

Triggering Factors for the Occurrence of Insulinitis in the BB Rat : Increased Natural Killer Activity and Induction of the Cytolytic Activity against RINr (Rat Insulinoma Cell Line) Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8022

BB ラットのラ氏島炎惹起要因：NK 細胞活性と インスリノーマ由来 RINr 細胞株に対する 細胞障害活性の誘導能

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口 昂教授）

丸 山 博 昭

（昭和63年2月15日受付）

BB ラットはヒト I 型糖尿病の動物モデルである。著者は BB (original) 由来の糖尿病抵抗性 (diabetes resistant, DR) である BB/Kanazawa (BB/K) と BB/W 由来でラ氏島炎 (90%)、糖尿病 (33%) を高率に発症する糖尿病易発症性 (diabetes prone, DP) の BB/Saitama-Tokyo (BB/S) を用いて末梢血リンパ球および脾リンパ球のキラー活性を比較検討し、ラ氏島炎および糖尿病発症に関連する因子を調べた。8~10週齢の BB/S, BB/K およびウイスターのマクロファージ除去後の末梢血リンパ球および脾リンパ球の i) サブセット, ii) ナチュラル・キラー (natural killer, NK) 活性, iii) RINr 細胞 (rat insulinoma cell line, RINr) 腹腔内投与前後の RINr に対するキラー活性の変化と、さらにこれらの成績と免疫組織学的に検索したラ氏島炎の有無との関連を検討した。BB/S, BB/K ともリンパ球減少症がみられ、サブレッサー T 細胞の欠如のため OX8 陽性細胞は NK 細胞のみで構成されていた。また、BB/S では OX6 陽性細胞と OX12 陽性細胞の解離がみられ、Ia 陽性細胞 (恐らく活性化 T 細胞) の増加がみられた。末梢血における NK 活性は BB/S 38.6±7.8%, BB/K 22.7±9.1%, ウイスター 26.7±8.2% と、BB/S の有意な上昇がみられた ($p < 0.05$)。一方、脾臓における NK 活性は BB/S 30.2±10.2%, BB/K 28.5±10.1%, ウイスター 10.4±4.6% と、BB/S, BB/K とも有意に上昇していた ($p < 0.05$)。RINr 投与前後の RINr に対するキラー活性は、末梢血では BB/S が 11.6%→29.4%, BB/K が 7.8%→20.9%, ウイスターが 9.5%→11.6% と、BB/S, BB/K で RINr に対するキラー活性の増強反応が認められた。脾臓では三者間に差はなかった。ラ氏島炎は、BB/S にのみ認められ、Ia 陽性細胞の浸潤がみられた。以上より、BB ラットの膵β細胞に対する免疫異常反応の存在が示唆されたが、BB/K ではラ氏島炎がみられず、この反応以外の因子がラ氏島炎の発現には必要と思われる。この点に関して BB/S のみ末梢血における NK 活性が上昇しており、しかも末梢血における NK 活性/Large granular lymphocytes (LGLs) 比の上昇、即ち個々の NK 細胞が活性化していると考えられ、膵β細胞に対する免疫異常反応に加えて、末梢血における NK 細胞の活性化亢進がラ氏島炎や糖尿病の発症に関与すると推察された。

Key words BB ラット, ナチュラル・キラー (NK) 活性, RINr, ラ氏島炎, 糖尿病

ヒト I 型糖尿病の病因に何らかの自己免疫異常が関与していることは広く知られており、その根拠としてインスリン依存性糖尿病 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) 患者の膵ランゲルハンス

島 (ラ氏島) へのリンパ球浸潤 (ラ氏島炎)¹⁾や膵ラ氏島細胞表面抗体 (islet cell surface antibody, ICSA) の存在²⁾などが挙げられる。

ヒト I 型糖尿病と類似した糖尿病をおこす動物モ

Abbreviations: DP, diabetes prone; DR, diabetes resistant; ICSA, islet cell surface antibody; IDDM, insulin dependent diabetes mellitus; IL-2, interleukin 2; LGL, large granular lymphocyte; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer.

Table 1. BB rat sublimes

BB (original)	Department of National Health and Welfare, Ottawa, Canada
BB/W	University of Massachusetts Medical Center, Worcester, Ma., U.S.A.
BB/H	Hagedorn Research Laboratory, Gentofte, Denmark
BB/Harvard	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, Ma., U.S.A.
BB/E	University Department of Medicine, Western General Hospital, Edinburgh, Scotland
BB/Dtüs	University of Düsseldorf, Düsseldorf, FRG

Ref: Clin. Immunol. (Jap.), 19, 755-762 (1987).

Table 2. Mouse anti-Rat lymphocyte monoclonal antibodies

W3/13	all T cells, plasma cells
OX 19	all T cells
OX 8	suppressor/cytotoxic T cells, NK cells
W3/25	helper T cells, macrophages
OX 6	Ia ⁺ cells, B cells
OX 12	B cells

NK cells: natural killer cell, Ref: Clin. Immunol. (Jap.), 19, 755-762 (1987).

デルとして、BB ラットや NOD マウスが知られており³⁾、病因究明のために用いられている。BB ラットは1974年、カナダの Bio-Breeding Laboratories のウイスター closed colony から偶然発見されたものであり⁴⁾、末梢血・脾臓およびリンパ節におけるリンパ球減少（特にT細胞の減少⁵⁾）、各種T細胞マイトジェンに対する反応低下⁶⁾、皮膚移植片拒絶反応の遅延⁷⁾といった細胞性免疫不全を呈し、さらに ICSA や抗甲状腺抗体などの自己抗体も存在し⁸⁾、I型糖尿病や慢性甲状腺炎などの自己免疫異常を発現する。

BB ラットの糖尿病は生後60~120日に急性発症し、多尿や高血糖が持続してインスリンの投与を行わなければ4、5日で糖尿病性ケトアシドーシスを呈して死亡すると述べられている。また組織学的にはラ氏島炎が認められる⁹⁾。

今までの BB ラットに関する報告¹⁰⁻¹⁷⁾を総合すると、BB ラットの糖尿病発症に細胞性免疫が強く関与していることが示唆される。しかし、どのリンパ球サブセットが発症の主役を演じているかは不明だった。

最近、ナチュラル・キラー (natural killer, NK) 細胞¹⁸⁾¹⁹⁾およびサプレッサーT細胞のマーカーである OX8 抗体の投与により、BB ラットの糖尿病発症が抑制されると報告され²⁰⁾、NK細胞の関与が強く考えられている。しかし、BB ラットの NK 細胞とその活性に関して、今まで検討されたものはほとんど脾

リンパ球に関したものであり、よりラ氏島と密接な関連があると思われる末梢血中の NK 細胞や NK 活性には不明な点が多い。

本研究では、BB ラットの末梢血における NK 活性や、ラットインスリノーマ株に対するキラー活性の誘導能とラ氏島炎との関連を検討して、糖尿病発症のメカニズムを細胞性免疫の面から追求した。

対象および方法

I. 実験動物

BB ラットは未だ純系化されておらず、オタワ以外の系では繁殖、飼育された場所の名を付記して呼ばれている。現在、6亜系に大別されるが（表1）²¹⁾、著者は2亜系由来の BB ラットを使用した。一つは BB/Kanazawa (BB/K) ラットであり、Dr. Thibert (Department of National Health and Welfare, Ottawa, Canada) より提供された BB (original) 由来で、金沢大学動物実験施設にて兄妹交配を10代以上繰り返している。この BB/K の特徴は、リンパ球減少症はあるものの糖尿病発症率が1%以下である点にある。もう一つの亜系である BB/Saitama-Tokyo (BB/S) ラットは BB/W 由来で、埼玉医科大学第4内科より提供されたものであり、金沢大学動物実験施設で兄妹交配を5代繰り返している。この BB/S の特徴は、リンパ球減少症があり、8週齢以後のほとんどのラットにラ氏島炎が認められ、糖尿病発症率は33%であった。ただし、河津らの報告では生後120日までに80~90%の BB/W が糖尿病を発症しており²²⁾、この差は著者がラットを生後10週齢で屠殺しているためと思われる。

BB/S および BB/K のコントロールとして、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) の一致している、ウイスターを用いた。ラットの MHC である RT1 は BB/S, BB/K およびウイスターとも RT1^u である²³⁾。

II. 標的細胞

1. RINr 細胞 (RINr)²⁴⁾: NEDH (New En-

gland Deaconess Hospital) ラットインスリノーマ (insulinoma) 由来の継代株で RT1 は RT1^g である¹⁷⁾.

