

## Zur Induktion einer aktiven chronischen Hepatitis durch heterologe lösliche Leberproteine

F. K. KÖSSLING und K. H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE

Pathologisches Institut (Direktor: Prof. Dr. H. BREDT)  
und II. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. P. SCHÖLMEICH)  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Eingegangen am 17. Juli 1968

### *Induction of Chronic Active Hepatitis by Organspecific Heterologic Soluble Proteins of the Liver*

*Summary.* These investigations are concerned with species- and organspecific liver proteins, demonstrated in earlier studies. Rabbits were sensitized utilizing similar protein-preparations obtained from human liver.

1. With long-term sensitizations (approximately one year) immuntolerances were induced in adult rabbits by chronic administration of small doses of protein. The state of immun tolerance could be disturbed by applying of heat- and sulfanilic acid-altered protein, which at the same time could be shown to have induced hypersensitivity of delayed type. — Histologically active chronic hepatitis was found in all animals. Other organs such as heart, lung, skeletal muscle, thyroid gland and kidney were not affected.

2. In short-term sensitizations with a high dosis of liver protein only dense lymphocytic infiltrations in the periportal areas were found histologically. In one animal only early changes of a chronic hepatitis were seen.

Antigenic relations between human and rabbit liver proteins, as demonstrated earlier by serological techniques, are discussed in detail. Hypersensitivity of the delayed type would seem to play an important role in the development of active chronic hepatitis. This condition can be produced with long-term stimulations.

*Zusammenfassung.* Die Untersuchungen gehen von dem früher geführten Nachweis eines im immunologischen Sinne organspezifischen und weitgehend speciesexklusiven Proteins der Leber aus. Entsprechende Proteinpräparationen aus menschlichen Lebern wurden zur Sensibilisierung von Kaninchen eingesetzt.

1. Bei langdauernder Sensibilisierung (über 1 Jahr) mit kleinen Dosen gelang beim erwachsenen Kaninchen die Induktion einer Immuntoleranz, die durch Applikation von hitze- und sulfanilsäurealteriertem Protein durchbrochen werden konnte; gleichzeitig konnte eine Hypersensibilität vom verzögerten Typ induziert werden. Histologisch fand sich bei allen Tieren eine aktive chronische Hepatitis; die übrigen Organe (Herz, Lunge, Skelettmuskulatur, Schilddrüse und Niere) waren frei von pathologischen Veränderungen.

2. Bei kurzzeitiger Sensibilisierung (3 Monate) mit hohen Dosen fand sich histologisch lediglich eine dichtzellige lymphocytäre Infiltration der Periportalfelder der Leber; nur bei einem Tier bestanden geringe Hinweiszeichen auf eine beginnende chronische Lebererkrankung.

In der Diskussion wird auf die serologisch nachweisbare Antigenverwandtschaft der entsprechenden Proteine von humaner und Kaninchenleber hingewiesen. Für die Entwicklung einer chronisch-progredienten Organerkrankung scheint die Ausbildung einer Hypersensitivität vom verzögerten Typ im Rahmen einer langdauernden Stimulierung wesentlich zu sein.

Bei seltenen Verlaufsformen einer chronischen progredienten hyper-gammaglobulinämischen Hepatitis lassen sich als passagere Befunde Gamma-G-Typ Auto-Antikörper nachweisen, die mit einem löslichen Protein aus menschlichen Lebern

reagieren und durch entsprechende Fraktionen anderer Organe nicht absorbierbar sind. Diese Antikörper sind damit als organspezifisch charakterisiert, eine komplette Speciespezifität besteht nicht. Das antigene Substrat der beschriebenen Antikörper konnte inzwischen näher charakterisiert werden. Es handelt sich um ein weitgehend speciesexclusives, organgebundenes Protein im Cytoplasma der menschlichen Leber, welches mittels Ultrazentrifugation, Chromatographie an Sephadex G 100 und Ammoniumsulfatfällung gewonnen werden kann. Gegen dieses Protein ist im erwachsenen Kaninchen eine Immuntoleranz induzierbar, die nicht mit nativen, jedoch mit alterierten Leberproteinen zerstörbar ist (MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, 1968a, b).

Gleichzeitig läßt sich mit diesem Protein eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ durch langdauernde Immunisierung mit kleinen Dosen induzieren. Damit bietet das Versuchsmodell die Möglichkeit, das Auftreten organlokalisierter immunpathologischer Reaktionen im Sinne einer chronischen Hepatitis zu studieren.

Eine zusammenfassende Darstellung der bisherigen Versuche zu diesem Problem findet sich bei PARONETTO (1968) bzw. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE (1968a). In dieser Arbeit soll über die histopathologischen und fluoreszenzhistologischen Befunde berichtet werden, die nach Sensibilisierung erwachsener Kaninchen mit löslichen Proteinen aus menschlichen Lebern gewonnen wurden (MEYER ZUM BÜSCHENFELDE u. KÖSSLING, 1968).

## Methodik

### 1. Gewinnung der Antigene

Eine ausführliche Darstellung der Methoden zur Antikörperanalyse, zur Gewinnung antigenwirksamer subcellulärer Fraktionen mittels Ultrazentrifugation, Chromatographie an Sephadex G 100 und Ammoniumsulfatfällung sowie zur Modifikation löslicher Leberproteine mittels Koppelung an Sulfanilsäure bzw. Alteration durch Hitze findet sich bei MEYER ZUM BÜSCHENFELDE (1968a, b).

