

» Isolierte Tumorzellen im Knochenmark sagen ein verkürztes Überleben bei lymphknoten-negativem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom vorher¹

Zusammenfassung. Hintergrund: In verschiedenen Arbeiten hat gezeigt werden können, dass isolierte Tumorzellen, welche dem konventionellen Tumorstaging entgehen, häufig im Knochenmark von Patienten mit scheinbar lokalisiertem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom nachgewiesen werden können. Die klinische Relevanz dieser minimalen hämatogenen Tumorzeldisseminierung wird kontrovers diskutiert. **Methoden:** Tumorzellen im Knochenmark wurden unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers CK2 gegen ein epitheliales, intermediäres Filamentprotein, Cytokeratin Nr. 18, nachgewiesen. Die Bedeutung eines positiven Knochenmarkbefundes für den klinischen Verlauf wurde bei 139 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und postoperativem Tumorstadium pT1–T4, pN0–2, M0, R0, mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 66 Monaten (Range: 48–74 Monate) untersucht. **Ergebnisse:** Cytokeratin-18-positive Zellen im Knochenmark wurden bei 83 (59,7% aller Patienten) zum Zeitpunkt der Operation gefunden und in 6 von 12 repräsentativen Patienten, die zweimal 3–18 Monate nach der Operation punktiert wurden. Bei Patienten, bei denen keine Lymphknotenmetastasen (pN0, n=66) nachgewiesen wurden, war der Nachweis von 2 oder mehr Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Operation ein starker und unabhängiger Faktor für das Gesamtüberleben in der univariaten Analyse ($p=0,007$). In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass diese Patienten ein 2,8-mal höheres Risiko für ein kürzeres Überleben aufwiesen, als die Patienten mit einem positiven Cytokeratin-Status nach der Operation entwickelten 11 bis 44 Monate nach der Operation ein Tumorrezidiv, währenddessen keiner der Patienten mit einem negativen Knochenmarkbefund zu allen Zeitpunkten ein Tumorrezidiv zeigte. **Schlussfolgerungen:** Eine minimal-residuale Knochenmarkbeteiligung ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit lymphknotennegativem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, welcher hilfreich sein könnte, diejenigen Patienten zu identifizieren, die einer adjuvanten, systemischen Therapie bedürfen. Die postoperative Persistenz oder das Wiedererscheinen von Tumorzellen im Knochenmark weisen darauf hin, dass dieses nicht nur abgeschilferte Zellen sind, sondern es sich tatsächlich um Mikrometastasen handeln könnte.

B. Passlick, B. Kubuschok, J. R. Izicki, O. Thetter, K. Pantel

Klinik für Thoraxchirurgie, Asklepios Fachkliniken München-Gauting und Chirurgische Klinik – Innenstadt –, Klinikum der Universität München; Institut für Immunologie, Universität München

Isolated Tumor Cells in Bone Marrow Predict Reduced Survival in Node-Negative Non-Small Cell Lung Cancer: Background: It became recently evident that isolated tumor cells undetectable by conventional tumor staging are frequently present in bone marrow of patients with apparently localized non-small cell lung cancer (NSCLC). The clinical relevance of this minimal hematogenous tumor cell dissemination is under vigorous debate. **Methods:** For tumor cell detection in the bone marrow we used monoclonal antibody CK2 against the epithelial intermediate filament protein cytokeratin 18. The influence of a positive bone marrow finding on clinical outcome was studied in 139 patients with NSCLC postoperatively staged as pT₁₋₄, pN₀₋₂, M₀, R₀ after a median follow up of 66 months (48–74). **Findings:** Cytokeratin-18-positive cells in bone marrow were demonstrated in 83 (59.7%) patients at the time of primary surgery and in 6 of 12 representative patients analyzed twice 3–18 months after surgery. In patients without histopathological lymph node metastases (pN₀; n=66) the occurrence of ≥ 2 tumor cells in bone marrow at primary surgery was a strong and independent predictor for overall survival ($p=0.007$) in univariate analysis. The multivariate analysis showed a 2.8 times increased risk for shorter survival in patients with disseminated tumor cells versus patients without such cells. Four of the six patients with a positive CK status after surgery developed a tumor recurrence 11–44 months after the operation, while in none of the patients with a negative bone marrow at all times intervals showed a tumor relapse. **Conclusions:** Minimal residual bone marrow involvement is an independent prognostic factor for overall survival in patients with node-negative NSCLC, which may help to identify patients in need of an adjuvant systemic therapy. The postoperative persistence or re-appearance of tumor cells in bone marrow indicates that these are not only shedded cells but rather represent true micrometastasis.