2. YAC-1 細胞 (YAC-1)²⁰⁾: マウス T リンパ腫由来の継代株で、マウスおよびラットにおける NK 感受性細胞である。

III. 単クローン抗体

末梢血リンパ球および脾リンパ球のサブセットと、ラ氏島への浸潤細胞の検索に 6 種類のマウス抗ラットリンパ球単クローン抗体を使用した (表 2)。W3/13 は T 細胞全般および形質細胞, OX19 は T 細胞全般, OX8 はサブレッサー/サイトトキック T 細胞および NK 細胞, W3/25 はヘルパー T 細胞およびマクロファージ, OX6 は Ia 陽性細胞および B 細胞, そして OX12 は B 細胞の表面マーカーである。これらの単クローン抗体は Dr. Mason (Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, U. K.) より提供された。

その他にフローレセイン・イソチオシアネイト (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel Laboratories, Westchester, P. A.), ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Tago, Inc., Burlingame, CA.) を二次抗体として使用した。

IV. 末梢血リンパ球および脾リンパ球の調整

以下に述べる操作は全て無菌的に行なった。まず、ラットをエーテル麻酔下に開腹し、下大静脈よりヘパリン加採血し、同時に脾臓と膵臓も摘出した。脾臓はステンレスメッシュにてすりつぶし、リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) にて浮遊後、ナイロンウールで濾過し、1500 rpm, 5 分, 4°C にて遠心した。それから沈渣を、ペニシリン (200 U/ml), ゲンタマイシン (10 μg/ml), 0.02M ヘペス (Hepes) 緩衝液 (GIBCO, Grand Island, N. Y.) を含む RPMI 1640 培養液 (RPMI 1640) (GIBCO) に 20% (V/V) となるように新鮮ウイスター血清を加えたものに再浮遊した。

末梢血リンパ球および脾リンパ球からマクロファージを除去する目的で、シリカゲル (KAC-2, 日本抗体研究所, 高崎) を用いた。ヘパリン加血液には KAC-2 を 10~20% (V/V) になるように加え、また脾細胞浮遊液については前述のラット新鮮血清 20% (V/V) 加細胞浮遊液としてから KAC-2 を加え、15分ごとに転倒混和を行ない、37°C にて 1 時間インキュベートした。インキュベート後の末梢血および脾細胞浮遊液を用いて、比重遠心法により単核

細胞を分離した。まず、9% (W/V) Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 水溶液 100ml に 32.8% (W/V) メトリゾ酸ナトリウム溶液 (第一化学薬品, 東京) 42ml を加えた混合液の上に末梢血および脾細胞浮遊液を重層して、2500rpm, 30分, 4°C にて遠心した。その後中間層を採取し、PBS にて 3 回洗浄後、非働化ウシ胎児血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS) を 10% (V/V) となるよう加えた RPMI 1640 溶液 (10% FCS-RPMI 1640) に再浮遊した。細胞数を 1×10^6 /ml に調整し、以後の実験に使用した。末梢血、脾臓ともこのリンパ球分画での単球 (またはマクロファージ) は 0.7% 以下に減少していた。

またヘパリン加血液の一部を用いて、トーマ (Thoma) 計算盤上でリンパ球数を算定した。

V. 間接蛍光抗体法

1. リンパ球サブセット

間接蛍光抗体法を用いて上記で得られたリンパ球のサブセットを解析した。一次抗体としてマウス抗ラットリンパ球単クローン抗体 (表 2), 二次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた。至適量の一次抗体を末梢血リンパ球および脾リンパ球浮遊液に加え、30分, 4°C にて静置、その後 0.02% アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline with sodium azide, PBSA) にて 2 回遠心洗浄後、細胞浮遊液の沈渣に非働化したウイスター血清を 10% (V/V) になるように加え、二次抗体と 4°C にて 30 分反応させた。PBSA にて 1 回洗浄後 PBSA に再浮遊し、レーザーフローサイトメーター、スペクトラム III (Spectrum III, Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, N. J.) を用いて解析した。

2. NK 細胞の算定

ラット NK 細胞は OX19 陰性 OX8 陽性細胞と表現できる²⁰⁾。OX19 陰性 OX8 陽性細胞の比率の求め方を略記する。一次抗体として OX19, OX8 の 2 種類の抗体を用い、間接蛍光抗体法により陽性率を求め、この値から OX19 のみで染色した場合の陽性率を減じた数値を OX19 陰性 OX8 陽性細胞の比率とした。

3. NK 細胞の分離

セル・ソーターのエピックス C (Epics C, Coulter electronics Inc., Hialeah, FL) を用いてラット脾細胞を OX19 陽性細胞 (ヘルパー T 細胞, サブレッサー T 細胞が含まれる), OX19 陰性 OX8 陽性細胞 (NK 細胞がこの分画に含まれる) と OX19 陰性

OX8 陰性細胞 (B細胞が含まれる) に分画した。これらの分画への分離は、上記の間接蛍光抗体法と同様の操作を行ない、蛍光を有する細胞と蛍光を有しない細胞にエピックスCを用いて選別した。まず、OX19 で標識し、OX19 陽性細胞と OX19 陰性細胞に分け、この後 OX19 陰性細胞を OX8 で再度標識して、OX19 陰性 OX8 陽性細胞および OX19 陰性 OX8 陰性細胞に分けた。

VI. NK 活性の測定

1. 測定法

標的細胞として、NK 感受性細胞である YAC-1、NK 非感受性細胞である RINr を用いた。NK 活性測定は 4 時間培養 ^{51}Cr release assay 法にて行なった。各標的細胞 1×10^6 個に $\text{Na } ^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, M. A.) $0.5 \mu\text{Ci}$ を加え、 37°C 、 5% CO_2 下で 1 時間培養し、冷 PBS にて 2 回洗浄後、 10% FCS-RPMI 1640 にて調整した。マクロファージを除去した末梢血リンパ球および脾リンパ球をエフェクター細胞とし、96穴丸穴マイクロプレート (No. 25850) (Corning Glass Works, Corning, N. Y.) に標的細胞と共に 37°C 、 5% CO_2 下で 4 時間培養し、その上清中 ^{51}Cr 放出量をガンマシンチレーションカウンター ARC-501 (アロカ、東京) で測定した。% 傷害能は以下の式で算出した。

$$\% ^{51}\text{Cr release} = \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

Maximum release は 1% トリトン X 0.1ml を標的細胞 0.1ml に添加したときの最大 ^{51}Cr 放出量を示し、Spontaneous release は 10% FCS-RPMI 1640 0.1ml を添加したときの ^{51}Cr 自然放出量とした。各検体は triplicate にて測定した。

