

*De invloed van immunoscintigrafie met monoklonale antilichamen op bepalingen van hormonen en tumormerkstoffen. Een muis met een staartje!**

J.A.M.J.L. JANSSEN, P.J. BLANKESTIJN, R. DOCTER, B.G. BLIJENBERG, S.W.J. LAMBERTS EN E.P. KRENNING

In 1975 werden voor het eerst monoklonale antistoffen in vitro verkregen. Kohler en Milstein fuseerden muizemyeloomcellen met lymfocyten van dieren die met een bepaald antigeen geïmmuniseerd waren en verkregen op die manier op grote schaal antilichamen tegen het antigeen.¹ Het gebruik van monoklonale antistoffen in de geneeskunde heeft sedertdien een grote vlucht genomen. Niet alleen worden deze antistoffen veel (in vitro) bij klinisch-chemische bepalingen en pathologisch-anatomisch onderzoek gebruikt, maar ook vindt in toeneemende mate in vivo-toepassing voor diagnostische en therapeutische doeleinden plaats.

Onlangs werden in dit tijdschrift de op dit ogenblik bekende bijwerkingen beschreven die bij toepassing van monoklonale antistoffen in vivo kunnen voorkomen.² Een daarin onvermeld gebleven klinisch zeer relevant probleem inherent aan het (veelvuldig) gebruik van monoklonale antistoffen in vivo beschrijven wij aan de hand van de volgende ziektegeschiedenis.

PATIËNTEN EN METHODEN

Bij 4 patiënten, 3 met een medullair schildkliercarcinoom met metastasen en 1 met carcinoommetastasen van onbekende oorsprong, werd scintigrafie met antistof tegen carcino-embryonaal antigeen (CEA) verricht. Bij deze patiënten werden volgens immunometrische methoden de serum-concentraties van thyroïd stimulerend hormoon (TSH), alfa-foetoproteïne (AFP), prostaatzure fosfatase (PZF) en CEA bepaald. Van 1 van de patiënten (patiënt A) wordt de ziektegeschiedenis uitvoerig beschreven.

Bij immunometrische methoden wordt gebruik gemaakt van het volgende principe:³ monoklonale antilichamen gebonden aan een vaste drager worden geïncubeerd met een patiëntenmonster waarvan de antigeenconcentratie (bijvoorbeeld van het TSH) moet worden bepaald. Bij incubatie wordt het antigeen aan de drager gebonden. Vervolgens wordt al het opgebrachte serum dat geen binding met het monoklonale antilichaam is

SAMENVATTING

Het gebruik van monoklonale antilichamen in de geneeskunde voor in vivo diagnostiek en voor therapeutische doeleinden zal naar verwachting de komende jaren sterk toenemen. Hoewel monoklonale antilichamen theoretisch een hoge specificiteit bezitten, blijft de dierlijke oorsprong van deze antilichamen in de praktijk een probleem vormen. Door herhaalde toediening (in vivo) van dierlijke monoklonale antilichamen kunnen humane antilichamen tegen deze monoklonale antilichamen gevormd worden. Aangezien dierlijke monoklonale antilichamen ook worden gebruikt bij laboratoriumbepalingen (in vitro), kan de aanwezigheid van humane antilichamen tegen deze dierlijke monoklonale antilichamen leiden tot foute uitkomsten van deze bepalingen. Een en ander wordt aan de hand van een ziektegeschiedenis gedemonstreerd.

Bij het interpreteren van laboratoriumuitslagen dient met dit fenomeen rekening gehouden te worden.

aangegaan, door middel van een wasprocedure verwijderd. Het monoklonale antilichaam gebonden aan de vaste drager is in overmaat aanwezig. Na de wasprocedure wordt een tweede gemerkt monoklonaal antilichaam gericht tegen een andere antigene determinant van het antigeen in overmaat toegevoegd. Dit gemerkte antilichaam bindt zich aan het aan de drager gefixeerde antigeen. Na incubatie met dit tweede monoklonale antilichaam wordt door middel van een tweede wasprocedure de overmaat antilichaam verwijderd. Na scheiding van de vrije en de gebonden fractie wordt de activiteit van het gelabelde complex bepaald. De concentratie van de onbekende te analyseren monsters kunnen dan op een standaardcurve worden afgelezen.

