

# 博士學位論文

NOD マウスにおける Th1 サイトカインおよび  
Th2 サイトカイン産生能と糖尿病発症との関係

平成 10 年 12 月

近畿大学大学院医学研究科  
内科学系専攻(指導:青木矩彦教授)

山 内 孝 哲

# NOD マウスにおける Th 1 サイトカインおよび Th 2 サイトカイン産生能と糖尿病発症との関係

近畿大学医学部第2内科学教室

山内 孝哲, 大野 恭裕, 今村 稔

(指導: 青木 矩彦 教授)

Relation between Th 1 / Th 2 cytokines production and  
development of diabetes mellitus in NOD mice

Takaaki Yamauchi, Yasuhiro Ohno, Minoru Imamura

Second Department of Internal Medicine,

Kinki University School of Medicine

(Director : Prof. Norihiko Aoki)

## 抄 録

ヒトの1型糖尿病のモデルであるNODマウスにおいては糖尿病発症に性差があり、過去のデータが示すようにcyclophosphamide (CY)が糖尿病発症を促進する。CY投与雌雄NODマウスにおける糖尿病発症とTh1サイトカインであるIL-2, IFN- $\gamma$ およびTh2サイトカインであるIL-4, IL-10産生能との関係を検討した。その結果、NODマウスではCY処理により上記4種サイトカインはいずれも産生能の増加を認めたが、その産生パターンには差があり、Th2/Th1サイトカイン比の不均衡を生じた。CY投与雌NODマウスでは投与1週後よりも2週後にIL-2 (Th1サイトカイン)の産生能増加を示した。CY投与2週後の観察では、saline投与群と比較してIL-10/IL-2比の有意な低下を認め、糖尿病発症をみた。本実験により、CYが雌NODマウスのTh1サイトカインとTh2サイトカインの不均衡を生じ、そのことが糖尿病発症を促進する一因となる可能性が示唆された。

Key words : NOD mice, T-lymphocyte, cytokine, interleukin 2, interleukin 4, interleukin 10, interferon  $\gamma$ , type 1 DM, cyclophosphamide

## 緒 言

ヒトの1型糖尿病（インスリン依存型糖尿病，IDDM）は，現在自己免疫疾患としてとらえられており，その機序にはサイトカインを含めて多様な免疫学的因子の関与がある<sup>1, 2</sup>。

Non-obese diabetic (NOD) マウスは塩野義製薬油日ラボラトリーズにおいてICRマウスより分離・近交系化された糖尿病好発系マウスであり，ラ氏島炎（insulinitis）が認められること，islet cell cytoplasmic antibody (ICA), insulin autoantibody (IAA), islet cell surface antibody (ICSA), などの自己抗体が検出されることより，ヒト・インスリン依存型糖尿病のモデル動物として広く実験に使用されており<sup>3-8</sup>，その糖尿病発症機序については様々な報告がなされている。

NODマウスの糖尿病発症は，T細胞を中心とするリンパ球のラ氏島内浸潤（ラ氏島炎）とそれに引き続いて起こる膵β細胞破壊によって生じる。ラ氏島炎は性差はあるが，雌雄とも約4週齢で生じ，10週齢頃にはほぼ全例に観察される。しかし雌のNODマウスが高率に糖尿病を発症する（30-40週齢までの累積発症率は約80%）のに対して，雄のNODマウスにおいては低率（20%前後）である。そのことからNODマウスの糖尿病発症にはラ氏島炎が基本病変であるが，それ以外にも関与する因子のある事が想像できる。

最近の知見として，NODマウスの糖尿病発症にはヘルパーT細胞が関与しておりヘルパーT細胞にはT-helper type 1 (Th 1) とT-helper type 2 (Th 2) の2つが存在し，それぞれ異なるサイトカインを分泌することが確立している<sup>9</sup>。しかしNODに関する従来データでは十分な説明ではなく，これらのサイトカインのNODマウスの糖尿病における役割はいまだ明確な結論に達していない。

一方，cyclophosphamide (CY) の単回投与後8-10日で破壊的ラ氏島炎を生じ，NODマウスの糖尿病発症を促進する作用があることが知られている<sup>10-16</sup>。

糖尿病未発症の15週齢のNODマウスにCYを投与し糖尿病発症を促進させる系において，CY投与前，投与1週後，2週後と経時的観察を行って，Th 1 サイトカインおよびTh 2 サイトカインの産生能と糖尿病発症の関係を検討した。

## 方 法

### 対象

8週齢の雌雄NODマウスと8週齢の雌ICRマウスは日本クレア株式会社より購入した。ICRマウスはNODマウスと起源を同じくし，糖尿病を発症しないマウスであるため正常対照とした。両マウスの飼育は一定の温度（23±1.0℃），湿度（50±5%），光（12時間周期）の条件で行い，飼料は日本クレア株式会社より購入した固形飼料CA-1を用い，飲料水は水道水を用いた。飼料と水は自由摂取とした。

15週令の雌雄NODマウスと雌ICRマウスの腹腔内にcyclophosphamide (CY : Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) (200mg/kg) または生理食塩水を1回投与した。15, 16, 17週齢マウスにおける無処置群，生理食塩水投与群，CY投与群の雌NODマウスは各n=10，雄NODマウスは各n=5，ICRマウスは各n=10であった。

## 実験方法

### マウスの処置

雌雄 NOD マウスと正常対照である雌 ICR マウスを diethyl ether 麻酔し、心腔穿刺にて採血した。その後、下大静脈を切開し、心腔より EDTA を 10ml 注入して血液をマウス体内より除去した。血液除去後脾臓を摘出した。

