

Aus der Staatlichen Anstalt für experimentelle Therapie, „Paul Ehrlich-Institut“ zu Frankfurt am Main (Kommiss. Direktor: Prof. Dr. G. HEYMANN) sowie der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max Planck-Institut) München (Direktor: Prof. Dr. G. PETERS)

Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen *

I. Mitteilung:

Grundlagen, Technik und Bewertung des Versuchs
zur Messung der Neurovirulenz für den Affen

Von

OTTO BONIN und FRIEDRICH UNTERHARNSCHEIDT

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. August 1964)

Die Lebendimpfung gegen Poliomyelitis ahmt den Mechanismus der natürlichen Infektion sehr weitgehend nach — sogar die Eintrittspforte des Virus in den Organismus ist bei der Schluckimpfung die gleiche wie bei der natürlichen Infektion. Sie benutzt dazu ein sogenanntes attenuiertes oder abgeschwächtes Virus, das sich im Organismus des Impflings wie das Wildvirus vermehrt und von ihm auch ausgeschieden wird.

Man braucht gar nicht mit SABIN¹² zu postulieren, daß die Infektion des Darmtraktes mit diesem Impfvirus eine genetisch verankerte celluläre Resistenz der Darmschleimhaut gegen die Reinfektion erzeugt. Die Tatsache, daß die Reinfektion mit dem gleichen Typ während einer begrenzten Zeit nach der Impfung nicht angeht, kann man auch damit erklären, daß das Impfvirus über die Lymphknoten des Darmtraktes in den Organismus eingeschleust wird und diese zu einer besonders starken Antikörperbildung veranlaßt. Die Schluckimpfung richtet also eine Barriere gegen die Ausbreitung des Erregers im Organismus auf, die bereits in der Darmwand die Viren abfängt. Damit wird schon die Virämie zumindest quantitativ stark reduziert.

Bei der Impfung mit inaktiviertem Impfstoff nach SALK wird demgegenüber nur eine wesentlich kleinere Menge nicht vermehrungsfähiges Virusantigen parenteral appliziert. Diese verteilt sich auf alle antikörperbildenden Gewebe ohne Bevorzugung der Darmlymphknoten. Nach dieser Impfung werden weniger Serumantikörper gebildet als nach der massiven Virusinvasion bei der Schluckimpfung. Die Antikörper erreichen auch nicht ihre höchste Konzentration in den Lymphknoten, die direkt hinter der Eintrittspforte des Virus liegen, sie können also das Angehen der Darminfektion nicht verhindern. Die durch diese Impfung vermittelte „immunologische Erfahrung“ versetzt den Impfling aber in die Lage, bei einer späteren Infektion mit Wildvirus so schnell Antikörper bilden zu können, daß die Ausbreitung des Virus über die Virämie zum ZNS verhindert wird.

* Herrn Prof. Dr. WILLIBALD SCHOLZ zum 75. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

Die theoretischen und praktischen Vorteile der Lebendimpfung gegenüber der Impfung mit inaktivierten Impfstoffen sollen nicht bestritten werden. Sie werden aber mit dem Nachteil erkauft, daß man den Impfing mit einem vermehrungsfähigen Krankheitserreger infizieren muß. Ein Virus, das man für eine solche Lebendimpfung benutzen will, darf den Menschen nicht krankmachen; es darf also keine nennenswerte Neuropathogenität oder Neurovirulenz für den Menschen besitzen.

Diese für die Beurteilung der Impfstoffe wesentlichste Eigenschaft läßt sich bei der laufenden Kontrolle der Impfstoffproduktion nicht überprüfen, da nicht jede Impfstoffcharge vor ihrer allgemeinen Anwendung einen großen Feldversuch am Menschen durchlaufen kann. Es gibt aber eine Reihe von Hilfsmethoden zur Charakterisierung der Impfviren, die aber alle keine direkten Schlüsse auf die wichtigste Eigenschaft der Neurovirulenz für den Menschen erlauben. Neben der Neuropathogenität für den Affen, die in dieser und der folgenden Mitteilung besprochen werden soll, kommen dafür noch drei sogenannte Gewebekulturmerkmale der Viren in Frage.

Die attenuierten Impfviren vermehren sich z. B. in der Gewebekultur bei Bebrütungstemperaturen um 40° C sehr viel schlechter als die meisten — aber eben nicht alle — Wildstämme (LWOFF u. LWOFF³). Weiterhin wird die Vermehrung der Impfstämme im Vergleich zu den meisten Wildstämme bei erniedrigtem Bicarbonatgehalt im Medium deutlich verzögert (VOGT, DULBECCO u. WENNER¹³; HSUUNG u. MELNICK⁴). Und schließlich zeigen die Impfviren eine schlechte Vermehrungsfähigkeit auf den Zellen eines bestimmten Affennieren-Zellstammes, der permanent kultiviert werden kann (KANDA u. MELNICK⁶).

Wie eben schon angedeutet, sind alle diese Eigenschaften nicht absolut mit der Neuropathogenität der Viren für den Affen — und somit erst recht nicht mit der für den Menschen — korreliert.

