自己免疫性肝疾患に検出される 抗 liver/kidney microsome (LKM) 1 抗体と抗 Is 抗体

松 嶋 広・宮 地 清 光・鷹 野 佐恵子
樋 渡 恒 憲・荒 川 正 一*・加 藤 真 明*
保 坂 洋 夫**

Jpn. J. Clin. Immun., 13 (3) : 277~285, 1990.

Anti-liver/kidney microsome (anti-LKM) 1 antibody and anti-Is antibody in patients with autoimmune hepatic diseases

Hiroshi Matsushima, Kiyomitsu Miyachi, Saeko Takano,
Tsunenori Hiwatashi, Syoichi Arakawa*, Masaaki Kato* and
Hiroo Hosaka**

Autoimmune Disease Center, Health Sciences Research Institute

**Department of Internal Medicine, Ooiso Hospital,
Tokai University School of Medicine*

***Department of Internal Medicine, Saiseikai Nanbu Hospital*

[Summary]

We have identified two sera containing anti-liver/kidney microsome (anti-LKM) 1 antibody and 7 sera containing anti-Is antibody among one hundred sixty seven samples taken from patients suspected of having autoimmune hepatic diseases. In this study, we report on the immunological characterization of these two antibodies in relation to each other and to the various antimitochondrial antibodies.

Anti-Is antibody was found to be distinct from any of the previously defined antibodies such as anti-LKM 1, anti-MM, precipitating antimitochondrial antibodies (anti-M-A, anti-M-B, anti-M-C and anti-M-D) when tested by double immunodiffusion using rat liver sonicated mitochondrial and microsomal fractions. Anti-Is and anti-LKM 1 were also found to be different in terms of cellular specificity. When viewed by indirect immunofluorescence, anti-LKM 1 significantly stained proximal tubular cells, hepatocytes, and portal area cells, while anti-Is only slightly stained tubular cells. Furthermore, anti-Is antibody was found to

be mostly associated with AMA, while anti-LKM 1 was not. Finally, a monospecific anti-Is antibody immunoprecipitated a complex of 87 kd, 80 kd and 72 kd proteins using ^{35}S -methionine labeled HeLa cell extract. The molecular weight of the LKM 1 antigen was estimated to be 50 kd by western blot under reducing conditions using partially purified rat liver microsomal fraction. Clinical characterization of these antibodies has yet to be conducted.

Key words : 抗 LKM 1 抗体,
抗 Is 抗体,
二重免疫拡散法,
自己免疫性肝疾患

【概 要】

本研究所に抗ミトコンドリア抗体 (antimitochondrial antibody : AMA) の検索依頼を受けた 167 血清について、抗 liver/kidney microsome 1 (LKM 1) 抗体 2 血清と新たに抗 Is 抗体 7 血清を同定し、本抗体の免疫学的特徴について検討した。ラット肝臓のミトコンドリア分画、マイクロゾーム分画を抗原としたオクタブローム法で抗 Is 抗体は、抗 LKM 1 抗体、抗 MM 抗体、沈降性抗ミトコンドリア抗体 M-A、M-B、M-C、M-D 抗体と異なる自己抗体であった。ラット腎および肝のクリオスタット切片を用いた蛍光抗体法では、抗 LKM 1 抗体は腎近位尿細管細胞質を特異的に染色し、肝では門脈域、肝小葉内の肝細胞も含め細胞質を均一に染色した。抗 Is 抗体は、腎尿細管細胞、肝細胞の細胞質を弱く染色した。抗 LKM 1 抗体は AMA との共存はなく、抗 Is 抗体は 7 例中 6 例が AMA との共存であった。対応抗原の推定分子量は、HeLa 細胞を用いた免疫沈降法で Is 抗原は 87, 80, 72 KD の複合体、ラット肝臓マイクロゾームを抗原とした免疫ブロット法で LKM 1 抗原は 50 KD に検出された。

