

# Varianten und Mutanten bei animal-pathogenen Virusarten

Autor(en): **Hallauer, C.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **16 (1960)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307445>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Varianten und Mutanten bei animal-pathogenen Virusarten<sup>1</sup>

Von C. Hallauer

**Vorbemerkungen.** Sämtliche Virusarten repräsentieren *heterogene Populationen* von biologisch und genetisch differenten Partikeln, nämlich einem vorherrschenden, den biologischen Charakter bestimmenden Biotyp und den sich in der Minderzahl befindlichen natürlichen Mutanten. Die Mutationsrate ist bei den verschiedenen Virusarten ungleich groß, so daß zwischen genetisch relativ stabilen Arten (z. B. Variola-, Masern-, Gelbfieber-, Mumps-, Herpes simplex-, klassisches Hühnerpestvirus) und ausgesprochen labilen Arten (z. B. Influenza-, Polio-, Maul- und Klauen-seuche-, atypisches Hühnerpestvirus) unterschieden werden kann. Die Potenz zur Variabilität wird somit durch die jeder Virusart inhärente Frequenz der Bildung spontaner Mutanten bestimmt. Die Umformung einer Viruspopulation zu einer selbständigen Variante bzw. Mutante erfolgt – nach der vorherrschenden Meinung – ausschließlich durch *Selektion*, d. h. durch die Begünstigung natürlich vorhandener Mutanten gegenüber dem bisher dominierenden Biotyp. Als natürliche «Selektoren» fungieren Gewebe, in welchen das Virus bisher nicht passiert wurde. Mit dieser Vorstellung harmoniert die Erfahrung, wonach ein Wirtswechsel oder die Virusdauerpassage in bestimmten Geweben (z. B. Gehirn) häufig Virustransformationen bewirken.

### *Isolierung von Varianten bzw. Mutanten bei der Dauerzüchtung von klassischem bzw. atypischem Geflügelpest- und Gelbfiebervirus in menschlichen Gewebsexplantaten<sup>2</sup>*

Die seit vier Jahren laufenden Untersuchungen verfolgten zunächst den Zweck, menschenapathogene Virusarten (Vaccine-, Geflügelpest-, Gelbfieber-, 17D-Virus) an explantiertes menschliches Tumorgewebe (Carcinomstämme «HeLa», «KB», «Detroit-6») derart zu adaptieren, daß eine therapeutische Verwendung beim Menschen möglich gewesen wäre.

<sup>1</sup> Die Abhandlung dieses Themas muß sich auf eine Reihe eigener Versuche beschränken, in welchen die vorzügliche Eignung von Gewebsexplantaten für die Gewinnung von Virusvarianten und Mutanten nachgewiesen wurde und der Mechanismus dieser Virusabwandlungen teilweise geklärt werden konnte.

<sup>2</sup> Entsprechende Versuche mit Variolavirus sind z. Z. im Gang.

Dieser Zweck wurde indessen nicht erreicht; sämtliche «adaptierten» Virusstämme vermochten zwar das explantierte Tumorgewebe völlig zu zerstören, zeigten jedoch bei menschlichen Tumorträgern – von einer einzigen Ausnahme<sup>3</sup> abgesehen – nicht die geringsten onkolytischen Effekte.

Trotz dieses offensichtlichen Mißerfolges wurden diese Versuche auf noch breiterer Basis (Einbezug des menschenpathogenen Gelbfiebestammes «Asibi»); zusätzliche Verwendung von menschlichem Normalgewebe [Amnion, Niere]) fortgeführt, und zwar im Hinblick auf die Erfahrung, wonach Virusarten (Gelbfieber-, Hühnerpest-, Newcastle Disease-, Poliovirus) im Gewebsexplantat ungleich häufiger und weitgehend abgewandelt werden als im Tierversuch (vgl. *Hallauer* und *Kronauer* [14]). Außerdem bietet das Gewebsexplantat für das Studium der Varianten- und Mutantenbildung noch eine Reihe weiterer Vorzüge: 1. Explantate (Passagezellstämme) sind derart dedifferenziert, daß die art- und organspezifische Provenienz des Gewebes für die Eignung zur Viruszüchtung meist keine Rolle mehr spielt, d. h. Gewebe, die in vivo nicht zu infizieren sind, können in vitro einen hohen Grad von Virusempfindlichkeit aufweisen (vgl. *Hallauer* und *Kronauer* [14]); 2. die Bildung von Virusvarianten kann im Explantat durch die tägliche Prüfung des cytopathogenen Effektes, der Plaquebildung, der Hämagglutinin- und Infektiositätstiter fortlaufend kontrolliert werden, und 3. erlaubt die Plaque-Technik von *Dulbecco*, Virusvarianten rasch festzustellen und in reinen Klonen zu isolieren.

