

# *Acta Medica Okayama*

---

*Volume 30, Issue 2*

1976

*Article 5*

APRIL 1976

---

Zur entstehung der immun-insulitis bei  
rinder-a-komponente und rinder-  
monokomponente-insulin-sensibilisierten  
mausen

Soji Okada\*

\*Okayama University,

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

# Zur entstehung der immun-insulitis bei rinder-a-komponente und rinder- monokomponente-insulin-sensibilisierten mausen\*

Soji Okada

## **Abstract**

Es wurde Untersuchungen an Mäusen mit dem Rinder-Monokomponente-Insulin und der Rinder-a-Komponente durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, ob das Monokomponente-Insulin oder die a-Komponente als ein Insulitis-erzeugendes Antigen dienen kann. Dabei wurden die Tiere mit den Substanzen, die jeweils mit Freund's complete adjuvant wiederholt verabreicht wurden, aktiv immunisiert und weiterhin untersucht auf eine dadurch bewirkte Insulitis. (1) Bei den mit dem Rinder-Monokomponente-Insulin sensibilisierten Gruppen kam die Insulitis bei 1 von 8 Tieren in der 20. Woche nach der ersten Sensibilisierung und bei 5 von 10 Tieren in der 28. Woche zur Erscheinung. (2) Bei den mit der a-Komponente behandelten Gruppen ließ sich die Insulitis bei 0 von 9 Tieren in der 20. Woche nach dem Sensibilisierungsbeginn und auch bei 1 von 10 Tieren in der 28. Woche nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Monokomponente-Insulin als ein Insulitis-erzeugendes Antigen wirken kann. Dagegen war nur ein Fall von Insulitis befallen unter 19 Tieren, die mit der a-Komponente behandelt wurden.

Acta Med. Okayama 30, 117—123 (1976)

**ZUR ENTSTEHUNG DER IMMUN-INSULITIS BEI  
RINDER-a-KOMPONENTE UND RINDER-  
MONOKOMPONENTE-INSULIN-  
SENSIBILISIERTEN 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, February 5, 1976*

*Zusammenfassung.* Es wurde Untersuchungen an Mäusen mit dem Rinder-Monokomponente-Insulin und der Rinder-a-Komponente durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, ob das Monokomponente-Insulin oder die a-Komponente als ein Insulitis-erzeugendes Antigen dienen kann. Dabei wurden die Tiere mit den Substanzen, die jeweils mit Freund's complete adjuvant wiederholt verabreicht wurden, aktiv immunisiert und weiterhin untersucht auf eine dadurch bewirkte Insulitis. (1) Bei den mit dem Rinder-Monokomponente-Insulin sensibilisierten Gruppen kam die Insulitis bei 1 von 8 Fällen in der 20. Woche nach der ersten Sensibilisierung und bei 5 von 10 Fällen in der 28. Woche zur Erscheinung. (2) Bei den mit der a-Komponente behandelten Gruppen ließ sich die Insulitis bei 0 von 9 Fällen in der 20. Woche nach dem Sensibilisierungsbeginn und auch bei 1 von 10 Fällen in der 28. Woche nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Monokomponente-Insulin als ein Insulitis-erzeugendes Antigen wirken kann. Dagegen war nur ein Fall von Insulitis befallen unter 19 Tieren, die mit der a-Komponente behandelt wurden.

Die Insulitis (1) stellt einen pathoanatomischen Befund dar, der für den Diabetes mellitus spezifisch ist. Auf Grund der Beobachtungen an Versuchstieren, daß aktive Immunisierung mit dem rekristallinen Insulin eine Insulitis zur Erscheinung brachte (2), (3), (4), kommt es gleich in Betracht, daß der menschlichen Diabetes mellitus mindestens z.T. durch einen immunologischen Vorgang entstehen kann.

Im Hinblick auf diese Feststellung erhebt sich die Frage, was für ein Antigen für diese experimentelle Produktion der Insulitis verantwortlich sein soll.

Neuestens wurden das Monokomponente-Insulin (sogenanntes Monomer-Insulin), eine insulin-ähnliche Substanz (insulin-like substance), das Proinsulin (welches ein hohes Molekulargewicht hat) und Unreinheiten vom rekristallinen Insulin getrennt (5), was eine neue Lage in der Forschung der Antigenität des

rekristallinen Insulin geschaffen hat. So bestätigten Untersuchungen an Kaninchen (6) und Meerschweinchen (7), daß das Monokomponente-Insulin wirklich imstande den insulinverbindenden Antikörper auszubilden ist. Weiterhin war es zu erkennen, daß das Monokomponente-Insulin in Gegenwart des Anti-insulinerums vom Meerschweinchen eine Präzipitationsreaktion auslösen kann (8), (9). Diese Ergebnisse weisen die Möglichkeit auf, daß das Insulin selbst auch eine Antigenität besitzt.

