrenzung des lymphoepithelialen Karzinoms als eigene Entität ab und ordnet sie den Transitionalkarzinomen zu, die in das ortsständige lymphatische Gewebe infiltrieren (Wang et al., 1962; Chiang und Jung, 1977; von Ilberg et al., 1976).

Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nasopharynxkarzinom führten Svoboda et al. (1965) durch, wobei sie vor allem die Plattenepithelkomponente dieser Tumoren belegen konnten. Döhnert (1977) stellte anhand lichtmikroskopischer, elektronenmikroskopischer und immunologischer Untersuchungsmethoden fest, daß es sich beim Lymphoepitheliom des Epipharynx und des Mesopharynx um ein Karzinom handelt, das eine eigenständige Tumoreinheit mit biologischen und histologischen Besonderheiten darstellt.

Unter den Kausalfaktoren des lymphoepithelialen Karzinoms im Nasopharynx werden neben genetischen und hormonellen auch Immundefekte diskutiert (Yoshida et al., 1976; Rapp und Reed, 1977). Da bei den meisten Patienten mit Nasopharynxkarzinomen erhöhte Antikörpertiter gegen Epstein-Barr-Virus bezogene Antigene nachgewiesen werden (Wolf et al., 1973; Henle und Henle, 1974; Kammer und Munk, 1975; Sugano, 1975; de The, 1976; zur Hausen, 1976; Lynn et al., 1977), wurden Viren der Herpesgruppe zunehmend häufiger als auslösendes Antigen dieser Tumoren genannt. Dabei wurde auch eine Interaktion der Karzinogene und dispo-

tioneller Faktoren zum Teil unter Zusammentreffen unterschiedlicher Viren erörtert.

Der elektronenmikroskopische Nachweis von vorwiegend intranukleär gelegenen Partikeln bei fünf Patienten mit vorwiegend lymphoepitheliomatöser Differenzierung eines Nasopharynxkarzinoms veranlaßt zur folgenden Mitteilung.

Material und Methodik

Die Titerbestimmungen wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. zur Hausen (Freiburg) durchgeführt. Das Tumorgewebe wurde bei fünf Patienten mit histologisch gesichertem Karzinom des Nasopharynx erneut für die elektronenmikroskopische Untersuchung entnommen. Die Fixation erfolgte durch Immersion in 3,6%igem gepuffertem Glutaraldehyd und anschließend in 1%igem gepuffertem Osmiumtetroxyd. Das fixierte und mit Uranylacetat im Stück kontrastierte Material wurde nach der Dehydrierung in Epon eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat kontrastiert. Für die lichtmikroskopische Begutachtung der Semidünnschnitte wurden diese nach Mallory (Azur II + Methylblau) gefärbt. Zum Vergleich dienten Paraffinschnitte, die mit folgenden Färbungen behandelt wurden: Giemsa, PAS, Haematoxylin-Eosin und Eisenhaematoxylin-Pikrofuchsin nach van Gieson, kombiniert mit Resorcin; außerdem wurde die Silberimprägnation nach Gomori angewandt.

Befunde

Die Serumtiter bezüglich EBV/IgG/IF waren bei allen fünf Patienten auf 1 : 2 048 oder darüber erhöht und sprachen bereits serologisch für das Vorliegen eines Nasenrachenraumkarzinoms.

Lichtmikroskopische Befunde

Für die feingeweblichen Untersuchungen bewährten sich Semidünnschnitte, die einmal eine bessere Abgrenzung zwischen epithelialen Tumoranteilen und lymphatischen Elementen ermöglichten und darüber hinaus auch eine Differenzierung innerhalb des lymphatischen Gewebes in Lymphozyten, Immunozyten und Immunoblasten zuließen.

Vier der untersuchten Tumoren boten das typische Bild eines Lymphoepithelioms vom Typ Regaud mit Entwicklung unter dem Epipharynxepithel, Ausbreitungstendenz nach basal in das angrenzende Bindegewebe und relativ scharfer Abgrenzung zwischen epitheliale Tumoranteil und lymphatischem Zwischengewebe (Abb. 1a, b). Die Tumorzellen waren in Form breiter Bänder mit zipfeligen Ausziehungen angeordnet. Sie waren manchmal durch eine einreihige Formation schmaler Bindegewebszellen, nicht aber durch eine eindeutige Basalmembran abgegrenzt. Innerhalb der Zellbänder war das atypische Plattenepithel gekennzeichnet durch: wechselnd breite Cytoplasmasäume mit gelegentlich starker Aufhellung der Cytoplasmagrundsubstanz, durch polymorphe, teils große blasige, teils mittelgroße chromatindichtere Kerne und durch ein bis zwei große dunkle Nucleolen. Auch zweikerige Zellen und einzelne Rieskerne kamen vor. Mitosen mit teilweise atypischen Mitosefiguren waren häufig. Unmittelbar zwischen den epithelialen Tumorzellen waren nur vereinzelt Lymphozyten und Immunozyten zu erkennen. Das neben den

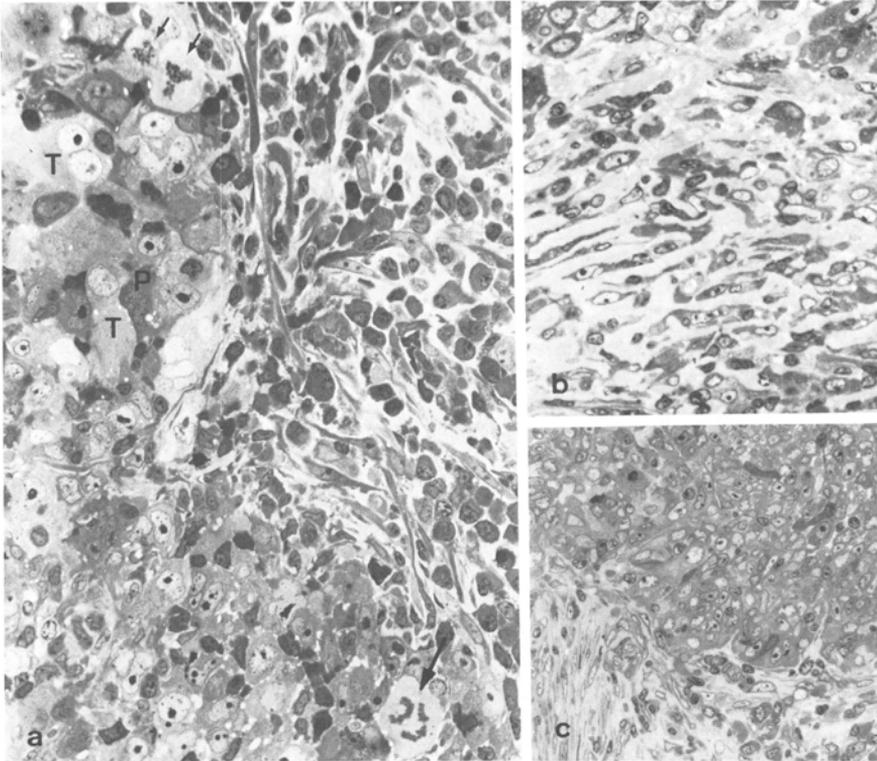


Abb. 1a. Lymphoepitheliales Karzinom vom Typ Regaud mit breiten Streifen eines polymorphkernigen atypischen Epithels neben immunozytär und lymphozytär infiltriertem Stroma. In den Epithelkomplexen atypische Mitosefiguren (\nearrow). *P* = Plasmazelle, *T* = Tumorzelle. Vergr. 360fach

Abb. 1b. Spindelzellige Ausprägung des Epithels in einem lymphoepithelialen Karzinom. Vergr. 360fach

Abb. 1c. Wenig differenziertes Plattenepithelkarzinom mit teilweise fibroblastenreichem Stroma und schütterer lymphozytärer Reaktion im Stroma. Vergr. 225fach

Epithelbändern entwickelte lymphatische Gewebe bestand zum überwiegenden Teil aus Immunozyten. Nur in einem Fall waren Lymphozyten ebensohäufig wie Immunozyten. In einem anderen Fall war streckenweise ein spindelig ausgezogener Epitheltyp entwickelt.

Gegenüber den vier lymphoepithelialen Karzinomen mußte ein Plattenepithelkarzinom mit geringer Differenzierung abgegrenzt werden, in dem die atypischen Plattenepithelstreifen gegenüber dem lymphatischen Gewebe stark überwogen. Stellenweise war hier zwischen den Tumorzellbändern nur fibrozytäres Stroma entwickelt (Abb. 1c). Verhornungen konnten lichtmikroskopisch nicht erfaßt werden. Stellenweise war die Abgrenzung gegenüber dem kleineren Zelltyp des Transitionalzellkarzinoms schwierig. Die Ausbreitung war in allen fünf Fällen gleichartig in die Tiefe gerichtet, das oberflächliche Epithel der Epipharynxschleimhaut blieb intakt.