2. エフェクター細胞/標的細胞比 (E/T 比) の決定

各 4 匹ずつの BB/K およびウイスターの脾リンパ球を用いて、E/T 比を 10, 20, 40, 80 と変えて比較検討した。

3. NK 活性の週齢別推移

BB/K およびウイスターの脾リンパ球を用いて、2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 週齢以上の NK 活性を比較検討した。

4. リンパ球サブセットの NK 活性

エピックスCにて分離した OX19 陽性細胞、OX19 陰性 OX8 陽性細胞、OX19 陰性 OX8 陰性細胞の 3 分画の細胞をそれぞれエフェクター細胞とし、

YAC-1 を標的細胞として NK 活性を測定した。E/T 比は 2 とした。

VII. Large granular lymphocyte (LGL) の算定

1. LGL の算定

末梢血リンパ球および脾リンパ球を 10% FCS-RPMI 1640 にて調整し、サイトスピン 2 (Cytospin 2, SHANDON, England) を使用して 700rpm、8 分間サイトスピンした。ドライヤーにて冷風乾燥後、メイ・ギムザ (May-Giemsa) 重染色を行ない、強拡大にて鏡検し、200 個の細胞をカウントして LGL の比率を百分率で求めた。

2. LGL 数の週齢別推移

NK 活性の推移と同様に BB/K およびウイスターの脾リンパ球を用い、2~16 週齢以上の LGL 数の推移を比較した。

VIII. RINr に対するキラー活性の測定

アロ (allo-) 抗原反応性キラー細胞²⁰⁾の誘導を目的として、以下の実験を行なった。アロ抗原として RINr (MHC は RT1^s) 5×10^6 個を PBS に浮遊し、8~10 週齢の BB/S, BB/K 並びにウイスターの腹腔内に投与した。投与後 4, 7 日目に屠殺し、マクロファージを除去した末梢血リンパ球および脾リンパ球をエフェクター細胞として、また RINr を標的細胞として ^{51}Cr release assay 法にてキラー活性を測定した。コントロールとして、生食水 0.5ml を腹腔内投与した BB/S, BB/K およびウイスターを用いた。E/T 比は 20 とした。

IX. ラ氏島の免疫組織学的染色

ラ氏島炎の有無と浸潤細胞のサブセットを免疫組織学的染色にて検討した。屠殺後採取した臓臓を O. C. T. コンパウンド (Tissue-Tek, Miles Laboratories Inc., Naperville) に包埋後、 -20°C にて凍結した。その後マイクロトームにて厚さ $4 \sim 6 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製しアセトン固定した。固定後 PBS で洗浄して、二次抗体の非特異的結合を防止する目的で正常ヤギ血清の 3% (V/V) PBS 溶液にて 15~20 分間インキュベートした。その後マウス抗ラットリンパ球単クローン抗体と室温にて 1 時間反応させ、PBS にて洗浄し、次にペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体と 1 時間反応させた。PBS にて洗浄し、3-アミノノ-9-エチルカルバゾール (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee) を N. N-ジメチルホルムアミド (和光純薬、大阪) に溶かした溶液 0.5ml、 0.05M 酢酸緩衝液 (acetate buffer, pH 5.0) 9.5ml、 3% 過酸化水素水 0.05ml を混じた溶液と反応させて発色させた。核

Table 3. Lymphocyte subsets in Wistar, BB/K and BB/S rats

	SPLEEN			Peripheral blood		
	Wistar n=20	BB/K n=15	BB/S n=10	Wistar n=10	BB/K n=10	BB/S n=5
Ly. No. (/mm ³)	—	—	—	9200±1300	2300±900**	2900±400**
W3/13 (%)	69.3±13.9	47.4±9.7	54.1±9.8	72.3±12.6	55.1±7.3	48.7±13.4
OX 19 (%)	62.6±12.1	21.5±7.7**	28.1±5.7**	49.5±16.4	5.3±13.9**	4.7±2.0**
OX 8 (%)	38.6±9.4	24.0±5.4**	15.6±4.7**	27.5±7.0	19.1±8.8*	10.2±1.1**
W3/25 (%)	35.1±6.3	20.6±2.7**	31.3±8.5	33.8±19.3	4.8±3.8**	4.5±1.1**
OX 6 (%)	21.0±11.2	41.7±3.9**	40.6±11.7**	22.3±6.0	34.5±5.7**	42.3±9.4**
OX 12 (%)	20.6±11.6	38.9±7.4**	27.9±9.5	17.7±12.3	43.8±11.4**	25.3±13.0
OX19 ⁻ OX8 ⁺ (%)	12.7±4.5	26.5±5.0**	14.6±7.0	10.1±3.8	18.0±8.8	9.9±5.8

Data are shown as mean±SD. *p<0.05 and **p<0.01 vs. Wistar rats.

染色はカラチ・ヘマトキシリンにて行なった。染色標本をグリセロール封入し、100倍～400倍にて鏡検し、細胞浸潤および浸潤細胞のサブセットを検討した。

X. 糖尿病の判定

糖尿病発症の有無を以下のごとく調べた。生後8週齢より週2回 BB/S および BB/K の随時尿をテストテープにて検尿し、尿糖 2+以上を3回以上つづけて認めるものを糖尿病発症ラットとした。

XI. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値±標準偏差 (n) で示した。平均値の検定には二群の場合には Student の t 検定を、三群では分散分析後、Duncan による多重比較法を行なった。危険率 p<0.05 を有意とした。

成 績

I. 末梢血リンパ球数並びに末梢血、脾リンパ球サブセット

末梢血リンパ球数は BB/S, BB/K ともウイスターに比し著減していた (表3)。

末梢血および脾臓のリンパ球サブセットに関しては、T細胞系の表面マーカーである W3/13, OX19, OX8, W3/25 を有するリンパ球は相対的な比率において BB/S, BB/K の各ラットでウイスターに比べ著しく低下しており、また末梢血ではリンパ球数と考え合わせればT細胞の絶対数も著減していた。また脾臓でもT細胞の絶対的減少がみられた (未発表データ)。一方、B細胞系のマーカーである OX6, OX12 を有するリンパ球は BB/S, BB/K で相対的な比率において増加していた。2 亜系の BB ラットでの末梢血におけるB細胞数は、ウイスターが 1700/mm³であるのに比し BB/S では 750/mm³,

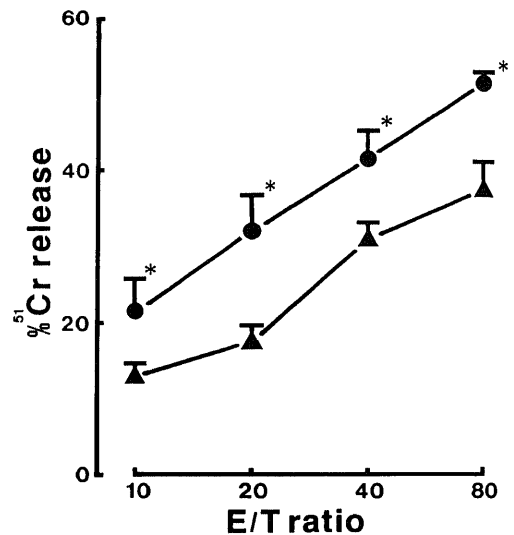


Fig.1. NK activity of macrophage-depleted spleen lymphocytes as a function of E/T ratio. Data are shown as mean±SD. ●, BB/K rats (n=4); ▲, Wistar rats (n=4). *p<0.05 vs. Wistar rats.