Die Abwandlung, welche die geprüften Virusarten bei der Dauerpassage in menschlichen Gewebsexplantaten erfuhren, ist insofern einheitlich, als stets hochgradig mitigierte, d. h. für die natürlichen Wirte apathogene Varianten gebildet wurden. Hiervon abgesehen, zeigte jede Variante – in Abhängigkeit von der Art des Ausgangsvirus, der zur Züchtung verwendeten Gewebe und der Dauer der Kulturpassage – bestimmte Besonderheiten.

### 1. *Klassisches Geflügelpestvirus* (13, 14, 15)

Der seit mehr als dreißig Jahren in Ei- und Hühnerpassagen unterhaltene Stamm «Brescia» wurde auf Explantate der menschlichen Carcinomstämme HeLa und KB sowie von menschlichem Amnion (Stamm FL) übertragen und in Dauerpassagen fortgeführt. Die Viruspassage erfolgte in jedem dieser Explantate in zwei Serien, wovon die eine kontinuierlich mit massiven, die andere mit kleinen Virusdosen infiziert

---

<sup>3</sup> Völlige Rückbildung einer Struma maligna nach der intratumoralen Injektion von Vaccinekulturvirus.

wurde. Sobald sich Anzeichen für eine qualitative Veränderung des Passagevirus ergaben, wurde versucht, die entstandene Variante nach dem Verdünnungsverfahren (Überimpfung von Virusgrenzdoson auf das Explantat bzw. Brutei) zu isolieren. Derart isolierte Varianten wurden hierauf in fortlaufenden Bruteipassagen auf die Stabilität ihrer Eigenschaften geprüft. Die nachfolgende Zusammenstellung (Tab. 1) gibt über diese Versuchsanordnung Auskunft.

Tabelle 1

Dauerpassage des klassischen Geflügelpestvirus «Brescia» in menschlichen Explantaten. Passagezahl: im gesamten, im Zeitpunkt des ersten Nachweises und der Isolierung der Varianten

Explantate	HeLa «M - S»*	HeLa «Zürich»	KB	Amnion «FL»
Gesamtzahl der Passagen .	76	62	60	54
Varianten:				
erster Nachweis . . . . .	18.	20.	5.	30.
Isolierung bzw. Stabilisierung . . . . .	37./1-79**	30./1-32 50./1-25 62./1-19	20./1-29 48./1-22 60./1-17	24./1-9

\* Stamm Minneapolis (1.-36. Passage), Stamm Sip (37.-76. Passage)

\*\* Abzweigung des Kulturvirus der 37. Passage auf Brutei und 79 Eipassagen

Die Bildung von Varianten konnte in sämtlichen der geprüften Explantate – allerdings nach einer recht unterschiedlichen Anzahl von Passagen – nachgewiesen werden. Die Art des explantierten Gewebes bestimmte nicht nur die Raschheit der Virusabwandlung, sondern auch die Stabilität der isolierten Varianten. So konnten aus Amnionexplantaten – trotz zahlreichen Selektionsversuchen – keine völlig stabilen, d. h. irreversibel mitigierten Virusvarianten gewonnen werden. Fernerhin hatte die Größe der Infektionsdosis, mit welcher die Explantate beimpft wurden, einen unverkennbaren Einfluß auf die Virusvariabilität: In HeLa- und Amnionexplantaten war die Isolierung von Varianten nur in den massiv infizierten Passagereihen möglich.

Gegenüber dem vollvirulenten Ausgangsvirus unterschieden sich die Varianten in den folgenden Merkmalen:

a) Varianten sind – im Gegensatz zum originären Virus – an menschliche Explantate adaptiert. Die im Explantat erreichten Viruskonzentrationen betragen für Varianten  $\log 5.5-6.3$ , für das Originalvirus  $\log \approx 1.0-3.5 ID_{50}$ .