Mit Abstand das wichtigste Merkmal der attenuierten Impfviren ist die herabgesetzte Neurovirulenz der Viren für den Affen. Aber auch, wenn wir im Affenversuch eine geringe Neuropathogenität finden, dürfen wir daraus nicht folgern, daß dieses Virus den Menschen überhaupt nicht schädigen könnte. Wenn wir uns darüber klar werden wollen, was die Prüfung der Poliomyelitis-Lebendimpfstoffe im Affenversuch für die Unschädlichkeit in der Praxis bedeutet, müssen wir auf die alten Untersuchungen von SABIN¹¹ zurückgreifen, die die theoretische Grundlage für diese Impfmethoden darstellen.

In umfangreichen Experimenten an verschiedenen Affenarten hat SABIN wahrscheinlich gemacht, daß sich die Empfindlichkeit der motorischen Rückenmarkneurone gegenüber dem Poliovirus in der Entwicklungsreihe der Primaten gesetzmäßig verhält — und zwar nimmt sie mit zunehmender Entwicklungsstufe der Tierspecies ab. In seinen Versuchen traten Lähmungen oder histologisch erkennbare gewebliche Alterationen bei Rhesusaffen erst nach intraspinaler Injektion von

höheren Virusdosen auf als bei Cynomolgusaffen. Hieraus folgt, daß der Cynomolgusaffe empfindlicher gegen diese Virusinfektion ist als der Rhesusaffe. Diese Tatsache wurde erst kürzlich wieder vom englischen Prüfungsinsttitut (BESWICK u. WINTER²) und von unserer Arbeitsgruppe (BONIN, UNTERHARNSCHEIDT, MAULER, SCHMIDT u. SCHMIDT³) unter weitgehendem Ausschluß eines zufälligen Irrtums bestätigt. Beim Schimpanse war die paralytogene Virusdosis noch größer; seine Neurone müssen also noch weniger empfindlich sein.

Die Empfindlichkeit der Rückenmarksneurone des Menschen, der an der Spitze dieser Entwicklungsreihe steht, können wir nicht in derartigen Versuchen quantitativ messen. Wir wissen nur, daß Virusstämme von aparalytischen menschlichen Erkrankungen für Schimpansen — und in noch stärkerem Maß für niedere Affen — oft noch paralytogen sind. Andererseits waren die von paralytischen menschlichen Fällen stammenden Viren in SABINS Experimenten für Schimpansen immer paralytogen. Der Schluß, daß die motorischen Neurone des Menschen noch weniger empfindlich sind, liegt also nahe — er ist aber nicht quantitativ erwiesen.

Noch größere Virusdosen brauchen wir zur Erzeugung poliomyelitischer Läsionen oder zur Paralysierung, wenn wir das Virus intracerebral — d. h. in die Thalamusregion der beiden Hemisphären — injizieren. SABIN¹² nimmt an, daß dies damit zusammenhängt, daß das Virus bei dieser Injektionsart sich erst über die relativ unempfindlichen Zellen des Hirnstammes und des Halsmarks ausbreiten muß, ehe es die empfindlicheren Zellen des Lendenmarks erreicht. In einem Versuch mit intrathalamischer Injektionstechnik messen wir also wahrscheinlich eine andere Eigenschaft des Virus als mit der intraspinalen Injektion. Die hier vorliegenden Verhältnisse sind aber noch nicht voll aufgeklärt. Wie kompliziert sie sein müssen, wird durch die Tatsache beleuchtet, daß der im intraspinalen Affenversuch sehr gut attenuiert erscheinende Virustyp I nach i.m. Injektion relativ häufig Paralysen hervorruft, während das die anderen Typen seltener tun (KIRSCHSTEIN u. Mitarb.⁷).

Schon aus diesen Andeutungen dürfte klar werden, daß ein direkter Schluß von der meßbaren Affen-Neuropathogenität auf seine zu erwartende Menschen-Neuropathogenität unzulässig ist. Um nun trotzdem eine begrenzte Aussage machen zu können, hat man in die Prüfung der Poliomyelitis-Lebendimpfstoffe einen Vergleichswert eingebaut.

In diesem Versuch injizieren wir gleichartige Gruppen von Affen, die selbstverständlich keine Poliomyelitis-Antikörper haben dürfen, mit abgestuften Dosen des zu prüfenden Virus. Gleichzeitig erhalten vergleichbare Tiergruppen die gleichen Dosen eines Bezugsvirus, von dem wir wissen, daß es sich in den Feldversuchen am Menschen bewährt hat. Finden wir nun, daß das zu prüfende Impfstoffvirus beim Affen

keine stärkeren Läsionen erzeugt als das Bezugsvirus, so knüpfen wir daran die Erwartung, daß das Impfstoffvirus auch den Menschen nicht stärker schädigen wird als die in den Feldversuchen erprobten Impfstoffe, mit denen unser Bezugsvirus sicher gleich ist.

Der Versuch zur Messung der Neurovirulenz von Impfstoffviren für den Affen gliedert sich in zwei Teile — einen mit intracerebraler (intrathalamischer) und einen mit intraspinaler (intralumbaler) Injektionstechnik. In beiden Teilen dieses Versuchs werden mehrere Dosen des Impfstoffvirus mit nahezu gleichen Dosen des Bezugsvirus verglichen.