BB/K では1000/mm³と少ないものの、T細胞数ほどの減少は認められなかった。このことから BB ラットではT細胞を中心としたリンパ球減少症が存在するといえる。

BB ラットとウイスターのリンパ球サブセットの差を以下に列挙する。i) T細胞のマーカーである W3/13 と OX19 の陽性細胞の比率に著しい解離が認められる。ii) OX19 陽性細胞と W3/25 陽性細胞の比率は近似する。iii) OX8 陽性細胞の比率は OX19 陰性 OX8 陽性細胞の比率と近似する。iv) ii) と iii) より BB ラットにおいてはヘルパーT細胞

胞 (OX19 陽性 W3/25 陽性細胞) が著減はしているが存在する一方、サプレッサーT細胞 (OX19 陽性 OX8 陽性細胞) はほとんど存在しない。v) OX8 陽性細胞はほとんど NK 細胞 (OX19 陰性 OX8 陽性細胞) である。

BB/S, BB/K 間に認められる差異について述べる

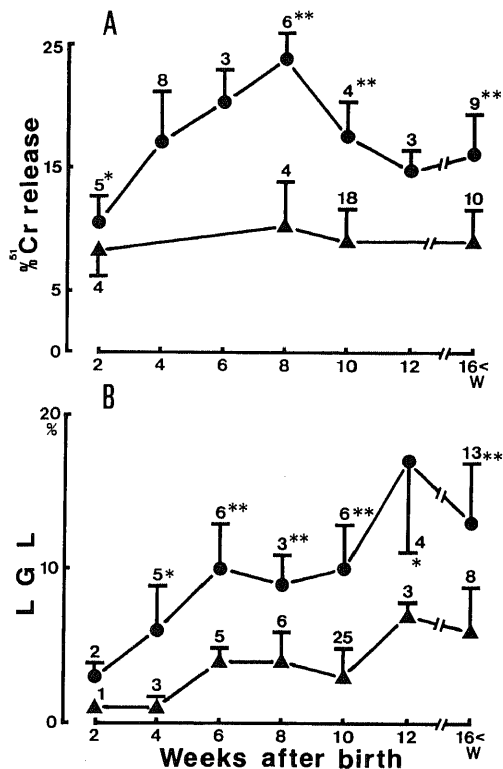


Fig. 2. NK activity (A) and large granular lymphocytes (B) as a function of age. Data are shown as mean \pm SD. ●, BB/K rats; ▲, Wistar rats. Numerals besides bars indicate the experimental numbers. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. age-matched Wistar rats.

と、i) OX19 陰性 OX8 陽性細胞が BB/K において増加しており、BB/S ではウイスターとほぼ同率であった点、ii) BB/S では OX6 陽性細胞が OX12 陽性細胞に比べ増加しており、解離がみられたが、BB/K ではみられなかった点が挙げられる。

II. NK 活性の E/T 比の決定

10~80のどの E/T 比でも、BB/K がウイスターに比べ有意に高いことより (図 1)、以下の実験は特別

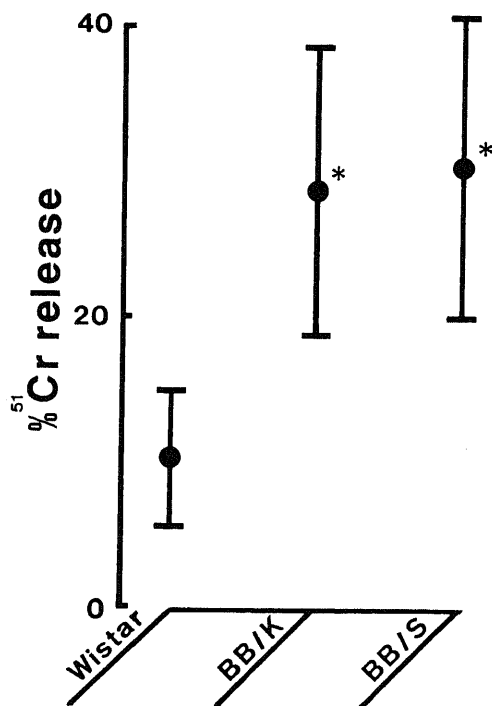


Fig. 3. NK activity of macrophage-depleted spleen lymphocytes in Wistar (n=8), BB/K (n=18), and BB/S (n=9) rats. Data are shown as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Wistar rats.

Table 4. LGLs and NK activity in macrophage-depleted spleen lymphocyte subsets

	BB		Wistar	
	LGLs	NK(E/T)	LGLs	NK(E/T)
Unfractionated	19%	20.0% (20)	4%	7.9% (20)
OX19 ⁺	3	1.3 (2)	2	4.4 (2)
OX19 ⁻ OX8 ⁺	68	41.9 (2)	48	25.6 (2)
OX19 ⁻ OX8 ⁻	13	6.8 (2)	4	8.0 (2)

OX19⁺ means OX19⁺ cells which include helper T cells and suppressor T cells, OX19⁻OX8⁺ cells are NK cells and OX19⁻OX8⁻ cells are B cells.

の場合を除いて全て E/T 比を20とした。

III. NK 活性と LGL 数の時間的推移

脾臓における NK 活性は BB/K がどの週齢でもウイスターに比べ高値を示したが (図 2), 特に 8~10週齢で有意に差が大きかったため, 以下の実験は 8~10週齢のラットを使用した。なお, LGL 数は 2週齢を除き BB/K がウイスターに比し常に有意に高値を示した。

IV. 脾臓の OX19 陽性細胞, OX19 陰性 OX8 陽性細胞および OX19 陰性 OX8 陰性細胞の各分画における NK 活性

脾リンパ球よりソーティングした各分画での LGL は BB/K, ウイスターとも OX19 陰性 OX8 陽性細胞分画にほとんど含まれていた (表 4)。また NK 活性も OX19 陰性 OX8 陽性細胞分画が他の分画に比し著明に上昇していた。

この結果は LGL が NK 細胞であることを証明していると推察できた。

V. 末梢血および脾臓における NK 活性

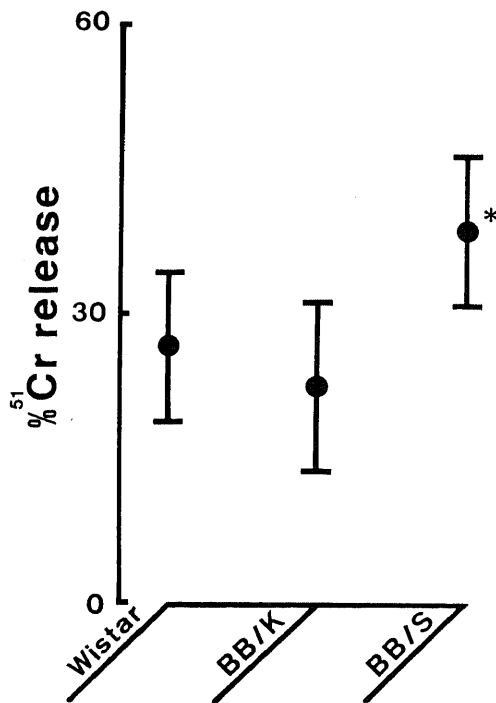


Fig. 4. NK activity of macrophage-depleted peripheral blood lymphocytes in Wistar (n=8), BB/K (n=9), and BB/S (n=4) rats. Data are shown as mean \pm SD. *p < 0.05 vs. Wistar and BB/K rats.

