

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. N. HENNING)

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Hepatitis

II. Mitteilung

Serologische Studien nach Sensibilisierung mit homologen Leberzellfraktionen

Von

H. WARNATZ, F. SCHEIFFARTH und R. SCHWARZ

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. April 1965)

In früheren eigenen Untersuchungen und bei Experimenten anderer Autoren (ESTES, MILLOT et al., WEIR, Übersicht bei STEINER et al.) konnten nach Sensibilisierung mit homologem Leberantigen im Tierversuch zirkulierende Antikörper nachgewiesen werden. Diese Antikörper besitzen die Eigenschaft, mit verschiedenen Bestandteilen der Leberzelle zu reagieren, wie wir in fluoreszenzserologischen Untersuchungen nachweisen konnten. Da es sich bei dem verwendeten Antigen um Lebergesamtextrikte handelte, blieb die Frage unbeantwortet, welche subcellulären Bestandteile der Leberzelle antigenwirksam werden. In unseren tierexperimentellen Untersuchungen haben wir deshalb Kaninchen mit verschiedenen Leberzellfraktionen sensibilisiert. Zielsetzung unserer Untersuchungen war, die Spezifität der Antiseren, die durch Verwendung einheitlicher Antigene erzeugt wurden, durch vergleichende serologische und immun-histochemische Untersuchungen zu prüfen.

Methodik

Die Sensibilisierung der Tiere erfolgte entsprechend den Angaben in Mitteilung I: In der Gruppe A wurden drei Tiere mit Kernfraktion, in Gruppe B vier Tiere mit Cytoplasmakfraktion, in Gruppe C vier Tiere mit Mitochondrien-Mikrosomenfraktion und in Gruppe D vier Tiere mit Gesamtextrikt von homologer Leber sensibilisiert. Die serologischen Veränderungen unter der Sensibilisierung wurden fortlaufend kontrolliert. Dazu wurde den Tieren in vierwöchigem Abstand Blut entnommen: Die erste Blutentnahme erfolgte vor Beginn der Behandlung, die letzte Blutprobe wurde durch Entbluten der Tiere bei deren Tötung gewonnen. Das Serum wurde nach Abwarten der spontanen Gerinnung vom Blutkuchen abgehebert. Die Blutproben wurden jeweils folgenden Untersuchungen unterzogen:

1. Bestimmung des Gesamteiweißes mit der Biuretreaktion nach WEICHSELBAUM.
2. Papierelektrophoretische Kontrollen der Serumeiweißfraktionen nach GRASSMANN und HANNIG.
3. Hämagglutinationsprobe nach BOYDEN mit Titerbestimmung. Dabei wurde als Antigen jeweils ein gefriergetrocknetes Präparat des Gesamtleberextraktes bzw. der einzelnen Zellfraktionen benützt.
4. Fluoreszenzserologische Untersuchungen.

16 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn wurden die Tiere getötet. Die Leber wurde entnommen und histologisch sowie fluoreszenzserologisch untersucht. Die fluoreszenzserologischen Untersuchungen wurden nach einer Modifikation des von COONS angegebenen Verfahrens (COONS et al., v. MAYERSBACH) vorgenommen. Zur Markierung der γ -Globuline, die aus den bei der letzten Blutentnahme gewonnenen Kaninchenserum mittels Ammoniumsulfatfällung abgetrennt wurden, wurde Fluoresceinisothiocyanat in einer Dosierung von

0,01 mg/mg Eiweiß verwendet. Die Reinigung der markierten Seren erfolgte durch Dialysierung gegen gepufferte, physiologische Kochsalzlösung sowie durch Trennung der Seren an der DEAE-Cellulosesäule mittels eines Kochsalzgradienten (GOLDSTEIN et al.). Von den eingefrorenen Leberstücken wurden Gefrierschnitte von $7,5\ \mu$ Dicke im Kryostaten hergestellt und diese vor der Inkubierung mit den markierten autologen Seren (30 min bei 37°C im Brutschrank) in Methanol fixiert und anschließend 30 min gewässert. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Im einzelnen wurde die Fluoreszenz der Parenchymzellen differenziert nach Cytoplasma und Zellkern, der Gallengänge sowie von Anteilen der Glissonschen Kapsel beschrieben.

