

Über die Anwendung der sog. Mixed Agglutination zum immunhistologischen Antigennachweis in der Zelle*

W. VOGEL, F. KATZENMEIER und O. HAFERKAMP

Pathologisches Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Eingegangen am 4. Juli 1966

Für den immunhistologischen Nachweis von Antigenen — und in analoger Weise auch von Antikörpern — im Gewebe stand bisher nur die fluoreszenzmikroskopische Methode von COONS und KAPLAN (1950) zur Verfügung, wenn man von dem Verfahren einer Isotopenmarkierung etwa des Antigens absieht. Das Verfahren von COONS und KAPLAN (1950) gestattet zwar eine annähernd genaue Antigenlokalisation, es ist aber hinsichtlich der Spezifität trotz zahlreicher Kontrolluntersuchungen oft unsicher in seiner Aussage. Auf der Suche nach einer spezifischen, einfach zu handhabenden und leicht im Lichtmikroskop ablesbaren Methode bot sich uns nun die sog. „Mixed Agglutination“ von Erythrocyten an, deren Prinzip 1939 von WIENER und HERMAN beschrieben worden war. Bei diesem Verfahren wird das Antigen im Gewebe durch eine Agglutination von Erythrocyten auf dem Gewebsschnitt sichtbar gemacht, da sich die Erythrocyten nur über den antigenhaltigen Bezirken zusammenballen.

Zur Erklärung dieser Methode sei angenommen, daß die Lokalisation des leberspezifischen Antigens durch mixed agglutination festzustellen wäre. Dann müßten sich also die Erythrocyten über diesem Gewebe zusammenballen. Um aber diese Agglutination der Erythrocyten über der Antigenlokalisation zu erreichen, müssen sowohl das Gewebe als auch die roten Blutkörperchen entsprechend vorher behandelt werden. Das Gewebe aus einer Rattenleber — wie es in Abb. 1 schematisch wiedergegeben ist — wird zuerst mit einem Kaninchenserum mit Antikörper gegen Rattenlebermikrosomen überschichtet, da ja das leberspezifische Antigen nach WEILER (1956) in der Mikrosomenfraktion verankert ist. Dabei wird dieser Antikörper, ein Kaninchen- γ -Globulin, im Gewebe an den Mikrosomen der Rattenleberzellen fixiert. Anschließend wird das Gewebe mit einer Aufschwemmung von Erythrocyten bedeckt, an deren Oberfläche man einen Antikörper gegen Kaninchen- γ -Globulin fixiert hat. Die Bindung des Anti-Kaninchen- γ -Globulin an die Erythrocyten wird dadurch erreicht, daß mit Kaninchen- γ -Globulin überzogene Schaferythrocyten in ein hochtitriges, unverdünntes oder nur kaum verdünntes Antiserum gegen Kaninchen- γ -Globulin gebracht werden. Es binden sich dann zwar die Antikörper aus diesem Antiserum gegen das Kaninchen- γ -Globulin an der Oberfläche der Erythrocyten, sie behalten aber im Sinne des sog. Prozonenphänomens noch genügend freie Valenzen, um mit Kaninchen- γ -Globulin — etwa im Gewebe — noch einmal zu reagieren. Auf Grund dieser freien Valenzen werden dann die Schaferythrocyten mit ihrer Antikörperhülle gegen Kaninchen- γ -Globulin auf einem Gewebe stets dort fixiert und agglutiniert, wo Kaninchen- γ -Globulin gebunden ist, in unserem Falle also auf den Leberzellen.

Das Antigen in den Leberzellen wird also zunächst von einem nicht sichtbaren Kaninchen- γ -Globulin (= Antikörper gegen Rattenlebermikrosomen) und von einem an die Erythrocyten gebundenem Anti-Kaninchen- γ -Globulin (= Anti-Antikörper) überdeckt. Diese Methode entspricht in etwa dem indirekten Sandwichverfahren von COONS und KAPLAN, nur wird dabei statt der Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat die Agglutination der Erythrocyten benutzt, um die stattgehabte Bindung sichtbar zu machen.

* Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die Mixed Agglutination diente bisher vorwiegend der Aufdeckung von Blutgruppenantigenen an der Oberfläche einzelner Zellen (COOMBS, 1961). Darüber hinaus wurde sie in diesem Jahrzehnt auch zur Aufdeckung von Antigenen in der Zellmembran einzelner Zellkulturen angewandt (HÖGMAN, 1959). So konnten ESPMARK und FAGRAEUS (1961) Oberflächenantigene an virusinfizierten Zellen bei Pocken, Masern und Hundestaupe, später auch bei Herpes simplex und Schnupfen nachweisen. BARRON, MILGROM, KARZON und WITEBSKY (1963) fanden, daß diese Methode ausreichend zur Messung des Antikörpertiters bei Masern war. Kürzlich konnten TÖNDER, MILGROM und WITEBSKY (1964) an Gewebsschnitten auch offen-