### マウス脾細胞の分離と培養

- 1) 滅菌シャーレ (滅菌 S シャーレ : 栄研器材株式会社, 東京) に 5 ml の 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum : GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン合剤 (BIO WHITTAKER, Walkersville, MD, USA) 含有 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM : GIBCO BRL) (培地) を入れ, amphotericin B (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) を 200  $\mu$ l 加えたものの中に 10 分間浸した。
- 2) 上記に 20ml の phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 を加えた後, 脾細胞を金属メッシュ (格子径 75  $\mu$ m) 上でスライドガラスを使用してすりつぶし, シャーレ内の液中に浮遊した。その細胞浮遊液を遠心チューブに入れ, 2000xg で 7 分間遠心し上清を除去した。
- 3) 0.16M tris  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 7.2 で混入した赤血球を除去した。その後 PBS で 3 回洗浄し, 培地に細胞を浮遊させた。
- 4)  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度に培地を加えて調節した。細胞浮遊液の viability は 95% 以上であった。細胞浮遊液を 24 穴マルチプレート (Iwaki Glass, Chiba, Japan) に 1 ml ずつ入れた。
- 5) 各ウエル毎に 5  $\mu$ g/ml の最終濃度になるように concanavalin A (ConA : Sigma) を加えて 72 時間刺激培養した。

### サイトカインの測定

72 時間後に培養上清を回収し, 遠心分離して細胞成分を除去したものをサイトカイン測定に供した。上清中の IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  濃度を ELISA キットで測定した。マウスサイトカイン用 ELISA キットは IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  については Genzyme Diagnostics (Cambridge, MA, USA) のものを使用し, IL-10 は Perseptive Biosystems (Framingham, MA, USA) のものを使用した。各検体の ELISA による測定は duplicate で行い, CY による変動について検討した。

### 糖尿病の判定

血糖値はヘキソキナーゼ法 (タイド, バイエル・三共, 東京) を使用し, 解剖時に心腔より採取したマウス血液を直接測定した。随時血糖値 200mg/dl 以上を糖尿病と診断した。

### 統計学的処理

結果は, 平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) で表現し, 2 群間の平均値の差の検定は Student *t*-test で

行い危険率5%以下を有意とした。

## 成績

15週齢の雌雄 NOD マウスおよび雌 ICR マウスに saline あるいは CY を投与し、その後1週間、2週間を経た時点で脾細胞を回収した。脾細胞を37°C で72時間培養して上清のサイトカイン濃度を比較した結果を図1-4に示す。

### IL-2 産生能について

CY 投与1週及び2週後に IL-2 産生能は、雄 NOD マウスでは、saline 投与群に比し有意の増加を認めしたが、1週後より2週後の方が値が低かった(図1-a)。雌 NOD マウスでは、やはり1週後、2週後ともに saline 投与群より CY 投与群で有意の増加を認めしたが、雄と異なり2週後の値の方が高かった(図1-b)。ICR マウスでは、1週後で CY 投与群に産生増加を認めしたが、2週後は CY 投与群と saline 投与群との間に有意差がなかった。さらに、NOD マウスにおける CY 投与群と saline 投与群の IL-2 比(CY 投与群/saline 投与群)をとると、雄は1週後3.88、2週後2.94と2週間後に減少し、一方雌では1週後2.19、2週後5.90と2週間後に増加を認めた。

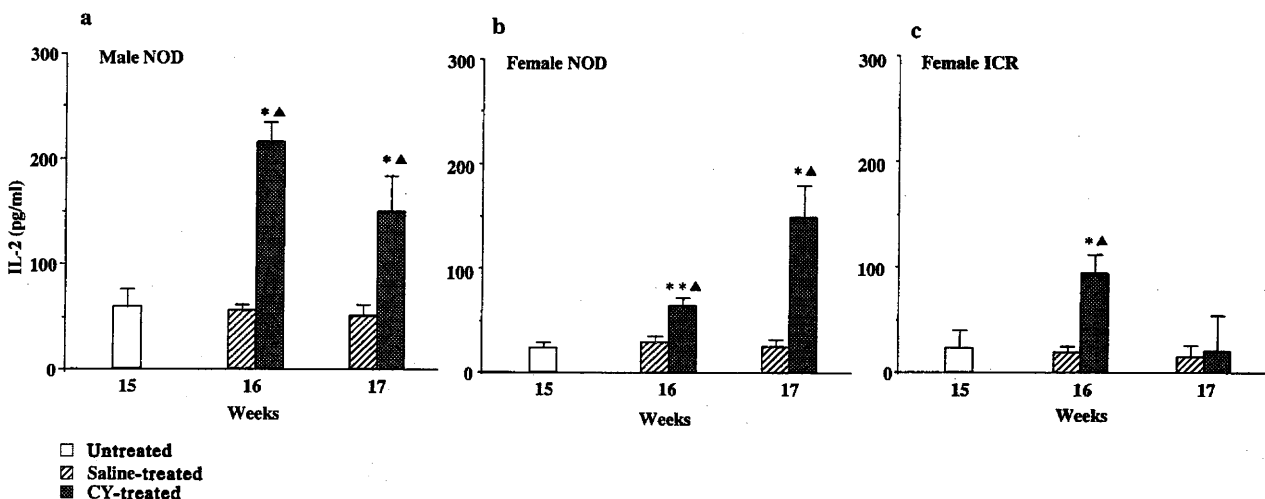


図1 cyclophosphamide (CY) 投与した NOD と ICR マウスにおける培養脾細胞による Con-A 刺激 IL-2 産生。

NOD と ICR マウス (15週齢) の腹腔内に CY (200mg/kg) あるいは生理食塩水を投与した。

データは平均値±標準誤差 (mean ± SE) で表した。

\*p<0.05, \*\*p<0.0001 : それぞれ生理食塩水投与群との比較。

▲ p<0.05 : 15 週齢グループとの比較。

これらのマウスの糖尿病発症率は CY 投与後2週間後の時点で、雄 NOD マウスは0/5、雌 NOD マウスは7/10、ICR では0/10であった(表1)。しかしながら、CY 投与1週後の時点は糖尿病の発症は各群ともに0%であった。

表1 Cyclophosphamide (CY) 投与 NOD と ICR マウスでの糖尿病の発症率.

	female NOD <sup>a)</sup>	male NOD <sup>a)</sup>	female ICR <sup>a)</sup>
% Diabetic <sup>b)</sup>	70% (7/10)	0% (0/5)	0% (0/10)

a)15 週齢の NOD と ICR マウスに CY を 200 mg/kg 投与し、2 週後の 17 週齢で血糖値を測定した.

b)血糖値 200 mg/dl を以上を、糖尿病と診断した.