b) Bei der Auswertung im Brutei zeigt das mitigierte Kulturvirus durchschnittlich einen niedrigeren Infektiositätstiter als im Explantat ( $-\log 4.3:5.7 \text{ ID}_{50}$ ). Zwischen mitigiertem Ei- und Originalvirus bestehen ähnliche Titerdifferenzen ( $-\log 7.0:8.3$ ). Charakteristisch für das Verhalten mitigierter Virusstämme sind jedoch vor allem die – gegenüber dem Originalvirus – konstant (um 1–6 Tage) verlängerten Tötungszeiten, in welchen der verzögerte Infektionsablauf bzw. die verlangsamte Virusgeneralisation deutlich zum Ausdruck kommt.

c) Die Hämagglutininbildung ist bei Varianten nicht herabgesetzt, steht jedoch in einem offensichtlichen Mißverhältnis zum relativ niedrigen Infektiositätstiter, so daß auffallend kleine  $\text{ID}_{50}/\text{HA}$ -Quotienten (Kulturvirus:  $\log 2.5-3.7$ ; Eivirus:  $\log 4.1-4.5$ ; Originalvirus:  $\log 5.6$ ) resultieren, ein Befund, der möglicherweise auf die Bildung von inkomplettem Virus hinweist.

d) Für Hühner sind die Varianten bei jeder Art von Applikation (intramuskulär, intravenös, intracerebral, peroral) und nach Verabreichung größter Infektionsdosen ( $10^6-10^7 \text{ ID}_{50}$ ) völlig apathogen. Der Infektionsablauf ist wohl auch in dieser Tierspecies zeitlich verzögert, so daß der pathogene Schwellenwert durch die frühzeitige (am 4.–5. Tag p.i. nachweisbare) Intervention von Antikörpern nicht erreicht wird.

Durch die Dauerpassage bereits mitigierter Virusstämme in bestimmten Explantaten (HeLa «Zürich», KB) kann die Infektiosität auch für die Species Huhn derart abfallen, daß die periphere (intramuskuläre) Einverleibung nur noch eine örtlich begrenzte Infektion bewirkt (14).

e) Im Antigenbestand stimmen die erzeugten Varianten mit dem Originalvirus überein, so daß eine zuverlässige Immunisierung von Hühnern möglich ist (13, 15).

## 2. *Atypisches Geflügelpestvirus* (11, 15)

Der Pseudopeststamm «Valencia» wurde in derselben, bereits für klassisches Virus beschriebenen Versuchsanordnung in menschlichen Gewebsexplantaten (HeLa «Sip», KB und Amnion) passiert und auf Variantenbildung geprüft. Die nachfolgende Übersicht (Tab. 2) orientiert über die Anzahl der durchgeführten Passagen, den Termin des ersten Nachweises sowie der Isolierung und Stabilisierung gebildeter Varianten.

Auch für diese Virusart erwies sich jedes der geprüften Gewebe für die Virusabwandlung als geeignet, wenn auch wiederum in unterschiedlichem Grade (KB > HeLa > Amnion). Ebenso wurde auch in diesen Versuchen die begünstigende Wirkung großer Infektionsdosen auf die Abspaltung von Virusvarianten festgestellt. Schließlich zeigten die isolierten Varianten – je nach ihrer geweblichen Provenienz – ebenfalls einen unterschied-

Tabelle 2

Dauerpassage des atypischen Geflügelpestvirus «Valencia» in menschlichen Explantaten. Passagezahl: im gesamten, im Zeitpunkt des ersten Nachweises und der Isolierung der Varianten

Explantate	HeLa «Sip»	KB	Amnion
Gesamtzahl der Passagen . . . .	211	55	70
Varianten:			
erster Nachweis . . . . .	40	6-15	53 (?)
Isolierung bzw. Stabilisierung	70./1-35*	37./1-2 50./1-15	67./1-5

\* Abzweigung des Kulturvirus der 70. Passage auf Brutei und 35 Eipassagen

lichen Grad von Stabilität, und zwar in der Reihenfolge HeLa > KB > Amnion.

Im Gegensatz zum klassischen Virus bedurfte nun aber das Pseudopestvirus keiner irgendwelchen Anpassung an menschliche Explantate. Fernerhin verhielten sich mitigierte Virusstämme im Explantat hinsichtlich der Höhe der Infektiositäts- und Hämagglutinintiter, ID<sub>50</sub>/HA-Quotienten, Grad der cytopathogenen Auswirkung durchaus gleichartig, wie das vollvirulente Ausgangsvirus. Die Charakterisierung von Pseudopestvarianten beschränkte sich daher auf drei Kriterien:

- a) die verminderte Infektiosität und Pathogenität für das Brutei (verlängerte Absterbezeiten);
- b) die völlige Apathogenität für Hühner und
- c) die hochgradige immunisierende Potenz für Hühner.

