

Zur Pathologie des Diabetes mellitus der weißen Maus bei der EMC-Virusinfektion

Histologische, elektronenmikroskopische
und quantitativ morphologische Befunde an den Langerhansschen Inseln

H. Müntefering

Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Meessen)

Eingegangen am 7. März 1972

On the Pathology of the Diabetes mellitus in the White Mouse
Infected with EMC-Virus

Histological, Electronmicroscopical and Quantitative Morphological Findings
in the Islets of Langerhans

Summary. By infection with a myocardiotropic (M) variant of the encephalomyocarditis (EMC) virus, which belongs to the group of Picorna virus, it was possible to produce in the white mouse a nearly isolated damage of the islets of Langerhans with insulin deficiency diabetes. An encephalotropic (E) variant however mainly damages the exocrine pancreatic parenchyma without dysglycaemia.

We examined the islet tissue macroscopically, microscopically, submicroscopically and quantitative morphologically at different times after infection with both variants of the virus: E and M variant produce in the total pancreas, with an increase in weight, an edema readily recognized macroscopically. Its intensity develops about 24 hours later depending upon the degree of the virus reproduction in the organ.

Histologically a diffuse pancreatitis with extensive destruction of the exocrine parenchyma is recognized after infection with the E variant. The islets are seldom affected and then only at their marginal parts. An infection with the M variant however causes severe systemic lesions of the islets, sparing mostly the acinarstructures. Virus infection first causes necrosis of single or several cells. Then follows a heavy interstitial edema; terminally an insulitis develops with infiltrates of macrophages, lymphocytes and polymorph nuclear leukocytes.

The electron optical findings confirm the islet-cell lesions that end with necrosis, as well as the interstitial edema and the inflammatory infiltrates of the islet tissue. During and after the acute stage of infection the B-cells, which remain spared by direct viral injury, show in contrast to the intact A-cells, signs of increased functional activity like degranulation, multiplication of ergastoplasmatic membranes, free ribosomes and mitochondriae. When the diabetic condition persists signs of cellular fatigue with formation of vesicles and vacuolisation appear.

According to quantitative morphological studies a significant shrinking of the islet tissue was found after infection with the E variant because the islet-lesion was only peripheral. Although the islets were more damaged by the M variant and the function of the cells was heavily-disturbed, there were no significant changes to be seen in the size of the islets, or in the A-B-cell-relation.

Calculation of the ratio between A and B cells, and between interstitial tissue and islet parenchyma gave information about the severity of the lesion. The interstitial tissue, that is, the regions of destroyed parenchyma increased with the severity of the lesion.

The changes of the islets after infection with the M variant, especially the identified insulitis, show striking parallels to changes observed in infantile and juvenile human diabetes mellitus of short onset. Comparison of those findings with ours described here as well as a comparison of the course of the disease in laboratory animals and in man give cause to assume, that our experiment can also pass as a model for human pathology.

Zusammenfassung. Durch Infektion mit einer myokardiotropen (M-)Variante des zur Gruppe der Picornaviren zählenden EMC-Virus gelang es, bei der weißen Maus eine weitgehend isolierte Schädigung der Langerhansschen Inseln mit Insulinmangeldiabetes zu erzeugen. Eine encephalotrope (E-)Variante schädigt dagegen vorwiegend das exokrine Parenchym des Pankreas ohne wesentliche Störungen des Zuckerstoffwechsels.

Wir haben in verschiedenen Zeitabständen nach der Infektion mit beiden Varianten des Virus den Inselapparat makroskopisch, mikroskopisch, submikroskopisch und quantitativ morphologisch untersucht: E- und M-Variante verursachen am gesamten Pankreas ein schon makroskopisch deutlich erkennbares, mit Gewichtszunahme einhergehendes Ödem, dessen Intensität sich in einer Phasenverschiebung von etwa 24 Std nach dem Grad der Virusvermehrung in dem Organ richtet.

Histologisch erkennt man nach Infektion mit der E-Variante eine diffuse Pankreatitis mit ausgedehnten Zerstörungen des exokrinen Parenchyms. Die Inseln werden dabei selten und nur in ihren Randanteilen betroffen. Nach Infektion mit der M-Variante kommt es dagegen zu schweren Schädigungen des Inselsystems unter weitgehender Aussparung der Acinusstrukturen. Virusbefall führt zunächst zu Nekrosen einzelner oder mehrerer Zellen. Danach folgt ein starkes interstitielles Ödem und schließlich entwickelt sich eine Insulitis mit Infiltraten aus Makrophagen sowie polymorphkernigen Leukocyten und Lymphocyten.

Die elektronenoptischen Befunde bestätigen die Inselzellschädigung bis zur Nekrose ebenso wie das interstitielle Ödem und die entzündlichen Infiltrationen des Inselgewebes. Während und nach der akuten Infektionsphase zeigen die von der direkten viralen Schädigung verschont gebliebenen B-Zellen im Gegensatz zu den intakten A-Zellen Zeichen verstärkter funktioneller Aktivität wie Degranulierung, Vermehrung ergastoplasmatischer Membranen und freier Ribosomen sowie Vermehrung der Mitochondrien. Bei länger bestehender diabetischer Stoffwechselstörung stellen sich auch Zeichen der Erschöpfung mit Vesikeln- und Vacuolenbildung ein.

Die quantitativ morphologischen Untersuchungen ergaben eine signifikante Verkleinerung des Inselapparates durch die E-Variante infolge der nur peripheren Inselschädigung. Da die Inseln durch die M-Variante diffuser geschädigt werden, fanden sich hier für die Inselgröße, den prozentualen Anteil des Inselgewebes am Gesamtparenchym und die A-B-Zellenrelation trotz starker Störungen der Funktion keine signifikanten Änderungen. Aufschluß über den Grad der Schädigung erhält man dagegen durch die Berechnung der prozentualen Anteile der A- und B-Zellen und des Zwischengewebes am Inselparenchym. Das Zwischengewebe bzw. die damit quantitativ gemeinsam erfaßten Gewebelücken nehmen mit dem Grad der Schädigung zu. Die Inselveränderungen nach Infektion mit der M-Variante, insbesondere die nachgewiesene Insulitis, zeigen auffallende Parallelen zu Befunden, die bei Fällen von kindlichem und juvenillem Diabetes mellitus des Menschen mit raschem Krankheitsverlauf beobachtet worden sind. Der Vergleich dieser Befunde wie auch Parallelen im Verlauf der Erkrankung der Versuchstiere und beim Menschen geben Anlaß zu der Annahme, daß unser Experiment auch als ein Modell für die Humanpathologie gelten kann.

Einleitung

Das Encephalomyokarditis (EMC)-Virus ist eines der zahlreichen für Menschen und Tiere pathogenen RNS-Viren aus der Gruppe der Picornaviren (Melnick u. Mitarb., 1963). Craighead (1966) gelang es, durch Passagen in weißen Mäusen zwei Arten dieses Virus von unterschiedlicher Pathogenität und mit bestimmten Gewebetropismen zu gewinnen. Eine encephalotrope (E-)Variante verursacht ein meist rasch zum Tode führendes Krankheitsbild mit geringer Myokarditis, schwerer Encephalitis und schwerer Pankreatitis ohne wesentliche Störungen des Zuckerstoffwechsels. Eine myokardiotrope (M-)Variante ruft dagegen eine mildere Erkrankung mit im Vordergrund stehender Myokarditis und geringer Herdencephalitis hervor. Sie schädigt im Pankreas vorwiegend das Inselsystem und beeinträchtigt den Zuckerstoffwechsel (Craighead, 1966, 1968). Durch weiterführende

Untersuchungen mit dieser Variante konnten wir gemeinsam mit Schmidt und Körber (1970, 1971) bei erwachsenen männlichen weißen Mäusen einen klassischen Insulinmangeldiabetes erzeugen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung der makroskopischen, mikroskopischen, submikroskopischen und quantitativ morphologischen Befunde an den Langerhansschen Inseln nach Infektion mit der E- und der M-Variante des EMC-Virus.

Untersuchungsgut und Methodik

Die myokardiotrope (M-)Variante des Encephalomyokarditis (EMC)-Virus gelangte von Craighead¹ (1965, 1966) über eine Passage in drei Wochen alten Mäusen, die Rolly² durchführte, in Form eines Pools aus Gehirn, Herz und Pankreas in unsere Hand. Schon durch die einmalige Gewinnung aus anderen Organen zeigte das Virus deutlich Eigenschaften, wie sie Craighead (1966) für seine E-Variante beschrieben hatte. Wir haben diesen übernommenen Stamm deshalb mit „E-Variante“ bezeichnet. Unter ausschließlicher Verwendung der Herzen konnte daraus jedoch über drei Passagen in 3 Wochen alten Mäusen die M-Variante zurückgewonnen werden. Ein Pool aus homogenisiertem Herzgewebe moribunder Tiere der letzten Passage und der übernommene Pool der E-Variante wurden zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert³. Jedes Versuchstier erhielt subcutan 0,5 ml der Flüssigkeit, die zur Verdünnung des Viruspools benutzt wurde, und zwar Earlesche Lösung unter Zusatz von 2% Kälberserum.

Als Versuchstiere verwendeten wir insgesamt 331 zwölf bis siebzehn Wochen alten Mäuse des Stammes NMRI/Han², der nicht durch Spondandiabetes belastet ist. Die ursprünglich spezifiziert pathogenfreien Tiere wurden konventionalisiert, in Plastikkäfigen auf Torf einzeln oder in Gruppen zu 5 Tieren bei 25°C Raumtemperatur und 58% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Fertigfutter der Fa. Hoeveler und Leitungswasser standen ad libitum zur Verfügung.

Auf Glucosurie prüften wir mittels „Glucotest®“. Bei jedem Tier wurde einmal vor dem Versuch sowie je nach Überlebenszeit 1–14 mal nach Versuchsbeginn im Blut aus dem Retroorbital sinus jeweils nach 16ständigem Entzug der Nahrung der Blutzuckerspiegel untersucht³. Die Werte wurden nach der ortho-Tolidinmethode (Hultman, 1959) als Doppelbestimmungen auf dem Autoanalyser gewonnen. Die Bestimmung der Aktivität der Oxalacetat-Transaminase im Serum erfolgte nach der Methode von Karmen u. Mitarb. (1955).

Nach Beendigung der Versuche töteten wir die Tiere jeweils vormittags zwischen 10.00 und 12.00 Uhr durch Entblutung. Unmittelbar danach entnahmen wir das Pankreas möglichst vollständig, fixierten es in 4%igem neutralem Formalin oder in Bouinscher Lösung 12 Std lang undbetteten es in Paraffin ein. Von drei mindestens 300 μ voneinander entfernten Stufen fertigten wir jeweils mehrere Schnittpräparate an. Folgende Färbungen wandten wir bei jedem Organ an: Hämatoxylin-Eosin, Elastica van Gieson, PAS-Reaktion, Aldehydfuchsin (Gomori, 1950), Aldehydfuchsin-Trichrom (Lazarus und Volk, 1962) und Darstellung von Insulin mit Pseudoisocyanin (Schiebler und Schiessler, 1959).

Außerdem haben wir von 212 Tieren die Herzen, von 39 die Gehirne und von 11 Tieren sämtliche inneren Organe histologisch untersucht. Von insgesamt 60 Bauchspeicheldrüsen zerlegten wir das milznahe Schwanzende in Gewebestücke von ca. 1 mm Kantenlänge, fixierten diese 2 Std lang in 2,5%igem Glutaraldehyd, wuschen sie in Sucrosephosphatpuffer und

1 Wir danken Prof. J. E. Craighead, Burlington, und Dr. H. Rolly, Farbwerke Hoechst, für die Überlassung des Virusstammes und Prof. Dr. W. A. K. Schmidt, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie (Direktor: Prof. Dr. P. Naumann) der Universität Düsseldorf für die weitere virologische Bearbeitung.

2 Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden.

3 Wir danken Dr. W. Körber, I. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. F. Grosse-Brockhoff) der Universität Düsseldorf, für die klinisch-chemischen Untersuchungen.

betteten sie nach weiterer Fixierung in gepuffertem Osmiumtetroxyd und Dehydrierung in aufsteigender Acetonreihe in Durcupan ein. Die Inseln suchten wir an 1—2 μ dicken, mit Methylenblau gefärbten Semidünnnschnitten auf. Die Ultradünnnschnitte für die Elektronenmikroskopie fertigten wir mit dem Porter-Blum-Ultramikrotom MT2 an, kontrastierten mit Bleihydroxyd und untersuchten mit einem RCA-EMU 3G Elektronenmikroskop bei 50 kV.

Zur Erfassung der *quantitativen Veränderungen* haben wir die wichtigen histologischen Befunde katalogisiert und ebenso wie die Meß- und Zählergebnisse auf Formblättern registriert. Für die umfangreichen Rechenoperationen stand uns der Programmrechner „Olivetti P 102“ zur Verfügung⁴.

Histologisch untersuchten wir bei insgesamt 27 Kontrolltieren und 219 Versuchstieren die Bauchspeicheldrüsen, Meßergebnisse liegen von 27 Kontrollen und 207 Versuchstieren, Zählerwerte von 24 Kontrolltieren und 194 Versuchstieren vor. Den Inselapparat haben wir am Ortholux-Mikroskop von Leitz mit dem Meßocular bei 25facher Standardvergrößerung ausgemessen, so daß auch extrem große Inseln in einem Blickfeld ganz zu erfassen waren. Singuläre B-Zellen und weniger als 30 μ große Anschnitte von Inseln blieben unberücksichtigt, da diese sich oft nicht exakt abgrenzen lassen und Voruntersuchungen ergaben, daß ihr Anteil am innersekretorischen Parenchym wegen ihres seltenen Vorkommens statistisch vernachlässigt werden darf.