### 2. Versuchsanordnung

*a) Gruppe 1 (3 Kaninchen).* Die Tiere (2000—3000 g schwer; weiße Neuseeländer) wurden nach dem in Tabelle 1 angegebenen Schema immunisiert und zwar wurden die 150000 G-Überstände einer Ultrazentrifugation kernfreier Leberhomogenate gegeben. Nach anfänglicher Antikörperantwort vom Soforttyp war nach dem 160. Versuchstag lediglich noch eine Hypersensibilität vom verzögerten Typ (Hauttest) nachweisbar. Eine Antikörperantwort vom Soforttyp war durch Steigerung der Antigendosis über 3mal 25 mg nicht induzierbar. Gaben von hitzealteriertem bzw. an Sulfanilsäure gekoppeltem Protein führten bei Fortbestehen einer Hypersensibilität vom verzögerten Typ (Hauttest) zur Antikörperantwort vom Soforttyp und zwar gegen das jeweils native bzw. alterierte Protein. Die Tiere wurden ca. 3 Monate nach der letzten Sensibilisierung entblutet und die Organe histologisch sowie fluoreszenzhistologisch und histochemisch untersucht.

*b) Gruppe 2 (4 Kaninchen).* Bei diesen Tieren (2000—3000 g schwer; weiße Neuseeländer) wurde mittels kleiner Antigendosen subcutan eine Immuntoleranz gegen lösliches humanes Leberprotein induziert. Verwendet wurden die chromatographisch gewonnenen Fraktionen 1 und 2 aus löslichem Leberprotein (150000 G-Überstände; s. Abb. 9, Z. ges. exper. Med. Bd. 148, S. 146, 1968). Das organspezifische Protein lag in diesen Fraktionen in angereicherter Form sowie nichtaggregiert vor. (Einzelheiten zur Methode s. bei MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, 1968a.) Die erworbene Immuntoleranz konnte gleichfalls nur mit sulfanilsäurealteriertem

Leberprotein durchbrochen werden. Tabelle 1 zeigt im einzelnen den Verlauf der Versuche. Die Tiere wurden 3—5 Monate nach der letzten Sensibilisierung getötet.

c) *Gruppe 3 (3 Kaninchen)*. Die Tiere (2000—3000 g schwer; weiße Neuseeländer) wurden mit hohen Antigen Dosen der Fraktion I und II sensibilisiert. Die Gesamtantigen Dosis lag über der der Tiere der Versuche 1 und 2. Sämtliche Tiere reagierten in Form einer Antikörperantwort vom Soforttyp. Es ließen sich Antikörper gegen lösliches humanes Leberprotein nachweisen. Zirkulierende Autoantikörper wurden nicht gefunden; auch eine Antikörperantwort vom verzögerten Typ (Hauttest) war nicht nachweisbar. Die Tiere wurden 3—4 Monate nach der letzten Immunisierung getötet.

d) *Kontrollgruppe (8 Kaninchen; 2000—3000 g schwer; weiße Neuseeländer)*. 4 Tiere wurden mit komplettem Freundschens Adjuvans und Sulfanilsäure 3mal wöchentlich über 8 Wochen behandelt; es wurden jeweils 2 ml Adjuvans und 10 mg Sulfanilsäure gegeben. Weiterhin wurden 2 Tiere nach gleichem Schema lediglich mit Sulfanilsäure behandelt; 2 Tiere dienten unbehandelt als Kontrolle. Kontrollen zum Nachweis von Antikörpern gegen subcelluläre Organfraktionen, den Versuchen 1, 2 und 3 entsprechend, waren negativ.

### 3. Untersuchungen der Gewebe

a) *Histologische Untersuchungen*. Organstücke von Leber, Milz, Niere, Lymphknoten, Lunge, Thymus, Schilddrüse, Herz- und Skelettmuskulatur sowie Haut wurden nach Fixation in 10%iger gepufferter, neutraler Formalinlösung in Paraffin eingebettet.

b) *Fluoreszenzhistologische Untersuchungen*. Herstellung der Proteinkonjugate: Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin bzw. lösliche Proteinfraktionen von Kaninchen- und Menschenleber, -niere und -skelettmuskulatur wurden unter Zusatz von 0,85%iger Kochsalzlösung und 10%igem 0,5 m-Carbonatpuffer (pH 9,5) auf eine Konzentration von 10 mg Protein/ml eingestellt und mit 5 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC) über 14 Std im Kältelabor konjugiert (SMITH u. Mitarb., 1966; STRAUSS u. Mitarb., 1960). Während der 1. Std wurde der pH des Konjugates kontrolliert und bei Absinken durch Zusatz von Puffer erneut auf einen Wert von 9,5 eingestellt (SMITH u. Mitarb., 1966). Die Reinigung des Konjugates erfolgte an Sephadex G 50 mittels unterschiedlich molarer, phosphatgepufferter NaCl-Lösung (KRACHT u. Mitarb., 1967). Anschließend erfolgte eine Einengung der gereinigten Fraktion an Dextran T 80.