#### IFN- $\gamma$ 産生能について

雄 NOD マウスでは、CY 投与 1 週間のみ saline 投与群あるいは投与前群 (15 週齢) と比較して IFN- $\gamma$  産生がそれぞれ有意に増加していたが (図 2 -a), 雌 NOD マウスでは CY 投与 1 週間後、2 週間共に saline 投与群あるいは投与前群 (15 週齢) と比較して IFN- $\gamma$  産生能が有意に増加した (図 2 -b).

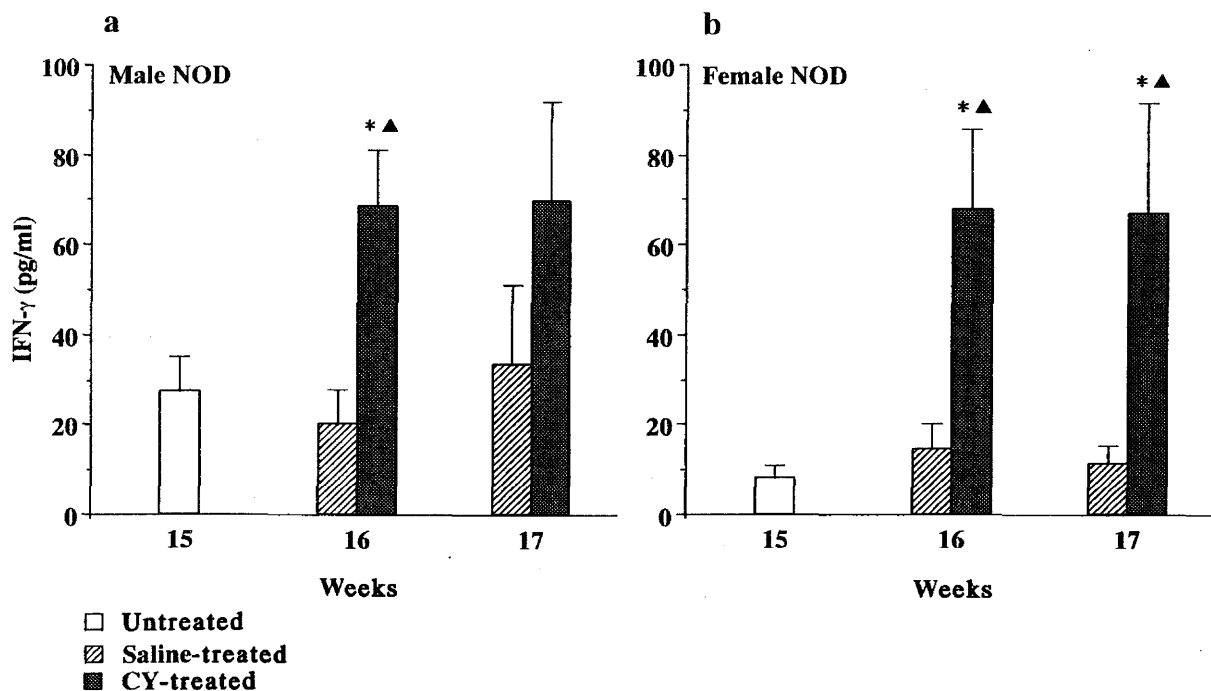


図2 cyclophosphamide (CY) 投与した NOD と ICR マウスにおける培養脾細胞による Con-A 刺激 IFN- $\gamma$  産生.  
NOD と ICR マウス (15 週齢) の腹腔内に CY (200 mg/kg) あるいは生理食塩水を投与した.

データは平均値±標準誤差 (mean ± SE) で表した.

\* $p < 0.05$  : それぞれ生理食塩水投与群との比較.

▲  $p < 0.05$  : 15 週齢グループとの比較.

さらに、NODにおけるCY投与群とsaline投与群のIFN- $\gamma$ 比(CY投与群/saline投与群)をとると、雄は1週後3.37、2週後2.09と2週後に減少しているのに対し、雌では1週後4.64、2週後6.03と2週後に高値を示した。

#### IL-4産生能について

雄NODマウスでは、CY投与1週後に投与前あるいはsaline投与群と比較してそれぞれ有意の増加を示したが、CY投与2週後には有意差を認めなかった(図3-a)。雌NODマウスについても同様の所見であった(図3-b)。NODマウスにおけるCY投与群とsaline投与群のIL-4比(CY投与群/saline投与群)をとると、雄は1週後7.25、2週後1.55、雌でも1週後5.64、2週後1.51と、いずれも2週後に低下を認めており、IL-4に関しては雌雄とも同様の傾向を示した。

