

Celluläre Immunität gegen HB-Antigen (Australia-Antigen) — *In-vitro*-Reaktionen bei Meerschweinchen und Menschen *

Ulrich Koszinowski, Andreas Schober und Reiner Thomssen

Hygiene-Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Thomssen)

Eingegangen am 21. September 1973

Cellular Immunity to HB-Antigen (Australia Antigen) — *In-vitro* Reactions in Guinea Pigs and Humans

Abstract. Guinea pigs were inoculated with purified HB-Antigen emulsified in Freund's complete adjuvant. After 16 days all animals had developed antibodies and cell-mediated immunity as revealed by macrophage-migration-test and lymphocyte transformation.

12 healthy normal persons, 11 persistent HB-antigen-carriers and 7 HB-antibody-carriers were tested for cellular immunity against HB-antigen using the leucocyte-migration-test. Specific reactions were found only in those persons, who had HB-antibody in their serum by means of counterimmunoelectrophoresis or radioimmunoassay.

Zusammenfassung. Meerschweinchen wurden mit gereinigtem HB-Antigen in Verbindung mit komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Nach 16 Tagen entwickelten alle Tiere Antikörper und eine spezifische celluläre Immunität gegen HB-Antigen, nachweisbar durch Makrophagenmigrationshemmungstest und Lymphocyten-Transformation.

12 gesunde Kontrollpersonen, 11 Patienten mit HB-Antigen-Persistenz und 7 HB-Antikörperträger wurden im Leukocytenmigrationstest auf celluläre Immunität gegen HB-Antigen untersucht. Spezifische Reaktionen wurden nur bei den Personen gefunden, bei denen sich durch Überwanderungselektrophorese oder Radioimmunassay HB-Antikörper nachweisen ließen.

Einleitung

Celluläre Immunität gegenüber Virusinfektionen kann außer durch Hauttests auch durch *in-vitro*-Reaktionen wie Lymphocyten-Transformation, Hemmung der Makrophagenwanderung und Cytotoxizitätstests nachgewiesen werden. Nach der Meinung verschiedener Autoren spielt die celluläre Immunität im Verlauf der Erkrankung an Hepatitis B eine wesentliche Rolle [2, 8]. Da die celluläre Immunität gegen den Erreger der Hepatitis B nicht untersucht werden kann, weil der Erreger bislang nicht gefunden werden konnte, wurde versucht, gegen das mit dieser Erkrankung korrelierte HB-Antigen (HB-Ag., Australia-Antigen) Im-

* Teilweise gefördert mit Mitteln des Schwerpunktes „Virushepatitisforschung“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

munantworten vom verzögerten Typ nachzuweisen. Hierbei wurde der Lymphocyten-Transformationstest [6,7,13] und der Migrationshemmungstest [3,5] angewandt. Bislang fehlen jedoch *in-vitro*-Untersuchungen mit hochgereinigtem HB-Antigen. Ungeklärt ist im tierexperimentellen Modell die Korrelation von Lymphocyten-Transformation, Makrophagenwanderungstest und Antikörperbildung bei Beginn der Immunantwort und beim Menschen das Verhältnis zwischen Antikörperbildung und cellulärer Immunität nach Maßgabe der *in-vitro*-Tests.

Material und Methoden

1. a) Als Versuchstiere dienten ca. 400 g schwere Pirbright-Meerschweinchen.

b) Versuchspersonen: Gesunde Kontrollpersonen ($n = 12$), HB-Antigen-Träger ($n = 11$) und HB-Antikörper-Träger ($n = 7$).

