

Aspekte der immunologischen Diagnostik von Hirntumoren

Ergebnisse mit tumorassoziierten Membranantigenen und dem Elektrophorese-Mobilitäts-Test

H. Meyer-Rienecker, H. L. Jenssen und H. Werner

Neurologische Abteilung der Nervenklinik (Direktor: Prof. Dr. J. Sayk) und
Forschungsabteilung Immunologie (Leiter: Prof. Dr. H. Friemel) am Institut für Physiologische
Chemie, Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, DDR

Aspects of Immunologic Diagnosis of Brain Tumors

Results With Tumor-Associated Membrane Antigens and the Electrophoretic Mobility Test

Summary. In cell-mediated immune processes the products of antigen-sensitive lymphocytes are detectable as charge-changing lymphokines by means of the cell electrophoretic mobility method (EM test). The improvement of the method concerns the measuring procedures (indicator particle and automation) and the application of specific antigens. The employment of special membrane antigens (3 M KCl extracts) from tissue of normal brain and brain tumors is decisive for further differentiating results. The application of tumor-associated membrane antigens (TAA) from various kinds of brain tumors shows some diagnostically important reaction patterns. Using a common tumor antigen, the TAA-X₃ mixture, a (1) characteristic result of general significance for neoplasms can be obtained; in applying the different TAA of brain tumors the findings in EM test point out an (2) organospecific reactivity and/or a (3) histogenetic reaction pattern. The distinct neuro-epithelial and mesodermal brain tumors produce predominantly an organospecific reaction and only partly a histogenetical profile. For this type of reactivity to the TAA in brain tumors, a series of factors depending on neuro-immunological specialities are important.

Key words: Brain tumors – Tumor immunity – Tumor-associated antigens – Electrophoretic mobility test – Lymphokine in vitro.

Sonderdruckanforderungen an: Prof. Dr. H. Meyer-Rienecker, Arbeitsgruppe Neuroimmunologie, Nervenklinik der Wilhelm-Pieck-Universität, DDR-25 Rostock 9, Deutsche Demokratische Republik

Zusammenfassung. Bei zellgebundenen Immunvorgängen können die Produkte antigensensitiver Lymphozyten als ladungsverändernde Lymphokine mit der Zell-Elektrophorese-Mobilitäts-Methode (EM-Test) bestimmt werden. Die gegenwärtigen Fortschritte des Verfahrens betreffen den Meßvorgang (Indikatorpartikel und Automatisierung) und den Einsatz spezifischer Antigene. Die Anwendung spezieller Membranantigene (3 M-KCl-Extrakte) aus Normal- und Tumorgewebe bei neurologischen Erkrankungen ist entscheidend für weiter differenzierende Resultate. So zeigt die Verwendung tumorassozierter Membranantigene (TAA) aus den unterschiedlichen Hirntumortypen einige diagnostisch bedeutsame Reaktionstypen: mit einem allgemeinen Tumorantigen, dem TAA-X₃-Gemisch, ergibt sich ein (1.) allgemein-tumorcharakteristischer Befund; unter Nutzung der differenten TAA der einzelnen Geschwulstarten ist eine (2.) organspezifische Reaktivität und/oder ein (3.) histogenetisches Reaktionsmuster im EM-Test nachweisbar. Bei den verschiedenen neuroepithelialen und mesodermalen Hirngeschwülsten besteht vorwiegend eine organspezifische Reaktion und nur partiell ein histogenetisches Profil. Für diese Ergebnisse der Reaktivität gegenüber den TAA bei den Hirntumoren sind eine Reihe von Faktoren, auch bedingt durch neuroimmunologische Besonderheiten, von Bedeutung.

Schlüsselwörter: Hirntumoren – Tumorimmunologie – Tumorassoziierte Antigene – Elektrophorese-Mobilitäts-Test – Lymphokine in vitro.

Einleitung

Wesentliche Fortschritte bei der Diagnostik von Tumoren im Zentralnervensystem erbrachten zum einen neuroradiologische Verfahren, und hierbei speziell die axiale Computer-Tomographie [1], z. B. in Form des EMI-Scanning. Zum anderen führten die beim Geschwulstwachstum ablaufenden Immunreaktionen, vor allem die zellgebundene Immunität [12, 33], zu neuen Aspekten bei der Diagnostik und Verlaufskontrolle sowie hinsichtlich möglicher therapeutischer Ansatzpunkte. Dabei stehen die Reaktivität der sensibilisierten Lymphocyten gegenüber den tumorassoziierten Antigenen [4, 17] und die Spezifität der Nachweismethoden [12] im Vordergrund der Problematik.

Eines der hinreichend empfindlichen *Verfahren* zur Ermittlung einer cellulären Immunität bei Malignomen ist der Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EM-Test), von Field und Caspary [8] im Jahre 1970 als Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test (MEM-Test) entwickelt. Unter Verwendung von basischem Myelinprotein (BP) oder basischem Protein aus Tumorgewebe (cancer basic protein — CaBP) als Antigen für die sensibilisierten Lymphocyten [2, 5] wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bei den Geschwülsten eine positive Reaktivität festgestellt [6, 9, 13, 19, 23, 27, 30]. Mit diesem Testsystem ergab sich auch für einige andere neurologische und entzündliche Erkrankungen eine Mobilitäts-hemmung [10, 20, 21], so daß für die Tumordiagnostik — außer der notwendigen Vereinfachung des Verfahrens — der Einsatz weiterer, möglichst spezifischer Antigene erforderlich ist.

Die hieraus resultierende *Entwicklung* in den letzten Jahren zielte auf die (a) methodische Vereinfachung der EM-Technik bezüglich der Indikatorpartikel [15, 26] und des Meßvorganges [13, 24] bis hin zur objektiven und automatischen Erfassung der elektrophoretischen Beweglichkeit (Schütt u. Mitarb., in Vorbereitung). Ferner gelang es, durch die (b) Anwendung tumorassozierter Zellmembranantigene (TAA) eine weitere Spezifität in der Ermittlung einer antigenen Reaktivität [14, 23, 28] zu erreichen. Inwiefern das EM-Test-Verfahren unter Benutzung organ- bzw. gewebespezifischer TAA auf weitere Tumorarten anwendbar ist, soll im folgenden für die primären und sekundären Hirngeschwülste untersucht werden.

