

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

Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen*

II. Mitteilung

**Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren
nach intralumbaler Injektion unter besonderer Berücksichtigung
der Unterschiede zwischen den Virustypen**

Von

FRIEDRICH UNTERHARNSCHIEDT und OTTO BONIN

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. August 1964)

In der vorliegenden Studie sollen Qualität und Ausbreitung der geweblichen Veränderungen am ZNS des Affen nach Injektion von attenuiertem Poliovirus verschiedener Typen beschrieben werden. Wenn, wie es die I. Mitteilung zeigte, im Einzelversuch mit kleiner Tierzahl die Unterschiede zwischen den Virustypen auch oft nur schwer erkennbar sind, so erlaubt doch die zusammenfassende Betrachtung eines großen Tiermaterials aus mehreren Versuchen, schlüssige Aussagen zu machen.

Unsere Darstellung geht von den Befunden der menschlichen Poliomyelitis aus, weil die an ihnen gewonnene Erfahrung bei der Beurteilung morphologischer Veränderungen im Tierversuch berücksichtigt werden muß. Zudem erfolgt die histologische Untersuchung der Affen in denselben Regionen, die dem Ausbreitungsgebiet des poliomyelitischen Prozesses beim Menschen entsprechen. Von den meisten der mitgeteilten Fälle menschlicher Poliomyelitis ist nicht bekannt, durch welchen Virustyp die Erkrankung verursacht war.

LANDSTEINER u. POPPER (1909) führten erstmals eine Übertragung der Poliomyelitis auf Affen durch. Von einem 9jährigen an einer akuten Poliomyelitis erkrankten Jungen, der nach 4 tägiger Krankheit an Atemlähmung starb, injizierten sie mit steriler Kochsalzlösung verriebene Rückenmarkssubstanz „in nicht geringer Menge“ zwei Affen intraperitoneal. Beide Affen erkrankten an einer Poliomyelitis, die histo-

* Herrn Prof. Dr. W. SCHOLZ zum 75. Geburtstag gewidmet.

logisch gesichert werden konnte. In weiteren Versuchen konnten LANDSTEINER u. PRASEK (1910) über gelungene Tierpassagen bei Affen berichten.

Über weitere Untersuchungen der Übertragung der Poliomyelitis auf Affen wurde von KNOEPFELMACHER (1909), FLEXNER u. LEWIS (1909), LEINER u. WIESNER (1909) sowie ROEMER (1909) berichtet. Damit war eine neue Ära eingeleitet worden, in der die geweblichen Veränderungen experimentell erzeugter Poliomyelitis am Affen nach unterschiedlicher Applikation beschrieben wurden: McCANN (1918), HURST (1929, 1930, 1931, 1932), FAIRBROTHER u. HURST (1930), PETTE (1930), BETTINA WARBURG; PETTE, DEMME u. KÖRNYEY (1932), O'LEARY, HEINBECKER u. BISHOP (1932) u. a.

Aus allen diesen Studien können noch keine Rückschlüsse über das Verhalten der verschiedenen Virustypen gezogen werden, denn die Existenz verschiedener Typen des Poliovirus wurde erst 1931 erwiesen.

Auch aus den Ergebnissen späterer Untersuchungen sind solche Rückschlüsse nicht möglich, da sich die zahlreichen Virusstämme eines einzelnen Typs im Affenversuch durchaus verschieden verhalten können. SABIN u. OLITZKY (1936), LUHAN (1937), HOWE u. ECKE (1937/38), BODIAN u. HOWE (1940, 1945, 1947), SABIN u. WARD (1941), BODIAN (1948, 1954, 1956, 1964), HOWE (1955), VERLINDE (1960) u. a.

Vergleichende Untersuchungen mit definierten Stämmen wurden erst im Zusammenhang mit der Entwicklung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen vorgenommen. Hierunter sind vor allem folgende Arbeiten zu nennen: SABIN, HENNESSEN u. WINSSER (1954), MELNICK u. BRENNAN (1959), MURRAY u. Mitarb. (1959), SABIN (1959), CABASSO u. Mitarb. (1960), COID, O'TOBIN u. BESWICK (1960), KIRSCHSTEIN u. Mitarb. (1960), BESWICK u. WINTER (1961), COID, BESWICK u. O'TOBIN (1961), JUNGHERR u. Mitarb. (1961), KARASSON (1961), PETTE u. Mitarb. (1961), JUNGHEER, CABASSO u. STEBBINS (1963), WINTER u. BOULGER (1963), BESWICK u. Mitarb. (1964).

Eigene Befunde

Sämtliche Affen, über deren Befunde hier berichtet wird, sind nach der in der I. Mitteilung beschriebenen Technik injiziert, beobachtet und histologisch untersucht worden.

In unseren Untersuchungen am Affen zur Bestimmung des Neurovirulenzgrades zeigte sich der Versuch mit intrathalamischer Injektionstechnik den Versuchen mit intralumbaler Injektion unterlegen. Wir verfügen beim Virustyp I über ein Beobachtungsmaterial von etwa 360 intrathalamisch injizierten Affen; bei den Typen II und III wurden je etwa 100 intrathalamisch injizierte Tiere histologisch untersucht. Über Qualität, Quantität und Intensität der im intracerebralen Versuch beobachteten geweblichen Reaktionen berichten wir in einer weiteren Mitteilung.

Im intralumbalen Versuch mit der früher mitgeteilten Injektionstechnik von Sabin, werden die Neurovirulenzunterschiede zwischen den einzelnen Virustypen jedoch deutlicher.

Die folgende Beschreibung stützt sich daher im wesentlichen auf Befunde bei intralumbal injizierten Tieren.

Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Typen der attenuierten Polioviren zu verdeutlichen, wurde in Diagrammen aufgetragen, in wieviel Prozent der Schnitte von allen untersuchten Tieren einerseits mesodermal-gliöse Reaktionen, andererseits Nervenzelluntergang vorlagen. Für jede Region des ZNS und für jede Virusverdünnung sind die Prozentsätze der Schnitte mit Läsionen getrennt angegeben. Die Diagramme geben ein anschauliches Bild von dem Verteilungsmuster der

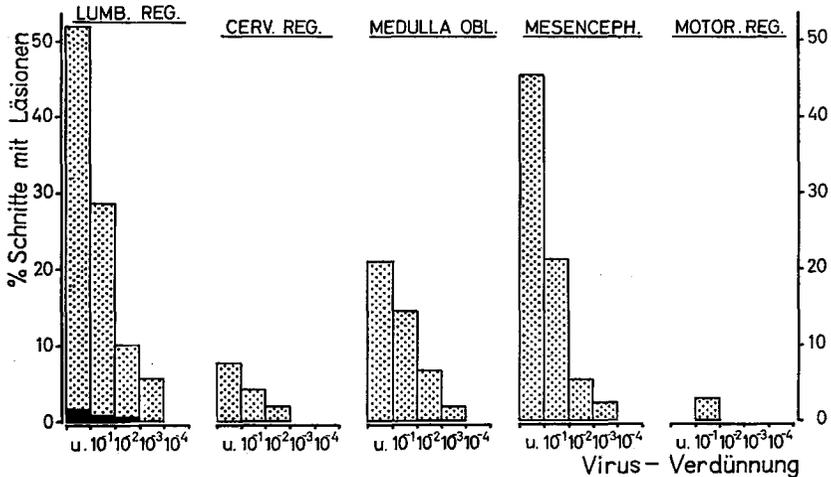


Abb. 1. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Veränderungen im ZNS von Rhesusaffen, nach intraspinaler Injektion von attenuiertem Poliovirus Typ II, Stamm P 712 Ch 2 a b. Punktierte Säulen: mesodermal-gliöse Reaktion; schwarze Säulen: Nervenzelluntergang

poliomyelitischen Läsionen und von dem Verhältnis zwischen Läsionshäufigkeit und Virusdosis, die in jeder Region als Dosis-Wirkungsabhängigkeit zum Ausdruck kommt.

Diese Diagramme vermitteln natürlich nur ein relativ grobes Bild des Ausbreitungsmusters, da in den aufgeführten Regionen sehr unterschiedliche Kerngebiete befallen sein können.

