

## 原 著

## 糖尿病者におけるインスリン結合抗体の臨床的研究

昭和41年9月16日 受付

信州大学医学部小田内科学教室

(主任:小田正幸教授)

藤 山 正 夫

## Studies on Insulin-Binding Antibody in Diabetic Subjects

Masao Fujiyama

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,

Shinshu University

(Director: Prof. M. Oda)

## 緒 言

インスリン抗体の検出方法の進歩とインスリンの精製純化の進歩は、従来疑問とされていたインスリンの抗原性の問題を解決した<sup>①</sup>。現在では、インスリンが弱い抗原性を有していること、その抗体は同種のインスリンによる血糖降下作用を中和しうること、異種のインスリンに対してもある程度の交叉反応が認められることなどが明らかとなつてきている<sup>①②</sup>。インスリン抗体の検出方法にはいくつかのものが報告されているが<sup>③</sup>、そのうち、インスリン結合抗体 (Insulin-Binding Antibody) は、Berson 氏<sup>④</sup>によつて開発されたものである。かれらは、インスリン治療をうけているヒトの血漿を  $I^{131}$  インスリンとともにインキュベートし濾紙電気泳動法を用いて展開すると、 $I^{131}$  インスリンは2つの部分に分かれることを見出した。すなわち、抗体と結合していない遊離のインスリンは原点にとどまり、抗体と結合したインスリンは  $\beta$ - $\gamma$  間のグロブリン分画部に移動する。このようにして検出される抗体がインスリン結合抗体と呼ばれるものである。

インスリン抗体の臨床上の意義については、インスリン抵抗性糖尿病の問題、糖尿病性血管合併症の発生または進展の問題が注目されている<sup>⑤</sup>。インスリン抵抗性糖尿病の原因は明らかでないことが多いが、インスリン阻害物質として知られているもの<sup>⑥</sup>のうち臨床的に報告されているものとしては、成長ホルモン<sup>⑦</sup>、 $\alpha_1$  グロブリン分画中にある阻害物質<sup>⑧</sup>などの他にインスリン抗体<sup>⑦⑧⑨</sup>がある。インスリン抗体がインスリン阻害性に働くとするならば、抗体の存在下での糖尿病の病態を明らかにすることは興味ある問題である。

一方、インスリン抗体が糖尿病の血管合併症と関連性を有しているのではないかとの示唆は、蛍光抗体法を用いた Blumenthal 氏の報告<sup>⑩</sup>以来問題を残すところとなつている<sup>⑩⑪</sup>。インスリンが抗原となつて血管合併症が発生あるいは進展するものとするれば、インスリンの注射によつて生じた抗体が血管合併症の進展あるいは悪化に影響を及ぼしているかもしれない。このことは糖尿病の臨床にとつて見逃すことのできない問題であるといえよう。

本研究においては、インスリンの注射によつて生じる流血中のインスリン結合抗体の意義を糖尿病者について検討した。

## 対象および方法

## I 対 象

研究の対象とした糖尿病者は85名で、いずれも信州大学小田内科または浅間病院に入院中もしくは通院中のもので、少なくとも2週~4週に1度の血糖検査をうけながらコントロールされているものをえらんだ。このうち、インスリン注射の経験のあるものは72名(男31, 女41)で、3カ月以上注射を続けているものは61名、3カ月未満のもの7名、注射の中絶しているもの4名であつた。使用インスリンはNPHインスリン(ウシ, プタ混合), またはレンテ・インスリン(ウシ, プタ混合)であつた。年齢は18才~77才(平均56才)で、糖尿病罹病期間は1カ月~47年(平均4.1年)であつた。インスリン注射の既往歴のない糖尿病者は13名(男9, 女4)で、年齢は24才~71才(平均51才)、罹病期間は1カ月~10年(平均2.8年)であつた。