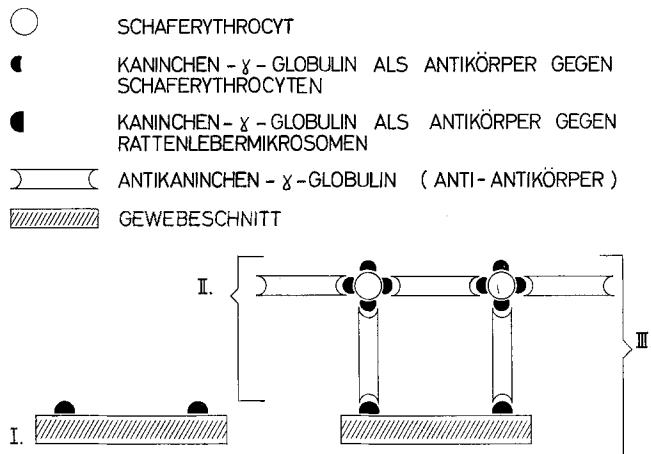


Abb. 1. Schematische Darstellung des Prinzips der Mixed Agglutination. I Mit Antikörper überschichteter Gewebsschnitt auf einem Deckglas; II Indicatorsystem: Schaferythrocyten mit einer Antikörperhülle gegen Kaninchen- γ -Globulin, III Bindung des Indicatorsystems an die Antikörperschicht über dem Gewebsantigen

bar intracellulär gelegene, vorwiegend speciesspezifische Antigene in Rinderorganen durch dieses Verfahren aufdecken. Dazu benutzten sie nicht wie bisher isolierte ganze Zellen oder Kulturen solcher, sondern sie eröffneten die Zelle durch einen Mikrotomschnitt, wobei die intracellulär gelegenen Antigene für eine Antigen-Antikörper-Reaktion im Rahmen der Mixed Agglutination frei zur Verfügung standen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit der Mixed Agglutination für immunhistologische Belange anhand solcher Untersuchungen zu überprüfen, für die neben serologischen auch immunhistologische Methoden, wie z.B. die Fluoreszenzmikroskopie bereits positive Resultate ergeben hatten. Besonders günstig schienen uns dabei die mehrfach bestätigten (DAY, 1965) immunhistologischen und serologischen Untersuchungsergebnisse (Methode von COONS und KAPLAN, Komplementbindungsreaktion) von WEILER (1956) für den Nachweis von leberspezifischen Antigenen und dem entsprechenden Antigenverlust bei Hepatomen. Werden hierfür doch zur Gewinnung der Antiseren Mikrosomen, Mitochondrien und — zu Kontrollzwecken — Kerne der Leberzellen verwandt, was für unsere Fragestellung bedeutsam war. Weiter sollte auch mit der Mixed Agglutination die von SOBBE, HAVERKAMP, DOEPFMER (1966) hergestellten Kaninchen-Antiseren gegen menschliches Sperma an menschlichem Hodengewebe ausgetestet werden.

Methodik

A. Immunisierung von Kaninchen gegen Lebergewebe der Ratte und histologische Austestung dieser Antiseren mit der Methode von COONS und KAPLAN

Antigengewinnung. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Antigenen diente normale Rattenleber. Die Verarbeitung des Gewebes ging nach der von WEILER (1965) beschriebenen Präparationstechnik mit der Ultrazentrifuge vor sich, um die Fraktion der Zellkerne, der Mitochondrien und Mikrosomen zu isolieren. Jede Fraktion wurde elektronenmikroskopisch auf ihre Reinheit hin kontrolliert. Zur *Immunisierung* wurden je zwei Kaninchen mit der Zellkern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion der normalen Rattenleber entsprechend den Angaben von WEILER (1956) verwandt. Nach 4 Wochen wurde von sechs Tieren das Serum steril gewonnen. Die bei der Sensibilisierung der Kaninchen zu erwartenden unspezifischen Antikörper gegen Rattengewebe überhaupt wurden durch erschöpfende Absorption nach den Angaben von WEILER (1956) entfernt.