In Kontrollversuchen wurden ungefärbte Präparate auf Spontanfluoreszenz untersucht. Ferner wurden Nieren-, Herz- und Milzschnittpräparate mit autologen markierten Seren inkubiert, um die Organspezifität etwa gefundener Antikörper nachzuweisen. Andere Präparate wurden mit markierten Seren von nicht sensibilisierten Tieren behandelt sowie mit Seren von Kaninchen, die gegen andere Leberzellfraktionen sensibilisiert worden waren. In weiteren Kontrolluntersuchungen wurden Präparate zunächst mit dem nicht markierten autologen Serum bei 37°C 30 min überschichtet und anschließend nach 20minütiger Wässerung mit physiologischer Kochsalzlösung mit dem markierten autologen Serum behandelt. Schließlich wurden einzelne Schnitte mit einer fluoreszenzmarkierten Cytoplasmafraktion der Leberzelle inkubiert, um nachzuweisen, ob eine Bindung von Antigen an bestimmte Elemente des Lebergewebes, etwa an mononucleäre Zellen der periportalen Felder, erfolgt.

Das bei der Tötung der Tiere durch Entbluten gewonnene Serum (ca. 50 ml) wurde zum Nachweis etwa vorhandener, pathogen wirksamer Antikörper auf unbehandelte Tiere übertragen. Wir verwendeten dazu Mischseren, die durch Vereinigung der jeweils von den einzelnen Gruppen stammenden Seren hergestellt wurden. Diese Mischseren wurden in je sechs Einzelgaben zu 5 ml in zweitägigem Abstand jeweils einem Tier intravenös injiziert. Zur Kontrolle erhielt ein Tier Normalserum in gleicher Dosierung übertragen. Die Tiere wurden 3 Wochen nach Versuchsbeginn getötet und die Lebern auf morphologische Veränderungen untersucht.

Ergebnisse

Der Serumgesamteiweißgehalt (durchschnittlich 6,9 g%) zeigte während des Sensibilisierungszeitraumes in allen vier Gruppen keine wesentlichen Veränderungen. Die Auswertung der Ergebnisse, die bei papierelektrophoretischer Trennung der Serumeiweißfraktionen erhalten wurden, ließ bei allen Gruppen unter der Sensibilisierung einen Abfall der Albumine erkennen; insbesondere bei den mit Gesamtextrakt und mit der Kernfraktion sensibilisierten Tieren konnte eine Verminderung der Albumine von 59,9 auf 49,5 bzw. von 60,2 auf 52,0 rel.-% 4 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn beobachtet werden. Bei späteren Kontrolluntersuchungen normalisierte sich der Albumingehalt der Seren wieder. Bei den Tieren der Gruppen A, B und D kam es 4 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn zu einem Konzentrationsanstieg der α_1 -Globuline von durchschnittlich 6,5 auf 7,7 rel.-%, der α_2 -Globuline von durchschnittlich 6,4 auf 7,2 rel.-% und der β -Globuline von 11,0 auf 13,7 rel.-%; lediglich bei den mit der Cytoplasmafraktion sensibilisierten Tieren blieben stärkere Konzentrationsänderungen der schnell wandernden Globulinfraktionen aus. Der γ -Globulingehalt blieb im Verlauf der Sensibilisierung bei allen Gruppen im wesentlichen unverändert.

Zirkulierende Antikörper konnten mit Hilfe der passiven Hämagglutinationsreaktion nach BOYDEN bei allen vier Gruppen 4 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn nachgewiesen werden (Abb. 1). Bei Verwendung eines homologen Lebergesamtextraktes als Antigen wurde bei dem angegebenen Sensibilisierungsschema das Titermaximum bei allen vier Gruppen nach 8 Wochen erreicht. In der folgenden Zeit war ein leichter Abfall des Titers nachzuweisen.

Wurde als Antigen für die Reaktion nach BOYDEN die jeweils zur Sensibilisierung benutzte lyophilisierte Leberfraktion verwendet, so zeigten die Antiseren während des Sensibilisierungszeitraumes einen anderen Titerverlauf (Abb. 2).

