

Acta Medica Okayama

Volume 30, Issue 2

1976

Article 4

APRIL 1976

Experimentelle erzeugung der immun. Insulitis bei mausen

Soji Okada*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Experimentelle erzeugung der immun. Insulitis bei mausen *

Soji Okada

Abstract

Experimentelle Produktion der Immun-Insulitis wurde aufgrund der aktiven Immunisierung der Mäuse vom dd-Stamm durch wiederholte Gabe vom rekristallisierten Rinderinsulin im Abstand von 4 Wochen unternommen. Während der Zeitdauer vom 3. Tag bis zur 28. Woche nach der ersten Sensibilisierung wurden serologische sowie histologische Untersuchungen an diesen Tieren vorgenommen. Dabei ergaben sich folgende Befunde: (1) Die Immuninsulitis kam bei allen von 58 Fällen bis zu 16 Wochen nach dem Sensibilisierungsbeginn nicht zur Erscheinung, und trat bei 2 von 8 Fällen erst in der 20. Woche und dann bei 3 von 8 Fällen in der 28. Woche in die Erscheinung. (2) Kein signifikanter Unterschied bestand in Hinsicht des insulinverbindenden Antikorpertiters im Blut zwischen den Fällen mit und ohne Immun-Insulitis in der 20. Woche sowie in der 28. Woche. (3) Im Zeitlauf gab es aber eine gute Koinzidenz zwischen der Entstehung der Immun-Insulitis und der Herabsetzung des Antikorpertiters im Blut. (4) Untersuchungen des Pankreas mit Hilfe der direkten Fluoreszenz-Antikörpermethode ergaben keine erkennbare spezifische Fluoreszenz innerhalb der Langerhansschen Inseln. Diese Untersuchungsergebnisse liefern der Ansicht einen Beweis, daß die Insulitis, die für den menschlichen Diabetes mellitus spezifisch ist, mindestens zum Teil durch einen immunologischen Mechanismus entstehen konnte.

Acta Med. Okayama 30, 107—115 (1976)

EXPERIMENTELLE ERZEUGUNG DER IMMUN- INSULITIS BEI MÄUSEN

von Soji OKADA

*Aus der III. Med. Univ.-Klinik an der Univ. Okayama
700 Okayama, Japan*

(Vorstand: Prof. Dr. T. Ofuji)

Received for publication, January 12, 1976

Zusammenfassung. Experimentelle Produktion der Immun-Insulitis wurde aufgrund der aktiven Immunisierung der Mäuse vom dd-Stamm durch wiederholte Gabe vom rekristallisierten Rinderinsulin im Abstand von 4 Wochen unternommen. Während der Zeitdauer vom 3. Tag bis zur 28. Woche nach der ersten Sensibilisierung wurden serologische sowie histologische Untersuchungen an diesen Tieren vorgenommen. Dabei ergaben sich folgende Befunde: (1) Die Immun-Insulitis kam bei allen von 58 Fällen bis zu 16 Wochen nach dem Sensibilisierungsbeginn nicht zur Erscheinung, und trat bei 2 von 8 Fällen erst in der 20. Woche und dann bei 3 von 8 Fällen in der 28. Woche in Erscheinung. (2) Kein signifikanter Unterschied bestand in Hinsicht des insulinverbindenden Antikörpertiters im Blut zwischen den Fällen mit und ohne Immun-Insulitis in der 20. Woche sowie in der 28. Woche. (3) Im Zeitlauf gab es aber eine gute Koinzidenz zwischen der Entstehung der Immun-Insulitis und der Herabsetzung des Antikörpertiters im Blut. (4) Untersuchungen des Pankreas mit Hilfe der direkten Fluoreszenz-Antikörpermethode ergaben keine erkennbare spezifische Fluoreszenz innerhalb der Langerhansschen Inseln. Diese Untersuchungsergebnisse liefern der Ansicht einen Beweis, daß die Insulitis, die für den menschlichen Diabetes mellitus spezifisch ist, mindestens zum Teil durch einen immunologischen Mechanismus entstehen könnte.