Beim *Virustyp II* (Abb. 1) (es wurden insgesamt 180 Rhesusaffen mit den verschiedenen Virusverdünnungen injiziert) kommt geringgradiger Nervenzelluntergang lediglich in unmittelbarer Umgebung des Stichkanals in der Lumbalregion und auch dort nur in Konzentrationen bis 10⁻² vor (lokale Ausbreitung). Im allgemeinen ist lediglich der Stichkanal mit umgebender mesodermal-gliöser Narbe sichtbar (Abb. 2a). Jedoch fällt in unserem Material auf, daß dieses Virus vor allem im Mittelhirn ausgeprägte mesodermal-gliöse Reaktionen hervorruft; in geringerem Maße auch in der Medulla oblongata. Erst dann kommt die Cervicalregion. Auch in der Lumbalregion ist das Ausmaß der meso-

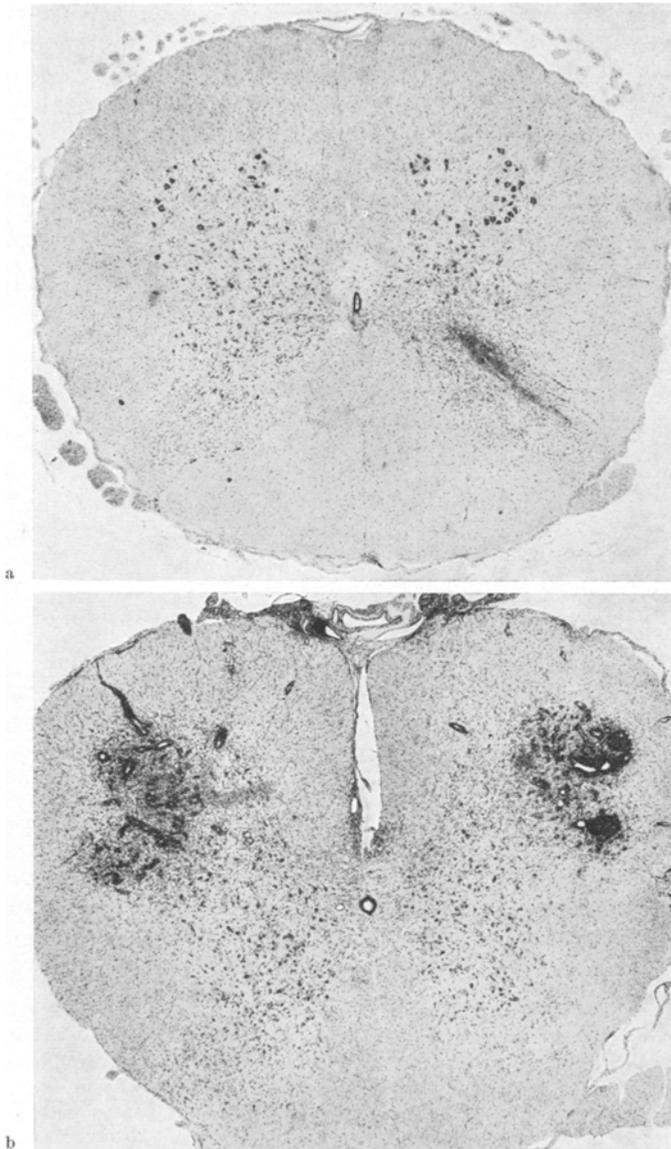


Abb.2. a Rhesusaffe, Lumbalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ II intralumbal. In der rechten Hinterwurzel und im rechten Hinterhorn Stichkanal mit wallartiger umgebender mesodermal-gliöser Narbe. Keine Ausbreitung des Virus in die Umgebung. Nissl; 16:1. b Rhesusaffe, Lumbalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ II intralumbal. Ausgeprägte lymphocytär-plasmacelluläre adventitielle Infiltrate beiderseits in den Vorderhörnern; kleinere auch in den weißen Strangarealen. Zwischen den Gefäßinfiltraten intakte Nervenzellen. Lediglich allgemeine Proliferation vorzugsweise von Mikroglia. In den weißen Strangarealen Gliasternchen und Glianruhe. Gewebliche Veränderungen vom sogenannten „attenuierten Typ“. Nissl; 16:1

dermal-gliösen Reaktionen beim Virustyp II ausgeprägter als beim Typ I (Abb. 2b).

Besonders stark befallen war der Nucleus ruber. Bei intralumbaler Inokulation des unverdünnten Virustyps II (38 Tiere) fanden sich adventitielle Infiltrate und umschriebene Gliareaktionen in 15 Fällen einseitig, in 16 Fällen beidseitig, insgesamt also bei 31 von 38 Tieren. Daneben bestanden vereinzelt mesodermal-gliöse Herde im Bereich des zentralen Höhlengraues, des Nucleus oculomotorius und der Substantia

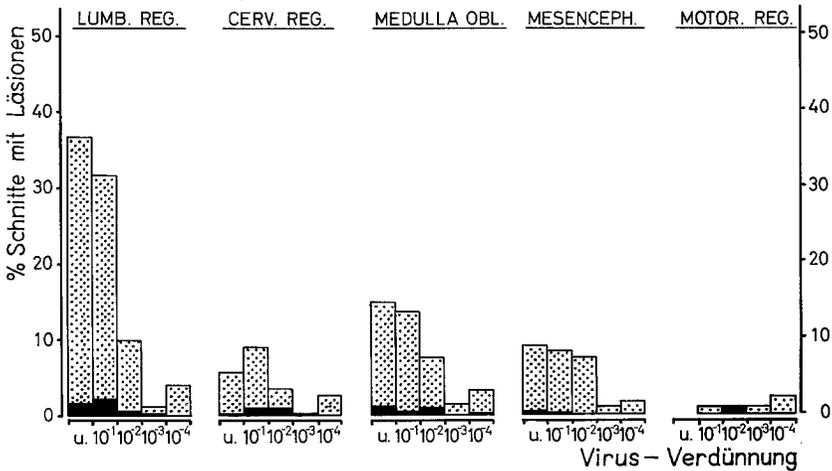


Abb. 3. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Veränderungen im ZNS von Rhesusaffen, nach intraspiraler Injektion von attenuiertem Poliovirus Typ I, Stamm LSe 2ab. Punktierte Säulen: mesodermal-gliöse Reaktion; schwarze Säulen: Nervenzelluntergang

nigra. In der Medulla oblongata waren bei 12 von 38 Tieren mesodermal-gliöse Herde nachweisbar, ohne eindeutige Prädispositionsstellen in den verschiedenen Kerngebieten. Danach folgt mit 10 Tieren die Cervicalregion.

Bei einer Verdünnungsstufe von 10⁻¹ (33 Tiere) zeigte der Nucleus ruber bei 12 Tieren adventitielle Infiltrate bzw. umschriebene Gliareaktionen. Auffallend war, daß die Veränderungen immer nur einseitig gefunden wurden. Die Medulla oblongata folgte mit Veränderungen bei 10 Tieren, dann erst die Cervicalregion mit 5 Tieren. In dieser Verdünnungsstufe war es einmal zu mesodermal-gliösen Reaktionen in der motorischen Region gekommen.

Bei der nächsten Verdünnungsstufe von 10⁻² (37 Tiere) war der Nucleus ruber sechsmal befallen, davon einmal beidseitig, die Medulla oblongata zeigte bei 9 und die Cervicalregion bei 5 Tieren mesodermal-gliöse Reaktionen.

Die folgende Verdünnungsstufe von 10⁻³ (37 Tiere) führte nur bei einem Tier zu Veränderungen im Nucleus ruber, die übrigen Regionen waren unauffällig.

Bei einer Verdünnung auf 10⁻⁴ (35 Tiere) fanden sich weder Veränderungen an der Inokulationsstelle noch in anderen Regionen des ZNS.