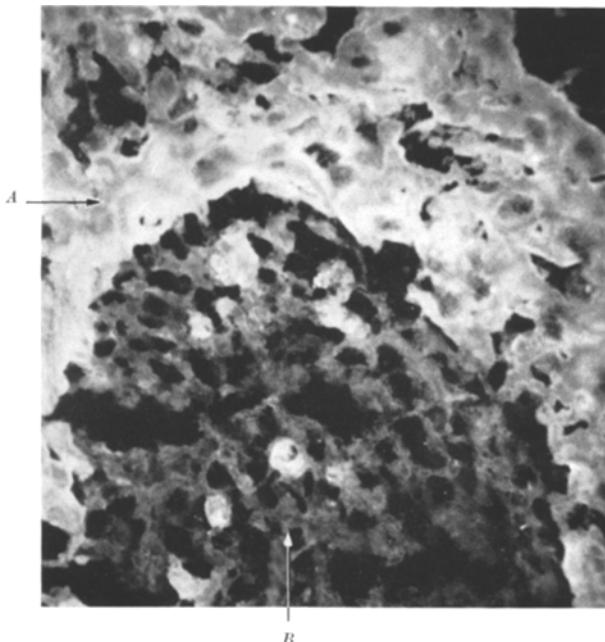


Abb. 2. Rattenleber mit Hepatominfiltat. Indirekte Methode nach COONS und KAPLAN mit Überschichten des unfixierten Gewebschnittes zuerst mit einem an Ratteniere absorbierten Kaninchenserum (K 520) gegen Rattenlebermikrosomen und dann mit einem an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelten Anti-Kaninchen- γ -Globulin vom Schaf. Bei A im Präparat gelbgrüne, in der Wiedergabe weißliche, markierende Fluoreszenz im Cytoplasma der Leberzellen bei fehlender Fluoreszenz des Hepatominfiltates (bei B). Vergr. 390 \times

Methode von COONS und KAPLAN. Nach Absorption wurden die Kaninchen-Antiseren auf unfixierte, mit Methylalkohol, mit 4%igem Formalin (pH 7,2) oder mit Aceton fixierte (5 min) Kryostatschnitte (5 μ) von Rattenlebern und mit Diäthylnitrosamin erzeugten Rattenhepatomen, Rattenieren- und Rattenparotisgewebe gebracht und nach 30minütiger Inkubation abgespült. Dann gelangte auf die Schnitte ein an Fluoresceinisothiocyanat gekoppeltes Schaf- γ -Globulin eigener Herstellung (genaue Methodik in Anlehnung an HAFFERKAMP u. Mitarb., 1962). Die Reinigung der Conjugate geschah nach den Angaben von McDEVITT et al. (1963).

Ergebnis. Während die Leberzellen bei Verwendung der Antiseren gegen Lebermikrosomen und —-mitochondrien — gleichgültig ob fixierte oder unfixierte Schnitte vorlagen — eine um die Kerne verstärkte gelbgrüne Fluoreszenz ihres Cytoplasmas aufweisen, fehlt eine solche Markierung bei den Hepatomzellen und auch bei den normalen Leberzellen, wenn diese mit den Antiseren gegen Leberzellkerne bei der Methode von COONS und KAPLAN behandelt

worden waren (s. Abb. 2). Dieser Befund deckt sich mit den Resultaten von WEILER. Die erfolgte Absorption bestätigte sich in einer fehlenden markierenden Fluoreszenz der Nieren- und Parotisschnitte bei obiger Technik. Im übrigen wurden bei der Methode von COONS und KAPLAN — wie oben fixierte und unfixierte — Schnitte aus Rattenlebern, -hepatomen, -nieren oder -parotiden zu Kontrollzwecken mit — wie die Antiseren absorbierten — Kaninchennormalserum anstelle der Kaninchen-Antiseren (Kontrolle I) oder als (Kontrolle II) mit ungekoppeltem Schaf- γ -Globulin — mit Antikörpereigenschaften gegen Kaninchen- γ -Globulin behandelt. Bei allen Kontrollen ergab sich keine markierende gelbgrüne Fluoreszenz des Gewebes.

B. Antiseren von Kaninchen gegen menschliches Hodengewebe (Sperma)

Es wurden die von SOBBE, HAVERKAMP und DOEPFMER (1966) hergestellten Antiseren gegen menschliches Sperma (Versuchstier Nr. K 2 und K 3) verwandt (Methode s. bei SOBBE et al., 1966).

Methode von COONS und KAPLAN. Die Antiseren wurden mittels des indirekten Verfahrens von COONS und KAPLAN (1950) gegen unfixierte Schnitte von menschlichen Hoden ausgetestet.

Ergebnis. Es zeigte sich eine durch Kontrollen abgesicherte gelbgrüne Fluoreszenz auf den Köpfen der Spermien (s. Abb. 4a) in den menschlichen Hodenkanälchen als Ausdruck einer γ -Globulinbindung aus den erwähnten Kaninchen-Antiseren gegen menschliches Hodengewebe (Sperma). (Methodik und genaue Ergebnisse s. bei SOBBE et al., 1966).

