

Die „Marburg-Virus“-Hepatitis im Tierexperiment

Versuche an Meerschweinchen

G. KORB, W. SLENCZKA, H. BECHTELSHEIMER und P. GEDIGK

Pathologisches Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. W. Hort), Hygiene-
Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. R. Siegert) und Pathologisches
Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. P. Gedigk)

Eingegangen am 15. März 1971

Animal Experiments on the “Marburg-Virus”-Hepatitis

Studies on Guinea Pigs

Summary. After inoculation with the “Marburg-Virus” guinea pigs developed a hepatitis after an incubation period of 2 to 8 days. The most striking histological changes were necroses of single hepatic cells or focal necroses, balloon-cells, cellular lysis, fatty degeneration, infiltrates of mononuclear cells in portal spaces and distinct proliferation of von Kupffer cells. The necroses revealed no special pattern of distribution. In addition, extracellular basophilic bodies were seen in portal spaces and sinusoids. Very occasionally basophilic or eosinophilic inclusions were found in liver cells. The regenerative capacity of liver cells was not affected. Restitutio ad integrum was noted in some cases as early as three weeks later, whereas in other animals infiltrates in portal spaces and accumulations of von Kupffer cells were still present 2 to 5 months after the disease had terminated clinically. On higher passages, the incubation period of the disease was shortened, the causative agent greatly increased and the hepatitis developed more rapidly. Simultaneously liver necroses became more conspicuous whereas mesenchymal reactions seemed to be reduced. In many of the animals basophilic structures with positive PAS and v. Kossa reactions were found in varying numbers of liver cells and in some von Kupffer cells. The possibility that these basophilic structures are related to intracellular aggregations of the infectious agent is discussed.

Zusammenfassung. Durch eine Infektion mit dem „Marburg-Virus“ entwickelt sich beim Meerschweinchen nach einer Inkubationszeit von 2—8 Tagen mit einem Mittelwert um den 5. Tag innerhalb kurzer Zeit eine Hepatitis. Sie ist im wesentlichen durch disseminiert angeordnete Einzelzellnekrosen, seltener vorkommende Gruppennnekrosen, ballonierte Leberzellen und lytische Nekrosen, eine im Ausmaß wechselnde Verfettung der Leberzellen, eine nur geringe Infiltration der portalen Felder mit lymphoiden bzw. monocytoiden Elementen sowie eine Aktivierung und erhebliche Proliferationstendenz der Sternzellen gekennzeichnet. Zusätzlich finden sich vornehmlich extracellulär gelegene basophile Körperchen sowie selten basophile oder eosinophile Cytoplasmainschlüsse in Leberzellen. Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist nicht beeinträchtigt. Bereits 3 Wochen nach Beginn der Erkrankung kann eine restitutio ad integrum vorliegen; unter Umständen sind aber auch noch nach mehreren Monaten lockere portale Infiltrate und Sternzellknötchen als Restzustände der Hepatitis vorhanden. Übergänge in eine chronische Hepatitis oder eine Cirrhose kommen nicht vor. Die Befunde zeigen eine bis in Einzelheiten reichende Übereinstimmung mit Veränderungen in der menschlichen Leber.

Bei höheren Passagen verkürzt sich die Inkubationszeit; eine voll entwickelte Hepatitis kann bereits am 5. Erkrankungstag vorliegen. Das Ausmaß der Lebernekrosen nimmt zu; die mesenchymale Reaktion ist dagegen eher geringer. Außerdem treten häufig in Leberzellen, seltener auch in Sternzellen eigentümliche basophile Strukturen mit einer positiven PAS- und von Kossa-Reaktion auf, die möglicherweise mit intracellulären Ansammlungen des infektiösen Agens übereinstimmen.

Bei allen Patienten, die 1967 in Marburg, Frankfurt und Belgrad an der „Marburg-Virus“-Infektion (Siegert, 1970; Martini u. Siegert, 1971) erkrankten, ergaben sich neben anderen Befunden übereinstimmend Hinweise für einen Leberschaden mit einem z.T. extrem hohen Anstieg der SGOT, einem wesentlichen geringeren Anstieg der SGPT sowie keiner oder nur unwesentlicher Erhöhung des Serumbilirubins und der alkalischen Serumphosphatase (Gedigk, Bechtelsheimer u. Korb, 1968; Martini u. Mitarb., 1968; Stille u. Mitarb., 1968). Histologische Untersuchungen ergaben eine durch eine Reihe von Besonderheiten gekennzeichnete Hepatitis (Bechtelsheimer, Korb u. Gedigk, 1970).

Nachdem es frühzeitig gelang, die Infektion auf Meerschweinchen zu übertragen (Siegert u. Mitarb., 1967; Smith u. Mitarb., 1967), wurden in der Zwischenzeit zahlreiche Tierversuche unternommen, um das Wissen über die „Marburg-Virus“-Hepatitis zu ergänzen. Über die dabei erhobenen Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangten die Lebern von 103 infizierten Meerschweinchen¹.

Die *Hauptserie* umfaßt 89 Tiere, die vornehmlich intraperitoneal infiziert wurden. Dabei erhielt eine erste Gruppe von Meerschweinchen das infektiöse Agens aus heterologen Wirtssystemen, nämlich entweder virämisches Patientenblut bzw. Blutplasma oder ein Homogenat von infizierten Zellkulturen (Slenczka, 1969). Bei dieser Gruppe handelt es sich um die 1. Meerschweinchen-Passage des Virus. Von Meerschweinchen der 1. Passage wurde während der Fieberphase Blut steril durch Herzpunktion gewonnen und weiteren Tieren intraperitoneal, vereinzelt auch intrakardial und intracerebral injiziert. Durch weitere Übertragungen wurden Versuche bis zur 26. Passage vorgenommen (weitere technische Angaben s. auch Siegert, Shu und Slenczka, 1968; sowie Siegert, 1970).

In einer *Nebenserie* wurde bei 14 Meerschweinchen der Versuch unternommen, durch eine Behandlung mit Cyclophosphamid (Endoxan) oder Heparin die Veränderungen in der Leber zu beeinflussen.

Für die histologischen Untersuchungen wurden jeweils von allen in gepuffertem 5%igen Formalin fixierten Leberlappen in üblicher Weise Paraffinschnitte hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin sowie der Trichrom-Methode nach Goldner gefärbt. Daneben wurden die Versilberung nach Gordon und Sweet, die PAS-Reaktion und die von Kossa-Reaktion durchgeführt.

Untersuchungsergebnisse

A. Hauptserie

Bei den Untersuchungen zeigte es sich, daß bei den ersten 3 Passagen die Tiere nach einer Inkubationszeit zwischen 2 und 8 Tagen, in der Mehrzahl nach 5 Tagen, mit einem steilen Temperaturanstieg auf Werte bis 41° C (rectal) erkrankten und nach weiteren 4—7 Tagen wieder entfieberten. Mehrfach kam es unmittelbar danach zu einem erneuten kurzfristigen Fieberanstieg. In der Regel trat bei Versuchen mit der 1. Passage kein Spontantod ein. Bei höheren Passagen verkürzte sich die Inkubationszeit auf weniger als 24 Std. Gleichzeitig kam es zu einer Letalität von 100%. Orientierende Bestimmungen der SGOT ergaben während der Fieberphase bei Tieren der 2. Passage Werte zwischen 42 und 690 E/l, der 7. Passage zwischen 317 und 956 E/l sowie bei der 15. und 19. Passage Werte bis 1380 E/l.

¹ Für unermüdliche technische Unterstützung sei an dieser Stelle Frau Wolff, med.-techn. Assistentin am Hygiene-Institut, und Frau Zucchi, med.-techn. Assistentin am Pathologischen Institut der Universität Marburg herzlich gedankt.