Im Versuchsteil mit intracerebraler Technik werden jeweils 20 Affen mit je 1 cm^3 Virus ($0,5 \text{ cm}^3$ in die Thalamusregion beider Hemisphären) injiziert, und zwar erhalten davon 10 Tiere unverdünntes Virus, 10 Tiere eine Verdünnung $1:10$ (10^{-1}). Die Virussuspension wird für diesen Versuch auf einen solchen Titer eingestellt, daß das Inokulum in diesen Tiergruppen $10-30$ Millionen ($10^{7,0}-10^{7,5}$) bzw. $1-3$ Millionen ($10^{6,0}-10^{6,5}$) Gewebekultur-Infektionsdosen (dim) pro Tier enthält.

Im Versuchsteil mit intraspinaler Injektionstechnik ist es notwendig, die Wirkung größerer Dosisunterschiede zu untersuchen, da die Abhängigkeit zwischen Dosis und Schädigung bei dieser Injektionsart ausgeprägter ist. Dabei erhalten fünf Gruppen von je mindestens fünf Affen Virusdosen, die sich jeweils um den Faktor 10 unterscheiden. Eine Gruppe erhält $0,2 \text{ cm}^3$ (in einigen Instituten $0,1 \text{ cm}^3$) unverdünntes Virus; eine zweite Gruppe $1:10$ (10^{-1}) verdünntes usw. . . . bis zur Verdünnungsstufe $1:10000$ oder 10^{-4} . Die Dosisabstufung in Gewebekultur-Infektionseinheiten reicht also von $2-6$ Millionen ($10^{6,3}-10^{6,8}$) dim pro Tier in der Gruppe mit höchster Dosis bis zu $200-600$ ($10^{2,3}-10^{2,8}$) dim in der Gruppe mit der kleinsten Dosis.

Während die Injektionstechnik beim intrathalamischen Versuchsteil keine sehr große Rolle zu spielen scheint, ist sie beim intraspinalen Versuch recht bedeutend. Die Meinungen, welche intraspinale Injektionstechnik für die Routineprüfung die wertvollere ist, sind noch sehr geteilt.

Bei der „Standardtechnik“ (MELNICK u. BRENNAN⁹) in den USA ist man bestrebt, ein großes Inokulum in das Rückenmark zu plazieren, welches sich entlang der Faserrichtung der weißen Substanz oft bis in das Thorakalmark ausbreitet. SABIN¹² versucht dagegen, das Inokulum streng lokalisiert zu halten, auch wenn dabei vielleicht ein Teil nicht im Rückenmark bleibt, sondern in den Liquorraum austritt.

BESWICK¹ hat den mechanischen Faktor bei diesen beiden Injektionsarten unter Benutzung chinesischer Tusche verglichen. Bei der Standardtechnik wurde eine starke, wolkig ausgezogene Schwärzung bis zur unteren Thorakalregion sichtbar, bei der Sabinschen Technik zeigte sich nur ein schwärzlicher Schleier unmittelbar an der Injektionsstelle. Daß beide Methoden, selbst bei Verwendung der gleichen attenuierten Poliostämme und der gleichen Dosis, zu unterschiedlichen geweblichen Alterationen führen müssen, ist offensichtlich. Man wird bei der Standard-Technik schwerere gewebliche Alterationen erwarten können. Demgegenüber wird bei der Sabinschen Technik der mechanische Faktor bei der Virusausbreitung im Nervengewebe kleiner gehalten — wenn hierfür auch eine mögliche Ausbreitung über den Liquorraum in Kauf genommen werden muß. Wir glauben

jedoch mit SABIN, daß man feinere Unterschiede im Verteilungsmuster der Läsionen bei verschiedenen Viren besser erkennen kann, wenn sich das Virus im Rückenmark aktiv und nicht passiv ausbreitet.

Nach einer klinischen Beobachtung von 17–20 Tagen, bei der besonders auf progrediente Paresen oder Paralysen zu achten ist, werden die Tiere zur histologischen Untersuchung getötet.

Nach unserer Erfahrung an einem großen Tiermaterial stimmt der klinische Befund bei den Tieren sehr oft nicht mit dem histologischen Befund überein. Die klinische Diagnose der paralytischen Affenpoliomyelitis ist nur in schweren Fällen sicher zu stellen. Dagegen werden bei Tieren mit leichteren progredienten Paresen oft keine poliomyelitischen Läsionen im Nervensystem gefunden. Man muß daraus folgern, daß auch leichtere traumatische Paresen während einer Beobachtungszeit von 3 Wochen eine leichte Progredienz zeigen können. Andererseits fanden wir recht häufig Tiere mit ausgeprägten histologischen Läsionen, bei denen sicher kein klinischer Befund zu erheben war. Wie beim Menschen muß also auch beim Affen ein sehr erheblicher Anteil der Nervenzellen zerstört sein, ehe Schwäche bzw. Lähmung der zugehörigen Muskelgruppen auftritt.