C. Mixed Agglutination

Zum Nachweis der gelungenen Sensibilisierung der Kaninchen gegen Lebergewebe der Ratte sowie gegen menschliches Hodengewebe (Spermien) wurde die Mixed Agglutination nach der von TÖNDER, MILGROM und WITEBSKY (1964) angegebener Methode durchgeführt. Der Amboceptor (Kaninchen-Antiserum gegen Hammelerythrocyten) wurde gebrauchsfertig von der Firma Behring (Marburg/Lahn) mit einem Titer von 8000 bezogen. Das hochtitrige Anti-Kaninchen- γ -Globulinserum wurde im hiesigen Laboratorium durch Immunisierung von Schafen gegen Kaninchen- γ -Globulin hergestellt. Die Antiseren wurden vor Gebrauch bei 56° C für 30 min inaktiviert. Alle Serumverdünnungen wurden mit einer abgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (Na_2HPO_4 — KH_2PO_4) bei pH 7,2 durchgeführt. Es wurde nicht nur für die Austestung der gegen Lebermikrosomen, -mitochondrien und -zellkerne gerichteten Kaninchen-Antiseren von Leber- und Hepatomgewebe, sondern aus Kontrollgründen auch von Nieren- und Parotisgewebe der Ratte im Kryostat Schnitte von 4—5 μ gewonnen. Diese

Tabelle. „Mixed Agglutination“ an unfixierten Rattengewebsschnitten mit Kaninchenserien gegen die Fraktionen der Zellkerne, der Mitochondrien und Mikrosomen der Rattenleber nach Absättigung der Seren mit Nierengewebe der Ratte

Gewebsantigen	Hepatom	Leber (Titer*)	Niere	Parotis
Je 2 Antiseren gegen die Fraktion der Zellkerne der Leber				
K 516	—	—	—	—
K 517	—	—	—	—
<i>Mitochondrien der Leberzellen</i>				
K 518	—	1:80	—	—
K 519	—	1:40	—	—
<i>Mikrosomen der Leberzellen</i>				
K 520	—	1:640	—	—
K 540	—	1:1280	—	—
<u>Kontrolle: Pool mehrerer Normalseren</u>	—	—	—	—

* Titer = Verdünnung der Antiseren, bei der noch eine einfach positiv zu bewertende Erythrocyten-Agglutination sichtbar war.

wurden dann entweder mit Methylalkohol, mit 4%igem Formalin (pH 7,2) bzw. Aceton fixiert oder wurden unfixiert gelassen. Jeweils einer von den insgesamt 16 Gewebsschnitten aus den erwähnten drei Organen und dem Tumor (von jedem Gewebe je 1 unfixierter, 1 acetonfixierter, 1 methylalkoholfixierter, 1 formalinfixierter Schnitt) wurde dann anschließend mit einem der sechs in einer geometrischen Reihe verdünnten Kaninchen-Antiseren gegen die Fraktionen der normalen Leber inkubiert, so daß also jedes der drei Organe und das Hepatom

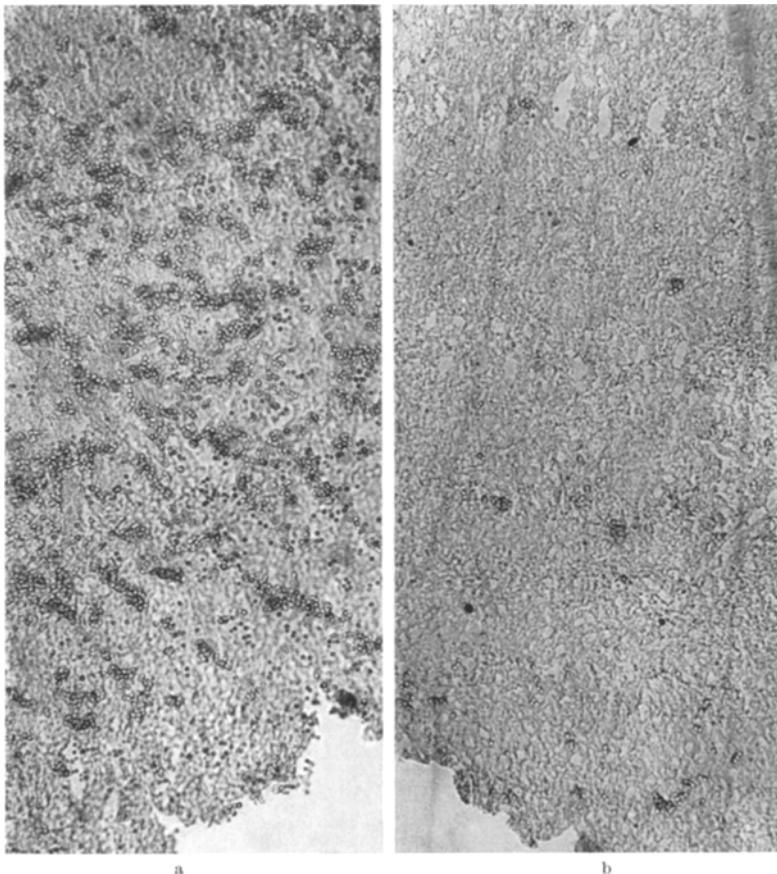


Abb. 3 a u. b. Mixed Agglutination mit einem Kaninchen-Antiserum gegen Ratten-Lebermikrosomen (K 520). a Unfixierter Gewebsschnitt einer normalen Rattenleber bei einer Antiserumverdünnung von 1:640. Bei a deutliche Agglutination der Erythrocyten des Indicatorsystems auf dem Lebergewebe (positive Reaktion). Vergr. 64×. b Unfixierter Gewebsschnitt aus einem Hepatom der Ratte. Unverdünntes Antiserum des Kaninchenserums K 520. Keine Agglutination der Erythrocyten des Indicatorsystems auf dem Hepatoma (negative Reaktion). Vergr. 40×