Histologische Befunde

1.—3. *Passage*

a) *Versuchsdauer 6—14 Tage; Erkrankungsdauer 1—8 Tage (29 Tiere)*. Erste Veränderungen fanden sich zwischen dem 2. und 3. Erkrankungstag; ihr Ausmaß nahm in den folgenden Tagen schnell zu, um etwa am 7. Tag der Erkrankung einen gewissen Höhepunkt zu erreichen. In der Frühphase fiel *an größeren und mittleren portalen Feldern* lediglich eine ödematöse Auflockerung und eine Weitstellung der Lymphgefäße auf. Kleine portale Felder enthielten vereinzelt lockere, aus lymphoiden bzw. monocytoiden Elementen bestehende Infiltrate (Abb. 1). Später nahm das Ausmaß der Infiltrate zu und erstreckte sich auch auf größere portale Felder. Gleichzeitig traten kleine extracellulär gelegene basophile Körperchen mit einem Durchmesser zwischen 1 und 3μ auf. Sie zeigten eine negative PAS- und von Kossa-Reaktion. An Gallengangsepithelien waren mehrfach regressive Veränderungen meistens in Form unregelmäßiger Cytoplasmavacuolen zu erkennen. In den *Leberläppchen* fanden sich am 2. und 3. Fiebertag zunächst verhältnismäßig wenige, später zahlreiche disseminiert angeordnete Einzelzellnekrosen von Leberzellen (Abb. 2), die offensichtlich mit einer auf umschriebene Abschnitte beschränkte Cytoplasmaverklumpung eingeleitet werden konnten. Voll entwickelte Einzelzellnekrosen waren durch eine Abrundung, eine homogene eosinophile Cytoplasmabeschaffenheit und Kernpyknosen oder fehlende Kerne gekennzeichnet. Nicht selten lagen abgerundete Einzelzellnekrosen in den Sinusoiden; sie ähnelten dann sog. Councilman-Körperchen. Daneben konnte ein Zerfall von nekrotischen Leberzellen in unregelmäßige Bruchstücke eintreten. Die übrigen Leberzellen wiesen eine von Tier zu Tier unterschiedlich stark ausgeprägte Verfettung, eine Glykogenabnahme sowie häufig ein Kernödem auf. Besonders im Kontakt zu zerfallenden Leberzellen war es bereits zu geringen Sternzellwucherungen gekommen. Andere Sternzellen wiesen als Ausdruck einer Aktivierung eine Zunahme des Umfanges und eine Kernhyperchromasie auf. Häufig stellten sich in den Sinusoiden, seltener auch im Cytoplasma von Sternzellen, kleine basophile Körper dar. Dabei hatte man den Eindruck, daß es sich um Kerntrümmer, möglicherweise von polymorphkernigen Leukocyten, handelt (Abb. 3), zumal in den Sinusoiden gerade in der Frühphase nicht selten auch intakt erscheinende Leukocyten vorkamen. Zusätzlich sah man in den Ästen der Pfortader und der Lebervenen zahlreiche unregelmäßige, große mononucleäre Zellelemente. Später, d.h. frühestens am 4. Tag der Erkrankung, traten neben den jetzt in größerer Zahl vorhandenen Einzelzellnekrosen auch Gruppennekrosen von Leberzellen auf (Abb. 4). Öfter waren im Bereich der Gruppennekrosen die regressiven Veränderungen in zentralen Abschnitten weiter fortgeschritten als in der Peripherie, was auf eine mehrzeitige Entstehung hinweist. Ferner fand sich ein weiterer Typ der Leberzellschädigung, der ebenfalls in einzelnen Zellen und Zellgruppen zu beobachten war. Dabei kam es zu einer deutlichen Volumenzunahme der Leberzellen, zu einer Aufhellung bzw. verminderten Anfärbbarkeit und feingranulären Strukturierung des Cytoplasmas sowie zu einem Kernödem mit und ohne Kernwandhyperchromasie, seltener auch zur Ausbildung von Kernpyknosen. Bei gleichzeitigem Schwund der granulären Cytoplasmastuktur konnte eine Auflösung dieser Leberzellen eintreten (Abb. 5).

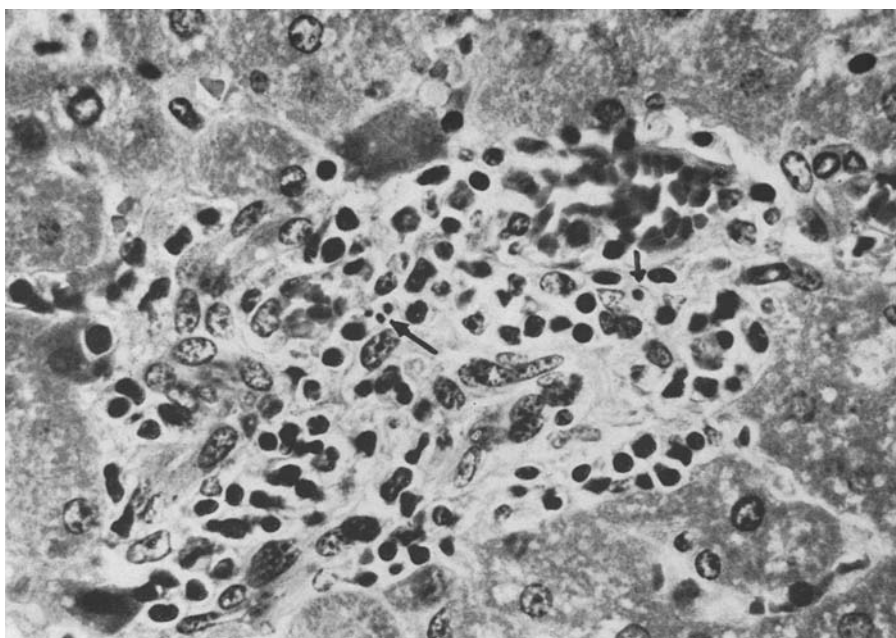


Abb. 1. Lockere Ansammlungen lymphoider bzw. monocytoider Elemente in einem portalen Feld. Vereinzelte extracelluläre basophile Körperchen (↗). Einige Einzelzellnekrosen von Leberzellen im periportalen Raum. Me 95; 3. Passage, 7. Tag der Infektion, 2. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 560×

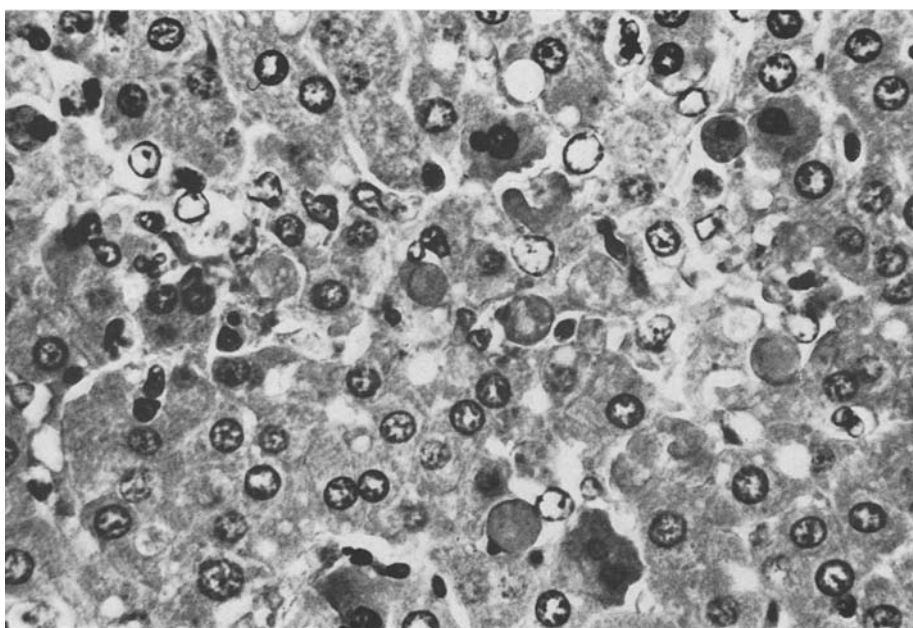


Abb. 2. Multiple Einzelzellnekrosen von Leberzellen. Me 129; 1. Passage, 13. Tag der Infektion, 8. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 560×