Bei den mit der Kern- und der Mitochondrien-Mikrosomenfraktion sensibilisierten Tieren wurde ein nahezu kontinuierlicher Titeranstieg während des

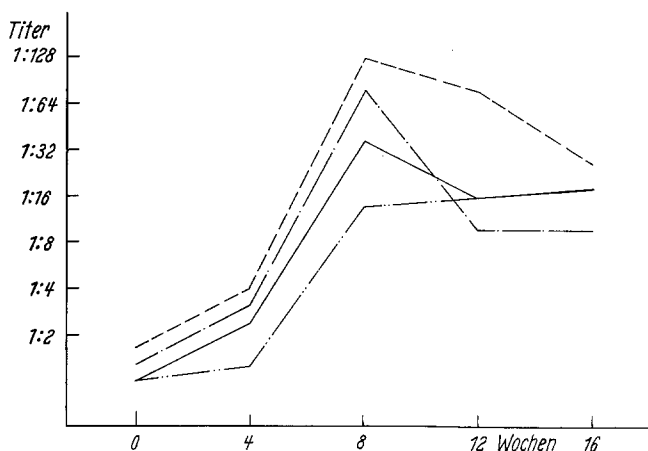


Abb. 1. Verlauf des Antikörpertiters, dessen Bestimmung mit der Hämagglutinationstechnik nach BOYDEN unter Verwendung eines homogenen Lebergesamtextrakts als Antigen erfolgte, während des Sensibilisierungszeitraumes von 16 Wochen bei den Gruppen A (---), B (-.-), C (-.-.-) und D (—)

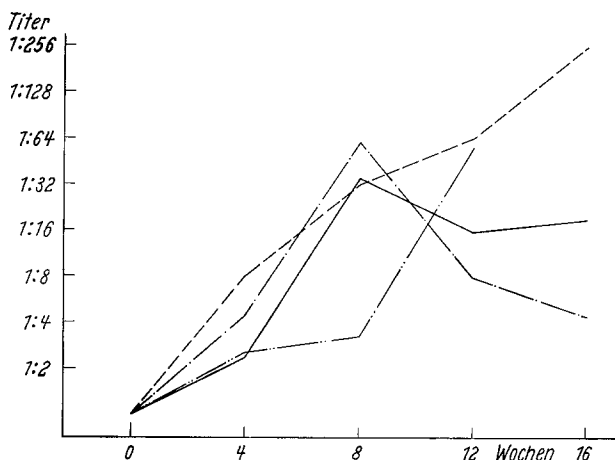


Abb. 2. Antikörper-Titerverlaufskurven für die Gruppen A, B, C und D, wobei für die Technik nach BOYDEN als Antigen in Gruppe A eine lyophilisierte Leberzellkernfraktion, in Gruppe B eine lyophilisierte Cytoplasmafraktion, in Gruppe C eine lyophilisierte Mitochondrien-Mikrosomenfraktion und in Gruppe D ein lyophilisierter Lebergesamtextrakt zur Anwendung kam

Sensibilisierungszeitraumes beobachtet. Hier wurden nach 16 Wochen die höchsten Titerwerte gemessen. Demgegenüber wurde bei den Tieren, die mit der Cytoplasmafraktion und mit Lebergesamtextrakt sensibilisiert wurden, das Titermaximum bereits nach 8 Wochen erreicht. In der Folgezeit kam es dann wieder zu einem Abfall.

Die Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle. *Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen nach Inkubierung von histologischen Leberpräparaten mit autologen und homologen Immunsereen*

Die Aufgliederung der Tabelle erfolgte entsprechend der Herkunft der Seren von Gruppe A, B, C und D sowie nach positivem oder negativem Fluoreszenzbefund der Parenchymzellen, Gallengänge bzw. mononucleären Zellen in den periportaln Feldern.