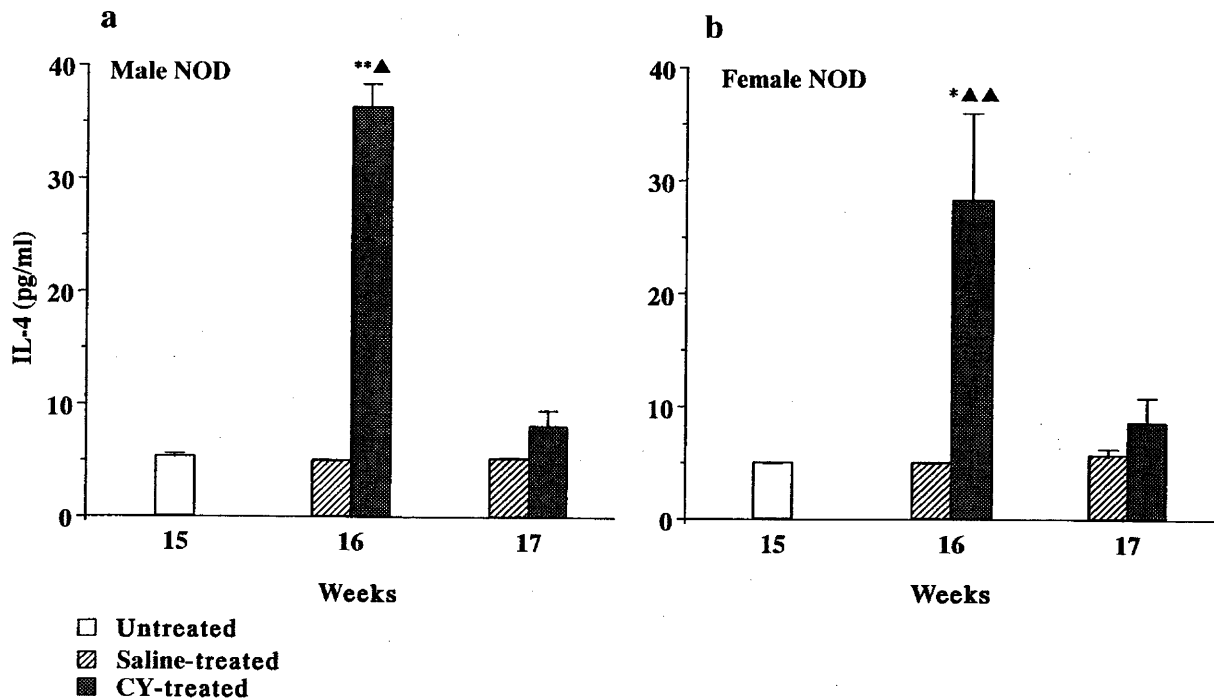


図3 cyclophosphamide (CY) 投与したNODとICRマウスにおける培養脾細胞によるCon-A刺激IL-4産生。

NODとICRマウス(15週齢)の腹腔内にCY(200mg/kg)あるいは生理食塩水を投与した。

データは平均値±標準誤差(mean±SE)で表した。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ :それぞれ生理食塩水投与群との比較。

▲ $p < 0.05$ , ▲▲ $p < 0.0001$ :15週齢グループとの比較。

#### IL-10産生能について

雄NODマウスでは、CY投与群は非投与群あるいはsaline投与群と比較してそれぞれ有意差を認めなかった(図4-a)。雌NODマウスはCY投与により1週後にIL-10産生能の増加を認めたが、2週後

には saline 投与群より低い値を示した ( $p < 0.05$ ) (図 4-b). 雌 ICR マウスの IL-10 産生能は 1 週後, 2 週後とも CY 投与群において saline 投与群と比較して有意差を認めなかった (図 4-c).

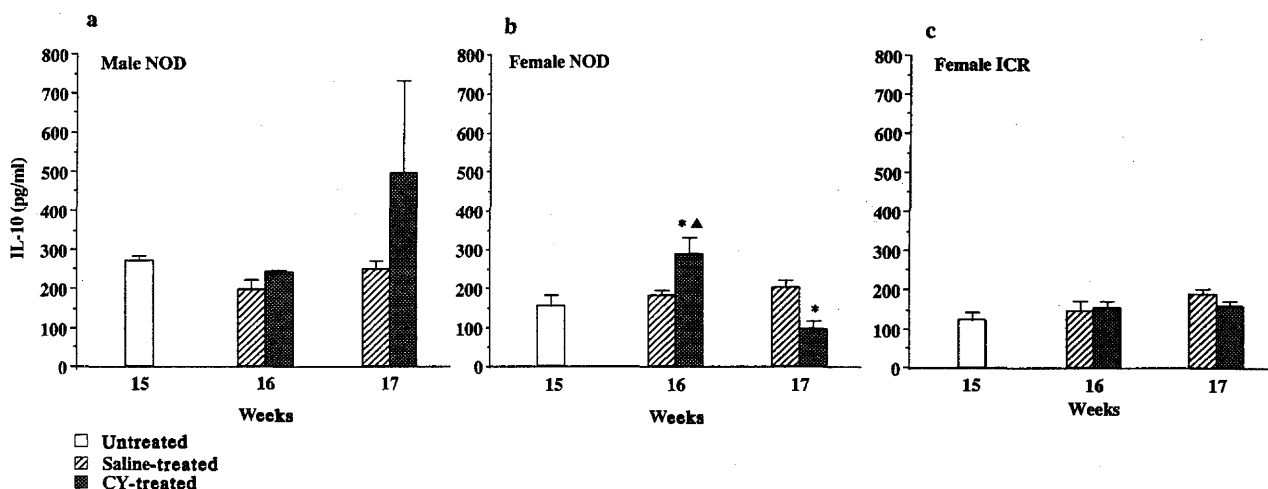


図 4 cyclophosphamide (CY) 投与した NOD と ICR マウスにおける脾細胞培養による Con-A 刺激 IL-10 産生.

NOD と ICR マウス (15 週齢) の腹腔内に CY (200mg/kg) あるいは生理食塩水を投与した.

データは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) で表した.

\* $p < 0.05$  : それぞれ生理食塩水投与群との比較.

▲ $p < 0.05$  : 15 週齢グループとの比較.