Methodik

Prinzip der Bestimmungsmethode. Spezifisch gegenüber einem Antigen sensibilisierte Lymphocyten setzen nach der in-vitro-Inkubation mit dem adäquaten antigenen Stimulus lymphokine Faktoren frei, die als Mediatoren der cellulären Immunität gelten. Derartige Lymphokine beeinflussen als ladungsverändernde Produkte der antigensensitiven Lymphocyten (L PAL) die Mobilität von Indikatorzellen im elektrischen Feld; sie werden aufgrund ihrer Hemmwirkung auf das Indikatorsystem als „slowing factor“ (macrophage slowing factor — MSF) bezeichnet [9].

Lymphocyten-Präparation. Die Isolierung der peripheren Lymphocyten erfolgte aus 25–30 ml defibriniertem Venenblut nach der Methylcellulose-Karbonyleisen-Technik bzw. dem Ficoll-Visotраст-Verfahren, wie mehrfach beschrieben [10, 19, 29]; die Zahl der Lymphocyten wurde mit Eagles Medium auf 1.0×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Gewinnung der Antigene. Für die Untersuchungen kamen lösliche Gewebsantigene des normalen Hirns und tumorassoziierte Membranantigene verschiedener Geschwulstarten zur Anwendung:

(a) Das basische (encephalitogene) Myelinprotein (BP) wurde nach dem seit längerem eingeführten Verfahren von Caspary und Field entsprechend der Angaben von Dunkley und Carnegie [7] aus normalem Hirngewebe des Menschen isoliert.

(b) Die Herstellung des normalen Zellmembranantigens vom Hirn (normal tissue antigen — NTA) des Menschen fand nach der 3 M-KCl-Extraktionstechnik gemäß Meltzer u. Mitarb. [18] in der Modifikation von Werner [32] statt. Dabei wurde das Gewebe in hypertoner KCl-Lösung homogenisiert, ultrazentrifugiert und dialysiert. Nach der Konzentration erfolgte eine Präcipitation ($50\% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und die Fraktionierung der gelösten Präcipitate an Sephadex G-200. Die Untersuchung der Einzelfraktionen mit Lymphocyten der Patienten ergab eine Antigenität im P2-Bereich (120–180 000 MW); diese Fraktion (300 µg/Testansatz) wurde im Test benutzt.

(c) Die tumorassoziierten Membranantigene (tumor associated antigens — TAA) der einzelnen Hirngeschwulstarten wurden ebenfalls als hypertone 3 M-KCl-Extrakte — entsprechend dem angeführten Verfahren [18, 32] — aus Operationsmaterial¹ von Patienten mit primären Hirntumoren isoliert. Nach der Separation und Gelchromatographie erfolgte die Ermittlung der Aktivität der Fraktionen an Patienten mit korrespondierenden Tumoren. Es fand sich eine unterschiedliche Antigenität und Spezifität in zwei Molekulargewichtsbereichen, dem P2 (120–180 000 MW) und P3 (50–80 000 MW); die P2-Fraktion besaß histospezifische und/oder organspezifische Eigenschaften, die P3-Fraktion zeigte — wie auch bei vorangegangenen Untersuchungen festgestellt [32] — eine ausgeprägt kreuzreagierende Aktivität. Für die Bestimmungen kam die P2-Fraktion (300 µg/Testansatz) zur Anwendung.

1 Für die histomorphologischen Untersuchungen danken wir Herrn Doz. Dr. P. Schröter, Leiter des Neuropathologischen Laboratoriums der Nervenklinik der Universität Rostock, und für die Operationspräparate Herrn MR Doz. Dr. Dr. G. Lang, Leiter der Neurochirurgischen Abteilung der Chirurgischen Klinik der Universität Greifswald

Im einzelnen handelte es sich um die TAA aus dem Tumorgewebe eines fibrillären Astrocytom (35jähriger Mann), eines glioblastös entarteten Astrocytom (46jähriger Mann), eines Oligodendroglom (27jährige Frau) und eines astrocytären Glioblastom (47jährige Frau) des Großhirns sowie eines Neurinom im Kleinhirnbrückenwinkelbereich (36jähriger Mann), eines Meningeom in der Keilbeinflügelregion (42jährige Frau) und eines temporal gelegenen Epidermoid (41jähriger Mann).

(d) Als allgemeines kreuzreagierendes tumorassoziiertes Membranantigen — TAA-X₃ — wurde aufgrund der Voruntersuchungen [14] und der Ergebnisse zur Antigenität der Fraktionen (s. voranstehenden Abschnitt (c)) ein Gemisch von drei TAA-P3-Fraktionen benutzt. Sie wurden nach dem gleichartigen Separationsablauf wie unter Abschnitt (b) bzw. (c) aus dem Operationsmaterial eines fibrillären Astrocytoms, eines Bronchialcarcinoms sowie Ostosarkoms gewonnen und als Gemisch — TAA-X₃ (P3-Fraktion) — für die Untersuchungen (300 µg/Testansatz) eingesetzt.

Indikatorzellen. Als Indikatorpartikel zur Messung der L PAL wurden Makrophagen angewandt. Die Gewinnung erfolgte aus dem Peritonealexudat von Meerschweinchen, 10–14 Tage nach lokaler Stimulierung mit Paraffinum subliquidum [3, 29].

Inkubation und Testansätze. Zur Stimulierung der Lymphokin-Bildung wurden 1×10^6 Lymphocyten der Patienten mit dem Antigen — 100 µg BP, 300 µg NTA bzw. TAA — in 3 ml Eagles Medium über 90 min bei 21°C inkubiert. Nach Kulturabbruch fand die Inkubation der Indikatorzellen mit den lymphokininhaltigen Zellüberständen über 90 min bei 21°C statt. Als Kontrollen dienten — wie allgemein beim EM-Testsystem [9, 14, 27] — in gleicher Weise behandelte antigenfreie Proben (zur Feststellung einer nicht spontanen Lymphokinfreisetzung) sowie Kontrollansätze von Makrophagen mit dem jeweiligen Antigen (zum Ausschluß einer durch das Antigen bewirkten Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit).