Fluoreszenzserologische Untersuchungen									
		Parenchymzellen				Gallengänge		Mononucleäre Zellen	
		Cytoplasma		Kerne					
		+	—	+	—	+	—	+	—
Autologe Seren	Kerne (A)	0	3	3	0	0	3	0	3
	Cyto (B)	3	0	0	3	0	3	2	1
	Mito (C)	3	0	1	2	1	2	0	3
	Gesamt (D)	4	0	2	2	2	2	1	3
Homologe Seren	Kerne (A)	4	7	8	3	0	11	1	10
	Cyto (B)	4	0	0	4	1	3	2	2
	Gesamt (D)	5	2	1	6	1	6	0	7

Die Leberparenchymzellen von Kaninchen der Gruppe D, die mit Lebergesamtextrakt sensibilisiert worden waren, zeigten bei Behandlung mit dem autologen markiertem Serum in allen Fällen eine intensive Fluoreszenz des Cytoplasmas, in einem Teil der Fälle auch eine sicher nachweisbare Fluoreszenz der Kerne der Leberparenchymzellen; in der Hälfte der Fälle konnte eine Fluoreszenz der Gallengänge beobachtet werden. Auffällig war in einem Präparat eine deutliche Fluoreszenz der mononucleären Zellen nach Inkubation mit der markierten Cytoplasmafraktion aus homologer Leber.

Bei Behandlung der Leberschnitte von Kaninchen der Gruppe B, die mit der Cytoplasmafraktion sensibilisiert worden waren, fand sich eine intensive Fluoreszenz des Cytoplasmas der Leberparenchymzellen, während die Kerne als dunkle Löcher ausgespart blieben (Abb. 3). Allerdings konnte in dieser Gruppe in keinem Fall eine Fluoreszenz der Gallengänge oder von Zellkernen beobachtet werden.

Demgegenüber fiel bei den Leberpräparaten, die von den mit der Kernfraktion sensibilisierten Tieren (Gruppe A) stammten, nach Behandlung mit autologem markiertem Serum jedesmal eine deutliche Fluoreszenz der Kerne sowie der Zellmembranen der Parenchymzellen auf, während das Cytoplasma nur in einem Fall gering angefärbt war (Abb. 4). Eine Fluoreszenz von mononucleären Zellen oder Gallengängen konnte nie beobachtet werden. Bei den mit der Mitochondrien-Mikrosomenfraktion sensibilisierten Tieren (Gruppe C) zeigte sich sowohl eine Fluoreszenz der Kerne der Parenchymzellen als auch eine solche des Cytoplasmas. Einmal konnte eine deutliche Fluoreszenz von Gallengängen beobachtet werden. Die Untersuchungsergebnisse bei Inkubierung von Leberpräparaten mit homologen Immunsereen sind in der Tabelle wiedergegeben. Sie entsprechen im wesentlichen den Befunden, die bei Inkubierung mit autologen Seren in den einzelnen Gruppen angegeben sind.

Die Kontrolluntersuchungen unter Verwendung von markierten Seren unbehandelter Tiere sowie nach Vorinkubierung mit nicht markierten Seren zeigten

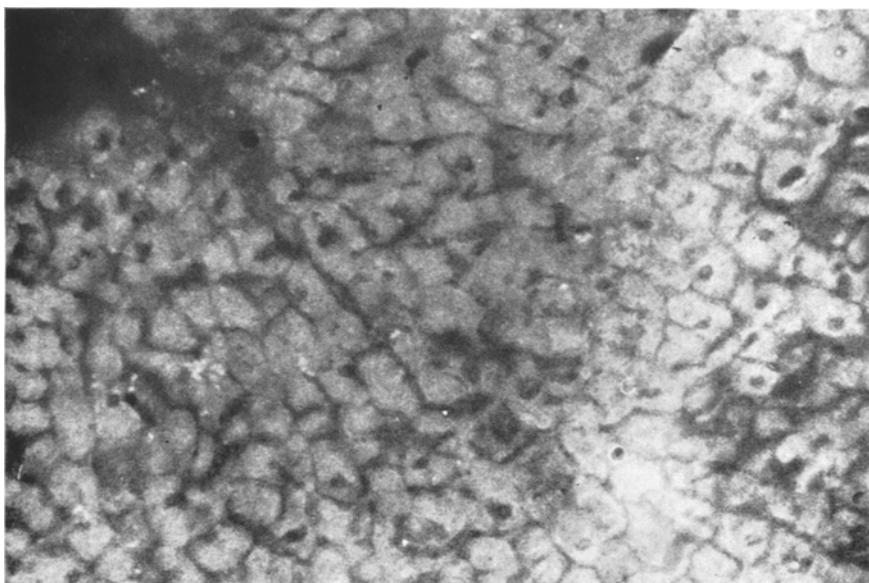


Abb. 3. Fluoreszenzserologischer Befund nach Inkubierung mit autologem Serum, das von einem mit der Cytoplasmafraktion 16 Wochen lang sensibilisierten Kaninchen stammt. Deutliche Fluoreszenz des Cytoplasmas der Parenchymzellen; die Zellkerne bleiben ausgespart