2. *Hepatitis B (Australia) Antigen*. Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde gereinigtes HB-Antigen verwandt. Die Reinigung, die andernorts ausführlich dargestellt wurde [10], erfolgte über eine zweimalige CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation HB-Antigen-positiven Serums-Subtyp „D“ — im Zonalrotor B XIV (Fa. Christ, Osterode), gefolgt von einer Sedimentation im Saccharosegradienten (5–25%ig, 5 Std 40000 U/min, Rotor B XIV). Die HB-Antigen-positiven Fraktionen wurden abschließend nochmals im CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert. Die auf diese Weise erhaltenen gereinigten HB-Antigen-Präparate (vgl. Abb.1) waren nach Maßgabe des Immundiffusionstests frei von kontaminierenden Serumproteinen. Auch zeigten mit diesen Präparaten hergestellte tierische Antiserum im Immundiffusionstest lediglich eine Reaktion mit HB-Antigen, nicht mit normalen Serumbestandteilen. Die Peakfraktionen des in Abb.1 dargestellten CsCl-Dichtegradienten sowie je eine der Fraktionen vor und nach der nachweisbaren HB-Antigen-Aktivität wurden mit phosphatgepufferter NaCl ultradialysiert und nach Einengung auf die Hälfte des Ausgangsvolumens sterilfiltriert. Für die Immunisierung der Tiere wurde nur die Fraktion 10 verwandt, für die *in-vitro*-Teste kamen die HB-Antigen-haltigen Fraktionen 9 und 11, als Negativkontrollen 6 und 19 zur Anwendung. HB-AG-Gehalt: Fr. 9: 10 μ g, Fr. 10: 15 μ g, Fr. 11: 43 μ g/ml.

3. *Makrophagenmigrationshemmungstest*. Die Durchführung des Wanderungstestes erfolgte in Anlehnung an die Methode von David u. David [1]. 72 Std vor Gewinnung der Makrophagen erhielten die Tiere 20 ml Thioglycolat i.p. Die Tiere wurden durch Herzpunktion entblutet. Ein Teil des Blutes wurde heparinisiert (50 E Heparin/ml Blut) und für Lymphocytentransformationen verwandt. Das Abdomen wurde freipräpariert und 20 ml Hanks mit 50 E Heparin/ml in die Bauchhöhle injiziert und die Peritonealexsudatzellaufschwemmung steril entnommen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in TCM 199 mit 15% kaolinabsorbierendem Meerschweinchenserum und 100 E Penicillin und 100 μ g Streptomycin/ml aufgenommen, in Capillaren gefüllt und in die Wanderungskammern verbracht. Die Kammern wurden anschließend mit Medium mit 20% Antigen gefüllt und 24 Std bei 37°C inkubiert. Die Area der Migration wurde auf Millimeterpapier projiziert, die Flächen ausgeschnitten, gewogen und nach der Gleichung

$$\frac{\text{Makrophagen-Wanderung in Gegenwart von Antigen}}{\text{Makrophagen-Wanderung ohne Antigen}} \times 100 = \text{Migration}$$

berechnet. Zum Ausschluß toxischer Antigenwirkung wurde die Wanderung der Makrophagen von Kontrolltieren im gleichen Test mitgeführt und die Ergebnisse nur verwertet, wenn bei diesen Tieren keine Wanderungshemmung durch Antigen auftrat.

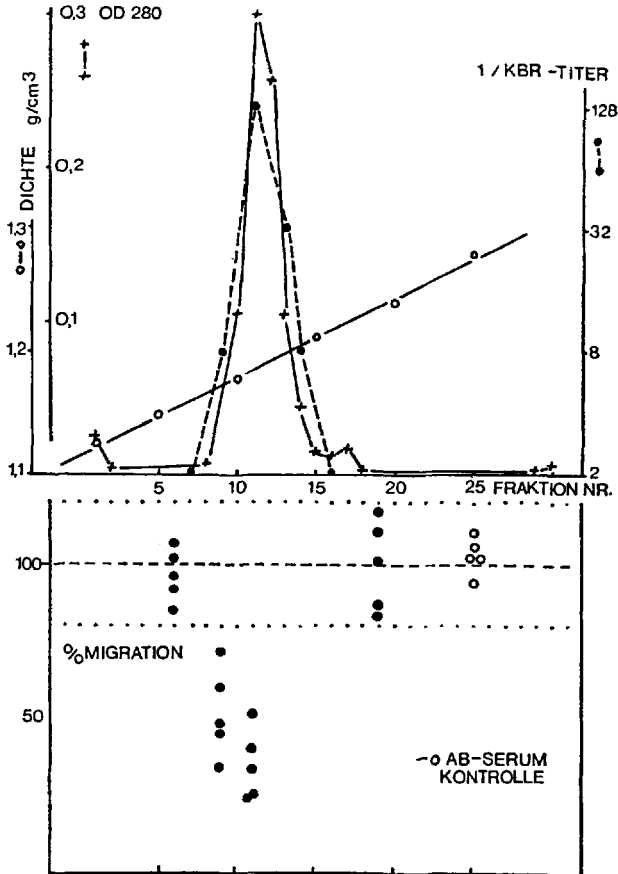


Abb.1. Spezifische Migrationshemmung durch gereinigtes HB-Antigen. Oberer Teil: Gereinigtes HB-Antigen im CsCl-Dichtegradienten (Rotor B XIV, Fa. Christ, Osterode). Unterer Teil: Wanderungshemmung der Makrophagen von immunisierten Meerschweinchen durch HB-Antigen, HB-Antigen-freie Fraktionen und humanes AB-Serum