Die Insulitis (1) stellt einen krankhaften Vorgang dar, der lediglich beim Diabetes mellitus (D.m.) des Menschen, insbesondere beim akuten juvenilen Diabetes, gehäuft (2) beobachtet wird. Da entsprechende Befunde für den D.m. spezifisch sind, kann angenommen werden, daß sie bei der Entstehung des D.m. von gewissem Typ eine Rolle spielt.

Es ist nicht möglich, das histologische Bild der Insulitis beim menschlichen D.m. von dem der Autoimmun-Krankheiten zu unterscheiden. Es ist auch bekannt, daß beim juvenilen Diabetes ein gleichzeitiges Auftreten anderer Autoimmun-Krankheiten (3) mit statistischer Signifikanz beobachtet wurde. Unter anderem wurde in 30% der D.m.-Fälle eine antipankreatische zelluläre Hypersensitivität beobachtet (4).

Andererseits wurde eine lymphozytäre Infiltration innerhalb der Langerhansschen Inseln vom Rind (5), Schaf (6) und Kaninchen (7) beobachtet, wenn die Tiere mit dem rekristallinen Insulin aktiv immunisiert wurden.

Wenn eine experimentelle Insulitis mit Hilfe der immunologischen Verfahren wirklich entsteht, läßt sich die Annahme verteidigen, daß die menschliche Insulitis aufgrund des immunologischen Vorgangs auftreten könnte. Diese Studie soll gleichzeitig zur Klärung des genauen Ablaufs der experimentellen Insulitis dienen.

In der vorliegenden Arbeit wird mitgeteilt, daß es uns gelang, durch aktive Immunisierung von Mäusen eine experimentelle Insulitis herbeizuführen.

MATERIAL UND METHODEN

1. *Tiere*

Fünf- bis 6-wöchige männliche Mäuse vom dd-Stamm, Körpergewicht 21,20 ± 3,58g, standen uns zur Verfügung. Jeweils 10 Tiere wurden in einem Käfig gehalten. Ihnen waren Wasser und MF-Futterpelotten (Hersteller: Oriental Kobo Industry Co., Chiba) beliebig zugänglich.

2. *Methode der Sensibilisierung*

Als Antigen diente rekristallisiertes Rinderinsulin (Lot. 121C-1350, SIGMA), dem eine gemeinsame Antigenität mit dem Mäuseinsulin zukommt (8), (9). Die Tiere erhielten jeweils eine subkutane Injektion am Rücken im Abstand von 4 Wochen. Jede Sensibilisierung bestand aus 0,4 mg Insulin, welches in 0,25 ml HCl-Kochsalzlosung (pH 3,0) gelöst und mit dem gleichen Teil vom Freund's complete adjuvant (FCA) emulsiert wurde. Die auf diese Weise sensibilisierten Tiere wurden in 8 Gruppen (Is-VIII_s) aufgeteilt, die jeweils 8-10 Mäuse enthielten. Gruppe Is bestand aus Tieren vom 3. Tag, IIs vom 7. Tag und IIIs vom 28. Tag nach der ersten Sensibilisierung. Die Gruppen IVs-VIII_s bestanden aus Tieren vom 28. Tag nach der jeweils 2., 3., 4., 5. und 7. Sensibilisierung.

Herangezogen wurden an den entsprechenden Zeitpunkten 8 Kontrollgruppen (Ik-VIII_k) von jeweils 5 Tieren, die ein Gemisch aus 0,25 ml HCl-Kochsalzlösung und gleichem Teil FCA auf dieselbe Weise erhielten.

3. *Materialentnahme*

Blutabnahme und Exstirpation des Pankreas sowie der sonstigen Organe bei den gesamten Versuchs- und Kontrolltieren erfolgten folgenderweise. Nach 24 stündigem Fasten wurde der Glucose-Toleranztest durchgeführt, wobei das Blut für Zuckerbestimmung vor und 60 Min. nach der Belastung aus dem Retroorbitalsinus entnommen wurde. Das Blut wurde dann nach der Dekapitation erneut gesammelt und das Pankreas wurde schnell exstirpiert. Das so gewonnene Blut wurde im Reagenzglas bei Zimmertemperatur aufbewahrt und die entnommenen Bauchspeicheldrüsen wurden mit Hilfe der unter Punkt 6. erwähnten Methode rasch fixiert.

