

Acta Medica Okayama

Volume 31, Issue 3

1977

Article 6

JUNE 1977

[Glucose tolerance abnormalities in mice
actively immunized with components of
bovine pancreatic hormones (author's transl)]

Soji Okada*
Koichi Kawanishi‡

Fumito Yagyu†
Tadashi Ofuji**

*Okayama University,

†Okayama University,

‡Okayama University,

**Okayama University,

[Glucose tolerance abnormalities in mice actively immunized with components of bovine pancreatic hormones (author's transl)]*

Soji Okada, Fumito Yagyu, Koichi Kawanishi, and Tadashi Ofuji

Abstract

The relationship between immune insulinitis and glucose tolerance was investigated in three groups of mice following active immunization with different components of bovine pancreatic hormone. An abnormal blood glucose level was observed in the three groups ranging from 33.3% to 87.5% of sensitized mice. A relationship was not present between the glucose tolerance response and the presence of insulinitis or anti-insulin antibody in the blood of sensitized mice. However, all sensitized mice with a marked decrease in glucose tolerance were found to have insulinitis. In animals without established insulinitis and with no demonstrable anti-insulin antibody, abnormal glucose tolerance was noted. This latter condition occurred more frequently with recrystallized insulin than with a-component and did not occur with monocomponent insulin. These findings seemed to indicate that two distinct processes involving some circulating antibodies with anti-insulin antibody and insulinitis might be involved in the development of the observed glucose tolerance abnormality.

Acta Med. Okayama 31, 211—216 (1977).

**ABNORMITÄT DER GLUCOSE-TOLERANZ BEI DEN
MIT VERSCHIEDENEN KOMPONENTEN DES
RINDERPANKREASHORMONS AKTIV
IMMUNISIERTEN MÄUSEN**

**(GLUCOSE TOLERANCE ABNORMALITIES IN MICE
ACTIVELY IMMUNIZED WITH COMPONENTS
OF BOVINE PANCREATIC HORMONES)**

SOJI OKADA, Fumito YAGYU, Koichi KAWANISHI
und Tadashi OFUJI

*Third Department of Internal Medicine, Okayama University
Medical School, Okayama, 700, Japan*

Received April 13, 1977

Abstract. The relationship between immune insulinitis and glucose tolerance was investigated in three groups of mice following active immunization with different components of bovine pancreatic hormone. An abnormal blood glucose level was observed in the three groups ranging from 33.3% to 87.5% of sensitized mice. A relationship was not present between the glucose tolerance response and the presence of insulinitis or anti-insulin antibody in the blood of sensitized mice. However, all sensitized mice with a marked decrease in glucose tolerance were found to have insulinitis. In animals without established insulinitis and with no demonstrable anti-insulin antibody, abnormal glucose tolerance was noted. This latter condition occurred more frequently with recrystallized insulin than with a-component and did not occur with monocomponent insulin. These findings seemed to indicate that two distinct processes involving some circulating antibodies with anti-insulin antibody and insulinitis might be involved in the development of the observed glucose tolerance abnormality.

Heute ist es angenommen, daß die Immun-Insulinitis wirklich einen der ätiologischen Faktoren des Diabetes mellitus darstellt. Aber es gibt noch keine feste Theorie über den Zusammenhang der Immun-Insulinitis mit der Ausbildung des Diabetes mellitus. In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungsergebnisse der Glucose-Toleranz bei den Immun-Insulinitis-befallenen Mäusen, von denen früher benachrichtigt war (1, 2), beschrieben. Aufgrund dieser Ergebnisse soll auch eine Möglichkeit, daß eine Abnormität der Glucose-Toleranz zur Entwicklung des Diabetes mellitus führen könnte, besprochen werden.

MATERIAL UND METHODE

Tiere. Unter den im vorhergehenden Bericht erwähnten Mäusen von Sensibilisierungs- und Kontrollgruppen standen diejenige, die in der 20. Woche (Is) und in der 28. Woche (IIs) nach der ersten Sensibilisierung waren, zur Prüfung zur Verfügung.