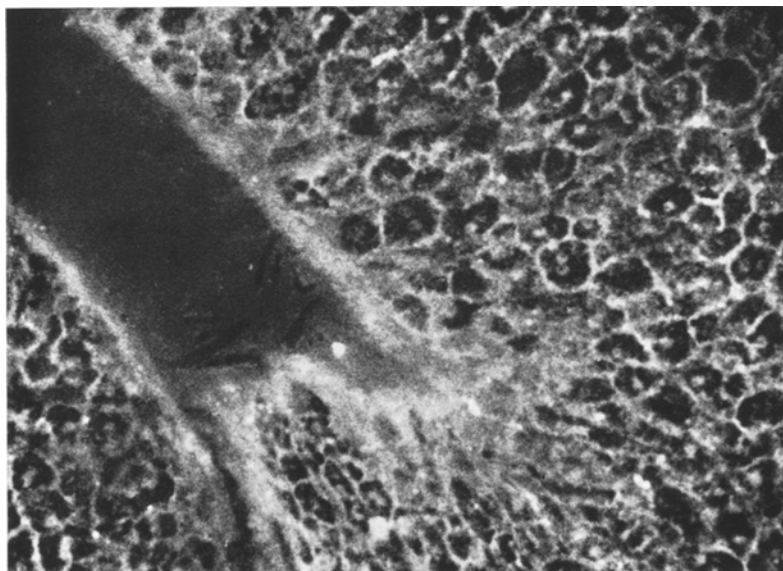


Abb. 4. Fluoreszenzserologisches Bild der Leber nach Inkubierung mit autologem Immunsrum von einem Kaninchen, das 16 Wochen mit homologer Leberzellkernfraktion sensibilisiert wurde. Deutliche Fluoreszenz der Kerne sowie der Zellmembranen

bis auf eine geringe Fluoreszenz des Cytoplasmas der Leberparenchymzellen stets negative Resultate. Spontanfluoreszenz der Präparate wurde nicht beobachtet. Bei Inkubierung der Schnittpreparate von Herz, Niere und Milz mit

markierten autologen Seren konnte bei Gruppe A in zwei Fällen, bei Gruppe C in einem Fall eine Kernfluoreszenz gesehen werden. In einem Nierenpräparat der Gruppe B konnte auch eine Fluoreszenz des Cytoplasmas der Tubulusepithelien nachgewiesen werden.

Nach passiver Übertragung von Mischseren, die von den Tieren der Gruppe A und D sowie von Normaltieren gewonnen wurden, konnten keine histologischen Veränderungen an den Lebern der Empfängertiere nachgewiesen werden. Insbesondere fanden sich keine Zeichen einer chronischen Hepatitis.

Diskussion

Die unter der Sensibilisierung beobachteten Bluteiweißveränderungen entsprechen bei den ersten Kontrollen 4 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn im wesentlichen einer unspezifischen Entzündungsreaktion mit Vermehrung der α - und β -Globuline. Eine Vermehrung der Immunglobuline im Bereich der γ -Globuline wurde nicht beobachtet. Zirkulierende Antikörper gegen homologes Lebergewebsantigen konnten bei allen vier Gruppen nachgewiesen werden. Der Verlauf der Titerkurve war in allen vier Gruppen etwa gleich. Auffällig war jedoch, daß die antinucleären Antikörper, die im wesentlichen nur bei den mit der Kern- und der Mitochondrien-Mikrosomenfraktion sensibilisierten Tieren beobachtet wurden, einen anderen Titerverlauf zeigten: hier wurden die höchsten Titer erst nach 16 Wochen beobachtet.