Zunächst wurde die *Inseldichte* ermittelt, die definiert ist als Quotient n/K der Anzahl K der durchgemusterten Gesichtsfelder und der Anzahl n der darin enthaltenen Inseln. Voruntersuchungen ergaben, daß nach Auszählung von 100 Blickfeldern die Abweichung der Mittelwerte der Meßgrößen von den durch Auszählung der doppelten bis dreifachen Zahl der Gesichtsfelder gewonnenen Mittelwerten immer weniger als 5% betrug. Wir durchmusterten deshalb histologisch je Fall mindestens 100 Gesichtsfelder zu annähernd gleichen Anteilen aus drei verschiedenen, mindestens 300 μ voneinander entfernten Schnittebenen. Aus der Anzahl der konstant 99225 μ^2 großen Gesichtsfelder ergab sich außerdem die tatsächlich untersuchte Fläche, so daß eine Umrechnung der Inseldichte pro Gesichtsfeld in die Dichte pro mm^2 möglich war

$$\left(\frac{\text{Anzahl } n \text{ der Inseln}}{\text{Inselfläche in } \text{mm}^2} = \frac{n}{K} \frac{10^6}{99225} \right).$$

Weiterhin ließ sich durch die Messung der kleinsten (d_{i_1}) und größten (d_{i_2}) Durchmesser in μ die Fläche $f_i = \frac{\pi}{4} d_{i_1} d_{i_2}$ der einzelnen Inseln und damit der Mittelwerte der Inselflächen

$\bar{f} = \frac{\pi}{4} \overline{d_1 d_2}$ für jedes Tier berechnen. Aus der Gesamtfläche der Inseln $f = \sum f_i$ und der Gesamtfläche der Gesichtsfelder $F = 99225 K$ (in μ^2) ergab sich schließlich die prozentuale Flächenbeteiligung von $100 f/F\%$ des Inselgewebes am Gesamtparenchym für jedes Tier.

Weiterhin haben wir an den mit der Aldehydfuchsin-Trichromfärbung behandelten Schnitten mit Hilfe der Integrations-Strichplatte III von Zeiss die Mengenverhältnisse von A-Zellen (a), B-Zellen (b) und Zwischengewebe (c) ausgezählt. Aus der Zahl der Treffer auf jedem dieser Gewebeanteile haben wir den Quotienten a/b sowie die prozentualen Anteile

$$a = \frac{100 a}{(a+b+c)}, b = \frac{100 b}{(a+b+c)}, c = \frac{100 c}{(a+b+c)} \% \text{ errechnet.}$$

Bei den statistischen Vergleichen der Meß- und Zählergebnisse verschiedener Gruppen von Tieren haben wir entweder den t-Test oder den Wilcoxon (Rangsummen)-Test für 2 Stichproben durchgeführt. Als Signifikanzschranke wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt.

Morphologische Befunde

Makroskopisch erkennt man am dritten bis vierten Tage nach der Infektion ein hochgradiges Ödem des Pankreas. Das Organ ist dadurch meistens so stark vergrößert, daß das

⁴ Dr. rer. nat. W. Eberl, Institut für Statistik und Dokumentation der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. H. Klinger) danken wir für die Durchführung der Programmierungsarbeiten und für die Prüfung der statistischen Untersuchungsergebnisse.

Abdomen der Tiere deutlich aufgetrieben erscheint. Das Organgewicht haben wir systematisch bis zum siebten Tage untersucht. Es steigt bei einem Normalgewicht von 155 mg am dritten bis fünften Tage auf Werte zwischen 550—700 mg an und nimmt dann allmählich wieder ab. Die Gewichtsänderung folgt dabei der Virusvermehrung und deren allmählichem Sistieren in einem zeitlichen Abstand von etwa 24 Std. Vom 5. Tage an erkennt man nur bei den mit der E-Variante infizierten Tieren zunehmend kalkspritzerartige Nekrosen des Pankreas und zum Teil auch des Peritoneums. Bei Infektion mit der M-Variante erscheint dagegen das Pankreas nach dem Schwinden des Ödems lediglich etwas plump gefiedert und gerötet.

Histologisch verursachen die beiden Virusstämme sehr differente Schädigungen. 48 Std nach Infektion mit der E-Variante sahen wir außer dem interstitiellen Ödem des Pankreas eine Schwellung einzelner Acinuszellen mit Verlust der Anfärbbarkeit des Cytoplasmas. Am dritten und vierten Tage zeigt das Drüsengewebe zahlreiche Zellen mit Vacuolisierungen und fleckförmige Coagulationsnekrosen. Vom fünften bis sechsten Tage an finden sich ausgedehnte Zerstörungen des exokrinen Parenchyms. Das stark ödematos verbreiterte Interstitium ist von einkernigen Rundzellen und vereinzelten polymorphkernigen Leukocyten infiltriert (Abb. 1b). Oft sahen wir so schwere Schädigungen des exokrinen Parenchyms, daß kein intaktes Drüsengläppchen mehr vorhanden war. Die Langerhansschen Inseln bleiben dagegen vielfach selbst in solchen Fällen noch erhalten (Abb. 1c). Zuweilen greift der nekrotisierende Prozeß aber auch auf das endokrine Parenchym über und führt so zu einer allmählichen Abschmelzung der Inseln, deren zentrale Anteile aber meistens erhalten bleiben (Abb. 1b).

Die M-Variante des EMC-Virus schädigt im Gegensatz zur E-Variante bevorzugt den Inselapparat. Nach Infektion mit diesem Virusstamm kommt es zwar auch zu einem starken interstitiellen Ödem, aber nur ganz vereinzelt zu Nekrosen des exokrinen Parenchyms. In zahlreichen, aber nicht allen Inseln sahen wir 48 Std nach der Infektion ein interstitielles Ödem und disseminierte, teils randständige, teils zentral gelegene Nekrosen einzelner oder mehrerer Zellen. Am dritten und vierten Tage kamen auch ausgedehnte und totale Nekrosen der Inseln vor (Abb. 2). A- und B-Zellen scheinen dabei in gleicher Weise geschädigt zu sein. In diesem Stadium der Schädigung sind lichtoptisch jedoch keine spezifischen Granula mehr nachzuweisen, so daß eine sichere Unterscheidung der Zelltypen nicht möglich ist. Die betroffenen Zellen weisen meist nur noch schattenhafte Kernstrukturen auf. Das Cytoplasma läßt sich nur schwach und homogen mit Eosin anfärbten. In der Folgezeit kommt es zunehmend zur Vacuolisierung und Auflösung der Zellen sowie zum Verlust des Zellgefüges mit Lückenbildung und mottenfraßähnlichen Defekten des Inseleparenchyms. Vom 3.—15. Tage an, vornehmlich aber am 4.—7. Tage nach der Infektion, sahen wir neben nur sehr spärlich entwickelten entzündlichen Infiltraten des Interstitiums schüttete bis dichte Infiltrationen der Inseln mit einkernigen Rundzellen und einzelnen polymorphkernigen Leukocyten (Abb. 1a, 3). Die in den geschädigten Inseln noch vorhandenen sekretorischen Zellen sind ohne Granula, vergrößert und weisen unregelmäßig gestaltetes oft plumpe rundliche bis walzenförmige Kerne auf. Zwischen den Zellen liegen erweiterte Blutcapillaren. Neben derartigen Inseln finden sich bei allen Versuchstieren, und zwar auch solchen, die ein Diabetes-Syndrom entwickelt haben, mehr oder weniger zahlreiche Inseln ohne Nekrosen oder Infiltrate. Am 4.—5. Tage nach der Infektion sind diese mikroskopisch meist noch völlig unauffällig. Danach zeigen sie aber ebenfalls charakteristische Ver-

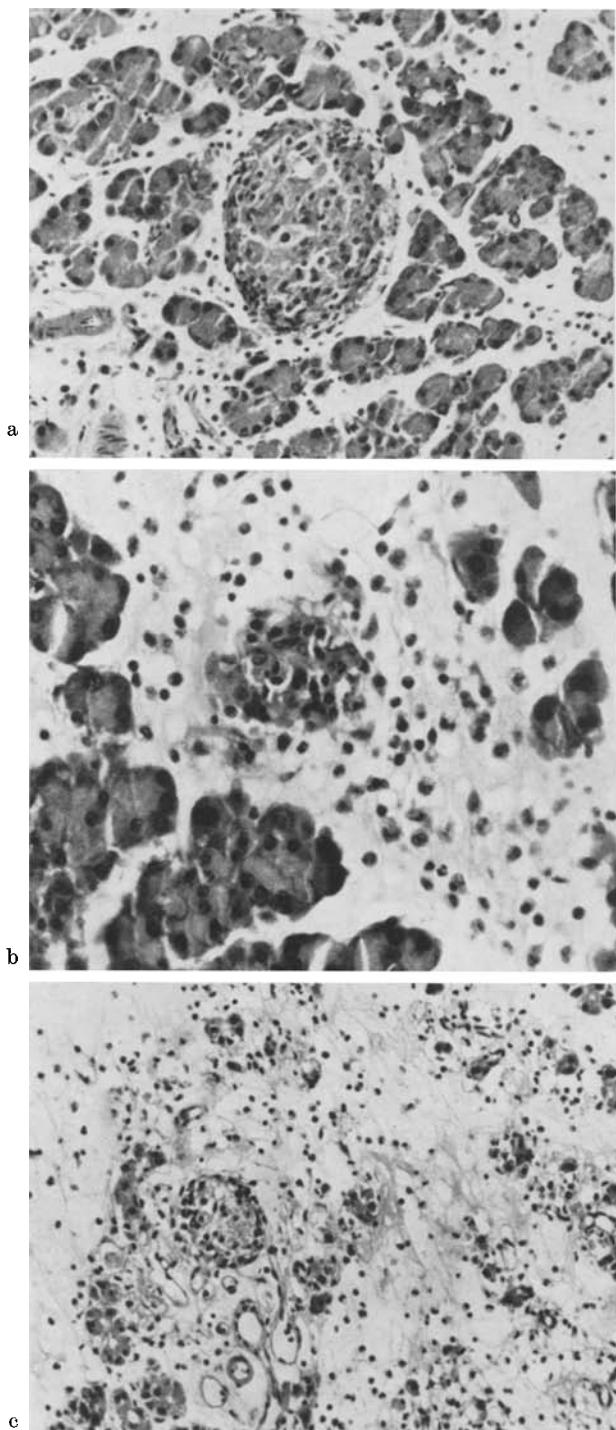


Abb. 1 a—c

änderungen (Abb. 4): Die Inselscheibe ist vielfach entrundet, in fortgesetzten Stadien auch unscharf konturiert. In den B-Zellen kommt es zu einer fortschreitenden Degranulierung. Der Zelleib erscheint gebläht. Die Kerne sind geschwollen, chromatinarm und weisen vergrößerte Nucleoli auf. Bei Tieren, die 30 Tage und länger überlebten, fanden wir einerseits in einem relativ hohen Prozentsatz sog. Rieseninseln (Tabelle 1) mit einem Durchmesser von mehr als 400 μ , andererseits aber auch besonders kleine Inseln. Der Mittelwert der Inselflächen war jedoch gegenüber dem von Normaltieren nicht signifikant verändert. Besonders in den kleinen Inseln fanden wir vermehrt Capillaren und Bindegewebsfasern.

Elektronenoptisch haben wir das Inselsystem nur nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus untersucht. Schon innerhalb der ersten 24 Std sahen wir in zahlreichen B-Zellen eine deutliche hydropische Schwellung der Mitochondrien mit Destruktion und Schwund der Cristae (Abb. 5). Vom zweiten Tage an findet man neben einem interstitiellen Ödem vorwiegend pericapilläre teils solitäre, teils in Gruppen angeordnete A- und B-Zellen mit schweren Schädigungen (Abb. 6). Die Kerne erscheinen geschrumpft, das Cytoplasma läßt nur noch unscharf konturierte Zellorganellen erkennen und es kommt zu herdförmigen Auflösungen der Zellmembranen. Die Granula weisen dabei zwar Unregelmäßigkeiten in Form und Größe auf, sind aber oft trotz relativ fortgeschritten Cytolyse noch zu identifizieren.

Gleichzeitig mit dem Auftreten der Nekrosen kommt es zu einer stärkeren Entfaltung von Blut- und Lymphcapillaren, so daß die untergehenden Zellen oft von solchen Gefäßen umschlossen werden (Abb. 7). Bei ausgedehnten Schädigungen zeigen die erhalten gebliebenen B-Zellen im Gegensatz zu den A-Zellen (Abb. 8) neben einem Schwund der Granula zunehmend tubuläre Strukturen, Vesikeln und Vacuolen im Cytoplasma. Vom dritten Tage nach der Infektion an konnten wir zwischen den Inselzellen Infiltratzellen mit phagocytären Eigenschaften beobachten. Dabei handelt es sich zum Teil um Leukocyten (Abb. 9), zum Teil auch um monocytäre Zellen, die sich durch cytosomale Einschlüsse und die Entwicklung lamellärer Korpuskeln oder sog. Myelinfiguren auszeichnen. In schwer geschädigten Inseln fanden wir oft nur noch einzelne, völlig intakt erscheinende A-Zellen zwischen zahlreichen nekrotischen Parenchymzellen, Infiltratzellen und stark entfalteten, nahe aneinander gerückten Lymph- und Blutcapillaren (Abb. 10).