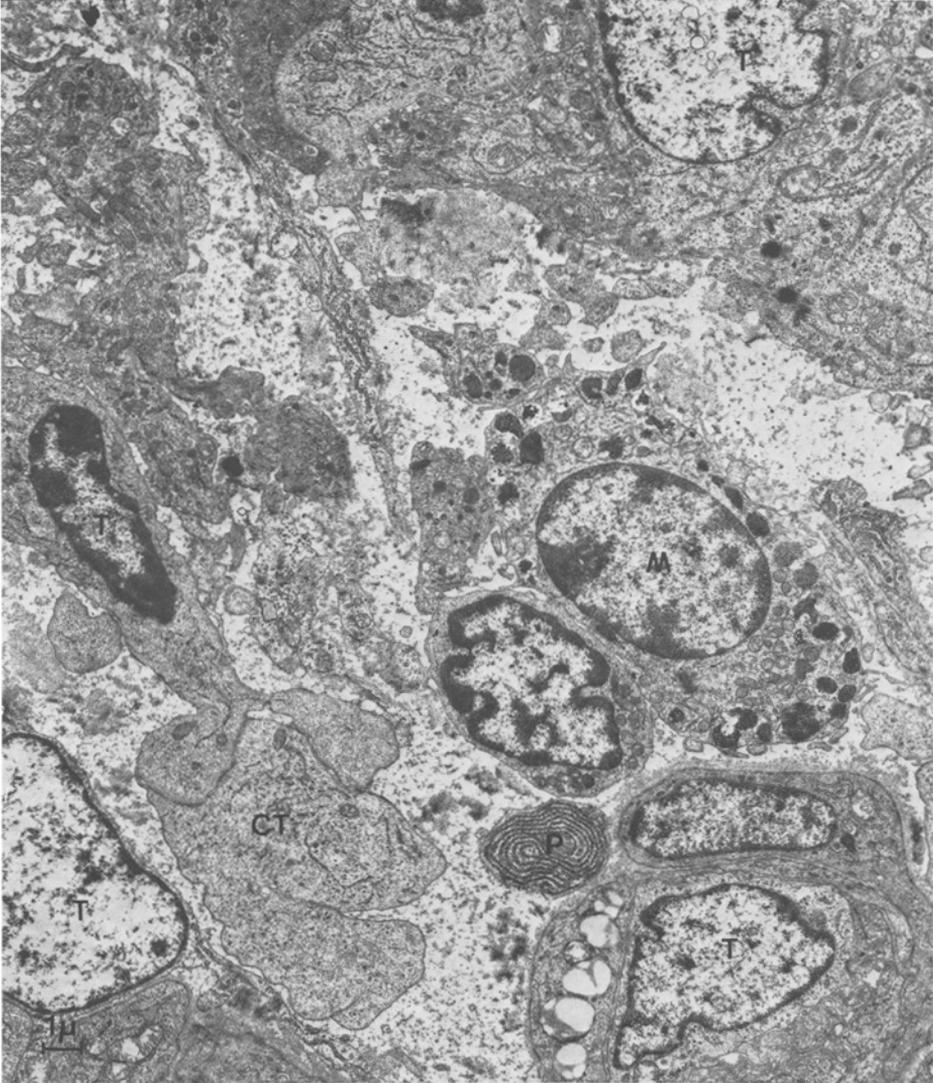


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme zur Darstellung der typischen Zellelemente des Tumors. *T* = Tumorzellanschnitte, *P* = Plasmazelle, *M* = Mastzelle, *CT* = cytoplasmatischer Fortsatz einer Tumorzelle. Im Interstitium schlierige, basalmembranähnliche Grundsubstanz. Vergr. 4970fach

Elektronenmikroskopische Befunde

Beim lymphoepithelialen Karzinom vom Typ Regaud sind die großen epithelialen Zellen durch ihr ausladendes Cytoplasma und durch große, helle Kerne mit meist randständigem Chromatin von den umgebenden Plasmazellen und Mastzellen zu

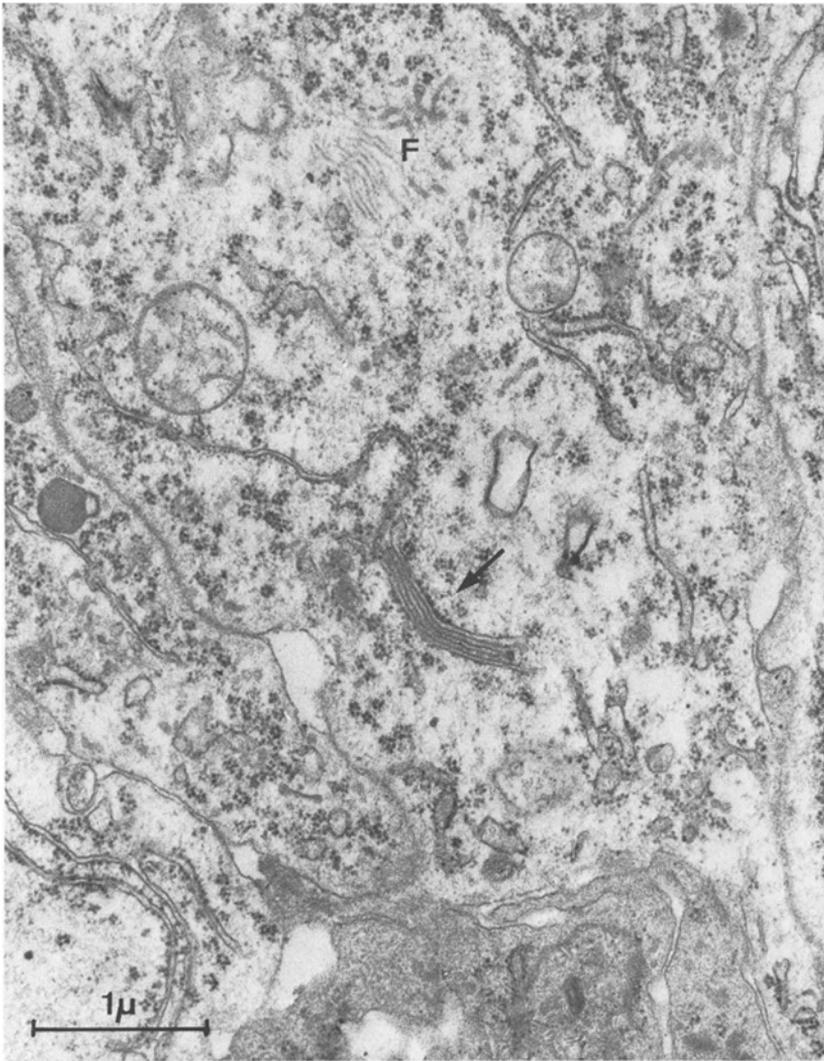


Abb. 3. Cytoplasma einer Tumorzelle des lymphoepithelialen Karzinoms. *F* = feinfilamentäre Fibrillen frei im Grundcytoplasma; (↗) Multiplikation der Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Reiches, ribosomenhaltiges Ergastoplasma. Vergr. 23000fach

unterscheiden (Abb. 2). Häufig beobachtet man pseudopodienartige Verzahnungen von Tumorzellen. An anderen Stellen ist das Interstitium relativ weit, wobei basalmembranartige, schlierige Strukturen mit deutlicher Verdichtung nahe der Zellmembran neben kollagenen Fasern den Interzellularraum ausfüllen. Der Kontakt der Tumorzellen zu den umgebenden Immunocyten, Lymphocyten und Mastzellen mit ihren typischen reifen Granula kann sehr dicht sein. Die Tumorgefäße sind vom morphologischen Aufbau her uncharakteristisch.

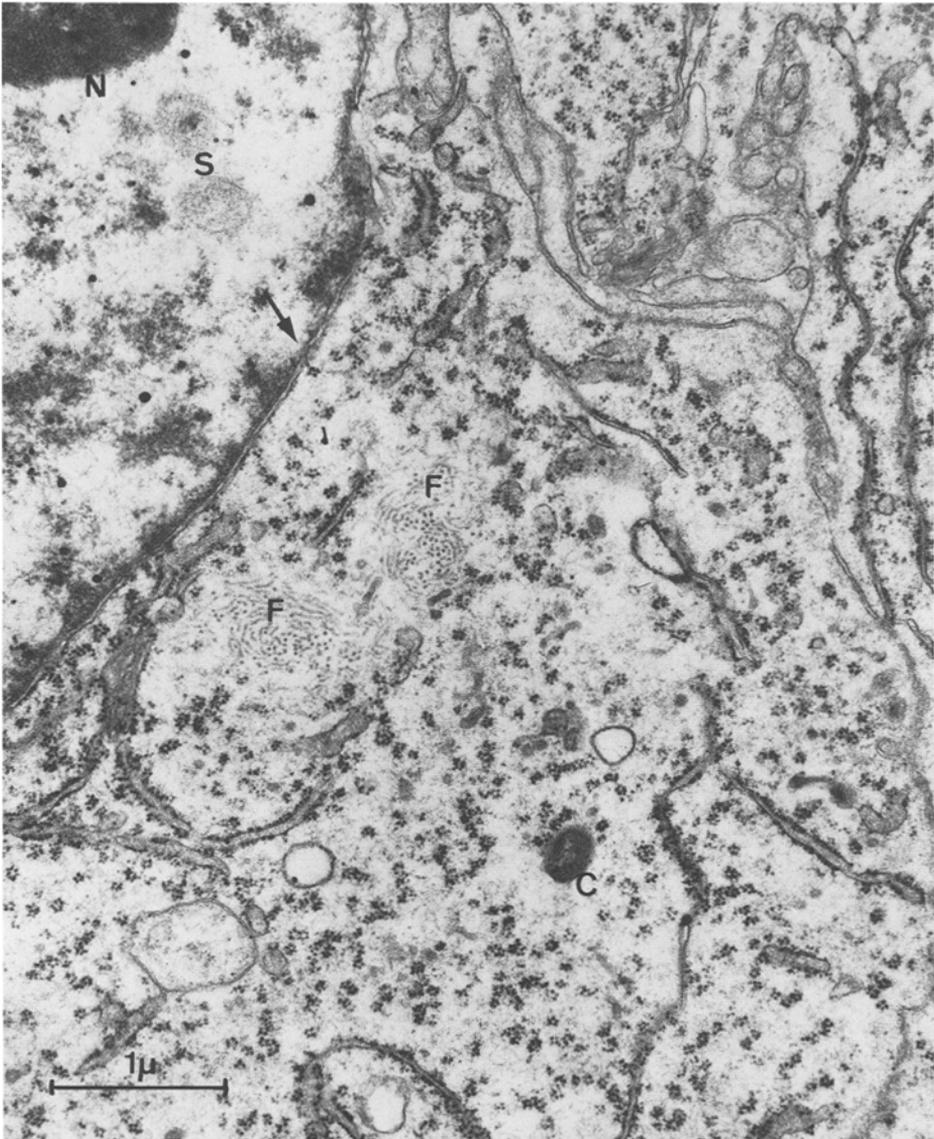


Abb. 4. Charakteristische Cytoplasmatextur einer lymphoepithelialen Tumorzelle. *C* = freier Chromatinkomplex im Grundcytoplasma, *F* = feinfilamentäre Bündel ohne Beziehung zu Membranen, *S* = Sphäridion, *N* = Nucleolus, (*) Kernpore. Vergr. 22270fach

Das Cytoplasma der Tumorzellen

Im Cytoplasma der epithelialen Tumorzellen fallen vorwiegend die erweiterten Ergastoplasmaschläuche auf, in denen neben dichtem homogenem bis feingranulärem Inhalt vereinzelt Myelinfiguren gefunden werden; derartige Myelinfiguren findet man