In der vorliegenden Arbeit führten wir folgende experimentelle Untersuchung durch, um den Nachweis zu erbringen, ob das Monokomponente-Insulin eine Insulitis wirklich verursachen kann. Es wird hier mitgeteilt, daß es uns gelang, durch aktive Immunisierung mit dem Monokomponente-Insulin eine experimentelle Insulitis herzustellen.

#### MATERIAL UND METHODEN

##### 1. Versuchstiere

Fünf- bis 6-wöchige männliche Mäuse vom dd-Stamm im Gewicht von  $20,3 \pm 4,20$  g standen uns zur Verfügung. Jeweils 10 Tiere wurden in einem Käfig gezüchtet. Ihnen waren solides Futter (MF, Hersteller: Oriental Kobo Industry Co., Chiba) und Wasser beliebig zugänglich.

##### 2. Sensibilisierungsmethode

Als Antigen dienten sowohl die a-Komponente (Lot 5874, Novo) als auch das Monokomponente-Insulin (Lot X-MC-O-10674, Novo) vom Rinderinsulin, dem eine gemeinsame Antigenität mit dem Mäuseinsulin zukommt (10) (11). Die Tiere erhielten jeweils subkutane Injektionen von Antigen an ihrem Rücken mit Abstand von 4 Wochen. Jede Sensibilisierungsdosis bestand aus 0,4 mg Antigen, welches in 0,25 ml HCl-Kochsalzlösung (pH 3,0) gelöst und dann mit dem gleichen Teil vom Freund's complete adjuvant (FCA) emulsiert wurde. Die auf diese Weise sensibilisierten Mäuse wurden in 2 Gruppen aufgeteilt, die jeweils 8-10 Tiere enthielten. Gruppe I bestand aus Tieren vom 28. Tag nach der 5. Sensibilisierung und Gruppe II aus den vom 28. Tag nach der 7. Sensibilisierung.

Herangezogen wurden an den entsprechenden Zeitpunkten 2 Kontrollgruppen von jeweils 10 Tieren, die ein Gemisch aus 0,25 ml HCl-Kochsalzlösung und gleichem Teil FCA auf dieselbe Weise erhielten.

##### 3. Materialentnahme

Bei den gesamten Tieren erfolgten Blutabnahme und Exstirpation des Pankreas folgendermaßen. 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 durch die Dekapitation erneut gesammelt und das Pankreas wurde sofort exstirpiert. Das so gewonnene Blut wurde im Reagenzglas bei Zimmertemperatur aufbewahrt und die entnommenen Bauchspeicheldrüsen wurden durch die unter Punkt 6. beschriebene Methode rasch fixiert.

4. *Glucose-Toleranztest*

Die Ergebnisse des Glucose-Toleranztests bei den sensibilisierten Tieren sollen nachher berichtet werden.

5. *Titerbestimmung des insulinverbindenden Antikörpers im Blut*

Nach 30-60 Min. Stillstand wurde das Serum vom Blut getrennt und bis zur Bestimmung des Antikörpertiters etwa 2 Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der insulinverbindende Antikörpertiter wurde in Anlehnung an die von Welborn u. Mitarb. (12) beschriebene Radioimmunoassay-Methode mittels  $^{125}\text{J}$ -Insulins (Rinder) und Äthanols bestimmt und in Prozentsatz von bound count gegenüber total count wiedergegeben. Einbezogen wurde jeweils 9-mal verdünntes Serum zur Prüfung.

6. *Histologische Untersuchung*

Die entnommenen Bauchspeicheldrüsen wurden schnell in der Bouin-Lösung fixiert. Aus verschiedenen Flächen eines Pankreas-Paraffinblocks wurden je 10 Schnitte in Serien hergestellt, wobei neben der routinen HE-Färbung auch Silberimprägnation und Chromhämatoxyllin-Phloxin-Färbung gegebenenfalls an den benachbarten Schnitten durchgeführt wurden. Die Intensität der Insulitis wurde nach der Dichte der in den Langerhansschen Inseln gefundenen infiltrierenden Zellen beurteilt und folgenderweise angegeben: (+) 15-20 Zellen; + 21-60 Zellen; ++ 61-100 Zellen; +++ 101 Zellen und darüber.

## UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

*Insulinverbindender Antikörpertiter*

Bei keiner der Kontrollgruppen wurden Antikörper nachgewiesen.

Unter den mit Rinder-a-Komponente sensibilisierten Tieren (IA und IIA) wiesen die von Gruppe IA einen Wert für den insulinverbindenden Antikörpertiter von  $10,85 \pm 3,24\%$  und die der Gruppe IIA einen entsprechenden Wert von  $13,37 \pm 4,34\%$  auf. Bei den Gruppen die mit dem Rinder-Monokomponente-Insulin sensibilisiert wurden (IM, IIM), betrug der Wert  $11,34 \pm 5,83\%$  für die Gruppe IM und  $25,77 \pm 6,31\%$  für IIM. (Tab. 1).

TAB. 1. ZUR ENTSTEHUNG DER IMMUN-INSULITIS BEI RINDER-a-KOMPONENTE UND RINDER-MONOKOMPONENTE-INSULIN-SENSIBILISIERTEN MÄUSEN

| Immunisierungs-Wochen  | 20                      | 28                      |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| a-Komponente           | 0/9(10,85 $\pm$ 3,24%)* | 1/10(13,37 $\pm$ 4,34%) |
| Monokomponente-Insulin | 1/8(11,34 $\pm$ 5,83%)  | 5/10(25,77 $\pm$ 6,31%) |

\*;  $M \pm \text{SEM}$ : der insulinverbindende Antikörpertiter

Betrachtet man den gemessenen insulinverbindenden Antikörpertiter der Insulitis-Befallenen im Vergleich zu denjenige der Nicht-Insulitis-Befallenen, so ergibt sich, daß der Wert bei der Gruppe IM 4,30% für die ersteren gegenüber

10,91 ± 6,54% für die letzteren betrug. Weiter stellte es sich heraus, daß der Wert bei IIM 11,46 ± 8,00% für Insulitis-Befallenen und 14,31 ± 10,54% für Nicht-Insulitis-Befallenen, bei IIA 6,30% für Insulitis-Befallenen und 12,74 ± 4,77% für Nicht-Insulitis-Befallenen betrug. Wie aus diesen Ziffern ersichtlich, bestand kein wesentlicher Unterschied diesbezüglich zwischen den Fällen mit und ohne Insulitis-Befall ( $t=0,215$ ,  $P>0,5$ ).

*Insulitis*

In den Kontrollgruppen wurden bei keiner der 20 Tieren Insulitis nachgewiesen.

In der 20. und 28. Woche nach dem Sensibilisierungsbeginn wurden die behandelten Tiere auf eine ausgebildete Insulitis untersucht. Die Insulitis, die in Infiltration von kleinen mononuklearen Zellen innerhalb der Langerhanschen Inseln besteht, ließ sich bei 1 von 8 Fällen der Gruppe IM, die mit dem Monokomponente-Insulin sensibilisiert wurden, und bei 5 von 10 Fällen der Gruppe IIM, die dasselbe Antigen erhielt, erkennen. Sie konnte auch bei 0 von 9 Fällen der IA und bei 1 von 10 Fällen der IIA unter den mit  $\alpha$ -Komponente sensibilisierten Gruppen beobachtet werden. (Abb. 1).

Ausdrückte man bei diesen sensibilisierten Tieren das Ausmaß der bewirkten Insulitis in der jeweiligen maximalen Intensität der pathologischen



Abb. 1. Insulitis mit Periinsulitis bei einer Rinder-Monokomponente-Insulin-sensibilisierten Maus; Methode nach Hematoxylin und Eosin (Vergr.  $\times 250$ )

Veränderung, so war es (+) bei IM, +, ++, ++, †† und †† bei IIM und (+) bei IIA.

Der Prozentsatz der betroffenen Inseln zu den gesamten Langerhansschen Inseln bei allen Tieren mit ausgebildeter Insulitis war jedoch relativ niedrig und zwar betrug nur etwa 10%.