Mit diesen serologischen Befunden standen die fluoreszenzserologischen Ergebnisse in Übereinstimmung. Diese Untersuchungen bestätigten, daß es sich bei den Immunsereen, die durch Sensibilisierung mit den einzelnen Leberzellfraktionen erzeugt wurden, um weitgehend spezifische Antikörper handelt. Antinucleäre Antikörper konnten nach Sensibilisierung mit der Cytoplasmafraktion nicht gefunden werden, während die Immunsereen, die von den mit der Kernfraktion sensibilisierten Tieren stammten, eine intensive Fluoreszenz der Zellkerne erzeugten. Die Frage, ob es sich bei der in Gruppe A und D beobachteten Fluoreszenz der Parenchymzellmembranen bzw. der Wände der Sinusoide um ein spezifisches Phänomen handelt und damit etwa eine Antigenverwandtschaft zwischen Kern und Zellmembran besteht, kann auf Grund der mitgeteilten Untersuchungen nicht entschieden werden. Eine Fluoreszenz dieser Strukturen konnte nach Inkubierung mit markierten Kaninchennormalseren nicht beobachtet werden. Eine Markierung der Gallengangsepithelien zeigte sich insbesondere bei den mit der Lebergesamtfraktion sensibilisierten Tieren; sie wurde vereinzelt auch bei den Tieren der Gruppe A und C beobachtet.

Die fluoreszenzserologisch nachgewiesenen Antikörper erwiesen sich nicht als streng organspezifisch; sie gingen, allerdings in seltenen Fällen, Kreuzreaktionen mit Schnittpräparaten anderer Organe (Milz, Niere, Herz) ein. Insbesondere Seren mit antinucleären Antikörpern vermochten sich an Zellkerne anderer Organe zu binden.

Interessant ist das mehrfach beobachtete Phänomen einer Fluoreszenz der mononucleären Zellen nach Inkubierung mit markiertem Antigen (Cytoplasmafraktion). Dieses Phänomen, das insgesamt sechsmal nachgewiesen wurde, weist darauf hin, daß diese Zellen markierte Anteile der Cytoplasmafraktion zu binden

vermögen. Über ihre mögliche Bedeutung für die morphologischen Veränderungen der Leber sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die mitgeteilten Untersuchungsergebnisse sind auch für die Pathogenese der chronischen Hepatitis des Menschen von Interesse. In einer Reihe von Fällen konnte hier das Auftreten von antinucleären Antikörpern beobachtet werden. Bei diesen wegen ihrer Beziehungen zum Formenkreis der Kollagenosen als lupoide Hepatitis bezeichneten Lebererkrankungen des Menschen konnte von verschiedenen Autoren (HARDERS und DÖLLE, MACKAY et al., PARONETTO et al., POPPER, WEIR et al.) die Bindung von γ -Globulinen an Zellkerne homologen und autologen Leberbiopsiematerials nachgewiesen werden. Die Bedeutung derartiger antinucleärer Faktoren für die Krankheitsentwicklung ist aber wenig wahrscheinlich. In unseren Versuchen zeigten die Tiere mit antinucleären Antikörpern im Gegensatz zu den Tieren mit anticytoplasmatischen Antikörpern keine wesentlichen morphologischen Veränderungen.

Diese Beobachtung scheint zwar die Ansicht verschiedener Autoren, daß den anticytoplasmatischen Antikörpern für die Entwicklung der chronischen Hepatitis eine besondere Bedeutung zukomme, zu stützen. In unseren Versuchen erwiesen sich jedoch auch die Immunsere, die nach Sensibilisierung mit homologer Cytoplasmafraktion gewonnen wurden, bei passiver Übertragung als unwirksam. Es gelang nicht, mit diesen Seren ähnliche Veränderungen zu erzeugen, wie sie bei Tieren beobachtet wurden, von denen sie stammten. Diese Tatsache macht eine pathogene Wirksamkeit der zirkulierenden Antikörper zumindest unwahrscheinlich.

Zusammenfassung

Kaninchen wurden mit homologen Leberzellfraktionen (Kern-, Cytoplasma- und Mitochondrien-Mikrosomenfraktion) sowie zum Vergleich mit einem homologen Lebergesamtextrakt zusammen mit Freund'schem Adjuvans über 16 Wochen sensibilisiert. Durch serologische Verlaufskontrollen mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN konnten spezifische Antikörper gegen die einzelnen Leberzellfraktionen erfaßt werden. Fluoreszenzserologisch ließen sich spezifische anticytoplasmatische und antinucleäre Antikörper nachweisen. Eine pathogene Wirksamkeit dieser Antikörper ist auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse bei passiver Übertragung der Antiseren unwahrscheinlich.