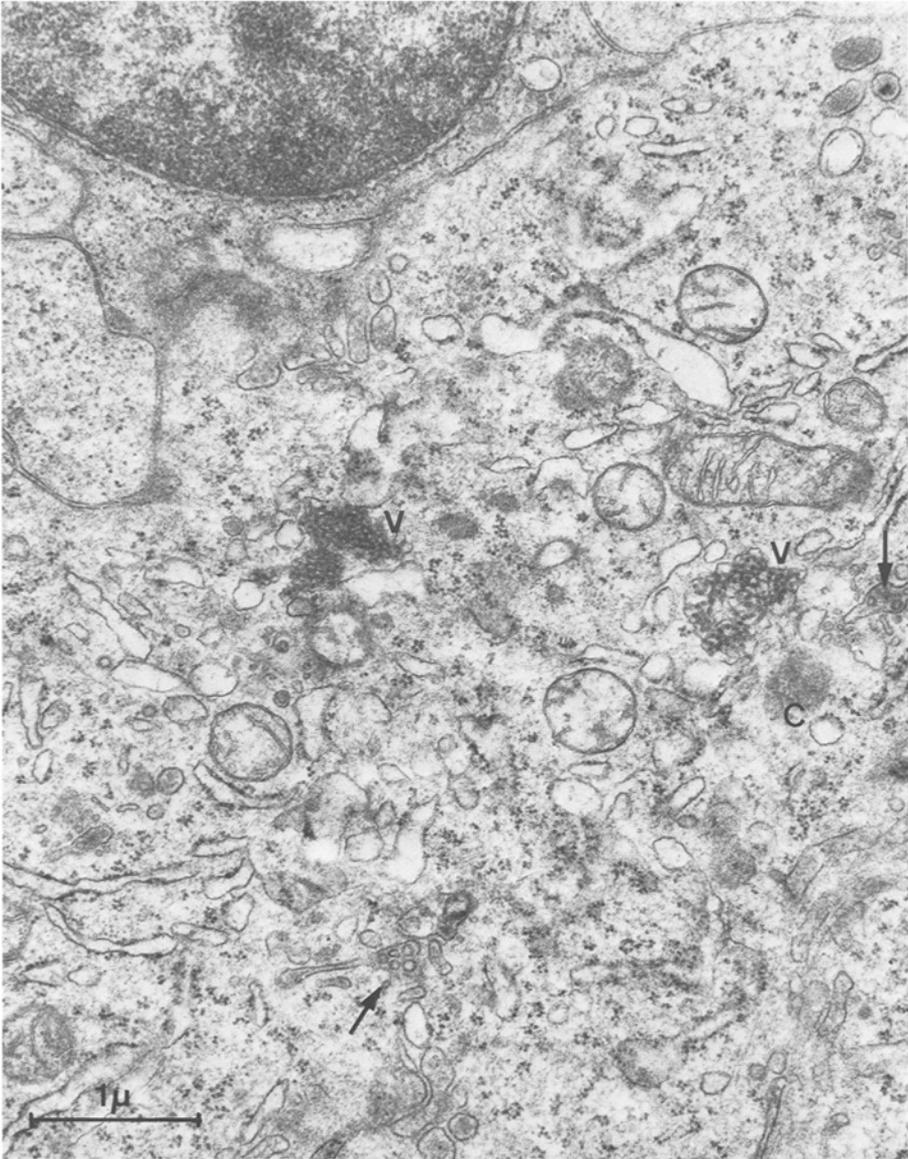


Abb. 5. Coronaviren in Form tubulärer, parakristalliner Anordnung innerhalb erweiterter Schläuche des endoplasmatischen Retikulums einer lymphoepithelialen Tumorzelle (V). Daneben im Lumen der Ergastoplasmaschläuche Coronaviruspartikel in reifer Form (↗). C = angeschnittenes, freies chromatinähnliches Kondensat. Vergr. 23000fach

darüber hinaus in den Kernen der Tumorzellen und in den Mitochondrien. Häufig findet man mehrfache Doppelungen der Membranen des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 3), wobei jeweils nur die äußerste Membranlage von Ribosomen besetzt ist. Daneben liegen zahllose freie Ribosomengruppen in Rosettenform vor. Auffallend häufig findet man mitten im Grundcytoplasma membranlose Chromatinkon-

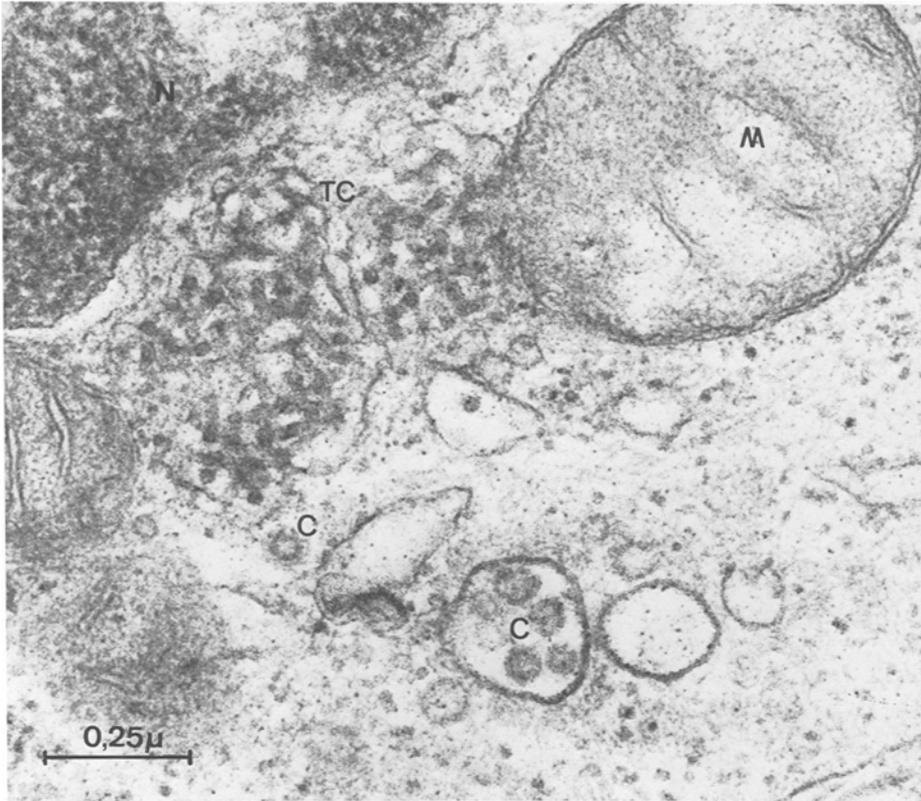


Abb. 6. Hohe Vergrößerung der beiden Formen von Coronaviren (tubulär TC, Capsid C). N = Kern der Tumorzelle, M = Mitochondrium. Vergr. 75640fach

densate ohne jegliche Beziehung zum Kern der dazugehörigen Tumorzelle. Knäuelartige, filamentäre Strukturen liegen frei im Grundcytoplasma und lassen keine Beziehung zu bekannten cytoplasmatischen Strukturen erkennen (Abb. 4).

Darüber hinaus enthalten die Tumorzellen einige besondere Cytoplasmaeinschlüsse, die in drei Gruppen einzuteilen sind:

a) Regelmäßig werden in den Tumorzellen teils frei in der Cytoplasmagrundsubstanz liegend, teils von Membranen des endoplasmatischen Retikulums umgeben, kurze tubuläre, in sich verschlungene Gebilde mit manchmal hantelförmigem Aussehen beobachtet (Abb. 5). Daneben liegen kreisrunde Partikel mit einer doppelten Membran und einem Durchmesser von 80–160 nm in Form kleiner Gruppen frei im Grundcytoplasma oder aber in erweiterten Schläuchen des hier glatten endoplasmatischen Retikulums (Abb. 6). Viele dieser Partikel sind an ihrer Oberfläche von feinsten „Granula“ besetzt, in ihrem Zentrum können sie eine elektronendichte Verdichtung aufweisen, die einem zentralen Core ähnelt. Nach Struktur, Größe und Lokalisation handelt es sich um *Coronaviren*.

b) Ein zweiter intracytoplasmatischer Partikeltyp findet sich ebenfalls sowohl frei in der Cytoplasmagrundsubstanz wie auch von Membranen umgeben, jedoch

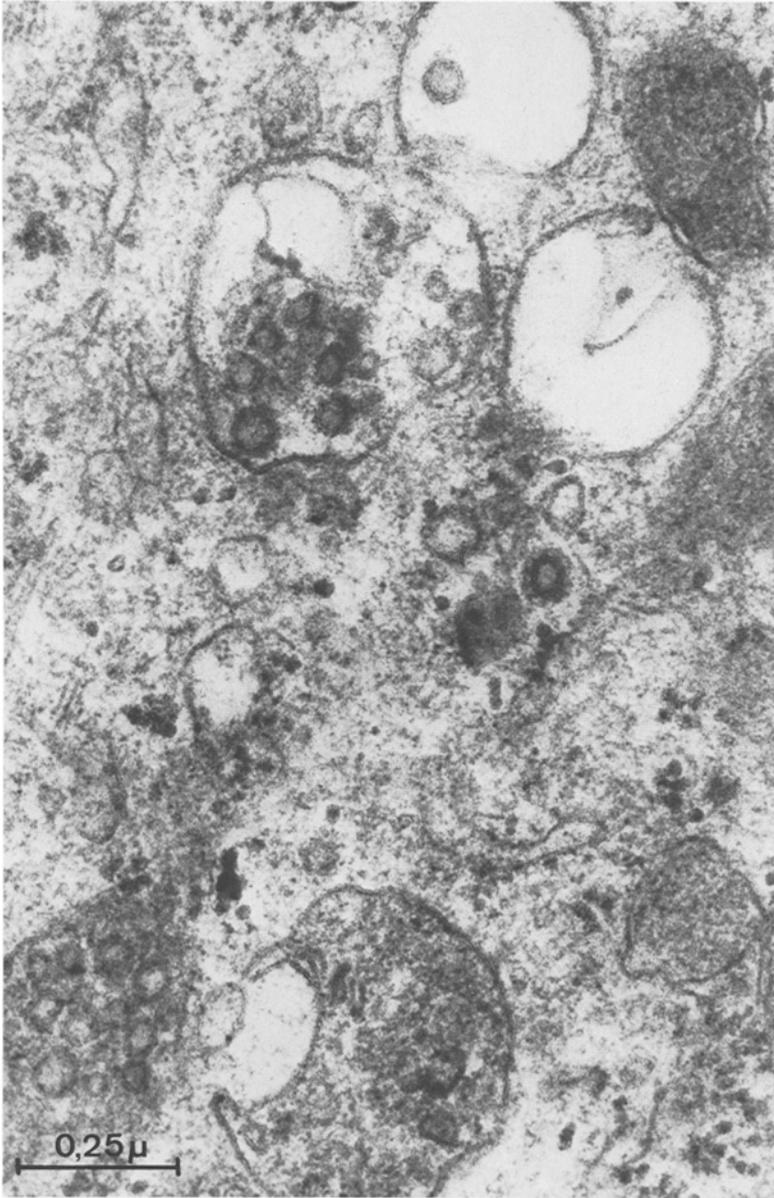


Abb. 7. Doppelmembrankonturierte Partikel mit elektronendichter Ringstruktur innerhalb von doppelmembranbegrenzten Vakuolen. Der Durchmesser der Partikel beträgt 60 nm. Sie unterscheiden sich von Coronaviren. Vergr. 83700fach

niemals innerhalb von Membranschläuchen, die sich dem endoplasmatischen Retikulum zuordnen lassen; sie unterscheiden sich deutlich von „Multivesicular Bodies“ oder von „Coated Vesicles“. Der Durchmesser dieser Partikel beträgt konstant 60 nm, wodurch sie sich von den Coronaviruskapsiden unterscheiden. Sie besitzen eine