これらの抗体を有する症例の特徴は、症例数が少なく現在検討中である。

I. はじめに

自己免疫性肝炎の診断には、自己抗体の検索が重要である¹⁾。以前より免疫学的に抗核抗体 (ANA)、LE 細胞、抗平滑筋抗体 (ASMA)²⁾、抗アクチン抗体³⁾などの自己抗体の検索が施行されていた。しかし ANA, ASMA が検出されず、血沈亢進と γ -globulin 高値で、さらに肝炎ウイルスマーカーが陰性である自己免疫性肝炎を疑う症例も少なくない。ヨーロッパでは以前より慢性活動性肝炎 (CAH) の診断に、抗 liver/kidney microsome (LKM) 抗体⁴⁾が有用であるとの報告があった。その後、間接蛍光抗体法の染色パターンより抗 LKM 抗体は 3 種に分類されている。(1) 抗 LKM 1 抗体陽性の自己免疫性 CAH (Type 2)⁵⁾、(2) 抗 LKM 2 抗体陽性の ticrynafen による薬剤性肝炎⁶⁾、(3) 抗 LKM δ 抗体陽性の慢性 δ 型肝炎である⁷⁾。

筆者らは昨年原発性胆汁性肝硬変 (PBC)-CAH 重複例に抗マイクロゾーム系の抗 MM 抗体を発見し、

自己免疫性肝炎の診断に役立つことを報告した⁸⁾。今回は本研究所に抗ミトコンドリア抗体 (AMA) 検索の依頼を受けた血清について抗 LKM 1 抗体と新たに同定した抗 Is 抗体につき報告し、本抗体の免疫学的特徴について報告する。

II. 対象および方法

1. 対 象

昭和 58 年 6 月より昭和 62 年 6 月までに保健科学研究所自己免疫病血清センターに、自己免疫性肝疾患を疑い、AMA 検査を依頼された中で、AMA あるいは抗平滑筋抗体陽性で PBC あるいは PBC が疑われた 167 血清を対象とした。抗 LKM 1 抗体は、Dr. Berg (Tübingen 大学) より分与された。抗 M-A 抗体、抗 M-B 抗体、抗 M-C 抗体^{9,10)}、抗 M-D 抗体¹¹⁾と抗 MM 抗体⁸⁾は、本研究所で同定されたものを使用した。PBC の診断基準は、厚生省特定疾患「難治性肝炎、調査研究班、自己免疫性肝炎分科会」で作成された基準¹²⁾によった。慢性肝炎の診断基準は 1968 年の

ヨーロッパ分類に従った¹³⁾。

2. 組織抽出物 (抗原) の作製

ラット肝からのミトコンドリア (Mit) 分画, マイクロゾーム (Mic) 分画, 上清 (Sup) 分画を, Schneider ら¹⁴⁾の方法に従い抽出し抗原とした。Mit 分画のみ超音波処理 (US-150, Nissei 社製) し使用した。詳細は以前の論文⁹⁾を参照されたい。

3. 抗体の検出法

1) 間接蛍光抗体 (indirect immunofluorescence : IIF) 法

ラット胃および腎臓組織のクリオスタット切片 (MBL 社) とラット肝臓組織のクリオスタット切片 (MBL 社) の基質を使用した。詳細は以前の論文⁹⁾を参照されたい。

2) 二重免疫拡散 (double immunodiffusion : DID) 法

0.1% NaN₃ 加 PBS に溶解した 0.6% アガロース (半井科学) を直径 90 mm のシャーレに 12.5 ml ずつ分注し, ゲル平板を作製した。well の大きさは直径 4 mm, 間隔は 3 mm とした。試料は 20 μ l ずつ分注し, 室温で湿潤箱中に放置し 5 日間にわたり観察を続けた。抗体の同定¹⁵⁾には明瞭な沈降線を示す希釈倍数を求め, 標準血清にて検討した。

4. LKM 1 抗原, Is 抗原活性部位の分子量推定

1) 免疫沈降法

³⁵S メチオニン標識 HeLa 細胞を 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, pH 8.0 中で超音波破碎し, 抗原を抽出した。被検者 IgG 結合 Protein A-Sepharose CL-4 B (Pharmacia 社) 2 mg と反応後, 免疫沈降物を回収し, SDS-10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分画後, オートラジオグラフィで検出した^{16,17)}。