NOD マウスにおける CY 投与群と saline 投与群の IL-10 比 (CY 投与群 / saline 投与群) をとると, 雄は 1 週後 1.24, 2 週後 1.99 と 2 週後に増加し, 雌では 1 週後 1.58, 2 週後 0.49 と 2 週後で低下を認めており, この点で雌雄は反対の所見を示した.

また, 図には示していないが, 雌 ICR マウスでは CY 投与による IL-4, IFN- $\gamma$  産生能の有意な変化は認めなかった.

次に Th1 サイトカインと Th2 サイトカイン産生量の比を検討した. IL-4 と IFN- $\gamma$  については測定感度以下の検体も出たため Th1 と Th2 それぞれのサイトカインの代表として IL-2 と IL-10 を使用した. すなわち, IL-10 / IL-2 比を算出し Th2 / Th1 活性比の推定に用いた.

#### IL-10 / IL-2 比の比較

CY 投与 2 週後では, 雄 NOD マウスの CY 投与群と saline 投与群の間に, IL-10 / IL-2 比值で有意差は認めなかった. CY 投与雌 NOD マウスの IL-10 / IL-2 比は saline 投与雌 NOD マウスに比較して約 13 分の 1 に低下していた ( $p < 0.0001$ ) (図 5). 雌雄間で比較すると, CY 投与雄 NOD マウスと比較して CY 投与雌 NOD マウスの IL-10 / IL-2 比は有意に低下していた ( $p < 0.05$ ).



CY 投与 2 週後で認めた上記 IL-10/IL-2 比の有意な変化は、CY 投与 1 週後では認められなかった (図示せず)。

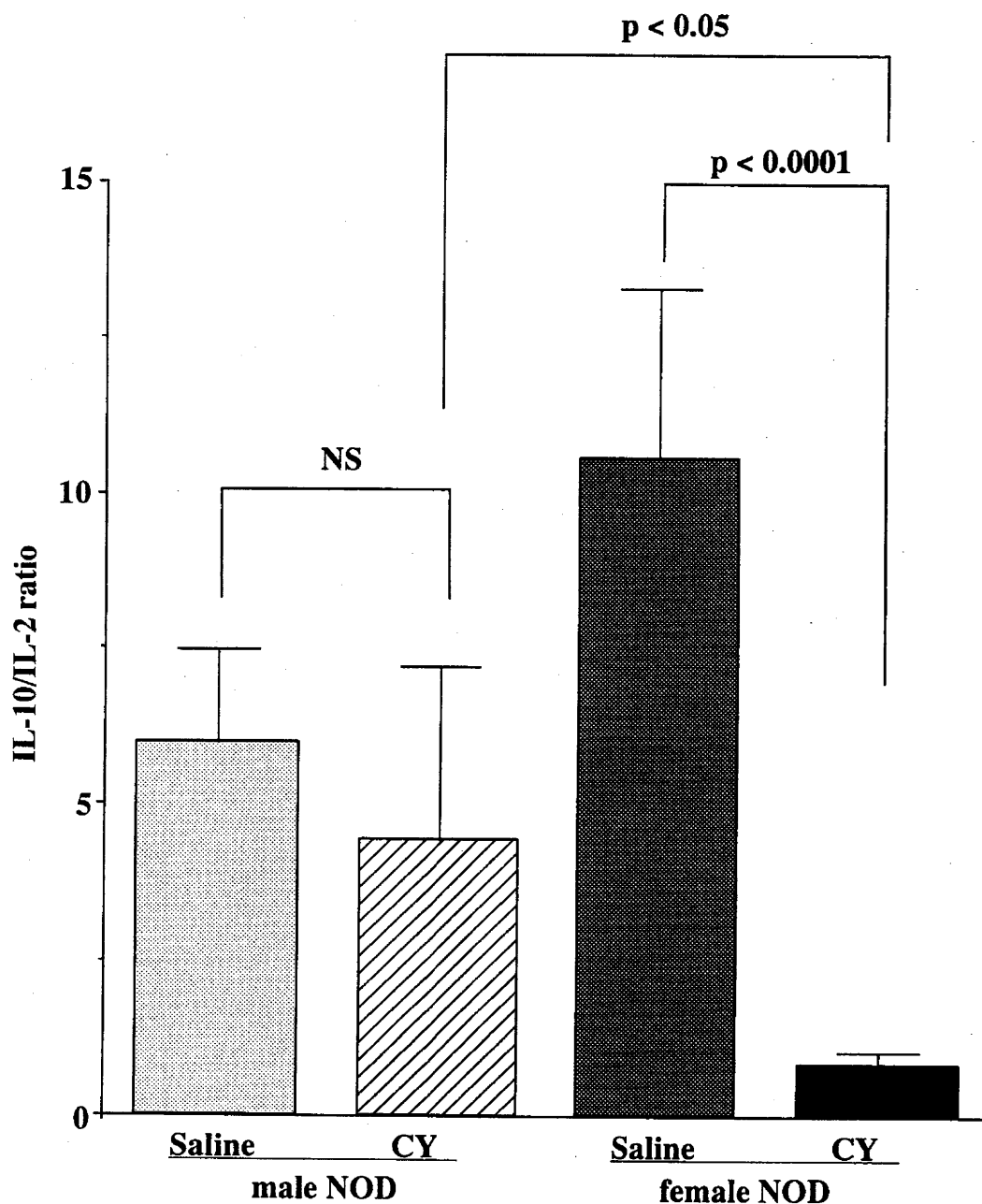


図5 培養脾細胞におけるIL-10/IL-2 比の比較.

NOD マウス (15週齢) の腹腔内にCY (200mg/kg) あるいは生理食塩水 (saline) を投与し、17週齢で実験に供した.

脾細胞を取って、方法に書かれたように3日間培養した.

データは平均値±標準誤差 (mean ± SE) で表した.