Einleitung

Bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom kann es lange vor der Diagnose von scheinbar lokalisierten Primärtumoren zu einer okkulten, hämatogenen und lymphatischen Streuung von Tumorzellen kommen [1–4]. Dieser Befund ist konsistent

¹ Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Society of Thoracic Surgeons (The Annals of Thoracic Surgery, 1999, Vol. 68, 2053–2058)

Zitat nur nach dieser Originalquelle

mit einem unbefriedigenden Langzeitergebnis der alleinigen chirurgischen Therapie mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 60% auch in frühen Tumorstadien [5]. Um die Diagnose dieses okkulten Stadiums der frühen Metastasierung zu verbessern, haben verschiedene Gruppen, so auch wir, sensitive immunzytochemische oder molekulare Techniken entwickelt, die den Nachweis von isolierten Lungenkrebszellen in tumorfernen Regionen (z. B. Knochenmark oder Lymphknoten) ermöglichen [1–3, 6, 7]. Die besondere Bedeutung der Knochenmarkuntersuchung liegt darin, dass das Knochenmark im Gegensatz zu anderen Organen leicht mittels einer Nadelaspiration untersucht werden kann. Obwohl es Hinweise gibt, dass Cytokeratin-positive, epitheliale Tumorzellen bei etwa 40 bis 60% der Patienten mit lokalisiertem nicht-kleinzelligem Karzinom nachgewiesen werden können [1–3], ist die klinische Bedeutung eines Befundes jedoch umstritten [8]. Bis heute gibt es kaum Untersuchungen, die die Bedeutung eines solchen Knochenmarkbefundes auf das Gesamtüberleben analysieren.

In dieser Arbeit präsentieren wir Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass eine minimal-residuale Knochenmarkbeteiligung ein starker und unabhängiger Faktor für die Vorhersage des Langzeitüberlebens von Patienten mit vollständig reseziertem, lymphknoten-negativem, nicht-kleinzelligem Karzinom (pT1–pT3, pN0, M0, R0) ist. Dieser Befund, zusammen mit der Beobachtung, dass Tumorzellen auch Monate nach der Operation im Knochenmark nachgewiesen werden können, unterstreicht den malignen Charakter von immunzytochemisch nachweisbaren Zellen im Knochenmark.

Patienten und Methoden

Patienten und Follow-up

Zum Operationszeitpunkt wurden Tumorproben und Knochenmarkaspirate von 139 Patienten mit operablem, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom gesammelt, die zwischen Oktober 1989 und Dezember 1991 mittels Lobektomie oder Pneumonektomie in Kombination mit einer systematischen, mediastinalen Lymphadenektomie operiert worden waren. Das Tumorstadium und das Tumorgrading wurden anfangs nach der 4. Ausgabe der International Union Against Cancer (1987) [9] klassifiziert und später mit Hilfe des neuen internationalen Staging-Systems reklassifiziert [10]. Nur Patienten im Stadium M0 (ohne Anhalt für eine Fernmetastasierung) und vollständig reseziertem Primärtumor (R0) wurden für die Studie zugelassen. Alle Teilnehmer gaben ihr Einverständnis. Die meisten Patienten erhielten keine adjuvante Therapie. Ausgenommen waren Patienten mit pT3- oder pT4-Tumoren, die postoperativ eine perkutane Bestrahlung (50 Gy) des Tumorbettes erhielten und Patienten mit einer pN2-Erkrankung, bei denen eine postoperative mediastinale (50 Gy) Bestrahlung vorgenommen wurde.