Zellelektrophorese. Die elektrophoretische Mobilität der Indikatorzellen wurde mit dem Verfahren der trägerfreien Mikrozellelektrophorese ermittelt [15]. Die Messungen erfolgten im Zytopherometer der Fa. Opton (Oberkochen/BRD) bei einer Stromstärke von 7,5 mA (175–180 V) unter konstanten Bedingungen (Temperatur von 21°C). Es wurde in der stationären Ebene des elektrischen Feldes für jeden Ansatz die Wanderungsgeschwindigkeit von 20–40 Makrophagen ermittelt, die Werte mit einem rechnergestützten automatischen Auswerteverfahren registriert. Die Durchführung der Bestimmungen fand in Form einer Blindstudie statt. Die Berechnung der Veränderung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit wurde in Prozent, bezogen auf die Werte nicht gehemmter Zellen, vorgenommen [8]; d.h. wenn T_1 die Wanderungszeit im Testansatz und K die der Kontrollansätze ist, ergibt sich (da $T_1 > K$) die prozentuale Hemmung aus $T_1 - K / K \times 100$.

Patientengut

Mit dem Testsystem wurden die Zellüberstände nach Inkubation der Lymphocyten mit dem BP, NTA und den verschiedenen TAA von 50 neurologischen Patienten untersucht.

Unter den Probanden mit primären *Neoplasmen des Zentralnervensystems* befanden sich 15 Patienten mit neuroepithelialen Hirntumoren, im einzelnen 4 Astrocytome (fibrillär, protoplasmatisch und gemischtzellig), 2 Oligodendroglome, 7 Glioblastome (vorwiegend multiform, in einem Fall astrocytär, oligodendroglär) und 2 Neurinome (im Bereich des N. acusticus). Bei den 8 Patienten mit mesodermalen Hirngeschwülsten handelte es sich um Meningeome (überwiegend endotheliomatöser, fibromatöser sowie psammöser Art), gleichfalls verschiedener Lokalisation. Die Altersverteilung dieser Krankheitsfälle mit primären Hirntumoren lag zwischen dem 22. und 64. Lebensjahr (Durchschnittsalter 45,3 Jahre). Innerhalb der 6 Patienten mit metastatischen Hirngeschwülsten waren 3 Erkrankungen an einem verhornten Plattenepithelcarcinom, 2 ausgehend vom Bronchialsystem, ein anderes vom Uterus, ferner ein Adenocarcinom des Coecum, ein Prostatacarcinom und ein Mammacarcinom (Durchschnittsalter 57 Jahre).

Eine strahlentherapeutische oder chemische Immunsuppression vor der Blutentnahme wurde bei keinem der Patienten durchgeführt. In jedem der Krankheitsfälle mit einer Geschwulst erfolgte eine histologische Klassifizierung der Tumorart aus bioptisch während der Operation bzw. autoptisch gewonnenem Gewebsmaterial.

Die 21 Patienten mit *anderen neurologischen Krankheiten* setzten sich zusammen aus 13 Erkrankungsfällen einer Multiplen Sklerose (verschiedenartiger Verlaufsformen), 3 Meningoencephalitiden (in je einem Fall akut-bakteriell, subakut-postinfektiös, chronisch und wahrscheinlich virusbedingt), einer amyotrophen Lateralsklerose, 2 cerebrovaskulären Krankheiten (vasculär verursachtes Parkinsonsyndrom bzw. apoplektiforme intracerebrale Blutung) und 2 schweren Schädelhirntraumen (Contusio cerebri).

Ergebnisse

Die innerhalb der 50 neurologischen Patienten in 39 Fällen bezüglich der allgemeinen und speziellen Antigene ein relativ spezifisches Reaktionsmuster aufweisenden Erkrankungsfälle sind auf der Grundlage des Nachweises der L PAL in der Tabelle 1 angeführt. Hieraus ist die bekannte positive Reaktivität gegenüber dem *BP* bei allen organischen Krankheiten mit ausgedehnterer und länger dauernder Parenchymdestruktion des Nervensystems ersichtlich. Darüber hinaus resultieren aus der Verwendung der durch hypertone Salzextraktion gewonnenen Membranantigene des normalen und tumorösen Hirngewebes (NTA und TAA) weiter differenzierende Befunde:

1. Bei Einsatz des normalen Gewebsantigens *NTA* lässt sich im EM-Test keine wesentliche Mobilitätsemmung für die malignen Hirngeschwülste, jedoch für die anderen neurologischen Erkrankungen nachweisen. Hieran sind vor allem die Krankheitsfälle mit einer Multiplen Sklerose (von denen 8 Patienten gegenüber 6

Tabelle 1. Ergebnisse des EM-Testes (Hemmung in Prozent) unter Verwendung allgemeiner hirntypischer Antigene (BP, NTA) und tumorassozierter Antigene (TAA-Fraktion X₃ sowie verschiedene histospezifische TAA) bei primären und sekundären Hirntumoren im Vergleich zu anderen neurologischen Krankheiten (\bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung)