Auch in den von den nekrotisierenden Vorgängen verschont gebliebenen Inseln lassen sich vom zweiten bis dritten Tage nach der Infektion an und je nach Ausmaß der Inselschädigung noch Wochen bis Monate über die akute Infektionsphase hinaus Veränderungen an den B-Zellen nachweisen. Diese betreffen im Gegensatz zu den bisher beschriebenen, herdförmig vorkommenden Schädigungen

Abb. 1a—c. Pankreas der weißen Maus nach subcutaner Infektion mit EMC-Viren. a Insulitis und nur geringe interstitielle Pankreatitis 6 Tage nach Infektion mit der M-Variante. HE, Vergr. 200fach. b Starke interstitielle Pankreatitis mit Übergreifen der Entzündung auf eine Langerhanssche Insel 5 Tage nach Infektion mit der E-Variante. HE, Vergr. 310fach. c Schwere nekrotisierende Pankreatitis und weitgehend erhaltene Langerhanssche Insel 7 Tage nach Infektion mit der E-Variante. HE, Vergr. 310fach

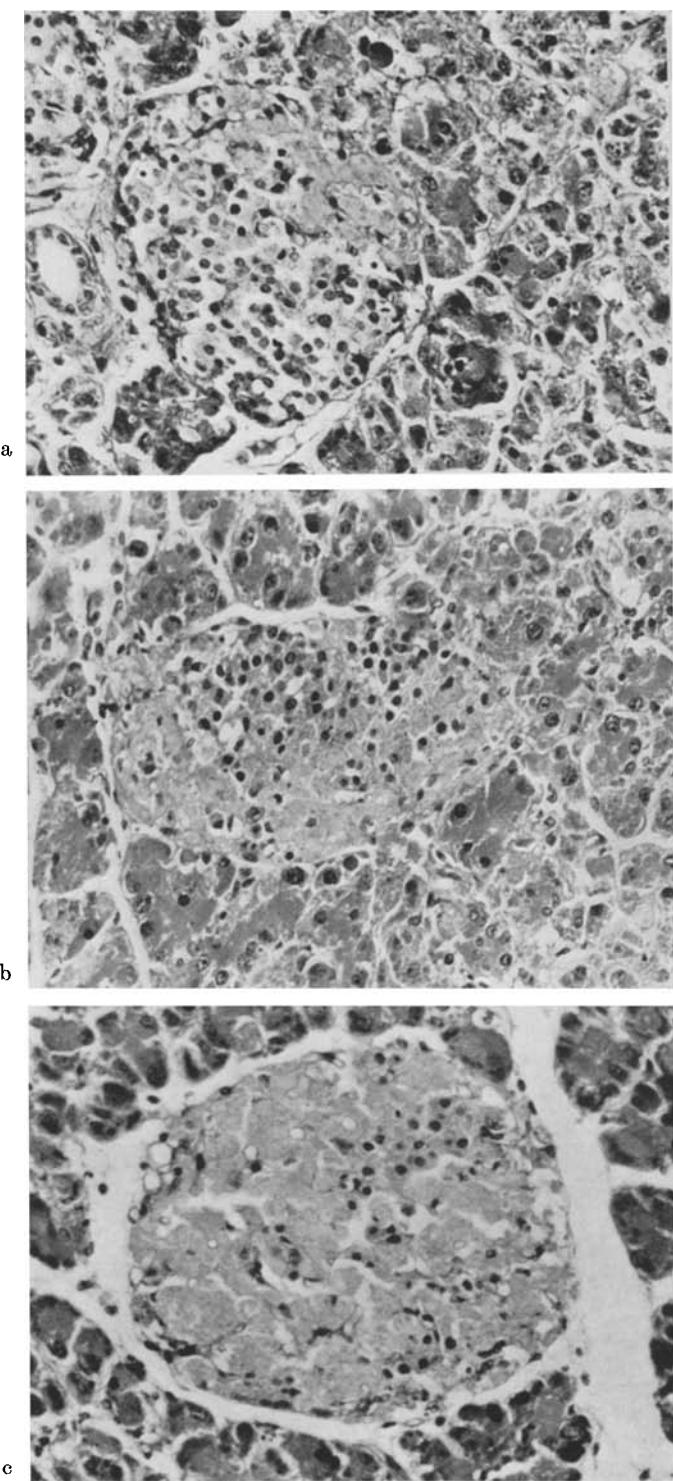


Abb. 2a—c

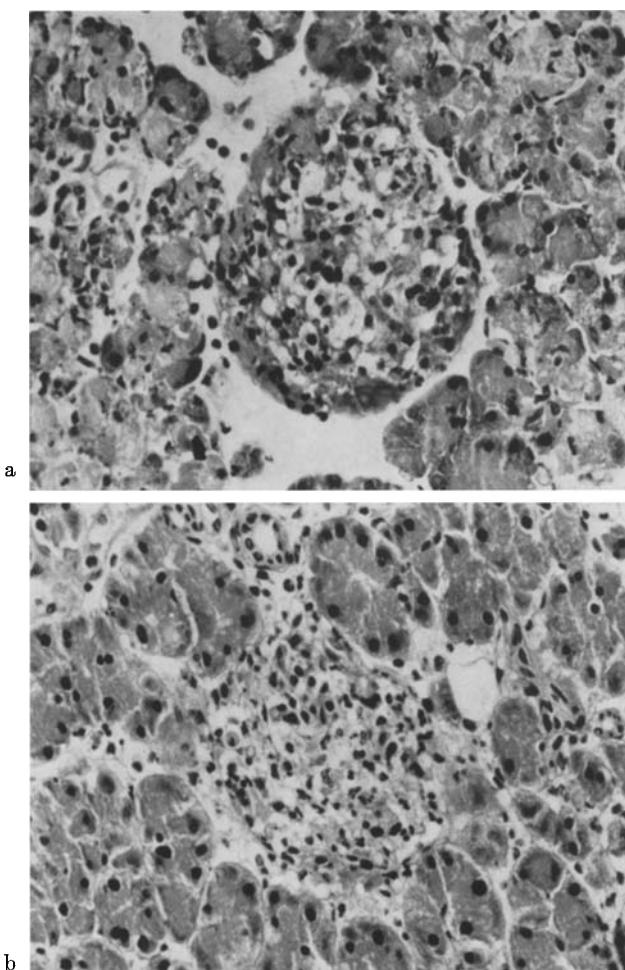


Abb. 3a u. b. Verschieden stark ausgeprägte Inselzellnekrosen und Insulitis der weißen Maus 3 Tage (a) und 4 Tage (b) nach subcutaner Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus, HE, Vergr. 310fach

meistens den gesamten restlichen Zellbestand. Auffällig ist vor allem eine Verarmung an Sekretgranula. Die wenigen restlichen Granula sind in die Nähe der Zellmembran verlagert (Abb. 11). Das rauhe endoplasmatische Reticulum ist vermehrt. Die Ribosomen liegen dicht gepackt den endoplasmatischen Membranen an oder auch frei im Cytoplasma. Stellenweise hat man den Eindruck, daß die Mitochondrien ebenfalls vermehrt vorkommen. Fast immer ist die Golgizone ver-

Abb. 2a—c. Verschieden stark ausgedehnte Nekrosen von Langerhansschen Inseln der weißen Maus 3 Tage (a, b) und 4 Tage (c) nach subcutaner Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. HE, Vergr. 310fach

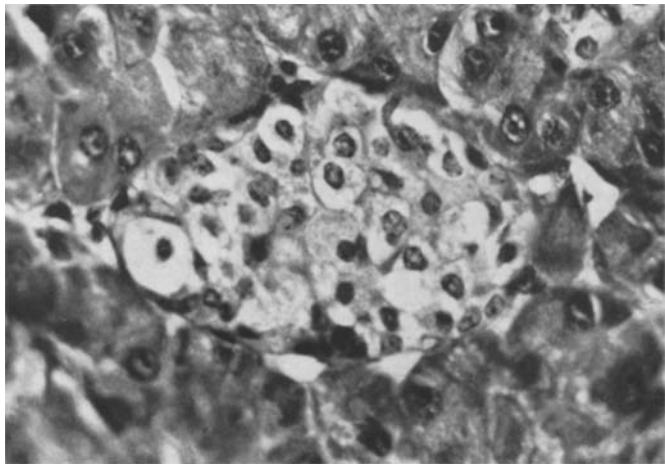


Abb. 4. Entgranulierung, Schwellung und Kernhypochromasie der B-Zellen einer intakt gebliebenen Langerhansschen Insel der weißen Maus bei durch die M-Variante des EMC-Virus induziertem Diabetes mellitus. Modifizierte Aldehydfuchsin-Trichrom-Färbung, 8 Tage nach Infektion. Vergr. 500fach

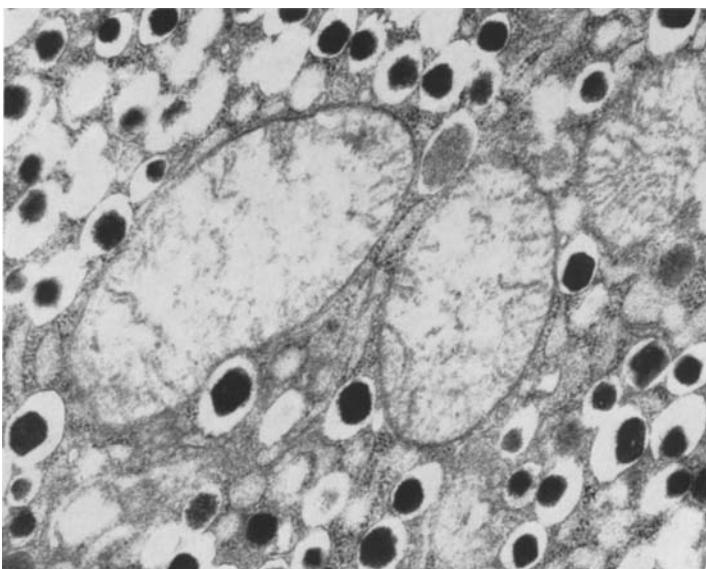


Abb. 5. Hydropische Schwellung der Mitochondrien einer B-Zelle der weißen Maus mit Schwund der Cristae 24 Std nach subcutaner Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Elektr.-mikr. Vergr. 10400fach, Endvergr. 40500fach

breitert (Abb. 12). Zwischen den Cisternen des Ergastoplasmas findet man vor allem bei Versuchstieren mit stärker ausgeprägtem Diabetes-Syndrom, aber auch bei solchen, die nur eine vorübergehende Glucosurie aufwiesen, vermehrt feine tubuläre Strukturen, Vesikeln und zum Teil auch kleine bis grobe Vacuolen. Im

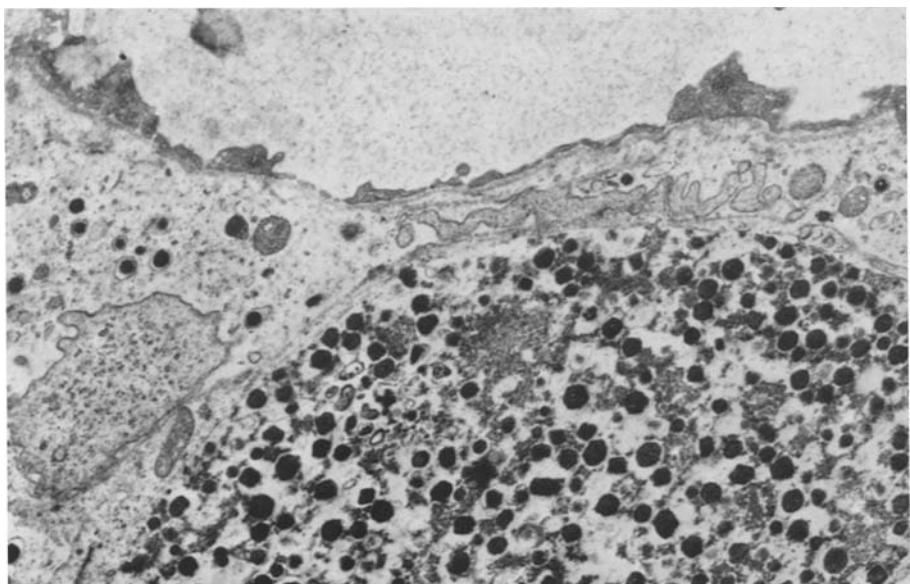


Abb. 6. Schwer geschädigte A-Zelle (rechts) und untergehende B-Zelle (links) mit noch identifizierbaren Granula neben einer dilatierten Blutcapillare (oben) 4 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Elektr.-mikr. Vergr. 3400fach, Endvergr. 13300fach

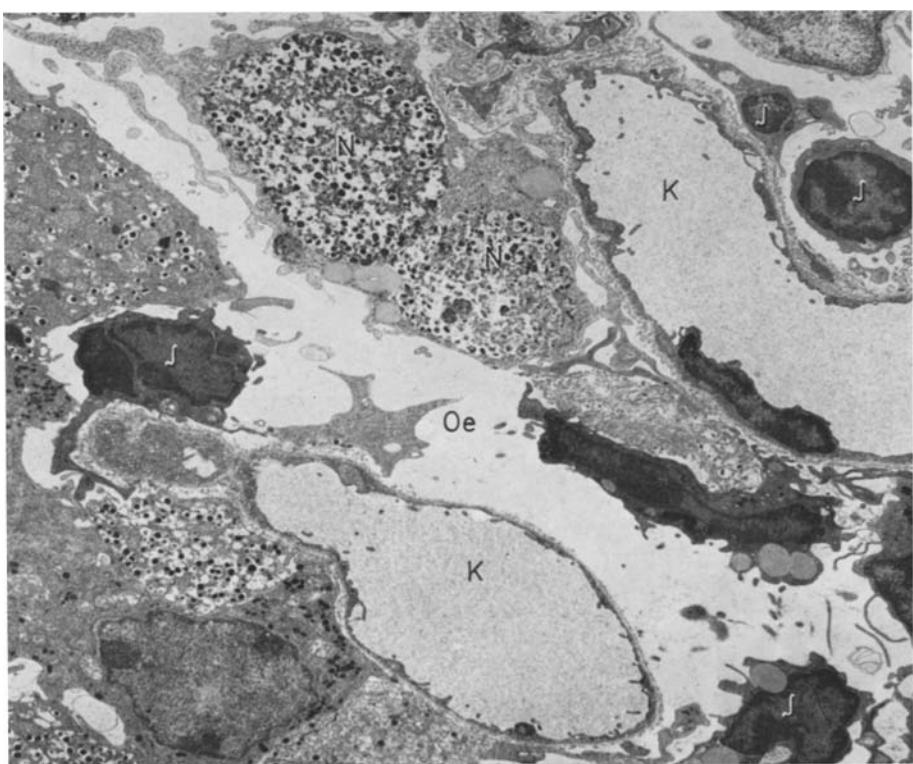


Abb. 7. Inselzellnekrosen (N), hochgradiges interstitielles Ödem (Oe) und entzündliche Infiltrate (I) sowie dilatierte Blutcapillaren (K) in einer Langerhansschen Insel 3 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Elektr.-mikr. Vergr. 1850 fach, Endvergr. 4755fach