Postoperativ wurden die Patienten für 2 Jahre alle 3 Monate nachuntersucht und danach in 6-monatigen Intervallen. Die Untersuchungen beinhalteten eine körperliche Untersuchung, eine Röntgen-Thorax-Aufnahme, halbjährlich eine Bronchoskopie mit peribronchialen oder intraluminalen Biopsien, ebenso halbjährlich ein Computertomogramm des Thorax und des Abdomens, eine abdominelle Ultraschalluntersuchung und ein Knochenszintigramm. Vollständige Informatio-

nen über ein Tumorrezidiv und das Überleben lag von 128 der 139 Patienten vor. Die übrigen 11 Patienten wurden ausgeschlossen wegen eines nicht-malignom-assoziierten Todes (n=7) oder der Rezidivstatus war unbekannt (n=4). Die mediane Beobachtungszeit betrug 66 Monate (Range: 48–74 Monate).

Eine postoperative Knochenmarkuntersuchung wurde zweimal bei 12 Patienten vorgenommen. Die erste postoperative Knochenmarkaspiration wurde zwischen dem 3. und 7. postoperativen Monat (Median: 6 Monate) vorgenommen und eine zweite 10–18 Monate (Median: 12 Monate) postoperativ. Für die postoperativen Knochenmarkanalysen wurde ein Beckenkamm in Lokalanästhesie ambulant punktiert. Für den Vergleich des Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Operation und postoperativ wurde nur ein Beckenkammaspirat berücksichtigt.

Gewebepräparation

Zum Zeitpunkt der Primäroperation wurden 2–4 Knochenmarkaspirate von beiden Beckenkämmen und wenigstens einer Rippe durch Aspiration gewonnen. Mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation konnten zwischen 5×10^6 und 6×10^7 (Mittel: $2,5 \times 10^7$) mononukleäre Zellen aus 2–10 ml (Mittel: 5 ml) Knochenmark gewonnen werden. Eine definierte Zahl dieser Zellen (8×10^4) wurde mittels Zytozentrifugation (150 g für 5 Minuten) auf Objektträger transferiert, über Nacht getrocknet und dann entweder sofort gefärbt oder bei -80°C gelagert.

Immunzytochemie und Auswertung

Die Knochenmarkpräparate und der Primärtumor wurden mittels des monoklonalen Antikörpers CK2 (IgG1, 2,5 µg/ml; Boehringer Mannheim), welches gegen das Cytokeratin-Polypeptid Nr. 18 (CK18) gerichtet ist, gefärbt. CK2 reagiert mit einfachen Epithelien und daraus abstammenden Tumoren und auch mit den meisten Plattenepithelkarzinomen der Lunge [11].

In einer kürzlich publizierten immunhistochemischen Untersuchung konnte eine CK18-Expression bei 95,5% (84 von 88) Lungentumoren nachgewiesen werden [12]. Die hohe Sensitivität von CK18 für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark konnten wir in unserer vor kurzem erschienenen Studie zeigen [3]. In einer Kontrollgruppe von 215 Patienten mit benignen epithelialen Tumoren, nicht epithelialen Malignomen und entzündlichen Erkrankungen oder mesenchymalen Malignomen waren nur 2,8% von 215 Patienten CK18-positiv.

In allen Experimenten wurde ein irrelevanter muriner monoklonaler Antikörper (MOPC 21, IgG1; Sigma, Deisenhofen) als Isotyp-Kontrolle verwendet. Für die Darstellung der Antikörper-Bindung wurde die alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase (APAAP-Technik) verwendet, die mit der Neufuchsin-Methode kombiniert wurde, wie kürzlich berichtet [3]. Kurz zusammengefasst: Nach Inkubation mit CK2 wurde ein polyvalentes Kaninchen-Antimäus-Immunglobulin-Antiserum (30 Minuten, Z259; Dako, Heidelberg) und präformierte Komplexe von alkalischer Phosphatase- und monoklonaler antialkalischer Phosphatase-Antikörper (30

Minuten, D651; Dako) in den entsprechenden Verdünnungen verwendet.

