

Aus der Nervenklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. K. KOLLE)

## Immunohistologische Untersuchungen über die intrathekale $\gamma$ -Globulinbildung bei der allergischen Encephalomyelitis\*

Von

EWALD FRICK

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. März 1964)

Das fluoreszenzoptische Verfahren von COONS<sup>3</sup> gestattet es, kleine Mengen eines antigenen Materials mikroskopisch sichtbar zu machen und im histologischen Schnitt zu lokalisieren. Auch die Bildung von Antikörpern im Gewebe läßt sich verfolgen<sup>4,12</sup>. Diese werden von Zellen produziert, die infolge des durch die Immunisation gesetzten Reizes erst entstehen und als Stammzellen für die Plasmazellen zu gelten haben. Im Verlauf der Zelldifferenzierung kommt es zur Synthese des spezifischen Antikörperproteins, das im Cytoplasma gelegen ist. Antikörperbildende Zellen finden sich vorzugsweise in der roten Pulpa der Milz und in den Marklagern der Lymphknoten. — ORTEGA u. MELLORS<sup>14</sup> haben die celluläre Genese des normalen  $\gamma$ -Globulins beim Menschen studiert. In den Lymphknoten konnten drei Zellarten, die  $\gamma$ -Globuline bilden, identifiziert werden; zwei davon waren Unterformen von Plasmazellen mit und ohne Russelkörper. Große und mittlere Lymphocyten sowie primitive Reticulumzellen im Zentrum germinativum enthielten ebenfalls  $\gamma$ -Globulin. Es fand sich kein  $\gamma$ -Globulin in reifen Lymphocyten, Mastzellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Reticulumzellen, Histiocyten und Endothelzellen. — In einem lymphocytären Infiltrat konnte  $\gamma$ -Globulin nachgewiesen werden. Es wurde eine holocrine oder auch apocrine Sekretion des  $\gamma$ -Globulins angenommen, das im Cytoplasma gelegen ist und eine granuläre Struktur aufweisen kann. In der Peripherie des Zelleibes zeigten sich oft kleine Vacuolen mit nicht fluoreszierenden Zentren. — COHEN u. Mitarb.<sup>2</sup> konnten bei der postnekrotischen Lebercirrhose und der akuten Hepatitis in einer größeren Anzahl von Infiltratzellen  $\gamma$ -Globuline feststellen, das dort gebildet war. Die Klassifikation dieser Zellen war problematisch, nur wenige waren Plasmazellen nach cytologischen Kriterien. Es schien sich um verschiedengradig modifizierte reticuloendotheliale Zellen zu handeln, die in Umbildung zu Plasmazellen begriffen sind.

\* Nach einem Vortrag auf dem 2. Liquor-Kolloquium vom 4.—6. Juli 1963 in Münster.

Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen waren unsere früheren Befunde, daß bei entzündlichen Erkrankungen des Gehirns und seiner Häute  $\gamma$ -Globulin im Liquorraum selber produziert wird<sup>7,8</sup>. Die Bildungsstätten für dieses „liquoreigene“  $\gamma$ -Globulin galt es näher zu bestimmen.