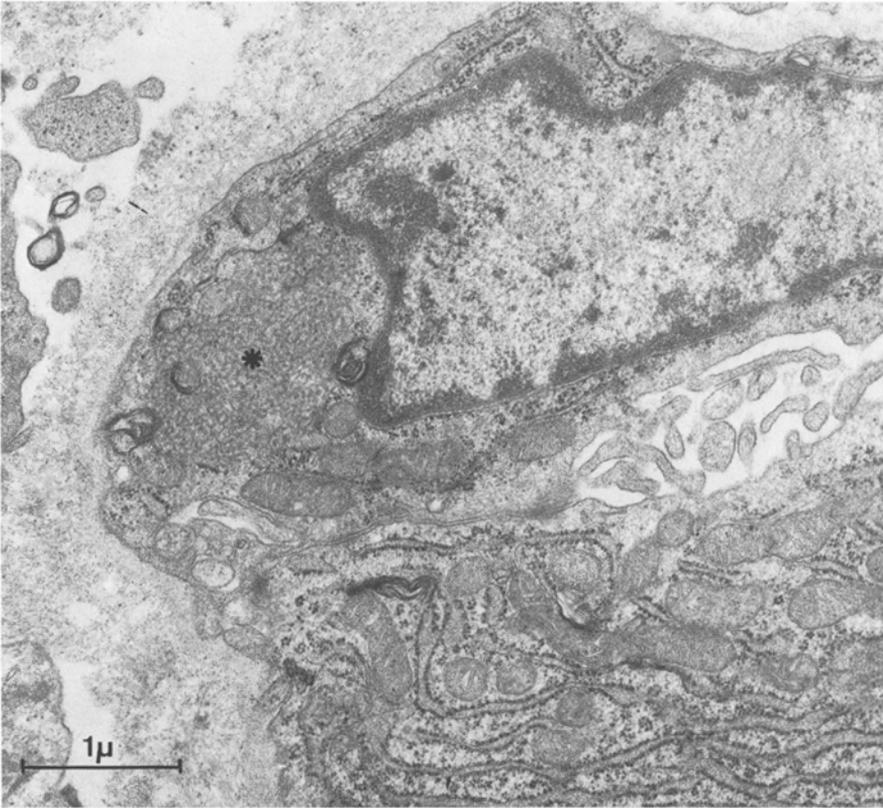


Abb. 8. Charakteristische „tubulo-retikuläre Aggregate“ im Grundcytoplasma einer Tumorkapillar-endothelzelle (*). Vergr. 20700fach

Doppelmembran, wobei der innere Ring dichter zu sein scheint als der äußere; manchmal zeigen sie ein elektronendichtes Core (Abb. 7).

c) Im Cytoplasma von Tumorzellen, aber auch in den Zellen von Blutgefäßwänden liegen Komplexe von ineinander verschlungenen Tubuli, deren Durchmesser 12–15 nm beträgt. Diese Komplexe werden von Ergastoplasmamembranen begrenzt. Diese feintubulären Knäuel zeigen eine große Ähnlichkeit mit tubuloretikulären Strukturen, wie sie gehäuft in Lymphozyten and Adventitiazellen bei Virusinfekten und autoaggressiven Erkrankungen (Lupus erythematodes) gefunden werden (Abb. 8).

d) Die Cytoplasmastrukturen innerhalb der Tumorzellstreifen des wenig differenzierten Plattenepithelkarzinoms unterscheiden sich eindeutig von denen der vorher beschriebenen lymphoepithelialen Karzinomzellen. Es kommen zahlreiche Tonofilamentbündel, desmosomale Verbindungen zu benachbarten Zellen sowie echte Schlußleisten vor (Abb. 9). Gelegentlich lassen sich im Cytoplasma dieser Zellen Keratohyalingranula nachweisen.

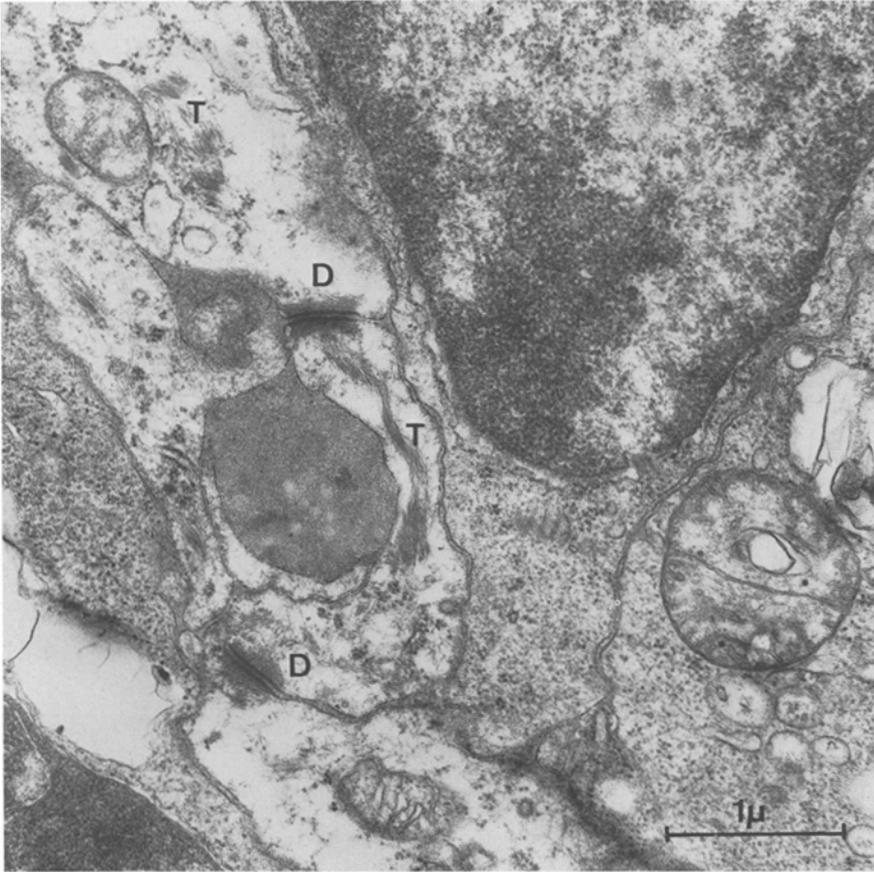


Abb. 9. Plattenepithelkarzinomzelle mit Bündeln von Tonofilamenten (*T*) und desmosomaler Verknüpfung mit der Nachbarzelle (*D*). Vergr. 23000fach

Die Kerne der Tumorzellen

Zwischen den elektronenmikroskopischen Strukturen der Kerne in den Karzinomzellen der lymphoepithelialen Tumoren und des Plattenepithelkarzinoms sind keine signifikanten Unterschiede auszumachen.

Im Gegensatz zu den dunklen Zellen der umgebenden Lymphozyten und dem mehr grobscholligen Chromatin der angrenzenden Immunozyten sind die Tumorkerne groß und wesentlich blasser; vorwiegend randständig entlang der Kernmembran verdichtet sich das feingranuläre Chromatin. An den Tumorzellen mit geschlossener Kernmembran beobachtet man große Kernporenanschnitte mit einem Durchmesser von 60–480 nm (Abb. 10). In den Porenanschnitten liegen manchmal Ribosomenrosetten, die einer Ausschleusung von mRNS aus dem Karyoplasma entsprechen. Gelegentlich erreichen Ausstülpungen der äußeren Kernmembran die Zellmembran.

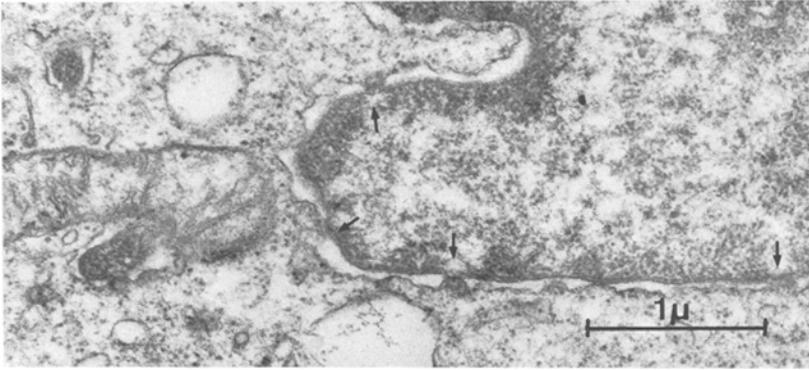


Abb. 10. Kernporen im Sagittalschnitt einer lymphoepithelialen Tumorzelle (♂). Vergr. 23000fach

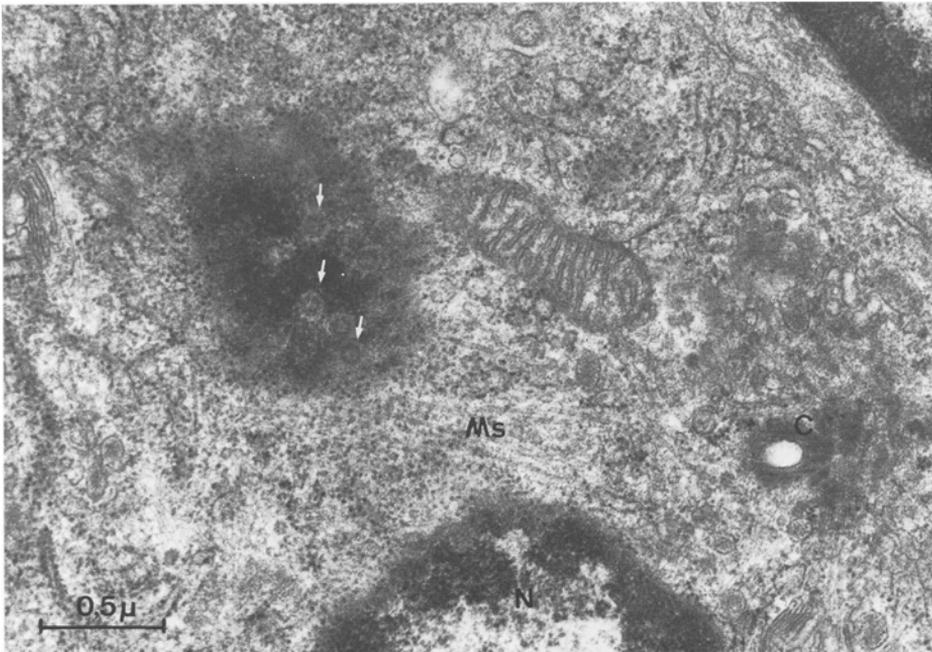


Abb. 11. Anschnitt einer epithelialen Tumorzelle im Telophasestadium. Neben dem Kern (N) der Zelle ein freier Chromatinkomplex mit virusähnlichen Einschlüssen konstanter Größe (♂). Ms = Mitosespindeln, C = Zentriol. Vergr. 30285fach