Von jedem Knochenmarksaspiraten wurden fünf Zytospin-Präparate analysiert (4×10^5 Zellen pro Objektträger). Alle Objektträger wurden von zwei Untersuchern begutachtet. In etwa 90% der Präparate fanden beide Untersucher das gleiche Ergebnis; Präparate mit unterschiedlichen Ergebnissen wurden reevaluiert und eine Konsensus-Entscheidung herbeigeführt.

Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden alle Variablen dichotomisiert. Das Alter als einzige kontinuierliche Variable wurde am Median (60 Jahre) dichotomisiert, um die Annahmen der multivariaten Analyse zu erfüllen. Kaplan-Meier-Kurven wurden berechnet und das beobachtete Überleben mit dem Log-rank-Test verglichen. Unter Verwendung des SPSS-Programms (SPSS-Software München) wurden für die multivariate Analyse Cox Proportional Hazard Models berechnet.

Ergebnisse

Häufigkeit von CK18-positiven Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Operation

Die immunzytochemische Färbung mit dem monoklonalen CK2 (gegen das Cytokeratin Nr. 18 gerichtet) zeigte disseminierte epitheliale Zellen in 83 (59,7%) der 139 Patienten mit resektablem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Abb. 1). Zwischen den verschiedenen Tumorstadien fanden sich keine Unterschiede in der Häufigkeit von CK18-positiven Zellen (Tab. 1). Bei Patienten mit pT1, pN0-Tumoren ($n = 15$) wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei 9 (60%) der Patienten gefunden, bei den pT2, pN0-Patienten ($n = 47$) in 23 (48,9%) der Fälle und bei 6 (75%) der 8 pT3, pN0-Patienten fand sich ein positiver Knochenmarkbefund ($p = 0,346$, χ^2 -Test). Die meisten CK18-positiven Zellen zeigten sich als isolierte Tumorzellen. Tumorzellverbände wurden nur bei

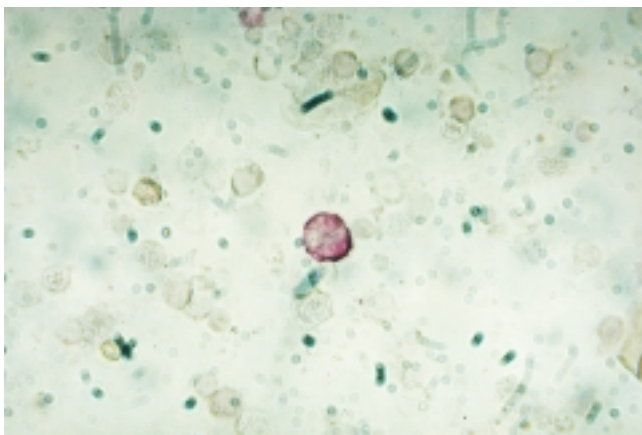


Abb. 1 Fotografie einer isolierten CK18+ Zelle im Knochenmark eines Patienten mit einem resektablen Bronchialkarzinom (Adeno-Ca; pT1, pN0, M0). APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper CK-2 gegen das Cytokeratin No.18; um das Auffinden von immunzytochemisch positiven Zellen zu erleichtern, wurde keine Gegenfärbung vorgenommen.

Tab. 1 Häufigkeit von CK18+ Zellen im Knochenmark von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom in verschiedenen Tumorstadien

Tumorstadium*	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten mit CK18+ Zellen im Knochenmark (%)
alle Patienten	139	83 (59,7)
Stadium IA	15	9 (60,0)
Stadium IB	47	23 (48,9)
Stadium IIA	4	2 (50,0)
Stadium IIB	17	12 (70,6)
Stadium IIIA	36	25 (69,4)
Stadium IIIB	20	12 (60,0)

* Pathologisches Tumorstadium entsprechend dem neuen Staging-System (1997) [25]

einigen Patienten (10,1%) gesehen [3]. Im Median wurden 2 (Range 1–531) CK18-positive Zellen in 4×10^5 mononukleäre Zellen gefunden (Abb. 2). Im Hinblick auf das gesamte Knochenmark würde dies einer geschätzten Tumorlast von 4×10^6 bis 2×10^9 Zellen bedeuten [13].

