

Die Bedeutung von Epstein-Barr-Virus-Antikörpern für Diagnose und Verlauf des Nasopharynxkarzinoms*

E. Wilmes, H. Wolf, F. Deinhardt, H. H. Naumann

HNO-Klinik (Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann) und Max-von-Pettenkofer-Institut (Direktor: Prof. Dr. F. Deinhardt) der Universität München

Zusammenfassung

Es besteht eine evidente Korrelation zwischen Nasopharynxkarzinomen und dem Auftreten von Epstein-Barr-Virus-spezifischen Antikörpermustern. Um die Aussagekraft derartiger Antikörperspektren näher zu überprüfen, wurden Seren von Patienten mit einem histologisch gesicherten Nasopharynxkarzinom (NPC) untersucht. Unter Verwendung der indirekten und antikomplementären Immunfluoreszenz wurden die Titer von Antikörpern verschiedener Klassen (IgA, IgG, IgM) gegen EBV-spezifische Antigene überprüft. Die EBV-spezifischen Antikörperspektren unterscheiden sich signifikant von denen gesunder Personen sowie von Patienten, die an einem anderen malignen Tumor im Kopf-Hals-Bereich erkrankt sind. Von besonderer Aussagekraft – auch im Einzelfall – sind IgA-Antikörper gegen das frühe Antigen (EA) und gegen Virus-Kapsid-Antigen (VCA). So bietet die Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen EBV-Virus-Kapsid-Antigen bei der Primärtumorsuche bei Halslymphknotenmetastasen einen weiteren wertvollen Hinweis auf das Vorliegen eines NPC. Es scheint, daß diese Antikörper nach erfolgreicher Behandlung des NPC absinken, ein Wiederanstieg kann daher für das Auftreten eines Rezidivs sprechen.

Einleitung

Durch Arbeiten von *Old* (8) und *Henle* (2, 3, 4, 5, 6), die hohe Antikörpertiter gegen Epstein-Barr-Virus (EBV) bei Patienten mit

* Auszugsweise vorgetragen auf der 63. Jahrestagung der Vereinigung Südwestdeutscher Hals-Nasen-Ohrenärzte in Freiburg, 21.–23. 9. 1979.

Die Arbeiten wurden unterstützt durch die deutsche Krebshilfe (Tumorzentrum München), durch Stiftungsmittel der Universität München und die DFG (Wo 227/2).

Die Autoren danken Frau G. Pleyl für ihre vorzügliche technische Hilfe.

Significance of Virus-Specific Antibodies to EBV-Antigens in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

Sera collected from patients with nasopharyngeal carcinoma, patients with other head and neck neoplasms, patients with infectious mononucleosis (IM), and healthy donors were titrated for antibodies (IgM, IgG, IgA) against Epstein-Barr-Virus (EBV) specific antigens (VCA, EA, EBNA) by indirect and by antikomplementary immunofluorescence. NPC-patients develop significantly high anti-EBV titers of IgG and IgA. In contrast patients with neoplasms (mainly carcinomas) arising in sites of the head and neck other than the nasopharynx revealed a lower incidence of high titers. Our results emphasize the remarkable predominance of IgA-antibodies to VCA and EA in NPC-patients and shows that Europeans do not differ in that respect from Asian patients. The significance and implications of these findings are discussed.

Karzinomen des Nasopharynx (NPC) fanden, haben sich die Indizien für eine Assoziation von Epstein-Barr-Virus und Nasopharynxkarzinomen gehäuft. Molekularbiologische Untersuchungen, wie der Nachweis viraler DNA durch *Wolf* u. Mitarb. in den epithelialen Zellen des NPC (12, 13), unterstützen die Annahme, daß EBV ein entscheidender Faktor in der Entstehung des Nasopharynxkarzinoms ist.

Während bisher hauptsächlich IgG-Antikörper gegen EBV untersucht wurden, berich-

teten G. und W. Henle 1976 zum ersten Male auch über erhöhte IgA-Antikörpertiter gegen EBV bei dieser Erkrankung (2).