Bei mitotischen Teilungsfiguren finden sich unregelmäßig im Cytoplasma verteilte schollige chromosomale Verdichtungen, die zum Teil von stark osmiophilen Doppelmembranfragmenten umschlungen sind. In der späten Anaphase und in der Telophase können zwischen den membranlosen oder nur zum Teil umhüllten Chromatinhäufen strahlenförmige Formationen langgestreckter Tubuli mit einem Durchmes-

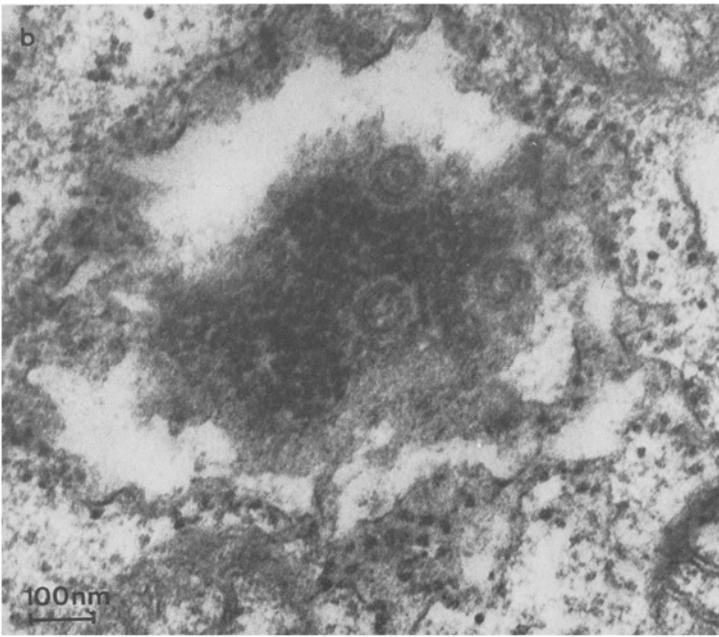
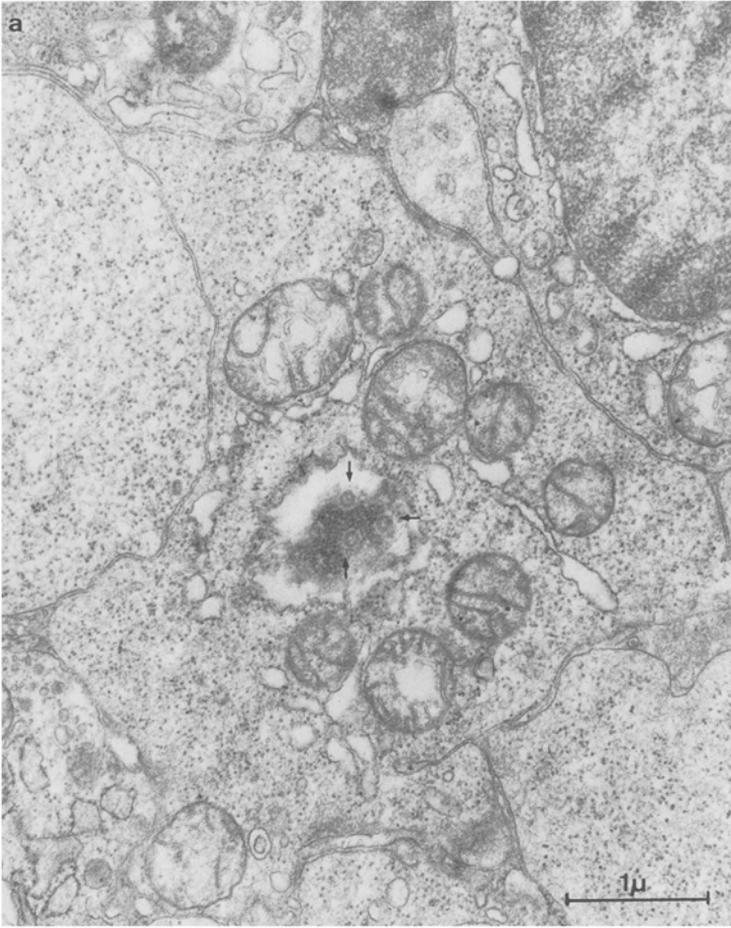


Abb. 12. (Legende siehe Seite 309)

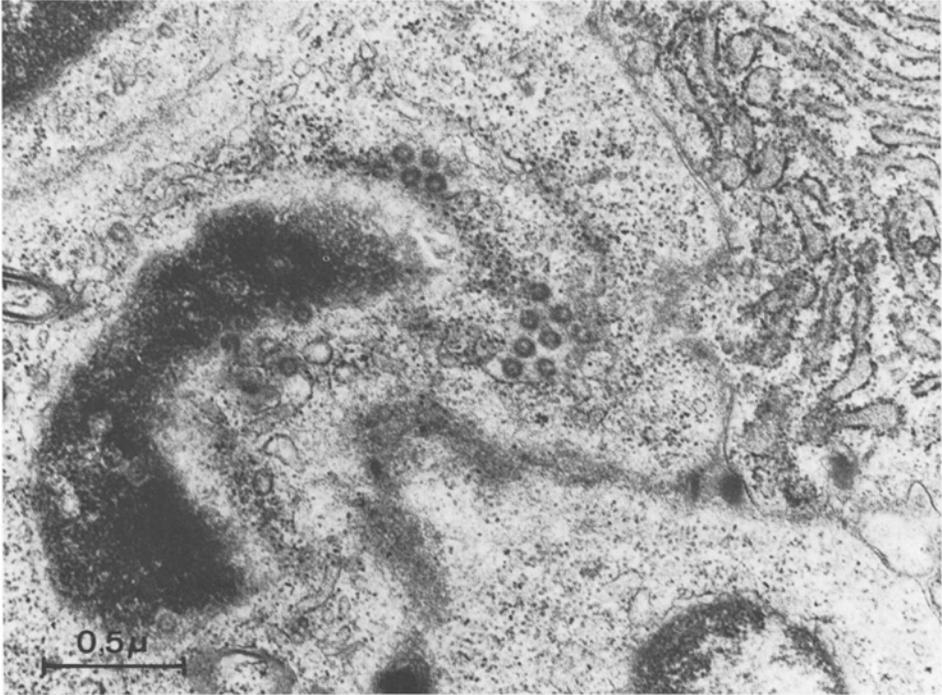


Abb. 13. Partikel im Kern und außerhalb der Kernebene mit dichtem zentralen Core. Vergr. 22095fach

ser von 12–18 nm (Mitosespindeln) und Anschnitte eines Centriols beobachtet werden.

In jedem dritten bis fünften Tumorzellkern, vor allem aber in den anscheinend frei im Grundcytoplasma liegenden Chromatinanhäufungen fallen runde Partikel auf, die von einem hellen Hof umgeben sind. Sie besitzen bei hoher elektronenmikroskopischer Vergrößerung eine doppelte Membran und enthalten vielfach ein kleines, zentrales Core. Diese Partikel können sowohl diffus über den gesamten Kern verteilt beobachtet werden als auch zu Gruppen angeordnet in der Nähe der Kernmembran. Gelegentlich findet man sie auch einzeln oder in Gruppen außerhalb des Kernes. Sie sind gleichmäßig groß, der äußere Durchmesser der Partikel beträgt 80–120 nm, der innere Ringdurchmesser durchschnittlich 80 nm, der des zentralen Cores 24 nm. Der Abstand zwischen äußerer und innerer Membran der Partikel mißt konstant 12 nm (Abb. 11–13).

Abb. 12. a Randanschnitt eines Tumorzellkernes mit deutlicher Kernmembran. In zentraler Lage des Chromatins drei virusähnliche Partikel (♣) mit einem Durchmesser von 100 nm. Vergr. 18225fach. **b** Gleiche Abbildung bei hoher Vergrößerung. Vergr. 65775fach

Diskussion

Die elektronenmikroskopischen Befunde, welche anhand der fünf untersuchten Karzinome des Nasopharynx dargestellt wurden, zeigen Einzelheiten des Kernes und des Cytoplasmas, wie sie bisher noch nicht beschrieben wurden. Während Lin et al. (1969) beim Nasopharynxkarzinom drei Tumorzelltypen charakterisierten, die sich vorwiegend durch ihren Gehalt an granulärem endoplasmatischem Retikulum, cytoplasmatischen Filamenten und durch die Ausbildung des Gogi-Komplexes unterschieden, konnten wir beim lymphoepithelialen Karzinom des Typs Schmincke-Regaud einen für diesen Tumortyp kennzeichnenden epithelialen Verband näher beschreiben. Es handelt sich dabei um auffallend große, helle epitheliale Tumorzellen mit großen Kernen und zahlreichen atypischen Mitosefiguren. Konstant wiederkehrende Charakteristika der Tumorzellen sind für den Bereich des Cytoplasmas Myelinfiguren innerhalb der Schläuche des endoplasmatischen Retikulums, Verdoppelungen der Membranschläuche des Ergastoplasmas, die regelmäßige Infektion der Tumorzellen mit Coronaviren (RNS-Viren), eine auffallend große Zahl von gleich großen, doppelmembranbegrenzten, bläschenartigen Partikeln frei im Grundcytoplasma oder in Vakuolen liegend sowie tubuloretikuläre Strukturen entweder frei im Grundcytoplasma liegend oder von einer Membran umgeben.