非糖尿病者は48名で、その構成は健康人9名、非糖尿病性疾患患者39名(慢性肝炎6, 肝硬変症3, 胆道

癆 1, 膠原病 3, リウマチ様関節炎 4, 敗血症 1, 肺結核 7, 肺癆 1, ホヂキン氏病 1, 白血病 2, その他の血液疾患 5. カッシング症候群 2, 精神病 3) であつた。このうちインスリン注射の経験のあるものは精神病患者 3 名であつた。

II 検査方法

1. インスリン結合抗体の測定

Berson & Yalow の方法<sup>①</sup>にならない Hydrodynamic flow chromatography を用いた。

(1) 採血: 24時間インスリンの注射をうけていない状態で, 早朝空腹時に肘静脈より採血し, 凝固の完了をまつて血清を分離し,  $-20^{\circ}\text{C}$  の氷室に保存した。測定時には室温で融解するのを待つて使用した。

(2)  $\text{I}^{131}$  インスリン: Abbott Laboratories の  $\text{I}^{131}$  インスリン (ウツ) を用いた。その条件は, Lot によつて多少異なるが Specific activity  $5.3\sim 6.7 \text{ mc/mg}$  インスリン, Concentration  $0.02\sim 0.03 \text{ mg}$  インスリン/ $\text{ml}$  であつた。

(3) 添加インスリン: Novo Therapeutisk Laboratorium の結晶ウツ・インスリン Lot No.05462 ( $23.53 \text{ u/mg}$ ) を用いた。

(4) 濾紙: 東洋濾紙 No.50 を巾  $2 \text{ cm}$ , 長さ  $25 \text{ cm}$  に切つて用いた。

(5) 測定方法: 血清  $1 \text{ ml}$  に  $\text{I}^{131}$  インスリン  $0.001 \text{ ml}$  を加え,  $4^{\circ}\text{C}$  で 48 時間インキュベートした。次に, この混合液を濾紙電気泳動法の要領で水平にはつた濾紙の 1 端から  $6 \text{ cm}$  の場所に附着する。5 分後にその側の濾紙端をバルビタール緩衝液 ( $\text{pH} 8.6$ , イオン強度  $0.05$ ) に浸し, 30 分後にとり出す。以上の操作は室温  $3\sim 7^{\circ}\text{C}$  の条件下で行つた。乾燥後, 放射能ペーパークロマトグラム自動測定装置 (日本無線) によつて濾紙の放射能を測定した。

抗体の有無によつてサンプルの放射能のピークは 1 カ所または 2 カ所にえられた。原点にのみピークが認められるものは抗体価は 0 である (図 1)。ピークが 2 カ所にえられた時には, 両者の面積をプランメーターで測定し, 結合インスリン (B)/遊離インスリン (F) 比を求めた。

抗体が認められる場合の抗体価の求め方は, 平田氏の方法<sup>②</sup>により  $\text{I}^{131}$  インスリン血清混合液を作製するとき, サンプルを 4 本 $\sim$ 5 本つくり, これに一定系列の濃度の添加インスリンを加えた。図 2 に示した如く, 添加インスリンの量が多くなると遊離インスリンの比率が増し, 結合インスリンの比率は減少するが, 結合インスリンの絶対量は増加している。各々のサンプルについて B/F を求め, 普通座標に B/F をと

り, 対数座標に結合インスリンの絶対量をとると, これらは直線となつた。B/F = 0 の点の値をインスリン結合抗体価とした。単位は血清  $1 \text{ ml}$  当りのインスリン量  $\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$  で表現した (図 3)。

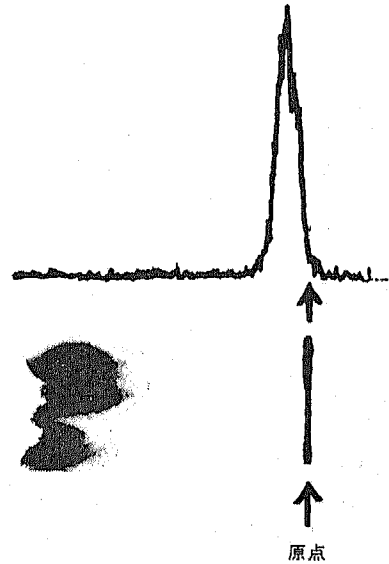


図 1 結合抗体陰性例の Paper Radiochromatogram

インスリン未使用者血清  $1 \text{ ml}$  に  $\text{I}^{131}$  インスリン  $26 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$  を加え, 東洋濾紙 No.50 を用いて Hydrodynamic flow chromatography をおこない, アクチグラムで放射能を測定。放射能のピークは原点に 1 カ所みられるのみ。