Tabelle. *Umfang der histologischen Untersuchung bei der Neurovirenlenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen am Affen*

Region des ZNS	Anzahl der Gewebsblöcke	Anzahl der histol. Schnitte
Lumbalregion	6	18
Cervicalregion	6	12
Medulla obl.	4	4
Mittelhirn	2	4
Motor. Region	2	2
Insgesamt:	20	40

Die getöteten Versuchstiere werden vor der Entnahme des Nervensystems mit Formalin-Kochsalzlösung perfundiert. Durch diese Behandlung werden autolytische Veränderungen in den Geweben weitgehend vermieden und die Qualität der histologischen Präparate sehr verbessert.

Für die histologische Untersuchung werden je sechs Gewebsblöcke der Lumbalregion und Cervicalregion, vier der Medulla oblongata, zwei des Mittelhirns und zwei der motorischen Region entnommen. Von diesen Blöcken wird eine unterschiedliche Zahl von Schnitten untersucht. Die Tabelle gibt den Umfang der histologischen Untersuchung in den einzelnen Regionen des ZNS detailliert an. Insgesamt werden von jedem Tier 40 Schnitte aus 20 Gewebsblöcken mikroskopisch untersucht.

Diese Zahl der histologischen Schnitte übersteigt die in manchen anderen Laboratorien untersuchte Schnitzahl bei weitem. Eine solche ausgedehnte histologische Untersuchung ist jedoch notwendig, weil die Läsionen bei der menschlichen und experimentellen Poliomyelitis diskontinuierlich verteilt sind. Nur eine entsprechend umfangreiche Untersuchung kann daher ein wahres Bild über die Schwere und Ausbreitung des Krankheitsprozesses beim Versuchstier vermitteln.

Um uns ein Bild über den notwendigen Untersuchungsumfang zu verschaffen, haben wir einen Affenversuch unter Zugrundelegung der 40 untersuchten Schnitte und unter Zugrundelegung von nur 18 Schnitten vergleichend bewertet. Bei dieser

zweiten Bewertung wurden nur die Schnitte gezählt, die nach dem Untersuchungsschema eines anderen Laboratoriums zu untersuchen waren. Diese Doppelbewertung eines Versuchs hat ergeben, daß man mit einem Untersuchungsumfang von nur 18 Schnitten pro Tier bei 39 von 191 Tieren (= 20,4%) die Ausbreitung der Poliomyelitis in eine oder mehrere Regionen des ZNS nicht erkannt hätte, die mit 40 Schnitten pro Tier erkannt wurde. Entsprechend der kleineren Schnittzahl war auch die Streuung der Ergebnisse mit verschiedenen Viren bei der Bewertung von nur 18 Schnitten größer als bei Bewertung von 40 Schnitten.

Die Einbettung der Gewebehölzchen erfolgt in Paraffin; die Schnittdicke beträgt 8—9 μ ; die Schnitte werden nach der Nissl-Methode gefärbt.

Für die Bewertung dieses Versuchs werden nur Tiere herangezogen, bei denen das Inokulum einwandfrei plaziert war. Bei intraspinal injizierten Tieren muß der Stichkanal (bzw. seine Umgebungsreaktion) im Rückenmark — und zwar vorzugsweise in seiner grauen Substanz — zu finden sein. Bei intracerebral injizierten Tieren wird der einwandfreie Sitz des Inokulums durch zusätzliche Untersuchung beider Thalamus gesichert.

Die Schwere und Ausbreitung von geweblichen Alterationen bei den Versuchstieren kann nur dann genügend exakt und etwa objektiv verglichen werden, wenn man sie in irgendeiner Weise zahlenmäßig ausdrückt. Daher war ein Bewertungs- oder Benotungsschema zu entwerfen, welches für jeden histologischen Schnitt eine qualitative und quantitative Einstufung erlaubte. In Anlehnung an andere Schemata (JUNGHERR⁵; MELNICK u. BRENNAN⁹; MURRAY u. Mitarb.¹⁰) wurde ein Benotungsschema entwickelt, welches die Läsionen auf jedem einzelnen Schnitt mit den Ziffern 0—4 bewertet. Die Definitionen für diese Ziffern sind auf Abb. 1 angegeben. Liegen keine Veränderungen vor, wird der Schnitt mit 0 bewertet. Bestehen perivasculäre Infiltrate bzw. Glia-knötchen, wird je nach Stärke dieser Veränderungen mit 1 oder 2 benotet. Die Bewertungsziffern 3 und 4 sind den geweblichen Veränderungen vorbehalten, die mit Alterationen am Parenchym, an den Nervenzellen einhergehen, wie Nervenzelluntergang und Neurophagien.

Die für jeden einzelnen Schnitt gefundenen Läsionsqualitäten werden mit diesen Bewertungsziffern in den in Abb. 1 wiedergegebenen Bewertungsbogen eingetragen. Durch Bildung von verschiedenen Mitteln aus diesen Bewertungsziffern ergeben sich Größen, die einen Vergleich der Schwere und Ausbreitung der Poliomyelitis bei verschiedenen Einzeltieren und in verschiedenen Versuchsgruppen ermöglichen.