4. *Glucose-Toleranztest*

Das Ergebnis des Glucose-Toleranztests bei den sensibilisierten Tieren soll

in einer anderen Publikation mitgeteilt werden.

5. *Titerbestimmung des insulinverbindenden Antikörpers im Blut*

Nach 30-60 Min. Stillstand wurde das Serum vom Blut isoliert und bis zur Bestimmung etwa 10 Monate bei -20°C aufbewahrt. Der insulinverbindende Antikörpertiter wurde mit Hilfe des radioimmunoassay aus ^{125}J -Insulin (Rinder) und Äthanol von Welborn u. Mitarb. (10) festgestellt und im Prozentsatz der bound counts gegenüber den total counts wiedergegeben. Einbezogen wurde jeweils 9 mal verdünntes Serum zur Prüfung.

6. *Histologische Untersuchung*

Die entnommenen Bauchspeicheldrüsen wurden schnell in Bouin-Lösung, Lungen, Leber und Nieren wurden in 10%-igem Formol fixiert. Aus verschiedenen Flächen eines Pankreas-Paraffinblocks wurden je 9-15 Schnitte in Serien hergestellt, wobei neben der routinemäßigen HE-Färbung auch Silberimprägnation und Chromhämatoxyllin-Phloxin-Färbung gegebenenfalls an den benachbarten Schnitten durchgeführt wurden. Sonstige Organschnitte wurden nur mit HE gefärbt.

Die Beurteilung des Infiltrationsausmaßes erfolgte aufgrund der Zelldichte, deren Grenze bei 15 Zellen lag.

7. *Direkte Fluoreszenz-Antikörpermethode*

Unmittelbar vor der Pankreasekstirpation wurden davon kleine Stückchen im voraus reseziert, die nach sofortiger Fixierung in n-Hexan-Azeton-Kohlensäureeis-Gemisch bei -20°C aufbewahrt wurden. Von diesen Gewebstückchen wurden innerhalb von 4 Wochen mit Hilfe eines Kryostats (Kammertemperatur -25 bis -30°C) Schnitte von $4-5\ \mu$ Dicke bearbeitet. Sie wurden anschließend mit FITC-markiertem Anti-Mäuse- γ -Globulin-Kaninchenserum (Lot. 656 F, HOECHST) und FITC-markiertem Anti-Mäuse-IgG-Kaninchenserum (Lot. 2226T 003AI, HYLAND) gefärbt und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1. *Insulinverbindender Antikörpertiter*

Bei keiner der Kontrollgruppen wurden Antikörper nachgewiesen.

Eine zeitliche Verschiebung des Antikörpertiters bei den insulin-sensibilisierten Gruppen (Is-VIII_s) ist der Tabelle 1. zu entnehmen. Die insulinverbindenden Antikörper ließen sich also am 3. (Is), am 7. (II_s) und am 28. (III_s) Tag nach der ersten Sensibilisierung nicht nachweisen. Sein Titer ($M \pm \text{SEM}$) betrug erst am 28. Tag nach der zweiten Sensibilisierung (IV_s) $23,62 \pm 5,99\%$. Dieser erhöhte sich bei der Gruppe Vs auf $26,30 \pm 6,16\%$, bei VI_s weiterhin auf $46,48 \pm 3,04\%$ und verminderte sich bei VII_s auf $20,20 \pm 6,92\%$, bei VIII_s auf $18,90 \pm 8,04\%$ allmählich wieder.

2. *Direkte Fluoreszenz-Antikörpermethode*

Bei keinem der Tiere der Kontrollgruppen (Ik bis VIIIk) war im Pankreas eine spezifische Fluoreszenz nachweisbar.