Diese Eigenschaften blieben auch bei einer langfristigen Dauerpassage (211 Passagen im HeLa-Explantat) völlig konstant; ein extremer Grad von Mitigierung wurde bei Pseudopestvarianten nicht beobachtet.

### 3. Gelbfiebertvirus (12, 16)

Die Züchtung von Gelbfiebertvirus in menschlichen Gewebsexplantaten erfolgte erstmalig und sollte vor allem die Frage abklären, 1. ob der menschenapathogene Impfstamm 17D durch die Dauerpassage in menschlichen Explantaten seine hochgradige Mitigierung unverändert beibehält, oder ob sich Anzeichen für eine Reversion in die pathogene Ausgangsform gewinnen lassen, und 2. ob der vollvirulente pantrope Asibi-Stamm in menschlichen Explantaten in ähnlicher Art mitigiert werden kann wie in Explantaten von embryonalem Hühnergewebe.

In welcher Weise diese Stämme passiert wurden, zeigt die nachfolgende Zusammenstellung (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3

## Dauerpassage von Gelbfiebertvirusstämmen in menschlichen Explantaten

Virusstämme	Gewebe	Anzahl Passagen
17D (London) .....	HeLa/KB	99/66
17D (Amsterdam) .....	KB	64
French Neurotropic* (Dakar).	HeLa	43
Asibi I.....	KB	71
Asibi II** .....	KB	28

\* im Affenversuch nicht geprüft

\*\* gleiches Ausgangsvirus wie Asibi I (nach 5jähriger Konservierung in lyophiler Form); im Affenversuch noch nicht geprüft.

Die Ergebnisse dieser Züchtungsversuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Anzüchtung sämtlicher Virusstämme in HeLa- und KB-Explantaten machte keine irgendwelchen Schwierigkeiten, und die bereits in den Ausgangskulturen oder zumindest in den nachfolgenden Passagen erreichten Infektiositätstiter ( $-\log 6.5-7.5 ID_{50}$ ) deckten sich mit den im cerebralen Mäusetest ermittelten Werten. Auch bei der Dauerpassage zeigten sämtliche der geprüften Stämme hinsichtlich Vermehrungsgrad und cytopathogener Auswirkung ein weitgehend gleichartiges und konstantes Verhalten, so daß die fortlaufende Kontrolle der Explantate keine Anhaltspunkte für eine Virusveränderung lieferte.

2. Die Bildung von Virusvarianten wurde erst durch die Pathogenitätsprüfung des Passagevirus im Mäuse- und Affenversuch sowie durch den schließlich gelungenen Hämagglutininachweis im Explantat manifest. Die Abwandlung zeigte für jeden Virusstamm ein besonderes Gepräge:

a) von den *17D-Stämmen* büßte der Stamm Amsterdam bereits zwischen der 2. und 7. KB-Passage seine cerebrale *Mäusepathogenität* völlig ein; der Stamm London erlitt dagegen denselben Verlust erst nach 99 HeLa- und 44 KB-Passagen. Beide Stämme bewirken im Mäusegehirn eine latente Infektion mit nachfolgender solider Immunität gegen massive Reinfektionen mit vollvirulentem Virus (12). Hinsichtlich der *Bildung von Hämagglutinin* (16) unterschieden sich beide Stämme; in den mit Stamm London infizierten Explantaten versagte der Hämagglutininachweis (Boratpufferextraktion des explantierten Gewebes) nach der 99. HeLa- und 54. KB-Passage regelmäßig, wogegen der Stamm Amsterdam bisher, d. h. nach 64 KB-Passagen, noch Hämagglutinin von annähernd konstantem Titer produziert, wobei natürlich nicht ausgeschlossen ist, daß diese Eigenschaft schließlich ebenfalls verloren geht. Die