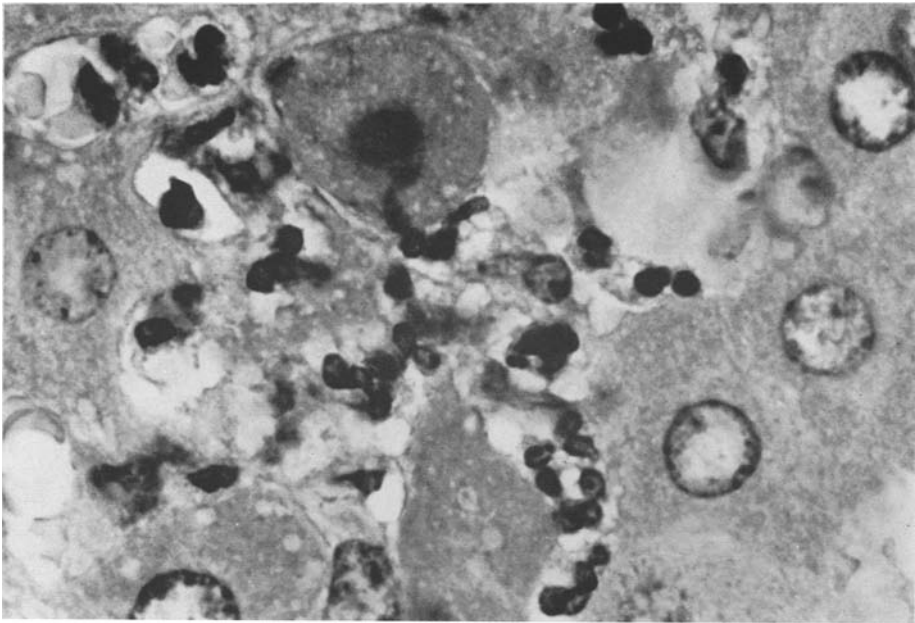


Abb. 3. Intrasinusoidal gelegene basophile Körperchen. Me 17; 1. Passage, 8. Tag der Infektion, 4. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 1400 \times

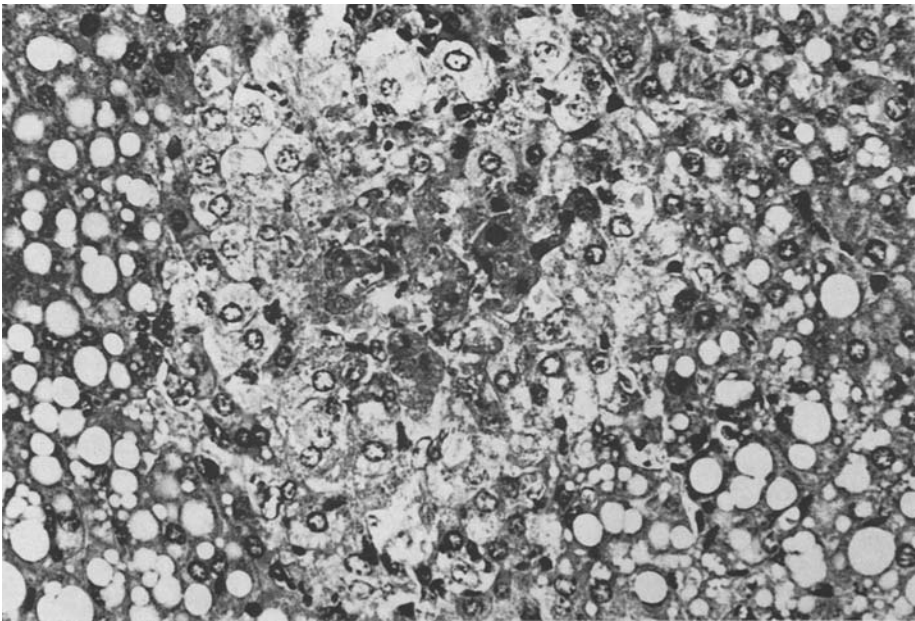


Abb. 4. Frische Gruppennekrose von Leberzellen; zentral und peripher unterschiedlich beschaffen. Deutliche Verfettung der übrigen Leberzellen. Me 1; 1. Passage, 12. Tag der Infektion, 5. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 350 \times

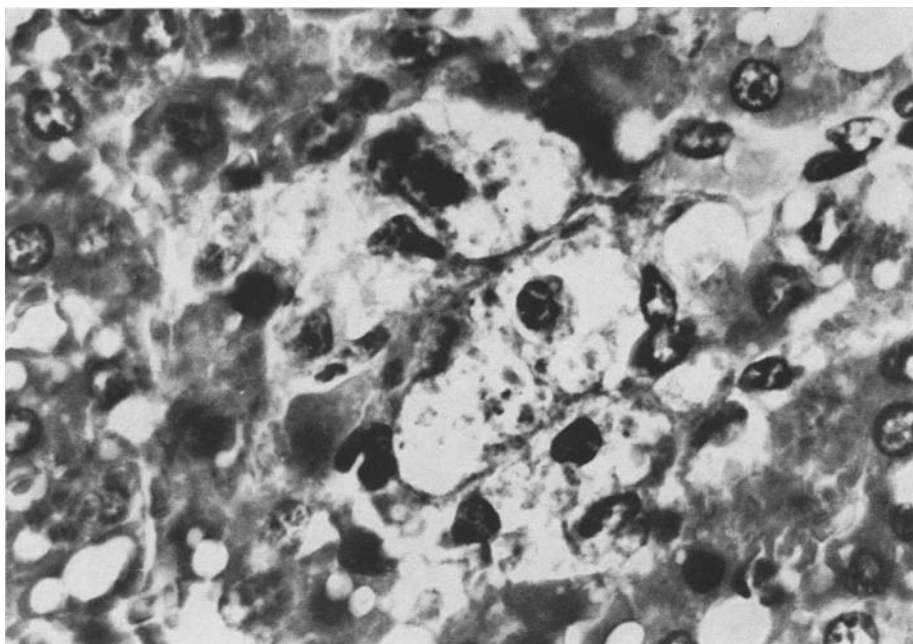


Abb. 5. Ballionierte, z.T. in Auflösung begriffene Leberzellen. Me 101; 3. Passage, 14. Tag der Infektion, 6. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 875 \times