Antigene	Neuroepithiale	Mesodermale	Sekundäre	Andere
	Hirntumore (n = 12)	Hirntumore (n = 8)	Hirntumore (n = 5)	neurologische Krankheiten (n = 14)
	\bar{x} $\pm s$ (%)	\bar{x} $\pm s$ (%)	\bar{x} $\pm s$ (%)	\bar{x} $\pm s$ (%)
BP	16.8 ± 2.7	17.9 ± 3.8	18.5 ± 4.2	13.5 ± 5.8
NTA	1.9 ± 2.4	1.0 ± 1.2	1.3 ± 1.7	11.2 ± 4.1
TAA-X ₃	14.6 ± 5.2	13.9 ± 3.6	11.7 ± 4.7	6.8 ± 8.7
Astrocytom	9.3 ± 7.2	4.7 ± 7.0	0.9 ± 0.8	1.1 ± 0.6
Oligodendrogliom	4.5 ± 4.5	6.7 ± 4.5	5.7 ± 4.1	7.6 ± 5.9
Glioblastom	8.1 ± 6.3	6.8 ± 7.1	2.2 ± 1.6	1.1 ± 1.6
Neurinom	6.6 ± 5.1	13.4 ± 7.4	6.3 ± 8.0	1.4 ± 2.4
Meningeom	10.0 ± 6.9	14.8 ± 1.7	9.6 ± 4.7	9.4 ± 7.2
Epidermoid	4.8 ± 5.0	6.8 ± 4.2	5.2 ± 4.7	7.6 ± 5.3

sonstigen neurologischen Erkrankungen in der Tabelle 1 angeführt sind) beteiligt. Derartigen deutlichen — stets positiven — Hemmwerten gegenüber dem NTA bei der Multiplen Sklerose (und einigen chronischen Meningoencephalitiden) kommt eine nicht geringe diagnostische Bedeutung zu. Hinsichtlich der Einzelheiten und des Vergleichs zu anderen Krankheitsbildern — wie auch bezüglich der negativen Befunde bei der Untersuchung von Normalpersonen — wurde bereits in einer vorangegangenen Mitteilung [22] — auf der Grundlage von insgesamt 60 Probanden — Stellung genommen.

2. Andersartig sind die Ergebnisse des EM-Testes bei der Anwendung des allgemeinen *Tumorantigens TAA-X₃* (Gemisch von P 3-Fraktionen). Hiermit weisen 25 der untersuchten 29 primären und sekundären Hirngeschwülste positive Hemmwerte über 6% auf (was einer Nachweisrate von 86% entspricht). Dagegen zeigen die anderen neurologischen Krankheiten eine geringere Aktivität der L PAL (wobei einige der mäßig erhöhten bzw. im Grenzwertbereich liegenden Fälle wiederum Erkrankungen an einer Multiplen Sklerose sind). Insgesamt führt der Einsatz des TAA-X₃ und des NTA zu einer zwischen den Hirngeschwülsten und den anderen neurologischen Krankheiten unterscheidenden Reaktivität.

3. Für eine weiterreichende Aussage zur Tumorspezifität gemäß der Histogenese wurden Untersuchungen mit den *verschiedenen TAA* (P 2-Fraktion) der einzelnen Geschwulstarten durchgeführt. Die Resultate entsprechend der neuroepithelialen und mesodermalen Herkunft bzw. der speziellen histologischen Klassifikation der Tumoren zeigen ein differenziertes Reaktionsmuster (Tabelle 1 und 2). Auffällig sind einerseits deutliche Hemmwerte bei den an einem Astrocytom oder Glioblastom erkrankten Patienten mit einigen der von neuroepithelialen Geschwülsten gewonnenen Antigene sowie eine gleichfalls eindeutige Reaktivität der Meningeom-Fälle gegenüber dem Antigen aus Neurinom- und Meningeom-Gewebe. Auf der anderen Seite ergeben sich für einige TAA unterschiedliche Wertigkeiten.

Von den neuroepithelialen Antigenen muß die differenzierende Reaktivität des TAA (P 2-Fraktion) vom Astrocytom hervorgehoben werden. Geringer ist dagegen diejenige des Oligodendroglom und Glioblastom. Bei Verwendung des TAA aus dem Neurinom-Gewebe kann ein relativ unterschiedliches Reaktionsmuster festgestellt werden. Hinsichtlich des mesodermalen Meningeom-Antigen ist die verhältnismäßig breitbasige Reaktivität bemerkenswert. Anders und insbesondere gleichförmig gering stellt sich die Reaktivität gegenüber dem TAA vom Epidermoid für alle untersuchten Tumorarten dar.

Insgesamt reagierten (mit einer Mobilitätshemmung über 6%) von den in der Tabelle 1 bzw. 2 angeführten 25 Patienten mit einem Hirntumor drei Viertel mit mehr als einem der TAA (P 2-Fraktion) verschiedenartiger Geschwülste, mit weiteren tumorassoziierten Extrakten 3 (1/4) der neuroepithelialen und 5 (etwa 2/3) der mesodermalen Neoplasmen, dabei — wie bei den metastatischen Tumoren — jeweils ein Erkrankungsfall mit 4 der eingesetzten 6 Antigene. Von allen der mit den TAA (P 2-Fraktion) untersuchten 29 primären und sekundären Hirngeschwülsten zeigten 25 (86%) eine *positive* Reaktion. Zwei — nicht in den Tabellen aufgeführte — Patienten mit einem Astrocytom (afibrillär bzw. klein- und großzellig) boten *keine eindeutigen* Ergebnisse (Hemmwert mit nicht-korrespondierendem Meningeom-Antigen von 10,9% bzw. neuroepithelialem Antigen von 8,5%).

Tabelle 2. Mobilitätshemmung im EM-Test bei verschiedenartigen primären und sekundären Hirngeschwülsten unter Anwendung tumorassozierter Antigene der histogenetisch unterschiedlichen Hirntumortypen (Hemmung in Prozent, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung)