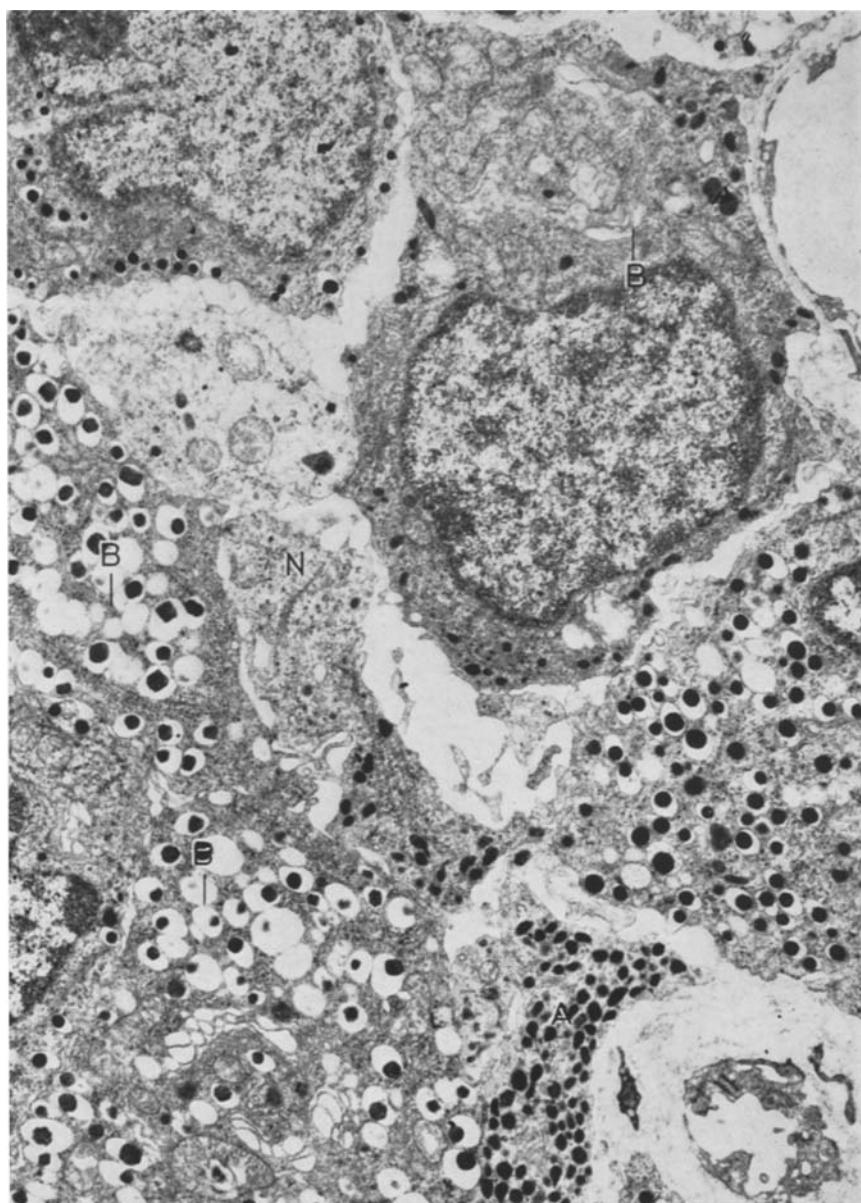


Abb. 8. Inselzellnekrosen (N) 6 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Weitgehende Entgranulierung ($B\uparrow$) und Bildung von tubulären Strukturen und Vesikeln im Cytoplasma der erhalten gebliebenen B-Zellen ($B\downarrow$). Erhaltene A-Zellen ohne sekundäre Veränderungen (A). Elektrkr.-mikr. Vergr. 1850fach, Endvergr. 10545fach

Gegensatz zu den B-Zellen sahen wir außerhalb der akuten Infektionsphase an den A-Zellen keine sicheren pathologischen Veränderungen. Neubildungen von Inselzellen, Mitosen oder sichere Transformationen konnten wir in den 60 bisher elektronenoptisch untersuchten Fällen ebenfalls nicht beobachten.

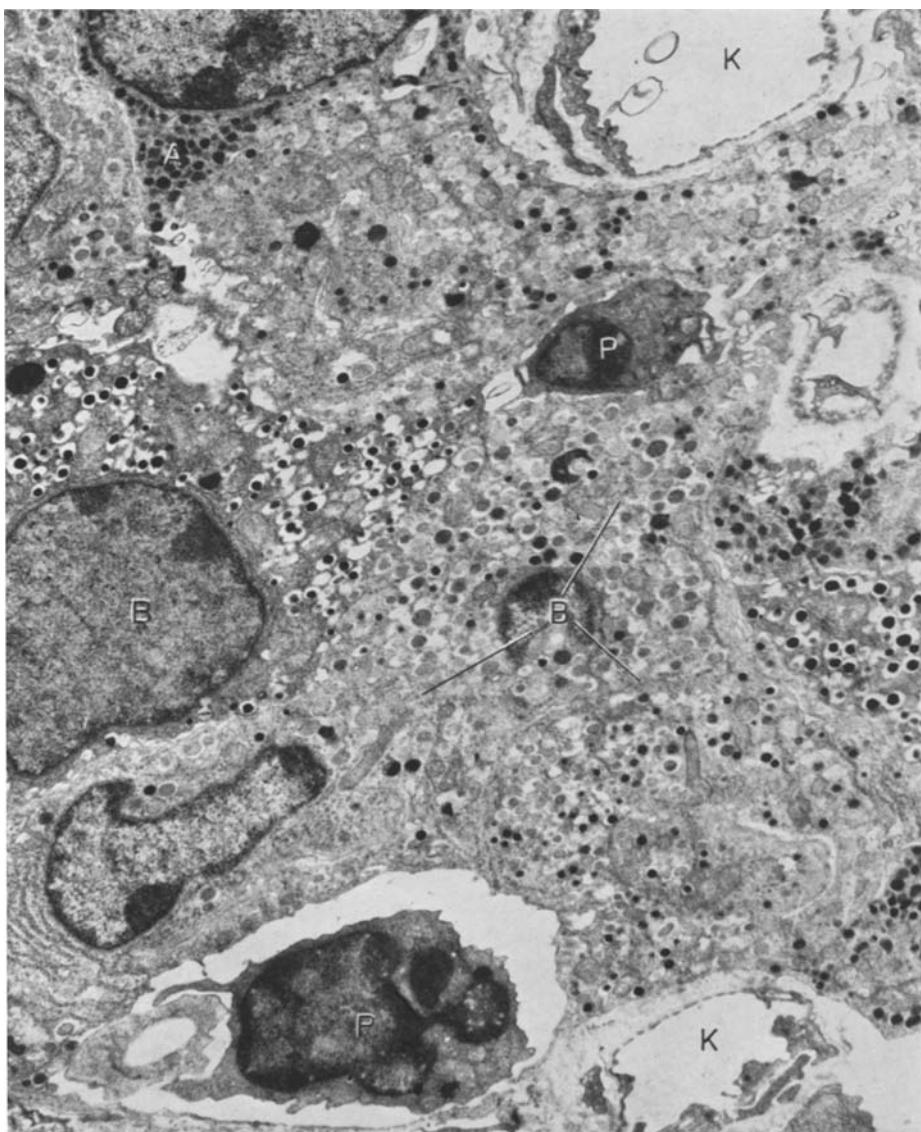


Abb. 9. Phagocyten (P) zwischen herdförmig entgranulierten B-Zellen (B) und intakten A-Zellen (A) einer Langerhansschen Insel 12 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Elektr.-mikr. Vergr. 2500fach, Endvergr. 8625fach

Quantitative Befunde⁵

Im Gegensatz zu den Kontrolltieren zeigen zwar sämtliche infizierten Tiere mikroskopische Schädigungen, aufgrund der qualitativen Untersuchungen allein lassen sich aber Tiere mit Diabetes-Syndrom und solche mit nur vorübergehender

⁵ Die Zahlenwerte der umfangreichen Messungen, Zählungen und statistischen Berechnungen können beim Verfasser eingesehen, in Auszügen auch angefordert werden.

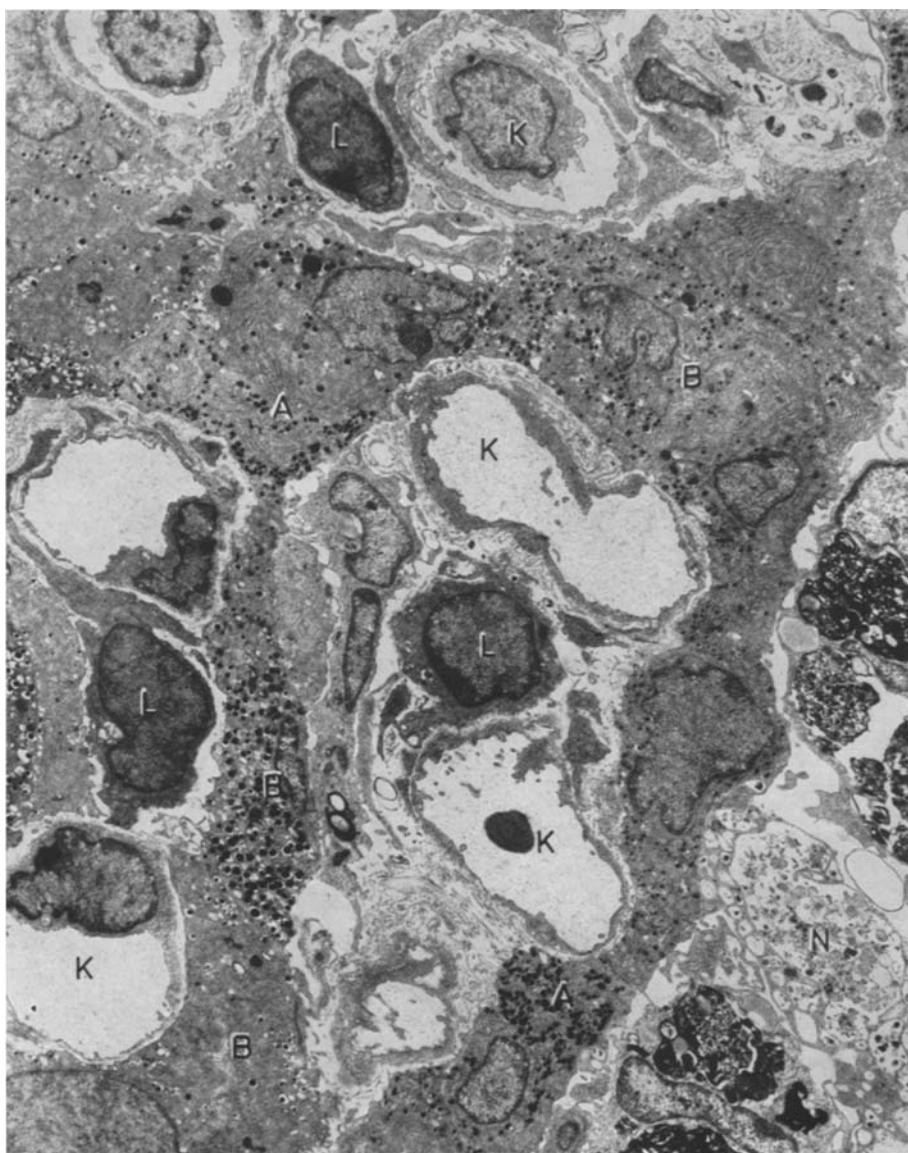


Abb. 10. Spärliche als Rest verbliebene A- und B-Zellen einer Langerhansschen Insel zwischen entfalteten Blutcapillaren (K), ausgetretenen lymphocytoiden Zellen (L) und größeren Nekrosen (N) 5 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Elektr.-mikr. Vergr. 1800fach, Endvergr. 4460fach

Störung des Zuckerstoffwechsels nicht sicher unterscheiden; denn die feingeweblichen Veränderungen der Langerhansschen Inseln und auch des exkretorischen Drüsengewebes waren bei allen Versuchsgruppen qualitativ weitgehend gleich.

Auch die quantitative Analyse der jeweils registrierten histologischen Merkmale gab keinen Hinweis auf den Grad der Funktionsstörung. Für Männchen, Weib-

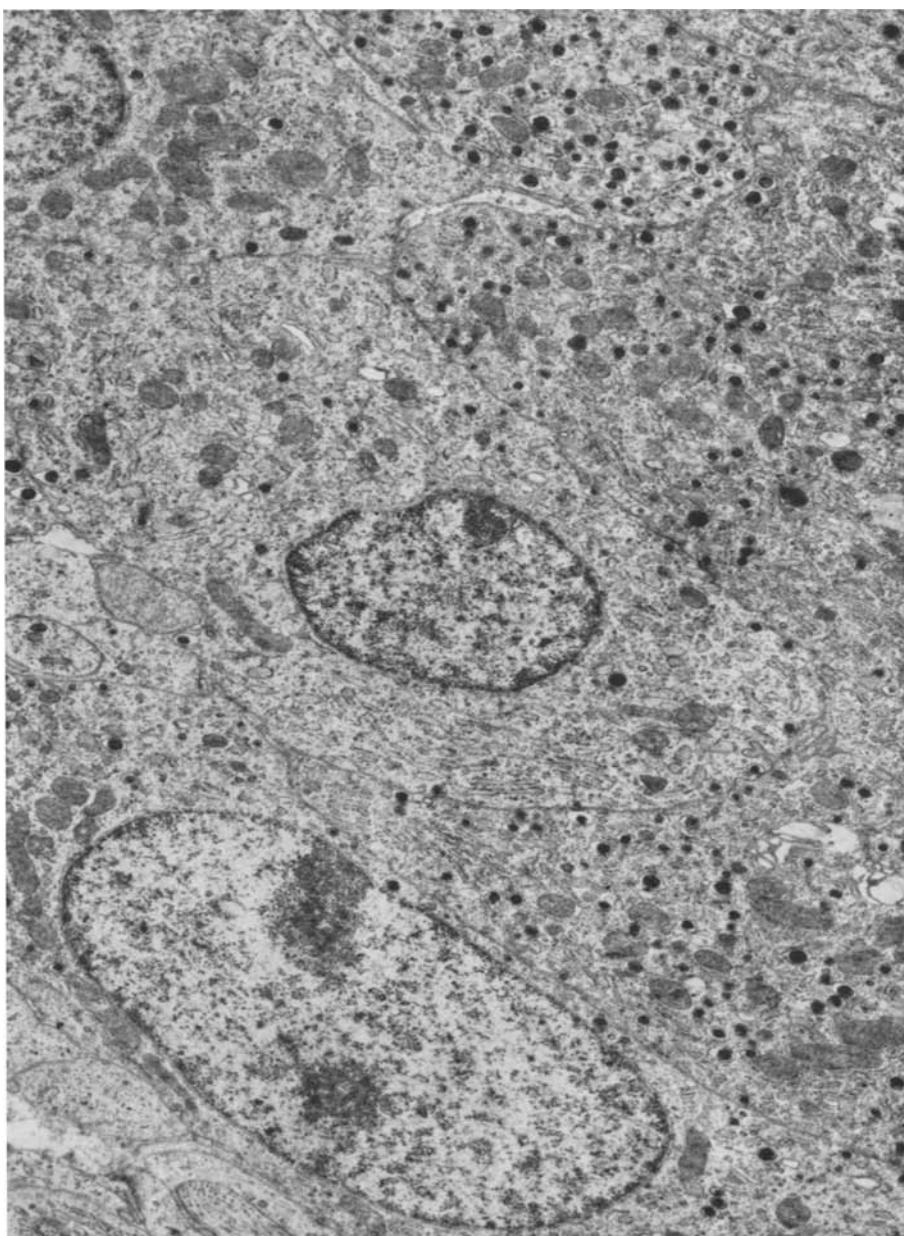


Abb. 11. B-Zellen einer Langerhansschen Insel der weißen Maus bei Diabetes mellitus 7 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Weitgehende Entgranulierung, zum Teil mit Verlagerung der restlichen Granula an die Zellmembran. Vermehrung des endoplasmatischen Reticulums und der Mitochondrien. Elektr.-mikr. Vergr. 4200fach, Endvergr. 10416fach

chen, Tiere mit und ohne Diabetes-Syndrom und auch für Tiergruppen, die mit der E-Variante und solche, die mit der M-Variante des EMC-Virus infiziert worden waren, ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeits-