Bei 12 der 74 Tiere bei den sensibilisierten Gruppen wurde eine körnige spezifische Fluoreszenz diffus in der Umgebung der mittleren bzw. kleinen Ausführungsgänge beobachtet. Diese 12 Fälle verteilten sich folgenderweise: IIs (1 Fall) IIIs(2), IVs(1), Vs(4), VIs(1), VIIs(2) und VIIIs(1). 11 von diesen 12 Fällen wiesen histologisch gleichzeitig eine Periduktulitis auf.

Dagegen konnte die spezifische Fluoreszenz im Bereich der Inseln weder bei den Gruppen Is, IIs, IIIs, IVs, Vs und VIs, bei denen noch keine Zellinfiltration aufgetreten war, noch bei den Gruppen VIIs und VIIIs, bei denen es bereits zur Ausbildung des Infiltrats kam, und insbesondere, bei den 5 Fällen mit einer einwandfreien Insulitis beobachtet werden. Dasselbe war auch im periinsulären Bereich der Fall. Selbst bei 26 Tieren, die eine typische Periinsulitis aufwiesen, ließ sich keine spezifische Fluoreszenz nachweisen. In den sonstigen Gewebsanteilen wurde sie gleichfalls nicht beobachtet.

3. *Histologische Befunde*

In den Kontrollgruppen (Ik-VIIIk) wurden bei 10 von 40 Tieren perivasculäre Infiltrationen aus neutrophilen Leukozyten und bei 2 aus kleinen Rundzellen festgestellt. In der Umgebung der mittleren bzw. kleinen Ausführungsgänge fanden sich bei 5 von 40 Fällen Infiltrationen aus kleinen Rundzellen, deren Ausmaß jedoch nur klein war. Es ist daher schwer zu sagen, ob es sich um eine echte Periduktulitis handelte. Bei weiteren 4 Fällen wurde eine leichte fokale interstitielle Pankreatitis beobachtet.

Bei 29 der 74 insulin-sensibilisierten Tieren ließen sich nur angedeutete Infiltrationen aus kleinen Rundzellen und bei 2 aus neutrophilen Leukozyten erkennen.

In den Lungen und der Leber der beiden Gruppen wurde eine leichte interstitielle Infiltration beobachtet.

Die Periduktulitis, Periinsulitis und Insulitis stellten Befunde dar, die nur in der insulin-sensibilisierten Gruppe erhoben werden konnten.

a) *Periduktulitis und Periinsulitis*

Die Periduktulitis, Zellinfiltration im periduktulären Bereich, trat bereits in der Gruppe IIs auf. Aus der Betrachtung der Entstehungshäufigkeit der Krankheitsbilder unter dem Zeitaspekt ergab sich, wie in der Tab. 1 ersichtlich ist, daß es diesbezüglich keine eindeutige Tendenz gab. Eine gewisse Neigung zeigte sich immerhin insofern als Umfang und Ausmaß der pathologischen Veränderung um so stärker erschienen, je mehr sich die Sensibilisierung vermehrte. Dementsprechend wurden beim Fall 6 der Gruppe VIIIs (28 Tag nach der 7. Sensibilisierung) neben leichter periduktulärer Fibrose Erweiterung des Kanälchenlumens Flüssigkeitsretention und Vermehrungsbild an den Kanälchenästen beobachtet.

Die Periinsulitis, die durch periinsuläre Zellinfiltration gekennzeichnet ist, trat bereits bei einem von 9 Tieren der Gruppe IIs auf. Häufigkeitsanalytisch ließ sich ähnlich wie bei der Periduktulitis keine signifikante Tendenz in ihrem zeitlichen Ablauf beobachtet (Tab. 1).

TAB. 1. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM ZUSTANDEKOMMEN DES INSULINVERBINDENDEN ANTIKÖRPERS (IBAK) UND DER ENTSTEHUNG DER INSULITIS, PERIDUKTULITIS UND PERIINSULITIS BEI INSULIN-SENSIBILISIERTEN MÄUSEN.