#### CY 投与雌 NOD マウスにおける DM 発症群と非発症群の IL-10/IL-2 比の比較

CY 投与 2 週後では、雌 NOD マウスはその70% に糖尿病を発症していた (表 1). この時点における

発症群と非発症群の間における IL-10/IL-2 比の比較をすると、図 6 に示すように糖尿病発症群においては、同比の有意の低下 ( $p < 0.05$ ) を認めた。

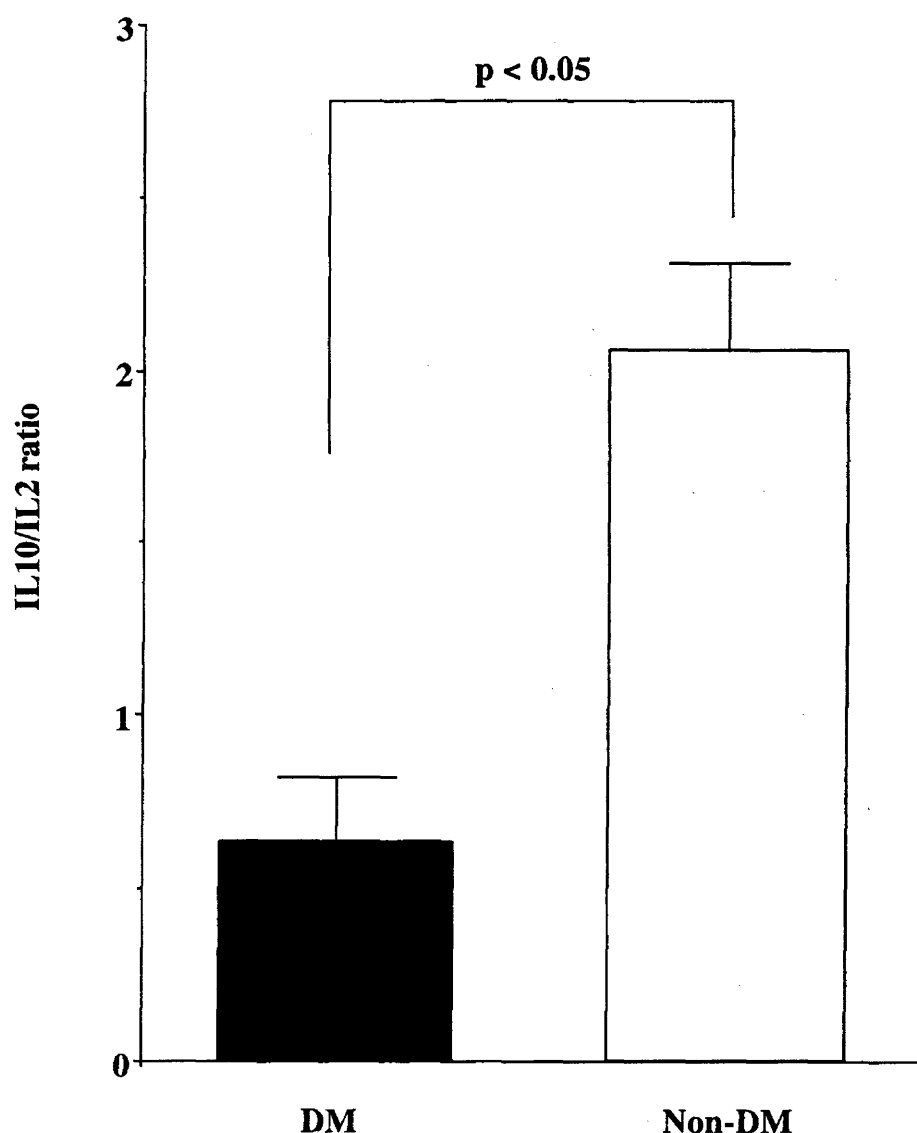


図 6 CY 投与雌 NOD マウスにおける DM 発症群と未発症群の IL-10/IL-2 比の比較。  
雌 NOD マウス (15週齢) の腹腔内に CY (200mg/kg) あるいは生理食塩水 (saline) を投与し、17週齢で実験に供した。  
脾細胞を取って、方法に書かれたように 3 日間培養した。  
データは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) で表した。

## 考 察

NOD マウスの糖尿病発症には性差があり、無処置の場合で雌は約 80% に自然発症するが、雄では約 20% 弱である。CY 投与が NOD マウスの糖尿病発症を促進することが知られているが、その作用機序の解明をサイトカイン産生の面から試みた。その結果、雌 NOD マウスでは CY 投与により Th1 サイトカ

イン, Th 2 サイトカイン共に産生能は増加したが, その増加は Th 1 サイトカインでより顕著であった. CY は Th 1 細胞, Th 2 細胞の各々にどのように作用するかは未だ明らかにされていないが, NOD マウスでは CY 投与によりマクロファージが活性化され, IL-12を産生し, Th 1 細胞の活性化を導くとの報告がある<sup>17</sup>. この事が我々の実験において Th 1 サイトカイン優位な産生能増加を認めた一つの機序と考えられる. Th 2 細胞は IL-2 受容体を発現する細胞であり, CY 投与により活性化された Th 1 細胞により産生される IL-2 により, Th 2 細胞が活性化され Th 2 サイトカインが増加した可能性が考えられる. つまり Th 2 サイトカインの増加は CY によるマクロファージ, Th 1 細胞の活性に引き続き生じたと考えられる.