4. Der Leukocytenmigrationstest wurde nach der Methode von Søborg [11] durchgeführt.

5. *Lymphocyten-Transformationstest.* Durch Herzpunktion wurde von Meerschweinchen Blut steril entnommen und mit 50 E Heparin/ml versetzt. Nach 1stündiger Sedimentation unter Zusatz von 10 Vol.-% Dextran (Dextran MG 250000 in 10⁰/-% Lösung) wurde der lymphocytenreiche Überstand abgehoben, zweimal in Hanks gewaschen und in Kulturmedium, bestehend aus TCM 199 mit 15⁰/-% kaolin-adsorbiertem Meerschweinchenserum, 100 E Penicillin und 100 µg Streptomycin/ml und 1⁰/-% Hepes aufgenommen. Die Lymphocytenzahl wurde auf 1 × 10⁶/ml eingestellt und je 1 ml in Kulturröhrchen überführt. Als Antigene dienten je 0,2 ml gereinigtes HB-Antigen oder HB-Antigen-haltiges Serum. Zur Proliferationskontrolle wurde Phythämagglutinin (Difco) mitgeführt. Alle Ansätze wurden mindestens 3fach vorgenommen. Die Kulturdauer betrug 120 Std. 12 Std vor Abbruch der

Kulturen wurden $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$ (spezifische Aktivität 23 mCi/mmol) hinzugefügt. Bei Kulturrende wurden die Zellen gewaschen und in physiol. NaCl aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch Filter mit $0,2 \mu\text{m}$ Porengröße filtriert und anschließend auf dem Filter mit 5% Trichloressigsäure gefällt. Die Filter wurden in Scintillationsflüssigkeit überführt und im Packard-Scintillationsspektrometer gemessen. Die Aufnahme von radioaktivem Thymidin wurde als Transformationsrate, d.h. als Verhältnis der Einbaurate antigenstimulierter zur Einbaurate der Kontrollkulturen angegeben.

6. *Antikörperbestimmungen.* HB-Antikörper wurden im Tierversuch in der Überwanderungselektrophorese gemessen, bei menschlichen Seren erfolgte die Antikörperbestimmung durch Überwanderungselektrophorese, Komplementbindungsreaktion und im Radioimmunoassay.

7. *Proteinbestimmung.* Die Proteinbestimmung der gereinigten HB-Antigenfraktionen erfolgte nach der Laurell-Methode, die an der alkalischen Ninhydrinreaktion geeicht wurde.

Ergebnisse

1. *Spezifität der Immunreaktion mit gereinigtem Antigen*

5 Meerschweinchen erhielten $50 \mu\text{g}$ gereinigtes HB-Antigen der Fraktion 10 (Abb. 1) zusammen mit komplettem Freundschem Adjuvans subcutan injiziert. Weitere Injektionen von je $25 \mu\text{g}$ HB-Antigen erfolgten am 21. und 28. Tag. Am 33. Tag erhielten die Tiere $20 \text{ ml Thioglycolat i.p.}$ und am 35. Tag wurden die Tiere getötet und der Makrophagenmigrationshemmungstest durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Wanderungshemmung nur dann, wenn HB-Antigen-haltige Fraktionen *in-vitro* als Antigen verwandt wurden, HB-Antigen-freie Fraktionen induzierten die Bildung von migrationshemmendem Faktor dagegen nicht. Ebenso fand sich keine Wanderungshemmung in Gegenwart von HB-Antigen-freiem AB-Serum.