Immunsierungs- Wochen	(3)*	1	4	8	12	16	20	28
IBAK (%)	M 4,88 ± 0,26	4,96 ± 0,15	3,52 ± 0,34	23,62 ± 5,99	26,30 ± 6,16	46,48 ± 3,04	20,20 ± 6,92	18,90 ± 8,04
Insulitis	0/9	0/9	0/10	0/10	0/10	0/10	2/8	3/8
Periduktulitis	0/9	2/9	7/10	5/10	10/10	6/10	2/8	5/8
Periinsulitis	0/9	1/9	4/10	1/10	5/10	4/10	6/8	5/8

* : Immunisierungstage

b) *Insulitis*

Die Insulitis, die aus Zellinfiltration innerhalb der Langerhanansschen Inseln besteht, trat erst in der 20. Woche (Gruppe VIIIs) auf (Tab. 1). In der Gruppe VIIIIs kam es bei 3 von 8 Tieren zu ihrer Entstehung (Tab. 1 und Abb. 1).

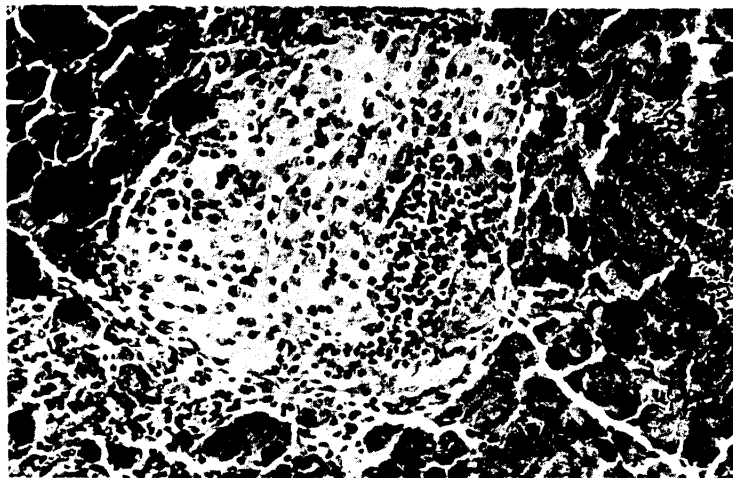


Abb. 1. Infiltration kleiner Rundzellen innerhalb der Langerhansschen Insel bei einer insulin-sensibilisierten Maus; Methode nach Hema-toxylin und Eosin. (Vergr. $\times 250$)

Die Langerhansschen Inseln, die das Bild der Insulitis aufwiesen, waren zahlenmäßig relativ wenig, ihr Anteil lag höchstens bei 15%. Zytologisch bestanden die Infiltrate bei der Insulitis aus kleinen Rundzellen. Strukturell blieben die auf diese Weise befallenen Inseln noch unversehrt und eine Veränderung der α - und β -Zellen war gleichfalls kaum zu beobachten. Bei 5 Tieren mit der Insulitis wurde ausnahmslos die Periinsulitis festgestellt, die mit der ersteren morphologisch in engem Zusammenhang stand (Abb. 2). Die Periduktulitis wurde nur bei 3 von den genannten 5 Tieren beobachtet.