### Methodik und Material

Albumin und  $\gamma$ -Globulin wurden aus normalem Meerschweinchenserum durch Auftrennung mittels der kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese auf Filtrierkarton (GRASSMANN u. HANNIG<sup>9</sup>) gewonnen. Die Reinheit der Proteinfractionen wurde papierelektrophoretisch geprüft. — Kaninchen wurden mit dem Albumin oder dem  $\gamma$ -Globulin vom Meerschweinchen nach der Freundschens Adjuvantentechnik<sup>5</sup> immunisiert. Jedes Tier erhielt dreimal je 20 mg Protein intramuskulär in Abständen von 4 Wochen. 6 Wochen danach injizierten wir zweimal mit achttägigem Abstand je 10 mg Eiweiß ohne Adjuvans subcutan und gewannen 10 Tage später die Immunsereen. Die Spezifität der Immunsereen wurde im Ouchterlony-Test<sup>15</sup> geprüft; als Antigene wurden das Meerschweinchen-Albumin oder  $\gamma$ -Globulin in einer 100 mg-%igen Lösung und 1:50 verdünntes Meerschweinchenserum verwendet. Bei dieser Versuchsanordnung kam jeweils nur eine Präcipitationslinie zur Darstellung. Der Antikörpertiter wurde im Ringtest ermittelt, wobei eine 50 mg-%ige Albumin- oder  $\gamma$ -Globulinlösung unterschichtet wurde. Immunsereen mit einem Titer von mindestens 1:128 wurden gepoolt und mittels  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gefällt<sup>1</sup>, das Präcipitat wurde in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (0,15 mol. NaCl, 0,15 mol.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf pH 8,0 eingestellt) aufgelöst und dialysiert. Das gereinigte Kaninchenimmunsereum wurde mit Fluorescein-iso-thio-cyanat konjugiert<sup>13</sup>; das Konjugat wurde in der Sephadex-Säule G-25 von dem überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff getrennt<sup>11</sup> und anschließend noch etwa 48 Std bei + 4°C gegen gepufferte Kochsalzlösung pH 7,0 dialysiert. Anschließend wurde es dreimal mit acetongetrocknetem Rattenleberpulver absorbiert<sup>3</sup>. Die fluochromierten gereinigten Seren wurden steril filtriert, in Portionen abgefüllt, eingefroren und bei — 35°C aufbewahrt.

20 Meerschweinchen im Gewicht von 300—400 g dienten als normale Kontrollen. — 25 Meerschweinchen der gleichen Gewichtsklasse wurden nach der Freundschens Methode<sup>5</sup> unter Verwendung einer 20%igen wäßrigen homologen Hirnemulsion immunisiert. Etwa 14 Tage später erkrankten die Tiere mit den typischen Symptomen der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE), ataktischen Gangstörungen, querschnittsförmigen Lähmungen. Auf dem Höhepunkt der Erkrankung, meist 3—5 Tage nach deren Beginn, wurden die Tiere getötet und untersucht. — Von Gehirn und Rückenmark wurden etwa 4  $\mu$  dicke Schnitte im Kryostat hergestellt. Davon wurde ein Teil, um die histologischen Veränderungen kontrollieren zu können, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, der andere wurde 30 min bei 37°C in 95%igem Äthanol fixiert und zum direkten Antigennachweis mit dem fluochromierten Immunsereum bedeckt (Methode nach COONS u. KAPLAN)<sup>3</sup>. — Die immunologische Spezifität wurde geprüft durch Vorbehandlung je eines Schnittes mit 1. unkonjugiertem Immunsereum, 2. konjugiertem Normalserum, 3. normalem Meerschweinchenserum, 4. normalem Meerschweinchenalbumin oder  $\gamma$ -Globulin. Als optische Einrichtung diente ein Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop mit Quecksilberhochdruckbrenner Osram HBO 200.

### Befunde

1. 15 Meerschweinchen mit einer EAE wurden untersucht. — Die *Hämatoxylin-Eosin-Präparate* ergaben den üblichen Befund einer disseminierten Encephalomyelitis mit bevorzugtem Befall der weißen Substanz

und der subependymären Region. Die zahlreichen Infiltrate waren meistens um die kleinen Venen angeordnet. Sie bestanden aus kleinzelligen Elementen, vorwiegend Lymphocyten — eine sichere Differenzierung von Plasmazellen war am Gefrierschnitt nicht möglich. Auch vereinzelte polymorphkernige Leukocyten waren vorhanden. Sehr ausgeprägte Infiltrate waren in den Meningen, gelegentlich war auch der Plexus in den Seitenventrikeln befallen. — Die *fluoreszenzmikroskopische*