Zunächst wird für jeden Affen das arithmetische Mittel der Bewertungsziffern in jeder Region des ZNS gebildet. Daraus kann durch Mittelung für jedes Tier eine Bewertungsziffer für die Schwere und die Ausbreitung der Poliomyelitis gewonnen werden. Die Bewertungsziffer für die Schwere ergibt sich als das Mittel aus allen bei dem Tier gefundenen Läsionen, die für die Ausbreitung als das Mittel aus den Läsionen in der Region, die vom Injektionsort am weitesten entfernt ist (bei intra-

cerebral injizierten Tieren also im Lendenmark und bei intralumbal injizierten Tieren im Mittelhirn und der motorischen Region des Großhirns). Die Mitteilung über alle Tiere einer Gruppe innerhalb jeder Region erlaubt ein Urteil über die Schwere der Veränderungen in einer Region innerhalb einer gleichartig injizierten Tiergruppe. Und schließlich können die Mittel aus den bereits genannten Bewertungsziffern für Schwere und Ausbreitung bei jedem Tier für die Gesamtbewertung einer Tiergruppe herangezogen werden.

ZEICHENERKÄÄRUNG

- | | |
|-----|--------------------|
| O | ohne klin. Befund. |
| S | geringe Schwäche. |
| S | Schwäche. |
| (L) | Lähmung. |
| L | scherle Lähmung. |
| > | zunehmend. |
| = | dohnernd. |
| = | gleichbleibend. |
| (M) | tot (am ... Tag). |
| D | Möglichkeit. |
| | Durchfall. |
| | rechter Arm. |
| | linken Arm. |
| | linken Bein. |
| | rechten Bein. |

BEWERBTINGSKRITERIEN EINER LÄSIONEN:

0. Keine histopath. Veränderungen (mit Ausnahme des Injektionstrauma)

1: Sehr geringe und wenig ausgedehnte lymphatische Reaktion und vereinzelte Glasknotchen und -sternechen an Prädeiktionsstellen.

2: Stärkere und ausgedehntere mesodermale und gliose Reaktion an Prädeiktionsstellen.

3: Vereinzelte Neuropathien bzw. Tigrolyse mit mesodermal-gliose Reaktion.

4: Häufige Neuropathien bzw. Tigrolyse mit mesodermal-gliose Reaktionen durch das Injektionstrauma.

Abb. 1. Bewertungsbogen für eine Gruppe gleichartig injizierter Tiere in der Neuropathogenitätsprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen am Affen

Ein derartiges numerisches Bewertungsverfahren schien zwar zunächst recht willkürlich und vielleicht auch unbiologisch. Die Erfahrung an insgesamt bisher mehr als 1000 Affen hat aber gezeigt, daß diese Methode für den geforderten Vergleichsversuch durchaus brauchbar ist und daß der Krankheitsprozeß bei einem Tier nicht einfacher mit genügender Exaktheit beschrieben werden kann.

Ein solches Verfahren hat natürlich zur Voraussetzung, daß alle Tiere eines Vergleichsversuchs von demselben Pathologen untersucht werden. Denn bei diesem Verfahren erhält ein objektiver Befund in Form bestimmter geweblicher Alterationen durch den Mikroskopierenden eine subjektive Benotung. Diese Tatsache wirkt sich nur dann nicht als Meßfehler aus, wenn der subjektive Faktor bei allen untersuchten Tierkollektiven möglichst gleich gehalten wird.

Für den Vergleich zwischen verschiedenen Tiergruppen, die mit gleichen Dosen verschiedener Viren injiziert sind, ergeben sich nun verschiedene Möglichkeiten:

1. Unterschiede im klinischen Bild bei den Tieren vergleichbarer Gruppen können durch einen Vergleich der Häufigkeiten von Tieren mit progredienten Paresen oder Paralysen ausgedrückt werden.

2. Durch Bildung des Mittels über alle Läsionen eines Tieres — oder durch Mittelung der Bewertungsziffern in allen Regionen eines Tieres — kann eine Zahl gewonnen werden, die die Schwere des Krankheitsprozesses charakterisiert. Gleichzeitig kann durch Mittelung der Bewertungsziffern in den vom Injektionsort am weitesten entfernten Regionen eine Zahl zur Charakterisierung der Ausbreitungstendenz gewonnen werden (siehe oben). Die Gruppenmittel dieser beiden Bewertungsziffern erlauben aber nur einen recht groben Vergleich der Neuropathogenität verschiedener Viren.

3. Eine feinere Unterscheidung wird schon dann möglich, wenn man die Gruppenmittel der Bewertungsziffern in jeder Region des ZNS zueinander in Beziehung setzt. Bei einem solchen Verfahren werden Prädilektionsstellen in bestimmten Regionen des ZNS besser erkannt und bei der Bewertung stärker ins Gewicht fallen.