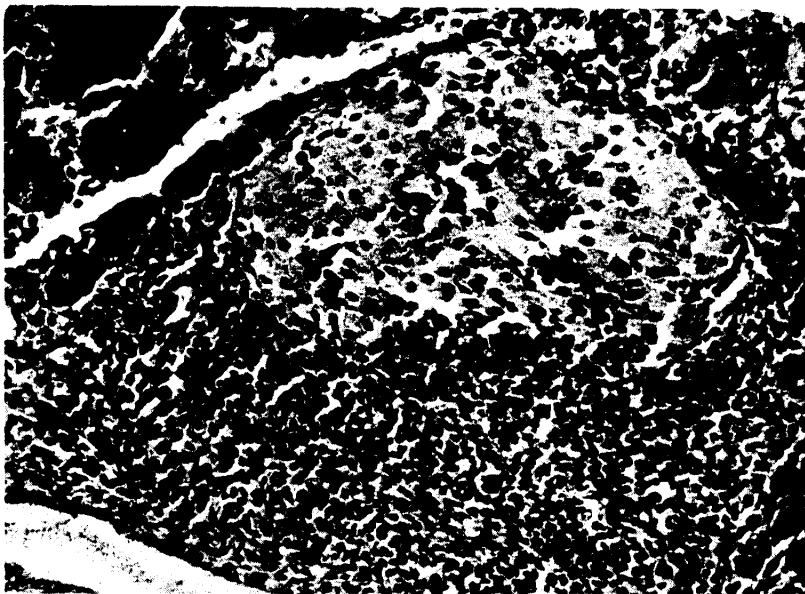


Abb. 2. Insulitis; beachte engen Zusammenhang mit schwerer Periinsulitis; Methode nach Hematoxylin und Eosin (Verg. $\times 250$)

Die Insulitis entstand erst in den späteren Phasen der Sensibilisierung, während die Periduktulitis und Periinsulitis bereits in den früheren Phasen auftraten (Tab. 1).

BESPRECHUNG

Die Insulitis gilt auf dem pathologisch-anatomischen Bereich des D.m. als ein interessantes Phänomen (2). Sofern sie eine für den menschlichen D.m. spezifische intransuläre Rundzelleninfiltration darstellt, ist es nicht möglich, ihr histologisches Bild von der bei den Autoimmun-Krankheiten beobachteten Veränderung zu unterscheiden.

Wird ein Tier mit rekristallinem Insulin immunisiert, so wird ein Anti-

körper gegen das Insulin produziert (11). Beim Meerschweinchen wird daneben eine Zellimmunität gegenüber dem Insulin ausgebildet (12).

Es wurde bei uns auf experimentellem Weg eine Insulitis aufgrund der aktiven Immunisierung von Mäusen des dd-Stammes mit dem rekristallinen Rinderinsulin, das eine gemeinsame Antigenität mit dem Mäuseinsulin besitzt (8), (9), erfolgreich hervorgerufen. Die Tatsache, daß die Insulitis mit Hilfe der immunologischen Methode experimentell verursacht werden konnte, liefert der Ansicht einen Beweis, daß die Insulitis, die für den menschlichen D.m. spezifisch ist, mindestens z.T. durch einen immunologischen Vorgang entstehen könnte.

Es wäre dann sicher von Bedeutung zu wissen, wann die Insulitis überhaupt entsteht, um einen Anhalt zu haben nicht nur für Klärung ihrer Entstehungsweise, sondern auch für künftige Ausführung solcher Untersuchungen.

Es war bisher lediglich bekannt, daß kleine rundzellige Infiltration unterschiedlichen Ausmaßes an unterschiedlichen Zeitpunkten ausgebildet worden ist, wo die jeweilige Untersuchungen vorgenommen wurden, z.B. 4 Monate (Kuh, (5)), 6 Monate (Schaffe, (6)) oder 21 Wochen (männl. Neuseeländer Kaninchen, (7)) nach dem Sensibilisierungsbeginn. Aus diesen Beschreibungen ist es daher nicht ersichtlich, an welchem Zeitpunkt die Insulitis überhaupt aufzutreten pflegt. Aufgrund der Untersuchungen an Mäusen, die zwischen der 1. und 28. Woche nach dem Sensibilisierungsbeginn im Abstand von 1 bis 4 Wochen wiederholt durchgeführt wurden, stellten wir fest, daß insgesamt 58 bis zur 16. Woche nach dem Prüfungsbeginn untersuchte Tieren kein histologisches Bild der Insulitis zeigten, während sich die Insulitis bei 2 von 8 Tieren in der 20. Woche, bei 3 von 8 in der 28. Woche eindeutig beobachten ließ. Daraus kann gefolgert werden, daß die Insulitis im allgemeinen um die 20. Woche nach dem Immunisierungsbeginn entsteht, was auch mit den bisherigen Beobachtungen (5), (6), (7) weitgehend übereinstimmt.

Es wäre weiterhin sicherlich sinnvoll, die Korrelation zwischen dem insulinverbindenden Antikörper im Blut und der Ausbildung der Insulitis festzustellen, da es als Hinweis auf die Klärung des Entstehungsmechanismus von Bedeutung wäre.