Antigene	Astrocytom (n = 2)	Oligodendrogliom (n = 2)	Glioblastom (n = 6)	Neurinom (n = 2)		Meningeom (n = 8)		Sekundäre Hirntumore (n = 5)	
				\bar{x} \pm s (%)		\bar{x} \pm s (%)		\bar{x} \pm s (%)	
				\bar{x}	s (%)	\bar{x}	s (%)	\bar{x}	s (%)
TAA-X ₃	13.5 \pm 1.4	17.8 \pm 1.1	14.3 \pm 7.8	13.0 \pm 1.1	13.9 \pm 3.6	11.7 \pm 4.7			
Astrocytom	17.0 \pm 3.3	9.1 \pm 8.9	9.4 \pm 6.9	1.0 \pm 1.0	4.7 \pm 7.0	0.9 \pm 0.8			
Oligodendrogliom	3.0 \pm 4.2	12.0 \pm 4.6	2.7 \pm 2.0	4.0 \pm 5.5	6.7 \pm 4.5	5.7 \pm 4.1			
Glioblastom	5.5 \pm 7.7	7.8 \pm 6.7	6.3 \pm 8.3	6.2 \pm 5.4	6.8 \pm 7.1	2.2 \pm 1.6			
Neurinom	3.9 \pm 3.8	9.5 \pm 8.1	3.5 \pm 1.6	8.3 \pm 7.0	13.4 \pm 7.4	6.3 \pm 8.0			
Meningeom	0.7 \pm 0.9	7.6 \pm 10.7	11.5 \pm 7.7	17.1 \pm 1.1	14.8 \pm 1.7	9.6 \pm 4.7			
Epidermoid	3.4 \pm 1.9	4.1 \pm 2.4	6.9 \pm 6.5	1.7 \pm 0.4	6.8 \pm 4.2	5.2 \pm 4.7			

Tabelle 3. Krankheitsfälle mit „falsch-negativen“ oder „falsch-positiven“ Ergebnissen im EM-Test (Hemmung in Prozent) bei der Verwendung verschiedener hirntypischer und tumorassozierter Antigene (BP und NTA des normalen Hirngewebes sowie TAA der einzelnen Hirntumorarten)

Patient	Diagnose	BP	NTA	TAA	X ₃	Astrocytom	Oligodendrogliom	Glioblastom	Neurinom	Menin-geom
<i>„falsch-negativ“</i>										
H.S. (55 J.)	Glioblastom, polyblast.	1.2	3.1	0.2	0.9	5.8	6.5	1.2	3.1	
H.K. (63 J.)	Metastase eines Adenocarcinoms des Coecum	3.5	1.5	5.2	0	0	0	0	0	2
<i>„falsch-positiv“</i>										
G.H. (48 J.)	Amyotrophe Lateralsklerose	13.8	7.3	0	0	0	0	0.4	9.2	0
K.S. (21 J.)	Meningoencephalitis, akut-bakteriell	21.1	1.9	9.7	11.9	16.7	n.d.	n.d.	n.d.	0
G.U. (47 J.)	Multiple Sklerose	10.6	19.8	17.3	5.3	19.2	3.0	19.8	14.6	

Weitere zwei Fälle mit einem Neoplasma (ein Glioblastom und eine Hirnmetastase eines Adenocarcinom) boten *falsch-negative* Befunde (s. Tabelle 3).

Auf den Zeitpunkt des Auftretens einer sich im EM-Test manifestierenden Sensibilisierung gegen die TAA zu Beginn des Krankheitsverlaufs ergeben sich aus den hier durchgeführten Untersuchungen keinerlei Rückschlüsse. Ein wesentlicher Effekt der totalen oder subtotalen Tumorentfernung auf den Grad der Mobilitätshemmung konnte bei Verlaufsbeobachtungen (bis zu 6 Monaten) nicht beobachtet werden. Zum Einfluß der Anwendung von Immunsuppressiva bzw. Cytostatica auf die LPAL-Aktivität sind keine Angaben möglich, da im vorliegenden Patientengut derartige Therapeutica nicht eingesetzt wurden.

Unter Berücksichtigung der Reagibilität gegenüber den verschiedenen TAA ließen sich bei 7 der 50 Erkrankungsfälle (d. h. 14% des Gesamtmaterials) bzw. bei einem Drittel der hier untersuchten anderen neurologischen Erkrankungen *falsch-positive* Ergebnisse nachweisen. Hieran waren vorwiegend die Patienten mit einer Multiplen Sklerose infolge ihrer Reaktivität, vor allem gegen das verwendete Meningo-*Antigen* ($12,7 \pm 5,9\%$), aber auch andere TAA (wie Oligodendrogliom mit $13,8 \pm 5,0\%$ Hemmung) beteiligt. Beispiele für derartige falsch-positive Reaktionsmuster, die auch den Krankheitsfall einer amyotrophen Lateralsklerose und einer Meningoencephalitis betreffen, sind in der Tabelle 3 angeführt.

Diskussion

Die Ergebnisse und damit die diagnostische Aussage der Ermittlung einer zellgebundenen Immunität über den Nachweis der lymphokinen Mediatoren werden auch bei den verschiedenen Organgeschwüsten von zwei wesentlichen Faktoren bestimmt. Es sind die (1.) Empfindlichkeit der *Bestimmungsverfahren* zur Feststellung der Lymphokine [33] und die (2.) Spezifität der zur Stimulierung antigenreaktiver Lymphocyten verwendeten *Antigene* [17]. Beide Komponenten sind für die differenzierenden Testresultate von grundlegender Bedeutung.

1. Gegenüber der seit längerem bekannten und überwiegend angewandten Makrophagen- oder Leukocyten-Migrationshemmung zeigt die Methode der *Zellelektrophorese* [8] einige Vorteile. Das auf einer Mobilitätshemmung von Indikatorpartikeln im elektrischen Feld basierende Verfahren der Elektrophoresemobilitäts-(EM)-Technik ist hinreichend empfindlich. Hiermit wurden bei den verschiedenartigen malignen Neoplasmen durch eine Reihe von Arbeitsgruppen positive Befunde erhoben [6, 8, 13, 19, 21, 24, 27, 30].

Ein Nachteil der bislang erhaltenen Ergebnisse ist die wenig differenzierende Wirkung des zur Lymphocytenstimulierung verwendeten BP. Mit einem derartigen Antigen lässt sich auch eine positive Reaktivität bei einigen anderen neurologischen Krankheiten mit länger dauernder und ausgeprägter Parenchymläsion im Bereich des Zentralnervensystems (Multiple Sklerose, Neuro-Lues, sonstige chronische Entzündungen, Apoplexie, degenerative Leiden) sowie einigen weiteren Erkrankungen (Influenza und andere akute Infektionen, aktive Tuberkulose, Sarkoidose, Lupus erythematoses, Colitis ulcerosa u. a.) beobachten [10, 20, 22, 30]. Solcherart Befunde weisen auf den für die immunologische Diagnostik der Malignome wesentlichen zweiten Faktor.