Diese beiden letztgenannten Verfahren haben aber den unbestrittenen Nachteil, daß die qualitativ unterschiedlichen Läsionen (mesodermal-gliöse Reaktionen (1 und 2) und Nervenzellschädigungen (3 und 4) zu einer Bewertungsziffer zusammengefaßt werden. Unterschiede in der Fähigkeit verschiedener Viren, mesodermal-gliöse Reaktionen zu verursachen und die Nervenzellen zu schädigen, werden bei einem solchen Bewertungsverfahren weitgehend verwischt. Eine weniger formalistische Lösung, die diese Unterschiede berücksichtigt, ist mit dem folgenden Verfahren möglich:

4. Für jede Region des ZNS wird die Häufigkeit von Schnitten mit Läsionen bestimmter Qualität bestimmt. Dabei können zur Vereinfachung die mit 1 und 2 benoteten mesodermal-gliösen Reaktionen einerseits und die mit 3 und 4 benoteten Nervenzellschädigungen andererseits zusammengefaßt werden. Wenn man die Häufigkeiten von Läsionen dieser verschiedenen Qualitäten in allen Regionen des ZNS in gleichartig injizierten Tiergruppen vergleicht, ergibt sich sicher eine Unterscheidungsmöglichkeit, die die meisten für die Beurteilung wesentlichen Daten berücksichtigt. Andererseits wird bei dieser detaillierteren Aufgliederung der Versuchsresultate die zufällige Streuung der Ergebnisse sehr stark ins Gewicht fallen.

Wie mit diesen Bemerkungen schon angedeutet, entstehen erhebliche Schwierigkeiten bei der Bewertung der Affenversuche hauptsächlich dadurch, daß die individuelle Empfindlichkeit der Einzeltiere aus einem einheitlichen Kollektiv sehr stark streut. Für diese Streuung der Einzelergebnisse ist sicher auch zum Teil die diffizile Injektionstechnik verantwortlich, bei der es darauf ankommt, das Inokulum in die graue Substanz des Lendenmarks zu plazieren.

Mit dem gleichen Virus können wir also zu verschiedenen Zeiten, bei verschiedenen Tieren und bei verschiedener Kondition dessen, der

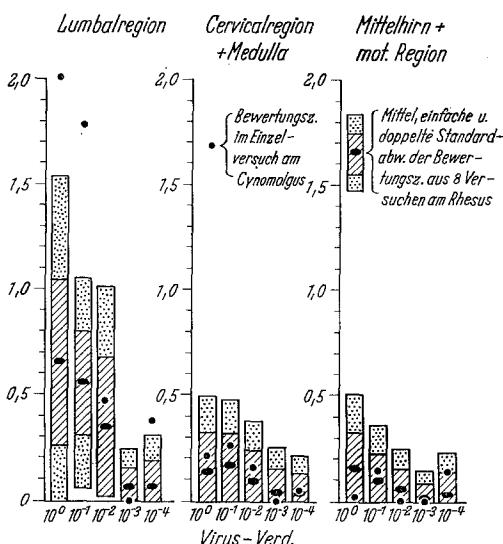


Abb. 2. Vergleich der Gruppen-Bewertungsziffern aus einem einzelnen Versuch mit Typ I-Bezugsvirus im Cynomolgusaffen mit dem Mittel der einfachen und doppelten Standardabweichung der Gruppen-Bewertungsziffern aus acht Versuchen mit Typ I-Bezugsviren im Rhesusaffen

verschieden. Versuchen mit Typ I-Bezugsviren im Rhesusaffen

Wissenschaftlich fundierte Grenze für die normale zufällige Schwankung der Neuropathogenitätsprüfung festlegen, bei deren Überschreitung wir mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit annehmen müssen, daß die beiden verglichenen Viren nicht identisch sein können. Wir haben versucht, diese Entscheidung mit empirisch-zahlenmäßigen, pseudostatistischen Methoden zu objektivieren (BONIN, UNTERHARNSCHEIDT, MAULER, SCHMIDT u. SCHMIDT³); das experimentum crucis, ob die mit diesem Bewertungsverfahren festgestellten Unterschiede reproduzierbar sind, steht aber noch aus.

Wie stark sich die Streuung der Ergebnisse von Einzelversuchen mit identischen Viren auswirkt, wird aus Abb. 2 (nach BONIN, UNTERHARNSCHEIDT, MAULER,

die Injektion vornimmt, zu durchaus unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Wenn wir in einem Versuch daher eine geringere Abweichung des Impfstoffvirus von dem Bezugsvirus feststellen, ist es oft schwer, zu entscheiden, ob diese tatsächlich etwas bedeutet oder ob sie nur zufällig ist. Mit den üblichen statistischen Tests können wir hier auch keine Entscheidung treffen, weil die Verteilung der Häufigkeiten bestimmter Läsionen, die wir als Grundlage für eine Signifikanzprüfung brauchen, nicht bekannt ist. Wir können daher bisher keine wissen-

SCHMIDT u. SCHMIDT³) deutlich. In diesem Diagramm wird das Ergebnis eines Einzelversuchs (mit intraspinaler Technik) mit Typ I-Bezugsvirus im Cynomolgusaffen mit den Ergebnissen von acht wiederholten Versuchen mit einem identischen Bezugsvirus im Rhesusaffen verglichen. Die mittleren Bewertungsziffern innerhalb zusammengefaßter Regionen des ZNS aus den einzelnen Gruppen des Versuchs am Cynomolgusaffen (dargestellt als Punkte) werden dabei zum Mittelwert (dargestellt als Oval) der einfachen und doppelten Standardabweichung der Bewertungsziffern aus den wiederholten Versuchen am Rhesusaffen (dargestellt als schraffierte bzw. punktierte Säulen) in Beziehung gesetzt. Das Bewertungsverfahren entspricht dabei als dem oben unter 3. genannten; es erlaubt also keine Schlüsse über etwaige unterschiedliche Qualität der Läsionen in den einzelnen Tiergruppen.