auch gegen jedes der sechs Antiseren bis zu einer Verdünnung von 1:2560 ausgetestet wurde. Dann wurden die Gewebsschnitte nach einer 30minütigen Inkubationszeit mit physiologischer Kochsalzlösung gut gespült und mit der 1%igen Erythrocytenlösung des Indikatorsystems überschichtet. Nach nochmaliger 2stündiger Inkubation bei 37° C in einer feuchten Kammer, ließ sich dann die Fixation und Agglutination der Erythrocyten auf der Oberfläche der Schnitte im Lichtmikroskop ablesen.

Die beiden Kaninchen-Antiseren gegen menschliches Sperma (Versuchstier K 2 und K 3) der von SOBBE et al. (1966) hergestellten Seren, wurden analog den Antiseren gegen die Rattenleberfraktionen behandelt, nur mit dem Unterschied, daß statt Leber-, Hepatom-, Parotis- oder Nierengewebe nur Hodengewebe als Antigen, — und zwar unfixiert — zur Verwendung kam.

Die Ablesung (3+, 2+, 1+, 0) der Mixed Agglutination geschah nach TÖNDER et al. (l. c. 267), (1964). Um die Ergebnisse abzusichern, wurden alle Reaktionen mit der Mixed Agglutination an verschiedenen Tagen mehrfach wiederholt, wobei die Resultate bei der Ablesung stets gleich blieben. Aus Kontrollgründen wurden alle oben angeführten Reaktionsabläufe statt mit den entsprechenden Antiseren von Kaninchen mit Kaninchen-Normalseren (Pool mehrerer normaler Kaninchenser) durchgeführt (Kontrolle s. auch Tabelle); hier fand sich in keinem Falle eine positive Reaktion.

Ergebnisse

a) Bei Verwendung der abgesättigten Kaninchen-Antiseren gegen die verschiedenen Zellbestandteile normalen Rattenlebergewebes waren positive Resultate bei der Mixed Agglutination lediglich mit den beiden Antiseren gegen die Lebermikrosomen und den beiden Antiseren gegen die Lebermitochondrien nachzuweisen, und zwar nur bei Verwendung von Gewebsschnitten der normalen Rattenleber. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Gewebsschnitte mit Aceton fixiert oder unfixiert waren; dagegen betrug die Titerhöhe bei Verwendung alkohol- und formalinfixierter Leberschnitte nur etwa den 8. Teil der Titerhöhe bei Verwendung unfixierter oder mit Aceton fixierter Leberschnitte. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, lag der Titer einer noch einfach positiv zu bewertenden Reaktion (1+) — s. Abb. 3a — bei den Antiseren gegen Lebermikrosomen wesentlich höher als bei den Antiseren gegen Lebermitochondrien. Die Abb. 3b zeigt einen unfixierten Gewebsschnitt von einem Hepatom mit negativem Ausfall der Reaktion bei Verwendung eines Antiserums gegen die Lebermikrosomen. Eine nachträgliche Durchmusterung der Fluoreszenzpräparate im Hinblick auf eine stärkere oder schwächere gelbgrüne, markierende Fluoreszenz der mit den Antiseren gegen Lebermikrosomen und der mit Antiseren gegen Lebermitochondrien behandelten Leberschnitte ließ (ohne Anfertigung der Verdünnungsreihen der Antiseren) keinen eindeutigen Unterschied in der Markierungsintensität erkennen. Das gleiche gilt auch für die unterschiedliche Fixierung der Gewebsschnitte, welche dabei keinen faßbaren Unterschied hinsichtlich der positiv zu bewertenden markierenden Fluoreszenzen zeigten.

b) Von den beiden Kaninchen-Antiseren gegen menschliches Sperma zeigte bei der Mixed Agglutination Versuchstier K 2 einen Titer von 1:20, Versuchstier K 3 einen solchen von 1:160; bis zu diesen Verdünnungsstufen der beiden Seren ließ sich eine deutliche, als 1+ zu bewertende Agglutination von Erythrocyten des Indikatorsystems im Bereich der Samenkanälchen nachweisen.