病態的には, CY 投与 2 週後に雌 NOD マウスでは Th 2 /Th 1 比が低下し 70% が糖尿病を発症した. 一方, 雄 NOD マウスでは CY 投与後 Th 2 /Th 1 比の有意な変化はなく糖尿病発症は認めなかった. IL-10/IL-2 比は雌 NOD マウスでは CY 投与 1 週後で 12.18 で, 2 週後で 0.63 (saline 群より有意に低下して  $p < 0.05$  で有意差) と急激に低下を認めている. しかし, 雄 NOD 群においては, 同 1 週後 4.03, 同 2 週後 4.44 と, ほぼ同程度の値を維持した. CY 投与 2 週後における糖尿病発症率は, CY 投与雄 NOD 群が糖尿病を発症しなかったことを考えると, Th 2 /Th 1 サイトカイン比の不均衡が糖尿病発症に強く関与していることが推定される.

Th 2 /Th 1 比がどの程度になれば糖尿病が発症するかは現時点では推察の域を出ないが, CY 投与後糖尿病非発症の雌 NOD マウス (IL-10/IL-2 = 2.06) の値と糖尿病発症の雌 NOD マウス (IL-10/IL-2 = 0.63) の値の間にあると考えることもできるが (CY 投与雌 ICR マウスでは IL-10/IL-2 = 8.05), この点については今後さらなる研究が必要である.

1 型糖尿病の自己抗原である glutamic acid decarboxylase (GAD) に対する血清抗体価は糖尿病発症 NOD マウスでは同週齢の非発症群に比較して高値であることが報告されている<sup>5</sup>. GAD の 65-kDa isoform である GAD 65 を投与した NOD マウスでは, 糖尿病発症が抑制される. これは GAD 65 投与により Th 2 細胞が活性化され,  $\beta$  細胞特異的 Th 1 細胞活性が抑制されるためと考えられている<sup>18-20</sup>. また 1 型糖尿病の自己抗原の一つであるインスリン投与でも Th 2 サイトカインが増加して, IL-4, IL-10 が増加し NOD マウスの糖尿病は抑制される<sup>21, 22</sup>. complete Freund's adjuvant によって免疫されたマウスでは IL-2, IFN- $\gamma$  の減少や<sup>23</sup>, IL-4, IL-10 の増加を生じ<sup>21, 23</sup> 糖尿病の発症が抑制される事が報告されており, 著者の得た CY 使用のデータを理解する上で同一線上にある現象ととらえることができる.

つまり, 1 型糖尿病発症には Th 1 サイトカイン (IL-2, IFN- $\gamma$ ) が促進的に働き<sup>24-26</sup>, Th 2 サイトカイン (IL-4, IL-10) が抑制的に作用する<sup>27-31</sup> という基礎事実を背景に Th 1 と Th 2 の機能上の不均衡が糖尿病発症に結びつくと考えられることができる.

我々の実験では脾細胞のサイトカイン産生能で NOD マウスの糖尿病発症について検討しているが, GAD 65 によって免疫されたマウスからの脾細胞の CD 4 + T 細胞の養子免疫移植実験で NOD マウスの糖尿病発症が抑制された<sup>18, 19</sup>. また糖尿病を発症した NOD マウスからの脾細胞を養子免疫移植された NOD マウスは糖尿病を発症する<sup>19</sup>. この事から NOD マウスの糖尿病発症には脾細胞においても  $\beta$  細胞特異的なリンパ球が存在しており, 膵ラ氏島炎に対応している.

過去の研究では、CY 投与後の NOD マウスでは脾活性化 B リンパ球数の増加<sup>6</sup>、IL-6 産生増強<sup>7</sup>、血清中の抗 GAD 抗体価の上昇<sup>5</sup> 等がほぼ同時に生じていることがわかっている。そして IL-6 は CY 投与後 1 週と 2 週に増加を認め、脾活性化 B リンパ球数と血清中の抗 GAD 抗体価は 2 週で増加を迎えることが判明している<sup>7</sup>。著者の研究において雌 NOD マウスの Th1 サイトカインの IL-2 と IFN- $\gamma$  は CY 投与後いずれも顕著な上昇を示した。ここで IL-2 と IFN- $\gamma$  の産生を比較してみると IFN- $\gamma$  では CY 投与 1 週と 2 週でほぼ同等の値であったが、IL-2 は 1 週目よりも 2 週目により高い値を示した。さらに特記すべきことは、IL-10 が CY 投与 2 週後の雌 NOD マウスにおいては有意に低下したことであり、雄 NOD マウスにはこの変化を認めなかった。すなわち、CY 投与実験においてみる限り、投与 1 週後ではなく、2 週後のサイトカイン変化が重要であることが明らかになった。

CY は NOD マウスのサプレッサー T リンパ球の機能を抑制し、IL-6 産生を増強し、またマクロファージを活性化することが従来の研究により明らかにされているが<sup>7</sup>、今回の実験では CY が脾細胞における Th1 機能の増強とこれに比較して Th2 機能の相対的低下も生じることを明らかにした。

以上のことより、CY は NOD マウスのマクロファージの活性化を誘導する結果<sup>8</sup>、マクロファージからの IL-6 の産生を生じ、B リンパ球の活性化を刺激することで抗体産生と抗原提示能両面の増強へと導き<sup>7</sup>、それと同時に Th1 サイトカイン (IL-2, IFN- $\gamma$ ) 産生能増強を生じる事で膵島細胞に対する細胞障害性を増し、さらには Th2 サイトカイン産生能の相対的低下が原因となって、自己免疫性膵島炎を進行させ、これらの諸因子また未知の諸因子の総合作用の中で糖尿病が顕性発症するという事が示唆される。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり御指導御校閲を賜りました青木矩彦教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始的確な御助言をいただきました雑賀豊彦講師に深く謝意をいたしますと共に、御協力いただきました本学第 2 内科学教室員各位にも深く謝意を表します。

本研究の要旨は第 10 回国際内分泌学会 (1996 年 6 月 14 日, サンフランシスコ, 米国), 第 35 回日本臨床代謝学会 (1998 年 3 月 5 日, 東京), 第 41 回日本糖尿病学会年次学術総会 (1998 年 5 月 21 日, 和歌山), 第 71 回日本内分泌学会学術総会 (1998 年 6 月 4 日, 福岡) において発表した。