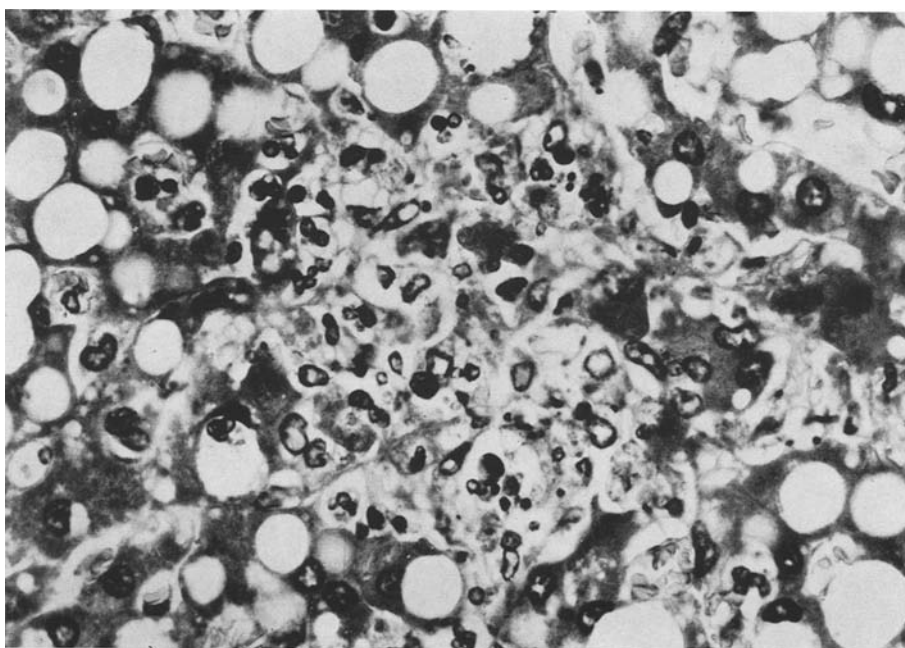


Abb. 6. Herdförmige Sternzellwucherung. Me 131; 1. Passage, 11. Tag der Infektion, 7. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 560 \times

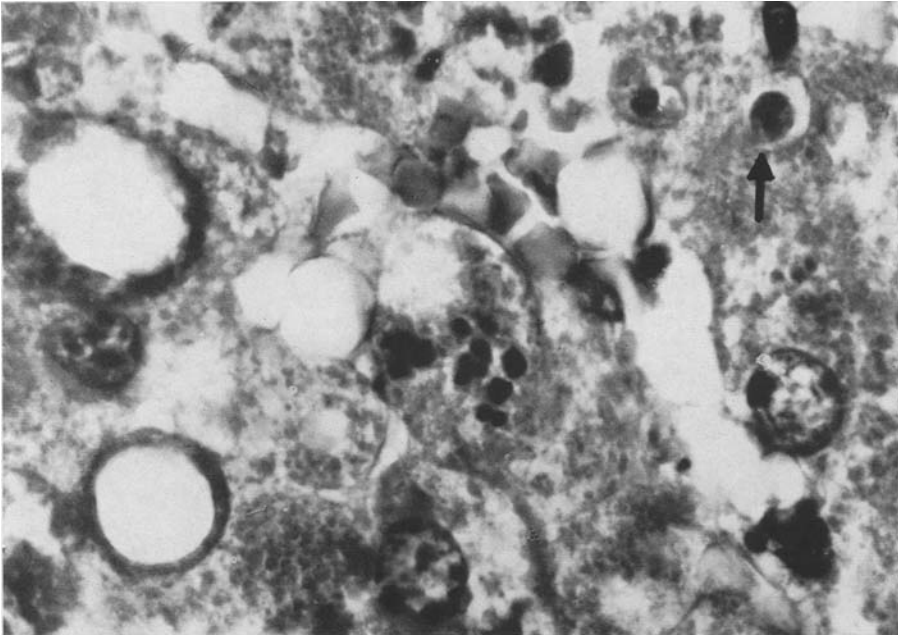


Abb. 7. Intracelluläre basophile Körperchen (Bildmitte) und eosinophiler Cytoplasmainschluß mit Hofbildung (↗). Me 123; 3. Passage, 6. Tag der Infektion, 4. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 1400×

Diese Form der Leberzellschädigung entspricht weitgehend einer sog. Ballonierung mit anschließender lytischer Nekrose (Popper u. Schaffner, 1961; Bianchi, 1967; Scheuer, 1968; Thaler, 1969). Häufig sah man — oft betont in der Umgebung von Nekrosen — Leberzellmitosen. Die Verfettung der sonst nicht geschädigten Leberzellen hatte zugenommen, so daß in der Regel eine teils herdförmige, teils diffuse, meist mittel- bis grobtropfige Verfettung vorlag. Während die portalen Felder weiterhin in der Mehrzahl nur lockere Infiltrate zeigten, bestand besonders im Kontakt zu Nekrosen eine ausgeprägte Sternzellproliferation (Abb. 6). In einigen Leberzellen stellten sich kleine basophile Körperchen mit negativer PAS- und von Kossa-Reaktion dar, in anderen waren hin und wieder kleine eosinophile Cytoplasmainschlüsse mit heller Hofbildung zu erkennen (Abb. 7). In keinem Fall ergaben sich Hinweise für eine Cholestase. Mit der Versilberung waren keine Defekte der Sinusoidstruktur zu erfassen.

b) *Versuchsdauer 23—43 Tage; Erkrankungsdauer 3—9 Tage (7 Tiere).* Bei 3 Tieren konnten in der Leber lichtmikroskopisch keine Veränderungen nachgewiesen werden. Bei 3 weiteren Meerschweinchen fanden sich extrem selten hyaline Einzelzellnekrosen von Leberzellen (Abb. 8) sowie herdförmig gewucherte Sternzellen. Zweimal bestand zusätzlich eine lockere rundzellige Infiltration der portalen Felder sowie eine herdförmige fein- bis mittelropfige Verfettung. Bei einem Tier waren mehrfach z.T. bis in die Nähe von Zentralvenen reichende Fibrosierungszonen (Abb. 9) entstanden.

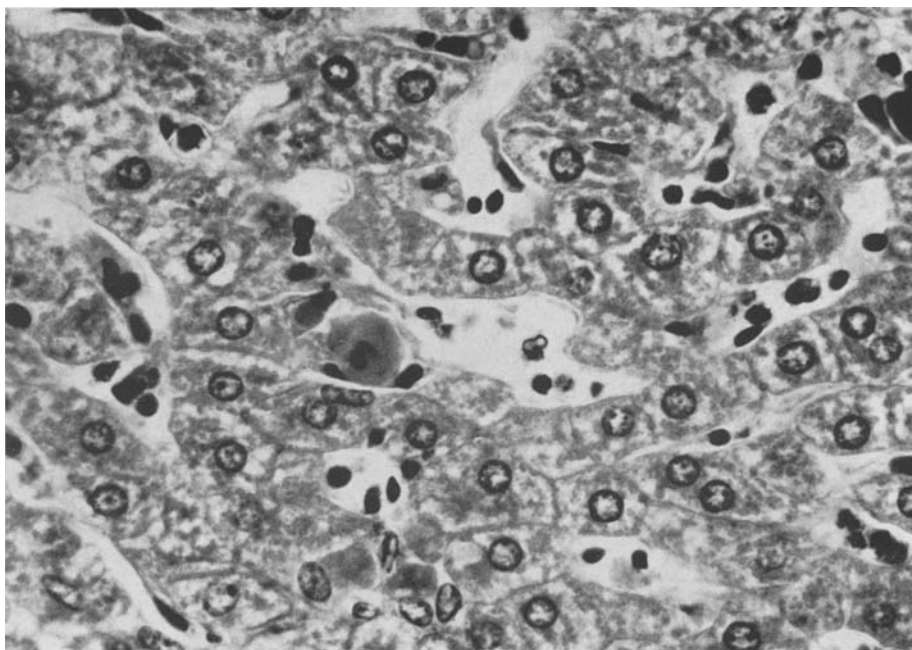


Abb. 8. Hyaline Einzelzellnekrose und leicht aktivierte Sternzellen. Me 69; 1. Passage, 23. Tag nach der Infektion. H. E., Vergr.: 560 \times