Bei den Myelinfiguren in den Schläuchen des endoplasmatischen Retikulums oder in Mitochondrien handelt es sich um Membrankomplexe, die man häufig bei Geschwülsten mit hoher Zellteilungsrate findet. Im gleichen Sinne werden die ungewöhnlich häufig anzutreffenden Mitosespindeln interpretiert, die man auch dann noch zusammen mit Centriolen im Cytoplasma der Tumorzellen findet, wenn keine weiteren Anzeichen einer bevorstehenden oder gerade abgelaufenen Zellteilung erkennbar sind. Im wenig differenzierten Plattenepithelkarzinom kamen zusätzlich zahlreiche dichte Bündel von Tonofilamenten vor sowie gelegentlich Keratohyalin granula. Außerdem zeigten die Zellen des atypischen Plattenepithels desmosomale Verbindungen der Zellen untereinander. Derartige Verbundstrukturen waren zwischen den Zellen des lymphoepithelialen Karzinoms nicht zu sehen.

Die Träger der fünf elektronenmikroskopisch untersuchten Karzinome wiesen einen signifikant erhöhten Epstein-Barr-Virusantikörpertiter auf, der als kennzeichnend für das Wachstum von Nasopharynxkarzinomen angesehen wird, obwohl derartige Titererhöhungen auch bei Burkitt-Lymphomen, infektiöser Mononucleose, Lymphogranulomatose und bei Leukämien festgestellt wurden. Schmauz et al. (1975) und Lynn et al. (1977) sahen sich durch differenzierte Titerbestimmungen in der Lage, den Therapieerfolg bei Nasopharynxkarzinomen abzuschätzen. Diese Kontrollmöglichkeit erscheint um so bedeutsamer, als die Ausdehnung dieser Karzinome häufig mit primärem Tiefenwachstum und ohne Ulzeration der oberflächlichen Schleimhaut mit klinisch-morphologischen Methoden nur schwer zu erkennen ist. Die morphologischen Befunde, welche eine EBV-Infektion mit menschlichen Tumoren pathogenetisch in Verbindung bringen, beruhen auf dem Nachweis von herpesvirusähnlichen Partikeln, die elektronenmikroskopisch in transformierten Lymphozyten aus Gewebekulturen von Burkitt-Lymphomen und Nasenrachenraumkarzinomen gefunden wurden. Bis auf eine Mitteilung von Nadol (1977) liegt bis heute kein morphologischer Nachweis von Viruspartikeln aus Biopsiematerial vor. Die Abwesenheit morphologisch faßbarer Virusstrukturen wurde auf verschiedene Weise erklärt: Nach Ansicht von Epstein (1962) sowie Rapp und Duff (1974) ruft die Infektion mit dem onkogenen Virus eine maligne Transformation der normalen Zelle hervor mit Inkorporation des viralen Genoms in die zelluläre DNS, wodurch eine Neoplasma ohne virale Replikation induziert wird. Zu den „Fingerprints“ für einen derartigen Viruskontakt gehört ein erhöhter Serumantikörpertiter gegen EB-Viren. Als Antigen wird ein virales Kapsidprotein vermutet (Henle und Henle, 1974; Gunven et al., 1970). Durch diese Theorie wird jedoch nicht erklärt, auf welchem Wege weiterhin genügend Kapsidprotein erzeugt

wird, das den Serumantikörperspiegel aufrechterhalten oder ansteigen lassen kann. Darüber hinaus existieren Beispiele neoplastischer Erkrankungen bei Tieren, wie auch beim Menschen, ausgelöst durch DNS-Viren, bei denen virale Partikel, einschließlich des Herpesvirus im Gewebe gefunden wurden (Fawcett, 1956, Lucke, Adenokarzinom; Almeida et al., 1962, Warzen; Dunn und Ogilvie, 1968, Warzen; Boyle et al., 1973, Kehlkopfpapillome; Arnold et al., 1977, Schleimhautwarzen). Nadol (1977) fand virale Partikel von herpesähnlichem Charakter in weniger als 1% der Tumorzellen, allerdings nicht im Kern, sondern im Cytoplasma. Daneben beobachtete er leere Kapsidstrukturen, vor allem in degenerierenden Zellen. Er erklärt das seltene Auffinden morphologisch faßbarer Virusstrukturen im Nasenrachenraumkarzinom damit, daß die Konzentration viraler Partikel im Tumorgewebe so gering sei, daß sie elektronenmikroskopisch nicht erfaßt werden. Die empfindlichen DNS-Viren könnten während der Zeit der Probeexzision und Fixation darüber hinaus auch ihre morphologische Darstellbarkeit verlieren (vgl.: Lundquist et al., 1975; Dunn und Ogilvie, 1968; Klein et al., 1974). Damit würde verständlich, daß die Viruspartikel in transformierten Lymphozyten der Gewebekultur von Burkitt-Lymphomen (Epstein, 1962) und des Nasenrachenraumkarzinoms (de The et al., 1969) gefunden wurden, wobei angenommen wird, daß die Ansammlung von Viruspartikeln in der Gewebekultur begünstigt wird (Henle und Henle, 1974). Arnold et al. (1977) vertraten in bezug auf die Papillomviren die Ansicht, daß sich DNS-Viren vorwiegend dann morphologisch fassen lassen, wenn durch Zerfall oder durch Zelltod die virale DNS aus der zellulären DNS wieder ausgeschleust wird. Nach Einbau der Virus-DNS in die Chromosomen der Wirtszelle verhalten sich die viralen DNS-Anteile bei nachfolgenden Zellteilungen wie zelluläre Gene und werden mit diesen synchron vermehrt (Kammer und Munk, 1975). Es ist jedoch auch vorstellbar, daß bei einer DNS-Virusinfizierten Zelle die virale DNS wieder ausgeschleust und morphologisch faßbar wird, wenn unvollständige oder atypische Mitosen ablaufen, für die es beim Nasenrachenkarzinom zahlreiche Hinweise gibt.

Angesichts der aufgeführten theoretischen Erklärungsmöglichkeiten für das Fehlen eines eindeutigen morphologischen Virusnachweises beim Karzinom des Nasenrachenraums haben wir unser Augenmerk besonders auf die zahlreichen cytoplasmatischen und nukleären Partikel in den epithelialen Zellen der untersuchten Karzinoome gerichtet. Diese partikulären Einschlüsse lassen sich in Gruppen einteilen und wie folgt zumindest teilweise identifizieren:

a) Frei im Cytoplasma liegend, vielfach aber auch in Schläuchen des endoplasmatischen Retikulums finden sich bläschenförmige Partikel mit doppelter Membran und sternförmigem, feingranulärem Besatz an der Oberfläche; sie besitzen einen Durchmesser von 80–160 nm. Diese Partikelgruppe läßt sich wegen ihrer charakteristischen Strukturen den Coronaviren zuordnen (vgl. Oshiro, 1973). Die tubulären Formen dieses RNS-Virus können zu weitläufigen Aggregaten konfluieren und zeigen häufig Hantelformation. Der tubuläre Durchmesser beträgt durchschnittlich 20–25 nm. Zur Gruppe der Coronaviren gehört das infektiöse Bronchitisvirus der Vögel, das Mäusehepatitisvirus und das Pneumotropvirus der Hasen. Menschliche Coronaviren benötigen eine sehr ausgewählte Wachstumsgrundlage, so daß es nur möglich ist, Kulturen derartiger Viren auf menschlicher Trachealschleimhaut zu züchten. In der Regel liegen die Viruspartikel innerhalb der Schläuche des endoplasmatischen Retikulums. Während ihrer Reifung erhalten sie ein DENSE Core und nach Loslösung aus den Membranen des endoplasmatischen Retikulums besitzen sie eine Doppelmembran. Das Auffinden derartiger banaler RNS-Viren im Tumorgewebe aus dem Nasopharynx hat mit Wahrscheinlichkeit mit der Ätiologie des Krankheitsbildes nichts zu tun und ist als Nebenbefund zu bewerten. Dennoch haben andere Untersucher, die sich mit dem Tumorgewebe des Nasopharynxkarzinoms oder der Normalstruktur der Epipharynxschleimhaut befaßten (Lin et al., 1969; Jahnke, 1974) diese Viren, die in unserem Untersuchungsgut beinahe in jeder zweiten Tumorzelle anzutreffen waren, nicht finden können.

b) Oft sind die tubulären Formen der Coronaviren schwer zu unterscheiden von den sogenannten tubulo-retikulären Strukturen, wie wir sie in Gefäßwandzellen, aber auch in Tumorzellen fanden. Der Durchmesser dieser zarten Tubuli beträgt 12–15 nm. Derartige Cytoplasmaeinschlüsse wurden in vergleichbarer Form und Ausdehnung in den Lymphozyten des strömenden Blutes beim Lupus erythematoidus und in Zellen von virusinduzierten Tumoren beschrieben. Sie wurden bereits oft mit tubulär- oder kristallinstrukturierten Viren verwechselt, da sie vorwiegend bei Viruserkrankungen (Staupe, Papillomen, Herpes-Simplex-Erkrankungen) auftreten. Bei der natürlichen und experimentellen Herpes-Virus-Encephalitis gehören sie zum konstanten Bild. Ihre Bedeutung ist unbekannt (Anzil und Blinzinger, 1972, 1974; Bariety et al., 1971, 1973; Baringer, 1971; Baringer und Swoveland, 1972; Bariety et al., 1973; Blinzinger und Deutschländer, 1969; Blinzinger et al., 1972; Grimley et al., 1973; Haas und Yunis, 1970; Hovig et al., 1968; Uzman et al., 1971).

c) Ebenfalls frei im Cytoplasma liegend, teils von Membranen umhüllt, jedoch niemals in den Ergastoplasmaschläuchen fanden wir runde, doppelmembranbegrenzte Partikel mit einem konstanten Durchmesser von 60 nm. Sie lassen sich von Vesikeln des Golgi-Apparates ebenso wie gegenüber Multivesicular Bodies oder Coated Vesicles deutlich abgrenzen. Eine Zuordnung zu bekannten Partikeln ist nicht sicher möglich. Die Partikel haben jedoch eine gewisse Ähnlichkeit mit den beispielsweise von Bernhard (1973) beschriebenen Oncornaviren, ohne daß wir aufgrund unserer Befunde eine Zuordnung zu dieser Virusgruppe treffen können.

d) Sowohl in den Tumorzellkernen der lymphoepithelialen Karzinome wie auch des Plattenepithelkarzinoms konnten wir Partikel nachweisen, die bei einem äußeren Durchmesser von durchschnittlich 100 nm eine Doppelmembran und häufig ein zentrales Core mit einem Durchmesser von 24 nm aufwiesen. Diese Partikel lagen sowohl diffus über das gesamte Chromatin verteilt wie auch im randständig verdichteten Chromatin, selten auch außerhalb der Kernebene im kernnahen Cytoplasma. Dort, wo sie zwischen Kernmembran und randständig verdichtetem Chromatin lagen, ließen die Partikel ebenfalls eine Doppelmembran und vielfach ein elektronendichtes Core erkennen. Die Partikel sind nach Form und Größe Viruspartikeln vom Herpes-Typ sehr ähnlich, die bei Hummeler et al. (1966), zur Hausen et al. (1967) und bei Kammer und Munk (1975) abgebildet sind. Sie lassen sich zudem kaum unterscheiden von Viruspartikeln, die Epstein (1962), Epstein und Achong (1970) sowie de The et al. (1969) und Sugano (1975) in Zellkulturen des Burkitt-Lymphoms und des Nasopharynxkarzinoms fanden.