Faßt man den Befund zusammen, so ergibt sich, daß der Virustyp II kaum jemals Nervenzelluntergang hervorruft; ein solcher kommt nur bei höherer Viruskonzentration in unmittelbarer Nähe der Inokulationsstelle vor. Das Virus ruft im Mittelhirn ausgeprägter, in der Medulla oblongata schwächer und in noch geringerem Maße in der Cervicalregion mesodermal-gliöse Reaktionen hervor, deren Häufigkeit nach Prä-dilektionsstellen beschrieben wurde. Es ist also eine diskontinuierliche

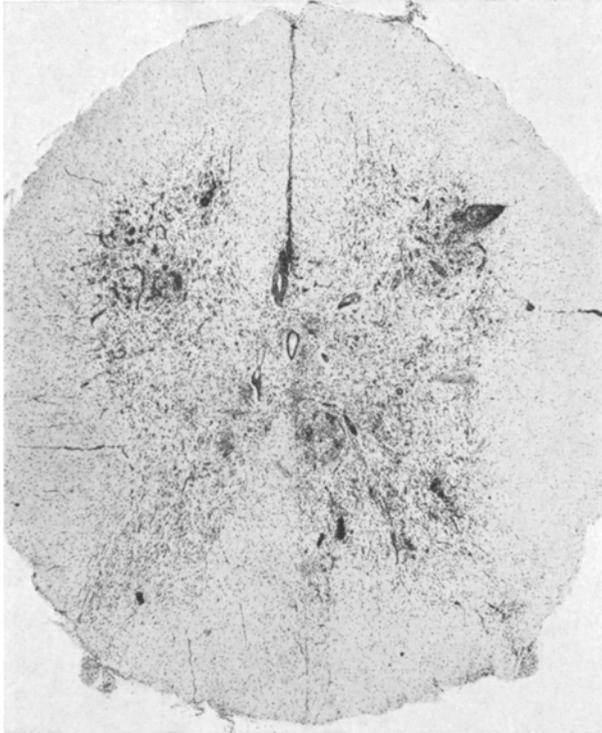


Abb. 4. Rhesusaffe, Lumbalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ I intralumbal. In den Hintersträngen rechts und im rechten Hinterhorn Umgebungsreaktion des Stiechkanals. Weitgehender Ausfall der Nervenzellen in beiden Vorder- und Hinterhörnern. Mittelgradige adventitielle lymphocytär-plasmacelluläre Infiltrate, vor allem in den Vorderhörnern. Proliferation von Mikroglia. Im Entzündungsfeld weiterhin noch vereinzelt Leukocyten, massenhaft Lymphocyten, Plasmazellen und Makrophagen. In den weißen Strangarealen saumartiger Besatz einzelner Gefäße mit Lymphocyten und Plasmazellen. Nissl; 16:1

Ausbreitung des Prozesses nicht nur innerhalb weniger aufeinanderfolgender Schnitte zu beobachten, — ein Befund, den wir als typisch für die Poliomyelitis herausstellen möchten, — sondern auch innerhalb verschiedener Regionen. Aufgrund des geringgradigen Nervenzelluntergangs sind wir mit der Mehrzahl der Autoren, die sich mit der ver-

gleichenden Bewertung attenuierter Polioviren befaßt haben der Meinung, daß der Impfstamm vom Typ II der am besten attenuierte ist.

Beim *Virustyp I* (Abb. 3) umfaßt unser Beobachtungsmaterial insgesamt 429 intraspinal injizierte Rhesusaffen. Die Tiere wiesen bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-3} Nervenzelluntergang im Lendenmark auf. Der Nervenzellausfall beschränkte sich nicht auf ein Vorderhorn, sondern es war teils auch zu einer Ausbreitung des Virus auf die andere, von der Inokulation nicht betroffenen Seite des Rückenmarks gekommen

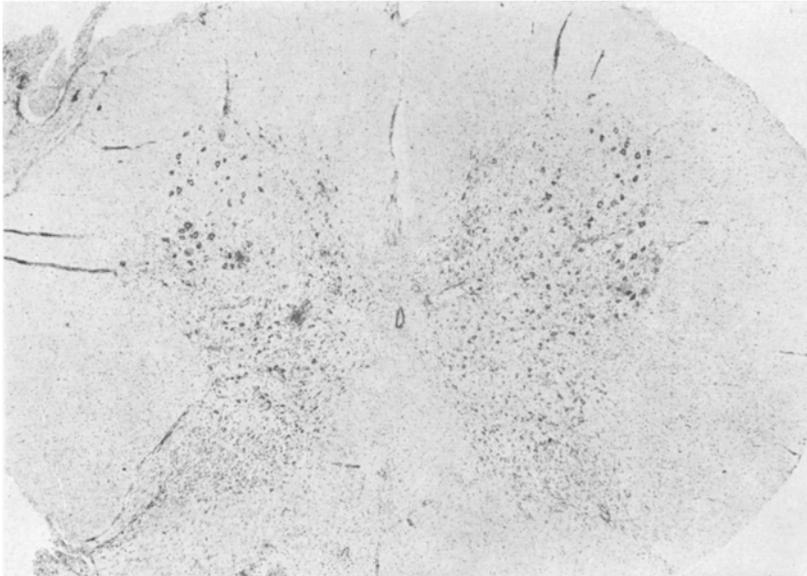


Abb. 5. Rhesusaffe, Cervicalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ I. In beiden Vorderhörnern, vor allem in medialen Anteilen Nervenzelluntergang. Ältere Neurophagien; stellenweise zeigen die Nervenzellen Veränderungen im Sinne der zentralen Chromatolyse. Allgemeine diffuse Mikro- und Astroglia-proliferation. Geringgradige Säume von Lymphocyten und Plasmazellen um Gefäße der weißen Substanz. Nissl; 16:1

(Abb. 4). Verglichen mit Virustyp II war der Nervenzelluntergang ausgeprägter, vor allem war er in allen untersuchten Regionen nachweisbar (Abb. 5). Die Ausbreitung reichte bis in die motorische Region, im Gegensatz zum Typ II, bei dem nur eine lokale Ausbreitung des Virus im Lumbalbereich mit geringgradiger irreversibler Nervenzellschädigung vorlag. Besonders in den Vorderhörnern kamen verschiedene Formen und Stadien von Nervenzelluntergang vor. Neben älteren Neurophagien fanden sich frischere mit reichlichen Leukocytenansammlungen, und daneben in größerer Zahl Zellveränderungen im Sinne der zentralen Chromatolyse. Dabei handelte es sich teilweise um reversible Schädigungen; stellenweise kann als sicher gelten, daß Nervenzelluntergang vorlag.

Mesodermal-gliöse Reaktionen, die im ganzen weniger stark ausgeprägt waren als beim Virustyp II kamen in allen untersuchten Regionen vor, jedoch ohne bevorzugten Befall von Mittelhirn und Medulla oblongata: beim Virustyp I waren die mesodermal-gliösen Reaktionen eher gleichmäßig über die verschiedenen Regionen verteilt. Jedoch war auch bei Typ I im Mittelhirn der Nucleus ruber am häufigsten befallen (stellenweise war es dort auch zu Untergang von Nervenzellen gekommen). Daneben lagen mesodermal-gliöse Reaktionen in anderen

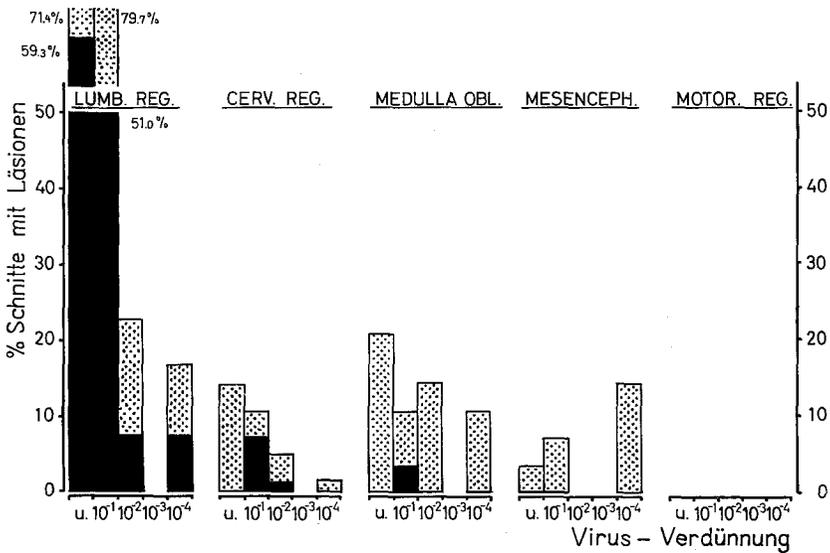


Abb. 6. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Veränderungen im ZNS von Cynomolgusaffen, nach intraspinaler Injektion von attenuiertem Poliovirus Typ I, Stamm 2 L Sc 2ab. Punktierete Säulen: mesodermal-gliöse Reaktion, schwarze Säulen: Nervenzelluntergang

Abschnitten von Mittelhirn und Medulla oblongata vor, wie adventitielle Infiltrate und umschriebene Gliareaktionen, stellenweise auch Neurophagien. Diese wurden in der Substantia nigra, im zentralen Höhlengrau, in der Formatio reticularis, in den Nuclei pontis, in den vorderen Zwielhügeln und vereinzelt an anderen Stellen gefunden.

Fassen wir die Befunde von Virustyp I zusammen, so ist der Nervenzelluntergang ausgeprägter als bei Typ II. Sämtliche untersuchten Regionen sind beteiligt. Dagegen ist das Ausmaß der mesodermal-gliösen Reaktionen geringer und ohne ausgesprochene Prädilektionsstellen. Insbesondere liegen nicht derart ausgeprägte adventitielle Infiltrate wie beim Virustyp II vor.