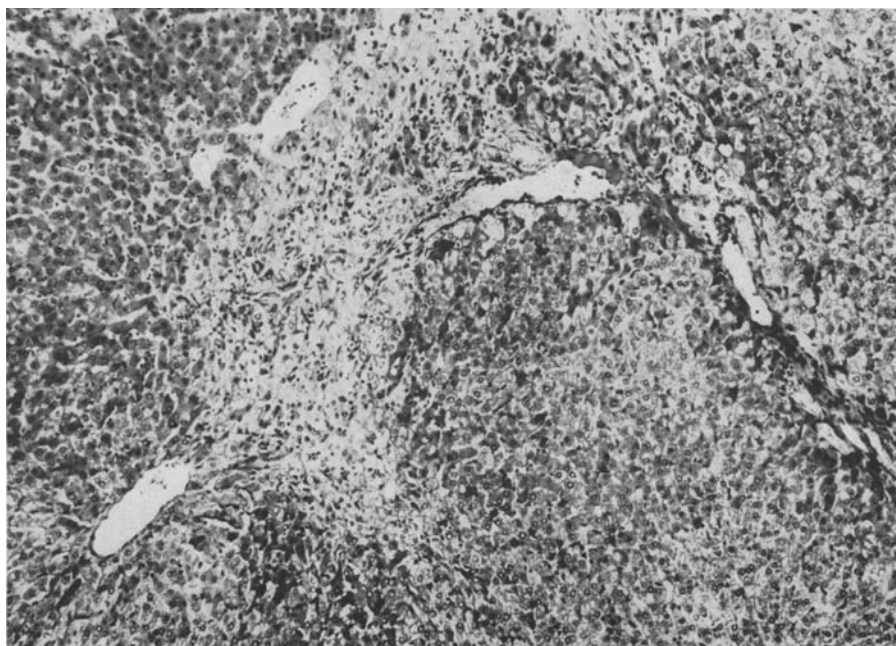


Abb. 9. Größere, von einem portalen Feld bis zu einer Zentralvene reichende Fibrosierungszone. Me 232; 1. Passage, 39. Tag nach der Infektion. H. E., Vergr.: 87 \times

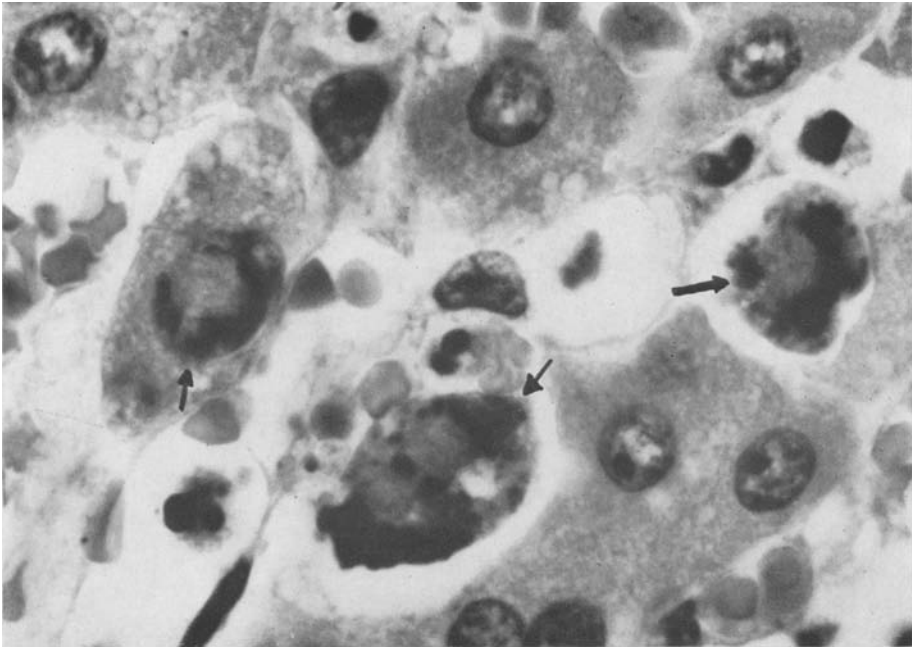


Abb. 10. Zum Teil perinucleär betont angeordnete „basophile Strukturen“ in Leber- und Sternzellen (↗). Me 81; 4. Passage, 8. Tag der Infektion, 7.—8. Tag der Erkrankung. H. E., Vergr.: 1400×

c) *Versuchsdauer 70—139 Tage; Erkrankungsdauer 2—7 Tage (7 Tiere)* Die Lebern von 3 Tieren wiesen keine Veränderungen auf. Viermal waren lockere Rundzellinfiltrate in den portalen Feldern und einigen Sternzellknötchen zu erkennen.

4. Passage

Versuchsdauer 8—10 Tage; Erkrankungsdauer 7—9 Tage (4 Tiere) Neben den geschilderten Veränderungen stellten sich bei einem Tier in zahlreichen Leberzellen, seltener auch in Sternzellen, oft perinucleär betont unterschiedlich dicht angeordnete basophile Granula mit einem Durchmesser unter 1μ dar. Andere Leberzellen enthielten gleichartige schollige Strukturen oder eine entsprechende Beschaffenheit des gesamten Cytoplasmaleibes (Abb. 10). Selbst bei stärkster Vergrößerung ließ sich bei den scholligen bzw. diffusen Cytoplasmaveränderungen nicht entscheiden, ob sie durch besonders dicht gelagerte Granula oder durch einen Zusammenfluß der Granula hervorgerufen werden. Unabhängig von der Form zeigten die basophilen Strukturen eine stark positive PAS-Reaktion sowie eine wechselnd stark positive von Kossa-Reaktion (Abb. 11). Weiterhin fielen den Sinusoidwänden angelagerte kleine Zellen mit peripheren Kernen und einer eigenartigen transparent-hyalinen Cytoplasmabeschaffenheit auf.

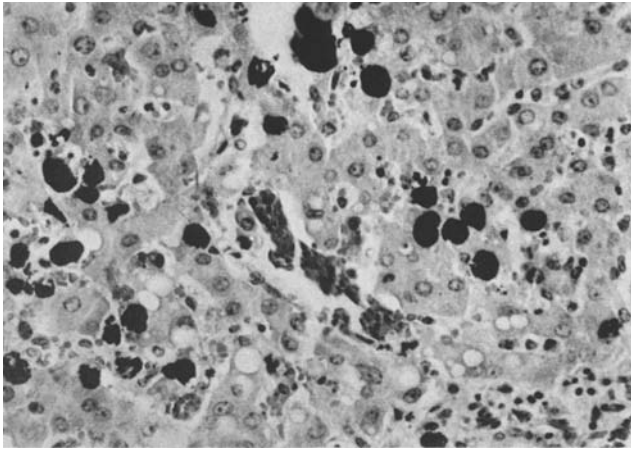


Abb. 11. „Basophile Strukturen“ mit positiver von Kossa-Reaktion. Me 248; 11. Passage, 5. Tag der Infektion, 4.—5. Tag der Erkrankung. Vergr.: 250×

5.—9. Passage

Versuchsdauer 4—8 Tage; Erkrankungsdauer 3—5 Tage (4 Tiere). Entsprechend der verkürzten Inkubationszeit lagen bei diesen Tieren 4 Tage nach der Infektion (3. Erkrankungstag) bereits typische Frühveränderungen und am 5. Tag der Infektion (4. Erkrankungstag) nahezu das Vollbild der Hepatitis vor. Ein Tier zeigte in der Leber die erstmals bei der 4. Passage aufgetretenen basophilen Strukturen.