Glucose-Toleranztest. Die Tiere erhielten jeweils 2 mg von Zucker pro Gram Körpergewicht nach 24-stündigem Fasten. Das Blut für Zuckerbestimmung wurde vor und 60 Min. nach der Belastung aus dem retro-orbitalen Sinus entnommen.

Bestimmung von Blutzucker. Der Blutspiegel der Glucose wurde mit Hilfe der Glucose-Oxidase Methode mittels eines „reflectance meter“ festgestellt.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Normalbereich des Blutzuckers bei Kontrolltieren. Als Normalbereich des Blutzuckers wurden die Mittelwerte ± 2 S. D. benutzt, die aus im vorhergehenden Bericht angegebenen Messwerten von Blutzucker für Kontrollgruppen berechnet wurden. Dabei ergaben sich jeweilige Werte von $89,8 \pm 27,5$ mg/dl und $130,7 \pm 60,1$ mg/dl vor und 60 Min. nach der Belastung in der 20. Woche nach der ersten Sensibilisierung. Die entsprechenden Werte in der 28. Woche waren $102,6 \pm 44,9$ mg/dl vor der Belastung und $156,8 \pm 47,1$ mg/dl 60 Min. nach der Belastung.

Blutzuckerwerte von sensibilisierten Tieren. Hier wurden Messwerte von Blutzucker, die höher als die oben genannten Kontrollwerte waren, als erhöht, und die, die niedriger als die entsprechenden Kontrollwerte waren, als erniedrigt bezeichnet. Alle solche Abweichungen von Norm wurden als abnorm angesehen. Bei der mit rekristallisiertem Insulin sensibilisierten Gruppe (RI) fanden sich 4 Fälle mit erhöhtem Blutzucker, 3 Fälle mit erniedrigtem Blutzucker und nur ein Fall mit normalem Zuckerwert in der 20. Woche nach der ersten Sensibilisierung. Unter Fällen von der mit a-Komponente sensibilisierten Gruppe (aK) befanden sich 6 mit erhöhtem, 1 mit erniedrigtem und 1 mit normalem Blutzucker. Bei der Monokomponente-Insulin-sensibilisierten Gruppe (MK) befanden sich 3 Fälle von erniedrigtem Blutzucker, 5 Fälle von normalem Blutzucker und keiner von erhöhtem Blutzucker (Abb. 1-A, B).

In der 28. Woche nach der ersten Sensibilisierung befanden sich bei der RI-sensibilisierten Gruppe 2 Fälle von erhöhtem Blutzucker, 5 Fälle von erniedrigtem Blutzucker und 1 Fall von normalem Blutzucker. Unter denjenigen Fällen, die mit aK sensibilisiert wurden, befanden sich 3 mit erhöhtem Blutzucker, 1 mit erniedrigtem Blutzucker und 6 mit normalem Blutzucker. Von den Fällen der MK-sensibilisierten Gruppe fanden sich 3 mit erhöhtem Zuckerwert, 7 mit normalem Zuckerwert und keiner von erniedrigtem Zuckerwert. Damit stellte es