2. *Entwicklung cellulärer und humoraler Immunität gegen HB-Antigen beim Meerschweinchen*

Meerschweinchen erhielten eine primäre Immunisation durch Gabe von $50 \mu\text{g}$ Antigen in $0,5 \text{ ml}$ Freundschem Adjuvans subcutan. Gruppen von jeweils 4 Tieren wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Immunisation durch Herzpunktion entblutet, die durch Thioglycolat stimulierten Peritonealexsudatzellen wurden gewonnen. Antikörper gegen HB-Antigen wurden mit AB-Serum als Kontrolle in der Überwanderungselektrophorese bestimmt. Gleichzeitig wurde mit den Blutlymphocyten der Transformationstest mit den Antigenen HB-Antigen-haltiges Serum, AB-Serum und Phythämagglutinin, sowie Kulturen ohne Zusätze als Kontrollen durchgeführt (Tab. 1). Erst nach 16 Tagen wurde eine antigenspezifische Transformation beobachtet, die über dem Zweifachen der Mittelwerte der Kontrollen lag. Durch die AB-Serum-Kontrollen ließ sich zeigen, daß diese Transformation nicht eine Immunantwort gegen Serumproteine bedeutet. Die Werte der durch AB-Serum stimulierten

Tabelle 1. Einbau von ³H-Thymidin in Blutlymphocytenkulturen nach einmaliger Immunisation mit HB-Antigen in komplettem Freundschem Adjuvans^a

Tag nach Immunisierung	Zahl der Tiere	Mittelwerte ³ H-Th. (dpm/min)				
		Kontrolle 1	PHA 2	AB-Serum 3	HB-Ag 4	Index 1:4
7	4	240	2324	247	239	1
10	4	217	759	227	184	0,84
12	3	270	2322	269	293	1
16	4	205	1168	198	444	2,1
24	4	216	2808	244	645	2,9
30	3	165	1336	170	373	2,2

^a 50 µg HB-Antigen in 0,5 ml komplettem Freundschem Adjuvans s.c.

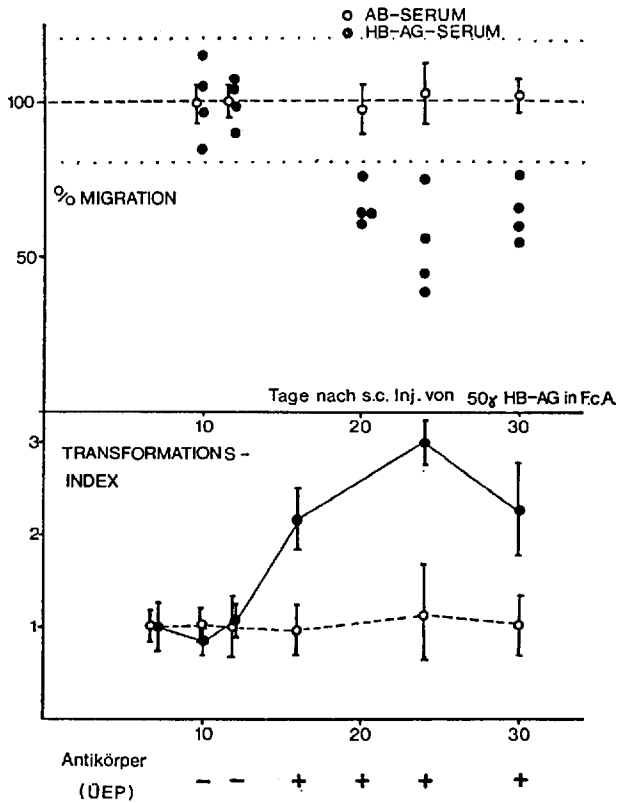


Abb.2. Beginn der Immunantwort bei Meerschweinchen nach Verabreichung gereinigten HB-Antigens