2) 免疫ブロット法

SDS-PAGE は Laemmli の方法¹⁸⁾に従った。抗原としてラット肝臓マイクロゾーム分画を用い, SDS-PAGE 施行後, ニトロセルロース膜への転写は Towbin らの方法¹⁹⁾に従い, 各種血清と反応させ, 第 2 抗体に peroxidase 標識 anti-human Ig GAM goat γ -globulin (Kpl 社) を用い酵素抗体法により対応抗原を検出した。

5. 蛋白濃度の測定

蛋白濃度は Lowry 法²⁰⁾に従って測定した。

III. 成績

1. 抗 Is 抗体, 抗 LKM 1 抗体, 抗 MM 抗体の特異性

Mic 分画 (抗原蛋白濃度 60 mg/ml) を中心に, 上段の well に沈降性抗ミトコンドリア抗体抗 M-A, M-B と抗 M-C, M-D 抗体, 下段の well に抗 MM 抗体, 抗 LKM 1 抗体陽性血清を, 左右の well に抗 Is 抗体陽性血清をおき, DID 法で検索した (図 1 a)。抗 Is 抗体 (8 倍希釈) の沈降線は, 抗 LKM 1 抗体 (16 倍希釈), 抗 MM 抗体 (2 倍希釈) の沈降線と明らかに交差し, この 3 種の沈降抗体は互いに相異なるものであった。また沈降性抗ミトコンドリア抗体は Mic 分画では検出されなかった。

2. 抗 Is 抗体と AMA

抗 Is 抗体は Mic 分画, Sup 分画を抗原として使用すると容易に明瞭な沈降抗体を検出できるが, Mit 分画でもやや幅の広い沈降抗体を検出することが可能であった。中央に Mit 分画 (抗原蛋白濃度 86 mg/ml) を置き, 周囲に抗 Is 抗体と AMA を置いた (図 1 b)。左右の Is 血清 (8 倍希釈) は 2 本の沈降線を示し,

図 1 a Double immunodiffusion test using rat liver microsomal fraction as antigen.

The independence of anti-Is antibody from anti-LKM 1 and anti-MM antibody is shown.

抗原側は抗 Is 抗体, 抗体側は未同定の AMA であった。抗 Is 抗体は左上段の抗 M-C 抗体, 抗 M-D 抗体 (2 倍希釈), 右上段の抗 M-A 抗体, 抗 M-B 抗体 (2 倍希釈) と異なっていた。

図 1 b Double immunodiffusion test using rat liver mitochondrial fraction as antigen.

The independence of anti-Is antibody from anti-M-C/anti-M-D, and from anti-M-A/anti-M-B is shown.

図 2 a Immunofluorescent staining pattern of anti-LKM 1 antibody on rat liver. Hepatocytes show intense fine granular staining.

3. 抗 LKM 1 抗体と抗 Is 抗体の蛍光抗体染色パターン

抗 LKM 1 抗体陽性血清は, 近位尿細管細胞質を特異的に染色し, 遠位尿細管細胞質は染色されなかった。肝切片では門脈域, 肝小葉内の肝細胞も含め全体が均質に染色された (図 2 a, 2 b)。AMA 陰性, 抗 Is 抗体陽性の患者血清 (KA) を用いた検索では, 腎尿細管細胞ならびに肝細胞は, 細胞質が弱く染色された (図 2 c, 2 d)。

4. 抗 LKM 1 抗体, 抗 Is 抗体の頻度

本研究所に AMA を検索依頼された 167 血清につき, 両抗体の頻度を検索した。抗 LKM 1 抗体は 2 例 (1.2%), 抗 Is 抗体は 7 例 (4.2%) であった。ちなみに抗 MM 抗体は 44 例 (26.3%), AMA は 71 例 (42.5%) であった (表 1)。

図 2 b Immunofluorescent staining pattern of anti-LKM 1 antibody on rat kidney.

The proximal tubule cytoplasm has been uniformly stained, while the distal tubule cytoplasm and mesenchymal cell cytoplasm have not.

図 2 c Immunofluorescent staining pattern of anti-Is antibody on rat liver.
Anti-Is antibody has only slightly stained hepatocytes.

図 2 d Immunofluorescent staining pattern of anti-Is antibody on rat kidney.
Anti-Is antibody has only slightly stained tubular cells.