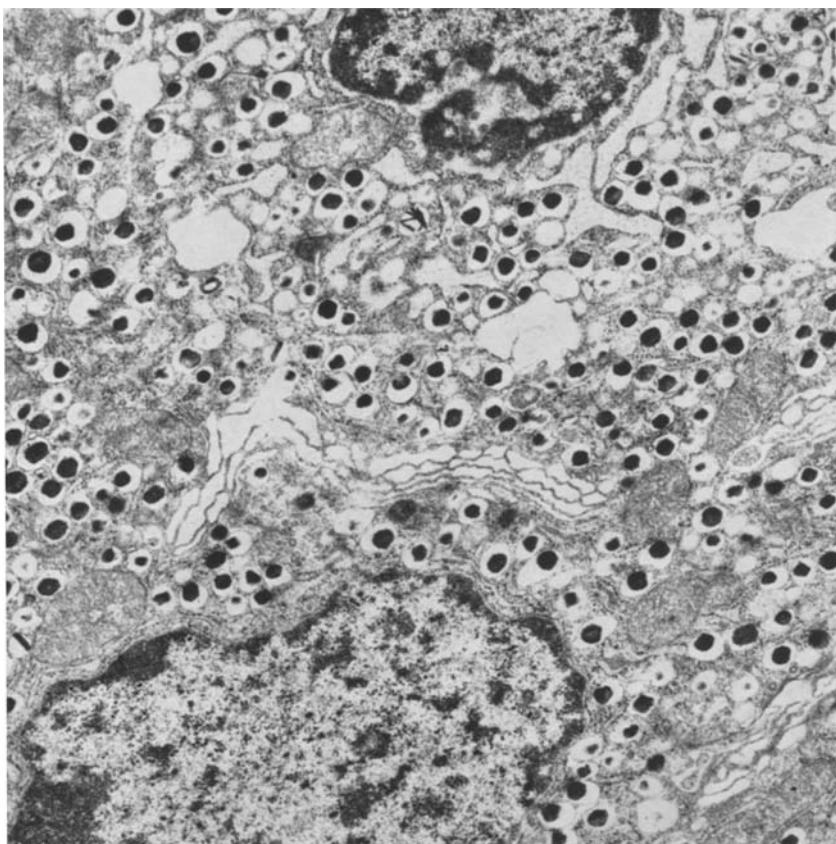


Abb. 12. Verbreiterung der Golgizone sowie Bildung von Vesikeln und Vacuolen in den erhalten gebliebenen B-Zellen einer Langerhansschen Insel 2 Tage nach Infektion mit der M-Variante des EMC-Virus. Elektr.-mikr. Vergr. 3400fach. Endvergr. 13400fach

Verteilung der feingeweblichen Veränderungen nachweisen. Aufschlußreich war diese Untersuchung dagegen im Hinblick auf den Ablauf des Infektionsgeschehens. Tabelle 1 zeigt die Häufigkeit des Vorkommens der wichtigsten Merkmale im Verlauf der Infektionskrankheit. Man erkennt, daß innerhalb der ersten drei Tage nach der Infektion 100%, nach mehr als 30 Tagen immerhin noch 83% der Versuchstiere pathologische Veränderungen der Bauchspeicheldrüse aufweisen. Die Art der Schädigung ist in den einzelnen Phasen jedoch unterschiedlich. So finden sich in den ersten Tagen überwiegend akute entzündliche Veränderungen wie Hyperämie, Ödem, zellige Infiltrate und Nekrosen. Diese nehmen aber rasch wieder an Häufigkeit ab. Nach dem 15. Tage haben wir beispielsweise Nekrosen und Infiltrate nicht mehr beobachtet. Ein besonders empfindliches aber unspezifisches Schädigungsmerkmal ist die Veränderung der B-Zellen-Granula. Sie waren in allen untersuchten Stadien in etwa 40—90% der Fälle vermindert. Seltener, in ihrer Häufigkeit aber mit wachsendem zeitlichem Abstand von der Infektion deutlich ansteigend, fanden wir Schädigungen der Inseln, wie sie von zahlreichen

Tabelle 1. Häufigkeit des Vorkommens der wichtigsten histologischen Veränderungen am Pankreas nach Infektion mit EMC-Viren

Tage nach Infektion	1-3			4-7			8-10			11-14			15-30			mehr als 30	
	7 100%			56 100%			26 100%			31 100%			52 100%			47 100%	
	Anzahl % der Tiere																
Gesamtzahl der Versuchstiere	7	100%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A. Langerhansche Inseln	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nekrosen	5	71,4	41	73,2	18	69,2	16	51,6	5	9,6	—	—	—	—	—	—	—
Ödem	3	42,8	19	33,9	7	26,9	8	25,8	1	1,9	2	4,2	—	—	—	—	—
Leukozyten-Infiltrate	1	14,2	21	37,5	5	19,2	2	6,4	2	3,8	—	—	—	—	—	—	—
Lymphozyten-Infiltrate	1	14,2	20	35,7	10	38,4	4	12,9	4	7,6	—	—	—	—	—	—	—
Hyperämie	4	57,1	16	28,5	9	34,6	13	41,9	6	11,5	9	19,1	—	—	—	—	—
Hydrostatische Degeneration	4	57,1	15	26,7	14	53,8	21	67,7	19	36,5	16	34,0	—	—	—	—	—
Vacuolare Degeneration	4	57,1	24	42,8	14	53,8	21	67,7	10	19,2	10	21,2	—	—	—	—	—
Eintrundung	—	—	9	16,0	8	30,7	8	25,8	19	36,5	18	38,2	—	—	—	—	—
Kernschwellung und Hypochromasie	1	14,2	2	3,5	1	3,8	5	16,1	6	11,5	11	23,4	—	—	—	—	—
Vergroßerte Nukleolen	—	—	2	3,5	—	—	—	—	—	—	3	6,3	—	—	—	—	—
Riesenkerne vermehrt	—	—	—	—	1	3,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mitosen vermehrt	—	—	2	3,5	1	3,8	—	—	2	3,8	3	6,3	—	—	—	—	—
Retikulinfasern vermehrt	—	—	—	—	3	11,5	3	9,6	6	11,5	13	27,6	—	—	—	—	—
Degranulierung	3	42,8	50	89,2	24	92,3	25	80,6	22	42,3	25	53,1	—	—	—	—	—
Inselhyperplasie	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	6,3	—	—	—	—	—
Confluens von Inseln	—	—	14,2	3	5,3	1	3,8	1	3,2	2	3,8	1	2,1	—	—	—	—
Riesen-Inseln	1	—	3	5,3	—	—	1	3,2	2	3,8	7	14,8	—	—	—	—	—
Urschärfte Inselkonturen	—	—	—	—	3	11,5	4	12,9	7	13,4	1	2,1	—	—	—	—	—
Singuläre B-Zellen vermehrt	—	—	—	3	5,3	2	7,6	5	16,1	10	19,2	14	29,7	—	—	—	—
Ausbildung von Gang-Inseln	—	—	—	3	7,1	6	23,0	7	22,5	7	13,4	10	21,2	—	—	—	—
Ganghyperplasie	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Endokrines Pankreas	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nekrosen	3	42,8	39	69,6	12	46,1	17	54,8	4	7,6	—	—	—	—	—	—	—
Ödem	4	57,1	39	69,6	18	69,2	16	51,6	7	13,4	2	4,2	—	—	—	—	—
Leukozyten-Infiltrate	3	42,8	33	58,9	10	38,4	13	41,9	1	1,9	—	—	—	—	—	—	—
Lymphozyten-Infiltrate	3	42,8	32	57,1	11	42,3	13	41,9	1	1,9	—	—	—	—	—	—	—
Hyperämie	2	28,5	8	14,2	4	15,3	5	16,1	2	3,8	2	4,2	—	—	—	—	—
Tiere mit pathologischen Veränderungen	7	100,0	55	92,2	26	100,0	31	100,0	41	78,8	39	82,9	—	—	—	—	—

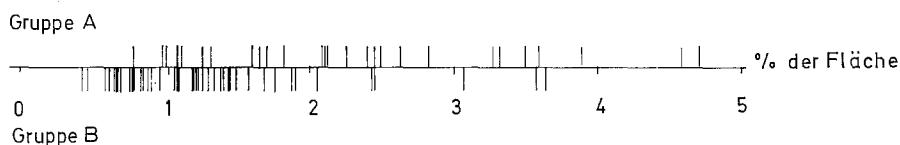


Abb. 13. Prozentualer Anteil der Fläche der Langerhansschen Inseln an der Gesamtfläche des Pankreas in histologischen Schnittpräparaten bei 27 Kontrolltieren (A) und 42 Versuchstieren nach Infektion mit der E-Variante des EMC-Virus (B)

Untersuchern bei Diabetes mellitus verschiedener Genese (Seifert, 1959; Ferner, 1952) und bei Experimenten als Folge der Überbeanspruchung (Boquist, 1970; Kracht, 1959; Lacy, 1967; Like, 1970, 1969; Freytag u. Mitarb., 1969) des B-Zellen-Systems beschrieben worden sind, nämlich Vacuolisierung des Cytoplasmas, Schwellung der Kerne mit Hypochromasie, Schwellung der Nucleolen, Riesenkernbildung, Erhöhung der Mitoserate, Fibrosierung, Entrundung, Hypertrophie und Konfluenz von Inseln sowie Proliferation singulärer B-Zellen, Vergrößerung des Gangorganes und Ausbildung sog. Ganginseln.

Die durch Messung des Inselapparates gewonnenen Daten lassen ebenfalls keine Rückschlüsse auf das Ausmaß der Funktionsstörung zu. Der Anteil des Inselgewebes am gesamten Pankreas beträgt bei Normaltieren im Mittel 2,32%, bei Tieren mit virusinduziertem Diabetes-Syndrom 2,31%. Auch für die verschiedenen Stadien des Ablaufes der Infektion ließen sich keine signifikanten Änderungen des prozentualen Flächenanteils des Inselgewebes nachweisen.

Einen verkleinerten Inselapparat fanden wir dagegen bei den Tieren, die mit der E-Variante des EMC-Virus infiziert worden waren. Sein Anteil betrug nur 1,36%; der entsprechende Wert für die Tiere, die mit der M-Variante infiziert worden waren, betrug dagegen 2,55%. Dieser Befund braucht jedoch nicht in Widerspruch zu unserer Erfahrung zu stehen, daß die E-Variante eine geringere Affinität zum Inselapparat habe. Da nämlich bei der Infektion mit der M-Variante vorwiegend das Inselgewebe geschädigt wird und meistens nur einzelne Zellen oder Zellgruppen betroffen sind, bleibt die ursprüngliche Größe und Form der Inseln trotz schwerer pathologischer Veränderungen in der Regel noch erhalten. Durch die E-Variante wird dagegen das exokrine Drüsengewebe besonders stark geschädigt. Wenn die Entzündung auch auf die Inseln übergreift (Abb. 1b), so werden diese immer von der Peripherie her erfaßt und dadurch verkleinert. Für diese Erklärung spricht auch Abb. 13: Während der prozentuale Flächenanteil des Inselgewebes bei den einzelnen Tieren des Normalkollektivs innerhalb der gefundenen Spannweite eine ziemlich gleichmäßige Verteilung aufweist, kommen bei dem mit der E-Variante infizierten Kollektiv kleinere Meßwerte vor und es findet sich bei kleinerer Spannweite eine deutlich schiefe Verteilung der prozentualen Flächenanteile.

Ursache dieses Befundes ist mit großer Wahrscheinlichkeit die vollständige Zerstörung der kleinen Inseln. Aus methodischen Gründen haben wir die Inseln mit einem kleineren Durchmesser als 30 μ bei den Messungen aber nicht berücksichtigt und können deshalb nicht sicher beurteilen, ob die Inselgröße überhaupt einer Normalverteilung folgt. Zum statistischen Vergleich der Werte für die Fläche des Inselparenchyms und die Inseldichte, die ebenfalls nicht notwendig

normalverteilte Meßgrößen darstellen, haben wir den Wilcoxon (Rangsummen-) Test für zwei Stichproben angewendet. Dabei ergab sich eine signifikante Minde rung des Inselparenchyms für die mit der E-Variante infizierten Tiere. Da dieses Virus gleichzeitig auch eine starke Schädigung des exokrinen Drüsengewebes verursacht, kommt es verständlicherweise zu keiner wesentlichen Veränderung der Inseldichte.