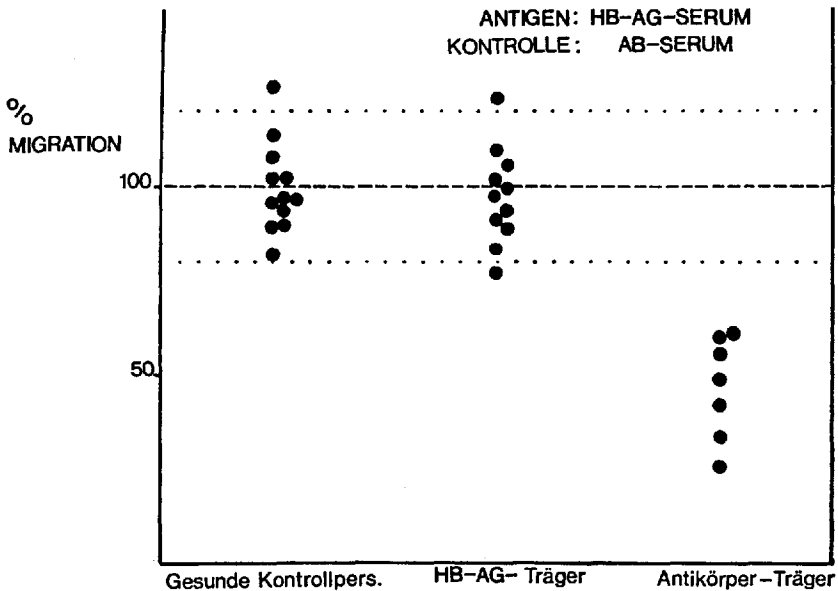


Abb. 3. Leukocytenmigrationstest beim Menschen. Wanderungshemmung durch HB-Antigen nur bei HB-Antikörperträgern

Kulturen lagen im Bereich der Leerkontrollen und wiesen keine ansteigende Tendenz auf. Die Spezifität der Lymphocytentransformation wird weiterhin durch die Migrationshemmungsteste bestätigt (Abb. 2). Auch hier fand sich, verglichen mit der Migration bei Normaltierkontrollen und bei AB-Serumzusatz, erst bei den 20 Tage nach Immunisation untersuchten Tieren eine Migrationshemmung durch HB-Antigen, die bei allen Tieren der Gruppe über 25% betrug.

Nach Maßgabe von Transformations- und Migrationshemmungstest ließ sich übereinstimmend eine celluläre Immunität erst nach dem 12. Tag nachweisen. Spezifische Antikörper gegen HB-Antigen wurden ebenfalls erst am 16. Tag gefunden. Eine zeitliche Differenz zwischen Antikörperbildung und der Immunreaktion vom verzögerten Typ war nicht zu beobachten.

3. HB-Antikörper und Leukocytenmigrationstest beim Menschen

Bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Persistenz des HB-Antigen im Serum und bei HB-Antikörperträgern wurde der Leukocytenmigrationstest mit HB-Antigen-haltigem Serum als Antigen in der Konzentration von 0,2 ml/ml Medium durchgeführt. Als Kontrollantigen wurde HB-Antigen-negatives AB-Serum verwandt. Bei gesunden Kontrollpersonen und HB-Antigen-Trägern fand sich keine Wanderungs-

hemmung in Gegenwart des Antigens. Deutliche Hemmung war bei den Personen zu beobachten, bei denen sich HB-Antikörper nachweisen ließen (Abb. 3).

Diskussion

Die von uns verwandte Versuchsanordnung zeigt, daß HB-Antigen im gereinigten Zustand antigene Eigenschaften behält und sowohl Antikörperbildung wie celluläre Immunität stimulieren kann. Eine Immunantwort gegen humane Serumproteine wurde nicht beobachtet, mithin die Reinheit der Antigenpräparation bestätigt. Frühere Untersucher konnten durch *in-vivo* Experimente nachweisen [4], daß HB-Antigen im Meerschweinchen bei geringer Antigenmenge nur in Verbindung mit Freundschem Adjuvans zu einer Immunantwort führt. Wir verwandten deshalb ebenfalls Freundsches Adjuvans und konnten nach 16 Tagen in der Lymphocyten-Transformation celluläre Immunität nachweisen. Dieser späte Beginn der Immunantwort deckt sich mit den Ergebnissen der Hauttests [4]. Andere virale Antigene führen schon früher zu nachweisbaren cellulären Immunreaktionen [9, 12]. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern [4] fanden wir gleichzeitig mit dem Beginn der cellulären Immunität eine spezifische Antikörperbildung gegen HB-Antigen. Der antigene Reiz führt also, wenn überhaupt, zu einer Immunantwort cellulärer und humoraler Art.

Hinsichtlich der Untersuchung der Immunitätslage bei klinisch unauffälligen Personen mit HB-Antigenkontakt kommen wir zu den gleichen Ergebnissen wie bei einer früheren Mitteilung [6]. Eine *in-vitro*-Reaktion cellulärer Immunität ist auch hier nur bei gleichzeitig ausgeprägter Antikörperbildung zu beobachten. Es scheinen sich drei Reaktionstypen unterscheiden zu lassen:

1. Patienten mit Antigenpersistenz. Bei ihnen kann ein supprimierter immunologischer Status gegenüber HB-Antigen angenommen werden, der Test fällt regelmäßig negativ aus.