Besprechung

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigten die Anwendbarkeit der Mixed Agglutination für den Nachweis intracellulär gelegener Antigene an Gewebsschnitten, wie es auch für die vorwiegend speciesspezifischen Antigene in Rinderorganen von TÖNDER et al. (1964) beschrieben wurde. Es muß angenommen werden, daß eine große Zahl von Zellen allein schon durch den Mikrotomschnitt eröffnet wird. Eine Fixierung ist nicht unbedingt erforderlich; sie kann sogar, wie unsere Ergebnisse mit den Antiseren gegen Lebermikrosomen und Lebermitochondrien bei Verwendung von alkohol- oder formalinfixierten Leberschnitten zeigten, einen Titerabfall der Mixed Agglutination bedingen, da offenbar die Antigene durch die Fixierung ihre serologische Reaktionsfähigkeit im Rahmen der

Mixed Agglutination eingebüßt hatten. Auch TÖNDER et al. (1964) betonen das Problem der Fixierung bei ihren Untersuchungen, eine Schwierigkeit, die auch bei der Methode von COONS und KAPLAN (1950) eine hinlänglich bekannte Rolle spielt.

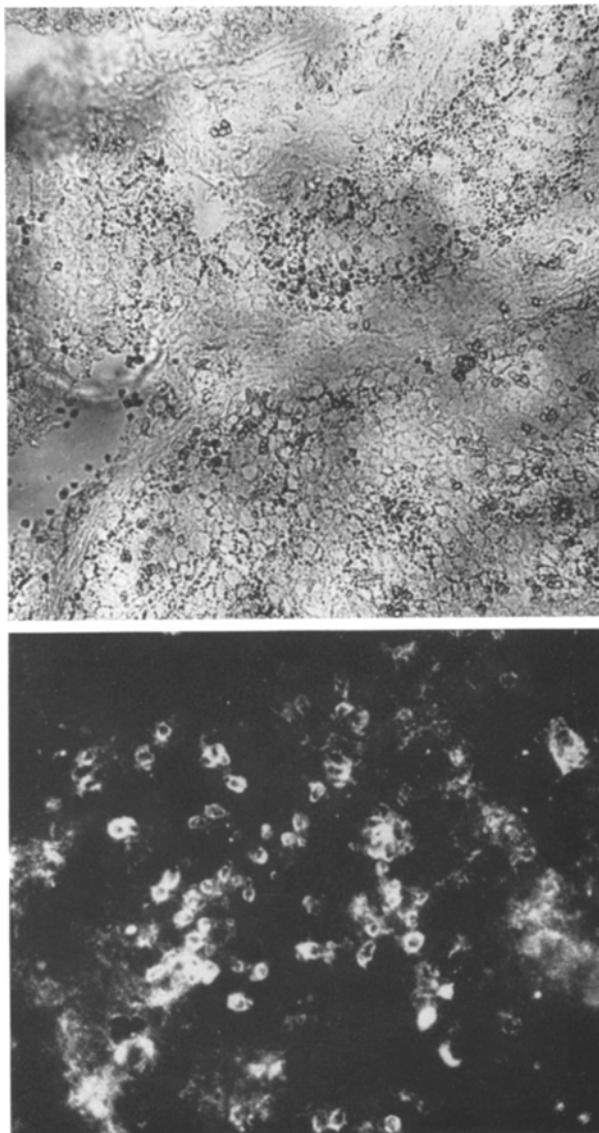


Abb. 4 a u. b. Menschlicher Hoden. a: Indirekte Methode nach COONS und KAPLAN mit Überschichten des unfixierten Gewebschnittes zuerst mit einem Kaninchenantiserum (K 3) gegen menschliches Sperma und dann mit einem an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelten Anti-Kaninchen- γ -Globulin vom Schaf. Bei a im Präparat gelbgrüne, in der Wiedergabe weiße markierende Fluoreszenz der Spermaköpfe in einem Hodenkaräfchen. Vergr. 128 \times . b: Mixed Agglutination mit einem unverdünnnten Kaninchenantiserum gegen menschliches Sperma (K 3). Bei a Agglutination der Erythrozyten des Indicatorzytens im Bereich der Sperma enthaltenden Hodenkaräfchen (positive Reaktion). Vergr. 80 \times

Der Vorteil der Mixed Agglutination liegt einmal in ihrer hohen Empfindlichkeit, mit der sie Antigene des Gewebes — und im Gewebe — aufdeckt (COOMBS, 1961). Das geht auch aus unseren Ergebnissen mit den Antiseren gegen Leberzellpartikel hervor: Antiseren gegen die Mikrosomen zeigten bei der Mixed Agglutination einen wesentlich höheren Titer gegen normales Lebergewebe als die Antiseren