2. Die Spezifität des Nachweises einer cellulären Immunität ist entscheidend abhängig von den für die Lymphocytenstimulierung benutzten Antigenen. Aus den mit dem BP erhaltenen relativ unspezifischen EM-Test-Ergebnissen resultierte die Notwendigkeit der Verwendung weiterer Antigene. Dabei führte der Einsatz basischer Proteine aus Krebsgewebe, des CaBP (cancer basic protein), zwar zu einem größeren Hemmwert [3], erfüllte jedoch nicht die an ein allgemeines Tumorantigen zu stellenden Anforderungen [2, 5]. Aus diesem Grunde erfolgte die Anwendung *spezifischer Membranantigene*, die durch hypertonische 3 M-KCl-Extraktion aus Normal- und Tumorgewebe als NTA oder TAA gewonnen werden können [18, 32]. Derartige zellmembranassoziierte Gewebsantigene erbrachten, wie auch die Befunde in anderen Testsystemen zeigten [16, 25, 31], für die Geschwulst- und einige Autoimmunerkrankungen eindeutiger differenzierende Ergebnisse [13, 22, 23].

Erste Resultate mit den TAA verschiedener Organgeschwülste wiesen auf für einige Tumorarten charakteristische Membranantigene. Infolge der mit dem EM-Test exakt feststellbaren Sensibilisierung der Lymphocyten gegenüber den verschiedenen TAA kann somit ein charakteristisches Reaktionsmuster für den jeweiligen Erkrankungsfall ermittelt werden [23]. Entsprechende Untersuchungsreihen sowohl mit einem aus den 3 M-KCl-Extrakten verschiedener Geschwülste [14] gewonnenen allgemeinen Tumorantigen, dem gemischten TAA-X₃ (P 3-Fraktion) als auch den TAA (P 2-Fraktion) der histogenetisch differenten Neoplasmen zeigten ein für die einzelnen Malignome zum Teil typisches „immunologisches Tumorprofil“ [13, 23, 28] bzw. Lymphocyten-Reaktionsmuster.

Mit den gewebsspezifischen TAA im EM-Test ergaben sich aufgrund unserer Untersuchungen für die *Hirngeschwülste* hauptsächlich drei Reaktionsformen:

I. Ein *positives* Testresultat zeigten 86% der Tumoren im Bereich des ZNS mit dem allgemeinen, gemischten TAA-X₃ (P 3-Fraktion) sowie einem der histospezifischen TAA (P 2-Fraktion), drei Viertel der Fälle mit einem weiteren derartigen Antigen und ein kleiner Prozentsatz mit mehr als drei Antigenextrakten.

II. Einen *nicht eindeutigen* Befund, d. h. Hemmwerte zwischen 8 und 10% mit nicht-korrespondierenden TAA (P 2-Fraktion), bot ein Anteil von etwa 7% der Hirntumore.

III. In einem gleichen Prozentsatz der Krankheitsfälle war ein *falsch-negatives* Reaktionsmuster (mit Hemmwerten unter 6–7%) nachweisbar, wobei diese Patienten klinisch und autoptisch keine wesentlichen Besonderheiten, jedoch eine relativ langdauernde Anamnese und ein gering oberhalb des Durchschnittes liegendes Erkrankungsalter aufwiesen.

Bei Berücksichtigung der *anderen neurologischen Erkrankungen* ergab sich für die TAA im EM-Test noch eine weitere (IV.) Reaktionsform. Es waren *falsch-positive* Befunde, die offenbar in Abhängigkeit vom untersuchten Erkrankungsgut bis zu einem Drittel der Fälle zeigten. Hieran sind überwiegend (zu $\frac{2}{3}$) die Patienten mit einer Multiplen Sklerose, vor allem aufgrund ihrer Reaktivität gegenüber dem Meningo-geom-Antigen — aber auch einigen anderen TAA — beteiligt. Gleichfalls wiesen verschiedene — vorwiegend entzündliche — neurologische Krankheitsbilder ein derartiges Reaktionsmuster auf (s. Tabelle 3), wobei positiv zu wertende Mobilitätshemmungen sowohl gegen nur eines als auch mehrere der eingesetzten TAA zu beobachten waren.

Eine weitere Differenzierung, besonders der „falsch-positiven“ Befunde mit den TAA, läßt sich durch die zusätzliche Anwendung des NTA aus normalem Hirngewebe erreichen. Die Patienten mit einem Hirntumor reagierten allgemein nicht mit dem NTA (s. Tabelle 1). Dagegen werden die Lymphocyten der Fälle mit einer Multiplen Sklerose (und einigen chronischen Entzündungen des ZNS) bei der in-vitro-Inkubation mit dem NTA zur Bildung der L-PAL angeregt, so daß eine Hemmung im EM-Test resultiert. Es konnte dies auch durch weiterreichende Untersuchungen an einem umfangreichen neurologischeren Patientengut bestätigt werden [22].

Allgemein sind hinsichtlich der mit dem EM-Test nachweisbaren Lymphocyten-sensibilisierung gegen Antigene aus Geschwulstgewebe für die verschiedenen TAA im wesentlichen *drei Reaktionstypen* zu unterscheiden.

1. Es besteht eine *tumorcharakteristische Reaktionsform* gegenüber einem allgemeinen (gemischten) Tumorantigen (TAA-X₃ — P3-Fraktion), die hinsichtlich der verschiedenen Geschwulstarten auf einer Kreuzreaktivität basiert, jedoch nicht die sogenannten benignen Tumoren erfaßt [14, 23]. Eine breitbasige Reaktion gegen derartige Antigenpräparationen bieten alle Neoplasmen (mit einer Nachweisrate von über 85%), auch die primären und sekundären Hirntumoren.