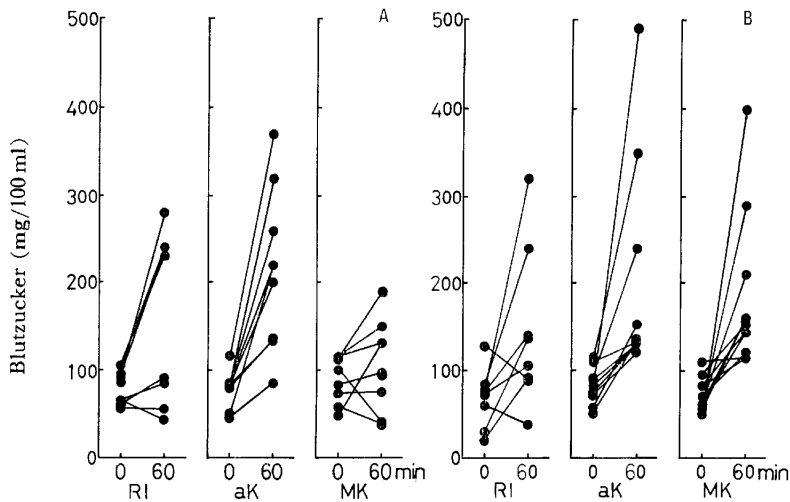


Abb. 1. Glucose-Toleranz der Mäuse aktiver Immunisierung mit der verschiedenen Komponenten (RI, aK und MK) des Rinderpankreasshormons. A. In der 20. Woche nach der ersten Sensibilisierung. B. In der 28. Woche nach der ersten Sensibilisierung

sich heraus, daß 87,5% der RI-sensibilisierten Tieren, 61,1% der aK-sensibilisierten und 33,3% der MK-sensibilisierten eine abnorme Abweichung von der Norm der Glucose-Toleranz aufwiesen.

Fälle mit entstandener Insulinitis und Abnormität der Glucose-Toleranz. Bei einer an den Fällen mit entstandener Insulinitis (aufgeteilt in die Fälle mit und ohne Antiinsulin-Antikörper) vorgenommenen Untersuchung ergab sich folgender Befund: Unter den ersteren Fällen ließ sich eine Abnormität der Glucose-Toleranz bei 2 von 2 Fällen von IsRI, bei 3 von 3 Fällen von IIsRI, bei 0 von 0 Fall von IsaK, bei 1 von 1 Fall von IIsaK, bei 0 von 0 Fall von IsMK und bei 1 von 5 Fällen von IIsMK beobachten. Unter den letzteren wurde dieselbe Abnormität bei 0 von 0 Fall von IsRI, bei 0 von 0 Fall von IIsRI, bei 0 von 0 Fall von IsaK, bei 0 von 0 Fall von IIsaK, bei 0 von 1 Fall von IsMK und bei 1 von 1 Fall von IIsMK. Bemerkenswert ist, daß alle der 3 Fälle, die eine hochgradige Herabsetzung der Glucose-Toleranz aufwiesen, d. h. eine Fall von IIsRI, ein von IIsaK und ein von IIsMK, eindeutiges Zusammentreffen der Insulinitis hatten, die histologisch nachgewiesen wurden.

Antiinsulin-Antikörper im Blut und Abnormität der Glucose-Toleranz. In ähnlicher Weise wie bei den oben erwähnten wurden die Fälle ohne entstandene Insulinitis (wiederum aufgeteilt in die Fälle ohne und mit Antiinsulin-Antikörper) auf die Abnormität der Glucose-Toleranz bei 9 von den ersteren Fällen zu sehen war. Diese 9 Fälle verteilten sich folgenderweise: 3 von 3 Fällen von IsRI, 3 von 3 Fällen von IIsRI, 3 von 4 Fällen von IsaK, 0 von 4 Fällen von IIsaK, 0 von 4

Fällen von IsMK und 0 von 0 Fall von IIsMK. Unter den letzteren ließ sich eine Abnormität der Glucose-Toleranz bei 2 von 3 Fällen von IsRI, bei 1 von 2 Fällen von IIsRI, bei 4 von 5 Fällen von IsaK, bei 3 von 5 Fällen von IsMK und bei 2 von 5 Fällen von IIsMK beobachten.

BESPRECHUNG

Die bisher zugänglichen Arbeiten, die abnorme Blutzuckerwerte von mit den Komponenten des Pankreashormons aktiv immunisierten Tieren im ursachlichen Zusammenhang mit der Immun-Insulitis mitteilen, beschränken sich leider auf nur diejenige, die an Kaninchen (3) und Maus (4) vorgenommen wurden. Die bei der ersteren Tierart beobachtete Hyperglykämie ist als eine Konsequenz der biologischen neutralisierenden Wirkung vom Antiinsulin-Antikörper im zirkulierenden Blut anzusehen, während die Ursache der bei der letzteren Tierart gefundenen Herabsetzung der Glucose-Toleranz noch weitergehend unbekannt ist.