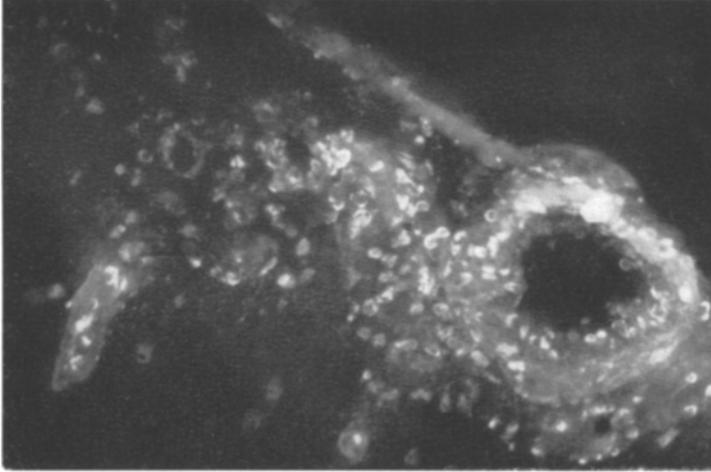


Abb. 1. Kleinzelliges Infiltrat im Hirngewebe. Im Plasma der Zellen  $\gamma$ -Globulin, das hell fluoresciert. Daneben mehr homogene, teils fleckförmige Fluoreszenz infolge einer diffusen Verteilung von  $\gamma$ -Globulin im Gewebe; etwa 150fach

*Untersuchung* unter Verwendung des Immunsersums gegen Meerschweinchen- $\gamma$ -Globulin hatte folgende Ergebnisse: In den kleinen Infiltratzellen in Gehirn, Rückenmark und Plexus (Abb. 1) zeigte sich eine helle Fluoreszenz des Plasmas. Eine besondere Struktur des fluoreszierenden Materials, granuläre oder globuläre Anordnung, wie sie in den plasmatischen Zellen von Lymphknoten und Milz zu beobachten ist, war nicht zu erkennen. Leukocyten wiesen keine Fluoreszenz auf. Die Infiltratzellen der Leptomeninge ergaben den gleichen Befund (Abb. 2); hier waren auch Zellen mit größerem, teils bohnenförmigem Kern zu sehen, deren Cytoplasma kräftig fluorescierte und die als sog. histiogene Lymphocyten in der Liquorcytologie bekannt sind (Abb. 3). — Durch Prüfung auf immunologische Spezifität (s. o.) ließ sich nachweisen, daß die Fluoreszenz durch im Cytoplasma der Infiltratzellen gelegenes  $\gamma$ -Globulin hervorgerufen wurde. — In den oft ausgedehnten Infiltraten und besonders in Nähe der kleinen Gefäße, der Venolen, war eine homogene, manchmal fleckförmige stärkere Fluoreszenz vorhanden, die für eine diffuse Verteilung von  $\gamma$ -Globulin im Gewebe sprach (Abb. 1). Mit dem Immunsersum gegen

Albumin zeigte sich in den Infiltratzellen kein fluorescierendes Material, jedoch war die homogene Fluoreszenz um die kleinen Gefäße herum ebenfalls zu erkennen.

2. Bei den *normalen Kontrollen* ließen sich Albumin und  $\gamma$ -Globulin weder in den Zellen der Leptomeninx noch in den die Gefäße begleitenden bindegewebigen Elementen von Gehirn und Rückenmark nachweisen, ebensowenig in den Gefäßendothelien und den Ganglienzellen. — Die weiteren Befunde am Normaltier — vom Plexus, Ependym — sollen hier nicht berücksichtigt werden, da sie mit der aufgeworfenen Fragestellung nach der Herkunft von Immunglobulinen bei der EAE in keinem Zusammenhang stehen.

### Besprechung der Versuchsergebnisse

Die lymphocytären und plasmacellulären *Infiltratzellen* im Zentralnervensystem, den Meningen und Plexus bei der EAE enthalten  $\gamma$ -Globulin. Diese Feststellung steht in Parallele zu Beobachtungen an anderen Organen<sup>2,14</sup>. Die bei der EAE im Liquor nachgewiesene intrathekale  $\gamma$ -Globulinbildung wird hierdurch erklärt<sup>8</sup>. Das  $\gamma$ -Globulin

gelangt aus den Zellen in den Liquor, dabei sind Vorgänge nach Art der holocrinen oder apocrinen Sekretion anzunehmen. — Bei Untersuchungen zur Pathogenese der EAE konnte RIDLEY<sup>16</sup> ebenfalls  $\gamma$ -Globulin mit der auch von uns benutzten fluoreszenzmikroskopischen Technik in Lympho-