Met immunometrische methoden kunnen gemeten worden de concentraties TSH (Riagnost TSH), CEA (Enzyman-Test CEA), prostaatzure fosfatase (PZF; PAP-EIA Diagnostic Kit) en alfa-foetoproteïne (AFP; alfa-foeto Riabead).

Bij de beschreven patiënt A werd het calcitoninegehalte met een polyvalent geïteserum (dr. G.H. Hackeng, Bergweg Ziekenhuis, Rotterdam) bepaald en de hoeveelheid prostaat specifiek antigeen (PSA) met Tandem-PSA. Bij de anti-CEA-scintigrafie werd gebruik gemaakt van anti-CEA Imacis-1. De 'dimercaptosuccinate'-(DMSA)-scan werd verricht met DMSA (V).

ZIEKTEGESCHIEDENIS

In januari 1988 werd patiënt A, een 68-jarige man, opgenomen wegens een progressieve zwelling in de hals. In 1985 werd bij hem een feochromocytoom in de bijnieren vastgesteld en wegens een medullair schildkliercarcinoom werd bij hem een niet-radicaal schildklierextirpatie verricht. Bovendien werd

* Dit artikel werd eerder gepubliceerd met als titel 'Effects of immunoscintigraphy with monoclonal antibodies in assays of hormones and tumour markers' in Br Med J 1989; 298: 1511-3.
Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam.

Afd. Interne Geneeskunde I: J.A.M.J.L. Janssen, assistent-geneeskundige; P.J. Blankestijn, internist.

Afd. Interne Geneeskunde III: drs. R. Docter, biochemicus; prof. dr. S.W.J. Lamberts en dr. E.P. Krenning, internisten.

Afd. Klinische Chemie: dr. B.G. Blijenberg, klinisch chemicus.

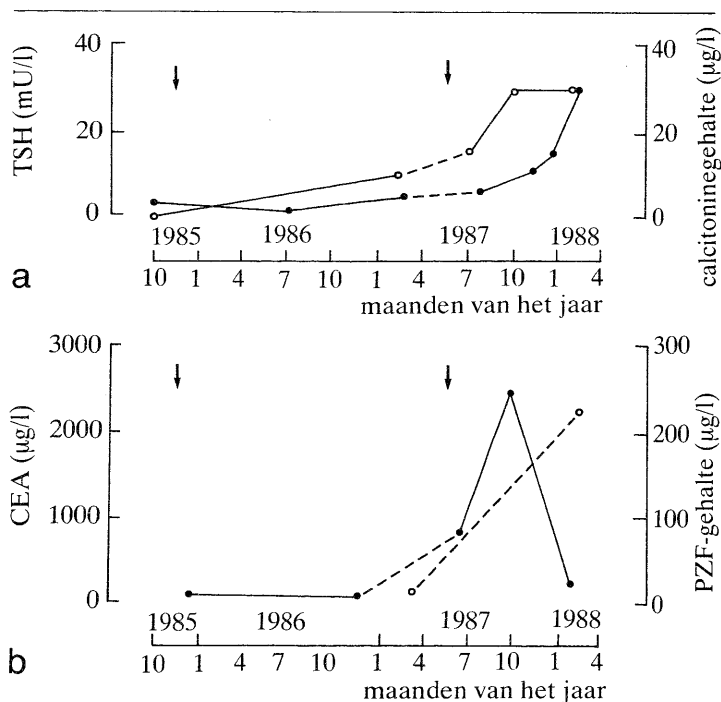
Afd. Nucleaire Geneeskunde: dr. E.P. Krenning, internist.

Correspondentie-adres: dr. E.P. Krenning.