Prüfung auf *Affenpathogenität* erfolgte bei beiden Stämmen nach der 39./40. HeLa-KB-Passage (Stamm London) bzw. 39. KB-Passage (Stamm Amsterdam). Beide Stämme erwiesen sich nach der peripheren Einverleibung als völlig apathogen und erzeugten humorale Antikörper. Eine Reversion im Sinne einer – durch die Dauerpassage in menschlichen Gewebsexplantaten bewirkten – wiedererlangten Viscerotropie konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

b) Der *Asibi-Stamm* (I und II) verhielt sich während 71 bzw. 28 KB-Passagen hinsichtlich der Hämagglutininbildung und Mäusepathogenität wie das Ausgangsvirus. Seine Abwandlung zur mitigierten Variante wurde erst im *Affenversuch* (subcutane Injektion des Kulturvirus der 36. KB-Passage) evident. Nach einer massiven Infektionsdosis blieben die Versuchstiere – von einer transitorischen Fiebererhebung abgesehen – symptomlos und überlebten, während die Impfung mit dem originären *Asibi-Virus* eine letal verlaufende Infektion bewirkte. Auf Grund dieser allerdings wenig zahlreichen, an insgesamt 8 Rhesusaffen durchgeführten Versuche konnte angenommen werden, daß der pantrope *Asibi-Stamm* durch die Passage in explantierten menschlichen Tumorgeweben seine originäre Viscerotropie verloren hatte.

### *Schlußbetrachtungen*

Die vorliegenden Versuche bieten drei bemerkenswerte Aspekte, nämlich: 1. daß im Explantat die Bildung von Varianten auch bei Virusarten möglich ist, die unter natürlichen und experimentellen Bedingungen einen hohen Grad von Stabilität aufweisen (klassisches Hühnerpestvirus), 2. daß die Isolierung von Varianten im Explantat auch dann gelingt, wenn die Viruszüchtung in Geweben des natürlichen, hochempfindlichen Wirtes erfolgt (Gelbfiebervirus) und 3. daß die Abwandlung der drei geprüften Virusarten im Gewebsexplantat ausschließlich zu Minusvarianten führte, wobei zum Teil (klassisches Hühnerpestvirus, 17D-Stamm des Gelbfiebervirus) extreme Grade von Mitigierung erreicht wurden.

Schon auf Grund dieser Befunde dürfte die Annahme gerechtfertigt sein, daß dem Gewebsexplantat hinsichtlich der Selektionierung von Virusvarianten eine Sonderstellung zukommt.

Auf die vorzügliche Eignung explantierter Gewebe für die Erzeugung von Varianten und Mutanten machte der Referent (8) bereits 1938 aufmerksam, indem er nach der Sichtung der damaligen Literatur feststellte, daß die Variabilität von Virusarten im Gewebsexplantat auffallend groß ist und daß sich *in vitro* oft Varianten isolieren lassen, deren Gewinnung *in vivo* durch die Viruspassage in entsprechenden Geweben nicht mög-



lich ist. Die seither erschienenen Mitteilungen über Virusabwandlungen im Gewebsexplantat – insbesondere über die Isolierung aparytogenen Poliovarianten – sowie auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen bestätigen diesen Sachverhalt.

Die Besonderheit des Gewebsexplantates liegt nun bekanntlich darin, daß das explantierte Gewebe desorganisiert, dedifferenziert und in seiner Vermehrungspotenz «embryonalisiert» ist. Für die Beziehungen zwischen Virus und Wirtsgewebe ergeben sich hieraus zwei bemerkenswerte Konsequenzen: 1. daß die Virusvermehrung im Gewebsexplantat häufig auch dann möglich ist, wenn dasselbe Gewebe in vivo zufolge seiner art- und organspezifischen Provenienz virusresistent ist. Das Gewebsexplantat besitzt demnach – ähnlich anderen embryonalen Geweben (Hühnerembryo, Säuglingsneonate) – die Qualität eines «Universalnährbodens», und 2. daß die Variantenbildung im Explantat auch dann zu beobachten ist, wenn die Viruspassage in Geweben desselben hochempfänglichen Wirtes durchgeführt wird. Die Übertragung einer Viruspopulation vom Tierkörper in das Explantat desselben Wirtes dürfte daher einem eigentlichen Wirtswechsel entsprechen, durch welchen die Selektion bestimmter Biotypen eingeleitet wird.