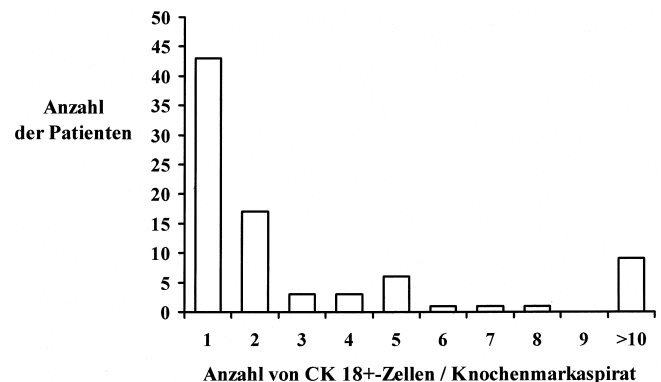


Abb. 2 Häufigkeit von CK18+ Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit vollständig reseziertem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Prognostische Bedeutung von CK18-positiven Tumorzellen

Nach einer mittleren Beobachtungszeit von 66 Monaten war die Prognose der 62 Patienten mit manifesten Lymphknotenmetastasen (pN1–2) unabhängig vom initialen immunzytochemischen Knochenmarkbefund (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit einer pN0-Erkrankung, die 2 oder mehr CK18-positive Zellen im Knochenmark aufwiesen, ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten ohne isolierte Tumorzellen ($p = 0,007$, Log-rank-Test) (Abb. 3). Entsprechend zeigten diese Patienten eine höhere Rezidivrate als Patienten ohne disseminierte Zellen ($p = 0,005$; Daten nicht gezeigt). Bei Patienten, bei denen lediglich eine CK18-positive Zelle in einem der Knochenmarkaspirate nachgewiesen wurde, war die Prognose nicht verschieden von denjenigen Patienten mit einem vollständig negativen Knochenmark. Interessanterweise war die Häufigkeit von Kno-

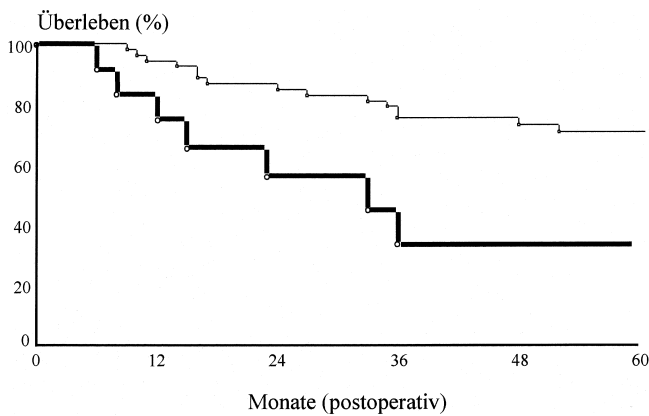


Abb. 3 Überleben (Kaplan-Meier-Analyse) von pN0-Patienten (n = 66) mit reseziertem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in Abhängigkeit des immunzytochemischen Nachweises (—) oder des Fehlens (---) von CK18+ Tumorzellen (≥ 2 Zellen pro 4×10^5 Knochenmarkszellen) im Knochenmark. Der Unterschied ist signifikant mit $p = 0,007$ (log-rank-Test).

chenmetastasen durch den Nachweis des Knochenmarkstatus nicht beeinflusst: 7,5% der Patienten mit einem negativen Knochenmark entwickelten Knochenmetastasen im Vergleich zu lediglich 13,3% der Patienten mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ($p = 0,3$, χ^2 -Test).

Tab. 2 Multivariate Analyse des Überlebens mit pN0-Patienten[#]

Variable	univariate p^{\dagger}	multivariate Analyse (Cox model)			relatives Risiko (95% KI)
		Geschätzter Koeffizient	SE	p	
Knochenmark-Status (positiv* vs. negativ)	0,007	1,022	0,513	0,046	2,8 (1,1–7,5)
pT-Stadium (pT ₁₋₂ vs. pT ₃)	0,007	1,211	0,444	0,006	3,3 (1,4–8,0)
Alter (Jahre) (≤ 60 vs. > 60)	0,024	1,030	0,502	0,040	2,8 (1,0–7,6)