Nach den Untersuchungen von Roizman und Spear hat das Nucleokapsid des Herpesvirus einen Durchmesser von 100 nm. Das umschlossene Virion besitzt einen Durchmesser von 100–150 nm. Die von zur Hausen et al. (1967) gezeigten Viruspartikel aus einer Burkitt-Tumorzellkultur messen etwa 84 nm, die von Hummeler et al. (1966) dargestellten Viruspartikel in Lymphoblastenkulturen eines Burkitt-Lymphoms weisen einen Durchmesser von 100–120 nm auf. Der Durchmesser der von Epstein und Achong (1970) in EB1-Lymphoblastenkernen gezeigten EB-Viruspartikel beträgt ebenfalls 100 nm. Gleichfalls weisen die Partikel, die von Nadol (1977) im Cytoplasma des Nasenrachenraumkarzinoms beschrieben wurden, einen Durchmesser zwischen 80 und 100 nm auf.

Beim Nachweis derartiger vorwiegend intranukleär gelegener Partikel wäre es wünschenswert, die Identität mit Herpes- beziehungsweise mit Epstein-Barr-Viren dadurch zu belegen, daß ultraimmunhistochemisch die Lokalisation der Partikel mit der positiven Fluoreszenz auf die Viruskapsidantikörper übereinstimmt. Dieser Nachweis ist derzeit nach einer Aufbereitung des Tumorgewebes für die elektronen-

mikroskopische Untersuchung, wie es für die vorgestellten Tumoren geschah, kaum möglich (zur Hausen, persönliche Mitteilung).

Bei der Erörterung der Virusnatur von Partikeln, wie wir sie vorwiegend intranukleär in den Tumorzellen nachwiesen, sind nach Haguenaу (persönliche Mitteilungen) verschiedene Kernstrukturen zu beachten, die zu einer Fehlinterpretation führen könnten. Schwierigkeiten bereitet im vorliegenden Fall die morphologische Trennung der Partikel von Kernporenanschnitten. Kernporen zeigen eine vielfältige Konfiguration, vor allem während mitotischer Teilungsfiguren oder pathologischer Mitosen. Über Kernporen von Interphasekernen liegen zwar zahlreiche Mitteilungen vor (Afzelius, 1955; Merriam, 1962; Feldherr, 1970; Du Praw, 1965; Franke, 1970, 1974; Franke und Scheer, 1974). Über die Ausprägung und Größe der Kernporen in der Prophase von Mitosen und vor allem bei pathologischen Kernteilungsfiguren, wie sie in Tumoren vorkommen, waren uns dagegen keine einschlägigen Untersuchungsergebnisse zugänglich. Auch die Angaben zur Porenweite variieren je nach untersuchter Tierspezies oder Gewebeart erheblich. Da nach Maul und Deaven (1977) die Kernporenkomplexe den Austausch von Makromolekülen zwischen den zwei Hauptkompartementen der Zelle entweder durch eine Veränderung der totalen Anzahl der Poren oder durch Änderung ihres Durchmessers kontrollieren, ist zu erwarten, daß abhängig vom metabolischen Funktionszustand der Zelle große Unterschiede in der Porenweite bestehen. Hinsichtlich der Menge der Kernporen lassen sich andeutungsweise Vergleich zu HeLa-Zellkernen ziehen (die einzige Tumorzelle, von der etwas über Kernporen bekannt ist), bei denen 11,24 Kernporen pro μm^2 gezählt werden (Maul und Deaven, 1977). Franke (1970) und Franke und Scheer (1974) zeigen elektronenmikroskopische Anschnitte von Kernporen der HeLa-Zellen, hier beträgt der Durchmesser einer Kernpore 60 nm. Die Kernporen in Sagittalschnitten durch Tumorzellkerne zeigen in unserem Untersuchungsmaterial sehr unterschiedliche Durchmesser von 60–480 nm. Nur selten findet man Kernporen mit einem Durchmesser bis zu 100 nm, die ein offenes Lumen, das heißt eine Verbindung zwischen Nucleoplasma und Cytoplasma erkennen lassen. Tangentiale Anschnitte derartiger Poren müßten im wesentlichen zur Darstellung einer Doppelringfigur führen, deren Durchmesser etwa 90 nm betragen sollte. Die zarte Membran, die das Porenlumen von den Umschlagstellen der Kerndoppelmembran aus überbrückt, kann in Tangentialschnitten nicht das Bild eines zentralen Cores simulieren. Es ist darüber hinaus zu bedenken, daß bei Tangentialanschnitten von Kernen bei der üblichen Schnittdicke von 60 nm die Kernporen nur als unscharf begrenzte runde Chromatinfiguren abgebildet werden können, da beim Strahlendurchgang zu wenig Kernmembranmasse getroffen wird, um eine scharfe Membranstruktur abzubilden. So kommt es zum Bild „membranloser“ Kernanschnitte (Vogell, persönliche Mitteilung). Kernporen in tangentialen Anschnitten von Zellkernen können daher im elektronenmikroskopischen Bild entweder nur als membranlose, kreisrunde Aufhellungsdefekte der Kernrandzonen imponieren oder als kreisrunde, unscharf begrenzte Nucleoplasmadefekte. Gegen Kernporen spricht auch die Häufigkeit des Auftretens dieser Gebilde; tangentielle Anschnitte von Kernporen sind in der Regel Zufallsbefunde und werden nur äußerst selten beobachtet. Beim lymphoepithelialen Karzinom des Nasopharynx findet man jedoch die beschriebenen Partikel sehr häufig, die Randschärfe der Partikel ist so deutlich gezeichnet, daß unseres Erachtens eine Abgrenzung zwischen Kernporen möglich ist. Gehäufte tangentielle Anschnitte von

Kernporen sind allerdings bei stark gelappten Kernen häufiger zu finden als bei abgerundeten Kernen. Die Zellkerne der epithelialen Tumorzellen des lymphoepithelialen Karzinoms sind jedoch, wie bereits in der lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahme erkennbar, auffallend groß und abgerundet (Abb. 1). In diesem Zusammenhang sei noch einmal darauf hingewiesen, daß sich die nukleären Partikel in einigen Kernen so diffus über das Karyoplasma verteilen, daß bei der konstanten Partikelgröße die Diskussion von Poren der Kernmembran weitgehend entfällt. Querschnittsstruktur, Dimension, Menge und Verteilung der Partikel sprechen daher aus morphologischer Sicht für eine Zuordnung der Partikel zu herpesartigen Viren.

Abschließend sei noch einmal darauf hingewiesen, daß auch andere cytoplasmatische und nukleäre Einschlüsse, wie eine Vermehrung von Ribosomen (Roizman und Furlong, 1974), eine Verteilung des Chromatins an die Kernränder (Nii et al., 1968), intracytoplasmatische, tubulo-retikuläre Einschlüsse (Anzil und Blinzinger, 1974; Baringer, 1971), das Auftreten sphärischer „Nuclear Bodies“ (Bouteille et al., 1967) auf die Beteiligung von Viren an der Transformation der Zellen hinweisen. Unsere Befunde fassen wir als Stütze der These auf, daß Viren eine pathogene Bedeutung bei der Entstehung von Nasopharynxkarzinomen haben.

Für die ausführlichen Diskussionen und Hinweise danken wir Mme. Docteur Françoise Haguenu, Laboratoire de Medicine Experimentale, College de France, Paris; Herrn Dr. med. K. H. Blinzinger, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Neuropathologie, München; Herrn Prof. Dr. med. H. zur Hausen, Institut für Virologie der Universität Freiburg; Herrn Prof. Dr. W. Vogell, Direktor des Instituts für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Universität Düsseldorf.

Fräulein S. Linnenkohl danken wir für die hervorragende technische Assistenz.

Literatur

- Afzelius, B. A.: The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea urchin oocyte as studied with the electron microscope. *Exp. Cell Res.* **8**, 147–158 (1955)
- Almeida, J. D., Howatson, A. F., Williams, M. G.: Electron microscope study of human warts: Sites of virus production and nature of the inclusion bodies. *J. Invest. Dermatol.* **38**, 337–345 (1962)
- Anzil, A. P., Blinzinger, K.: Electron microscopic studies of rabbit central and peripheral nervous system in experimental Borna disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **22**, 305–318 (1972)
- Anzil, A. P., Blinzinger, K.: Cytoplasmic tubule-containing vacuoles and endoplasmic tubuloreticular inclusions in the lymphocytes of a child. *Extr. de Biomedicine [Express]* **21**, 210–212 (1974)
- Arnold, W., Ganzer, U., Nasemann, T.: Zur Pathogenese und Klinik der papillomatösen Haut- und Schleimhaut-Erkrankungen. *Arch. Otolaryngol.* **214**, 221–230 (1977)
- Bariety, J., Amor, B., Kahan, A., Balafrej, J. L., Delbarre, F.: Ultrastructural anomalies in mononuclear cells of peripheral blood in S.L.E.: presence of virus-like inclusions. *Rev. Europ. Etud. Clin. Biol.* **16**, 715 (1971)
- Bariety, J., Richer, D., Appay, M., Grossetete, J., Callard, P.: Frequency of intraendothelial “virus-like” particles: An electron microscopy study of 376 human renal biosies. *J. Clin. Pathol.* **26**, 21–29 (1973)
- Baringer, J. R.: Tubular aggregates in endoplasmic reticulum in herpes-simplex encephalitis. *N. Engl. J. Med.* **285**, 943–945 (1971)
- Baringer, J. R., Swoveland, P.: Tubular aggregates in endoplasmic reticulum: evidence against their viral nature. *J. Ultrastruct. Res.* **41**, 270–274 (1972)
- Bernhard, W.: Oncornaviruses. 2. Type A and C virus particles in murine and other mammalian leukemias and carcinomas. Chapt. 15. In: *Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages*, Vol. 5 of ultrastructure in biological systems. Dalton, A. J., Haguenu, F. (eds.), pp. 283–306. New York, London: Academic Press 1973