Daß die artspezifische Provenienz des explantierten Gewebes für die Variantenbildung im Explantat nicht unbedingt entscheidend ist, kann für die von uns geprüften Virusarten als weitgehend gesichert gelten. So gelingt die Abwandlung des vollvirulenten Gelbfiebertvirus in einen mitigierten 17D-Stamm offensichtlich nicht nur in den von *Theiler* u. Mitarb. (24) verwendeten Explantaten des Hühnerembryos, sondern auch – wie aus unseren eigenen Versuchen mit Wahrscheinlichkeit hervorgeht – im explantierten Tumor- und Normalgewebe des Menschen, d. h. dem für Gelbfiebertvirus hochempfänglichen Hauptwirt. Ebenso führt die Dauerpassage des atypischen Geflügelpestvirus in Explantaten sowohl des hochempfänglichen Hühnerembryos (*Bankowski* u. Mitarb. [1]) als auch des weitgehend resistenten Menschen (eigene Versuche) zu Varianten, die nach dem Grad ihrer Mitigierung wohl nahezu identisch sind. Ähnliche Parallelen ergeben sich für das klassische Geflügelpestvirus, das sowohl im menschlichen Explantat als auch im explantierten embryonalen Hühnerlebergewebe<sup>4</sup> (*Hallauer* [7]) oder im Brutei (*Moses* u. Mitarb. [21]) zu einer für Hühner apathogenen Virusvariante abgewandelt wurde.

Bei der Passage von pantropen, septicämischen Virusarten sind bisher die folgenden Typen von Varianten festgestellt worden:

---

<sup>4</sup> Die Virusabwandlung in diesem Gewebe ist allerdings als Ausnahmefund zu bewerten, dessen Mechanismus nicht geklärt werden konnte.

1. Minusvarianten, die durch eine verminderte Infektiosität und herabgesetzte bzw. aufgehobene Pathogenität für die natürlichen und experimentellen Wirte gekennzeichnet sind. Derartige Varianten wurden beim Vaccinevirus (22), Maul- und Klauenseuchevirus (23) und dem Virus der klassischen und atypischen Geflügelpest (13, 14, 11) isoliert. Für diese Varianten ist charakteristisch, daß die Virusvermehrung zwar im Explantat völlig ungehemmt, im empfänglichen Wirt jedoch soweit abgebremsst ist, so daß die Infektion – wohl durch die rechtzeitige Intervention gebildeter Antikörper – einen latenten bzw. immunisierenden Verlauf nimmt. Durch die Dauerpassage im Explantat können extreme Grade von Mitigierung erreicht werden; solche Varianten (14, 23) erzeugen nur noch örtliche Infektionen und sind zur hämatogenen Generalisierung nicht mehr befähigt.

2. Minusvarianten, die durch den Verlust desjenigen Tropismus (Viscerotropie) charakterisiert sind, welcher für die Pathogenität des originären Virus bestimmend ist. In diese Gruppe gehören die im Explantat erzeugten «neurotrophen» Stämme des Gelbfieber- (24), Rift Valley Fever- (2, 4), West Nile- (17) und equinen Encephalomyelitisvirus (18). Die «Neurotropie» (encephalitogenes Vermögen nach intracerebraler Infektion) ist bei derartigen Varianten meist unverändert erhalten, kann jedoch bei einer langdauernden Kulturpassage schließlich – wie dies beim 17D-Stamm des Gelbfiebervirus nachgewiesen ist (24, 12) – ebenfalls beträchtlich abfallen. Von den Minusvarianten der ersten Kategorie unterscheiden sich diese «neurotrophen» Varianten wohl lediglich durch ihre Affinität zum zentralnervösen Gewebe, die jedoch bereits dem Ausgangsvirus zukommt und daher nicht als ein erworbenes Merkmal zu bewerten ist. Der Verlust der «Viscerotropie» ist wohl auch bei diesen Varianten nur der Ausdruck für eine verminderte Infektiosität für die visceralen Organe empfänglicher Wirte. Die Dauerpassage im Explantat kann auch bei diesen Virusarten – wiederum in Analogie zum klassischen Geflügelpestvirus – zur Bildung hochgradig mitigierter Varianten, die im Tierkörper nicht mehr zu generalisieren vermögen, Anlaß geben (24, 12, 14).

3. Plusvarianten von neurotroper Qualität konnten bei der Passage von Influenzavirus (6), Vaccinevirus (19) und klassischem Geflügelpestvirus (10) in Explantaten von nervösem und bemerkenswerterweise auch nicht-nervösem Gewebe gewonnen werden.

Virusvarianten ganz ähnlicher Art können nun bekanntlich auch im Tierkörper erzeugt werden, allerdings nur, wenn die Viruspassage in ganz bestimmten Organen bzw. Geweben – Gehirn, Hoden, Chorionallantois des Bruteies, Tumoren – durchgeführt wird (vgl. *Findlay* [5], *Hallauer* [9]).