Um die Aussagekraft solcher serologischen Untersuchungen zu prüfen und um deren Gültigkeit auch für eine nicht asiatische Population zu kontrollieren, haben wir Patienten mit frisch erfaßten Nasopharynxkarzinomen sowie behandelte und klinisch rezidivfreie Patienten untersucht. Als serologische Parameter wurden die Titer von IgG, IgM und IgA-Antikörpern gegen Kapselantigene (Virus-Capsid-Antigen = VCA), von IgG und IgA-Antikörpern gegen das frühe Antigen (Early Antigen = EA) und von IgG-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-spezifische nukleäre Antigen (EBNA) bestimmt.

Zum Vergleich wurden drei Kontrollgruppen untersucht:

1. Patienten mit anderen malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich,
2. Patienten mit infektiöser Mononukleose,
3. Patienten mit ähnlicher Alters- und Geschlechtsverteilung wie die Patienten mit Nasopharynxkarzinomen.

Methodik

Für den Test der Seren auf Antikörper gegen VCA und gegen das frühe Antigen (EA) wurden indirekte Immunfluoreszenzteste verwendet (7). Als VCA-Antigen dienten 3 Tage alte P 3-HR 1-Zellen mit 5–10% VCA positiven Zellen. Als EA wurden aktiv wachsende Raji-Zellen verwendet, die vor der Präparation 2–3 Tage mit 25 µg/ml Joddesoxyuridin und 0,5% eines Schafserums mit Antikörpern gegen menschliches IgM behandelt wurden (8). Die antigentragenden Zellen wurden auf Objektträger mit aufgespritzten Teflonabgrenzungen gebracht, mit einem Gebläse luftgetrocknet und 10 min bei 20° in Aceton fixiert. Als Konjugat für den VCA-Test wurde eine 1:50 verdünnte Lösung von fluoreszenzmarkiertem Anti-Human-IgA vom Kaninchen verwendet. Als Konjugat für den EA-Test wurde eine 1:50 verdünnte Lösung von fluoreszenzmarkiertem Anti-Human-IgG vom Kaninchen verwendet. Antikörper gegen EBNA wurden nach der Methode von Reedman und Klein (9) bestimmt.

Als Antigen wurden Raji-Zellen verwendet, die 3 min mit Aceton/Methanol 1:1 fixiert wurden. Als Konjugat wurde eine 1:50 verdünnte Lösung

von fluoreszenzmarkiertem Anti-Human-Komplement C³ (produziert in Ziegen, Hyland/Div. Travenol/Cost Mesa/USA) verwendet. Der IgA-Test wurde wie der IgG-Test durchgeführt. Als Konjugat wurde eine 1:50 verdünnte Lösung von fluoreszenzmarkiertem Anti-Human-IgA vom Kaninchen verwendet. Für den IgM-Test auf VCA wurden 7 Tage alte Zellen der gleichen Art wie für den IgG-Test verwendet. Die Fixierung und Aufbewahrung wurde jedoch nach Schmitz (10) modifiziert. Das Serum wurde 3 Std. mit dem Antigen bei 37°C inkubiert. Als Konjugat für den IgM-Test wurde eine 1:50 verdünnte Lösung von fluoreszenzmarkiertem Anti-Human-IgM vom Kaninchen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper von DAKO, Kopenhagen, bezogen.

Die Tests wurden mit einem Zeiss-Forschungsmikroskop III mit 50 W Hg Hochdrucklampe mit dem Filtersatz, bestehend aus: Erregerfilter BP 450–490; Farbteiler FT 510; Sperrfilter LP 520, einem 25/0,80 W Wasser-Glycerin-Öl oder 25/0,60 Luft Objektiv bei 325facher Endvergrößerung, abgelesen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind aus den Abb. 1 und 2 zu entnehmen. Jeweils links sind die Patienten mit Nasopharynxkarzinomen und rechts die Kontrollpopulationen aufgetragen. Die Nasopharynxkarzinome sind dabei noch einmal unterteilt in drei Gruppen:

1. Tumortragende Patienten.
2. Vor längerer Zeit (1–6 Jahre) behandelte, klinisch rezidivfreie Patienten.
3. Die Gesamtzahl aller NPC-Patienten, wobei hier bei zeitlich gestaffelten Mehrfachuntersuchungen jeder Wert berücksichtigt wurde.

Zu Abb. 1:

a) Antikörper gegen Epstein-Barr-spezifisches nukleäres Antigen (EBNA).