#### BESPRECHUNG

Der Hauptpunkt in der vorliegenden Untersuchung war zu bestimmen, ob das Monokomponente-Insulin zur Entstehung der Insulitis führen kann. Man nimmt heute an, daß das Mäuseinsulin eine gemeinsame Antigenität mit dem Rinderinsulin besitzt (10), (11). In der vorliegenden Arbeit wurde entweder das Rinder-Monokomponente-Insulin oder die Rinder-a-Komponente benutzt. In Anlehnung an die Sensibilisierungsmethode, von welcher schon im vorhergehenden Bericht die Rede gewesen ist (4), wurden die respektiven Antigene als eine Emulsion in FCA den Mäusen vom dd-Stamm in einer Dosis von 0,4 mg wiederholt verabreicht. Unter Berücksichtigung der Feststellung, daß die Entstehungszeit der Insulitis gegen 20 Wochen nach der ersten Sensibilisierung sein soll (4), erfolgten die Prüfungen der behandelten Tiere auf die eventuelle Ausbildung der Insulitis beim vorliegenden Versuch in der 20. und 28. Woche nach der Sensibilisierungsbeginn. An diesen Zeitpunkten erwiesen sich beide Antigene wirklich als Insulitis-erzeugend. So unter denjenigen Fällen, die mit dem Monokomponente-Insulin behandelt wurden, ließ sich eine einwandfreie Insulitis bei 1 von 8 Fällen (IM) in der 20. Woche und bei 5 von 10 Fällen (IIM) in der 28. Woche beobachten. Diese Tatsache spricht dafür, daß das Monokomponente-Insulin ein wirksames Insulitis-erzeugendes Antigen sein könnte.

Wenn man die a-Komponente als Antigen benutzte, so trat die Insulitis bei 0 von 9 Fällen (IA) in der 20. Woche und bei 1 von 10 Fällen (IIA) in der 28. Woche auf. Parenthetisch stellte es sich in einem ähnlichen Versuch mit dem rekristallisierten Insulin heraus, daß die Insulitis sich bei 2 von 8 Fällen bis zur 20. Woche und bei 3 von 8 Fällen bis zur 28. Woche ausbildete (4).

Wenn es sich um die Entstehungshäufigkeit der Insulitis handelt, so ist es zu ersehen, daß sie bei 6 (33,3%) von den 18 mit dem Monokomponente-Insulin behandelten Fällen auftrat. Diese Ziffer kommt daher derjenige, die mit dem rekristallisierten Insulin erhoben werden konnte (5 von 16 Fällen oder 31,3%), gleich. Dahingegen entstand die Insulitis nur bei 1 von 19 Fällen nach Gabe von der a-Komponente, das heißt die Entstehungshäufigkeit war hier weitaus geringer als die von den vorhergehenden zwei Agenzien.

Klöppel u. Mitarb. sensibilisierten Kaninchen mit Rinder-c-Komponente (bestehend aus das Monokomponente-Insulin und „insulin-like substance“) und FCA, und erzielten bei 3 von 5 so behandelten Fällen eine Insulitis zu erzeugen

(13). Die von diesen Autoren ermittelte Entstehungsrate war also viel höher als diejenige, die wir mit dem Monokomponente-Insulin fanden. Dies dürfte darauf hinweisen, daß „insulin-like substance“, die einen Bestandteil der c-Komponente darstellt, eine stärkere Antigenität als die Monokomponente-Insulin besitzt (14).

Nach ihren Angaben bildete sich eine Insulitis in keiner von 5 mit der a-Komponente behandelten Fällen auf. Es gelang uns bei 1 von 10 Fällen der Gruppe IIA eine Insulitis eindeutig zu verursachen, doch ihrer Umfang und Ausmaß waren deutlich geringer als die der durch das Monokomponente-Insulin oder rekristallisierten Insulin bewirkten Insulitis.

Aus den oben-geannten Resultaten von Klöppel u. Mitarb. sowie den Ergebnissen unserer Versuche kann gefolgert werden daß die im rekristallinen Insulin enthaltene Unreinheiten (a-Komponente) zur Erzeugung der Insulitis unfähig oder nur unbedeutsam fähig ist. Im Gegensatz dazu sind die c-Komponente und das Monokomponente-Insulin, die jeweils einen Bestandteil des rekristallinen Insulin von niedrigerem Molekulargewicht darstellen, offenbar imstande eine Insulitis zu verursachen.

In dem vorliegenden Versuch an Mäusen erfolgte die Verabreichung der Antigene unter ähnlichen Bedingungen wie bei den bisherigen Untersuchungen an Kaninchen (6) (13) sowie Meerschweinchen (7). Die Behandlung führte zur Produktion des insulinverbindenden Antikörpers gegenüber den verwendeten Antigenen. Bei einem früher vorgenommenen Versuch erwies sich, daß das Monokomponente-Insulin, wenn es allein verabreicht wird, keine erfaßbare Fähigkeit der Produktion des Anti-Insulin-Antikörpers aufweist (14). Dagegen wurde der insulinverbindende Antikörper sowohl bei den Kaninchen (6) (13), Meerschweinchen (7) als auch bei den Mäusen im vorliegenden Versuch deutlich demonstriert, nachdem diese Tiere mit dem Monokomponente-Insulin, welches vorläufig in einer säurehaltigen Lösung gelöst und dann mit FCA emulsiert wurde, sensibilisiert wurden. Diese Diskrepanz in den Ergebnissen dürfte sich durch die Unterschiede der chemischen oder physikalischen Eigenschaften der verwendeten Antigene erklären.