表 1 Frequencies of various antibodies in patients suspected of having autoimmune hepatic diseases.

No. of patients	No. of patients positive for			
	anti-LKM 1	anti-Is	anti-MM	AMA
167	2(1.2%)	7(4.2%)	44(26.3%)	71(42.5%)

These antibodies were detected by double immunodiffusion.

anti-LKM 1 : anti-liver/kidney microsome 1 antibody

AMA : antimitochondrial antibodies

5. 抗 LKM 1 抗体陽性の 2 症例と抗 Is 抗体陽性の 7 症例の免疫学的検討

抗 LKM 1 抗体陽性の第 1 例は, A.H., 女性, 45 歳, AMA, 抗 Is 抗体陰性, IgG 2,769 mg/dl, IgA 304 mg/dl, IgM 197 mg/dl, GOT 92 IU/l, GPT 67 IU/l, T.B. 1.5 mg/dl, T. chol 91 mg/dl, Alp 296 IU/l, γ GTP 45 IU/l であった。第 2 例は, H.T., 女性, 61 歳, AMA, 抗 Is 抗体陰性, IgG 5,162 mg/dl, IgA 726 mg/dl, IgM 508 mg/dl, GOT 96 IU/l, GPT 35 IU/l, T. B. 2.2 mg/dl, T. chol 91 mg/dl, Alp 566 IU/l, γ GTP 151 IU/l であった。

抗 Is 抗体陽性例は, I.K., 男性, 80 歳, AMA は IIF 法で 80 倍陽性, DID 法で未同定の沈降抗体 32 倍陽性, 抗 LKM 1 抗体陰性, IgM 915 mg/dl, GOT 60 IU/l, GPT 55 IU/l, T. chol 278 mg/dl, Alp 1,766 IU/l, γ GTP 614 IU/l であった。その他, O.A. 例は男性であったが, 他 5 例は女性であった。K.A. 例のみ AMA 陰性で, 他の 6 例は AMA 陽性であった(表 2)。

6. 免疫プロット法による対応抗原の検索

ラット肝臓マイクロゾーム分画を抗原とした免疫ブ

表 2 Laboratory findings of 2 patients with anti-LKM 1 and 7 patients with anti-Is antibody

Name	Sex	Year	CNSDC	ANA	AMA	a-LKM 1	a-Is	IgG	IgA	IgM	GOT	GPT	T.B.	T. chol	Alp	γ -GTP
N.K.	f	52	?	?	320	—	32	nd	nd	nd	256	327	7.0	131	89	67
T.S.	f	47	?	—	160	—	256	1,618	140	799	25	22	0.4	nd	172	48
N.K.	f	69	?	?	640	—	128	2,468	438	1,241	77	47	1.0	309	341	600
K.A.	f	56	?	—	—	—	64	nd	nd	nd	21	22	2.1	176	122	6
I.K.	m	80	—	—	80	—	128	1,370	466	915	60	55	0.8	278	1,766	614
O.A.	m	83	+	—	640	—	8	1,654	520	126	36	24	1.7	112	187	19
D.H.	f	51	+	H.Sp. 320	160	—	2	1,545	391	577	35	41	1.0	261	490	260
A.H.	f	46	—	80	—	64	—	2,769	304	197	92	67	1.5	91	296	45
H.T.	f	61	?	—	—	32	—	5,162	726	508	96	35	2.2	91	566	151

CNSDC : chronic non suppurative destructive cholangitis

H. : Homogeneous

Sp. : Speckled

f : female

m : male

ロット法の成績を図3に示した。lane 1は抗原転写後クマシーにて染色し、lane 2, lane 3は抗 LKM 1 抗体陽性血清と、lane 4は正常人血清と反応させたものである。抗 LKM 1 抗体陽性血清は 50 KD に共通するバンドを検出し、正常人血清においてはバンドは認められなかった。