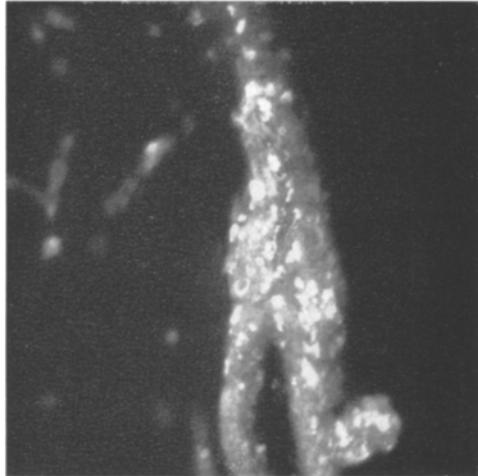


Abb. 2.  $\gamma$ -Globulin in Infiltratzellen der Leptomeninge; etwa 150fach



Abb. 3. „Histiogene“ Lymphocyten der Meningen mit  $\gamma$ -Globulin im Cytoplasma; etwa 350fach

cyten und Plasmazellen nachweisen. — Das  $\gamma$ -Globulin wird ganz offensichtlich von diesen Zellen gebildet. Die  $\gamma$ -Globulinproduktion ist als immunologischer Abwehrvorgang zu interpretieren. Eine weitere Aussage erschien uns schon früher<sup>8</sup> nicht möglich; Antikörper gegen Hirngewebe hatten sich im Liquor bei an EAE erkrankten Tieren nicht auffinden lassen. Auch RIDLEY<sup>16</sup> vermochte keine Antikörper gegen Hirngewebe oder gegen Tuberculoproteide festzustellen; es war ferner kein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Bildung des  $\gamma$ -Globulins und der Manifestation der neurologischen Ausfälle gegeben. Das  $\gamma$ -Globulin ist wahrscheinlich kein kausaler Faktor für den Krankheitsprozeß.

Das in den encephalitischen Herden besonders in Umgebung der Gefäße anzutreffende *extracelluläre  $\gamma$ -Globulin* könnte von den dort anwesenden kleinen Infiltratzellen gebildet worden sein, wie RIDLEY<sup>16</sup> annimmt, es ist aber auch möglich, daß es auf Grund einer „Schrankenstörung“ aus dem Gefäßsystem ins Gewebe übergetreten ist. Durch Untersuchungen mittels Autoradiographie und Verwendung von heterologen mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugierten Proteinen hat sich ergeben<sup>17</sup>, daß morphologische Gefäßveränderungen bei der EAE meist mit erhöhter Permeabilität für Eiweißkörper einhergehen, ohne daß Entzündungszellen anwesend zu sein brauchen. Für eine Schrankenstörung spricht die von uns festgestellte gleichzeitige Anwesenheit nicht nur von  $\gamma$ -Globulin, sondern auch von Albumin um die entzündlich-infiltrierten Gefäße herum. Wir halten es daher für wahrscheinlicher, daß das in den Entzündungsherden extracellulär gelegene  $\gamma$ -Globulin aus dem Serum und nicht von den Infiltratzellen stammt, zumal auch an anderen Organen ein Übertritt des  $\gamma$ -Globulins von den Entzündungszellen ins Gewebe nicht beobachtet wurde<sup>2,14</sup>.

Die an den *Kontrolltieren* erhobenen Befunde zeigen, daß weder Albumin noch  $\gamma$ -Globulin normalerweise in den Zellen der Leptomeninx oder in dem Gefäßbindegewebe von Gehirn und Rückenmark gebildet werden. Diese Beobachtung bestätigt unsere früheren Untersuchungen<sup>6,7</sup>, die mit J<sup>131</sup>-markierten Proteinen durchgeführt worden waren, daß das Albumin und  $\gamma$ -Globulin des Liquors unter normalen Bedingungen aus dem Serum stammen und nicht im Liquorraum selber entstanden sind.

Herrn Professor Dr. O. STOCHDORPH danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der histologischen Präparate.

### Zusammenfassung

Durch immunhistologische Untersuchung mit Fluoresceinisothiocyanat konjugierten Antiseren gegen Albumin und  $\gamma$ -Globulin läßt sich zeigen, daß bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) des Meerschweinchens  $\gamma$ -Globulin von den Infiltratzellen in Gehirn, Rückenmark, Plexus und Leptomeninx gebildet wird. Die bei der EAE im

Liquor zu beobachtende intrathekale, „liquoreigene“  $\gamma$ -Globulinproduktion wird hierdurch erklärt; von den lymphocytären und plasmacellulären Entzündungszellen gelangt das  $\gamma$ -Globulin über eine holocrine oder apocrine Sekretion in den Liquor. — Albumin und  $\gamma$ -Globulin finden sich normalerweise nicht in den Zellen der Leptomeninx oder in dem Gefäßbindegewebe von Gehirn und Rückenmark.