Wegen seiner Lokalisation am Kern wird dieses Antigen Epstein-Barr-spezifisches nukleäres Antigen genannt. Die Titer bei NPC-Patienten bewegen sich zwischen 1:16 und 1:2048. Die Kontrollen sind deutlich niedriger, nur 1 Patient mit einer infektiösen Mononukleose (IM) hatte Titer von 1:256.

b) Antikörper gegen das frühe Antigen (EA)

IgG-Antikörper gegen EA sind bei allen an NPC erkrankten Patienten deutlich gegenüber den Kontrollen erhöht. Nur die IM bildet eine Ausnahme und zeigt ebenfalls erhöhte Antikörpertiter.

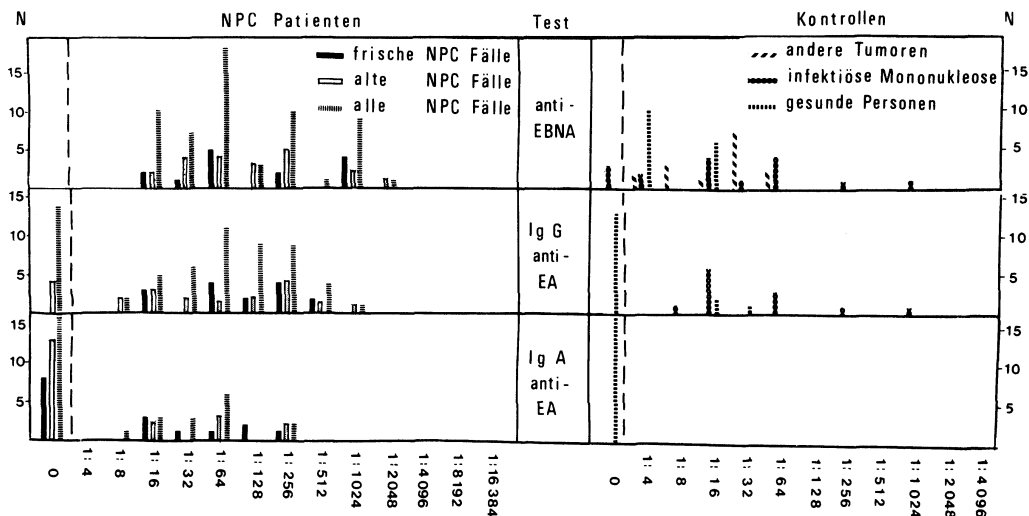


Abb. 1 Vergleich von IgG-Antikörpern gegen EB-spezifisches Kernantigen (EBNA) und von IgG- und IgA-Antikörpern gegen frühes Antigen (EA) bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen und Kontrollpopulationen.

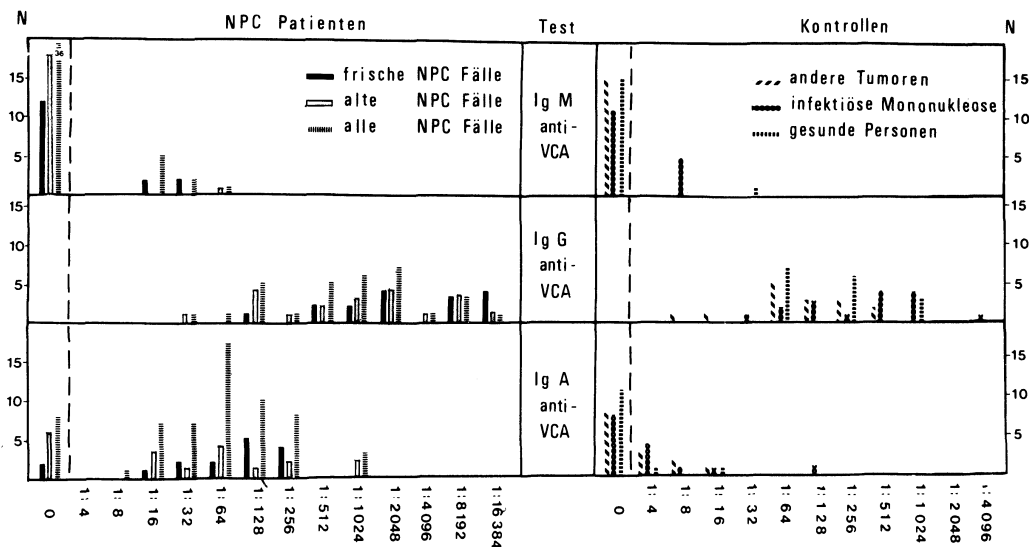


Abb. 2 Vergleich von IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern gegen EBV-spezifische Kapselantigene (VCA) bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen und Kontrollpopulationen.

c) IgA-Antikörper gegen EA entwickeln nur etwa die Hälfte aller NPC-Patienten.