7. 免疫沈降法による対応抗原の検索

³⁵S-メチオニンで標識した HeLa 細胞を抗原とした免疫沈降法の成績を図4に示した。lane 1は分子量マーカー。lane 2の AMA 陽性血清 (K. K.), lane 3の AMA, 抗 SS-A 抗体陽性血清 (Y. K.) は 68, 41, 36 KD に AMA の蛋白を、そして 60 KD に抗 SS-A 抗体の蛋白を沈降させた。lane 4の抗 Is 抗体陽性血清 (K. A.), lane 5の抗 Is 抗体と AMA 陽性血清 (T. S.) は、AMA の対応抗原の他、87 KD, 80 KD, 72 KD に抗 Is 抗体の蛋白を沈降させた。lane 6にコントロールとして抗 Ku 抗体の 80, 68 KD, 抗 SS-A 抗体の 60 KD, 抗 U1-RNP 抗体の 34, 29, 28, 20 KD の沈降物を示した。lane 7の正常人血清は 44 KD 付近に非特異的のバンドを認めただけであった。

IV. 考 案

昭和 58 年 6 月より昭和 62 年 6 月の 4 年間に AMA 検索を依頼された血清中に、抗 LKM 1 抗体 2 血清、今回新たに命名した抗 Is 抗体 7 血清を同定した。抗 LKM 1 抗体は、蛍光抗体法で、近位尿管細胞の細胞質が特異的に染色され、肝細胞の細胞質も均一に染

色され AMA とは異なる特徴があり、一部の CAH に出現すると報告された^{4,21)}。対応抗原は、当初小胞体に付着する磷脂質と蛋白からなるリポ蛋白であり、容易に可溶化されないとされていた。その後抗 LKM 1 抗体陽性の約半数例は、CAH であるが、薬剤アレルギー性肝炎にも認められ、とくに本抗体陽性例の特徴は、若い CAH 患者に多く、性差はなく、ANA や ASMA を併存しにくいことも報告された²²⁾。ある小児科では、慢性肝炎を血清学的に HB マーカー陽性群、ASMA 陽性群、本抗体陽性群の 3 群に分類しており²³⁾、それらの頻度から考えると、とくに小児科領域では、抗 LKM 1 抗体陽性の慢性肝炎の存在を重要視しなくてはならない。

日本では、本抗体への関心が薄いのか、今までに本抗体陽性の報告はなかった。本研究所では、この数年抗 LKM 1 抗体と鑑別を要する抗 MM 抗体に注目していたが²⁴⁾、Dr. Berg より抗 LKM 1 抗体を入手することができ、DID 法にても確認することが可能となった。本邦初の抗 LKM 1 抗体陽性例は、45 歳と 61 歳の女性で、輸血後の非 A 非 B 型肝炎を合併した症例に検出された²⁴⁾。今回の対象例は、本研究所へ AMA を依頼された患者に限られている現状から考えると、おそらく本抗体はもっと高頻度に見つかることが予想される。その理由として、小児科で PBC を診察することはきわめてまれであること、抗 LKM 1 抗体が AMA と共存しないことが多いことからである。今後とくに非 A 非 B 型の慢性肝炎につき検討することが望まれる。抗 LKM 1 抗体の対応抗原は、AMA の

図 3 Immunoblotting characterization of anti-LKM 1 antibody

Lane 1 : LKM 1 antigen preparation stained with Coomassie Brilliant Blue G following SDS-PAGE

Lane 2 : CAH patient A.H.

Lane 3 : CAH patient H.T.

Lane 4 : normal human serum

Immunoblotting was conducted under reducing conditions using purified LKM 1 antigen and sera from patients. The 50 KD protein band observed in lanes 2 and 3 suggests the presence of anti-LKM 1 antibody in the sera of patients A. H. and H.T..

それと同様リポ蛋白で不溶性であるとされていた。そのためか、最近まで DID 法にて沈降抗体を証明しようとしなかった。抗 LKM 1 抗体の対応抗原は免疫ブロット法で 50 KD であり²⁴⁾、本法が抗 LKM 1 抗体を検索するのに最も敏感で確実であると報告されている²⁵⁾。しかしこの方法だけでは、他の抗体系との識別は確実ではなく、DID 法での沈降線の一致が重要である。最近本抗体の対応抗原は、ヒト肝チトクローム P 450 に関連する酵素 (P 450 BNF-B と P 450 PSF-G) であることが報告された²⁵⁾。

抗 Is 抗体は、DID 法で AMA や抗 LKM 1 抗体、抗 MM 抗体と異なる新たな抗体で、最初に発見され

図 4 Immunoprecipitation using ³⁵S-methionine labeled HeLa cell extract and sera from patients with PBC and other liver diseases.