Das Inselgewebe besteht normalerweise im wesentlichen aus A- und B-Zellen. Von zahlreichen Untersuchern ist deshalb als Maß für quantitative Veränderungen des Inselzellbildes die A-B-Zellen-Relation bestimmt worden (Seifert, 1954). Sie gibt Aufschluß über die Zu- oder Abnahme einer der beiden Zellarten. Da in unseren Experimenten aber A- und B-Zellen gleichermaßen durch die Viren betroffen sein können, braucht eine Änderung der A-B-Zellen-Relation trotz schwerer Schädigungen nicht einzutreten. Außerdem kommen Veränderungen des Zwischengewebes wie Hyperämie, Gefäßproliferationen, und Bindegewebsvermehrungen, sowie durch nekrotisierende Vorgänge entstandene Lücken vor, die für die Beurteilung des quantitativen Inselbildes wichtig sind. Wir haben deshalb mit Hilfe des Integrationsoculares in den Inseln außer den jeweiligen Anteilen an A- und B-Zellen noch den restlichen Flächenanteil bestimmt.

Erwartungsgemäß gab die Bestimmung der A-B-Zellen-Relation keinen Aufschluß über den Grad der Schädigung. Das Ausbleiben von Änderungen der Relation bestätigte darüber hinaus, daß keines der verwendeten Viren eine unterschiedlich starke Affinität zu einer der beiden Zellarten besitzt. Eindeutig ist dagegen die Vermehrung des Zwischengewebes und der Lücken in den Inseln in Übereinstimmung mit der Zunahme des Schweregrades der viralen Schädigung. Der Anteil betrug bei der Kontrollgruppe im Mittel 0,69%, bei den mit der E-Variante infizierten Tieren 2,43%, bei den Tieren mit Diabetes-Syndrom jedoch 6,40%.

Diskussion

Das EMC-Virus hat einen mittleren Durchmesser von $20\text{ }\mu$ und entspricht damit in Größe und Form weitgehend den Ribosomen (Hinz u. Mitarb., 1962). Es ist deshalb in der Zelle nur dann sicher nachweisbar, wenn es in Form sog. Kristalle vorliegt, in denen zahlreiche Viruspartikel in geometrischer Anordnung vereinigt sind. Derartige Kristalle, die schon in der infizierten Gewebekultur nur an wenigen Stellen vorkommen, sind aber im Gewebe offenbar extrem selten, so daß wir sie im Pankreas elektronenoptisch bisher nicht beobachten konnten.

Nach Anlage unserer Experimente besteht aber auch ohne den morphologischen Virusnachweis kein Zweifel an dem ursächlichen Zusammenhang zwischen der Virusinfektion und den beschriebenen Gewebeveränderungen. Eine zusätzliche Bestätigung liegt darin, daß die encephalotrope (E-)Variante und die myokardiotrope (M-)Variante des EMC-Virus infolge ihres auch im Pankreas unterschiedlichen Tropismus zu differenten Gewebeschädigungen führen. Da nämlich die übrigen Versuchsbedingungen bei der Infektion mit beiden Varianten identisch waren, können die jeweils erzielten Veränderungen gleichsam als Kontrollbefunde herangezogen werden.

Bei der nun folgenden Erörterung der Untersuchungsergebnisse möchten wir so vorgehen, daß wir die erhobenen Befunde jeweils mit experimentellen Ergebnissen aus der Literatur und nach Möglichkeit auch mit Befunden aus der Humanpathologie vergleichend diskutieren.

Die nach Infektion mit der E-Variante nachgewiesenen Schädigungen sind nicht spezifisch für dieses Virus. Ähnliche Befunde wurden auch nach Infektion mit anderen Viren wiederholt erhoben: Mit einem EMC-Virus erzielte Craighead (1965) ausgedehnte Nekrosen des exokrinen Pankreasparenchyms. Pappenheimer u. Mitarb. gelang es 1951, durch Passagen von Cox-

sackie-Viren des Connecticut-5-Stammes in erwachsenen weißen Mäusen Läsionen des Pankreas unter Aussparung der Inseln und der Ausführungsgänge zu erzeugen. Dalldorf und Gifford (1951) gewannen durch Passagen in der Bauchspeicheldrüse erwachsener Mäuse Coxsackie-Viren der Gruppe B mit spezifischem Gewebetropismus, die entsprechende morphologische Veränderungen hervorriefen. Nach Infektion 3 Wochen alter Mäuse mit Maul- und Klauenseuche-Viren sah Platt (1956) ebenfalls ausgedehnte Schädigungen der Acinuszellen. Alle diese Autoren beobachteten übereinstimmend eine deutlich unterschiedliche Affinität der Viren zum endokrinen und exokrinen Anteil des Pankreas. Trotz schwerer Pankreatitis wird der Insellapparat gar nicht oder nur so gering geschädigt, daß meistens nur vorübergehende Störungen des Zuckerstoffwechsels resultieren.

Auch beim Menschen sind derartige vorübergehende Funktionsstörungen des Inselsystems durch akute Entzündungen der Bauchspeicheldrüse beobachtet worden. Körthe (1911) berichtete über Glucosurien bei sechs von 44 Patienten mit akuter Pankreatitis. Schumacher (1947) fand bei 700 Fällen von akuter Pankreatitis aus der Literatur in 11% Glucosurien. Bell (1958) beobachtete bei 35 von 102, Dannhauser (1954) bei 28 von 86 Patienten mit Pankreatitis eine Glucosurie. Auch eine Reihe anderer Autoren machten ähnliche Beobachtungen (Egdahl, 1907; Sebening, 1927; Bernhard, 1931; Mahner, 1937).

Noch häufiger als Glucosurien sind Hyperglykämien bei schwerer Pankreatitis beschrieben worden (Weede, 1930; Brogg und Varangot, 1937; Bernhard, 1928; Goldmann, 1932; Fallis, 1951). Besonders bei Mumps sollen vorübergehende Hyperglykämien aufgetreten sein (Kirschfeld, 1936; Cremer, 1947). Die Zahl der Diabetiker, die eine Pankreatitis überstanden haben, ist aber sehr gering. Nach Schumacher (1958) kommt es bei höchstens 2% der Fälle von akuter Pankreatitis zu einem permanenten Diabetes mellitus. Dabei muß man noch die Möglichkeit einkalkulieren, daß durch die Pankreatitis lediglich ein präexistenter latenter Diabetes manifest wurde (Sprague, 1947). Bell (1958) stellte bei 2089 Fällen von Diabetes nur 18mal ein Zusammentreffen mit Pankreatitis fest. Warren und LeCompte (1952) vermuten jedoch, daß die Zahl der durch eine Pankreatitis entstehenden Diabetes-Syndrome nur deshalb so klein ist, weil eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die so ausgedehnt ist, daß eine funktionell bedeutsame Anzahl der Langerhansschen Inseln mitgeschädigt wird, in der Regel zum Tode führt. Diese Ansicht würde mit unseren morphologischen Befunden nach Infektion mit der E-Variante gut in Einklang zu bringen sein. Wie Abb. 1c belegt, fanden wir nämlich machmal auch dann noch weitgehend intaktes Inselgewebe, wenn schon das gesamte exokrine Parenchym zerstört und dadurch ein Überleben der Tiere nicht möglich war. Die quantitativen Untersuchungen ergaben sogar, daß trotz einer signifikanten absoluten und relativen Verkleinerung des Inselorganes kein Diabetes-Syndrom auftrat. Eine für die Entstehung des Diabetes mellitus ausreichende Schädigung der Inseln ist deshalb im Rahmen einer Pankreatitis nur selten zu erwarten. Selbst bei den häufiger zitierten Berichten über die Entstehung des Diabetes mellitus nach Mumps mit Pankreasbeteiligung handelt es sich um im Vergleich zur allgemeinen Häufigkeit der Infektion seltener Einzelfälle (Cremer, 1947; McCrae, 1963).

Als häufige Ursache des Diabetes erscheint dagegen aufgrund der unterschiedlichen Disposition von exokrinem und endokrinem Parenchym zu viralen Infektionen eine isolierte Schädigung der Inseln im Pankreas durchaus denkbar. Klinisch sind solche Inselschäden jedoch außerordentlich schwer zu erfassen, da

außer Störungen des Zuckerstoffwechsels keine charakteristischen Befunde zu erwarten sind. Auch die Isolierung insulotroper Viren aus dem Pankreas ist wegen der unvermeidbaren Kontamination durch exokrines Gewebe kaum möglich. Aus diesem Grunde kommt den Experimenten von Craighead und Shelokov (1961) sowie Craighead (1965, 1966) große Bedeutung zu, denen es gelang, durch Passagen in weißen Mäusen und Virus-Rückgewinnung aus bestimmten Organen die zwei verschiedenen Varianten des EMC-Virus zu gewinnen; denn es stellte sich heraus, daß die encephalotrope (E-)Variante gleichzeitig auch pankreotrop, die myokardiotrope (M-)Variante dagegen gleichzeitig insulotrop war und weitgehend isolierte Inselschäden in Form von Nekrosen hervorrief, die häufig mit einer Hyperglykämie und Glucosurie einhergingen (Craighead und McLane, 1968; From u. Mitarb., 1968; Craighead und Steinke, 1971; Müntefering u. Mitarb., 1971).

Durch unsere Experimente mit der M-Variante des EMC-Virus konnten wir diese Befunde bestätigen (Abb. 2). Darüber hinaus ergaben die systematischen histomorphologischen Untersuchungen am 3.—15. Tage, vorwiegend aber am 4.—7. Tage nach der Infektion eine Insulitis mit schüttenden bis dichten Infiltrationen zahlreicher, jedoch nicht sämtlicher Inseln durch einkernige Rundzellen und vereinzelte polymorphe Leukocyten. Die in den geschädigten Inseln noch vorhandenen sekretorischen Zellen waren ohne Granula, vergrößert und wiesen plumpe rundliche bis walzenförmige Kerne auf.

Vergleichbare entzündliche Inselveränderungen wurden tierexperimentell lediglich durch Immunreaktion erzeugt, und zwar durch Injektion von Fremdinsulin oder durch Gaben von Antiinsulin-Seren bzw. daraus gewonnenen Immunpräcipitaten (Seifert, 1966; Freytag und Klöppel 1969, Lit. s. dort).

Unsere Befunde stellen aber auch auffällige Parallelen zu den Inselveränderungen dar, die wiederholt bei menschlichen Fällen von juvenilem Diabetes mit raschem, zum Tode führendem Krankheitsverlauf beschrieben worden sind (Schmidt, 1902; Cecil, 1909; Heilberg, 1911; Fischer, 1915; Kraus, 1929; Warren, 1927; LeCompte, 1958; Steiner, 1968). Besonders charakteristisch ist die kurze Dauer der entzündlichen Erscheinungen. LeCompte (1958) sieht darin die Ursache für das Fehlen der Insulitis bei Fällen mit weniger raschem Krankheitsverlauf. Auch Steiner (1968) nimmt an, daß die Insulitis wahrscheinlich keine Sonderform des juvenilen Diabetes, sondern eine bei den heutigen günstigen Therapiemöglichkeiten und den dadurch bedingten besseren Überlebenschancen nur selten morphologisch erfassbare Initialform darstellt.

Auffällig ist ferner die Aussparung einzelner Inseln. Sie läßt ebenso wie die Tendenz zum Schwund von Zellen in den betroffenen Inseln daran denken, daß pathogenetisch auch bei juvenilem Diabetes eine gegen bestimmte Zellen oder Zellgruppen und nicht gegen das Insulin gerichtete Schädigung das Krankheitsgeschehen zumindest einleite (Steiner, 1958).

Deutlicher noch als die qualitativen Untersuchungen zeigte in unserem Experiment die quantitative Analyse der histologischen Einzelmerkmale den raschen Wandel des morphologischen Erscheinungsbildes im Ablauf der akuten Erkrankung: Während in den ersten Tagen nach der Infektion die akut entzündlichen Veränderungen zahlenmäßig überwiegen, finden sich mit zunehmendem zeitlichem Abstand von der Infektion vermehrt Merkmale der Überbeanspruchung.

Die Grenzen sind jedoch fließend und die Variabilität der Befunde ist groß, so daß im Einzelfalle keine Aussage über den Grad der funktionellen Beeinträchtigung möglich ist.

Beim Menschen kam Seifert (1959) zu entsprechenden Ergebnissen. Durch eine ähnliche Analyse bei einem Vergleich zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern konnte er ebenfalls zwar „bemerkenswerte Unterschiede in der Häufigkeit und Stärke der Einzelmerkmale, jedoch nicht in der absoluten Spezifität“ feststellen.

Quantitativ morphologische Untersuchungen an spontan-diabetischen Mäusen (Carpenter u. Mitarb., 1963) sowie zahlreiche Experimente mit Alloxan (Chavin, 1970; Wellmann u. Mitarb., 1965, 1967, 1969), verschiedenen Antidiabetica (Kracht, 1959; Sandritter u. Mitarb., 1959; Lacy, 1967; Loubatières, 1968), Corticoiden (Kast u. Mitarb., 1970) oder anderen Hormonen (Scharf u. Mitarb., 1966) haben gezeigt, daß der Inselapparat ziemlich rasch mit quantitativen Veränderungen reagieren kann. Auch aus der Humanpathologie sind Verschiebungen der Inselmasse allgemein bekannt, und zwar sowohl Hyperplasien — z.B. bei Feten diabetischer Mütter (Borehard und Müntefering, 1969, Lit. s. dort) — wie auch Atrophien, die besonders eindrucksvoll bei Diabetikern mit Entstehung der Krankheit in der Wachstumsperiode sind (McLane und Ogilvie, 1955; Gepts, 1957; Hellmann und Angervall, 1961). Da die Veränderung der Inselmasse in solchen Fällen im wesentlichen auf eine Reduzierung der B-Zellen zurückzuführen ist, haben zahlreiche Autoren außerdem eine — allerdings unterschiedlich starke — Verschiebung der A-B-Zellenrelation beschrieben (Seifert, 1959, Lit. s. dort).