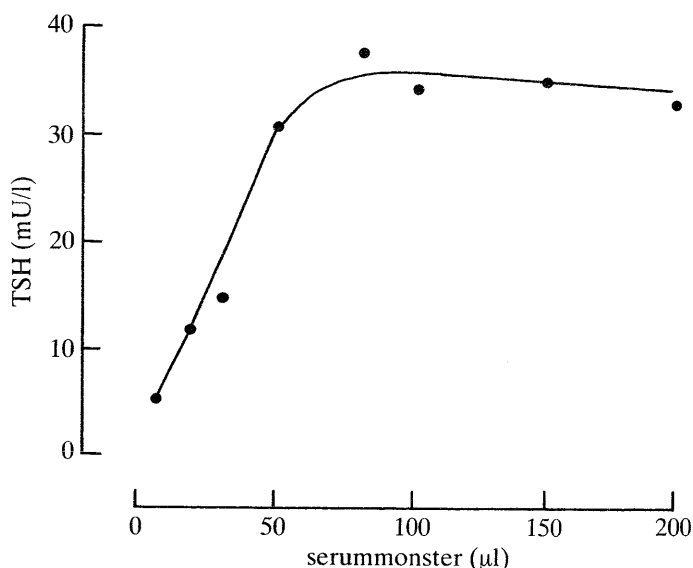
hyperplasie van de bijschildklieren vastgesteld. Er bestond dus een multiële endocriene neoplasie (MEN) van het type II of Sipple-syndroom. De voorgeschiedenis vermeldt verder een proefbiopsie van de prostaat in verband met een mogelijk maligne palpabele zwelling. Het biopt toonde geen afwijkingen. Na de schildklieroperatie werd patiënt met thyroxine gesuppleerd.

Sinds medio 1987 was er een duidelijk progressieve zwelling zichtbaar in de linker kaakhoek. Zowel het calcitoninegehalte (een merkstof voor het medullaire schildkliercarcinoom; figuur 1a), als het CEA-gehalte (eveneens een merkstof voor het medullaire schildkliercarcinoom; figuur 1b) waren sterk verhoogd, namelijk 31 µg/l (normaal < 0,13 µg/l) respectievelijk 245 µg/l (normaal < 5 µg/l). Het parathormoongehalte van 3,20 pmol/l (normaal < 4,0 pmol/l) was normaal. Bij herhaling waren de PZF-waarden rond 230 µg/l (normaal < 5 µg/l). In maart 1987 was het PZF-gehalte nog 10 µg/l. Het AFP-gehalte was met een waarde van 80 U/l (normaal < 20 U/l) eveneens verhoogd. Dit werd bepaald om de aard van een hypodense afwijking op de CT-scan van de lever te onderzoeken.

De bepalingen van de schildklierfunctie toonden een totaal thyroxinegehalte van 240 nmol/l (normaal circa 145 nmol/l bij thyroxinesuppletie), een TSH-gehalte van 36,5 mU/l (normaal < 2 mU/l bij thyroxinesuppletie) en een concentratie vrije thyroxine van 31,2 pmol (normaal circa 16 pmol/l bij thyroxinesuppletie). Patiënt was dus thyreotoxisch. De thyroxinesuppletie was 3 maanden voor opname met 50 µg thyroxine verhoogd tot 175 µg per dag, omdat het TSH-gehalte in het serum tijdens suppletie met 125 µg thyroxine per dag 12,9 mU/l bedroeg. Hieruit was toen de conclusie getrokken dat te weinig gesuppleerd werd, hoewel de thyroxinesuppletie al sedert de schild-



FIGUUR 1. Het verloop van de concentraties (a) thyroïd stimulerend hormoon (TSH; ●) en calcitonine (○), en (b) carcinoembryonaal antigeen (CEA) (●) en prostaatzure-fosfatasegehalte (PZF; ○) in de tijd bij patiënt A bij wie scintigrafie met een anti-CEA (muize)monoklonale antistof werd toegepast. De pijlen geven de tijdstippen aan waarop de scintigrafie werd verricht. De onderbreking van de lijnen geeft aan dat er twijfel bestaat dat de lijnen aldus getrokken mogen worden.