Lane 1 : molecular weight markers

Lane 2 : PBC patient K.K.

Lane 3 : PBC and Sjögren syndrome patient Y.K.

Lane 4 : non-PBC liver disease patient K.A.

Lane 5 : PBC patient T.S.

Lane 6 : prototype serum containing anti-Ku, anti-U 1 RNP and anti-SS-A/Ro

Lane 7 : normal human serum

Monospecific anti-Is antibodies in lanes 4 and 5 immunoprecipitated a complex of 87 KD, 80 KD and 72 KD proteins from ³⁵S-methionine labeled HeLa cell extract.

た患者 (Ishiguro, K.) の頭文字よりつけたものである。抗 Is 抗体陽性 7 例中 6 例は AMA 陽性で 5 例は PBC の可能性が強かった。PBC が考えにくい 2 例のうち、IK 例は慢性非活動性肝炎で、他の 1 例 KA は血清総ビリルビンが 2.1 mg/ml であったが、他に肝機能異常を認めない症例で確定診断がついていない。抗 Is 抗体は、昨年日本臨床免疫学会では、抗 LKM 1 抗体、抗 MM 抗体に次ぐ 3 番目のマイクロゾーム系の抗体として抗 Mic 3 抗体と名づけたが、その後の検討で、本抗体の対応抗原は、Sup 分画に最も多く存在していると思われるので抗 Is 抗体と改名した。最近 Martini らは、当研究所で従来より施行している二重免疫拡散法で、自己免疫性 CAH (Type 2) に抗 liver cytosol (Anti-LC 1) 抗体が同定されることを報告した²⁷⁾。本抗体は、抗アクチン抗体陽性の自己免疫性 CAH (Type 1) には、同定されず、多くは抗 LKM 1 抗体陽性の症例に見つかることと報告されている。抗 Is 抗体も liver cytosol とよく反応することにより同一の可能性もあるが、抗 LC 1 抗体は、PBC 患者血清中に同定されないこと、肝小葉の中心静脈近辺の肝細胞が染色されず、その周辺が染色

される特殊な染色パターンがあることより抗 Is 抗体と異なると思われる。しかし早急に標準血清の交換により両抗体の異同を明らかにすべきと思われる。免疫沈降法の成績から、AMA の対応抗原は 68, 41, 36 KD の蛋白が確認され、Is 抗原は 87 KD のメチオニンに富む蛋白と 80, 72 KD の蛋白との複合体と考えられた。LKM 抗原は主に肝、腎細胞の Mic 分画に存在しているためか、HeLa 細胞由来のこの抗原では検出されなかった。ラット肝 Mic 分画を抗原とした免疫プロット法では、以前の報告どおり 50 KD に対応抗原を確認した。今後 Is 抗原の対応抗原の性状について、更に検討する予定である。

自己免疫性肝炎の治療は、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤が速効することが多い。今後、他施設でこれらの抗体の検索が望まれる。