Das Diagramm läßt erkennen, daß das Ergebnis des Einzelversuchs am Cynomolgusaffen in den höheren Regionen des ZNS (Halsmark bis motorische Rinde) durchaus innerhalb der Standardabweichung — also der zu erwartenden Streuung — liegt. Im Lendenmark liegen jedoch drei von fünf Bewertungsziffern beim Cynomolgusaffen außerhalb der doppelten Standardabweichung der Bewertungsziffern, die bei Rhesusaffen nach Injektion gleicher Dosen eines identischen Virus zu geben waren. Wenn sich nach diesen Berechnungen (da die primäre Verteilung der Bewertungsziffern nicht bekannt ist) auch keine Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines echten Unterschiedes angeben läßt, so erscheint die höhere Empfindlichkeit des Lendenmarks beim Cynomolgusaffen doch kein Zufallsbefund zu sein. Ein einwandfreies statistisches Verfahren zur Bestimmung eines echten Unterschiedes für das Verhalten verschiedener Viren im intraspinalen Affenversuch existiert bisher noch nicht.

Für den intracerebralen Versuchsteil, bei dem in jeder Gruppe mindestens 10 Tiere gesetzt werden, hat die Gruppe um MURRAY (unveröffentlicht) auf Grund der Ergebnisse von wiederholten Versuchen mit dem gleichen Virus die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten bestimmter Häufigkeiten von „positiven“ Tieren berechnet, wobei die unterschiedliche Schwere und verschiedene Ausbreitung der pathomorphologischen Veränderungen bei diesen Tieren unberücksichtigt bleiben muß. Wenn man also das Ergebnis aus einem Einzelversuch mit einem Impfstoffvirus auf das Mittel aus mehreren Versuchsergebnissen mit dem Bezugsvirus beziehen will — wie es auch in dem Beispiel der Abb. 2 geschehen ist —, so kann man nach dieser Methode angeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine experimentell beobachtete Häufigkeit positiver Tiere zu erwarten ist. Bei einer solchen Bewertung kann man aber nicht mehr von einem echten Vergleichsversuch sprechen. Bei diesem Bewertungsverfahren bleibt nämlich der durch eine unterschiedliche Reaktionsfähigkeit verschiedener Tierkollektive verursachte systematische Versuchsfehler unberücksichtigt. Trotzdem ist ein solches Verfahren deshalb gerechtfertigt, weil dieser systematische Fehler weitaus kleiner zu sein scheint als die rein zufällig bedingte Streuung der Ergebnisse von Einzeltierversuchen (BONIN, UNTERHARNSCHEIDT, MAULER, SCHMIDT u. SCHMIDT³). Erfahrungsgemäß fallen jedoch die Ergebnisse von Affenversuchen mit intracerebraler Technik auch bei Impfstoffviren der verschiedenen Typen so gleichmäßig aus, daß nur sehr selten ein Verdacht auf einen echten Unterschied zwischen den Viren entsteht (siehe folgende Mitteilung).

Für den intraspinalen Affenversuch, der die Unterschiede zwischen verschiedenen Viren deutlicher aufzeigt, sind derartige Berechnungen bisher noch nicht möglich gewesen. Sie stoßen deshalb auf große Schwierigkeiten, weil die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe in diesem Versuch für eine einwandfrei statistische Bewertung der Ergebnisse zu klein ist.

Die Entscheidung, ob ein Impfstoff nach diesem Affenversuch also zugelassen werden kann oder ob er wegen offensichtlich höherer Neuropathogenität zurückgewiesen werden muß, ist daher wenigstens vorerst noch subjektiv zu treffen.

Die zur Ermittlung der Schwankung dieses Versuchs notwendige Auswertung von Befunden an einem großen Tiermaterial hat aber ein klares Bild über das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Virusarten im Affenversuch vermittelt, über das in der folgenden Mitteilung berichtet werden soll.

Selbst wenn es mit sehr umfangreichen Affenversuchen möglich sein sollte, geringe Neurovirulenzunterschiede verschiedener Viruszubereitungen für den Affen festzustellen, so würden diese Ergebnisse für die Unschädlichkeit der Impfstoffe beim Menschen nicht sehr viel aussagen. Denn bei diesem Affenversuch schließen wir indirekt aus dem Verhalten eines Virus in einem durchschnittlichen Affenkollektiv auf sein mutmaßliches Verhalten in einem durchschnittlichen Menschenkollektiv. So wie es bei großen Affenkollektiven Tiere gibt, die auf die Virusinjektion mit wesentlich stärkeren Erscheinungen reagieren als der Durchschnitt der Tiere, so gibt es auch sicher unter den Menschen besonders empfindliche Individuen. Über eventuelle Schädigungsmöglichkeiten durch das Impfvirus im Einzelfall oder über die Möglichkeit der Entstehung von für Poliomyelitis atypischen Krankheitsbildern sagen unsere Versuchsergebnisse überhaupt nichts aus.