Unsere Ergebnisse mit *Virustyp III* (172 Tiere) (Abb. 7) können wir nicht direkt mit den vorstehenden vergleichen, weil die Versuche mit Typ III an Cynomolgusaffen durchgeführt wurden.

Wir müssen daher zunächst die unterschiedliche Empfindlichkeit von Rhesus- und Cynomolgusaffen besprechen. Dies kann nur dadurch geschehen, daß man die Reaktionshäufigkeiten bei beiden Affenarten nach Injektion des gleichen Virus vergleicht. Abb. 6 bringt das Bild beim Cynomolgusaffen nach Injektion des gleichen Virus, das den der Abb. 3 zugrundeliegenden Rhesusaffen injiziert wurde. Wie die Ergebnisse der diesen Diagrammen zugrundeliegenden Einzelversuche gestreut haben, ergibt sich aus Abb. 2 der I. Mitteilung. Die dort schon erwähnte höhere Empfindlichkeit des Lendenmarks des Cynomolgusaffen fällt bei einem Vergleich der Abb. 3 und 6 sofort ins Auge. In den höheren Regionen des ZNS (Cervicalregion und höher) ist die Dosisabstufung beim Virus-typ III (Abb. 7) nicht so gleichmäßig wie bei den Versuchen mit Rhesus-

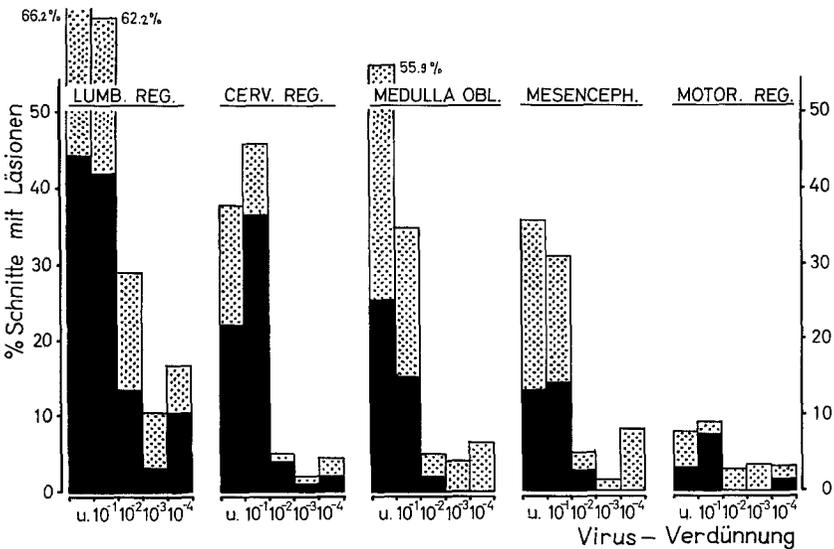


Abb. 7. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Veränderungen im ZNS von Cynomolgusaffen, nach intraspinaler Injektion von attenuiertem Poliovirus Typ III, Stamm Leon 12 a, b. Punktierte Säulen: mesodermal-glöse Reaktion; schwarze Säulen: Nervenzelluntergang

Abb. 8. a Cynomolgusaffe, Lumbalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ III intralumbal. In der rechten Hinterwurzel und im rechten Hinterhorn Stichelkanal mit wallartiger umgebender mesodermalglöser Gewebsproliferation. Im gleichseitigen Vorder- und Hinterhorn fast vollständiger Untergang der Nervenzellen. Ältere Neurophagen, vereinzelt noch Leukozyten, daneben Lymphocyten und Makrophagen. Ausgeprägte Proliferation von Mikro- und weniger ausgeprägt von protoplasmatischer Astroglia. Nicht sehr ausgeprägte adventitielle Gefäßinfiltrate mit Lymphocyten und Plasmazellen. Die Gegenseite zeigt keinen sicheren Nervenzellausfall, lediglich eine diskrete Mikroglia-proliferation. Glianruhe in den weißen Strangarealen. Nissl; 16:1. b Cynomaffe, Lumbalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ III intralumbal. Segment außerhalb der Inokulationsstelle. Im Bereich der grauen Substanz beider Seiten besteht ein fast vollständiger Nervenzelluntergang und nur relativem Verschontbleiben der Hinterhörner. Ältere Neurophagen. Im Entzündungsfeld massive Proliferation von Mikro- und protoplasmatischer Astroglia, daneben finden sich Lymphocyten, Plasmazellen sowie Makrophagen innig durchmischt. Stellenweise frischere Neurophagen, besonders in lateralen Anteilen des linken Vorderhornes. Nur angedeutete Gefäßinfiltrate, vorwiegend aus Lymphocyten bestehend. Breitflächiges Übergreifen des Prozesses auf die weißen Strangareale mit mittelgradiger Gliazellproliferation. Nissl; 16:1

affen (Abb.3). Das hängt sicher mit der viel kleineren Tierzahl, die Abb.6 zugrunde liegt, zusammen.

Beim Cynomolgusaffen sind sowohl nach Injektion von Typ I als auch von Typ III im Lumbalbereich (auch außerhalb der Inokulationsstelle) die Nervenzellen

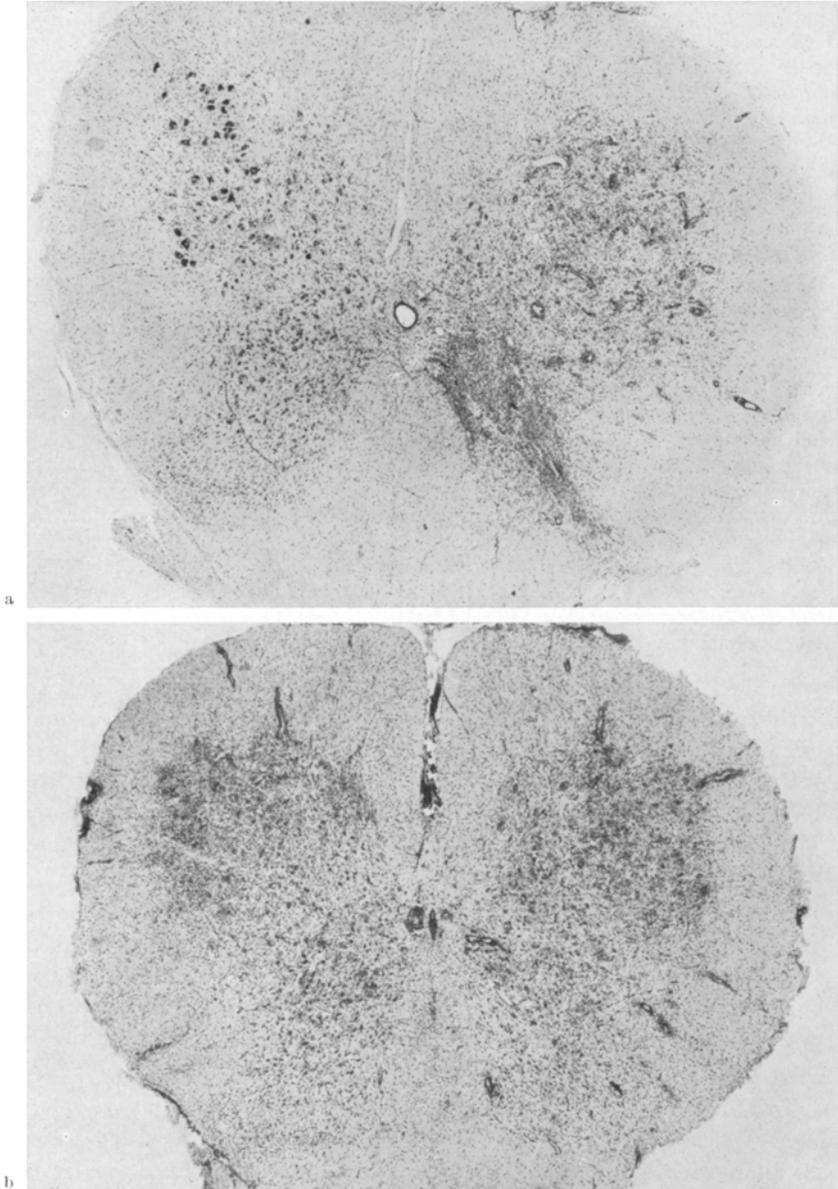


Abb. 8a und b. (Legende siehe S. 462)

beider Vorder- und auch der Hinterhörner stellenweise vollständig ausgefallen (vgl. Abb. 8a und b). Im Rückenmarksquerschnitt besteht eine außerordentlich innige Durchmischung von Blut- und Lymphzellen mit gewucherten Glieelementen. Im Entzündungsfeld sind den zunächst aufgetretenen Leukocyten später Lymphocyten gefolgt, dem leukocyitären Stadium folgte das lymphocytaire. Neben ausgeprägter Proliferation von Mikroglia und protoplasmatischer Astroglia finden sich Leukocyten, Lymphocyten, Plasmazellen und Makrophagen. Stellenweise sind neben älteren subakuten Läsionen, die der Überlebenszeit des Affen (17—21 Tage) entsprechen, ganz frische Prozesse vorhanden, beispielsweise Neurophagien mit massenhaften Auftreten von Leukocyten.