FIGUUR 2. Het verloop van het thyroïd stimulerend hormoon(TSH)-gehalte van een serummonster bij verschillende verdunningen van patiënt A bij wie scintigrafie met een anti-'carcinoembryonisch antigeen' (CEA) (muize)monoklonale antistof werd toegepast.

klierextirpatie in 1985 niet meer gewijzigd had hoeven te worden. Ondanks de verhoogde thyroxinesuppletie steeg het TSH-gehalte paradoxaal nog verder.

Een cytologische punctie van de zwelling in de hals toonde een recidief van het medullaire schildkliercarcinoom. Een DMSA-scan ter opsporing van metastasen van het medullaire schildkliercarcinoom toonde behalve hotspots links in de hals, een hotspot ter plaatse van de op de CT-scan waargenomen hypodense afwijking in de lever. Een en ander pleitte dus voor metastasering van het medullaire schildkliercarcinoom. De sterk verhoogde PZF-waarde leek ook nog op een prostaatscinoom te wijzen. Nader onderzoek gaf geen steun aan deze diagnose. Het leek niet onmogelijk dat het medullaire schildkliercarcinoom in staat was tot productie van het PZF. Een fout-positieve uitslag ten gevolge van een kruisreactie met de bepalingen van het PZF-gehalte werd overwogen. Beide overwegingen leken onwaarschijnlijk, nadat bij aanvullende diagnostiek ook een sterk verhoogde concentratie PSA gevonden was van 715 µg/l (normaal 0-10 µg/l).

Interpretatie van het sterk verhoogde TSH-gehalte leverde aanvankelijk problemen op. Klinisch en biochemisch bestond er thyreotoxicose tijdens thyroxinesuppletie. De aanwezigheid van een hypofysetumor met overmatige productie van TSH, hetgeen zeer zelden voorkomt, werd onwaarschijnlijk geacht op grond van een niet-afwijkende CT-scan van de hypofyse. Ook het verhoogde AFP-gehalte was problematisch. Het medullaire schildkliercarcinoom kan voor zover ons bekend geen AFP produceren. Aanwijzingen voor een tumor met embryonale elementen, zoals een testistumor, werden bij patiënt niet aangetroffen.

De verklaring voor al deze sterk verhoogde tumormerkstoffen werd gevonden na het bepalen van het TSH-gehalte bij verschillende verdunningen van het serum (figuur 2). Bij een monster groter dan 50 µl serum lijkt er een maximum te bestaan voor de binding van het antigeen (TSH) en de antistof (antistof tegen TSH). Normaal wordt bij de bepaling van het TSH-gehalte een monster van 200 µl patiëntenserum gebruikt. Het verloop van de grafiek suggereert een plateau en daarmee de aanwezigheid van een overmaat aan antigeen in het serum. Het

verloop van de serumspiegel van TSH, PZF, calcitonine en CEA in de tijd gaf de definitieve verklaring (zie figuur 1). In het najaar van 1986 was namelijk enige stijging van het TSH- en van het calcitoninegehalte vastgesteld. Deze stijging was nog duidelijker in mei 1987. Bovendien werd toen een verhoging van het PZF-gehalte gemeten. Retrospectief bleek patiënt in november 1985 en in april 1987 scintigrafie met een anti-CEA-antistof te hebben ondergaan ter opsporing van eventuele metastasen van het medullaire schildkliercarcinoom. Bij deze scintigrafie was gebruik gemaakt van anti-CEA monoklonale antistoffen verkregen uit muizemyeloomcellen.