So wird das pantrope Gelbfiebertvirus durch die kontinuierliche Passage im Mäuse- bzw. Affen- und Kückengehirn, Mäusehoden, in Mäusetumoren und auf der Chorionallantois des embryonierten Hühnereies zu «neurotrophen» Stämmen unter weitgehendem Verlust der Viscerotropie abgewandelt (vgl. Theiler [24]). Ähnliche Minusvarianten entstehen durch Mäusegehirnpassagen beim Rift Valley Fever-Virus, beim Virus der afrikanischen Pferdesterbe, beim Dengue-Virus und durch Taubengehirnpassagen beim Virus der equinen Encephalomyelitis. Dieselben Gewebe (Gehirn, Chorionallantois des Bruteies) eignen sich für die Gewinnung von neurotrophen Plusvarianten des klassischen Geflügelpest-, Vaccine- und Influenzavirus.

Auf die a priori überraschende Tatsache, daß eine Reihe von Geweben, die sich nach ihrer art- und organspezifischen Provenienz in hohem Grade unterscheiden, eine Viruspopulation in ähnlicher Weise zu selektionieren vermögen, hat bereits *Levaditi* (20) bei seinen Untersuchungen über die Abwandlung von Dermo- zu Neurovaccine eindrücklich hingewiesen. Die nun vorliegenden Befunde über die Variantenbildung bei andern septicämischen Virusarten bestätigen und erweitern die damalige Beobachtung, ohne jedoch das Phänomen in befriedigender Weise zu erklären.

Über die Art des Selektionsvorganges besteht allerdings kaum ein Zweifel: sowohl die Gewebe in vivo als auch diejenigen des Explantates begünstigen die Vermehrung «neurotroper» gegenüber viscerotropen Viruspartikeln, so daß – in weitgehender Unabhängigkeit von der Art des geweblichen «Selektors» – Minusvarianten von ähnlicher Qualität entstehen. Die Gleichartigkeit solcher Varianten kommt in drei Merkmalen, in welchen sie sich zugleich vom originären Ausgangsvirus unterscheiden, zum Ausdruck; nämlich 1. im Verlust an septicämischer Infektiosität bzw. Viscerotropie, 2. in der Ausweitung des Infektiositätsspektrums auf diejenigen Gewebe, die auch als Selektoren fungieren, und 3. in der relativ großen Stabilität ihrer biologischen Eigenschaften.

Die oft vorhandene «Neurotropie» ist daher nur *ein* Kriterium unter andern und zeigt außerdem von Fall zu Fall ein unterschiedliches Gepräge<sup>5</sup>.

Bei dieser Sachlage wäre zu erwarten, daß auch zwischen den selektionierenden Geweben irgendwelche Analogien bestehen. Die von *Levaditi* (20) vertretene Hypothese, wonach die Gewebe nach Maßgabe ihrer entwicklungsgeschichtlichen Abstammung (embryonale Keimblätter) selektionieren, entspricht dem Beobachtungsmaterial nur teilweise und erscheint auch aus theoretischen Gründen als wenig wahrscheinlich. Plausibler ist wohl die Annahme, daß die experimentelle Viruspassage in Geweben, die unter natürlichen Verhältnissen nicht infiziert werden, schon ausreicht, um eine Umschichtung einer Viruspopulation zu be-

---

<sup>5</sup>Auf die laxen und unkritischen Anwendung des Begriffes «Neurotropie» hat bereits *R. Doerr* (3) wiederholt hingewiesen.

günstigen. Fernerhin bieten embryonale, noch nicht ausgereifte bzw. dedifferenzierte Gewebe natürlichen Mutanten offensichtlich optimale Vermehrungsbedingungen, wobei der «Selektionsdruck» durch die Verimpfung massiver Infektionsdosen noch verstärkt werden kann. Die außerordentliche Frequenz der Variantenbildung im explantierten Gewebe dürfte hierdurch eine hinreichende Erklärung finden. Schließlich ist für die Virusvariabilität im Explantat charakteristisch, daß die Virusabwandlung häufig einen extremen Grad erreicht (14, 24, 12), so daß man sich des Eindruckes nicht erwehren kann, daß auch die Mutationsrate im explantierten Gewebe erhöht ist.

### *Zusammenfassung*

1. Septicämische Virusarten (klassisches und atypisches Geflügelpest- und Gelbfiebertvirus) können in menschlichen Explantaten von Tumor- und Normalgeweben zu apathogenen und immunisierenden Varianten abgewandelt werden.

2. Die hervorragende Eignung des Gewebsexplantates zur Variantenbildung ist in seinen histologischen und physiologischen Besonderheiten begründet.