Die Gefäße zeigen einen lymphocyitären bzw. lymphocyitär-plasmacellulären Saum. Besonders am Rande der Herde und auch außerhalb des Entzündungsfeldes finden sich die adventitiellen Infiltrate. Sie sind lymphocyitär-plasmacellulär nicht nur in der Umgebung von Gewebsinfiltraten die selbst Lymphocyten enthalten; sondern auch um jene Herde, die rein leukocyitär sind, oder bei denen nur Gliazellen das Feld beherrschen, oder auch, wo sich nebeneinander beide Zellarten finden. Häufig verlieren gegen die Oberfläche verlaufende Venen bereits eine bestimmte Strecke vor dem Verlassen des zentral-nervösen Gewebes ihren umgebenden Infiltratsaum.

In den weichen Häuten liegen im subakuten Stadium stellenweise fleckförmige lymphocyitär-plasmacelluläre Infiltrate vor, die in früheren Stadien leukocyitär sind. Häufig sind die weichen Häute über dem poliomyelitischen Entzündungsfeld völlig intakt, zum Teil finden sich die umschriebenen Infiltrate an der Austrittsstelle von Gefäßen. Die Meningitis hat demnach, und darauf haben besonders BETTINA WARBURG und SPIELMEYER hingewiesen, keine bedeutungsvollen Beziehungen zu den poliomyelitischen Herden. Selbst mit der Inokulationstechnik nach SABIN, die von uns angewandt wurde, bei der sicherlich eine größere Menge Virus unter hohem Druck in den Liquorraum gebracht wird, ist die meningeale Reaktion äußerst gering. Das Charakteristische dieses Prozesses hat SPIELMEYER als „Encephalomyelitis“ bzw. „Myelomeningitis“ bezeichnet.

In den übrigen Regionen des Nervensystems unterscheiden sich die Virustypen I und III jedoch am Cynomolgusaffen deutlich. Es ist sofort ersichtlich, daß Virustyp III eine wesentlich größere Tendenz zur Ausbreitung im Nervensystem hat als der Typ I. Auch in den höheren Regionen des ZNS treten die schweren Läsionen mit Nervenzelluntergang in bemerkenswerter Häufigkeit auf. Abb. 9a und b zeigen Übersichtsaufnahmen der Cervicalregion.

Auch die motorische Region ist befallen. Neben Neurophagien, die besonders in der 3. und 5. Rindenschicht nachweisbar sind, liegt Mikroglia proliferation vor. In der Hirnrinde ist die Mikroglia im allgemeinen senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet. In den Rindenherden ist ausgeprägte Mikrogliazellproliferation nachweisbar, die nicht nur die 5. und 3. Schicht, sondern häufig alle Schichten der Rinde betrifft.

Das Bild beim Virustyp III erinnert an das Bild der Affenpoliomyelitis durch Wildviren (Abb. 10), von der keine vergleichbaren Diagramme gezeigt werden können, da wir mit diesen Viren keine Tiere nur intraspinal injiziert haben.

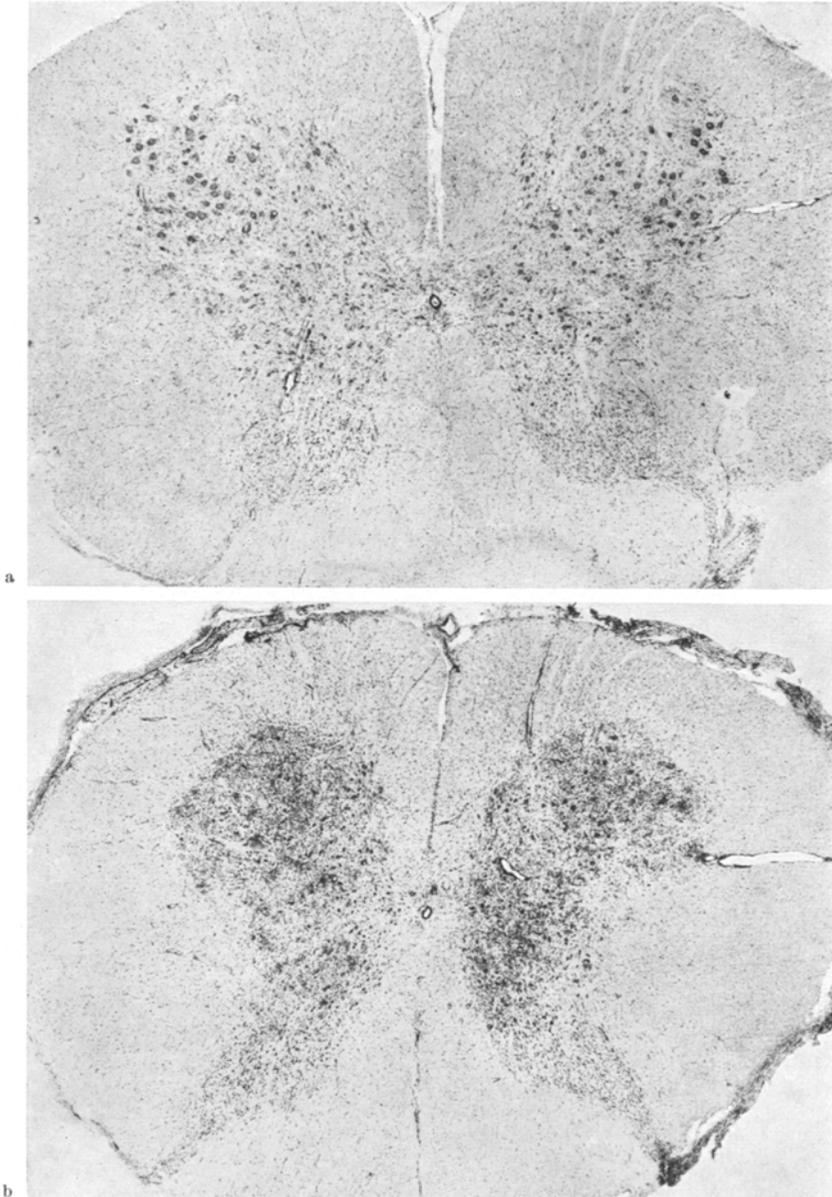


Abb. 9. a Cynomolgusaffe, Cervicalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ III intralumbal. In beiden Vorderhörnern, links ausgeprägter als rechts, zeigen die Nervenzellen eine zentrale Chromatolyse. Keine Neurophagien. Diffuse Mikroglia proliferation. Geringgradige lymphocytäre Gefäßsäume. Nissl; 16:1. b Cynomaffe, Cervicalregion. Attenuiertes Poliovirus Typ III intralumbal. Weitgehender Nervenzelluntergang, auch die Hinterhörner betreffend, links ausgeprägter als rechts. Frischere und ältere Neurophagien. Diffuse Proliferation von Mikroglia, stellenweise Leukocyten, Lymphocyten und Makrophagen. Geringgradige lymphocytäre Zellsäume in grauer und weißer Substanz. Nissl; 16:1

Bei den häufigen Schädigungen der Nervenzellen beim Virustyp III sind alle Formen und Stadien des Untergangs einzelner Neurone zu erkennen. Neben älteren finden sich auch ganz frische Neurophagien, und massenhaft Leukocyten. Außer dieser Form von Nervenzelluntergang findet sich eine Zellschädigung, die man als zentrale Chromatolyse bezeichnen kann (Abb.11). Die Nisslsubstanz verschwindet