Diese Prüfmethode der Poliomyelitis-Lebendimpfstoffe ist sicher geeignet, die Verimpfung von hochvirulentem Virus zu verhüten. Sie gibt uns aber nicht die Sicherheit, daß bei einem geringen Prozentsatz der Impflinge nicht doch Schädigungen durch die Impfung auftreten können. Dies sollten wir wissen, wenn wir den Lebendimpfstoff anwenden.

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Besprechung der theoretischen Grundlagen der Poliomyelitis-Lebendimpfung und der Bestimmung der Neurovirulenz von attenuierten Polioviren für den Affen wird die Technik des Affenversuchs in der Prüfung dieser Impfstoffe kurz geschildert. Die mögliche Bedeutung von technischen Unterschieden in der Versuchsdurchführung wird diskutiert.

Ein einwandfreies statistisches Verfahren zur Bestimmung eines echten Unterschiedes zwischen der Neurovirulenz verschiedener Viren, das alle durch den Versuch gegebenen Informationen nützt, existiert bisher noch nicht. Der Versuch zur Messung der Neurovirulenz für den Affen muß daher vorerst noch subjektiv beurteilt werden. Es wird ein numerisches Bewertungsverfahren diskutiert, das die Beurteilung des Versuchsergebnisses erleichtern kann, das aber keine statistisch fun-

derten Wahrscheinlichkeitsaussagen ermöglicht. Abschließend wird die Bedeutung dieses Versuchs für die Unschädlichkeit der Impfstoffe am Menschen kurz besprochen.

Literatur

- ¹ BESWICK, T. S. L., and C. R. COLE: The influence of technique on the sensitivity of monkeys to intraspinally inoculated poliovirus. *J. Hyg. (Lond.)* **59**, 395—399 (1961).
- ² —, and M. WINTER: Neurovirulence of attenuated Polioviruses. Proc. VIIth Symposium Eurp. Assoc. Poliomyelitis and allied diseases, p. 297. Oxford 1961. Paris: Masson.
- ³ BONIN, O., F. UNTERHARNSCHEIDT, R. MAULER, K. SCHMIDT, and I. SCHMIDT: Some quantitative aspects of monkey neurovirulence tests in control of live poliovirus vaccines. Proc. Symposium on the characterization and uses of human diploid cell strains. Opatija, Sept. 1963 S. 501—515.
- ⁴ HSIRUNG, G. D., and J. MELNICK: Effect of sodium bicarbonate concentration on plaque formation of virulent and attenuated polioviruses. *J. Immunol.* **80**, 282—293 (1958).
- ⁵ JUNGHER, E. L., V. J. CABASSO, A. D. MOYER, and H. R. COX: Proposed method and evaluation of the monkey neurovirulence test for attenuated poliovirus vaccine. *J. infect. Dis.* **108**, 247—261 (1961).
- ⁶ KANDA, Y., and J. L. MELNICK: In vitro differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS-cells. *J. exp. Med.* **109**, 9—24 (1959).
- ⁷ KIRSCHSTEIN, R., G. BORMAN, S. BARON, R. FRIEDMAN, R. MURRAY, and G. HOTTE: Laboratory investigations of the attenuated poliovirus vaccine strains. I. Neurovirulence after intramuscular inoculation of monkeys. In: Live Poliovirus Vaccines. Second International Conference. Scient. Publ. No. 50 of the Pan American Health Org., p. 90—97. Washington 1960.
- ⁸ LWOFF, A., et M. LWOFF: Remarques sur quelques caractères du développement du virus de la poliomyélite. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **248**, 1725—1727 (1959).
- ⁹ MELNICK, J. L., and J. BRENNAN: Monkey neurovirulence of attenuated poliovirus vaccines being used in field trials. In: Live Poliovirus Vaccines. First International Conference. Scient. Publ. Nr. 44 of the Pan American Health Org., p. 65—101. Washington 1959.
- ¹⁰ MURRAY, R., R. KIRSCHSTEIN, G. VAN HOOSIER jr., and S. BARON: Comparative virulence for Rhesus monkey of poliovirus strains used for oral administration. In: Live Poliovirus Vaccines, First International Conference. Scient. Publ. No. 44 of the Pan American Health Org., pp. 39—64 (1959).
- ¹¹ SABIN, A. B.: Pathogenesis of Poliomyelitis. *Science* **123**, 1151 (1956).
- ¹² — Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccines. *Brit. med. J.* **1959**, 663—680.
- ¹³ VOGT, M., R. DULBECCO, and M. A. WENNER: Mutants of poliomyelitis viruses with reduced efficiency of plating in acid medium and reduced neuropathogenicity. *Virology* **4**, 141—155 (1957).