1. 脾臓における NK 活性

BB/S が $30.2 \pm 10.2\%$ (n=9), BB/K が $28.5 \pm 10.1\%$ (n=18), ウイスターが $10.4 \pm 4.6\%$ (n=8) で, BB/S, BB/K がウイスターに比し有意に高値を示した (図 3)。

2. 末梢血における NK 活性

BB/S が $38.6 \pm 7.8\%$ (n=4), BB/K が $22.7 \pm 9.1\%$ (n=9), ウイスターが $26.7 \pm 8.2\%$ (n=8) で, BB/S が BB/K, ウイスターに比し有意に高値を示した (図 4)。BB/K とウイスター間には差がなかった。

3. NK 活性/LGL 比

NK 活性 (%) を LGL (%) で除して比較してみた (図 5)。末梢血では, BB/S が 6.2 ± 2.7 (n=3), BB/K が 0.8 ± 0.5 (n=10), ウイスターが 0.9 ± 0.4 (n=10) で, BB/S が他の二者に比し有意に高かった。

脾臓では, BB/S が 1.9 ± 0.4 (n=3), BB/K が 1.6 ± 0.6 (n=10), ウイスターが 1.6 ± 0.9 (n=10) と三者間に差が認められなかった。

VI. RINr に対するキラー活性

in vivo での RINr に対するキラー活性の経時的変化を比較検討した (図 6)。

末梢血では, RINr 投与前, BB/S が $11.0 \pm 3.9\%$ (n=3), BB/K が $7.8 \pm 2.2\%$ (n=10), ウイスターが $9.5 \pm 3.3\%$ (n=10) と BB/S でやや高値を示した。投与後 4 日目, 7 日目はそれぞれ BB/S が $17.7 \pm 5.4\%$ (n=3), $29.4 \pm 18.0\%$ (n=3) で, BB/K は $14.3 \pm 6.7\%$ (n=10), $20.9 \pm 7.9\%$ (n=10), ウイスターは $7.5 \pm 2.5\%$ (n=10), $11.6 \pm 5.9\%$ (n=10) という結果を得た。BB/S, BB/K は漸増し, キラー活性の増強反応がみられた。特に BB/S では 3 例中 2 例の 7 日目のキラー活性が 39.0%, 45.1% と顕著な増強反応を示したが, 他の 1 例は 4.1% と増強がみられなかった。

脾臓では, BB/S 5 例, BB/K 10 例およびウイスター 10 例を対象にしたが, RINr 投与前後の反応は三者とも無反応で, 有意差はなかった。

VII. ラ氏島炎および糖尿病発症率

免疫組織学的染色にてラ氏島炎を検討した結果, BB/S では 12 例中 11 例に Ia 陽性細胞の浸潤をみた (表 5, 図 7)。しかし, W3/13, OX8 および W3/25 陽性細胞の浸潤はみられなかった。一方, BB/K では 25 例全例陰性であった。

次に, 糖尿病は BB/S が 12 例中 4 例が発症していたが, BB/K は未発症だった。

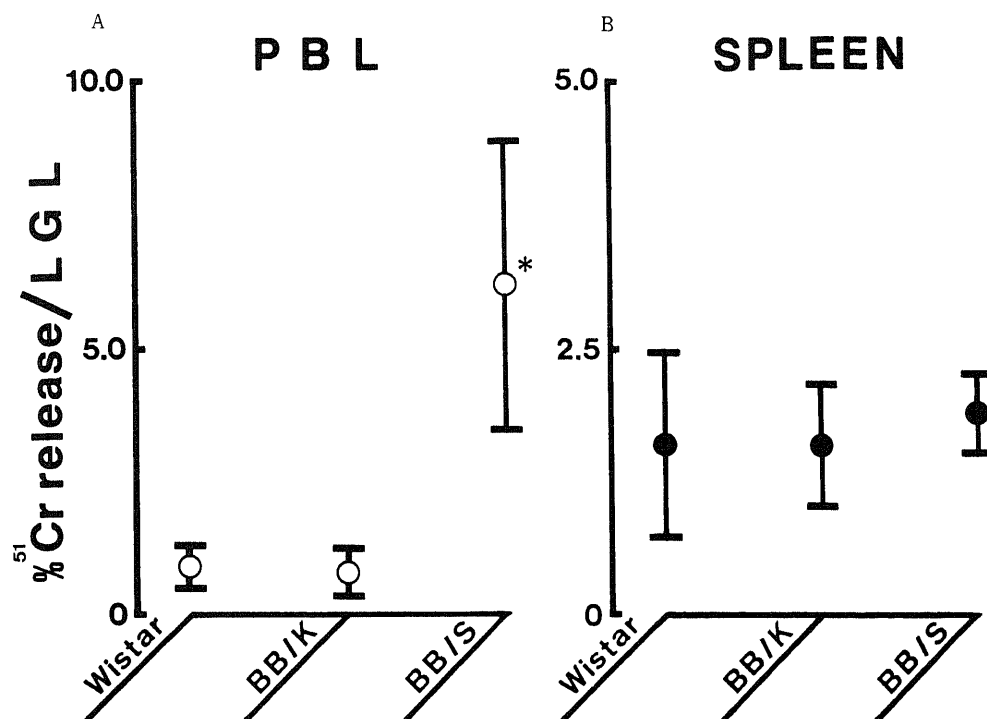


Fig.5. Relative NK activity to peripheral blood lymphocytes (A) and spleen lymphocytes (B). The ratio is calculated by dividing NK activity (%) by the percentage of LGLs in macrophage-depleted lymphocytes. Data are shown as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Wistar and BB/K rats.

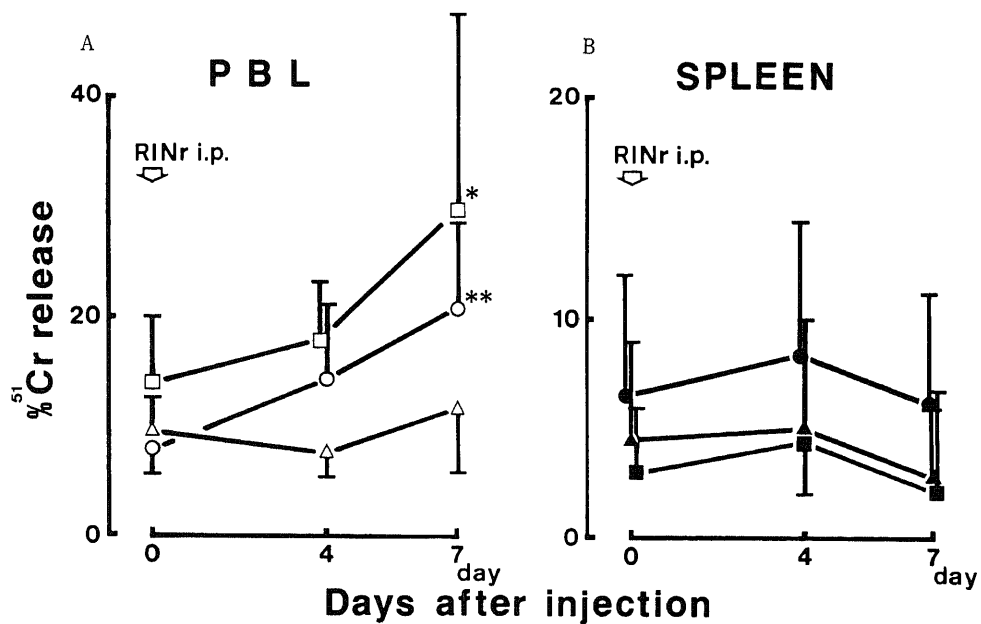


Fig.6. Time course of RINr-directed cytotoxic activity of macrophage-depleted peripheral blood lymphocytes (A) and spleen lymphocytes (B) after i.p. injection of RINr (5×10^5 cells). ■ and □, BB/S; ● and ○, BB/K; ▲ and △, Wistar rats. Data are shown as mean \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Wistar rats (day 7).