In den Kontrollen finden sich keine IgA-Antikörper gegen EA. Das Vorliegen von IgA-Ak gegen EA spricht daher eindeutig für ein NPC, der negative Ausfall des Testes aber nicht dagegen.

Zu Abb. 2:

Die Abb. 2 zeigt die Titer der drei untersuchten Antikörperklassen IgM, IgG und IgA gegen das Virus-Kapsid-Antigen (VCA).

a) *IgM-Antikörper* gegen VCA sind bei einer frischen Infektion durch EBV, das heißt, bei einer infektiösen Mononukleose in der Mehrzahl vor-

handen. Vor allem bei älteren Patienten und chronisch Kranken können Rheumafaktoren zu falsch positiven Befunden führen. Bei einigen NPC-Patienten war dies der Fall, da nach Elimination der Rheumafaktoren durch Adsorption an Latex der IgM-Test negativ ausfiel. Nur wenige Patienten hatten IgM-(VCA-)Antikörper gebildet. IgM-Antikörper sind somit ohne Bedeutung für den serologischen Nachweis eines Nasopharynxkarzinoms.

b) *IgG-Antikörper* persistieren nach einer Infektion lebenslang. Während sie bei einer infektiösen Mononukleose immer erhöht sind, finden sich auch bei den anderen Kontrollen gelegentlich erhöhte Titer. Bei NPC-Patienten finden sich zum Teil extrem hohe Titer bis 1:16384. IgG-Antikörper sind somit für NPC-Patienten signifikant, aber im Einzelfall der serologischen Auswertung ohne wesentliche Bedeutung.

c) *IgA-Antikörper* gegen VCA entwickelten alle NPC-Patienten. Von den Kontrollpopulationen waren im Falle der IM gelegentlich und vorübergehend niedere Titer von IgA (VCA) nachzuweisen. Bei den anderen Kontrollen sind nur selten und kaum signifikante Titer gefunden worden. Dagegen waren nur 2 Patienten mit Nasopharynxkarzinomen in diesem Test negativ. Sie waren insofern eine Ausnahme, als sie an einem ausge dehnten, die Schädelbasis infiltrierenden Karzinom litten, an dem sie kurz nach der Blutentnahme verstarben. Lymphknoten waren keine vorhanden. Möglicherweise handelt es sich hier um einen Zusammenbruch des Abwehrsystems, der zu einem Erliegen der Antikörperproduktion führte.

IgA-Antikörper gegen VCA sind unserer Meinung nach ein überzeugender Hinweis auf das Vorliegen eines NPC.

Diskussion

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß Patienten mit Nasopharynxkarzinomen deutlich erhöhte Titer von Antikörpern verschiedener Klassen gegen unterschiedliche EBV-Antigene entwickeln.

Beweisend für das Vorliegen eines NPC sind insbesondere Antikörper der IgA-Klasse gegen das frühe Antigen (IgA-EA) sowie gegen das Virus-Kapsid-Antigen (IgA-VCA). IgG-Antikörper gegen EA, VCA und EBNA sind ebenfalls meist deutlich erhöht. Sie sind jedoch auch bei Kontrollpopulationen zu finden und damit für die Diagnose im Einzel-

fall – darauf kommt es uns besonders an – von geringerem Wert. Statistisch gesehen sind sie jedoch signifikant.

Bedenkt man, daß in 8% der Fälle zervikaler Metastasierungen zunächst kein Primärtumor gefunden werden kann (1), so bietet die serologische Untersuchung auf IgA-Antikörper eine wertvolle Ergänzung klinischer, optischer und endoskopischer Untersuchungsmethoden. Insbesondere beim lymphoepithelialen Karzinom erscheint dies bedeutungsvoll, da dieses sich nicht selten subepithelial unauffällig in der *Rosenmüllerschen* Grube entwickelt.