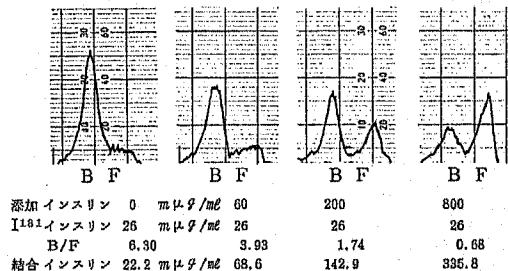


図 2 結合抗体陽性例の抗体の検出

血清  $1 \text{ ml}$  に  $\text{I}^{131}$  インスリン  $26 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$  を加え, Hydrodynamic flow chromatography をおこなつたものの Radiochromatogram。放射能のピークは 2 カ所にみられる。インキュベートにさいして加えた添加インスリンの量が多くなるほど結合インスリン (B) の比率は小さくなり, 逆に遊離インスリン (F) の比率が大となる。

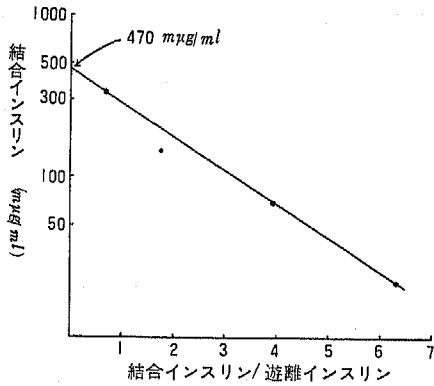


図3 結合抗体価の求め方

アクトグラムより求めた B/F を普通座標にとり、これに対する結合インスリン量を対数座標にプロットする。これらの値は直線上に並ぶ。F/B=0 の点の結合インスリン量が求める結合抗体価である。ここに示した例は図2の症例である。

2. インスリン感性テスト

検査の前日の朝のインスリン注射は、レギュラー・インスリンを用い、その後の操作は葛谷氏の方法<sup>⑩</sup>によつた。

3. 眼底検査

眼底の検査は直像検査法によつた。糖尿病性網膜症の分類は Wagener<sup>⑪</sup>によつた。

成 績

I 結合抗体の検出状況について

1. 結合抗体の検出頻度

表1に示した如く、結合抗体が検出されたものは、すべてインスリン使用者であつた。糖尿病患者については、結合抗体はインスリン使用例72名中61名(84%)に認められた。このうち3カ月以上継続して注射している例では61名中56名(92%)に認められた。インスリン注射の中断している4例のうち結合抗体の認められた3例はNPHインスリン8~12単位を2年2カ月~4年間使用したのち3~6カ月中断していたものである。結合抗体の認められなかつた残りの1例はNPHインスリン10単位を66日間用いその後30日中断していた例であつた。

非糖尿病患者48名のうち結合抗体の認められた2名はいずれも精神病患者でインスリンを断続的に約1カ年使用したものであつた。インスリン使用者で結合抗体の認められなかつた残りの1例は精神病患者でインスリンの注射を20日間うけたものである。

2. インスリン使用期間と結合抗体価

上述の成績より、結合抗体のみられるものはインスリン使用例のみであることが判明したので、以下の検索をインスリン使用糖尿病患者についてのみおこなつた。

継続してインスリン注射をおこなつている症例のインスリン使用期間は10日~7年10カ月(平均1.9年)であつた。図4に示した如く、3カ月未満のものでは7例中5例は抗体価は0であり、1例は53日で25 µg/ml、他の1例は56日で10 µg/mlの結合抗体価を示した。3カ月以上の使用者では61例中92%のものに抗体が認められたが、2年以上の使用者で認められなかつたものが2例あつた。6カ月以上の例について