Herstellung der fluoreszenzhistologischen Präparate: Nach Entblutung der Tiere durch Herzpunktion wurden Organstücke von Leber, Niere und Milz frisch tiefgefroren und Kryostat-schnitte angefertigt. — Die 8  $\mu$  dicken Schnitte wurden nach Lufttrocknung und kurzzeitiger Fixation in kaltem Aceton 3mal 5 min in PBS gespült und danach für 1 Std bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte erneut Spülung der Präparate in 3mal gewechseltem PBS und Eindecken in gepufferter Glyceringelatine. Zu allen Versuchen wurden Kontrollen durch Blockierung mit unmarkierten Seren und Proteinen durchgeführt.

c) *Fermenthistochemische Untersuchungen*. Dargestellt wurden an unfixierten Kryostat-schnitten Succinatdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratdehydrogenase, Lactatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und Monoaminoxidase (Monoaminoxidase) mit der Tetrazoliummethode sowie Adenosintriphosphatase und Glucose-6-phosphatase (Metallsalzmethode). An fixierten Schnitten wurde die saure und alkalische Phosphatase (Azofarbstoffmethode bzw. Metallsalzmethode) dargestellt (Methoden nach PEARSE, 1961, bzw. SPANNHOF, 1967).

## Ergebnisse

### 1. Leberveränderungen

a) Bei sämtlichen Tieren der *Gruppe 1* fand sich histologisch das Äquivalentbild einer aktiven chronischen Hepatitis (s. Abb. 1 a und b bzw. Tabelle 2). — Fluoreszenzhistologisch gelang der Nachweis von Autoantikörpern gegen Lebergewebe in den Leberepithelien der Läppchen-peripherie sowie in vereinzelt runden Elementen des periportal Feldes. Der Nachweis gelang mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin und mit FITC-markierten löslichen Leberproteinen der Fraktionen 1 und 2 vom Kaninchen (Abb. 3 a und b). — Ferment-histochemisch fanden sich im Bereich der von entzündlichen Infiltraten zerstörten Grenz-platten der Leberläppchen deutliche Defekte bzw. Aktivitätsminderungen der Succinat-

Tabelle 1. Schema des Versuchsplans

Versuchsdauer in Tagen

		100										200	300	400	500
Gruppe I	Prot./mg.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	25	25	5A	5A
	Zirk. AK	+	+	-	-	(+)	+	-	-	-	-	Adj. Adj.	275	275	275
	I. C. T.														
	Entblutet														
Gruppe II	Prot./mg.	5	5	5	5	5	5	15	25	25	25	275	275	5A	5A
	Zirk. AK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Adj. Adj.	275	275	275
	I. C. T.														
	Entblutet														
Gruppe III	Prot./mg.	165	165	3x150	60	200(3)									
	Zirk. AK	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	I. C. T.														
	Entblutet														
Kontr. Gruppe	12-2ml Adj.														
	Zirk. AK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I. C. T.														
	Entblutet														

Zeichenerklärung: Zirk. AK = Zirkulierende Antikörper; + = AK Titer > 1:80; + = AK Titer > 1:20; (+) = AK Titer < 1:20; - = keine AK; + = positiv; - = negativ; ( ) = Nr. des Tieres, I. C. T. = Intra Cutantest; Prot./mg = Proteindosis in Milligramm pro Injektion; Adj. = Completted Freundsches Adjuvans; SA = Sulfanilsäure-Alteration; HA = Hitzealteration.

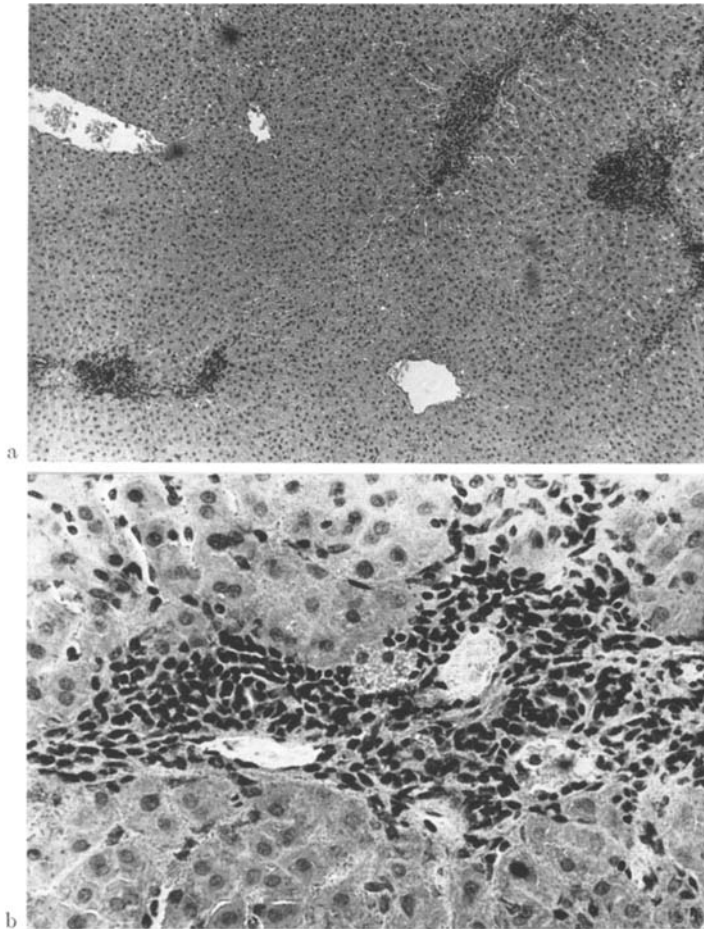


Abb. 1 a u. b. Versuch 1, Tier 1: aktive chronische Hepatitis. (Paraff., Häm.-Eos., Mikroskop. Vergr. 31 bzw. 313  $\times$ )

dehydrogenase, der Isocitratdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase. Veränderungen der Malat- und Lactatdehydrogenase sowie der Monoaminoxidase waren nur inkonstant nachweisbar. Die Phosphatasen zeigten in den genannten Gruppen regelmäßig Fermentaktivitätsminderungen der Adenosintriphosphatase und z. T. auch der Glucose-6-Phosphatase. Veränderungen der alkalischen und sauren Phosphatase waren nicht nachweisbar.