2. Patienten mit transitorischem HB-Antigen im Serum. Sie zeigen positive Immunantworten cellulärer Art nach dem Verschwinden des Antigens aus dem Serum. Diese Immunantwort ist nur kurz [3] oder auch in einem längeren Zeitraum nach Überstehen der Hepatitis B nachweisbar [5, 13]. Wir konnten bei diesen Patienten nie eine celluläre Immunantwort feststellen [6].

3. Patienten mit HB-Antikörpern. Bei diesen Patienten konnte von uns und auch von anderen Untersuchern häufiger eine celluläre Immunität gegen HB-Antigen festgestellt werden. Da nicht allen Untersuchern gleich empfindliche Antikörpernachweisteste zur Verfügung standen, ist es möglich, daß die Diskrepanzen der Ergebnisse hinsichtlich der Gruppe 2 auf fehlenden Antikörperuntersuchungen beruhen, mithin teilweise unter Gruppe 3 eingeordnet werden müßten.

Demnach ist in der Regel die meßbare celluläre Immunität gegen HB-Antigen nach einer Hepatitis nur schwach ausgeprägt und nur vorübergehend mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Tests nachweisbar. Länger zu beobachten ist die celluläre Immunität dann, wenn es auch zu einer deutlichen Antikörperbildung gekommen ist. Mit Hilfe der empfindlichen Radioimmunassays sollte es möglich sein, die Verhältnisse der Immunantwort gegen HB-Antigen schon in sehr frühen Krankheitsstadien aufzudecken und mit der cellulären Immunantwort zu korrelieren.

Wir danken Fräulein G. Köhler für ihre technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

1. David, J. R., David, R.: Assay for inhibition of macrophage migration. In: In-vitro methods in cell mediated immunity, p. 249. B. R. Bloom and P. R. Glade, Eds. New York Acad. Press 1971
2. Dudley, F. J., Fox, R. A., Sherlock, S.: Cellular immunity and hepatitis associated, australia antigen liver disease. *Lancet* **1972 I**, 723—726
3. Dudley, F. J., Giustino, V., Sherlock, S.: Cell-mediated immunity in patients positive for hepatitis associated antigen. *Brit. med. J.* **1972 IV**, 754—756
4. Irwin, Gr. R., Hierholzer, W. J., McCollum, R. W.: Delayed hypersensitivity to hepatitis associated antigen in guinea pigs. *J. infect. Dis.* **125**, 73—76 (1972)
5. Ito, K., Nakagawa, J., Okimoto, I., Nakano, H.: Chronic hepatitis-migration inhibition of leucocytes in the presence of australia antigen. *New Engl. J. Med.* **286**, 1005 (1972)
6. Koszinowski, U., Thomssen, R., Schober, A.: In-vitro Stimulation der Lymphocyten von Antikörperträgern durch HB-Antigen. *Dtsch. med. Wschr.* **98**, 262—267 (1973)
7. Pettigrew, N. M., Goudie, R. B., Russel, R. I., Chaudhuri, H. K. R.: Evidence for a role of hepatitis virus B in chronic alcoholic liver disease. *Lancet* **1972 I**, 724—725
8. Popper, H., Mackay, I. B.: Relation between australia antigen and autoimmune hepatitis. *Lancet* **1972 I**, 1161—1163
9. Rosenberg, G. L., Farber, P. A., Notkins, A. L.: In-vitro stimulation of sensitized lymphocytes by herpes simplex virus and vaccinia virus. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **69**, 756—760 (1972)
10. Schober, A.: Eigenschaften des Hepatitis B-Antigens (Australia-Antigen) und klinische Bedeutung des Hepatitis-B-Antikörpers (Australia-Antikörper). Habilitationsschrift, Göttingen 1973
11. Søborg, M.: The leucocyte migration technique for in-vitro detection of cellular hypersensitivity in man. In: In vitro methods in cell mediated immunity, p. 289. B. R. Bloom and P. R. Glade, Eds. New York: Acad Press. 1971
12. Tompkins, W. A. F., Adams, C., Rawls, W. E.: An in vitro measure of cellular immunity to fibroma virus. *J. Immunol.* **104**, 502—510 (1970)
13. Yeung Laiwah, A. A. C.: Lymphocyte transformation by australia antigen. *Lancet* **1971 II**, 470—471

Dr. Ulrich Koszinowski
Hygiene-Institut der Universität
D-3400 Göttingen
Kreuzberggring 37
Bundesrepublik Deutschland