稿を終えるにあたり、免疫沈降法を御指導下さいました慶応大学医学部内科 三森経世博士、抗 Is 抗体陽性血清を分与下さいました亀谷内科病院 亀谷志郎先生、健和会病院 北原明倫先生、国立長野病院 安里進先生、湘南病院 鈴木先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Mackay, I.R., Gajdusek, D.C.: An autoimmune reaction against human tissue antigens in certain acute and chronic diseases II. Clinical correlations. Arch. intern. Med., 101: 30~35, 1958.
- 2) Trenchev, P., Sneyd, P., Holborow, E.J.: Immunofluorescent tracing of smooth muscle contractile protein antigens in tissues other than smooth muscle Clin. Exp. Immunol., 16: 125~136, 1974.
- 3) Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A. et al.: Anti-actin specificity of human smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis. Clin. Exp. Immunol., 24: 266~272, 1976.
- 4) Rizzetto, M., Swana, G.T., Doniach, D.: Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. Clin. Exp. Immunol., 15: 331~344, 1973.
- 5) Homberg, J.C., Abuaf, N., Bernard, O. et al.: Chronic active hepatitis associated with anti-liver/kidney microsome antibody type I: a second type of autoimmune hepatitis. Hepatology, 7: 1333~1339, 1987.
- 6) Homberg, J.C., Andre, C., Abuaf, N.: A new anti-liver/kidney microsome antibody (anti-LKM 2) in tienilic acid induced hepatitis. Clin. Exp. Immunol., 55: 561~570, 1984.
- 7) Crivelli, O., Lavarin, C., Chiaberge, E. et al.: Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta agent. Clin. Exp. Immunol., 54: 232~238, 1983.
- 8) 宮地清光・鷹野佐恵子・松嶋 広・他 2 名: 自己免疫性肝疾患、とくに原発性胆汁性肝硬変症と慢性活動性肝炎重複症例に出現する新しいマーカー抗体・日本臨床免疫学会誌, 11: 216~223, 1988.
- 9) Miyachi, K., Gupta, R.C., Dickson, E.R. et al.: Precipitating antibodies to mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol., 39: 599~606,

- 1980.
- 10) Miyachi, K., Watanabe, S., Yamashiki, M. et al. : Precipitating antimitochondrial antibodies in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Am. J. Gastro.*, 79 : 704~709, 1984.
- 11) 神谷 知至・本田 孝也・鈴木 修・他 3 名 : 慢性甲状腺炎, 慢性膵炎, Sicca 症候群を伴った原発性胆汁性肝硬変の男性症例. *肝臓*, 26 : 759~765, 1985.
- 12) 佐々木 博 : 原発性胆汁性肝硬変, 全国調査集計結果 (第 3 報), 厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班, 昭和 57 年度研究報告, pp. 102.
- 13) De Groote, J., Desmet, V.J., Gedigk, P. et al. : A classification of chronic hepatitis. *Lancet*, ii : 626~629, 1968.
- 14) Schneider, W.C., Hogeboom, G.H., : Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 183 : 123~128, 1950.
- 15) Tan, E.M., Kunkel, H.G. : Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 96 : 464~471, 1966.
- 16) Lerner, M.R., Steitz, J.A. : Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 5495~5499, 1979.
- 17) Mimori, T., Hinterberger, M., Pettersson, I. et al. : Autoantibodies to the U2 small nuclear ribonucleoprotein in a patient with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *J. Biol. Chem.* 259 : 560~565, 1984.
- 18) Leammli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680~685, 1970.
- 19) Towbin, H., Staehelin, H., Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulosesheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350~4354, 1979.
- 20) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.H., Farr, A.I. et al. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265~275, 1951.
- 21) Rizzetto, M., Bianchi, F.B., Doniach, D. : Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis. *Immunology*, 26 : 589~601, 1974.
- 22) Smith, M.G.M., Williams, R., Walker, G. et al. : Hepatic disorders associated with liver kidney microsomal antibodies. *Brit. Med. J.*, 2 : 80~84, 1974.
- 23) Odievre, M., Maggiore, G., Homberg, J.C. et al. : Seroimmunologic classification of chronic hepatitis in 57 children. *hepatology*, 3 : 407~409, 1983.
- 24) Alvareg, F., Bernard, O., Homberg, J.C. et al. : Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a 50000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, 161 : 1231~1236, 1985.
- 25) Kyriatsoulis, A., Manns, M., Gerken, G. et al. : Distinction between natural and pathological autoantibodies by immunoblotting and densitometric subtraction, liver/kidney microsomal antibody (LKM) positive sera identify multiple antigens in human liver tissue. *Clin. Exp. Immunol.*, 70 : 53~60, 1987.
- 26) Waxman, D. J., Lapenson, D.P., Krishnan, M. et al. : Antibodies to liver/kidney microsome in chronic active hepatitis recognize specific forms of hepatic cytochrome P450, *Gastroenterology*, 95 : 1326~1331, 1988.
- 27) Martini, E., Abuaf, N., Cavalli, F. et al. : Antibody to liver cytosol (Anti-LC 1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis Type 2. *Hepatology*, 8 : 1662~1666, 1988.