2. Eine *organspezifische Reaktivität* mit den TAA (P2-Fraktion) der verschiedenartigen Organtumoren ist generell und durchgängig vorhanden. Sie erscheint als die bevorzugte und prinzipielle Reaktionsform für die Tumoren im Bereich des ZNS und beruht auf einer teilweise komplexen, bei destruierenden Parenchymprozessen gegen die verschiedenen Gewebeanteile gerichteten cellulären Sensibilisierung. Dabei besteht gegenüber den einzelnen TAA (P2-Fraktion) ein unterschiedlicher Sensibilisierungsgrad, was auf die besondere Problematik der im folgenden zu erörternden histogenetischen Reaktionsform hindeutet.

3. Ein *histospezifisches Reaktionsmuster* ist für eine Reihe von Tumorarten bei Verwendung der korrespondierenden TAA (P2-Fraktion) mehr oder weniger deutlich. Es betrifft die tumorspezifische Reaktivität im EM-Testverfahren gegen einige TAA, wie beispielsweise aus Bronchialcarcinom, Magen- bzw. Kolon-/Rectumcarcinom, hypernephroides Carcinom, Prostata- und Blasencarcinom sowie Osteo- und Fibrosarkom [13, 23, 28]. Eine derartige Reaktionsform kann für die Hirntumoren nur begrenzt festgestellt werden, d. h. es findet sich die Tendenz eines auf die adäquaten TAA (P2-Fraktion) der mesodermalen und — geringer — neuroepithelialen Neoplasmen des Zentralnervensystems gerichteten Reaktionstyps.

Die bei den Hirngeschwülsten lediglich partiell korrespondierende Reaktivität gegenüber den histospezifischen TAA beruht auf einigen Faktoren bzw. Bedingungen. An (a) *allgemeinen Faktoren* muß seitens der verwendeten Antigene die Möglichkeit einer evtl. interkurrenten Kreuzreaktivität angeführt werden. Des weiteren sind verschiedene immunologische Bedingungen, wie Anzahl, Zusammensetzung und Funktionszustand der reagiblen Zellen, bedeutsam — wozu bestimmte Einzelheiten noch nicht als geklärt gelten [4]. Einige (b) *spezielle Faktoren* für die Reaktivität bei den Hirntumoren sind die Schrankenverhältnisse (Bluthirnschranken-System) und die hierdurch beeinflußte Antigeneinwirkung. Auf der anderen Seite disponiert die zumeist vorliegende Hirndrucksymptomatik und die Parenchymdestruktion für eine mehr komplexe Reaktivität gegen verschiedene Gewebsanteile. Als (c) *besonderer Faktor* kann die Polymorphie der Hirngeschwulstarten gelten, worauf auch die des öfteren bestehenden Schwierigkeiten der histopathologischen Klassifizierung hinweisen [11]. Darüber hinaus ist die Dignität — wie auch die Problematik der Gradeinteilung der Hirntumoren [34] zeigt — nicht homogen, offenbar gleichfalls einigen Schwankungen unterworfen.

Insgesamt ergaben die für die Hirntumoren mit dem EM-Test unter Verwendung verschiedener Membranantigene aus Normal- und Geschwulstgewebe erhaltenen Resultate die Empfindlichkeit und Spezifität des Verfahrens als immunologischer in-vitro-Test auf der Grundlage einer cellulären Immunität. Der Einsatz verschiedener Membranantigene, insbesondere der TAA — sowohl in Form eines allgemeinen Tumorantigens (TAA-X₃) als auch der histogenetisch determinierten korrespondierenden TAA —, erhöht im Vergleich zu den bislang benutzten Antigenen den Sicherheitsgrad des immunologischen Tumornachweises. Dabei sind differenzierende organcharakteristische Befunde in Abhängigkeit von der Organspezifität der TAA zu erhalten, was einen wesentlichen Fortschritt darstellt. Für eine umfangreiche Anwendung des Verfahrens — wie zur Früherkennung der Geschwülste — sind, worauf die bisherigen Untersuchungen (und einige falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse) hinweisen, noch eine Reihe von Problemen nicht vollständig geklärt. Es betrifft dies die Komplexität der Immunprozesse bei den Neoplasmen, Einzelheiten zur Reaktivität der Lymphocyten sowie den Bedeutungswert der tumorassoziierten Antigene.

Literatur

1. Ambrose, J.: Computerized transverse axial scanning (tomography), Part 2. Clinical application. *Br. J. Radiol.* **46**, 1023—1047 (1973)
2. Carnegie, P. R., Caspary, E. A., Field, E. J.: Isolation of an "antigen" from malignant tumours. *Br. J. Cancer* **28**, Suppl. I, 219—223 (1973)
3. Caspary, E. A., Field, E. J.: Specific lymphocyte sensitization in cancer: Is there a common antigen in human malignant neoplasia? *Br. Med. J.* **1971 II**, 613
4. Currie, G. A.: Cancer and the immune response. In: *Current topics in immunology*, No. 2. London: Arnold 1974
5. Dickinson, J. P., Caspary, E. A., Field, E. J.: A common tumour specific antigen. I. Restriction in vivo to malignant neoplastic tissue. *Br. J. Cancer* **27**, 99—105 (1973)
6. Douwes, F. R., Hanke, R., Mross, K.: Der Elektrophorese-Mobilitäts-Test in der Diagnostik von Malignomen. *Z. Krebsforsch.* **87**, 281—290 (1976)
7. Dunkley, P. R., Carnegie, P. R.: Isolation of myelin basic protein. In: *Research methods in neurochemistry*, Marks, N., Rodnight, R. (eds.), Vol. 2, pp. 219—245. New York, London: Plenum Press 1974
8. Field, E. J., Caspary, E. A.: Lymphocyte sensitisation: an in-vitro test for cancer? *Lancet* **1970 II**, 1337—1341
9. Field, E. J.: Immunological diagnosis of cancer. In: *Modern trends in oncology*, 1, Part one: Research progress, Raven, R. W. (ed.), pp. 183—208. London: Butterworths 1973
10. Field, E. J., Shenton, B. K., Meyer-Rienecker, H. J., Jenssen, H. L., Köhler, H., Günther, J. K., Friemel, H.: Die Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts(MEM)-Methode: ihre Anwendung in der klinischen Immunologie. *Dts. Gesundh.-Wesen* **30**, 377—383 (1975)
11. Güthert, H., Warzok, R.: Probleme der allgemeinen Pathologie der Hirntumoren. *Zbl. Neurochir.* **38**, 3—10 (1977)
12. Herberman, R. B.: Immunologic tests in diagnosis of cancer. *Am. J. Clin. Path.* **68**, 688—698 (1977)
13. Jenssen, H. L., Köhler, H., Werner, H., Meyer-Rienecker, H., Seyfarth, M., Büttner, H., Schütt, W., Günther, M., Jenssen, R., Friemel, H.: Ergebnisse und Stand der Entwicklung eines immunologischen Tumortestes für die Praxis auf der Grundlage der Zell-Elektrophorese-Mobilitäts-Methode. *DDR-Med.-Rep.* **5**, 876—888 (1976)
14. Jenssen, H. L., Werner, H., Köhler, H., Seyfarth, M., Friemel, H.: Ein neues allgemeines Tumorantigen zum immunologischen Nachweis von Malignität. *Dts. Gesundh.-Wesen* **32**, 1061—1063 (1977)