*b) Gruppe 2.* Alle Tiere dieser Gruppe zeigten histologisch, fluoreszenzhistologisch und fermenthistochemisch die gleichen Befunde wie die Tiere der Gruppe 1; es bestanden weder qualitative noch quantitative Unterschiede (Abb. 2a und b; s. auch Tabelle 2 und 3).

*c) Gruppe 3.* Histologisch fand sich bei 2 Tieren eine dichtzellige lymphocytäre Infiltration der Periportalfelder. Die Grenzplatten waren dabei zum Teil unscharf. Lediglich bei einem Tier (3/1) fanden sich im Bereich der durchbrochenen Grenzplatten einzelne sog. Piecemealnekrosen, so daß der Beginn einer chronischen Hepatitis diskutiert werden muß. Weiterhin fand sich bei einem Tier eine ältere sog. eosinophile Nekrose des Parenchyms mit zentralen Fibrinresten und Fremdkörperriesenzellen (Abb. 4). — Fluoreszenzhistologisch fanden sich die gleichen Veränderungen wie in den Gruppen 1 und 2; die Veränderungen waren jedoch quantitativ ungleich geringer ausgeprägt; nur sehr selten waren in Periportalfeldern bzw. in einigen läppchenperipher gelegenen Epithelien positive Fluoreszenzen mit FITC-markiertem

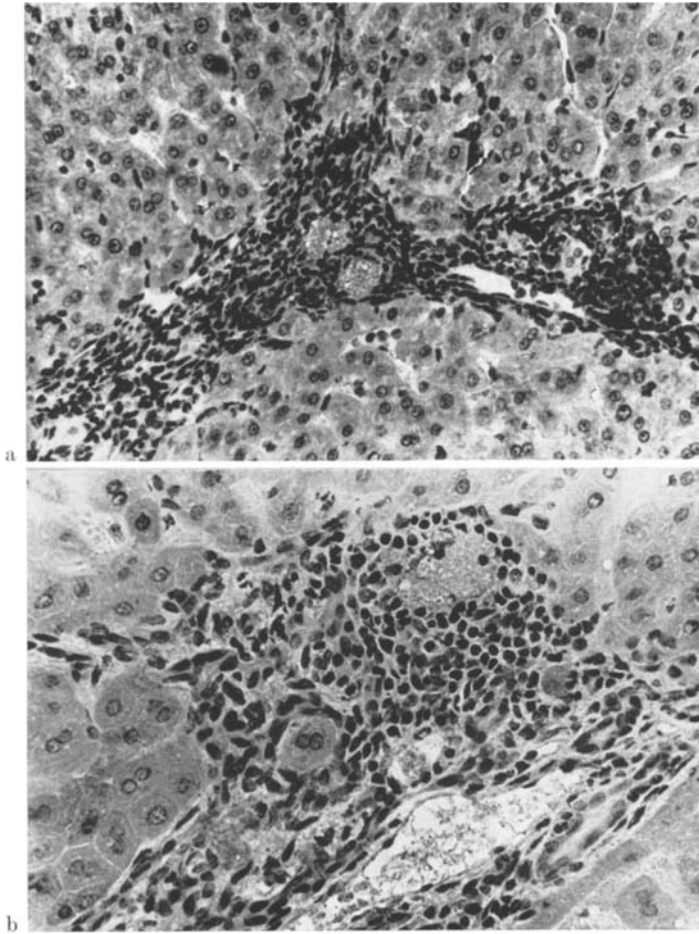


Abb. 2a u. b. Versuch 2, Tier 2: aktive chronische Hepatitis. (Paraff., Häm.-Eos., Mikroskop. Vergr. 125 bzw. 313  $\times$ )

Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin bzw. löslichem Leberprotein vom Kaninchen nachweisbar. — Die fermenthistochemischen Befunde waren gleichfalls gering ausgeprägt.

*d) Kontrollgruppe.* Die Lebern erschienen bis auf geringe und inkonstante Rundzellenansammlungen in den Periportalfeldern unauffällig. (1 Tier mußte wegen einer generalisierten, epitheloidzelligen Granulomatose ausgeschlossen werden.) Weiterhin fanden sich bei den mit Freund'schem Adjuvans behandelten Tieren vereinzelt kleine Leberzellnekrosen, bei denen es sich möglicherweise um ältere, sog. eosinophile Nekrosen handelt. — Die fluoreszenzhistologischen und fermenthistochemischen Untersuchungen ergaben keine pathologischen Befunde. (Zusammenfassung der histologischen und fluoreszenzhistologischen Befunde s. Tabelle 2 und 3.)

## 2. Übrige Organe

Die häufigsten Veränderungen waren in der Milz nachweisbar; bei 5 Tieren der Gruppe 1 und 2 bestand eine deutliche, ausgeprägte Follikel- und Pulpahyperplasie; gleiche, wenn auch geringere Veränderungen bestanden bei den Tieren der Gruppe 3. Bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigten lediglich die mit Adjuvans behandelten eine geringe Pulpahyperplasie. — Sämtliche anderen untersuchten Organe (Lunge, Herz, Skelettmuskulatur, Nieren und Schilddrüsen) waren frei von pathologischen Veränderungen.