BESCHOUWING

De bepaling van de concentraties TSH, CEA, PZF en AFP geschiedt met monoklonale antistoffen die ook verkregen zijn uit muizemyeloomcellen. Wat speelde zich dus af bij deze patiënt? Na de eerste scan in november 1985 is patiënt antilichamen tegen muizeantilichamen gaan produceren, de humane antimuizeantilichamen (HAMA's). De tweede scan in april 1987 heeft de produktie van de HAMA's nog eens extra gestimuleerd; er ontstond een boostereffect of anamnestiche reactie. De voor diagnostische bepalingen gebruikte muizemonoklonale antilichamen worden door deze HAMA's eveneens gebonden en geven daardoor een fout-verhoogde waarde (figuur 3). Door toevoeging van muizeserum aan het te onderzoeken serum zijn deze fout-verhoogde uitslagen te voorkomen.⁴ Dit fenomeen gold voor de bepaling van de gehalten PZF, CEA, TSH en AFP (tabel). Het calcitoninegehalte dat met polyvalent

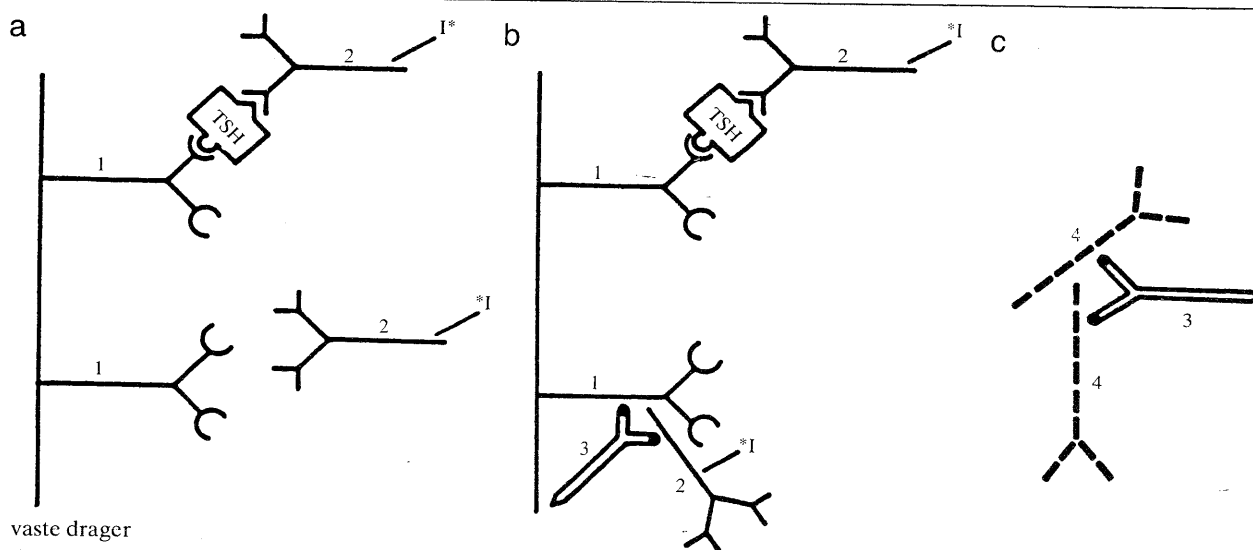
geiteserum werd bepaald, bleek niet fout-verhoogd. De stijging van het calcitoninegehalte is reëel en een uiting van de toename van de tumormassa van het medullaire schildkliercarcinoom.

In de tabel staan behalve gegevens van patiënt A die van drie andere patiënten. Patiënt B heeft evenals patiënt A 2 maal diagnostische scintigrafie met monoklonale muizeantistoffen ondergaan. Bij deze patiënt werden dezelfde afwijkingen als bij patiënt A geconstateerd. Patiënten C en D hebben slechts eenmaal diagnostische scintigrafie met muizemonoklonale antistoffen ondergaan. Bij hen werden geen fout-verhoogde waarden gevonden. Humane antilichamen tegen muizeantistoffen lijken dus vooral na de tweede scintigrafie voor te komen.