Federlin (14) vertritt hinsichtlich des Entstehungsmechanismus der Insulitis die Ansicht, daß es sich hierbei um „additional lesions induced by antibodies or immune complexes“ handelt. In diesem Zusammenhang ist die Bestimmung des insulinverbindenden Antikörpers im zirkulierenden Blut besonders wichtig. Der Vergleich der Antikörpertiter ist aber nur dann zuverlässig, wenn sie bei Fällen mit und ohne entstandener Insulitis gleichzeitig festgestellt worden ist. Arbeiten (5), (6), (7), die sich unter besonderer Berücksichtigung der Bedingung der „Gleichzeitigkeit“ damit befaßten, sind bisher nicht zugänglich.

Aus dem Vergleich der Insulinantikörperwerte bei den Tieren 20 Wochen (Gruppe VII, n=8) und 28 Wochen (Gruppe VIII, n=8) nach dem Sensibilisierungsbeginn ergab sich, daß in der Gruppe VII bei 2 Tieren mit Insulitis die Werte $20,05 \pm 4,15\%$, bei 6 Tieren ohne Insulitis $20,25 \pm 9,40\%$ (t-Test, $P > 0,5$); andererseits in der Gruppe VIII bei 3 Tieren mit Insulitis die Werte $29,47 \pm 19,27\%$, bei 5 Tieren ohne Insulitis die Werte $12,56 \pm 6,93\%$ (t-Test, $0,4 > P > 0,3$) betragen, wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Insulitis-Befall bestand. Es kann daher gefolgert werden, daß bei der Ausbildung der Insulitis kein zirkulierender Antikörper, sondern eher zelluläre Immunität eine entscheidende Rolle spielt.

Bei unserer Untersuchung an Mäusen konnte der insulinverbindende Antikörper im Blut erst in der 8. Woche nachgewiesen werden. Sein Titer nahm weiterhin zu, gelangte in der 16. Woche zum Maximalwert und senkte sich dann allmählich wieder. Die Bedeutung der Abnahme des Antikörpertiters kann noch nicht geklärt werden. Interessant ist trotzdem, daß eine gewisse zeitliche Übereinstimmung zwischen der Herabsetzung des Antikörperwerts und der Insulitis-Entstehung besteht. Diese Tatsache weist auf die Möglichkeit (14) hin, daß die Antikörperproduktion mit der Ausbildung der zellulären Immunität nicht in Parallelität, sondern in umgekehrtem Verhältnis steht.

Aus dem direkten Fluoreszenz-Antikörpernachweis ergab sich weiterhin, daß sich intrainsuläre Ablagerung von Immunglobulinen (γ -Globulin, IgG) in keinem der sensibilisierten Tiere in allen Versuchsphasen feststellen ließ, was bei den Rindern (5) auch der Fall ist. Das Fehlen der intrainsulären Fluoreszenz spricht gegen die oben angeführte Ansicht (13) von Federlin, daß es sich bei der Insulitis um eine direkte Konsequenz des immune complexes handelt. Andererseits wurde eine Ablagerung von Immunglobulinen in der Umgebung der Ausführungsgänge nachgewiesen. Obgleich dies darauf hinweist, daß die immune complexes an der Entstehung der Periduktulitis irgendwie beteiligt sein könnten, bleiben Einzelheiten doch noch ungeklärt.

Die Periduktulitis und die Periinsulitis, für deren Entstehung gewisse immunologische Faktoren verantwortlich sein mögen (15), (16), traten in unserem Versuch gleichfalls auf. Es ist auch bekannt, daß sie bereits in den früheren Sensibilisierungsstadien in Erscheinung traten und daß sich ihr pathologisches Bild im zeitlichen Ablauf verstärkte. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß zu ihrer Entstehung andere Faktoren beitragen als die bei der Insulitis, die erst in den späteren Sensibilisierungsphasen entstand.