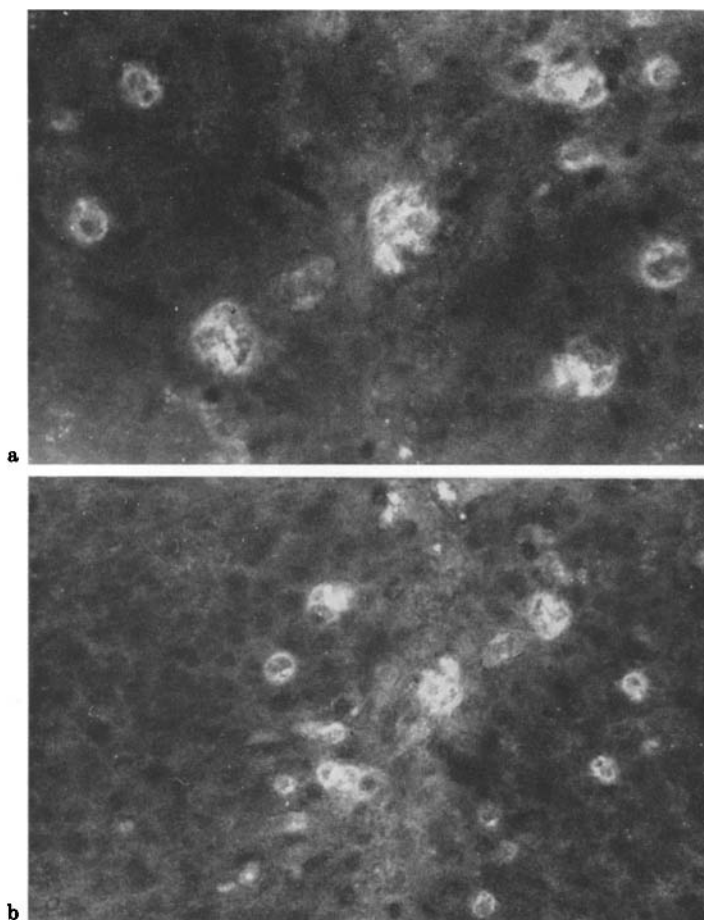


Abb. 3. a Versuch 1, Tier 1: Fluoreszenz von Leberepithelien nach Inkubation von FITC-markiertem Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin. (Mikroskop. Vergr. 500  $\times$ ). b Versuch 1, Tier 1: Fluoreszenz von Leberepithelien nach Inkubation von FITC-markiertem spezifischem löslichem Protein aus Kaninchenleber. (Mikroskop. Vergr. 313  $\times$ )

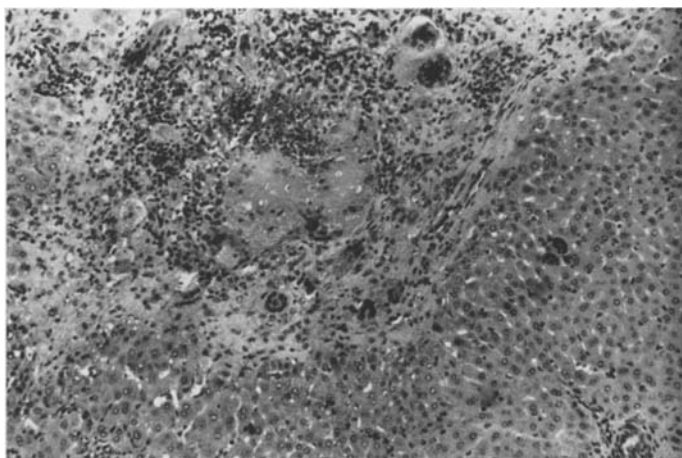


Abb. 4. Versuch 3, Tier 3: ausgedehnte, alte sog. eosinophile Nekrose mit Fremdkörperriesenzellen und peripherer Fibrose. (Paraff., Hämat.-Eos., Mikroskop. Vergr. 125  $\times$ )

Tabelle 2. *Histologische Ergebnisse*

Gruppe	Leber	Milz	Herz	Schild- drüse	Niere	Skelet- muskulatur	Lunge
I	aktive, chronische Hepatitis	Follikel- und Pulpa-hyperplasie (5 Tiere)	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
II	aktive, chronische Hepatitis	ohne pathol. Befund (2 Tiere)	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
III	zellreiche lymphocytäre Infiltrate in Periportalfeldern; Grenzplatten z. T. durchbrochen. 1 Tier mit beginnender chron. Hepatitis. 1 Tier mit älterer eosinophiler Nekrose	Follikel- und Pulpa-hyperplasie	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
Kontrolle	3 Tiere mit älteren (eosin. ?) Nekrosen; z. T. lockere rundzellige Infiltrate in Periportalfeldern	z. T. geringe Pulpa-hyperplasie	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.

Tabelle 3. *Fluoreszenzhistologische Ergebnisse (Leber)*

Gruppe	Anti-Kaninchen- $\gamma$ -Globulin, FITC-markiert	Lösliches Protein, Kaninchenleber; FITC-markiert	Lösliches Protein, Humanleber, FITC-markiert	Lösliches Protein, Kaninchenleber; Anti-Kaninchen-Globulin-FITC-markiert	Lösliches Protein, Kaninchenleber; FITC-markiert	Lösliches Protein, Humanleber; FITC-markiert
I	periportale Rundzellen Epithelien in Läppchen-peripherie	periportale Rundzellen <sup>a</sup> , Epithelien in Läppchen-peripherie <sup>a</sup>	Ø	Ø	Ø	Ø
II	wie Gruppe I	wie Gruppe <sup>a</sup>	Ø	Ø	Ø	Ø
III	wie Gruppe I; Befunde jedoch sehr gering ausgeprägt	wie Gruppe I; Befunde jedoch sehr gering ausgeprägt	Ø	Ø	Ø	Ø
Kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

<sup>a</sup> Nach Blockierung mit unmarkiertem löslichem Protein (Kaninchenleber) deutliche Abschwächung, jedoch keine vollständige Auslöschung der Fluoreszenz.