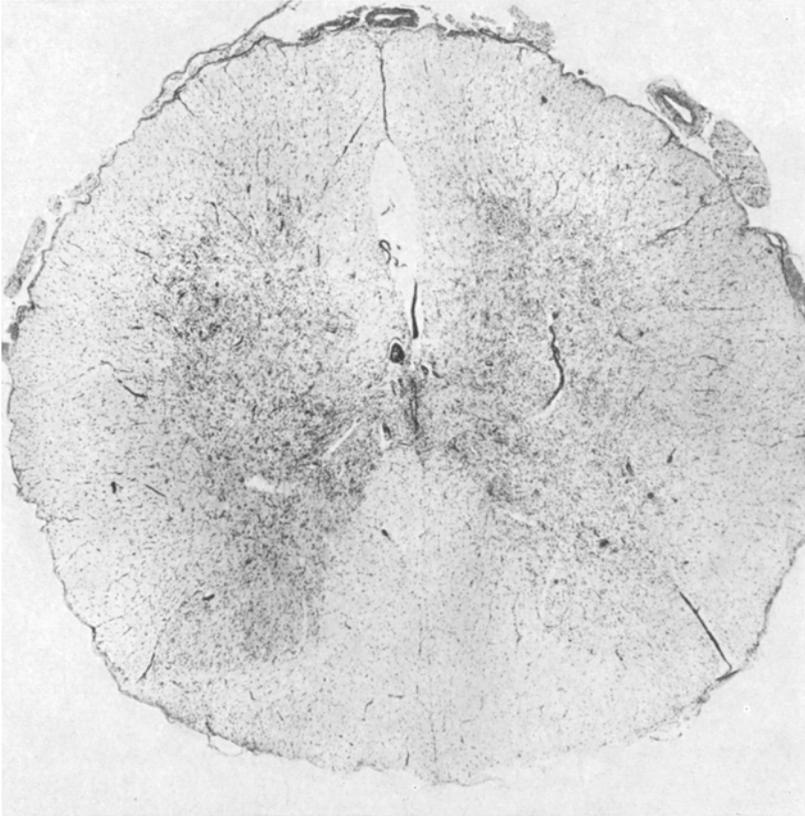


Abb.10. Rhesusaffe, Lumbalregion. Virulentes Poliovirus Typ I (MAHONEY). Fast vollständiger Ausfall aller Nervenzellen, mit Ausnahme einiger, in lateralen Anteilen des linken Vorderhornes. Proliferation von Mikroglia, daneben Lymphocyten und Makrophagen. Schmale einreihige Säume von Lymphocyten um Gefäße. In den weißen Strangarealen Gliasternchen und -knötchen. Gewebliche Veränderungen vom sogenannten „Wildvirustyp“. Nissl; 16:1, Nachvergrößerung zweifach

Abb.11a—f. Cynomolgusaffen. Nervenzellen aus den Vorderhörnern. Verschiedene Stadien von Veränderungen der Nervenzellen im Sinne der zentralen Chromatolyse. a Beginnende zentrale Chromatolyse, andeutungsweise Abrundung der Zelle. b Die Nisslsubstanz ist in zentralen Anteilen des Cytoplasma nicht mehr nachweisbar, stattdessen liegt eine körnige bzw. opake Masse vor, der Zellkern ist an den Rand der Zelle gerückt. c Weitere Schwellung der Zelle, Nisslsubstanz ist nur noch in einem schmalen Saum randständig nachweisbar. Verdoppeltes Kernkörperchen. d Schrumpfung der Zelle. Der Zellkern zeigt eine zum Zentrum gerichtete Kernkappe. Randständig gelegene Nisslsubstanz. Bis zu diesem Stadium handelt es sich unseres Erachtens um eine noch reversible Zellschädigung. Von der Kernkappe aus kann eine Restitution der Zelle einsetzen. e Übergang in irreversible Zellschädigung, das Cytoplasma ist opak. Der abgeplattete Zellkern ist ausgeschleust, das Kernkörperchen ist geschrumpft. Das Cytoplasma ist nur noch schemenhaft nachweisbar. f Endstadium einer zugrundegegangenen Vorderhornzelle. Sämtlich Nissl; 128:1, Nachvergrößerung 3,5fach

zunächst. Die Nervenzelle rundet sich ab und schwillt an. Das zentral gelegene Cytoplasma stellt sich opak dar. Der Zellkern schwillt an, das Kernkörperchen färbt sich dunkler, zeigt Vacuolen, gelegentlich sind zwei Kernkörperchen sichtbar.

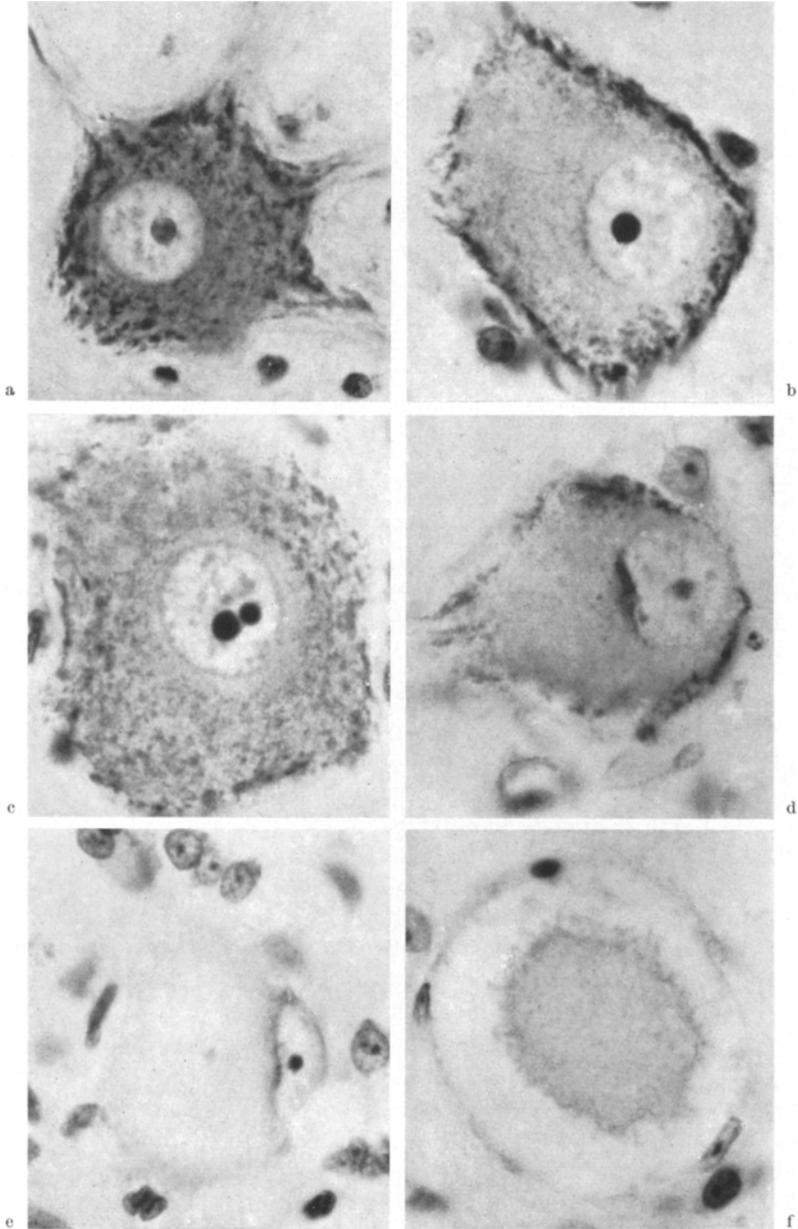


Abb. 11 a—f. (Legende siehe S. 466)

Nisslsubstanz ist nur noch in einem schmalen Randsaum der Zelle nachweisbar. Der Zellkern rückt an den Rand der Zelle. In diesem Stadium werden Kernkappen, die gegen das Zentrum der Zelle gerichtet sind, sichtbar. Die Zelle beginnt zu schrumpfen. Bis zu diesem Stadium scheint eine reversible Schädigung der Zelle vorzuliegen. Von der Kernkuppe ausgehend scheint eine Restitution der Nisslsubstanz möglich zu sein (Abb. 11 a—d). Die Zellschädigung kann jedoch in Zelluntergang übergehen (Abb. 11 e—f). Der randständige Zellkern wird ausgeschleust. Die randständig noch vorhandene Nisslsubstanz verschwindet vollends. Vom Zellkörper bleibt nur ein kaum anfärbbarer Schatten bröckeliger bzw. glasiger Struktur übrig. In diesen Stadien der Zellauflösung ist eine Erholung und Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit wahrscheinlich unmöglich.