Table 5. Frequency of Insulinitis and DM in BB/K and BB/S rats

	Insulinitis	DM
BB/K (n=25)	<1%	<1%
BB/S (n=12)	90%	33%

考 察

BB ラットは糖尿病発症ラットとして知られているが、全てが発症するわけではなく、中には糖尿病抵抗性 (diabetes resistant, DR) ラットもあり、糖尿病易発症性 (diabetes prone, DP) ラットと区別してい

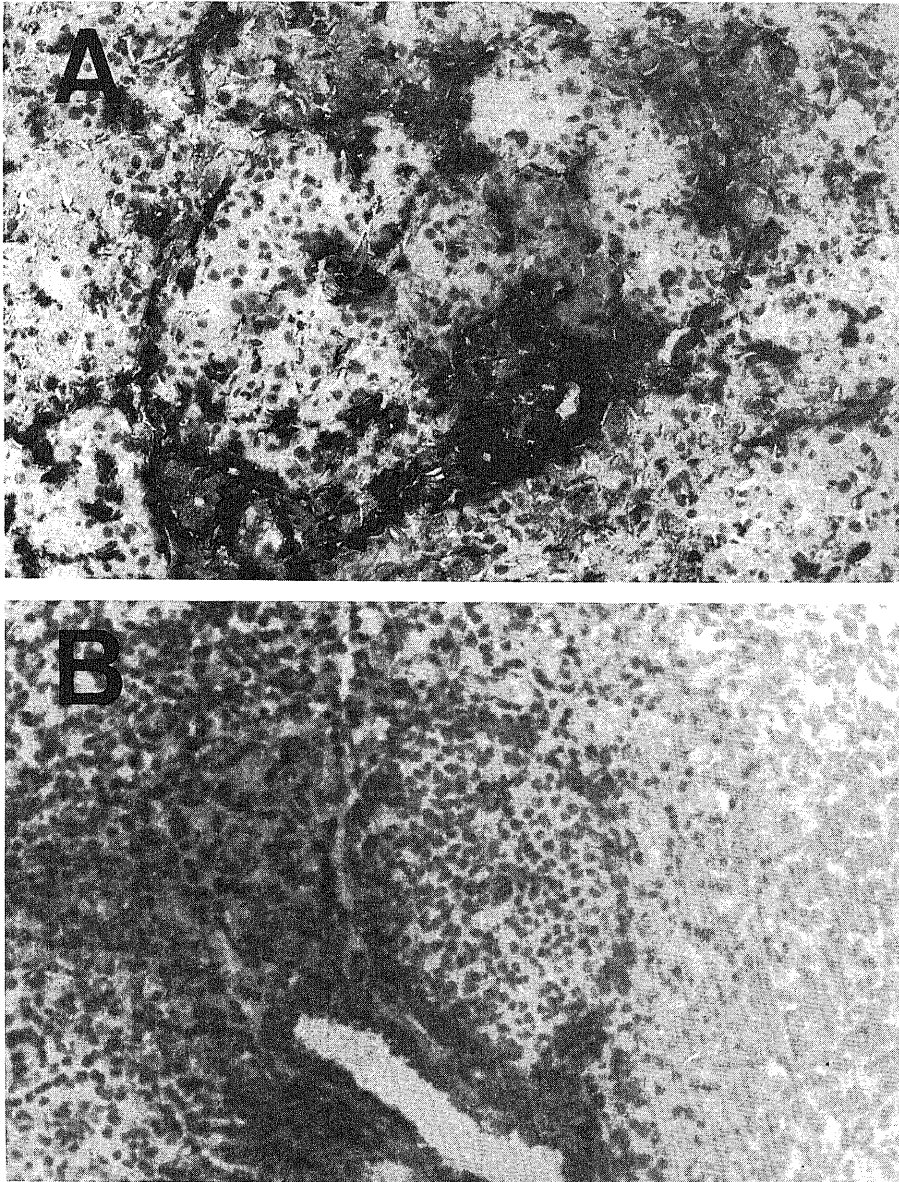


Fig. 7. Immunohistological findings. (A), BB/S rat. Dark stained area in the right-lower part of islet indicates the infiltration of lymphocytes (insulinitis). The infiltrating cells are Ia positive lymphocytes. (B), Wistar rat. No infiltration of lymphocytes is demonstrated.

る²⁸⁾。著者は BB/W 由来の BB/S を DP モデルとして、BB(original) 由来の BB/K を DR モデルとして用いた。

BB/S、BB/K の性質を列挙すると、共通点は i) リンパ球減少症の存在、ii) サプレッサー T 細胞の欠如、iii) 脾臓における NK 活性亢進、iv) RINr 投与後の RINr に対するキラー活性の増強反応の 4 点がある。一方、相違点として i) BB/S の末梢血における NK 活性亢進 ii) BB/S 末梢血、脾臓での OX6 陽性細胞と OX12 陽性細胞の解離 iii) BB/S では Ia 陽性細胞浸潤を伴ったラ氏島炎の存在と糖尿病発症がみられるが、BB/K ではラ氏島炎、糖尿病とも未発症である点の 3 点が挙げられる。

Woda らは DR が OX19 陽性 OX8 陽性細胞 (サプレッサー T 細胞) を有しており、脾臓における NK 活性も DP に比べ低いと述べ、サプレッサー T 細胞の存在と脾臓における NK 活性の差が糖尿病発症に関与していると報告しているが²⁹⁾、DR モデルとして著者が使用した BB/K では脾臓における NK 活性は BB/S と同等であり、脾臓における NK 活性亢進のみでは糖尿病発症は説明できないように思われる。ただし BB/K はサプレッサー T 細胞が欠如しており、この細胞の有無が著者と彼らの結果の差に関係しているかもしれない。

脾臓、リンパ節のリンパ球に比べ、末梢血リンパ球はより直接的に脾組織と影響し合っているはずである。そこで末梢血リンパ球のキラー活性を検討した。BB/S は BB/K に比し末梢血における NK 活性が高く、しかも末梢血における NK 活性/LGL 比の高値で示されるように、個々の末梢血の NK 細胞がもつ NK 活性も亢進しており、末梢血の NK 細胞は活性化された状態にあると思われる。

また BB/S では OX6 陽性細胞と OX12 陽性細胞の解離があり、これも T 細胞の活性化 (Ia 陽性 T 細胞の存在) を示唆する所見と推察される。Francfort らの報告²⁹⁾でも前糖尿病状態にある BB ラットの末梢血中 Ia 陽性 T 細胞の増加を指摘しており、BB/S の末梢血中ヘルパー T 細胞および NK 細胞が共に活性化されていると考えられる。

最近、NK 細胞が糖尿病の発症に関与しているとの報告が散見される²⁹⁾³⁰⁾。またラ氏島への攻撃が MHC 非依存性におこるとの報告もある³¹⁾。一方、著者のデータでは RINr 投与前には BB ラットの末梢血リンパ球は RINr に対してキラー活性をあまり有していないが、RINr 投与後には BB/S において 3 例中 2 例で RINr に対する著明なキラー活性の増強

反応を認め、BB/K においても BB/S に比べるとやや劣るものの、RINr に対するキラー活性の増強を認めた。この事実から、RINr 刺激により BB ラットの末梢血における NK 細胞のもつ傷害スペクトルが拡大したため、NK 非感受性細胞である RINr も傷害されたと推定される。BB/S の 1 例で RINr に対するキラー活性の増強がみられなかったが、これは BB ラットの糖尿病発症期間に 60~120 日と幅があり、本例は 8~10 週齢では前糖尿病状態に達していなかったためと推定される。