10. Passage

Versuchsdauer 1—6 Tage; Erkrankungsdauer 1—5 Tage (6 Tiere) Bei einem Tier, das 24 Std nach der Infektion bei bereits deutlichem Temperaturanstieg getötet worden war, konnten in der Leber keine eindeutigen Veränderungen festgestellt werden. Bei zwei 48 bzw. 72 Std nach dem Temperaturanstieg getöteten Tieren fanden sich bereits disseminierte, unterschiedlich alte Einzelzellnekrosen, einige Gruppennekrosen sowie eine spärliche herdförmige Verfettung. Portale Infiltrate, Sternzellproliferationen, ballonisierte Leberzellen oder lytische Nekrosen waren dagegen nicht zu erkennen. Bei zwei jeweils am 5. Tag nach dem Temperaturanstieg gestorbenen Tieren hatte sich — allerdings nur mit geringer herdförmiger Verfettung und nicht sehr ausgeprägter mesenchymaler Reaktion — das Vollbild der Hepatitis entwickelt.

11.—26. Passage

Versuchsdauer 2—7 Tage; Erkrankungsdauer 1—6 Tage (32 Tiere). Bei einem Tier mit einer Erkrankungsdauer unter 2 Tagen wies die Leber keine Veränderungen auf. Dagegen waren am 3. Erkrankungstag bereits zahlreiche Einzelzellnekrosen, einige Gruppennekrosen sowie eine unterschiedlich ausgeprägte Verfettung entstanden. In den nächsten 24 Std nahm das Ausmaß der Schädigung weiter zu. Außerdem traten ballonisierte Leberzellen und lytische Nekrosen auf.

Bei insgesamt 11 Tieren konnten die bei der 4. Passage beschriebenen basophilen Strukturen nachgewiesen werden. Die portalen Felder zeigten in der Regel nur auffallend lockere Infiltrate. Bei 6 Tieren sah man im Kontakt zu portalen Feldern neugebildete trabekuläre Strukturen, deren Zellen an Gallengangsepithelien erinnerten. Die Aktivierung und Proliferation der Sternzellen war im Vergleich zum Ausmaß der Nekrosen gering.

B. Nebenserie

Versuche mit Endoxan®

a) 15. Passage. 5 bzw. 6mal 10 mg Endoxan/kg Körpergewicht i.p. im Abstand von 24 Std. Infektion jeweils am 2. Behandlungstag. Infektionsdauer: 4, 5 und 6 Tage (jeweils 2 Tiere).

b) 25. Passage. 11mal 15 mg Endoxan/kg Körpergewicht i.p. im Abstand von 24 Std. Infektion jeweils am 9. Behandlungstag. Infektionsdauer: 3 Tage (1 Tier) und 4 Tage (2 Tiere).

Ebenso wie bei den infizierten, jedoch nicht behandelten Tieren standen in der Leber disseminierte Einzelzellnekrosen, Gruppennekrosen, ballonierte Leberzellen und lytische Nekrosen sowie eine fein- bis mitteltropfige Verfettung der Leberzellen ganz im Vordergrund. Mit nur einer Ausnahme fanden sich Leberzellen mit PAS- und von Kossa-positiven granulären, scholligen oder homogenen Strukturen. Selten waren in portalen Feldern und intrasinusoidal basophile Körperchen vorhanden. Eine mesenchymale Reaktion war trotz der ausgedehnten Nekrosen entweder überhaupt nicht oder nur ungewöhnlich gering ausgebildet.

Versuche mit Heparin

a) 24. Passage. 250 I.E. jeweils im Abstand von 12 Std, am 3. Tag nach der Infektion beginnend. Gesamtdosis 4mal 250 I.E.; Infektionsdauer 5 Tage (2 Tiere).

b) 25. Passage. 250 I.E. jeweils im Abstand von 12 Std, 24 Std nach der Infektion beginnend. Gesamtdosis 4mal 250 I.E.; Infektionsdauer 3 Tage (1 Tier).

c) 25. Passage. 250 I.E. jeweils im Abstand von 24 Std, 24 Std nach der Infektion beginnend. Gesamtdosis 5mal 250 I.E.; Infektionsdauer 4 Tage (1 Tier).

Alle Tiere zeigten die für die gewählten Passagen und Versuchsdauer kennzeichnenden Veränderungen. Hinweise für einen therapeutischen Effekt, insbesondere hinsichtlich der Ausdehnung der Nekrosen, konnten nicht festgestellt werden.

Diskussion

Die Versuche ergaben, daß beim Meerschweinchen bei den ersten 3 Passagen die Inkubationszeit 2—8 Tage, im Mittel 5 Tage beträgt. Danach kommt es zu einem steilen Temperaturanstieg, der nach 4—7 Tagen wieder abfällt. In weitgehender Übereinstimmung damit konnte bei den in Marburg erkrankten Patienten eine Inkubationszeit von 5—7 Tagen ermittelt werden. In der Initialphase der Erkrankung wurde neben anderen Symptomen ebenfalls ein steiler Temperaturanstieg beobachtet (Martini u. Mitarb., 1968). Bei höheren Passagen verkürzte sich die Inkubationszeit auf teilweise weniger als 24 Std. Bei einer Letalität von 100% trat der Tod in der Regel 4—5 Tage nach dem Fieberanstieg ein. Simpson, Zlotnik und Rutter (1968) stellten bei Meerschweinchen für die

ersten Passagen eine Inkubationszeit zwischen 4 und 10 Tagen fest, die sich bis zur 8. Passage auf 2—3 Tage verkürzte. Diese Tiere starben 7—9 Tage nach der Infektion, d.h. am 5.—6. Erkrankungsstag. Bei Rhesus- und Cercopithecus-Affen fanden Haas, Maas und Oehlert (1968) eine Inkubationszeit von 2 Tagen; Simpson, Zlotnik und Rutter (1968) eine Inkubationszeit von 2—5 Tagen. Auch hier bestand am Anfang der Erkrankung ein steiler Temperaturanstieg. 6—9 Tage später kam es bei allen Tieren zum Exitus.

*Histologischer Ablauf der „Marburg-Virus“-Hepatitis beim Meerschweinchen
in den ersten 3 Passagen*