### *Résumé*

1. Les espèces de virus à caractère septicémique (peste aviaire classique et atypique, fièvre jaune) peuvent être transformées en variantes apathogènes et immunisantes par passage en cultures de tissus humains normaux et cancéreux.

2. L'effet de transformation est dû aux particularités histologiques et physiologiques des explantats tissulaires.

### *Riassunto*

1. Ceppi virali setticemici (peste aviaria classica ed atipica e virus della febbre gialla) possono, in espianti umani di tessuti tumorali e normali, essere trasformati in varianti apatogene ed immunizzanti.

2. L'eccellente attitudine degli espianti di tessuti alla produzione di varianti è documentata nelle sue particolarità istologiche e fisiologiche.

### *Summary*

1. Septicaemic viruses (fowl plague, Newcastle disease, yellow fever) can be transformed in human tissue cultures (Amnion, tumor cell-lines) to apathogenic and immunizing variants.

2. The suitability of the tissue explant for variant formation is based on its histological and physiological peculiarities.

1. *Bankowski*: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **96**, 114 (1957); Avian Dis. **2**, 197 (1958).
- *Bankowski, Corstvet und Fabricant*: Avian. Dis. **2**, 466 (1958).
- 2. *Daubney, Hudson und Garnham*: J. Path. Bact. **34**, 545 (1931).
- 3. *Doerr*: Handb. d. Virusforsch., hrsg. von Doerr und Hallauer. Bd. I/2, 1939, S. 848.
- 4. *Endo*: Virus **1**, 42 (1951).
- 5. *Findlay*: Handb. d. Virusforsch., hrsg. von Doerr und Hallauer. Bd. I/2, 1939, S. 1252.
- 6. *Francis und Moore*: J. exp. Med. **72**, 717 (1940).
- 7. *Hallauer, C.*: Z. Hyg. Infekt.-Kr. **116**, 456 (1934).
- 8. *Hallauer, C.*: Handb. d. Virusforsch., hrsg. von Doerr und Hallauer. Bd. I/1, 1938, S. 400.
- 9. *Hallauer, C.*: Handb. d. Virusforsch., hrsg. von Doerr und Hallauer. Bd. I/2, 1939, S. 1252.
- 10. *Hallauer, C.*: Arch. ges. Virusforsch. **1**, 70 (1939).
- 11. *Hallauer, C.*: Arch. ges. Virusforsch. **8**, 397 (1958).
- 12. *Hallauer, C.*: Arch. ges. Virusforsch. **9**, 428 (1959).
- 13. *Hallauer, C., und Kronauer*: Arch. ges. Virusforsch. **8**, 95 (1958).
- 14. *Hallauer und Kronauer*: Arch. ges. Virusforsch. **9**, 232 (1959).
- 15. *Hallauer und Kronauer*: Arch. ges. Virusforsch. **10**, 46 (1960).
- 16. *Hallauer und Kronauer*: Arch. ges. Virusforsch. **10** (im Druck).
- 17. *Koprowski und Lennette*: J. exp. Med. **84**, 181 (1946).
- 18. *Koprowski und Lennette*: J. exp. Med. **84**, 205 (1946).
- 19. *Krontowski, Jazimirska und Sawitza*: C. R. Soc. Biol. (Paris) **114**, 424 (1933).
- 20. *Levaditi*: Rev. Immunol. (Paris) **4**, 481 (1938).
- 21. *Moses, Brandly, Jones und Jungherr*: Amer. J. vet. Res. **9**, 314 und 399 (1948).
- 22. *Rivers und Ward*: J. exp. Med. **58**, 635 (1933).
- 23. *Striegler und Nagel*: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **134**, 71 (1935).
- 24. *Theiler*: Yellow Fever., hrsg. von Strode, 1951.

#### **Diskussion:**

*J.-L. Nicod* (Lausanne): Sait-on pourquoi les lésions virales sont si différentes les unes des autres (nécroses, tumeurs, granulomes, etc.) alors que le mécanisme de la pénétration du virus dans la cellule de l'hôte est si souvent le même? Est-ce que cela dépend de la composition chimique de l'enveloppe protéique que le virus abandonne au moment où il pénètre dans la cellule qu'il infecte?

*C. Hallauer*: Die unterschiedliche Reaktivität der Wirtszelle auf die Virusinfektion ist vom Permeierungsmodus sicher nicht abhängig, sondern wird durch die Art des jeweiligen Virus bestimmt.