以上より、DP の末梢血における NK 細胞の活性化の増大のみならず、傷害スペクトルの拡大を誘発する因子が存在し、RINr を攻撃したと同様に脾 β 細胞を攻撃し、脾 β 細胞の破壊がおこるものと思われる。

BB/S、BB/K でみられる RINr 投与後の末梢血における NK 細胞の傷害スペクトルの拡大は、ウイスターではみられず BB ラットに特異的と考えられる。また、皮膚移植片拒絶反応の遅延が BB ラットに存在することを考え併せると、BB ラットには細胞性免疫不全があるが RINr を含めた脾 β 細胞に対して免疫異常反応がおこり、末梢血における NK 細胞の傷害スペクトルの拡大が誘発されると考えられる。

BB ラットになぜ脾 β 細胞に対する免疫異常反応が存在するのかは現在のところ不明である。しかし、NK 細胞の傷害スペクトルの拡大誘発にはインターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) が関与していると思われる。Pukel らは低濃度の IL-2 を用いて DP の脾 NK 細胞を *in vitro* で培養刺激したところ、脾 NK 細胞の脾 β 細胞に対する傷害能が増強されたと述べ³²⁾、Kolb らは IL-2 を DP 腹腔内に投与した結果、糖尿病発症率が増加したと述べており、糖尿病発症が IL-2 の局所での一過性上昇に伴う免疫反応の賦活化によると考えている³³⁾。

BB/S のラ氏島には Ia 陽性細胞の浸潤がみられただけであったが、Dean らは Ia 陽性ヘルパー T 細胞 (活性化ヘルパー T 細胞) のラ氏島浸潤を報告した³⁴⁾。また Francfort らは活性化ヘルパー T 細胞の浸潤は、糖尿病発症より 3 週ほど前から始まっているとしている³⁰⁾。さらに Prud'homme らはラ氏島と BB ラットの脾細胞を混合培養後、ラ氏島周囲に活性化ヘルパー T 細胞の増殖と IL-2 産生がみられたと述べている³⁵⁾。また、ヘルパー T 細胞を主に抑制するサイクロスポリン A の投与により糖尿病の発症予防が可能であるとの報告もあり^{13)~15)}、末梢血における NK 細胞の傷害スペクトル拡大に必要と思われる IL-2 の供給を活性化ヘルパー T 細胞が担っていると推定で

きる。

以上より、BB/Sを含めたDPでは膵β細胞に対する免疫異常反応が糖尿病の発症3週以上前より始まり、この結果、活性化ヘルパーT細胞がラ氏島に浸潤し、ラ氏島炎をおこして局所的にIL-2を産生し、末梢血中の活性化された状態にあるNK細胞の傷害スペクトルをさらに拡大して膵β細胞の破壊が生じ、この過程が増幅されて最終的に糖尿病を発症するものと思われる。

DPの末梢血におけるNK細胞および末梢血、脾臓のヘルパーT細胞の活性化のメカニズムは不明であり、今後解明してゆかねばならない点であろう。

結 論

著者はBB(original)由来で糖尿病発症率が1%以下のDRモデルと思われるBB/Kと、BB/W由来で糖尿病発症率が33%のDPモデルと考えられるBB/Sを用いて比較検討し、以下の結果を得た。

1. BB/S, BB/Kともリンパ球減少症, サプレッサーT細胞の欠如, 脾臓におけるNK活性亢進を認めた。

2. BB/Sは90%の症例にラ氏島炎がみられ, Ia陽性細胞が浸潤していた。一方, BB/Kではラ氏島炎を認めなかった。

3. BB/SはBB/Kに比し末梢血におけるNK活性が亢進しており, さらに末梢血におけるNK活性/LGL比も6倍近く亢進していた。このことはBB/Sの末梢血中NK細胞が活性化された状態にあることを示唆した。

4. BB/Sでは末梢血および脾臓ともOX6陽性細胞とOX12陽性細胞の比率に解離がみられ, Ia陽性T細胞の増加がみられた。

5. BB/S, BB/KともRINr投与後にRINrに対する末梢血中リンパ球のもつキラー活性の増強がみられ, 特にBB/Sで著明であった。

以上より, 糖尿病の発症にはRINrを含めた膵β細胞に対する免疫異常反応に加えて, 末梢血におけるNK細胞およびT細胞の活性化亢進が関与していると推察される。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝致します。また終始直接御指導, 御鞭撻を頂いた佐藤保助教授, 鈴木祐吉講師はじめ小児科内分泌グループ諸兄, 並びに教室員の皆様に感謝します。

文 献

- 1) Bottazzo, G. F., Dean, B. M., Nally, J. M. & Mackay, E. H.: Direct evidence of various immunological phenomena associated with the 'Insulinitis' process. *Diabetologia*, **25**(Abstract), 142 (1983).
- 2) Lernmark, A., Freedman, Z. R., Hofman, C., Rubenstein, A. H., Steiner, D. F., Jackson, R. L., Winter, R. J. & Traisman, H. S.: Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 375-380 (1978).
- 3) 初野義博: Insulinitisを伴い急性発症する新しいヤセ型糖尿マウス。最新医学, **34**, 1183-1188 (1979).
- 4) Nakhoda, A. F., Like, A. A., Chapel, C. I., Murray, F. T. & Marliss, E. B.: The spontaneously diabetic wistar rat. *Diabetes*, **26**, 100-112 (1976).
- 5) Jackson, R., Rassi, N., Crump, T., Haynes, B. & Eisenbarth, G. S.: The BB diabetic rat. Profound T-cell lymphocytopenia. *Diabetes*, **30**, 887-889 (1981).
- 6) Rossini, A. A., Mordes, J. P., Pelletier, A. M. & Like, A. A.: Transfusions of whole blood prevent spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science*, **219**, 975-977 (1983).
- 7) Elder, M. E. & Maclaren, N. K.: Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. *J. Immunol.*, **130**, 1723-1731 (1983).
- 8) Like, A. A., Appel, M. C. & Rossini, A. A.: Autoantibodies in the BB/W rat. *Diabetes*, **31**, 816-820 (1982).
- 9) Seemayer, T. A., Tannenbaum, G. S., Goldman, H. & Colle, E.: Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB wistar rat. III. Light-microscopic and ultrastructural observations of pancreatic islets of Langerhans. *Am. J. Pathol.*, **106**, 237-249 (1982).
- 10) Like, A. A., Kislauskis, E., Williams, R. M. & Rossini, A. A.: Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science*, **216**, 644-646 (1982).
- 11) Scott, J., Engelhard, V. H., Curnow, R. T. & Benjamin, D. C.: Prevention of diabetes in BB rats. I. Evidence suggesting a requirement for