Unsere Messungen ergaben bemerkenswerterweise nur bei den mit der E-Variante infizierten Tieren, die eine Pankreatitis ohne Diabetes-Syndrom entwickelt hatten, signifikante Änderungen der Inselgröße, und zwar eine Verkleinerung. Bei den mit der M-Variante infizierten Tieren fanden wir dagegen weder die Inselgröße noch den prozentualen Anteil des Inselapparates am Gesamtorgan, noch die A-B-Zellenrelation trotz starker funktioneller Störung signifikant verändert. Wie oben bereits ausgeführt wurde, hängt diese Tatsache mit der unterschiedlichen Affinität der beiden Virusstämme zum exokrinen bzw. endokrinen Parenchym zusammen. Die E-Variante befällt zwar bevorzugt die Acinusstrukturen, trotzdem kann es aber zu signifikanten Veränderungen der Inselgröße kommen, weil der Inselapparat — wenn überhaupt — ausschließlich von der Peripherie her mitbetroffen wird. Die M-Variante mit ihrer größeren Affinität zum Inselgewebe schädigt dieses mehr diffus, so daß eine Größenänderung weniger augenscheinlich wird.

Aufschluß über den Grad der Funktionsstörung erhielten wir jedoch durch die Berechnung der prozentualen Anteile der A- und B-Zellen und des Zwischen Gewebes am gesamten Inselgewebe. Hier ließ sich eindeutig eine vom Schweregrad der Schädigung abhängige Zunahme des Zwischengewebes bzw. der damit gemeinsam erfaßten Gewebelücken nachweisen. Es kommt demnach durch die Infektion mit der M-Variante zu einer so gestreuten Schädigung einzelner Inselzellen, daß die Form der Inseln noch erhalten bleibt. A- und B-Zellen werden dabei offenbar gleich stark betroffen. Die relative Zunahme an nichtepithelialem Gewebe bei den Tieren mit Diabetes-Syndrom beweist damit indirekt, daß es sich hierbei um einen klassischen Insulinmangel-Diabetes handelt.

Die elektronenoptischen Befunde lassen sich im wesentlichen in zwei Gruppen mit verschiedener Pathogenese einteilen, und zwar solche, die durch direkte virale Schädigungen und solche, die sekundär als Folge der Überbeanspruchung des erhalten gebliebenen Restparenchyms entstehen. Durch die Viren, wahrscheinlich

durch die Vermehrung des Virus in der Zelle, kommt es zu Schädigungen der Kerne und des Cytoplasmas und schließlich zu Destruktion und Nekrose der Zellen.

In einer zweiten Phase mit Entfaltung der Blut- und Lymphcapillaren erkennt man entzündliche Infiltrate vorwiegend aus Lymphocyten und monocitoiden Phagocyten sowie einzelnen Leukocyten. Diese Phase entspricht der histologisch mit Insulitis einhergehenden Phase. Ihr Beginn fällt zeitlich mit dem Beginn der Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper zusammen.

Gleichzeitig, aber auch noch wesentlich später, wenn bereits alle akut entzündlichen Erscheinungen abgeklungen sind, finden sich sekundäre Veränderungen, die im wesentlichen solchen entsprechen, die auch aufgrund anderer Untersuchungen als Zeichen verstärkter funktioneller Aktivität zu deuten sind (Volk u. Mitarb., 1965, 1969; Volk und Lazarus, 1962, 1963, 1964; Björkman u. Mitarb., 1963; Like u. Mitarb., 1970; Luse u. Mitarb., 1967). Im Gegensatz zu den A-Zellen die in der akuten Phase wie die B-Zellen beteiligt sind, betreffen diese sekundären Veränderungen wie Degranulierung, Vermehrung ergastoplasmatischer Membranen und freier Ribosomen, Erweiterung der Zisternen des endoplasmatischen Reticulums sowie Vermehrung der Mitochondrien im wesentlichen die B-Zellen. Bei länger bestehender diabetischer Stoffwechsellsage kann es auch zur Erschöpfung der B-Zellen mit Vesikel- und Vacuolenbildung kommen.

Langzeitbeobachtungen mit regelmäßigen Glucosetoleranztesten gaben uns Gelegenheit, bei einigen Tieren mit Diabetes-Syndrom Grad und Wandel der funktionellen Störungen zu kontrollieren. Abb. 14 zeigt mehrere Belastungskurven nach Glucosetoleranztest bei einem Einzeltier mit virusbedingtem Diabetes-Syndrom. Man erkennt zunächst bis zum 6. Monat nach der Infektion eine allmählich abnehmende, nach 9 Monaten aber wieder zunehmende Störung der Glucosetoleranz.

Ein gewisses Ausmaß der viralen Schädigung kann demnach durch Regeneration und funktionelle Anpassung des Restparenchyms kompensiert werden. Bei zu ausgedehnter Schädigung kommt es aber offenbar zur Erschöpfung der noch intakten B-Zellen und schließlich erneut zur Minderung der Sekretionskapazität. Untersuchungen des Seruminsulinspiegels bei unseren Versuchstieren stehen allerdings noch aus. Sie sollen aber im Rahmen einer anderen Arbeit durchgeführt werden.

Fälle mit nur vorübergehender Störung der Glucosetoleranz kommen auch beim Menschen vor. Daweke u. Mitarb. (1969) stellten z. B. bei einerigen Zwillingen, von denen ein Zwilling an einem juvenilen Diabetes leidet, fest, daß der stoffwechselgesunde Partner über mehrere Jahre einen verringerten und verzögerten Anstieg des immunologisch erfaßbaren Insulins im oralen Glucosetoleranztest zeigte, was bis dahin als für den Prädiabetes charakteristisch angesehen wurde. Fünf Jahre später war die Insulinsekretion jedoch wieder normal.

Auch solche pathogenetisch sonst nur schwer deutbaren Befunde würden sich durch eine Virusinfektion beider Zwillinge mit ungleich starker Schädigung der Inselorgane zwanglos erklären lassen. Voraussetzung dafür wäre allerdings, daß beim Menschen überhaupt entsprechende Infektionen möglich sind. Nach den Untersuchungsergebnissen von Gamble u. Mitarb. (1969) muß dies jedoch als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Die Autoren fanden nämlich in den Seren von Patienten mit kürzlich manifest gewordenem Diabetes mellitus signifikant erhöhte Antikörpertiter gegen Coxsackie-B-Viren, die wie die EMC-Viren zur Gruppe der tier- und menschenpathogenen Picornaviren zählen (Melnick u. Mitarb., 1963) und in mancher Hinsicht ähnliche Eigenschaften aufweisen.

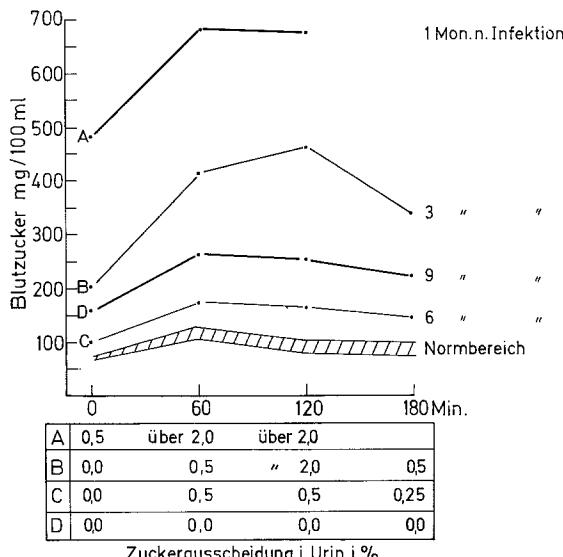


Abb. 14. Glucosetoleranztest nach Franke (Glucose intraperitoneal, 1 mg/kg Körpermengewicht) bei einem männlichen Tier in verschiedenen Zeitabständen nach der Infektion mit EMC-Viren. Normbereich = Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 gleichaltrigen, gesunden Tieren.

Aufgrund dieser Tatsache, vor allem aber wegen der dargestellten morphologischen Befunde scheint uns die Vermutung berechtigt zu sein, daß der virusbedingte Diabetes mellitus der weißen Maus auch als ein Modell des juvenilen Diabetes des Menschen gelten kann.

Literatur

- Archibald, E. W.: Acute oedema of the pancreas. A clinical and experimental study. Ann. Surg. **90**, 803—816 (1929).
- Baranov, V. G., Alekseeva, G. G., Dzeranova, N. Ya., Konradi, L. I., Shlimovich, P. B.: The pathogenesis of development of diabetes mellitus in obese persons. Klin. Med. (Mosk.) **48**, 97—103 (1970).
- Barboni, E., Monocchio, I.: Alterazioni pancreatiche in bovini con diabete mellito post-attoso. Arch. vet. ital. **13**, 477—489 (1962).
- Bargmann, F.: Der Inselapparat der Bauchspeicheldrüse. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. VIII/1. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Bell, E. T.: Pancreatitis: A study of 179 fatal cases. Surgery **43**, 527—537 (1958).
- Bernhard, F.: Über die Hyperglykämie bei akuten Pankreaserkrankungen. Dtsch. Z. Chir. **212**, 209—216 (1928).
- Bernhard, F.: Die Beziehungen zwischen den Erkrankungen der Gallenwege und dem Auftreten der akuten Pankreasnekrose und Beobachtungen über die diagnostischen Hilfsmittel zur Erkennung der akuten Pankreasveränderungen. Dtsch. Z. Chir. **231**, 1—30 (1931).
- Björkmann, N., Hellerström, C., Hellman, B.: The ultrastructure of the islets of Langerhans in normal and obese-hyperglycemic mice. Z. Zellforsch. **58**, 803—819 (1963).
- Boquist, L.: Tubular cytoplasmic bodies in pancreatic islet B-cells of mice. Z. Zellforsch. **106**, 69—78 (1970).
- Borchard, F., Müntefering, H.: Beitrag zur quantitativen Morphologie der Langerhansschen Inseln bei Früh- und Neugeborenen. Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat. **346**, 178—198 (1969).

- Boring, W. D., Angevine, D. M., Walker, D. L.: Factors influencing host-virus interactions. I. A comparison of viral multiplication and histopathology in infant, adult and cortisone-treated adult mice infected with the Connecticut-5 strain of Coxsackie virus. *J. exp. Med.* **102**, 753—766 (1955).
- Brocq, P., Varangot, J.: Les modifications de la glycémie dans la nécrose aigue du pancréas. Etude critique de leur valeur diagnostique et pronostique. *J. Chir. (Paris)* **49**, 177—220 (1937).
- Brown, E. E.: Infectious origin of juvenile diabetes. *Arch. Pediat.* **73**, 191—198 (1956).
- Carlson, A. J., Drennan, F. M.: The control of pancreatic diabetes in pregnancy by the passage of the internal secretion of the pancreas of the fetus to the blood of the mother. *Amer. J. Physiol.* **28**, 391—395 (1911).
- Carpenter, A.-M., Gerritsen, G. C., Dulin, W. E., Lazarow, A.: Islet and beta cell volumens in diabetic Chinese hamster and their non-diabetic siblings. *Diabetologia* **3**, 92—99 (1967).
- Carpenter, A.-M., Gerritsen, G. C., Dulin, W. E., Lazarow, A.: Islet and beta cell volumes in offspring of severely diabetic (ketotic) Chinese hamsters. *Diabetologia* **6**, 168—176 (1970).
- Carpenter, A.-M., Lazarow, A.: Component quantitation of tissue sections. II. A study of the factors which influence the accuracy of the method. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 329—340 (1962).
- Cecil, R. L.: A study of the pathological anatomy of the pancreas in ninety cases of diabetes mellitus. *J. exp. Med.* **11**, 266—290 (1909).
- Chavin, W., Young, J. E.: Effects of alloxan upon goldfish. *Gen. comp. Endocr.* **14**, 438—460 (1970).
- Craighead, J. E.: Necrosis of the pancreas, lacrimal and parotid glands associated with Encephalomyocarditis virus infection. *Nature (Lond.)* **207**, 1268—1269 (1965).
- Craighead, J. E.: Pathogenicity of the M and E variants of the Encephalomyocarditis (EMC) virus. I. Myocardiotropic and neurotropic properties. *Amer. J. Path.* **48**, 333—341 (1966).
- Craighead, J. E.: Pathogenicity of the M and E variants of the Encephalomyocarditis (EMC) virus. II. Lesions of the pancreas, parotid and lacrimal glands. *Amer. J. Path.* **48**, 375—382 (1966).
- Craighead, J. E., McLane, M. F.: Diabetes mellitus: Induction in mice by Encephalomyocarditis virus. *Science* **162**, 913—914 (1968).
- Craighead, J. E., Shelokov, A.: Encephalomyocarditis virus hemagglutination-inhibition test using antigens prepared in HeLa cell cultures. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **108**, 823—826 (1961).
- Craighead, J. E., Steinke, J.: Diabetes mellitus-like syndrome in mice infected with Encephalomyocarditis virus. *Amer. J. Path.* **63**, 119—134 (1971).
- Dalldorf, G., Gifford, R.: Adaptation of group B Coxsackie virus to adult mouse pancreas. *J. exp. Med.* **96**, 491—497 (1952).
- Daweke, H., Grote, W., Gries, F. A., Liebermeister, H.: Zur Genetik des Diabetes mellitus: Glucosetoleranz, Seruminsulin und freie Fettsäuren bei eineiigen Zwillingen. *Dtsch. med. Wschr.* **95**, 983—988 (1970).
- Donhauser, J. L.: Acute pancreatitis: A review of eighty-six cases. *Amer. J. Surg.* **88**, 946—952 (1954).
- Egdahl, A.: A review of one hundred and five reported cases of acute pancreatitis, with special reference to etiology; with report of two cases. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **18**, 130—136 (1907).
- Elman, R.: Acute interstitial pancreatitis: Clinical study of 37 cases showing edema, swelling and induration of the pancreas, but without necrosis, hemorrhage or suppuration. *Surg. Gynec. Obstet.* **57**, 291—309 (1933).
- Falkner, S., Olsson, R.: Ultrastructure of pancreatic islet tissue of normal and alloxan treated *cottus scorpius*. *Acta endocr. (Kbh.)* **39**, 32—46 (1962).
- Fallis, L. S.: Acute pancreatitis. Observations on 250 cases. *J. int. Coll. Surg.* **16**, 337—341 (1951).
- Ferner, H.: Das Inselsystem des Pankreas. Stuttgart: Georg Thieme 1952.
- Fischer, B.: Pankreas und Diabetes. *Frankfurter Z. allg. path. Anat.* **17**, 218—275 (1915).
- Freytag, G., Klöppel, G.: Experimentelle Insulitis und Pankreatitis nach Immunseren gegen Pankreasextrakte verschiedener Reinheitsgrade. *Beitr. path. Anat.* **139**, 138—160 (1969).