Experimental Investigations in Animals on the Pathogenesis of Chronic Hepatitis

II. Serological Studies after Sensitization with Fractions of Homologous Liver Cells

Summary

Fractions of homologous liver cells (nuclear, cytoplasmic, and mitochondrial-microsomal fraction), and for comparison, a whole liver extract, were used with Freund's adjuvant to sensitize rabbits over 16 weeks. By means of periodic serological testing with the passive hemagglutination of BOYDEN the development of specific antibodies against the different liver cell fractions could be followed. Specific anticytoplasmic and antinuclear antibodies could be demonstrated by immune fluorescent technics. From the results of our studies it seems improbable that these antibodies act pathogenically after passive immunization.

Literatur

- BERG, G., F. SCHEIFFARTH, H. SCHÖN u. H. GÖTZ: Bluteiweiß. In: N. HENNING, Klinische Laboratoriumsdiagnostik, 2. Aufl., S. 10. München u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1960.
- BOYDEN, S. V.: Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.* **93**, 107 (1951).
- COONS, A. H., H. I. CREECH, and R. N. JONES: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **47**, 200 (1941).
- , and M. KAPLAN: Localisation of antigen in tissue cells. *J. exp. Med.* **91**, 1 (1950).
- ESTES, H. R.: Effect of antirats liver serum on rats. *Arch. Path.* **47**, 399 (1949).
- GOLDSTEIN, G., I. SLIZYS, and M. R. CHASE: Studies on fluorescent antibody staining. I. Nonspecific fluorescence with fluorescein-coupled sheep antirabbit globulins. *J. exp. Med.* **144**, 89 (1961).
- GRASSMANN, W., K. HANNIG u. M. KNEDEL: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier. *Dtsch. med. Wschr.* **76**, 333 (1951).
- HARDERS, H., u. W. DÖLLE: Das Syndrom der lupoiden Hepatitis. *Gastroenterologia (Basel)* **100**, 220 (1963).
- MACKAY, I. R., L. J. TAFT, and D. C. COWLING: Lupoid hepatitis. *Lancet* **1956 II**, 1323.
- MAYERSBACH, H. v.: Immunhistologische Methoden in der Histochemie. In: W. GRAUMANN u. K. NEUMANN, Handbuch der Histochemie, S. 598. Stuttgart: Gustav Fischer 1958.
- MILLOT, P., M. SAINT-PAUL et P. VERMA: La réaction de Prausnitz-Küstner en immunologie expérimentale; application à l'étude d'immun-anticorps antithrombocytaires, anti-hépatique et antiglobulinique. *Ann. Inst. Pasteur* **94**, 598 (1958).
- PARONETTO, F., F. SCHNAFFNER, and H. POPPER: Immunocytochemical reaction of serum of patients with hepatic diseases with hepatic structures. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **106**, 216 (1961).
- POPPER, H.: Possible role of immune processes in self perpetuation of liver diseases. In: P. GRABAR and P. MIESCHER, Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions, p. 303; 2nd Intern. Symp. on Immunopathology, Brook Lodge (Mich.). Basel u. Stuttgart: Benno Schwabe & Co. 1961.
- SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ, H. GÖTZ u. G. KETTNER: Tierexperimentelle Studien über die Bildung humoraler Organautoantikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe. *Z. Gastroenterologie* **2**, 279 (1964)..
- SCHNEIDER, W., and G. HOGEBOOM: Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome in rat liver homogenates. *J. biol. Chem.* **183**, 123 (1950).
- STEINER, J. W., J. S. CAREUTHERS, R. BAUMAL, and S. R. KALIFAT: Experimental immunologic liver injury and the concept of autodestruction. Part I and II. *Canad. med. Ass. J.* **85**, 1369, 1425 (1961).
- WEIR, D. M.: Liver autoantibodies in the rat. *Immunology* **6**, 581 (1963).
- E. J. HOLBOROW, and G. D. JOHNSON: Clinical study of serum antinuclear factor. *Brit. med. J.* **1961 I**, 933.

Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH
Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität
852 Erlangen