gegen die Mitochondrien. Zu einem etwa analogen Ergebnis waren mittels der Komplementbindungsreaktion auch FISCHER und WEILER (1962) gekommen. Weiter scheint die Mixed Agglutination sich auch durch eine hohe Spezifität auszuzeichnen (s. auch COOMBS, 1961); so fanden wir bei ihrer Anwendung keine positive Reaktion unserer gegen Lebermikrosomen und -mitochondrien gerichteten Antiseren mit Hepatom-, Nieren- oder Parotisgewebe der Ratte, ganz entsprechend den Ergebnissen WEILERS (1956) mit der Komplementbindungsreaktion gegen Hepatom- und Rattenierenpartikel sowie KLEIN und BURGHOLDER (1959) mit der immunhistologischen Methode nach COONS und KAPLAN (1950). Gegenüber der Komplementbindungsreaktion hat die Mixed Agglutination für den mehr morphologisch ausgerichteten Immunologen aber den Vorteil, daß das Antigen auf und im Gewebe — und auch in den Zellen — durch die Lage der Erythrocyten des Indikatorsystems — zumindest im Sinne eines lokalisatorischen Hinweises — markiert wird. So konnten wir bei der Verwendung der beiden Antiseren gegen menschliches Sperma nicht nur mittels der Mixed Agglutination einen Titer bestimmen — was allerdings nach BEUTNER et al. (1961) auch für die Methode von COONS und KAPLAN (1950) durch Antiserumverdünnungen möglich ist — sondern auch Antikörper gegen Sperma durch die Erythrocytenlagerung im Bereich der Hodenkanälchen dort lokalisieren, wo sich die Spermien befinden.

Da mit der Mixed Agglutination ähnlich der indirekten Methode von COONS und KAPLAN (1950) ein Antikörper nur auf Grund seines γ -Globulincharakters nachgewiesen wird, sind auch für die Mixed Agglutination Kontrollen notwendig. Diese müssen ausschließen, daß es im Gewebe zu einer unspezifischen Bindung von γ -Globulin gekommen ist, ohne daß eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion mit einem gewebsständigen Antigen vorliegt. Die Kontrollen sind dementsprechend im wesentlichen die gleichen wie für die Methode von COONS und KAPLAN (1950). Insbesondere muß auch ausgeschlossen werden, daß ein nicht spezifisch sensibilisiertes Tier — in unserem Falle Normalkaninchen — mit seinem Serum einen positiven Reaktionsausfall bei der Mixed Agglutination bedingt, dadurch, daß unspezifische γ -Globuline im Gewebe haften. Eine Kontrolle mit einem anderen Gewebe als dem zu testenden, kann dann den spezifischen Ausfall auch der Mixed Agglutination mehr oder weniger sicherstellen. Die indirekte Methode nach COONS und KAPLAN (1950), mit der die Mixed Agglutination am ehesten verglichen werden kann, hat im Hinblick auf die Spezifität gegenüber der Mixed Agglutination den Nachteil, daß sie trotz Reinigung der Fluoreszenzfarbstoff- γ -Globulin-Conjugate zu einer völlig unspezifischen, sogar von einem γ -Globulingeinhalt des Gewebes unabhängigen Färbung von Organen führen kann; dabei kann eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion immunhistologisch wesentlich leichter vorgetäuscht werden als mit der Mixed Agglutination. Allerdings schließt im Gegensatz zur Immunhistologie ein negativer Ausfall der Mixed Agglutination keinesfalls aus, daß nicht doch intracellulär ein Antigen verborgen ist, an welches das Indikatorsystem auf Grund der Größe der Erythrocyten nicht gelangen kann, weil eben die in Frage kommenden Zellen nicht oder nur ungenügend eröffnet oder aufgeschlossen waren. Dementgegen dringt das Indikatorsystem der indirekten Methode von COONS und KAPLAN (1950) eben der an Fluoreszenzfarbstoff gebundene Anti-Antikörper verständlicherweise wesentlich leichter in die Zellen ein. Hieraus kann der Schluß gezogen werden, daß gewissermaßen

nur der positive Ausfall der Mixed Agglutination zur Absicherung der positiven immunhistologischen Ergebnisse im Hinblick auf die intracellulär gelegenen Antigene einen Beweis bietet.

Für extracellulär gelegene Antigene oder in der Zellmembran befindliche Antigene ist die Mixed Agglutination auch in ihrem negativen Ausfall als Kontrolle für die Immunhistologie zu bewerten.

Zusammenfassung

Anhand von Kaninchen-Antiseren gegen die Mikrosomen-, Mitochondrien- und Kernfraktion von Rattenlebern wird — in der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion — die Mixed Agglutination als eine fast im makroskopischen Bereich liegende, hochempfindliche Methode beschrieben, die Hinweise auf im Gewebe lokalisierte Antigene gestattet und gleichzeitig auch den von WEILER (1956) beschriebenen Antigenverlust bei Hepatomen bestätigt.

Durch Verwendung von Antiseren gegen menschliches Sperma gelingt mit der Mixed Agglutination eine Lokalisation des Antigens im Gewebe, die Erythrocyten agglutinieren über den Tubuluslichtungen.

Bei der Suche nach einem zellständigen Antigen stellt die Mixed Agglutination eine Methode dar, welche einem nachfolgend durchgeführten, indirekten Verfahren von COONS und KAPLAN (1950) im Hinblick auf ihre Spezifität vorangehen sollte. Die nähere Lokalisation der Antigene im Gewebe muß allerdings Aufgabe der Methode von COONS und KAPLAN (1950) bleiben.