In diesem Beitrag wurde über Untersuchungen berichtet, welche über die Glucose-Toleranz der Mäuse mit der von einem der Verfasser (Okada) zum erstenmal hergestellten Immun-Insulitis durchgeführt wurden. Die dabei erhobenen Befunde werden folgenderweise zusammengefasst; erstens ließ sich eine Abnormität des Blutzuckers im höheren Prozentsatz bei den sensibilisierten Mäusen als bei den Kontrolltieren beobachten; zweitens gab es bei den sensibilisierten Mäusen keine nachweisbare positive Korrelation zwischen der Glucose-Toleranz und dem Vorhandensein der Insulitis sowie dem Antiinsulin-Antikörpertiter; drittens ließ sich die Insulitis bei allen derjenigen Fällen, die eine bedeutende Herabsetzung der Glucose-Toleranz aufwiesen, eindeutig beobachten; viertens war eine Abnormität der Glucose-Toleranz unter den Fällen ohne entstandene Insulitis selbst bei denjenigen ohne Antiinsulin-Antikörper wirklich zu beobachten, und zwar öfter bei der RI-sensibilisierten Gruppe als bei der mit aK-behandelten Gruppe und niemals bei der MK-behandelten Gruppe.

Wie oben bereits erwähnt, ließ sich eine Abnormität der Glucose-Toleranz bei 87,5% der RI-sensibilisierten Fällen, bei 61,1% der aK-sensibilisierten Fällen und bei 33,3% der MK-sensibilisierten Fällen nachweisen. Daraus kann gefolgert werden, daß RI, das auch mehrere Unreinheiten enthält, im Vergleich mit MK, die heute die reinste Insulinpräparation zu darstellen scheint, die Abnormität der Glucose-Toleranz im höheren Prozentsatz von Fällen zur Erscheinung bringt. Auch Sensibilisierung durch aK hatte bei einem ziemlich hohen Prozentsatz von Fällen eine abnorme Glucose-Toleranz zur Folge. Dies unterscheidet sich von dem von Hirata u. Mitarb. (5) bei ihrer Untersuchung am Kaninchen erhobenen Befund, daß die aK eine wenige diabetogene Wirkung besitzt, und sollte unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zwischen

den beiden Untersuchungen bezüglich der experimentellen Methode (einschließlich der benutzten Tierart) betrachtet wurden.

Aufgrund der oben erwähnten Ergebnisse könnte man darauf schließen, daß bei dem Entstehungsmechanismus von der Herabsetzung der Glucose-Toleranz es sich um a) die Abnahme von der biologischen Aktivität des Insulins durch Antiinsulin-Antikörper oder andere Antikörper im zirkulierenden Blut, b) zelluläre Immunität oder c) die durch zellenbeschädigende Antikörper oder ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) verursachte Störung der Pankreas- β -Zellen handelt.

So wurde hier in der vorliegenden Untersuchung kein enger Zusammenhang der Abnormität der Glucose-Toleranz bei den sensibilisierten Mäusen mit Antiinsulin-Antikörper bestätigt, was in übereinstimmen mit den Ergebnissen von Jansen u. Mitarb. (4) steht. Dazu teilte sie mit, daß selbst bei den Mäusen, die sich gegen Insulin immunologisch duldsam befanden, die Herabsetzung der Glucose-Toleranz erkannt wurde. Dies bedeutet einen negativen Befund gegen die Behauptung, daß die Herabsetzung der Glucose-Toleranz bei den sensibilisierten Mäusen nur durch Antiinsulin-Antikörper veranlasst wird. Ferner wurde die Abnormität der Glucose-Toleranz auch bei den Insulitis-nicht-befallenen Fällen ohne Antiinsulin-Antikörper beobachtet. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Jansen u. Mitarb. (4) überein und deutet daran, daß die Herabsetzung der Glucose-Toleranz durch anderen Antikörper als Antiinsulin-Antikörper bewirkt wird. Die Tatsache, daß die Abnormität der Glucose-Toleranz bei den Insulitis-nicht-befallenen Fällen ohne Antiinsulin-Antikörper im höheren Prozentsatz von den RI-sensibilisierten Fällen, aber niemals bei den MK-sensibilisierten Fällen, beobachtet wurde, ist dann umso interessant, wenn man andenkst, daß RI mehr Antigen-Stoffen in sich enthält.