- Blinzinger, K., Anzil, A. P., Deutschländer, N.: Nature of tubular aggregates. *N. Engl. J. Med.* **286**, 157–159 (1972)
- Blinzinger, K. H., Deutschländer, N.: Über eigentümliche kristallgitterartige Strukturkomplexe im Gehirn von staupekranken Hunde. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **53**, 283–287 (1969)
- Bouteille, M., Kalifat, S. R., Delarue, J.: Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrastruct. Res.* **19**, 474–481 (1967)
- Boyle, W., Riggs, J., Oshiro, J. S., Lenneth, E. H.: Electron microscopic identification of papova virus in laryngeal papilloma. *Laryngoscope* **83**, 1102–1109 (1973)
- Cappel, D. F.: On lymphoepithelioma of the nasopharynx and tonsils. *J. Pathol.* **39**, 49–64 (1934)
- Chiang, T. Ch., Jung, P. F.: The nasopharyngoscope and camera examination of the primary carcinoma of nasopharynx. *Cancer* **40**, 2353–2364 (1977)
- De The, G.: Lymphoblastoid transformation and presence of herpes-type viral particles in a Chinese nasopharyngeal tumor cultured in vitro. *Nature* **221**, 770–771 (1969)
- De The, G.: Epstein-Barr virus behavior in different populations and implications for control of Epstein-Barr virus-associated tumors. *Cancer Res.* **36**, 692–695 (1976)
- Doerr, W.: Über lymphoepitheliale Geschwülste Schmincke-Regaud. *Ärztl. Wschr.* **11**, 169–173 (1956)
- Doerr, W.: Bösartige Geschwülste des Verdauungskanalns. Kritische Bemerkungen zur Differentialdiagnose. *Internist* **2**, 457–472 (1961)
- Döhnert, G.: Über lymphoepitheliale Geschwülste. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1977
- Eppstein, M. A.: Observations of the fine structure of mature herpes simplex virus and on the compositions of its nucleosid. *J. Exp. Med.* **115**, 1–12 (1962)
- Eppstein, M. A., Achong, B. G.: The EB virus, Chapt. 22. In: Burkitt's Lymphoma. Burkitt, D. P., Wright, D. H. (eds.). Edinburgh, London: Livingstone 1970
- Dunn, A. E. G., Ogilvie, M. M.: Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: Observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J. Ultrastruct. Res.* **22**, 282–295 (1968)
- Du Praw, E. J.: The organisation of nuclei and chromosomes in honeybee embryonic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 161–168 (1965)
- Fawcett, D. W.: Electron microscope observations on intracellular virus-like particles associated with the cells of the lucke renal adenocarcinoma. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 725–742 (1956)
- Feldherr, C. M.: The effect of the electron-opaque pore material on exchanges through the nuclear annuli. *J. Cell Biol.* **25**, 43–54 (1965)
- Franke, W. W.: On the universality of nuclear pore complex structure. *Z. Zellforsch.* **105**, 405–429 (1970)
- Franke, W. W.: Structure, biochemistry, and functions of the nuclear envelope. *Int. Rev. Cytol.* [Suppl.] **4**, 72–236 (1974)
- Franke, W. W., Scheer, U.: Structures and functions of the nuclear envelope. Chapt. 5. In: *The Cell nucleus*, Vol. 1. Busch, H. (ed.), pp. 220–348. New York, London: Academic Press 1974
- Grimley, P. M., Decker, J. L., Michelitsch, J. H., Frantz, M. M.: Abnormal structures in circulating lymphocytes from patients with systemic lupus erythematoses and related disorders. *Arthritis Rheum.* **16**, 313–321 (1973)
- Grimley, P. M., Barry, D. W., Schaff, Z.: Induction of "virus-like" tubular structures in the endoplasmic reticulum of human lymphoid cells treated with 5-bromodeoxyuridine. *Fed. Proc.* **32**, 964–973 (1973)
- Gunven, P., Henle, G., Henle, W., Clifford, P.: Antibodies to EBV-associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients. *Nature* **228**, 1053–1056 (1970)
- Haas, J. E., Yunis, E. J.: Tubular inclusions of systemic lupus erythematosus. Ultrastructural observations regarding their possible viral nature. *Exp. Mol. Pathol.* **12**, 257–263 (1970)
- Henle, W., Henle, G.: Epstein-Barr virus and human malignancies. *Cancer* **34**, 1368–1374 (1974)
- Hovig, T., Jeremic, M., Stavem, P. A.: A new type of inclusion bodies in lymphocytes. *Scand. J. Haematol.* **5**, 81–95 (1968)
- Hummeler, K., Henle, G., Henle, W.: Structure of a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt lymphoma. *J. Bacteriol.* **91**, 1366–1368 (1966)
- Ilberg, v. C., Kleinmann, H., Arnold, W.: Das Schmincke-Karzinom des Nasopharynx. *Laryngol. Rhinol. Otol.* (Stuttg.) **55**, 420–428 (1976)

- Jahnke, V.: Elektronenmikroskopische Befunde am normalen menschlichen Nasenrachenepithel. *Laryngol. Rhinol. Otol.* (Stuttg.) **53**, 290–300 (1974)
- Kammer, K., Munk, K.: DNS-haltige onkogene Viren und Tumorgenese. In: Hdb. Allg. Path. VI/6. Grundmann, E., (ed.) pp. 1–116. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1975
- Klein, G., Giovannella, B. C., Lindahl, T., Fialkow, P., Singh, S., Stehlin, J. S.: Direct evidence for the presence of Epstein-Barr Virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **71**, 4737–4741 (1974)
- Lin, H. S., Lin, Ch.-S., Yeh, S., Tu, S. M.: Fine structure of nasopharyngeal carcinoma with special reference to the anaplastic type. *Cancer* **23**, 390–405 (1969)
- Lundquist, P. G., Frithiof, L., Wersäll, J.: Ultrastructural features of human juvenile laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) **80**, 137–149 (1975)
- Lynn, T., Hsu, M., Hsieh, T., Tu, S.: Prognosis of nasopharyngeal carcinoma by Epstein-Barr-Virus antibody titer. *Arch. Otolaryngol.* **103**, 128–132 (1977)
- Maul, G. G., Deaven, L.: Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content. *J. Cell Biol.* **73**, 748–760 (1977)
- Merriam, R. W.: Some dynamic aspects of the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **12**, 79–90 (1962)
- Nadol, J. B.: Viral particles in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* **87**, 1932–1938 (1977)
- Nii, S., Morgan, C., Rose, H. M.: Electron microscopy of herpes simplex virus. II. Sequence of development. *J. Virol.* **2**, 517–536 (1968)
- Oshiro, L. S.: Corona viruses. In: Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages. Dalton, A. J., Hagenau, F. (eds.), pp. 231–246. New York: Academic Press 1973
- Quick, D., Cutler, M.: Transitional cell epidermoid carcinoma. *Surg. Gynecol. Obstet.* **45**, 320–331 (1927)
- Rapp, F., Duff, R.: Oncogenic conversion of normal cells by inactivated herpes simplex viruses. *Cancer* **34**, 1353–1362 (1974)
- Rapp, F., Reed, C. L.: The viral etiology of cancer. *Cancer* **40**, 419–429 (1977)
- Regaud, C.: Lymphoepitheliome de l'hypopharynx traité par roentgentherapie sans reaction notable du pharynx et du larynx. *Bull. Mem. Soc. Fr. d'Oto-Rhino-Laryng.* **34**, 209–214 (1921)
- Regaud, C., Reverchon, L.: Sur un cas d'épithélioma épidermoïde développé dans le massif maxillaire supérieur, étendu aux téguments de la face, aux cavités buccale, nasale et orbitaire, ainsi que aux ganglions du cou guéri par la curietherapie. *Fev. Laryng.* **42**, 369–378 (1921)
- Reverchon, L., Coutard, H.: Lymphoepitheliome de l'hypopharynx traité par le roentgentherapie. *Bull. Mem. Soc. Fr. d'Oto-Rhino-Laryng.* **34**, 209–214 (1921)
- Roizman, B., Furlong, D.: The replication of herpes viruses. In: *Comprehensive virology*, Vol. 3. Fraenkel Conrat, H., Wagner, R. R. (eds.), pp. 229–403. New York: Plenum Press 1974
- Roizman, B., Spear, P. G.: Herpes viruses, Chapt. 5. In: *Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages*, Vol. 5, Ultrastructure in biological systems. Dalton, A. J., Hagenau, F. (eds.), pp. 83–107. New York, London: Academic Press 1973
- Schmauz, R., Hoppe, W., Zur Hausen, H.: Okkultes Nasopharynxcarcinom. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **100**, 2527–2529 (1975)
- Schmincke, A.: Über lymphoepitheliale Geschwülste. *Beitr. Pathol.* **68**, 161–170 (1921)
- Simmons, M. W., Ariel, I. M.: Carcinoma of the nasopharynx; report of 150 cases. *Surg. Gynecol. Obstet.* **88**, 763–775 (1949)
- Sugano, H.: Potential viral etiology of human tumors. In: Hdb. Alg. Path., VI/6. Grundmann, E. (ed.), pp. 243–328. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1975
- Svoboda, D., Kirchner, F., Shanmugaratnam, K.: Ultrastructure of nasopharyngeal carcinoma in American and Chinese patients. *Exp. Mol. Pathol.* **4**, 189–203 (1965)
- Uzman, B. G., Saito, H., Kasac, M.: Tubular arrays in the endoplasmic reticulum in human tumor cells. *Lab. Invest.* **24**, 492–498 (1971)
- Wang, C. C., Little, J. B., Schulz, M. D.: Cancer of the nasopharynx. Its clinical and radiotherapeutic considerations. *Cancer* **15**, 921–926 (1962)
- Wolf, H., Zur Hausen, H., Becker, V.: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature [New Biol.]* **244**, 245–247 (1973)
- Yeh, S.: Histological classification of carcinoma of nasopharynx with critical review to existence of lymphoepitheliomas. *Cancer* **15**, 895–920 (1962)

- Yoshida, T. O., Yasuda-Yasaki, Utsumi, K. R.: Auto-antibodies in the sera of patients with nasopharyngeal carcinoma. In: *Oncogenesis and Herpesvirus II*. De The, D., Epstein, M. A., zur Hausen, H. (eds.), Part. 2, pp. 259–273. Lyon: Internat. Ag. Res. Canc. 1976
- Zur Hausen, H., Henle, W., Hummeler, E., Diehl, V., Henle, G.: Comparative study of cultured Burkitt tumor cells by immunofluorescence, autoradiography, and electron microscopy. *J. Virol.* **1**, 830–837 (1967)
- Zur Hausen, H.: Biochemical approaches to detection of Epstein-Barr virus in human tumors. *Cancer Res.* **36**, 678–680 (1976)

Eingegangen am 5. September 1978