Die adventitiellen Infiltrate bei Typ III unterscheiden sich von denen der oben besprochenen Virustypen II und I durch ihr weit geringeres Ausmaß. Die Gefäße sind nur von einem dünnen Saum von Lymphocyten und Plasmazellen umgeben. Demgegenüber findet sich aber bei den mit Typ III injizierten Tieren ausgedehnte Gliaproliferation — einmal in der Umgebung zugrundegegangener Nervenzellen; zum anderen in Form diffuser Gliazellproliferation und herdförmiger umschriebener Gewebsinfiltrate. Die Gesamthäufigkeit von Schnitten mit Läsionen ist beim Virustyp III nicht grundsätzlich verschieden von den anderen Virustypen, die beobachteten mesodermal-gliösen Läsionen sind beim Virustyp III jedoch von einem anderen Typ: Gefäßinfiltrate treten im Vergleich zu den Gewebsinfiltraten und der diffusen Gliaproliferation deutlich zurück. Auch in den weißen Strangarealen liegen adventitielle Infiltrate vor, neben ausgeprägten Gliasternehen.

Diskussion

Vergleichen wir die morphologischen Alterationen nach intraspinaler Injektion der drei attenuierten Virustypen und des Wildvirus, so ruft Typ II den geringsten Nervenzelluntergang hervor, der zudem auf die Lumbalregion beschränkt ist. Auffallend sind bei diesem Typ allerdings die ausgeprägten mesodermal-gliösen Reaktionen, mit der Prädilektionsstelle im Mittelhirn und, weniger ausgeprägt, in der Medulla oblongata. Die Gefäße zeigen ausgedehnte adventitielle Infiltrate mit mehreren Zellreihen, vorwiegend aus Lymphocyten und Plasmazellen, was BESWICK u. Mitarb. veranlaßte, von einem „granulomatösen Typ“ der Gewebsreaktion zu sprechen.

Der Virustyp I verursacht geringgradigen Nervenzelluntergang in der Umgebung des Stichkanals wie auch in allen untersuchten Regionen. Die mesodermal-gliösen Reaktionen sind weniger ausgeprägt als beim Typ II und zeigen nicht in gleichem Maße eine Bevorzugung des Mittelhirns und der Medulla oblongata, sondern betreffen eher gleichmäßig die verschiedenen Regionen. Die adventitiellen Infiltrate sind allgemein weniger ausgedehnt als bei Typ II.

Der Virustyp III zeigt demgegenüber eine wesentlich größere Tendenz zur Ausbreitung im Nervensystem als Typ I. Nervenzelluntergang findet sich häufig in allen Regionen des Nervensystems. Während die adventitiellen Infiltrate bei diesem Typ seltener sind, stehen diffuse und umschriebene Glioproliferationen im Vordergrund des histopathologischen Bildes.

In dem Maße, wie vom Typ II über den Typ I zum Typ III das Ausmaß des Nervenzelluntergangs zunimmt, läßt sich umgekehrt eine Abnahme der adventitiellen Infiltrate nachweisen. Die Befunde mit attenuiertem Virustyp III leiten zu den geweblichen Alterationen über, wie wir sie nach Injektion von Poliowildviren beim Affen sehen, die einen noch stärkeren Nervenzelluntergang bei mäßiger vasculärer Reaktion erkennen lassen. Wir können beim Virustyp II demnach von geweblichen Alterationen des „attenuierten Typs“ sprechen, müssen beim Typ III dagegen schon eine Annäherung an das Bild der geweblichen Alterationen vom „Wildvirustyp“ sehen. Der Virustyp I steht hinsichtlich seiner Neurovirulenz zwischen Typ II und III.

Eine ähnliche Wertreihe der Neurovirulenz läßt sich für die drei Typen der Wildviren nicht aufstellen, da die zahlreichen Stämme jedes einzelnen Virustyps durchaus verschiedene Neurovirulenz besitzen können.

Zusammenfassend können wir folgendes feststellen: mit dem intraspinalen Affenversuch ist es möglich, Unterschiede im Verhalten der drei Typen von attenuierten Polioviren festzustellen, die im intracerebralen Versuch nicht in Erscheinung treten. Bei den einzelnen Typen unterscheiden sich einerseits die Qualität und andererseits das Verteilungsmuster der Läsionen deutlich.

Wenn man für die einzelnen Versuche, aus denen die Diagramme zusammengestellt sind, eine Standardabweichung der mittleren Bewertungsziffern berechnet, dann zeigt sich, daß diese Unterschiede die doppelte Standardabweichung der Einzelwerte recht oft übersteigen. Zufällige Irrtümer sind damit zwar nicht sicher statistisch ausgeschlossen, aber sie sind doch sehr unwahrscheinlich, zumal es sich um ein sehr großes Beobachtungsmaterial handelt.

Die Diagramme zeigen deutlich, daß es unbiologisch ist, die Impfstoffe der verschiedenen Typen mit einem Bezugsvirus aus Typ I zu vergleichen, wie man es in den USA und leider auch noch bei uns heute tut.

Einige Worte wären noch über die Bedeutung der sogenannten unspezifischen geweblichen Läsionen (die z. B. von JUNGHERR sehr hoch eingeschätzt werden), für eine Fehlbeurteilung im Affenversuch zu sagen. Wir haben schon eingangs erwähnt, daß man die Ätiologie einer einzelnen geweblichen Alteration nicht erkennen kann. Aufgrund unserer Befunde können wir den unspezifischen Läsionen keine sehr große Bedeutung zumessen. Wir müssen weitaus die meisten dieser morphologischen Befunde durch das Poliovirus bedingt auffassen. Denn aus den Diagrammen ist erkennbar, daß die Häufigkeit aller beobachteten Läsionsarten

eindeutig von der injizierten Dosis Poliovirus abhängt. Der weitaus größte Teil der beobachteten histologischen Läsionen kann also weder vor der Injektion vorhanden gewesen sein, noch auf das mechanische Injektionstrauma zurückzuführen sein. In unserem Material läßt höchstens ein sehr geringer Anteil aller Läsionen diese Abhängigkeit von der Virusdosis vermissen.

Selbstverständlich wurden solche geweblichen Alterationen, bei denen man schon aus dem histologischen Bild eine andere ätiologische Diagnose wahrscheinlich machen kann (beispielsweise tuberöse Sklerose, Tuberkulose, Syringomyelie, Angiome, eitrige Meningitiden, traumatische Defekte u. a.) in die Diagramme überhaupt nicht aufgenommen.

Aus der Darstellung von Qualität und Ausbreitungsmuster ersieht man, daß die Impfstoffstämme ihre Pathogenität im Attenuierungsprozeß verändert haben. Es ist nicht so, daß sie einfach weniger Läsionen erzeugen als Wildviren. Wir halten es daher für nicht berechtigt, als Impffolge beim Menschen nur das klinische und morphologische Vollbild der Poliomyelitis anzuerkennen und zu diskutieren. Wenn die Stämme nach ihrer Attenuierung beim Affen erwiesenermaßen nach Qualität, Quantität und Topik andere morphologische Alterationen als die Wildviren erzeugen, kann man diese Möglichkeit für den Menschen kaum sicher ausschließen.

Zusammenfassung

Es wird die Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den drei Typen des Sabinschen Satzes von Impfviren beschrieben.

Mit dem intraspinalen Affenversuch ist es möglich, Unterschiede im Verhalten der drei Typen von attenuierten Polioviren festzustellen, die im intracerebralen Versuch nicht in Erscheinung treten. Das Ausmaß des Nervenzellunterganges nimmt in der Reihe Wildvirus — attenuiertes Virus Typ III — attenuiertes Virus Typ I — attenuiertes Virus Typ II ab. In der gleichen Reihe nehmen die Gefäßinfiltrate zu.

Aufgrund der Untersuchung eines großen Tiermaterials ist es möglich, für die histologischen Alterationen nach intraspinaler Injektion eines jeden Typs der attenuierten Polioviren Charakteristica für Qualität und Ausbreitung des Prozesses aufzustellen.

Literatur

- BESWICK, T. S. L., C. R. COID, E. HARTLEY, M. HENDERSON, and M. M. WINTER: The behavior of attenuated strains of poliovirus in monkeys. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **27**, 10—24 (1964).
- BESWICK, T. S. L., and M. M. WINTER: Neurovirulence of attenuated polioviruses. Proc. VIIth. Symposium European Ass. Poliomyelitis and allied diseases. Oxford 1961, p. 297. Paris: Masson.