[#] n = 66 * Mehr als 2 CK18+ Zellen, [†] Log-rank-Test

Tab. 3 Follow-up-Knochenmark-Untersuchung 3–18 Monate postoperativ

Patienten ID	CK18-Status zum Op-Zeitpunkt	CK18-Status 3–7 Monate postoperativ	CK18-Status 10–18 Monate postoperativ	Rezidiv	Zeit bis zum Rezidiv oder letztes Follow-up (Monate)
# 45	+	+	+	Ja	15
# 73	+	–	+	Nein	66
# 111	+	–	+	Ja	28
# 19	+	+	–	Ja	37
# 103	+	+	–	Nein	44
# 18	+	–	–	Ja	18
# 57	+	–	–	Nein	72
# 9	+	–	–	Ja	42
# 79	–	–	–	Nein	63
# 88	–	–	–	Nein	66
# 118	–	–	–	Nein	72
# 25	–	n. d.	+	Ja	11

In einem Cox-Regressionsmodell wurde die Unabhängigkeit des prognostischen Wertes des Knochenmarkstatus bei lymphknotennegativen Patienten untersucht. Es wurde der Einfluss von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, vom pT-Status und vom Alter des Patienten auf das Gesamtüberleben analysiert (Tab. 2). Da lediglich Patienten mit einem T3-Tumor eine adjuvante Strahlentherapie erhielten und diese Variable bereits in das Cox-Analysenmodell integriert war, war es nicht notwendig, die Therapie als eine zusätzliche Variable zu betrachten. Ein Einfluss des Tumorgradings, der Tumorhistologie oder des Geschlechtes auf die Überlebensraten war nicht erkennbar, so dass diese Covariaten von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die multivariate Analyse zeigte ein 2,8-mal höheres Risiko für ein kürzeres Überleben bei Patienten mit CK18-positiven im Vergleich zu Patienten ohne diese Zellen. Ein höheres t-Stadium oder ein höheres Patientenalter hatten einen ähnlichen prognostischen Wert für ein vermindertes Überleben (relatives Risiko 3,3 bzw. 2,8).

Follow-up-Knochenmark-Untersuchung

Postoperativ wurden Knochenmarkaspirate bei 12 Patienten 3–7 bzw. 10–12 Monate nach der Operation entnommen (Tab. 3). CK18-positive Zellen wurden bei 6 (50%) dieser Patienten gefunden, von denen 5 zum Zeitpunkt der Operation CK18-positiv waren, währenddessen 1 Patient (Nr. 25) initial keine CK18-positiven Zellen zeigte. Drei Patienten

waren zum Zeitpunkt der Operation CK18-positiv, wurden aber negativ während der Nachbeobachtung. 4 der 6 Patienten mit einem positiven Knochenmark postoperativ entwickelten ein Tumorrezidiv 11 – 44 Monate nach der Operation.

Im Gegensatz dazu blieben 5 der 6 Patienten ohne Tumorrezidiv entweder negativ (Nr. 79, 88, 118) oder wurden CK18-negativ (Nr. 47, 103) während der Follow-up-Untersuchungen (Tab. 2). Der verbleibende Patient (Nr. 73) war zum Zeitpunkt der Operation positiv, zeigte einen negativen Befund zum ersten Nachbeobachtungszeitpunkt und wurde später erneut positiv. Interessanterweise zeigte keiner der Patienten mit einem negativen Knochenmarkbefund zu allen Untersuchungszeitpunkten später ein Tumorrezidiv.

Diskussion

Diese Studie wurde durchgeführt, um die prognostische Bedeutung von einzelnen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit vollständig reseziertem nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (pT1–4, pN0–2, M0) zu untersuchen. Durch eine intensive methodologische Analyse konnten wir und andere zeigen [1, 14, 15, 16], dass die immunzytochemische Untersuchung eine gut etablierte Methode ist, um sogar eine epitheliale Zelle in einer hohen Anzahl (10^6) mononukleärer Knochenmarkzellen nachzuweisen. Die maligne Natur von isolierten epithelialen Zellen im Knochenmark konnte bei verschiedenen Tumoren durch die Überexpression des Onkogens erbB2, der Herunterregulierung von MHC-Klasse1-Antigenen und auch durch ihr Wachstumspotential in Zellkulturen nachgewiesen werden [17, 18].