Application of the Mixed Agglutination Test in the Immunhistologic Determination of Antigen in the Cell

Summary

Using rabbit antisera against microsomes, mitochondria and nuclear fraction of rat liver, the mixed agglutination test, a highly sensitive method which can be read almost macroscopically, gave positive results for tissue localized antigens only in microsomes and mitochondria fractions. At the same time, the report of WEILER (1956) on decrease in antigen due the liver cancer was confirmed. In addition, the mixed agglutination test was utilized to determine the localization of human spermatic antigen in tissue with anti-sperm serum. The erythrocytes agglutinated in the lumen of the testicular tubules. In the search for cell bound-antigen, the mixed agglutination test, which has a high degree of specificity, should be performed first. When the results are positive, it should be followed by the indirect method of COONS and KAPLAN (1950). However, to determine the point of the antigen localization in the tissue, one must utilize the method of COONS and KAPLAN¹.

Literatur

- BARRON, A. L., F. MILGROM, D. T. KARZON, and E. WITEBSKY: Demonstration of human measles antibody by mixed agglutination. *J. Immunol.* **90**, 908—913 (1963).
 BEUTNER, H. E.: Immunfluorescent staining: the fluorescent antibody method. *Bact. Rev.* **25**, 49—76 (1961).

¹ Herrn Prof. WITEBSKY und Herrn Prof. MILGROM (Buffalo/USA) danken wir für die Einarbeitungsmöglichkeit in die Technik der Mixed Agglutination.

- COOMBS, R. R. A.: The mixed agglutination reactions in the study of normal and malignant cells. *Cancer Res.* **21**, 1198—1202 (1961).
- 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—13 (1950).
- DAY, E. D.: The immunochemistry of cancer. Antigenic deletion, p. 72—82. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1965.
- ESPMARK, J. Å., and A. FAGRAEUS: Detection of antigens in tissue culture with the aid of mixed haemadsorption. *Acta path. mikrobiol. scand.* **154**, 258—262 (1962).
- FAGRAEUS, A., and J. Å. ESPMARK: Use of the mixed haemadsorption method in virus-infected tissue cultures. *Nature (Lond.)* **190**, 370—371 (1961).
- , and J. JONSSON: Mixed haemadsorption: A mixed antiglobulin reaction applied to antigens on a glass surface. Preparation and evaluation of indicator red cells; survey of present applications. *Immunology* **9**, 161—175 (1965).
- FISCHER, C., u. E. WEILER: Die histologische Darstellung des leberspezifischen Antigens und dessen Schwund in Hepatomen mit Hilfe des fluoresceinmarkierten Antikomplements. *Z. Krebsforsch.* **64**, 441—447 (1962).
- HAFERKAMP, O.: Ein tierexperimenteller Beitrag zur Immunopathologie der Speicheldrüsen. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 298—322 (1962).
- HÖGMAN, C. F.: The principle of mixed agglutination applied to tissue culture system. *Vox Sang. (Basel)* **4**, 12—20 (1959).
- KLEIN, P., u. P. BURGHOLDER: Ein Verfahren zur fluoreszenzoptischen Darstellung der Komplementbindung und seine Anwendung zur histoimmunologischen Untersuchung der experimentellen Nierenanaphylaxie. *Dtsch. med. Wschr.* **84**, 2001—2004 (1959).
- McDEVITT, H. O., J. H. PETERS, L. W. POLLARD, J. G. HARTER, and A. H. COONS: Purification and analysis of fluorescein-labelled antisera by column chromatography. *J. Immunol.* **90**, 634—642 (1962).
- NAIRN, R. C.: Immunological tracing: Tissue antigens and antibodies fluorescent protein tracing, Chapt. 9, p. 185—227. In: R. C. NAIRN, *Fluorescent protein tracing*. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone LTD 1962.
- SOBBE, A., O. HAFERKAMP u. R. DOERPFMER: Serologische und immunhistologische Untersuchungen an Sperma und Seren von Männern steriler Ehen mit tierexperimentellen Kontrollen. *Dtsch. med. Wschr.* (1966) (in Vorbereitung).
- TÖNDER, O., F. MILGROM, and E. WITEBSKY: Mixed agglutination with tissue sections. *J. exp. med.* **119**, 265—274 (1964).
- WEILER, W.: Die Änderung der serologischen Spezifität von Leberzellen der Ratte während der Cancerogenese durch p-Dimethylaminoazobenzol. *Z. Naturforsch.* **11b**, 31—38 (1956).
- WIENER, A. S., and M. HERMAN: The second stage of the agglutinative reaction. *J. Immunol.* **36**, 255—259 (1939).

Dr. med. W. VOGEL

Dr. med. F. KATZENMEIER

Prof. Dr. O. HAFERKAMP

Pathologisches Institut der Universität Bonn
53 Bonn-Venusberg