Erste Veränderungen treten frühestens nach dem 2. Tag der Erkrankung auf. Dabei zeigen die portalen Felder entweder eine Weitstellung der Lymphgefäße oder lockere, aus lymphoiden bzw. monocytoiden Elementen bestehende Infiltrate, deren Ausmaß später zunimmt. Bereits in der Initialphase sind in den Läppchen disseminiert angeordnete Einzelzellnekrosen von Leberzellen zu erkennen, die z.T. in Bruchstücke zerfallen oder die Gestalt von Councilman-Körperchen annehmen. Daneben liegt eine unterschiedlich stark ausgeprägte herdförmige oder diffuse Leberverfettung vor. Bereits frühzeitig tritt eine Aktivierung und Proliferation der Sternzellen ein. In größeren Blutgefäßen sind zahlreiche große mononucleäre Zellen vorhanden, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den regelmäßig im Patientenblut festgestellten pyroninophilen Blutzellen (Immunoblasten) bzw. lymphomonocytoiden Zellen (Martini u. Mitarb., 1968; Stille u. Mitarb., 1968) besitzen. Im weiteren Verlauf entstehen neben weiteren Einzelzellnekrosen auch Gruppennekrosen, ballonierte Leberzellen und lytische Nekrosen von Leberzellen. Zahlreiche, oft in der Umgebung von Nekrosen angeordnete Leberzellmitosen zeigen, daß die Regenerationsfähigkeit der Leber nicht wesentlich beeinträchtigt ist. Mit dem Ausmaß der Nekrosen nimmt die Proliferation der Sternzellen zu. Bemerkenswert sind in portalen Feldern und intrasinusoidal vorkommende, in der Regel extracellulär gelegene basophile Körperchen mit einem Durchmesser von 1—3 μ . Diesen Gebilden dürften, wie bereits an anderer Stelle diskutiert (Bechtelsheimer, Korb und Gedigk, 1970), Kerntrümmer als Folge einer Nucleoklasie zugrundeliegen. Bei den Tierversuchen besteht dabei der Eindruck, daß es sich um Kernteile zerfallender polymorphkerniger Leukocyten handeln könnte, was sich gut mit einer beim Menschen bereits am 1. Tag der Erkrankung stets nachweisbaren deutlichen Leukopenie (Martini u. Mitarb., 1968; Stille u. Mitarb., 1968) in Einklang bringen ließe. Weiterhin können in Leberzellen kleine basophile Körperchen vorliegen, die wir als Ausdruck eines gestörten Mitoseablaufes deuten möchten (Bechtelsheimer, Korb u. Gedigk, 1970). Sehr selten enthalten Leberzellen kleine eosinophile Einschlüsse mit heller Hofbildung. Über die Entstehung und Bedeutung sind bisher keine Aussagen möglich. Dies gilt auch für eigentümliche, in Sinusoiden vorkommende Zellen mit peripheren Kernen und hyalinem Zelleib. Sie sind bei den Tierexperimenten in großer Zahl auch in der Milz festzustellen. Zu keinem Zeitpunkt läßt sich eine Cholestase erfassen. Das Vollbild der durch die genannten Befunde gekennzeichneten Hepatitis liegt im Tierexperiment bei Versuchen mit den ersten 3 Passagen bereits zwischen dem 5. und 7. Tag der Erkrankung vor.

Danach tritt eine schnelle Rückbildung ein, so daß bei einem Teil der Versuchstiere bereits 3—4 Wochen nach Beginn der Erkrankung in der Leber keine wesentlichen Veränderungen mehr nachweisbar sind. Allerdings können Restzustände in Form rundzelliger portaler Infiltrate und Sternzellknötchen noch nach 2 bis 5 Monaten vorhanden sein. Die Leberstruktur wird durch die Hepatitis in der Regel nicht bleibend verändert. Nur bei einem einzigen Tier waren Narbenfelder entstanden. Für einen Übergang in eine chronische Hepatitis oder eine Cirrhose lagen keine Hinweise vor. Damit ergibt sich, daß beim Meerschweinchen nach einer Infektion mit dem „Marburg-Virus“ eine Hepatitis entsteht, die mit Befunden am Menschen weitgehend übereinstimmt. Hier wies das Verhalten der SGOT ebenfalls auf einen Höhepunkt im Ausmaß der Leberschädigung um den 7. Erkrankungstag hin (Martini u. Mitarb., 1968). Die an Verstorbenen und in Leberpunktaten festgestellten und bereits ausführlich erörterten morphologischen Veränderungen (Bechtelsheimer, Korb u. Gedigk, 1970) sind, abgesehen von Einzelheiten, identisch.

Unsere Befunde stehen weiterhin im Einklang mit Beobachtungen, die von anderen Untersuchern an Meerschweinchen (Simpson, Zlotnik u. Rutter, 1968; Zlotnik, 1969) an Hamstern (Zlotnik u. Simpson, 1969) sowie verschiedenen Affenarten (Simpson, Zlotnik u. Rutter, 1968) gemacht wurden. Abweichend davon fanden Haas, Maas und Oehlert (1968) bei Tierversuchen an Affen als wichtigsten Befund eine völlige Ausschaltung des RHS. Da jedoch ein Teil dieser Tiere gleichzeitig an einer Tuberkulose, andere an Malaria oder Parasitenbefall erkrankt waren, wäre es denkbar, daß hier die Ursache für das abweichende Verhalten der zum RHS zählenden Zellen in der Leber begründet ist.

Hinsichtlich der Pathogenese der beschriebenen Veränderungen in der Leber sind natürlich aus den morphologischen Momentbildern keine sicheren Schlüsse zu ziehen. Wir sind überzeugt, daß es sich bei der vorliegenden Hepatitis nicht um eine sekundäre toxische Hepatitis oder Begleit-Hepatitis, sondern vielmehr um die Folge eines direkten Virusbefalls der Leberzellen, also um eine Virus-Hepatitis handelt. Für diese Meinung sprechen nicht nur die in vielen Punkten vorhandene Ähnlichkeit mit anderen Formen einer viralen Hepatitis (Bechtelsheimer, Korb u. Gedigk, 1970), sondern insbesondere auch der Nachweis des Erregerantigens in Leberzellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (Shu, Siegert u. Slenczka, 1968; Slenczka u. Mitarb., 1968).

Überblickt man die vorliegenden Ergebnisse, so können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Sowohl beim Menschen als auch beim Meerschweinchen entsteht durch eine Infektion mit dem „Marburg-Virus“ nach einer Inkubationszeit von nur wenigen Tagen und einer Erkrankungsdauer von mindestens 2 Tagen eine Hepatitis, die spätestens um den 7. Tag der Erkrankung voll ausgebildet ist.

2. Klinisch ist die „Marburg-Virus“-Hepatitis durch einen z.T. extrem hohen Anstieg der SGOT, einen bemerkenswert geringen Anstieg der SGPT, eine in der Regel fehlende Erhöhung des Serumbilirubins und der alkalischen Serumphosphatase sowie eine regelrechte Bromsulphalein Elimination gekennzeichnet.

3. Histologisch stehen disseminiert angeordnete Einzelzellnekrosen, seltener vorkommende Gruppennekrosen, eine stets vorhandene, wenn auch unterschied-

lich ausgeprägte Leberzellverfettung sowie eine Aktivierung und oft ungewöhnlich starke Proliferation der Sternzellen im Vordergrund. Zusätzlich sind im Tierexperiment ballonierte Leberzellen und lytische Nekrosen nachweisbar. Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist nicht beeinträchtigt, so daß die Nekrosen schnell durch Regenerate ersetzt werden. Die portalen Felder sind oft nur gering mit lymphoiden bzw. monocytoiden Zellen infiltriert. Bemerkenswert sind in portalen Feldern und intrasinusoidal vorkommende basophile Körper, die auf eine erhebliche Nucleoklasie hinweisen. Weiterhin kommen in Leberzellen basophile Körperchen und eosinophile Einschlüsse vor.

4. Wird die Infektion überlebt, kann beim Menschen um den 35. Tag der Erkrankung ein Rezidiv der Leberschädigung auftreten (Martini u. Mitarb., 1968; Bechtelsheimer, Korb u. Gedigk, 1970). Weder beim Menschen noch im Tierversuch ergeben sich Hinweise für einen Übergang in eine chronische Hepatitis oder einen cirrhotischen Umbau.