In der vorliegenden Untersuchung zeigte eine multivariate Analyse, dass der Nachweis von disseminierten epithelialen Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit lymphknoten-negativen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit einer erhöhten Rate von Tumorrezidiven und einem verkürzten Überleben assoziiert ist. Der prädiktive Wert von isolierten Tumorzellen im Knochenmark für ein verkürztes Überleben ist von ähnlicher Wichtigkeit wie der prädiktive Wert des t-Stadiums.

Interessanterweise ist der Nachweis von isolierten Tumorzellen im Knochenmark nicht mit einem späteren Auftreten von manifesten Knochenmetastasen assoziiert. Daher können disseminierte Tumorzellen im Knochenmark eher als ein Parameter für das Streuungspotential eines individuellen Tumors betrachtet werden. Frühere Studien haben zeigen können, dass ein großer Teil der Tumorzellen im Knochenmark nicht proliferierende Zellen darstellen [17]. Daher ist es vorstellbar, dass das Knochenmark eine Art Reservoir für diese Tumorzelle ist, und dass diese später über den Blutstrom in andere sekundäre Organe transportiert werden, wo Tumorzellen ein geeigneteres Wachstumsmilieu finden können. Ein wichtiger Faktor, um manifeste Metastasen bilden zu können, scheint die Expression des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ zu sein, welche den Zellen die Degradation von Matrix-Proteinen erlaubt [19].

Unsere vorläufigen Follow-up-Knochenmarkuntersuchungen zeigen, dass in etwa $\frac{2}{3}$ der Patienten mit einem positiven Knochenmarkstatus zum Operationszeitpunkt auch 3–18 Monate postoperativ CK18-positive Zellen im Knochenmark

nachgewiesen werden können. Bei den meisten dieser Patienten war ein postoperativ positiver Knochenmarkbefund mit einem späteren klinisch nachweisbaren Tumorrezidiv assoziiert. Obwohl diese Annahme durch größere Studien bestätigt werden sollte, geben diese Daten Hinweise darauf, dass Zellen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen im Knochenmark nach der Operation des Primärtumors persistieren können. Daher erscheinen diese Zellen eher lebensfähige Mikrometastasen zu sein, als abgestoßene Tumorzellen mit einer nur limitierten Lebenserwartung. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Daten von Mansi und Kollegen, die bei den meisten ihrer Patienten mit Mammakarzinom in postoperativen Knochenmarkaspiraten keine Tumorzellen fanden [20].

Wie schon früher gezeigt, war der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark nicht mit einer frühen lymphogenen Tumorzeldisseminierung assoziiert [4], was darauf hinweist, dass eine frühe hämatogene und frühe lymphogene Disseminierung unterschiedlich geregelt sein kann. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Primärtumoren von Patienten mit einer frühen Disseminierung von Tumorzellen in die Lymphknoten, wie sie durch sensitive immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden kann, sich eine verminderte Expression des MHC-Klasse1-Antigen-Komplexes sowie von ICAM-1-Molekülen findet, währenddessen die Expression dieser immunregulatorischen Moleküle bei Primärtumoren von Patienten mit einer Knochenmark-Mikrometastasierung nicht verändert ist [21].

Im Hinblick auf die prognostische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sind verschiedene Versuche unternommen worden, um die Sensitivität der gegenwärtigen Nachweissysteme zu verbessern. Die Durchflusszytometrie hat bislang nicht beweisen können, dass sie dem immunzytochemischen Nachweis überlegen ist [22], aber auch mit dieser Methode sind in der Zukunft vielversprechende Ergebnisse zu erwarten [23]. Kürzlich sind molekulare Methoden unter Verwendung der Reverse-Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) entwickelt worden, die im Knochenmark oder Blut nach tumorassoziierter oder organspezifischer mRNA-Expression fahnden. Der Nachteil der RT-PCR-Technik ist jedoch, dass die Herkunft eines positiven Nachweises nicht einer intakten und lebensfähigen Tumorzelle zugeordnet werden kann. Daher können illegitime (nichttumorspezifische) Expressionen von kleinen Mengen von tumorassoziierter mRNA (CK 18, 19, EGP-40, MCU1 oder CEA) im Knochenmark nachgewiesen werden, wenn ausge dehnte Amplifikationen der cDNA vorgenommen werden [24].