CONCLUSIE

Het gebruik van monoklonale antilichamen in de geneeskunde voor diagnostische en therapeutische doeleinden zal naar verwachting de komende jaren nog sterker toenemen. Een van de grootste problemen die daarbij overwonnen dient te worden, is de mogelijke interferentie die kan ontstaan door het gebruik van monoklonale antistoffen van dierlijke oorsprong. Hybridoma-methoden voor de produktie van menselijke antistoffen zijn in ontwikkeling, maar een ideale cellijn voor de produktie van menselijk materiaal is er nog niet.

Behalve allergische reacties lijken er door vorming van humane antilichamen tegen monoklonale antilichamen van dierlijke oorsprong ook fout-verhoogde waarden bij



FIGUUR 3. Schematische overzichten van de bepaling van het thyroïd stimulerend hormoon (TSH)-gehalte met behulp van de immunoradiometrische assay voor TSH (TSH-IRMA) in aanwezigheid van humane antimuize-antilichamen. Tevens wordt ter voorkoming van meting van een fout-verhoogde TSH-waarde in het serum een hoeveelheid muizeserum of muize-immunoglobulinen aan het serummonster toegevoegd. (a) Het TSH in het serum van de patiënt reageert met monoklonale antilichamen, gericht tegen TSH, die gekoppeld zijn aan de vaste drager (bijvoorbeeld de buiswand) en met 'losse' ^{125}I (*I)-gelabelde anti-TSH-monoklonale antilichamen en vormt op die manier een radiogelabelde 'sandwich' gekoppeld aan de buis (1, 2). Na incubatie wordt de supernatant in de buis verwijderd en worden door wassen met buffer niet-gebonden- ^{125}I -monoklonale antilichamen verwijderd (2); (b) verstoring van de assay: humane antimuize-antilichamen binden aan beide muizemonoklonale antilichamen waardoor een sandwich ontstaat met het ^{125}I -gelabelde muize-antilichaam en het muize-antilichaam aan de buiswand (1-3). Er ontstaat een imitatie van de sandwich met TSH; (c) preventie van verstoring van de assay: muize-immunoglobulinen toegevoegd in de vorm van muizeserum binden de humane antimuize-antilichamen en voorkomen de vorming van sandwiches zonder TSH.^{3,4} In plaats daarvan ontstaan ongelabelde sandwiches. Deze verstoren de bepaling van het TSH-gehalte niet.

Effect van humaan antimuize-antilichaam op monoklonale bepalingsmethoden van de concentraties thyroïd stimulerend hormoon (TSH), alfa-foetoproteïne (AFP), prostaatzure fosfatase (PZF) en carcino-embryonaal antigeen (CEA) bij oncologische patiënten bij wie scintigrafie met anti-CEA-antistof werd verricht en effect van al (+) dan niet (–) toevoeging van muizerum aan de serummonsters

tijdscintigrafie met anti-CEA			bepalingen							
1e		2e	TSH (mU/l)		AFP (µg/l)		PZF (µg/l)		CEA (µg/l)	
			–	+	–	+	–	+	–	+
<i>A (gemetastaseerd medullair schildkliercarcinoom)</i>										
12 mei 1986	17 okt 1985	9 apr 1987	15,7	8,72*	13	6	11,4	5,7	38,4	4,6
19 feb 1988			26,0	0,14	74	6	94,0	3,7	335	5,3
23 feb 1988			30,6	0,31	.	.	.	.	389	4,7
<i>B (carcinoommetastasen van onbekende oorsprong)</i>										
23 sep 1986	25 sep 1986	5 feb 1987	.	.	< 3	.	.	.	174	.
14 jan 1987			.	.	< 3	.	.	.	678	.
25 feb 1987			8,24	0,45	10	< 3	28,6	< 5,0	1712	1106
<i>C (gemetastaseerd medullair schildkliercarcinoom)</i>										
26 okt 1987	24 okt 1985		0,08	0,08	< 3	< 3	3,3	1,1	2690	2585
26 feb 1988			0,27	0,24	< 3	.	.	.	.	.
<i>D (gemetastaseerd medullair schildkliercarcinoom)</i>										
22 feb 1988	6 jan 1987		0,38	0,59	.	.	.	.	.	.