Der immunologische Mechanismus, wodurch die Insulitis entsteht, ist noch nicht bekannt. Ein Vergleich der an denselben Zeitpunkten ermittelten Antikörpertiter der Insulitis-Befallenen und Nicht-Insulitis-Befallenen bei allen Behandlungsgruppen ergab keine statistisch gesicherte Differenz zwischen den beiden Gruppen der Tiere. Dieser Befund weist darauf hin, daß bei der Entstehung der Insulitis kein zirkulierender Antikörper, sondern eher eine zelluläre Immunität eine entscheidende Rolle spielt.

Die Tatsache, daß das Monokomponente-Insulin, welches man heute für reines Insulin nimmt, sich als Insulitis-erzeugend erwies, dürfte bedeuten, daß

das Insulin sich selbst zur Ursache der Krankheit führen kann.

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

Rinder-a-Komponente und Rinder-Monokomponente-Insulin wurden uns freundlich von dem Novo Forschungsinstitut durch die Kodama AG gespendet.

#### LITERATUR

1. Von Meyenburg, H.: Über 'Insulinitis' bei Diabetes. *Schweiz. med. Wochenschr.* **21**, 554-557, 1940.
2. Grodsky, G. M., Feldman, R., Toreson, W. E. and Lee, J. C.: Diabetes mellitus in rabbits immunized with insulin. *Diabetes* **15**, 579-585, 1966.
3. Okada, S., Kawanishi, K. und Ofuji, T.: Ein Forschungsbericht über Immun-Insulinitis bei Mäusen. *Acta Med. Okayama* **29**, 237-240, 1975.
4. Okada, S.: Experimentelle Erzeugung der Immun-Insulinitis bei Mäusen. *Acta Med. Okayama* **30**, 107-115, 1976.
5. Schlichtkrull, J., Brange, J., Ege, H., Hallund, O., Heding, L. G., Jørgensen, K. H., Markussen, J., Stahnke, P., Sundby, F. and Vølund, Aa.: Proinsulin and related proteins. Lecture held at the 5th Annual Meeting of European Association for the Study of Diabetes, Montpellier, 16th-18th September 1969.
6. Kumar, D., Mehtalia, S. D. and Miller, L. V.: Antigenicity of monocomponent porcine insulin in rabbits. *Horm. Metab. Res.* **6**, 175-177, 1974.
7. Okada, S., Kawanishi, K. and Ofuji, T.: Formation of antibody to monocomponent insulin in guinea pigs. *Acta Med. Okayama* **28**, 377-378, 1974.
8. Bansal, D. D., Connolly, J. H. and Vallance-Owen, J.: Precipitin reactions between insulin, proinsulin, insulin chains and insulin antibody. *Diabetologia* **9**, 384-386, 1973.
9. Okada, S., Kawanishi, K. and Ofuji, T.: Precipitin reactions between bovine insulin, porcine insulin, monocomponent insulin and guinea pig antiovine insulin sera. *Acta Med. Okayama* **28**, 295-297, 1974.
10. Moloney, P. J. and Coval, M.: Antigenicity of insulin. Diabetes induced by specific antibodies. *Biochem. J.* **59**, 179-185, 1955.
11. Freytag, G. und Klöppel, G.: Experimentelle Insulinitis und Pankreatitis nach Immunseren gegen Pankreasextrakte verschiedener Reinheitsgrade. *Beitr. path. Anat.* **139**, 138-160, 1969.
12. Welborn, T. A., Richards, R. and Fraser, T. R.: Simple test for insulin antibodies in sera, using <sup>131</sup>I-insulin and ethanol precipitation *Br. Med. J.* **1**, 719-722, 1967.
13. Klöppel, G. and Freytag, G.: Insulin antibodies and immune insulinitis in rabbits immunized with bovine or porcine insulin components. *Horm. Met. Res.* **7**, 25-30, 1975.
14. Schlichtkrull, J., Brange, J., Christiansen, A. H., Hallund, O., Heding, L. G. and Jørgensen, K. H.: Clinical aspects of insulinantigenicity. *Diabetes* **21** (suppl. 2), 649-656, 1972.