Zusammenfassend stellt der immunzytochemische Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark eine Möglichkeit dar, eine sonst okkulte minimale systemische Disseminierung aufzuzeigen und kann daher zu einer verbesserten Identifikation von Patienten mit einer ungünstigen Prognose führen. Diese Ergebnisse unterstützen den Vorschlag des Standardisierungskomitees der International Union Against Cancer (UICC), dieses frühe Tumorstadium der metastatischen Erkrankung mit der Kategorie pM1(i) in die existierende Tumorklassifikation einzubinden [25]. Ob die identifizierten Patienten von einer adjuvanten Therapie profitieren können, muss in weiteren Studien erarbeitet werden.

Diese Arbeit wurde unterstützt von Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 469), Bonn, der K. L. Weigand-Stiftung, München, und der MMW-Herausgeberstiftung München. Wir bedanken uns bei Simone Baier und Tanja Hoffmann für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung.

Literatur

- 1 Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B et al. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 1995; 222: 415–425
- 2 Ohgami A, Mitsudomi T, Sugio K et al. Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 363–367
- 3 Pantel K, Izbicki JR, Passlick B et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells detected in bone marrow of non-small cell lung cancer patients without overt metastases. *Lancet* 1996; 347: 649–653
- 4 Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, Thetter O, Pantel K. Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: Impact on staging and prognosis. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 177–183
- 5 Martini N, Bains MS, Burt ME et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 120–129
- 6 Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmaier H et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Eng J Med* 1997; 337: 1188–1194
- 7 Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B et al. Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1827–1832
- 8 Funke I, Schraut W. Meta-Analysis of studies on bone marrow micrometastases: An independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998; 16: 557–566
- 9 UICC. TNM classification of malignant tumors. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1987
- 10 Debus E, Moll R, Franke WW, Weber K, Osborn M. Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1984; 114: 121–130
- 11 Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M et al. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1027–1031
- 12 Harrison WJ. The total cellularity of the bone marrow in man. *J Clin Pathol* 1962; 15: 254–259
- 13 Pantel K, Braun S, Passlick B, Schlimok G. Minimal residual epithelial cancer: Diagnostic approaches and prognostic relevance. *Prog Histochem Cytochem* 1996; 30: 1–46
- 14 Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner KU et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1810–1817
- 15 Thorban S, Roder J, Nekarda H et al. Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1222–1227
- 16 Pantel K, Schlimok G, Braun S et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1419–1424
- 17 Pantel K, Dickmanns A, Zippelius F et al. Establishment of carcinoma cell lines from bone marrow of patients with minimal residual cancer: A novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1162–1168
- 18 Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU et al. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: A reference to early systemic disease in solid cancer. *Nature Med* 1995; 1: 1035–1039
- 19 Mansi JL, Berger U, McDonnell T et al. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7: 445–449
- 20 Passlick B, Pantel K, Kubuschok B et al. Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: Association with early lymphatic tumor cell spread. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 141–145
- 21 Molino A, Colombatti M, Bonetti F et al. A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer* 1991; 67: 1033–1036
- 22 Gross HL, Verwer B, Houck D, Hoffman RA, Reckterwald D. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10^{-7} . *J Natl Cancer Inst* 1995; 92: 537–541
- 23 Zippelius A, Kufer P, Honold G et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis for detection of micrometastatic epithelial tumor cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2701–2708
- 24 Hermanek P. pTNM and residual tumor classifications: Problems of assessment and prognostic significance. *World J Surg* 1995; 19: 184–190
- 25 Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997; 111: 1710–1717

PD Dr. med. B. Passlick

Klinik für Thoraxchirurgie
Asklepios Fachkliniken München-Gauting
Robert-Koch-Allee 2
82131 Gauting

E-mail: Passlick@lrz.uni-muenchen.de