. Niet verricht.

* Nog niet volledige suppletie met thyroxine.

immunoassays te kunnen voorkomen.^{5,6} Patiënt A is daarvan een goed voorbeeld. De mate waarin antilichamen worden gevormd, lijkt samenhang te vertonen met de frequentie waarmee men blootgesteld wordt aan dierlijke monoklonale antistoffen. Fout-verlaagde waarden van immunoassays door het gebruik van dierlijke monoklonale antistoffen zijn eveneens beschreven.⁷ Ook is de vorming van humane antilichamen beschreven na gebruikmaking van uiteenlopende diersoorten als konijn, geit en rund.⁸⁻¹⁰ Contact met dieren of dierproducten is een andere bekende oorzaak van vorming van antilichamen die interfereren met immunoassays.¹¹ Omdat immunoassays gebruikt worden om belangrijke diagnostische en therapeutische beslissingen te nemen, dient elke clinicus alert te zijn op dit fenomeen en voorzichtig te zijn bij het interpreteren van in vitro verkregen resultaten.

De auteurs danken dr. T.A.W. Splinter voor het gebruik van de oncologische serumbank, prof. dr. M.A.D.H. Schalekamp voor redactionele adviezen en H. van Toor voor analytische ondersteuning.

SUMMARY

Effect of immunoscintigraphy with monoclonal antibodies on assays of hormones and tumour markers. Beware of a mouse-trap!—The use of monoclonal antibodies in medicine for in-vivo diagnostic methods and for therapeutic purposes will increase in the future. Although monoclonal antibodies possess a high specificity, the animal origin of these antibodies remains a problem. Repeated administration of animal monoclonal antibodies (in vivo) may induce the formation of human antibodies against these monoclonal antibodies. Because animal mono-

clonal antibodies are also used in laboratory assays (in vitro), the presence of human antibodies against these animal monoclonal antibodies may cause spuriously elevated or depressed results of these assays. The clinician should be alert to this possibility. A case history is presented to demonstrate the problem.

LITERATUUR

- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.
- Linden EFH van der, Kroonenburgh MJPG. Bijwerkingen van monoklonale antilichamen bij de diagnostische en therapeutische toepassing wegens kanker. *Ned Tijdschr Geneesk* 1988; 132: 2049-52.
- Dicijën-Visser MP van, Brombacher PJ. Immunochemie, antilichamen als reagens. Utrecht: Bohn, Scheltema en Holkema, 1988.
- Kahn BB, Weintraub BD, Csako G, Zweig MH. Factitious elevation of thyrotropin in a new ultrasensitive assay: Implications for the use of monoclonal antibodies in sandwich immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 66: 526-33.
- Dillman RO, Beauregard JC, Halpern SE, Clutter M. Toxicities and side effects associated with intravenous infusions of murine monoclonal antibodies. *Biol Res Mod* 1986; 5: 73-84.
- Pinsky C. Monoclonal antibodies: progress is slow but sure. *N Engl J Med* 1986; 11: 704-5.
- Boscato LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; 32: 1491-5.
- Schaison G, Thomopoulos P, Moulias R, Feinstein MC. False hyperthyrotropinemia induced by heterophilic antibodies against rabbit serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 200-2.
- Primus FJ, Bennett SJ, Kim EE, et al. Circulating immune complexes in cancer patients receiving goat radiolocalizing antibodies for carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1980; 40: 497-501.
- Hunter WM, Budd PS. Circulating antibodies to ovine and bovine immunoglobulins in healthy subjects: a hazard for immunoassays. *Lancet* 1980; ii: 1136.
- Howanitz PJ, Howanitz JH, Lamberson HV, Ennis KM. Incidence and mechanisms of spurious increases in serum thyreotropin. *Clin Chem* 1982; 28: 427-31.

Aanvaard op 14 november 1988