### Summary

Using antisera against albumin and  $\gamma$ -globulin labelled with fluorescein isothiocyanate it can be shown that in an experimental allergic encephalomyelitis of the guinea pig  $\gamma$ -globulins are produced by cells infiltrating brain, spinal cord, plexus and leptomeninges. The occurrence of  $\gamma$ -globulin in spinal fluid in this conditions is thus explained. It is assumed that the  $\gamma$ -globulins are secreted by the cells of the inflammatory tissue cells since normally albumin and  $\gamma$ -globulin are not found in cells of leptomeninges or the connective tissue of blood vessels in brain or spinal cord.

### Literatur

- <sup>1</sup> CHRISTIAN, C. L.: Characterization of the "reactant" (gamma Globulin factor) in the F II precipitin reaction and the F II tanned sheep cell agglutination test. *J. exp. Med.* **108**, 139 (1958).
- <sup>2</sup> COHEN, S., G. OHTA, E. J. SINGER, and H. POPPER: Immunocytochemical study of gamma globulin in liver in hepatitis and postnecrotic cirrhosis. *J. exp. Med.* **111**, 285 (1960).
- <sup>3</sup> COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.* **91**, 1 (1950).
- <sup>4</sup> — E. H. LEDUC, and J. M. CONNOLLY: Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. exp. Med.* **102**, 49 (1955).
- <sup>5</sup> FREUND, J., and K. McDERMOTT: Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **49**, 548 (1942).
- <sup>6</sup> FRICK, E., u. L. SCHEID-SEYDEL: Untersuchungen mit  $J^{131}$ -markiertem Albumin über Austauschvorgänge zwischen Plasma und Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wschr.* **36**, 66 (1958).
- <sup>7</sup> — — — Untersuchungen mit  $J^{131}$ -markiertem  $\gamma$ -Globulin zur Frage der Abstammung der Liquoreiweißkörper. *Klin. Wschr.* **36**, 857 (1958).
- <sup>8</sup> — — — Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen allergischen Encephalomyelitis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **183**, 363 (1962).
- <sup>9</sup> GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Präparative Elektrophorese; in HONTEN-WEYL: *Methoden der organischen Chemie*, 4. Aufl., Bd. I/1, S. 685. Stuttgart: Thieme 1958.
- <sup>10</sup> HOFMANN, G., u. H. LEUPOLD-LÖWENTHAL: Studien zur Bluthirn- und Blutliquorschranke. 1. Mitteilung: Über den Durchtritt von Jod 131 markiertem Albumin durch den Plexus chorioideus. *Wien. Z. Nervenheilk.* **12**, 168 (1956).
- <sup>11</sup> KILLANDER, J., J. PONTÉN, and L. RODÉN: Rapid preparation of fluorescent antibodies using gel-filtration. *Nature (Lond.)* **192**, 182 (1961).

- <sup>12</sup> LEDUC, E. H., A. H. COONS, and J. M. CONNOLLY: Studies on antibodies production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. *J. exp. Med.* **102**, 61 (1955).
- <sup>13</sup> MARSHALL, J. D., W. C. EVELAND, and C. W. SMITH: Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.-Y.)* **98**, 898 (1958).
- <sup>14</sup> ORTEGA, L. G., and R. C. MELLORES: Cellular sites of formation of gamma globulin. *J. exp. Med.* **106**, 627 (1957).
- <sup>15</sup> OUCHTERLONY, O.: Antigen-antibody reactions in gels. IV. *Acta path. microbiol. scand.* **32**, 231 (1953).
- <sup>16</sup> RIDLEY, A.: Localization of gamma-Globulin in experimental encephalitis by the fluorescent antibody technique. *Z. Immun. Allergieforsch.* **125**, 173 (1963).
- <sup>17</sup> SEITELBERGER, F., u. K. JELLINGER: Die pathologische Anatomie der allergischen Erkrankungen des Nervensystems. *Wien. klin. Wschr.* **75**, 475 (1963).

Professor Dr. E. FRICK, 8 München 15, Nußbaumstraße 7,  
Universitäts-Nervenlinik