- Freytag, G., Klöppel, G., Howe, I.: Zur Pathogenese der experimentellen Insulitis. Verh. dtsch. Ges. Path. **53**, 423—429 (1969).
- From, G. L. A., Craighead, J. E., McLane, M. F., Steinke, J.: Virus-induced diabetes in mice. Metab. Clin. Exp. **17**, 1154—1158 (1968).
- Gamble, D. R., Kinsley, M. L., Fitzgerald, M. G., Bolton, R., Taylor, K. W.: Viral antibodies in diabetes mellitus. Brit. med. J. **1969** III, 627—630.
- Gamble, D. R., Taylor, K. W.: Seasonal incidence of diabetes mellitus. Brit. med. J. **1969** III, 631—633.
- Gepts, W.: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. Diabetes **14**, 619—633 (1965).
- Gepts, W., Christophe, J., Bellens, R.: Etude expérimentale de l'action du BZ-55 sur le rat normal où alloxyanisé—Modifications morphologiques et en particulier pancréatiques. Ann. Endocr. (Paris) **17**, 278—290 (1956).
- Gomori, G.: Aldehydfuchsin: A new stain for elastic tissue. Amer. J. clin. Path. **20**, 665—666 (1950).
- Gundersen, E.: Is diabetes of infectious origin? J. infect. Dis. **41**, 197—202 (1927).
- Hartig, F., Czerwek, H., Hebold, G.: Das Verhalten der B-Zellen der Langerhansschen Inseln im Tierexperiment. Verh. dtsch. Ges. Path. **54** (1970).
- Heilberg, K.A.: Über Diabetes bei Kindern. Arch. Kinderheilk. **56**, 403—411 (1911).
- Hellman, B., Angervall, L.: The frequency distribution of the number and volume of the islets of Langerhans in man. Acta path. microbiol. scand. **53**, 230—236 (1961).
- Henderson, F. F., King, E. A. A.: Acute pancreatitis. Arch. Surg. **30**, 1049—1057 (1935).
- Hennig, A.: Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. Mikroskopie **12**, 174—202 (1957).
- Herman, L., Sato, T., Fitzgerald, P. J.: IV. Endocrine pancreas. In: Kurts, St. M., Electron microscopic anatomy, p. 77—95. New York and London: Academic Press 1964.
- Hinz, R. W., Barski, G., Bernhard, W.: An electron microscopic study of the development of Encephalomyocarditis (EMC) virus propagated in vitro. Exp. Cell Res. **26**, 571—586 (1962).
- Hirschfeld, F.: Über infektiöse Entstehung der chronischen Pankreatitis und des Diabetes Berl. klin. Wschr. **45**, 537—542 (1908).
- Hultman, E.: Rapid specific method for determination of aldosaccharides in body fluids. Nature (Lond.) **183**, 108—109 (1959).
- Karmen, A.: Appendix: A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. J. clin. Invest. **34**, 131—133 (1955).
- Karmen, A., Wróblewski, F., LaDue, J. S.: Transaminase activity in human blood. J. clin. Invest. **34**, 126—131 (1955).
- Kast, A., Hamataka, H., Higashi, T., Nishimura, T.: Gewebemessungen am Inselorgan corticoidbehandelter Ratten. Verh. dtsch. Ges. Path. **54** (1970).
- Körte, W.: Die chirurgische Behandlung der akuten Pankreatitis. Langenbecks Arch. klin. Chir. **96**, 557—594 (1911).
- Kracht, J.: Experimentelle Morphologie des Inselorgans unter BZ 55, D 860 und IPTD. Med. Welt **12**, 525—528 (1959).
- Kraus, E. J.: Die pathologisch-anatomischen Veränderungen des Pankreas beim Diabetes mellitus. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, hrsg. von Henke, F. und Lubarsch, O., Bd. 5, 622—747. Berlin: Springer 1929.
- Kremer, H. U.: Juvenile diabetes as a sequel to mumps. Amer. J. Med. **3**, 257—258 (1947).
- Lacy, P. E.: Electron microscopy of the beta cell of the pancreas. Amer. J. Med. **31**, 851—859 (1961).
- Lacy, P. E.: The pancreatic beta cells. New Engl. J. Med. **267**, 187—195 (1967).
- Lacy, P. E., Hartkroft, W. S.: Electron microscopy of the islets of Langerhans. Ann. N.Y. Acad. Sci. **82**, 287—301 (1959).
- Lazarow, A., Carpenter, A.-M.: Component quantitation of tissue sections. I. Characterization of the instruments. J. Histochem. Cytochem. **10**, 324—328 (1962).
- Lazarus, S. S., Volk, B. W.: Ultramicroscopic and histochemical studies on pancreatic B-cells stimulated by tolbutamide. Diabetes **11**, 2—10 (Suppl.) (1962).

- Lazarus, S. S., Volk, B. W.: The Pancreas in Human and Experimental Diabetes, p. 257—267. New York: Grune & Stratton Inc. 1962.
- LeCompte, P., M.: "Insulitis" in early juvenile diabetes. Arch. Path. **66**, 450—457 (1958).
- Lever, J. D., Jeacock, M., Young, F. G.: The production and cure of metahypophyseal diabetes in the cat. A histochemical and electron microscopical study with particular reference to the changes in the islets of Langerhans of the pancreas. Proc. roy. Soc. B. **154**, 139—150 (1961).
- Like, A. A.: The uptake of exogenous peroxidase by the beta cells of the islets of Langerhans. Amer. J. Path. **59**, 225—246 (1970).
- Like, A. A.: The ultrastructure of the secretory cells of the islets of Langerhans in man. Lab. Invest. **16**, 937—951 (1966).
- Like, A. A., Chick, W. L.: Mitotic division in pancreatic beta cells. Science **163**, 941—943 (1969).
- Like, A. A., Miki, E.: Diabetic syndrome in sand rats. IV. Morphologic changes in islet tissue. Diabetologia **3**, 143—166 (1967).
- Like, A. A., Steinke, J., Jones, E. E., Cahill, G. F.: Pancreatic studies in mice with spontaneous diabetes mellitus. Amer. J. Path. **46**, 621—644 (1965).
- Loubatières, A., Mariani, M.-M., Alric, R., Houareau, M.-H.: Effet sur le développement et la néogenèse des îlots de Langerhans du pancréas d'un sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif: le glybenzcyclamide. C. R. Acad. Sci. (Paris) **267**, 23—239 (1968).
- Luse, S. A., Caramia, S. A., Gerritsen, G., Dulin, W. E.: Spontaneous diabetes mellitus in the Chinese hamster: An electron microscopic study of the islets of Langerhans. Diabetologia **3**, 97—108 (1967).
- MacLean, N., Ogilvie, R. F.: Observations on the pancreatic islet tissue of young diabetic subjects. Diabetes **8**, 83—91 (1959).
- Mahner, A.: Erfahrungen mit akuten Pankreaserkrankungen. Langenbecks Arch. klin. Chir. **187**, 691—704 (1937).
- McCrae, W. M.: Diabetes mellitus following mumps. Lancet **1963 I**, 1300—1301.
- Melnick, J. L., Cockburn, W. C., Dalldorf, G., Gard, S., Gear, J. H. S., Hammon, W. M., Kaplan, M. M., Nagler, F. P., Oker-Blom, N., Rhodes, A. J., Sabin, A. B., Verlinde, S. D., v. Magnus, H.: Picornavirus group. Virology **19**, 114—116 (1963).
- Müntefering, H., Schmidt, W. A. K., Körber, W.: Experimenteller Beitrag zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus. Verh. dtsch. Ges. Path. **54**, 669—670 (1970).
- Müntefering, H., Schmidt, W. A. K., Körber, W.: Zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus. Dtsch. med. Wschr. **96**, 693—699 (1971).
- Munger, B. L.: A light and electron microscopic study of cellular differentiation in the pancreatic islets of the mouse. Amer. J. Anat. **103**, 275—311 (1958).
- Pappenheimer, A. M., Kunz, L. J., Richardson, S.: Passage of Coxsackie virus (Connecticut-5 strain) in adult mice with production of pancreatic disease. J. exp. Med. **94**, 45—64 (1951).
- Platt, H.: A study of the pathological changes produced in young mice by the virus of foot-and-mouth-disease. J. Path. Bact. **72**, 299—312 (1956).
- Richter, K. D.: Morphologische Veränderungen der Langerhansschen Inseln von Laboratoriumstieren im Experiment. Verh. dtsch. Ges. Path. **54** (1970).
- Sandritter, W., Becker, U., Müller, D., Pfeiffer, E. F.: Histochemische Untersuchungen zur Frage der Funktion der B-Zellen der Langerhansschen Inseln nach Stimulierung mit D 860. Endokrinologie **87**, 193—217 (1959).
- Scharf, J.-H., Hammer, R., Leuteritz, W., Schmidt, R., Marzotko, D.: Verteilung der A- und B-Zellen sowie des Inselquotienten nach contrainsulärer, antithyreoidaler und antadenohypophysärer Behandlung im Inselorgan der weißen Ratte. Z. Zellforsch. **69**, 659—685 (1966).
- Schiebler, T. H., Schiessler, S.: Über den Nachweis von Insulin mit den metachromatisch reagierenden Pseudoisocyaninen. Histochemie **1**, 445—465 (1959).
- Schmidt, M. B.: Über die Beziehung der Langerhansschen Inseln des Pankreas zum Diabetes mellitus. Münch. med. Wschr. **49**, 51—54 (1902).
- Schmitz-Moormann, P., Zimmermann, U.: Die Langerhansschen Inseln bei der partiellen permanenten Ischämie des Katzen-Pankreas. Verh. dtsch. Ges. Path. **54**, 670 (1970).
- Sebening, W.: Folgezustände nach akuter Pankreasnekrose. Med. Klin. **23**, 551—556 (1927).

- Seifert, G.: Zur Orthologie und Pathologie des qualitativen Inselzellbildes. *Virchows Arch. path. Anat.* **325**, 379—396 (1954).
- Seifert, G.: Die pathologische Morphologie der Langerhansschen Inseln, besonders beim Diabetes mellitus des Menschen. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **42**, 50—84 (1959).
- Seifert, G.: Elektronenmikroskopische Befunde am Rattenpankreas nach experimenteller Äthioninschädigung. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **101**, 540—541 (1960).
- Seifert, G.: Die pathologische Anatomie des Inselapparates beim juvenilen Diabetes mellitus. *Dtsch. med. Wschr.* **91**, 778—779 (1966).
- Shumacker, H. B.: Acute pancreatitis and diabetes. *Ann. Surg.* **112**, 177—200 (1940).
- Sprague, R. G.: Diabetes mellitus associated with chronic relapsing pancreatitis. *Proc. Mayo Clin.* **22**, 553—558 (1947).
- Steiner, H.: Insultis beim perakuten Diabetes des Kindes. *Klin. Wschr.* **46**, 417—421 (1968).
- Toreson, W. E.: Glycogen infiltration (so-called hydropic degeneration) in pancreas in human and experimental diabetes mellitus. *Amer. J. Path.* **27**, 327—347 (1951).
- Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Ultramicroscopic evolution of B-cell ballooning degeneration in diabetic dogs. *Lab. Invest.* **12**, 697—711 (1963).
- Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Ultrastructural evidence for marked B-cell hyperfunction after prolonged oral sulfonylurea. *Lab. Invest.* **13**, 942—943 (1964).
- Volk, B. W., Wellmann, K. F., Lazarus, S. S.: Fine structure of rabbit pancreatic B-cells in cortisone-alloxan induced subdiabetes. *Lab. Invest.* **14**, 1375—1395 (1965).
- Volk, B. W., Wellmann, K. F., Lazarus, S. S., Brancato, P. B.: Beta cell morphology and insulin immunoassay—in long-term subdiabetic rabbits. *Arch. Path.* **88**, 413—422 (1969).
- Warren, S.: The pathology of diabetes in children. *J. Amer. med. Ass.* **88**, 99—101 (1927).
- Warren, S., LeCompte, P. M.: The pathology of diabetes mellitus. Philadelphia: Lea & Feigiger 1952.
- Weeden, W. M.: Acute pancreatitis with report of twelve cases. *Amer. J. Surg.* **8**, 1286—1290 (1930).
- Wellmann, K. F., Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Betacell structure in latent and chronic diabetes of the rabbit. *Diabetes* **14**, 792—804 (1965).
- Wellmann, K. F., Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Rabbit B-cell ultrastructure in steroid-alloxan latent and overt diabetes. *Amer. J. Path.* **46**, 12a (1965).
- Wellmann, K. F., Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Ultrastructural pancreatic beta-cell changes in rabbits after small and large doses of alloxan. *Diabetes* **16**, 242—251 (1967).
- Wellmann, K. F., Volk, B. W., Lazarus, S. S., Brancato, P.: Pancreatic B-cell morphology and insulin content of normal and alloxan-diabetic rabbits and their offsprings. *Diabetes* **18**, 138—145 (1969).
- Williamson, J. R.: Electron microscopy of glycogenic changes in beta cells in experimental diabetes. *Diabetes* **9**, 471—480 (1960).
- Williamson, J. R., Lacy, P. E.: Electron microscopy of islet cells in alloxan-treated rabbits. *Arch. Path.* **67**, 102—109 (1959).
- Williamson, J. R., Lacy, P. E.: Electron microscopy of glycogen infiltration in islets of cat. *Arch. Path.* **72**, 637—647 (1961).
- Wilson, W. B., Cheatham, W. J.: Parotitis in weanling mice produced by Coxsackie B-1 (Connecticut-5) virus. *Amer. J. Path.* **41**, 415—424 (1962).

Priv.-Doz. Dr. H. Müntefering
Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf
D-4000 Düsseldorf, Moorenstr. 5
Deutschland