## 文 献

1. 青木矩彦 内分泌代謝学入門 改訂3版. 金芳堂, 1998, pp 258-330
2. Ohno Y, Aoki N, Nishimura A (1993) In vitro production of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77 : 1072-1077
3. 青木矩彦 (1989) インスリン依存性糖尿病の成因におけるインターロイキン1およびマクロファージの役割. *近畿大医誌* 14 : 565-578
4. Aoki N, Ohno Y, Imamura M (1990) Physiological interactions between the immune and endocrine systems. *Med Sci Res* 18 : 195-201
5. 飯尾一也 (1993) NOD マウスにおけるインスリン自己抗体と抗 glutamic acid decarboxylase 抗体の検討. *近畿大医誌* 18 : 33-47
6. 岸谷 讓 (1993) 糖尿病好発系 (NOD) マウスにおける脾 B 細胞機能の研究. *近畿大医誌* 18 : 83-98
7. 西村明芳 (1994) 糖尿病好発系 (NOD) マウス脾細胞におけるインターロイキン6産生能の検討. *近畿大医誌* 19 : 361-372
8. Imamura Y, Aoki N, Jun H-S, Han H, Hirasawa K, Yoon J-W (1997) Role of Activated Syk Tyrosine Kinase in the Expression of IL-1  $\beta$  Gene Leading to the Destruction of  $\beta$ -Cells in Cyclophosphamide (CY)-Treated NOD Mice. *Diabetes* 46 : 57A
9. Katz JD, Benoist C, Mathis D (1995) T Helper Cell Subsets in Insulin-Dependent Diabetes. *Science* 268 : 1185-1188
10. Rothe H, Faust A, Schade U, Kleemann R, Bosse G, Hibino T, Martin S, Kolb H (1994) Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4. *Diabetologia* 37 : 1154-1158
11. Zhang ZL, Georgiou HM, Mandel TE (1993) The effect of cyclophosphamide treatment on lymphocyte subsets in the nonobese diabetic mouse : a comparison of various lymphoid organs. *Autoimmunity* 15 : 1-10
12. Harada M, Makino S (1984) Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia* 27 : 604-606
13. Yasunami R, Bach JF (1988) Anti-suppressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol* 18 : 481-484
14. Charlton B, Bacelj A, Slattery RM, Mandel TE (1989) Cyclophosphamide-induced diabetes in NOD/WEHI MICE : Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus. *Diabetes* 38 : 441-447
15. Baxter AG, Mandel TE (1991) Accelerated diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice

- differing in incidence of spontaneous disease. *Clin Exp Immunol* 85 : 464-468
16. Charlton B, Bacej A, Mandel TE (1988) Administration of silica particles or anti-Lyt 2 antibody prevents beta-cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. *Diabetes* 37 : 930-935
  17. Rothe H, Burkart V, Faust A, Kolb H (1996) Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 39 : 119-122
  18. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Forsthuber T, Lehmann PV, Kaufman DL (1996) Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD 65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 183 : 1561-1567
  19. Tisch R, Liblau RS, Yang X-D, Liblau P, McDevitt HO (1998) Induction of GAD 65-specific regulatory T-cells inhibits ongoing autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 47 : 894-899
  20. Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnick N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL (1996) Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nature Med* 2 : 1348-1353
  21. Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N, Weiner HL (1995) Suppression of insulinitis in Non-Obese Diabetic (NOD) Mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and -10, transforming growth factor- $\beta$ , and prostaglandin-E. *Am J Pathol* 147 : 1193-1199
  22. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song Y-H, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N (1995) Insulin Immunization of Nonobese Diabetic Mice Induces a Protective Insulinitis Characterized by Diminished Intra-islet Interferon- $\gamma$  Transcription. *J Clin Invest* 95 : 628-634
  23. Rabinovitch A, Sorensen O, Suarez-Pinzon WL, Power RF, Rajotte RV, Bleackley RC (1994) Analysis of cytokine mRNA expression in syngeneic islet grafts of NOD mice : interleukin 2 and interferon gamma mRNA expression correlate with graft rejection and interleukin 10 with graft survival. *Diabetologia* 37 : 833-837
  24. Pilstrom B, Bjork L, Bohme J (1995) Demonstration of a Th1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis. *Cytokine* 7 : 806-814
  25. Elliott EA, Flavell RA (1994) Transgenic mice expressing constitutive levels of IL-2 in islet  $\beta$  cells develop diabetes. *Int Immunol* 6 : 1629-1637
  26. Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman CG (1996)  $\beta$ -cell destruction may

- be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067
27. Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M (1994) Recombinant Human IL-10 Prevents the Onset of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse. *Clin immunol and immunopathol* 71 : 169-175
  28. Moritani M, Yoshimoto K, Ii S, Kondo M, Iwahana H, Yamaoka T, Sano T, Nakano N, Kikutani H, Itakura M (1996) Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10-transduced islet-specific Th1 lymphocytes. *J Clin Invest* 98 : 1851-1859
  29. Healey D, Ozegbe P, Arden S, Chandler P, Hutton J, Cooke A (1995) In vivo activity and in vitro specificity of CD4 + Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. *J Clin Invest* 95 : 2979-2985
  30. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF, Rajotte RV (1995) Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. *Transplantation* 60 : 368-374
  31. Han H-S, Jun H-S, Utsugi T, Yoon J-W (1996) A new type of CD4 + suppressor T cell completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngeneic islet transplanted NOD mice. *J Autoimmun* 9 : 331-339
  32. 笠倉新平編. サイトカイン. 第2版改訂新版. : 日本医学館, 1997, Chapter 7 pp 57-64