- mature T cells in bone marrow inoculum of neonatally injected rats. *Diabetes*, **35**, 1034-1040 (1986).
- 12) Like, A. A., Rossini, A. A., Guberski, D. L. & Appel, M. C.: Spontaneous diabetes mellitus reversal and prevention in the BB/W rat with antiserum to rat lymphocytes. *Science*, **206**, 1421-1423 (1979).
- 13) Like, A. A., Anthony, M., Guberski, D. J. & Rossini, A. A.: Spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. Effects of glucocorticoids, cyclosporin-A, and antiserum to rat lymphocytes. *Diabetes*, **32**, 326-330 (1983).
- 14) Laupacis, A., Stiller, C. R., Gardell, C., Keown, P., Dupre, J., Wallace, A. C. & Thibert, P.: Cyclosporin prevents diabetes in BB wistar rats. *Lancet*, **1**, 10-12 (1983).
- 15) Stiller, C. R., Laupacis, A., Keown, P. A., Gardell, C., Dupre, J., Thibert, P. & Wall, W.: Cyclosporine: action, pharmacokinetics, and effect in the BB rat model. *Metabolism*, **32** (Suppl), 69-72 (1983).
- 16) Nakhoda, A. F., Sima, A. A. F., Poussier, P. & Marliss, E. B.: Passive transfer of insulinitis from the "BB" rat to the nude mouse. *Endocrinology*, **109**, 2264-2266 (1981).
- 17) Koevary, S., Williams, R. M., Stoller, W. & Chick, W.: Passive transfer of diabetes in BB/W and Wistar Furth rats. *Diabetes*, **32** (Abstract), 50A (1983).
- 18) Reynolds, C. W., Sharrow, S. O., Ortaldo, J. R. & Herberman, R. B.: Natural killer activity in the rat. II. Analysis of surface antigens on LGL by flow cytometry. *J. Immunol.*, **127**, 2204-2208 (1981).
- 19) Woda, B. A., McFadden, M. L., Welsh, R. M. & Bain, K. M.: Separation and isolation of rat natural killer (NK) cells from T cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **132**, 2183-2184 (1984).
- 20) Like, A. A., Biron, C. A., Weringer, E. J., Byman, K., Sroczynski, E. & Guberski, D. L.: Prevention of diabetes in Biobreeding/Worcester rats with monoclonal anti-bodies that recognize T lymphocytes or natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **164**, 1145-1159 (1986).
- 21) 名取 孝, 御園生潤, 相沢 幹, 河津捷二, 米田嘉重郎: ヒトインシュリン依存性糖尿病のモデル動物の MHC と糖尿病発症遺伝子の解析—BB ラットについて. *臨床免疫*, **19**, 755-762 (1987).
- 22) 河津捷二, 鈴木将夫, 根岸清彦, 渡辺敏郎, 外間朝哲, 原 義人, 片山茂裕, 石井 淳, 米田嘉重郎: 1型糖尿病の自己免疫発症病理—BBラットにおける新知見を中心として. *医学のあゆみ*, **137**, 75-82 (1986).
- 23) Bellgrau, D., Naji, A., Silvers, W. K., Markmann, J. F. & Barker, C. F.: Spontaneous diabetes in BB rats: evidence for a T cell dependent immune response defect. *Diabetologia*, **23**, 359-364 (1982).
- 24) Gazdar, A. F., Chick, W. L., Oie, H. K., Sims, H. L., King, D. L., Weir, G. C. & Lauris, V.: Continuous, clonal, insulin-and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3519-3523 (1980).
- 25) Reynolds, C. R., Timonen, T. & Herberman, R. B.: Natural killer (NK) cell activity in the rat. I. Isolation and characterization of the effector cell. *J. Immunol.*, **127**, 282-287 (1981).
- 26) 野本亀久雄: アロ反応性キラーT細胞の生成とエフェクター機序. *臨床免疫*, **18**, 85-91 (1986).
- 27) Tsuru, S., Aiso, S., Taniguchi, M., Zinnaka, Y. & Nomoto, K.: Mechanisms of *in vivo* generation of cytotoxic activity against syngeneic tumours. I. Local differentiation of mature cytotoxic T lymphocytes in the rejection of tumours. *Immunology*, **54**, 281-288 (1981).
- 28) Woda, B. A., Like, A. A., Padden, C. & McFadden, M. L.: Deficiency of phenotypic cytotoxic-suppressor T lymphocytes in the BB/W rat. *J. Immunol.*, **136**, 856-859 (1986).
- 29) Francfort, J. W., Naji, A., Silvers, W. K., Tomaszewski, J., Woehrl, M. & Barker, C. F.: Immunologic studies of the prediabetic stage in the spontaneous autoimmune diabetes Transplantation, **40**, 698-701 (1985).
- 30) Mackay, P., Jacobson, J. & Rabinovitch, A.: Spontaneous diabetes mellitus in the Bio-Breeding/Worcester rat. Evidence *in vitro* for natural killer cell lysis of islet cells. *J. Clin. Invest.*, **77**, 916-924 (1986).

- 31) **Weringer, E. J. & Like, A. A.** : Diabetes mellitus in the BB/W rat. Insulinitis in pancreatic islet grafts after transplantation in diabetic recipients. *Am. J. Pathol.*, **125**, 107-112 (1986).
- 32) **Pukel, C., Baquerizo, H. & Rabinovitch, A.** : Interleukin 2 activates BB/W diabetic rat lymphoid cells cytotoxic to islet cells. *Diabetes*, **36**, 1217-1222 (1987).
- 33) **Kolb, H., Zielasek, J., Treichel, U., Freytag, G., Wrann, M. & Kiesel, U.** : Recombinant interleukin 2 enhances spontaneous insulin-dependent diabetes in BB rats. *Eur. J. Immunol.*, **16**, 209-212 (1986).
- 34) **Dean, B. M., Walker, R., Bone, A. J., Baird, J. D. & Cooke, A.** : Pre-diabetes in the spontaneously diabetic BB/E rat: lymphocyte subpopulations in the pancreatic infiltrate and expression of rat MHC class II molecules in endocrine cells. *Diabetologia*, **28**, 464-466 (1985).
- 35) **Prud'homme, G. J., Colle, E., Fuks, A., Goldner-Sauve, A. & Guttman, R. D.** : Cellular immune abnormalities and autoreactive T lymphocytes in insulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Immunology Today*, **6**, 160-162 (1985).

Triggering Factors for the Occurrence of Insulinitis in the BB Rat : Increased Natural Killer Activity and Induction of the Cytolytic Activity against RINr (Rat Insulinoma Cell Line) Cells Hiroaki Maruyama, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **97**, 290—302 (1988)

Key words : BB rat, natural killer (NK) activity, RINr, insulinitis, diabetes mellitus

Abstract

The BB rat is an available animal model for human type I diabetes. Two lines of BB rats were used in this study which aimed to clarify the relationship between cellular immune abnormality and the occurrence of insulinitis and diabetes. BB/Saitama-Tokyo rats (BB/S) derived from BB/W rats are lymphocytopenic and diabetes prone. BB/Kanazawa rats (BB/K) derived from BB (original) rats are lymphocytopenic but diabetes resistant. Using these rats aged 8-10 weeks and age-matched Wistar rats (W), macrophage-depleted peripheral blood lymphocytes (PBL) and splenocytes (SL) were prepared for the analysis of subsets, NK activity and killer activity against RINr (rat insulinoma cell line) cells. The presence or absence of insulinitis in each rat was evaluated immuno-histologically. Profound T lymphocytopenia, especially suppressor T cell deficiency, and the relative increase of B cells were noted in BB rats. In BB/S, moreover, a discrepancy existed between OX 6⁺ cells and OX 12⁺ cells; numbers of the OX 6⁺ population overwhelmed numbers of the OX 12⁺ population, suggesting the presence of activated T cells in BB/S. NK activity of the SL in BB/S (30.2%) and BB/K (28.5%) was significantly higher than that in W (10.4%). Regarding NK activity of PBL, only BB/S showed increased activity (38.6%) as compared to BB/K (22.7%) and W (26.7%). Furthermore, BB/S PBL had a high NK/LGL ratio, suggesting that the NK cells were activated. The augmentation of the killer activity against the RINr cell after its i.p. injection was found only in the PBL of both BB/S (from 11.6% to 29.4%) and BB/K (from 7.8% to 20.9%). Insulinitis was recognized only in BB/S and its frequency was 90%. Abnormal cellular immune response against islet β cells commonly existed in the BB rat, but it is not a single factor which triggers insulinitis. In cooperation with this abnormal response to islet β cells, increased NK activity of PBL and/or activated NK cells are supposed to play an important role in the occurrence of insulinitis, the first step of the diabetic process.