### Diskussion

Drei verschiedene Versuchsmodelle wurden eingesetzt, um die immunpathologische Bedeutung heterologer löslicher Leberproteine zu prüfen. In Gruppe 1 gelang es mittels kleiner Proteinmengen nach anfänglicher Antikörperantwort vom Soforttyp eine Hypersensibilität vom verzögerten Typ gegen organgebundene lösliche Leberproteine zu induzieren. Steigende Dosen des nativen Proteins waren nicht in der Lage nach dem 160. Versuchstag eine Antikörperantwort vom Soforttyp auszulösen. Durch Gabe von hitzealterierten bzw. an Sulfanilsäure gekoppelten Leberproteinen wurde die Toleranz gegenüber einer Sensibilität vom Soforttyp durchbrochen. In Gruppe 2 wurde die Dosiszone, die zur Induktion einer Immuntoleranz geeignet war, 100 Tage lang nicht überschritten. Die verabreichten stabilen, von aggregierten Molekülen befreiten Proteinlösungen führten danach in steigenden Konzentrationen nicht zu einer Antikörperantwort vom Soforttyp oder Spättyp. Mit Durchbrechung der Immuntoleranz mittels alterierter Proteine kommt es neben einer passageren Antikörperantwort vom Soforttyp zur Entwicklung einer Hypersensibilität vom verzögerten Typ. In der Gruppe 3 führten 6 Injektionen bei 2 Tieren und 7 Injektionen bei einem Tier mit einer Gesamtproteinmenge, die höher lag, als in den Versuchen 1 und 2 pro Tier, zu einer Antikörperantwort vom Soforttyp. Eine Hypersensibilität vom verzögerten Typ war als Hauttest nicht nachweisbar. Als Kontrolle dienten Tiere, die mit Adjuvantien bzw. in Kombination mit Sulfanilsäure während 8 Wochen behandelt wurden.

Die histologischen Befunde der Tiergruppen lassen den Versuchsanordnungen entsprechend deutliche Unterschiede erkennen. Die Tiere der Gruppe 1 und 2 zeigen sämtlich das Bild einer aktiven chronischen Hepatitis. Die Gruppe 3 läßt lediglich Rundzelleninfiltrate in den periportal Feldern erkennen, dabei sind die Grenzplatten hier und da durchbrochen. Lediglich bei einem Tier muß eine beginnende chronische Hepatitis diskutiert werden. — Die Milz zeigte bei diesen Tieren überwiegend eine Follikel- und Pulpahyperplasie. In keinem anderen Organ (Niere, Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur, Schilddrüse, Lunge) wurden pathologische Befunde gesehen, die denen im Bereich der Leber vergleichbar sind. In den Kontrollen waren außer vereinzelt eosinophilen Leberzellnekrosen keine histopathologischen Befunde nachweisbar.

Die *fluoreszenzhistologischen Untersuchungen* erbrachten sowohl mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin, als auch mit fluoreszenzmarkiertem löslichen Leberprotein vom Kaninchen, den Nachweis von Autoantikörpern im Cytoplasma einzelner Leberepithelien der Läppchenperipherie und entsprechende Befunde in vereinzelt Zellen des periportal Feldes. Damit dürfte die Induktion eines Autoantikörpers gegen Antigene des Lebercytoplasmas und auch die Induktion von spezifischen Immunzellen angenommen werden. Die Kontrolluntersuchungen beweisen die Organspezifität des Befundes.

Für die Induktion einer aktiven chronischen Hepatitis mittels heterologer Leberproteine kann noch keine endgültige Erklärung gebracht werden. Die bisherigen Untersuchungen erlauben jedoch folgende Aussagen:

Von organgebundenen löslichen Leberproteinen ausgehend, ist zunächst die Möglichkeit einer Antigenverwandtschaft zwischen injizierten heterologen und entsprechenden autologen Leberproteinen zu diskutieren. Untersuchungen zu