Auf der anderen Seite teilten Andersen u. Mitarb. (6) mit, daß selbst bei den Mäusen, die Infiltration aus Lymphozyten im Pankreas aufwiesen, die Glucose-Toleranz ganz normal war. Wir konnten zwar bei unserer Versuchsanordnung keinen engen Zusammenhang zwischen der Glucose-Toleranz und der Insulitis bei den sensibilisierten Mäusen in Wirklichkeit darstellen, aber sehr interessant kann die Tatsache sein, daß Insulitis sich bei allen von denjenigen Mäusen, die eine bedeutende Herabsetzung der Glucose-Toleranz aufwiesen, eindeutig nachweisen ließ.

Aus den oben genannten Befunden kann gefolgert werden, daß die Abnormität der Glucose-Toleranz durch zweierlei Mechanismen, die Ausbildung von mehreren Antikörpern im zirkulierenden Blut einschließlich Antiinsulin-Antikörper und die als Insulitis zur Erscheinung kommende zelluläre Immunität, verursacht wird.

Es sei dann möglich, eine Hypothese aufzustellen, daß überhaupt an Anfang

von Entstehung der Insulitis deren krankhafte Veränderungen in Umfang und Ausmaß beschränkt sind und nur unbedeutenden Einfluß auf Pankreas- β -Zellen haben, dann mit nachfolgender Progression der Läsion der Langerhansschen Inseln wird die Funktionsabnahme der β -Zellen zunehmend bedeutender und endlich zu deren bestimmten morphologischen Veränderungen führt, somit die Herabsetzung der Glucose-Toleranz konstant und hochgradig wird. Es scheint uns, daß die Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung dieser Ansicht einen Beweis liefern.

LITERATUR

1. Okada, S.: Experimentelle Erzeugung der Immun-Insulitis bei Mäusen. *Acta Med. Okayama* **30**, 107-115, 1976.
2. Okada, S.: Zur Entstehung der Immun-Insulitis bei Rinder-a-Komponente und Rinder-Monokomponente-Insulin-sensibilisierten Mäusen. *Acta Med. Okayama* **30**, 117-123, 1976.
3. Grodsky, G.M., Feldman, R., Toreson, W.E. and Lee, J.C.: Diabetes mellitus in rabbits immunized with insulin. *Diabetes* **15**, 579-585, 1966.
4. Jansen, F.K. & Herberg, L.: Immune reactions to fractions of crystallized insulin. III. Relation between glucose tolerance, purification of insulin and insulin antibodies. *Horm. Metab. Res.* **5**, 395-400, 1973.
5. Tominaga, M. and Hirata, Y.: Insulin antibody formation and glucose tolerance in the rabbits immunized with a- or b-component in crystalline bovine insulin. *J. Jpn. Diab. Soc. Supp.* **17**, 227, 1974 (In Japanese).
6. Andersen, O.O., Nerup, J., Bendixen, G., Egeberg, J., Gunnarsson, R., Kromann, H. and Poulsen, J.E.: Experimental induction of anti-pancreatic cell-mediated immunity associated with B-cell degeneration and glucose intolerance in rodents. In *Immunity and Autoimmunity in Diabetes Mellitus*, ed. P. A. Bastenie & W. Gepts, Excerpta Medica, Amsterdam and American Elsevier, New York, pp.211-217, 1974.