- BODIAN, D.: The virus, the nerve cell, and paralysis. A study of experimental poliomyelitis in the spinal cord. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **83**, 1—107 (1948).
- Viremia in experimental poliomyelitis. I. General aspects of infection after intravascular inoculation with strains of high and low invasiveness. *J. Hyg. (Lond.)* **60**, 339—357 (1954).
 - The enhancement of susceptibility of monkeys to poliovirus of high and of low virulence. *Amer. J. Hyg.* **64**, 92—103 (1956).
 - An electron-microscopic study of the monkey spinal cord. I. Fine structure of normal motor column. II. Effects of retrograde chromatolysis. III. Cytologic effects of mild and virulent poliovirus infection. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **114**, 13—119 (1964).
 - , and H. A. HOWE: An experimental study of the role of neurones in the dissemination of poliomyelitis virus in the nervous system. *Brain* **63**, 135 (1940).
 - — An effective methode of inoculation of poliomyelitis virus. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **44**, 170 (1940).
 - — The rate of progression of poliomyelitis virus in nerves. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **69**, 79—85 (1941).
 - — Neurotropism and the genesis of cerebral lesions in poliomyelitis; an experimental study. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **68**, 58 (1941).
 - — Non-paralytic poliomyelitis in the chimpanzee. *J. exp. Med.* **81**, 255—273 (1945).
 - — The significance of lesions in peripheral ganglion in chimpanzee and human poliomyelitis. *J. exp. Med.* **85**, 231—242 (1947).
- BONIN, O., u. F. UNTERHARNSCHIEDT: Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen. I. Mitteilung: Grundlagen, Technik und Bewertung des Versuchs zur Messung der Neurovirulenz für den Affen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **206**, 260—271 (1964).
- CABASSO, V. J., E. L. JUNGHERR, S. LEVINE, A. W. MOYER, M. ROCA-GARCIA, and H. R. COX: Assessment of correlation between certain in vitro poliovirus markers and monkey neurovirulence. In: *Sec. Int. Conf. on Live Poliovirus Vaccines, Panameric. Health Org., Sci. Publ. No. 50*, Washington D. C. 1960.
- COID, C. R., T. S. L. BESWICK, and J. H. O'TOBIN: The virulence of strains of poliovirus for cynomolgus monkeys after subcutaneous injection. *J. Hyg. (Camb.)* **59**, 387—394 (1961).
- J. H. O'TOBIN, and T. S. L. BESWICK: The sensitivity of monkeys to subcutaneous inoculation of the brunenders strain of type-I poliomyelitis virus. *J. Path. Bact.* **79**, 325—330 (1960).
- FAIRBROTHER, R. W., and E. W. HURST: The pathogenesis and propagation of the virus in experimental poliomyelitis. *J. Path. Bact.* **33**, 17 (1930).
- FLEXNER u. LEWIS: zit. nach K. LANDSTEINER u. E. PRASEK.
- HOWE, H. A.: Poliomyelitis infection in immunized chimpanzees. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **61**, 1014—1022 (1955).
- , and R. S. ECKE: Modification of the site of paralysis in experimental poliomyelitis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **37**, 123 (1937/38).
 - — Experimental poliomyelitis without paralysis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **37**, 125 (1937/38).
- HURST, E. W.: The histology of experimental poliomyelitis. *J. Path. Bact.* **32**, 457 (1929).
- The occurrence of intranuclear inclusions in the nerve cells in poliomyelitis. *J. Path. Bact.* **34**, 331 (1931).
 - Further observations on the pathogenesis of experimental poliomyelitis intrathecal inoculation of the virus. *J. Path. Bact.* **35**, 41 (1932).

- JUNGHERR, E. L., V. J. CABASSO, A. W. 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).
- — and M. STEBBINS: Comparative pathology of attenuated poliovirus and simian viruses 12 and 40 in monkeys. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **22**, 512—527 (1963).
- KARASSON, D.: Pathohistological examination of the neurovirulence of Sabin's attenuated poliovirus strains on monkeys. In: *The Control of Poliomyelitis by live Poliovirus Vaccine*, S. 149—156. Hsg. v. J. WEISSFEILER. Budapest: Akadémiai Kiado 1961.
- KIRSCHSTEIN, R., S. BARON, G. S. BORMAN, R. MURRAY, F. T. PERKINS, and G. HOTTLE: Neurovirulence of attenuated type I poliovirus vaccine strains after intramuscular inoculation of rhesus monkeys. *Virology* **11**, 300—302 (1960).
- G. BORMAN, S. BARON, R. FRIEDMAN, R. MURRAY, and G. HOTTLE: Laboratory investigations of the attenuated poliovirus vaccine strains. I. Neurovirulence after intramuscular inoculation of monkeys. In: *Live poliovirus vaccines*. Second Int. Conf. Scient. Publ. No. 50 of the Pan Amer. Health Org. Washington 1960, p. 90—97.
- KNOEPFELMACHER: zit. nach K. LANDSTEINER u. E. PRASEK.
- LANDSTEINER, K., u. E. POPPER: Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen. *Z. Immun.-Forsch.* **2**, 377—390 (1909).
- , u. E. PRASEK: Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen. *Z. Immun.-Forsch.* **4**, 584—589 (1910).
- LEINER u. WIESNER: zit. nach K. LANDSTEINER u. E. PRASEK.
- LUHAN, J. A.: Histopathologic studies in experimental poliomyelitis. *Arch. Neurol. (Chic.)* **37**, 479—504 (1937).
- MCCANN, G. F.: A study of mitochondria in experimental poliomyelitis. *J. exp. Med.* **27**, 31 (1918).
- MELNICK, J. L., and J. C. BRENNAN: Monkey neurovirulence of attenuated poliovirus vaccines being used in field trials. *Live Poliovirus Vaccines*, first intern. Conf., Scient. Publ. No. 44 of the Pan Amer. Health Org. Washington 1959, p. 65—101.
- MURRAY, R., R. KIRSCHSTEIN, G. VAN HOOSIER jr., and S. BARON: Comparative virulence for rhesus monkeys of poliovirus strains used for oral administration. In: *Live Poliovirus Vaccines*, first intern. Conf. Scient. Publ. No. 44 of the Pan Amer. Health Org. 1959, p. 39—64.
- O'LEARY, J. L., P. HEINBECKER, and H. G. BISHOP: Nerve degeneration in poliomyelitis: IV. Physiologic and histologic studies on the roots and nerves supplying paralyzed extremities of monkeys during acute poliomyelitis. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)* **28**, 272—298 (1932).
- PETTE, H.: Über experimentelle Poliomyelitis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **116**, 163—169 (1930).
- H. DEMME, u. ST. KÖRNYEY: Studien über experimentelle Poliomyelitis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **128**, 125—252 (1932).
- H. LENNARTZ, G. MAASS, L. VALENCIANO, u. K. MANNWEILER: Die Neuropathogenität abgeschwächter Polioviren im Affenexperiment. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* **148**, 168—192 (1961).
- ROEMER: zit. nach K. LANDSTEINER u. E. PRASEK.
- SABIN, A. B., W. A. HENNESSEN, and J. WINSSER: Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunologic types. *J. exp. Med.* **99**, 551—576 (1954).

- SABIN, A. B., and P. K. OLITZKY: Influence of pathway of infections and pathology of olfactory bulbs in experimental poliomyelitis. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **35**, 300 (1936).
- , and R. WARD: Nature of non-paralytic and transitory paralytic poliomyelitis in rhesus monkeys inoculated with human virus. J. exp. Med. **73**, 757—770 (1941).
- UNTERHARNSCHEIDT, F.: Über einen dysontogenetischen Prozeß mit blastomatösem Einschlag (tuberöse Sklerose) beim Affen. Acta neuropath. (Berl.) **3**, 250—254 (1964).
- Intracerebrales Angioma cavernosum bei einem Affen (*Macacus rhesus*). Acta neuropath. (Berl.) **3**, 295—296 (1964).
- , u. F. P. NAGLER: Springomyelie bei einem Affen (*Macacus mulatta*). Acta neuropath. (Berl.) (im Druck).
- VERLINDE, J. D.: Die experimentelle Poliomyelitis und ihre Bedeutung für das Studium der Pathogenese. Ergebn. Mikrobiol. **33**, 49—96 (1960).
- WARBURG, B.: Experimental poliomyelitis; histology of the persistent lesions of the central nervous system. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.) **25**, 1191—1232 (1931).
- WINTER, M. M., and L. R. BOULGER: The sensitivity of neurovirulence tests. In: Proceed. IXth European Symposium of Poliomyelitis and Allied Diseases. Stockholm 1.—4. Sept. 1963.

Priv.-Doz. Dr. FRIEDRICH UNTERHARNSCHEIDT,
Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max Planck-Institut), 8 München 23,
Kraepelinstraße 2
Prof. Dr. OTTO BONIN,
Paul Ehrlich-Institut, 6 Frankfurt (Main)-Süd 10, Paul Ehrlichstraße 42—44