Die bisherige Erfassung und Beobachtung (Beginn der Studie: Frühjahr 1978) von ca. 55 unbehandelten und behandelten sowie klinisch rezidivfreien Nasopharynxkarzinompatienten lassen zudem einen Abfall der IgA-Antikörper nach erfolgreicher Behandlung erkennen. Trotz der relativ kurzen Dauer der Studie von ca. 1,5 Jahren konnten bei zunächst klinisch rezidivfreien Patienten erneute Titeranstiege festgestellt werden. In einigen Fällen war die eingeleitete Suche nach einem Rezidiv positiv.

Sollten sich unsere Beobachtungen über einen längeren Zeitraum und an einem größeren Patientengut weiter erhärten, so wäre die Bestimmung von Antikörperspektren gegen EBV und insbesondere von IgA-Antikörpern gegen VCA ein ausgezeichnetes Hilfsmittel für die Unterstützung der primären Diagnose und vorzüglich geeignet für die Überwachung und Verlaufskontrolle behandelter Patienten. Da EBV-DNA regelmäßig in den epithelialen Zellen des NPC nachgewiesen werden konnte (12, 13), liegt hier ein Test vor, der mit großer Wahrscheinlichkeit direkt mit einem ätiologisch wichtigen Agens (EBV) des NPC korreliert.

Literatur

- 1 Becker, W., C. Herberhold: Klinik der Krankheiten des zervikalen Lymphknotensystems. Betr.: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Bd. III. (Hrsg. v. Berendes, Link, Zöllner.) Thieme, Stuttgart 1978

- 2 Henle, G., W. Henle: Epstein-Barr-Virus-Spezifische IgA Serum Antikörper als ein Outstanding feature of nasopharyngeal Carcinoma. *Int. J. Cancer* 17 (1976) 1
- 3 Henle, W., G. Henle, B. A. Zajac, G. Pearson, R. Waubke, M. Scriba: Differential reactivity of human sera with early antigens induced by Epstein-Barr-virus. *Science* 169 (1970 b) 188
- 4 Henle, W., G. Henle, P. Ho, H. C. Burtin, Y. Cadin, P. Clifford, A. de Schreyer, G. De The, V. Diehl, G. Klein: Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms and control groups. *J. nat. Cancer Inst.* 44 (1970 a) 225
- 5 Henle, W., G. Henle, P. Gunvin, G. Klein, P. Clifford, S. Singh: Patterns of antibodies to Epstein-Barr-virus induced early antigens in Burkitt's lymphoma. Comparison of dying patients with long-term survivors. *J. nat. Cancer Inst.* 50 (1973) 1163
- 6 Henle, W., H. C. Ho, G. Henle, H. C. Kwan: Antibodies to Epstein-Barr-virus related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long-term survivors. *J. nat. Cancer Inst.* 51 (1973) 351
- 7 Henle, W., G. Henle, C. A. Herwitz: Epstein-Barr-virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Hum. Path.* 5 (1974) 551
- 8 Old, L. J., E. A. Boyse, H. F. Oettgen, E. De Harven, G. Gerring, B. Williamson, P. Clifford: Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc. nat. Acad. Sci.* 56 (1966) 1699
- 9 Reedman, B. M., G. Klein: Cellular localization of an Epstein-Barr-virus associated complement fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11 (1973) 499
- 10 Schmitz, H.: Improved detection of virus-specific IgM antibodies. Elimination on non-specific IgM binding. *J. gen. Virol.* 49 (1978) 459
- 11 Tovey, M. G., G. Lenoir, J. Begon-Lours: Activation of latent Epstein-Barr-virus by antibody to human IgM. *Nature (Lond.)* 276 (1978) 270
- 12 Wolf, H., H. zur Hausen, V. Becker: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature (Lond.)* 244 (1973) 245
- 13 Wolf, H., H. zur Hausen, G. Klein, V. Becker, G. Henle, W. Henle: Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. III. Epstein-Barr-viral DNA in non-lymphoid nasopharyngeal carcinoma cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 161 (1975) 15

Dr. E. Wilmes, Univ.-HNO-Klinik, Klinikum Großhadern, Marchioninstr. 15, 8000 München 70

Dr. H. Wolf, Max-von-Pettenkofer-Institut, Pettenkoferstraße 9 a, 8000 München 2