Versuche mit hohen Tierpassagen

Zunächst fällt eine deutliche Verkürzung der Inkubationszeit auf, die in Verbindung mit immunfluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen für eine steigende Anreicherung des infektiösen Agens spricht (Siegert u. Mitarb., 1968; Siegert, 1970). Histologisch treten, genauso wie bei niedrigen Passagen, erste Veränderungen frühestens 48 Std nach Beginn der Erkrankung auf; bereits 2—3 Tage später kann das Vollbild der Hepatitis vorliegen. Während das Ausmaß der Leberzellnekrosen eher zunimmt, tritt die Verfettung etwas in den Hintergrund. Die portale Infiltration bleibt gering, ebenso die Reaktion der Sternzellen. Ob diese geringe Proliferationstendenz der Sternzellen, die im deutlichen Gegensatz zu den Befunden bei niedrigen Passagen steht, auf eine direkte oder indirekte Einwirkung des infektiösen Agens zurückzuführen ist, oder lediglich ein zeitlicher Effekt im Sinne einer verzögerten Reaktion vorliegt, muß offenbleiben, da die Tiere jenseits der 4. Passage spätestens am 6. Erkrankungstag spontan starben.

Als Besonderheit treten — bei unseren Versuchen erstmals bei der 4. Passage und bei höheren Passagen zunehmend häufiger — vornehmlich in Leberzellen, mitunter jedoch auch in Sternzellen basophile Strukturen auf, die sich von den in portalen Feldern und intrasinusoidal gelegenen basophilen Körperchen deutlich unterscheiden. Es handelt sich um oft perinucleär betonte Ansammlungen feiner Granula mit einem Durchmesser unter $1\ \mu$, Schollen oder homogene Gebilde, die übereinstimmend eine positive PAS- und von Kossa-Reaktion zeigen. Entsprechende Veränderungen fanden Simpson, Zlotnik und Rutter (1968) sowie Zlotnik (1969) bei infizierten Meerschweinchen schon ab der 2. Passage, bei Goldhamstern nach der 8. und 9. Passage, nicht dagegen bei Affen. Die genannten Untersucher bezeichnen die basophilen Strukturen als VMD-bodies (Vervet-Monkey-Disease-bodies). Sie vermuten einen direkten Zusammenhang zu Ansammlungen des infektiösen Agens in dem Sinne, daß sich um dieses Material eine Gluco- bzw. Mucopolysaccharidhülle mit Ablagerung von Kalksalzen ausbildet. In der zur Verfügung stehenden Literatur fanden wir keine Hinweise für entsprechende Leberzellveränderungen bei anderen Erkrankungen.

Versuche mit Cyclophosphamid (Endoxan) und Heparin

Die Versuche mit Endoxan® wurden vorgenommen, da dieser Substanz neben dem bekannten cytostatischen Effekt auch eine immunsuppressive Wirkung zugeschrieben wird. Es zeigt sich, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die Endoxanbehandlung die Entstehung von Lebernekrosen in keiner Weise beeinflußt. Dagegen besteht der Eindruck, daß die schon an sich bei höheren Passagen geringe mesenchymale Reaktion weiter unterdrückt bzw. aufgehoben wird. Ohne diese Beobachtung an dieser Stelle weiter erörtern zu wollen, kann doch festgestellt werden, daß jedenfalls bei der „Marburg-Virus“-Hepatitis eine initiale mesenchymale Reaktion für das Zustandekommen der Leberzellnekrosen ohne Bedeutung ist.

Den Versuchen mit Heparin lagen klinische Beobachtungen zugrunde, die in Verbindung mit einem Thrombozytensturz auf eine Verbrauchskoagulopathie (Martini u. Mitarb., 1968; Stille u. Mitarb., 1968) und damit verknüpft auf die Möglichkeit disseminierter intravasaler Gerinnungsvorgänge hinwiesen. Da sich das morphologische Bild trotz der Heparinbehandlung in keiner Weise änderte, kann auch dieser Faktor als Ursache der Lebernekrosen ausgeschlossen werden.

Literatur

- Bechtelsheimer, H., Korb, G., Gedigk, P.: Die „Marburg-Virus“-Hepatitis. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **351**, 273—290 (1970).
- Bianchi, L.: Punktat-Morphologie und Differentialdiagnose der Hepatitis. Bern-Stuttgart: Huber 1968.
- Gedigk, P., Bechtelsheimer, H., Korb, G.: Die pathologische Anatomie der „Marburg-Virus“-Krankheit (sog. „Marburger Affenkrankheit“). *Dtsch. med. Wschr.* **93**, 590—601 (1968).
- Haas, R., Maas, G., Oehlert, W.: Untersuchungen zur Tierpathogenität eines von *Cercopithecus aethiops* übertragenen menschenpathogenen Erregers. *Med. Klin.* **63**, 1359—1363 (1968).
- Martini, G. A., Knauff, H. G., Schmidt, H. A., Mayer, G., Baltzer, G.: Über eine bisher unbekannte, von Affen eingeschleppte Infektionskrankheit: Marburg-Virus-Krankheit. *Dtsch. med. Wschr.* **93**, 559—571 (1968).
- Siegert, R.: Marburg virus disease. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971.
- Popper, H., Schaffner, F.: Die Leber. Stuttgart: G. Thieme 1961.
- Scheuer, P.: Liver biopsy interpretation. London: Baillière, Tindall & Cassell 1968.
- Shu, H. L., Siegert, R., Slenczka, W.: Zur Pathogenese und Epidemiologie der Marburg Virus Infektion. *Dtsch. med. Wschr.* **93**, 2163—2165 (1968).
- Siegert, R.: The Marburg Virus (Vervet monkey agent). *Modern trends in medical virology* (ed. Heath, R. B., Waterson, A. P.) 2, p. 204—240. London: Butterworths 1970.
- Shu, H. L., Slenczka, W., Peters, D., Müller, G.: Zur Ätiologie einer unbekannten, von Affen ausgegangenen Infektionskrankheit. *Dtsch. med. Wschr.* **92**, 2341—2343 (1967).
- — — Isolierung und Identifizierung des „Marburg-Virus“. *Dtsch. med. Wschr.* **93**, 604—616 (1968).
- — — Zur Diagnostik und Pathogenese der Infektion mit Marburg-Virus. *Dtsch. Ärztebl.* **65**, 1827—1830 (1968).
- Simpson, D. I. H.: Vervet monkey disease. Experimental infection of guinea pigs and monkeys with the causative agent. *Brit. J. exp. Path.* **49**, 458—464 (1968).
- Slenczka, W.: Growth of Marburg-virus in vero cells. *Lab. Anim. Handb.* **4**, 143—147 (1969).
- Shu, H. L.: Piepenburg, G., Siegert, R.: Antigen-Nachweis des „Marburg-Virus“ in den Organen infizierter Meerschweinchen durch Immunfluoreszenz. *Dtsch. med. Wschr.* **93**, 612—616 (1968).
- Smith, C. E. G., Simpson, D. I. H., Bowen, E. T. W., Zlotnik, I.: Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet* **1967II**, 1119—1121.

Stille, W., Böhle, E., Helm, E., Rey, W. van, Siede W.: Über eine durch *Cercopithecus aethiops* übertragene Infektionskrankheit (Grüne Meerkatzen Krankheit, Green monkey disease). Dtsch. med. Wschr. **93**, 572—582 (1968).

Thaler, H.: Leberbiopsie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969.

Zlotnik, I.: Marburg agent disease: Pathology. Trans roy. Soc. trop. Med. Hyg. **63**, 310—323 (1969).

— Simpson, D. I. H.: The pathology of experimental vervet monkey disease in hamsters. Brit. J. exp. Path. **50**, 393—399 (1969).

Prof. Dr. G. Korb
Pathologisches Institut der Universität
BRD-3550 Marburg a. d. Lahn
Robert-Koch-Str. 5

Prof. Dr. P. Gedigk
Priv. Doz. Dr. H. Bechtelsheimer
Pathologisches Institut der Universität
BRD-5300 Bonn 1
Postfach

Dr. W. Slenczka
Hygiene Institut der Universität
BRD-3550 Marburg a. d. Lahn
Pilgrimstein 2