Es ist bis jetzt noch nicht festgestellt, ob eine zelluläre Immunität gegenüber dem Insulin bei den dadurch aktiv immunisierten Mäusen überhaupt entsteht. Aufgrund der obigen Beobachtungen liegt es jedoch nahe, daß bei der Insulitis kein zirkulierender Antikörper, sondern eine zelluläre Immunität die

entscheidende Rolle spielen könnte.

Auf jeden Fall betrug die Häufigkeit der Insulitis beim akut verlaufenden juvenilen D.m. 68% (2). Wenn man die Insulitis als einer der ätiologischen Faktoren annimmt, könnte die experimentelle Entstehung der Insulitis an Mäusen von großer Bedeutung sein.

Dank. Dem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Tadashi Ofuji bin ich für seine Unterstützung zu Dank verpflichtet. Herrn Dr. med. Zensuke Ota und Herrn Dr. med. Koichi Kawanishi danke ich für die Geduld.

LITERATUR

1. Von Meyenburg, H.: Über „Insulitis“ bei Diabetes. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **21**, 554-557, 1940.
2. Gepts, W.: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* **14**, 619-633, 1965.
3. Irvine, W. J., Clarke, B. F., Scarth, L., Cullen, D. R. and Duncan, L. J. P.: Thyroid and gastric autoimmunity in patients with diabetes mellitus. *Lancet* **2**, 163-168, 1970.
4. Nerup, J., Anderson, O., Bendixen, G., Egeberg, J. and Paulsen, J. E.: Antipancreatic cellular hypersensitivity in diabetes mellitus. *Diabetes* **20**, 424-427, 1971.
5. Renold, A. E., Soeldner, J. S. and Steinke, J.: Immunological studies with homologous and heterologous pancreatic insulin in the cow. In *Ciba Found. Colloq. Endocrinol.* M. P. Cameron and M. O'Connor, Churchi, London, **15**, pp. 122-139, 1964.
6. Renold, A. E.: In *Twelfth Symposium Dtsch. Ges. f. Endokrin.* ed. E. Klein, Springer Heidelberg, p. 45, 1967.
7. Grodsky, G. M., Feldman, R., Toreson, W. E. and Lee, J. C.: Diabetes mellitus in rabbits immunized with insulin. *Diabetes* **15**, 579-585, 1966.
8. Moloney, P. J. and Coval, M.: Antigenicity of insulin. Diabetes induced by specific antibodies. *Biochem. J.* **59**, 179-185, 1955.
9. Freytag, G. und Klöppel, G.: Experimentelle Insulitis und Pankreatitis nach Immunseren gegen Pankreasextrakte verschiedener Reinheitsgrade. *Beitr. path. Anat.* **139**, 138-160, 1969.
10. Welborn, T. A., Richards, R. and Fraser, T. R.: Simple test for insulin antibodies in sera using ¹³¹I-insulin and ethanol precipitation. *Br. Med. J.* **1**, 719-722, 1967.
11. Jansen, F. K. and Freytag, G.: Immune reactions to fractions of crystalline insulin II. May periinsulitis be produced by an antigen different from true sanger insulin? *Diabetologia* **9**, 191-196, 1973.
12. Clark, C. and Munoz, J.: Delayed hypersensitivity to insulin and its component polypeptide chains. *J. Immunol.* **105**, 574-583, 1970.
13. Federlin, K.: Insulitis: Experimental production by immune processes. In *Immunity and autoimmunity in diabetes mellitus*, ed. P. A. Bastenie and W. Gepts, Excerpta Medica, Amsterdam and American Elsevier, New York, pp. 183-188, 1974.
14. Lagrange, P. H., Mackaness, G. B. and Miller, T. E.: Potentiation of T cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J. Exp. Med.* **139**, 1529-1539, 1974.
15. Peter, H. Wright and Gingerich, R. L.: Lymphocytic infiltration of pancreatic tissue in guinea pigs and rabbits immunized with insulin and pancreatic extracts. *Diabetes* **23**, 386, 1974.
16. Freytag, G., Jansen, F. K. and Klöppel, G.: Immune reactions to fractions crystalline insulin I. Significance of lymphocytic infiltrates in the Endocrine and Exocrine pancreas of mice. *Diabetologia* **9**, 185-190, 1973.