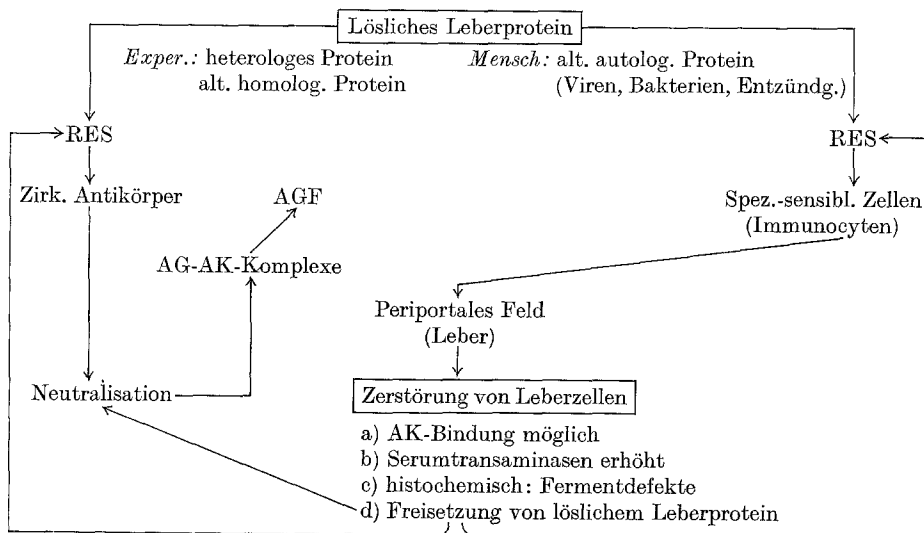
diesem Problem haben bisher nur eine Speciespezifität der organspezifischen Proteine von Mensch, Ratte und Kaninchen erbracht. Kreuzreaktionen wurden in einzelnen Fällen unter Anwendung der Ouchterlony-Technik, der passiven Hämagglutination sowie bei Absorptionsversuchen beobachtet. Damit ist die Möglichkeit zur Induktion eines mit dem autologen Protein kreuzreagierenden Autoantikörpers grundsätzlich denkbar. In unseren Versuchen konnten wir einen solchen Autoantikörper nicht als circulierenden Antikörper, jedoch mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik unter Verwendung von Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin bzw. fluoreszenzmarkiertem Kaninchenleberprotein in einzelnen Leberepithelien der Läppchenperipherie nachweisen. Die Antigenverwandtschaft zwischen heterologen und autologen Proteinen erhält nun noch eine weitere Stütze. Die histologischen Befunde zeigen eindeutig eine Durchbrechung von Grenzplatten mit Abschnürungen von Leberepithelien durch Rundzellen. Es dürfte sich dabei um Zellen handeln, die durch eine Sensibilisierung mit einem dem autologen Leberprotein antigenverwandten organspezifischem Protein induziert wurden.

Neben diesen grundsätzlichen Voraussetzungen für die Induktion einer organgebundenen immunpathologischen Reaktion soll eine weitere wichtige Tatsache diskutiert werden, die sich aus der Versuchsanordnung ergibt. Die Induktion einer Hypersensibilität vom verzögerten Typ scheint für die Entstehung einer chronisch progredienten Organerkrankung besonders wichtig zu sein. Ob diese Hypersensibilität vom verzögerten Typ nun über kleine Antigendosen direkt oder über eine induzierte Immuntoleranz und deren Durchbrechung mit alterierten Proteinen erzeugt wird, ist grundsätzlich gleich. Immerhin scheint ein langdauernder Immunisierungsprozeß, der bei unseren Tieren über 1 Jahr dauerte, wichtig zu sein. Eine aktive chronische Hepatitis zeigt sich noch 2—5 Monate nach Absetzen der Proteingaben. Demgegenüber erzeugt die Gabe hoher Dosen löslichen Leberproteins innerhalb von 12 Wochen lediglich dichtzellige Rundzelleninfiltrate in periportalen Feldern. Nur bei einem Tier muß der Beginn einer chronischen aktiven Hepatitis diskutiert werden. Eine starke Antikörperantwort vom Soforttyp ist noch mehrere Monate ohne Boosterungen nachweisbar. — Unsere Kontrollen zeigten lediglich Leberzellnekrosen bei den mit Adjuvans behandelten Tieren. Diese Befunde deckten sich mit denen von PARONETTO (1968), der im Meerschweinchen nach Gaben von Adjuvans gleichfalls eosinophile Nekrosen erzeugen konnte (vgl. JAHIEL u. KOFFLER, 1961; LAUFER u. Mitarb., 1959; NORKIN u. Mitarb., 1962).

Wir möchten folglich annehmen, daß eine Allergie oder *Hypersensibilität vom verzögerten Typ*, induziert durch kleine Proteindosen *über einen langen Zeitraum*, für das Entstehen einer *autoaggressiven Gewebläsion entscheidend* ist. Die fluoreszenzhistologischen Untersuchungen lassen es weiterhin als möglich erscheinen, daß eine direkte Bindung von Autoantikörpern an cytoplasmatische Strukturen im Bereich geschädigter Zellen vorkommt. — Ein vergleichbares Modell zur Induktion einer chronischen Hepatitis ist uns aus dem Schrifttum nicht bekanntgeworden. Zu diskutieren sind in diesem Zusammenhang lediglich Befunde von PARONETTO (1968), der in Meerschweinchenversuchen mit homologen löslichen Leberproteinen in nativer und alterierter Form kombiniert mit komplettem Freudschen Adjuvans sowie mit Adjuvans allein eine Hypersensibilität vom verzögerten Typ gegen das jeweils autologe Leberprotein erzeugte. Bei einer Ver-