15. Jenssen, H. L., Eckert, R.: Zellelektrophorese. In: Immunologische Arbeitsmethoden, Friemel, H. (Hrsg.), 2. Aufl. Jena: Fischer 1979
16. Kadish, A. S., Marcus, D. M., Bloom, B. R.: Inhibition of leukocyte migration by human breast-cancer-associated antigens. *Int. J. Cancer* **18**, 581—586 (1976)
17. King, R. B.: An overview of the present and future market for cancer testing. *Antibiotics Chemother. (Basel)* **22**, 47—58 (1978)
18. Meltzer, M. S., Leonhard, E. J., Rapp, H. J., Borsos, I.: Tumorspecific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride. *J. Natl. Cancer Inst. (Wash.)* **47**, 703—709 (1971)
19. Meyer-Rienecker, H., Jenssen, H. L., Köhler, H., Günther, J. K.: Zur Bedeutung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitätstests für die Diagnostik der Geschwülste des Zentralnervensystems. *Dtsch. Med. Wschr.* **100**, 538—543 (1975)
20. Meyer-Rienecker, H. J., Jenssen, H. L., Köhler, H., Werner, H.: Zur Anwendung der Zytoperimetrie bei neurologischen Erkrankungen. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* **45**, 615—629 (1977)
21. Meyer-Rienecker, H., Jenssen, H. L., Köhler, H., Lehmitz, R., Schmieter, K.: Zur zellulären Immunität neurologischer Erkrankungen. *Nervenarzt* **50**, 10—15 (1979)
22. Meyer-Rienecker, H., Jenssen, H. L., Werner, H.: Aspects of cellular immunity in multiple sclerosis: antigen-reactivity of lymphocytes and lymphokine activity. *J. Neurol. Sci.* **42**, 173—186 (1979)
23. Müller, M., Irmscher, J., Fischer, R., Grossmann, H.: Immunologisches Tumorprofil. Ein neuartiges Prinzip in der Anwendung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts(MEM)-Tests zur differenzierten Karzinomdiagnose. *Dts. Gesundh.-Wesen* **30**, 1836—1842 (1975)
24. Müller, M., et al.: Modern trends in cell electrophoresis. *Proc. Sympos., Dresden, March 12—16, 1978. (Schriften d. Med. Akad. Dresden, Bd. 15).* Dresden: Akad. 1978
25. Oldham, R. K., Weese, J. L., Herberman, R. B., Perlin, E., Millis, M., Heims, W., Blom, J., Green, D., Reid, J., Bellinger, S., Law, I., McCoy, J. L., Dean, J. H., Cannon, G. B., Djeu, J.: Immunological monitoring and immunotherapy in carcinoma of the lung. *Int. J. Cancer* **18**, 739—749 (1976)
26. Porzsolt, F., Tautz, Ch., Ax, W.: Electrophoretic mobility test: I. Modifications to simplify the detection of malignant diseases in man. *Behring Inst. Mitt.* **57**, 128—136 (1975)
27. Pritchard, J. A. V., Moore, J. L., Sutherland, W. H., Joslin, C. A. F.: Evaluation and development of the macrophage electrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease. *Br. J. Cancer* **27**, 1—9 (1973)
28. Seyfarth, M., Jenssen, H. L., Werner, H., Köhler, H., Jaster, D., Seyfarth, H., Höhndorf, H.: Immundiagnostik bei Knochentumoren. *Dts. Gesundh.-Wesen* **31**, 1258—1262 (1976)
29. Shenton, B. K., Jenssen, H. L., Werner, H., Field, E. J.: A comparison of the kinetics of the macrophage electrophoretic mobility (MEM) and the tanned sheep erythrocyte electrophoretic mobility (TEEM) tests. *J. Immunol. Meth.* **14**, 123—139 (1977)
30. Tautz, Ch., Schneider, W., Laier, E., Brügmann, G.: Der Elektrophoretische-Mobilitäts-(EM)-Test: Untersuchungsmethode zur Unterscheidung von malignen und nicht-malignen Tumoren. *Klin. Wschr.* **56**, 175—185 (1978)
31. Waldman, S. R., Yonemoto, R. H.: The use of cryopreserved lymphocytes in the leucocyte adherence inhibition assay. *Int. J. Cancer* **21**, 542—551 (1978)
32. Werner, H.: Präparation von Gewebsantigen (3 M-KCl-Methode). In: Immunologische Arbeitsmethoden, Friemel, H. (Hrsg.), 2. Aufl. Jena: Fischer 1979
33. Yoshida, T., Cohen, S.: Lymphokines in tumor immunity. In: *Mechanisms of tumor immunity*, Green, I., Cohen, S., McCluskey, R. T. (eds.), pp. 87—108. New York, London, Sydney, Toronto: Wiley 1977
34. Zülch, K. J., Mennel, H. D.: The biology of brain tumours. In: *Handbook of clinical neurology*, Vinken, P. J., Bruyn, G. W. (eds.), Vol. 16, pp. 1—55. Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1974