suchsdauer von ca. 90 Tagen war der histologisch auffälligste Befund eosinophile Nekrosen in allen Gruppen, vor allem auch bei den mit Adjuvans behandelten Tieren. Complement und Gammaglobulin ließen sich in den Nekrosen nicht nachweisen. Der Autor vermutet einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen eosinophilen Nekrosen und der bestehenden Hypersensibilität vom verzögerten Typ. Trotz weitgehender Differenzen hinsichtlich der Versuchstiere, der Versuchsdauer, der Art der Sensibilisierung und des Zeitpunkts der Tötung der Tiere bedürfen die gemeinsamen Befunde einer kurzen Besprechung. In unserer Adjuvanskontrolle wurden ebenfalls eosinophile Nekrosen gefunden. Wenn auch nicht so regelmäßig, so doch eindeutig, zeigten Tiere der Gruppe 3 solche Befunde. Diese Veränderungen, die hier in Verbindung mit einer AK-Antwort vom Soforttyp entstanden sind, haben zuvor bereits HAMAMOTO et al. (1964) beobachtet. Eosinophile Nekrosen sind somit nicht ausschließlich das Reaktionsprodukt einer Hypersensibilität vom verzögerten Typ, sondern auch vom Soforttyp. Die Rolle dieser Veränderungen bei der Entwicklung einer aktiven chronischen Hepatitis ist unseres Erachtens fraglich bzw. noch unbewiesen. Unsere Versuche zeigten demgegenüber, daß eine, mit einem organgebundenen Protein induzierte Hypersensibilität vom verzögerten Typ für die Entstehung einer aktiven chronischen Hepatitis entscheidend ist. Dabei ist es grundsätzlich wichtig, daß ein organgebundenes Protein in Form des nativen heterologen oder alterierten homologen Proteins (unpublizierte Befunde in Vorbereitung) zur Sensibilisierung eingesetzt werden.

Unsere Befunde lassen bisher den im nachfolgenden Schema zusammengefaßten Entwicklungsgang einer aktiven chronischen Hepatitis als denkmöglich erscheinen:



Nach den vorliegenden Experimenten sowie nach unveröffentlichten Befunden führt die Sensibilisierung mit heterologem bzw. alteriertem homologem Protein über eine RES-Stimulierung einerseits zu einer Antikörperantwort vom Soforttyp und andererseits zur Stimulierung spezifisch sensibilisierter Zellen. Die chronisch

fortschreitende Lebererkrankung wird von diesen spezifisch sensibilisierten Zellen unterhalten. Dabei muß eine Freisetzung von löslichem Leberprotein angenommen werden, die wiederum über eine RES-Stimulierung beide Immunvorgänge unterhält. Die Antikörperantwort vom Soforttyp dürfte keine pathogenetische, sondern nur diagnostische Bedeutung haben. Diese Bedeutung bezieht sich auf den Nachweis organspezifischer Antikörper und den Nachweis durch Antigen-Antikörper-Komplexe induzierter Anti-Gamma-Globulin-Faktoren (AGF). — Die Entstehung der menschlichen chronischen Hepatitis setzt nach diesen Vorstellungen eine Alteration des organspezifischen Proteins voraus.

### Literatur

- HAMAMOTO, Y., and A. YOSHIMA: Hepatic circulation in the experimental allergic hepatitis. *Jap. Circulat. J.* **28**, 108—110 (1964).
- JAHIEL, R. I., and D. KOFFLER: Hepatic granulomas induced in guinea pigs by Freund adjuvant with and without homologous liver. *Brit. J. exp. Path.* **42**, 338—342 (1961).
- KRACHT, J., U. HACHMEISTER, H.-J. BREUSTEDT u. H.-D. ZIMMERMANN: Immunhistologische Hormonlokalisation im Hypophysenvorderlappen des Menschen. *Mat. med. Nordmark* **19**, 224—238 (1967).
- LAUFER, A., C. TAL, and A. J. BEHAR: Effect of adjuvant and its components on the organs for various animals species; a comparative study. *Brit. J. exp. Path.* **40**, 1—7 (1959).
- MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K. H.: a.) Klinische Untersuchungen zur immunologischen Spezifität des Leberparenchyms. *Arch. Klin. Med.* **215**, 107—132 (1968).
- b) Untersuchungen über die immunologische Bedeutung löslicher Leberproteine. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.*, Wiesbaden 1968 (Theodor Frerichs-Preis). Im Druck.
- , u. F. K. KÖSSLING: Untersuchungen über die immunologische Bedeutung löslicher Leberproteine. — Serologische, histologische und fluoreszenz-histologische Befunde. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.*, Wiesbaden 1968. Im Druck.
- NORKIN, S. A., L. S. GOTTLIEB, and N. ZAMCHECK: Effect of liver homogenate and Freund adjuvant on guinea pig liver and other organs. *Amer. J. dig. Dis.* **7**, 824—832 (1962).
- PARONETTO, F.: Immune reactions and hepatic alterations in guinea pigs sensitized with hepatic proteins. In: *Immunopathology*, V. Int. Symp., 1967, p. 122—143, ed. by P. A. MIESCHER, New York, and P. GRABAR, Paris. Basel u. Stuttgart: Benno Schwabe & Co. 1968.
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: J. & A. Churchill 1961.
- SMITH, TH. B., B. HEYMER u. O. HAFERKAMP: Klinische Anwendung der Immunofluoreszenz. II. Präparation der für das Immunofluoreszenzverfahren erforderlichen Reagentien und Nachweis von im Gewebe lokalisierten Bakterien. *Z. med. Mikrobiol. Immunol.* **152**, 362—377 (1966).
- SPANNHOF, L.: *Einführung in die Praxis der Histochemie*. Jena: VEB Gustav Fischer 1967.
- STRAUSS, A. T. L., B. G. SEEGAL, K. C. SHU, P. M. BURKHOLDER, W. L. NASTUK, and K. E. OSSERMANN: Immunofluorescent demonstration of a muscle binding complement-fixing serum globulin fraction in myasthenia gravis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **105**, 184 (1960).

Dr. F. K. KÖSSLING

Pathologisches Institut der Johann Gutenberg-Universität Mainz  
65 Mainz, Langenbeckstraße 1

Priv.-Doz. Dr. Dr. K. H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE  
II. Med. Klinik der Johann Gutenberg-Universität  
65 Mainz