表 1 結合抗体の検出頻度

対 象	例 数	結合抗体陽性例		
		例 数	%	
糖 尿 病	インスリン使用例	72	61	84
	3カ月以上使用	61	56	92
	3カ月未満使用	7	2	29
	中断しているもの	4	3	75
	インスリン未使用例	13	0	0
合 計	85	61		
非 糖 尿 病	健康人(インスリン未使用)	9	0	0
	非糖尿病性疾患	39	2	5
	インスリン使用例	3	2	66
	インスリン未使用例	36	0	
合 計	48	2		

は、インスリン使用期間と結合抗体価との間に密接な関係を見出しえなかつた。

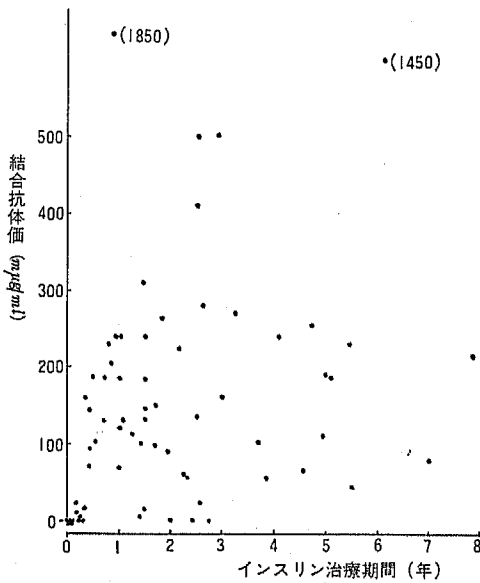


図4 インスリン治療期間と結合抗体価

3. インスリン1日使用量と結合抗体価

検索時のインスリンの1日注射量は4単位~60単位であつた。図5に示した如く、3カ月未満の短期使用者では、注射量と抗体価との間には密接な関係を見出

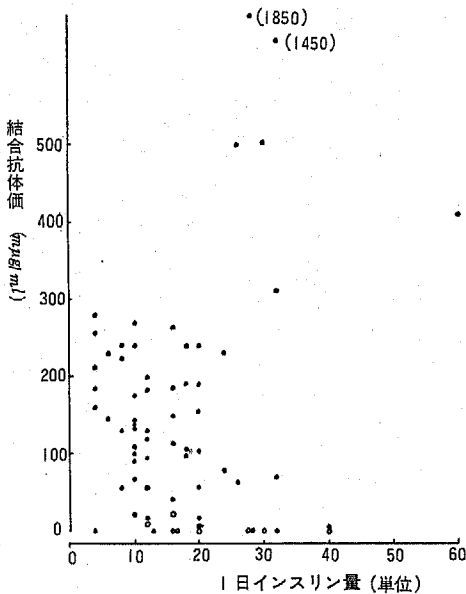


図5 1日インスリン使用量と結合抗体価  
(●: 3カ月以上使用者 ○: 3カ月未満使用者)

しえない。3カ月以上の使用者でも、注射量と抗体価との間に密接な関係を見出しがたいが、抗体価が300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  をこえる6例は、いずれも26単位以上の注射量であつた。

4. インスリン総使用量と結合抗体価

検索時まで注射したインスリン総量は、160単位~69,600単位で、平均11,600単位であつた。3カ月未満の短期使用者の注射量は、160単位~1,130単位の間にあつたが、注射量と抗体価の間には密接な関係は認められなかつた。このうち最も少量で抗体の認められたものは312単位で10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のものであつた。3カ月以上の使用例では、3,000単位以下のものでは200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  をこえる例はみられなかつた。26,000単位を注射した例で抗体が検出されなかつたものもある。抗体価が300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  をこえる6例の総使用量は、5,400単位~69,600単位で比較的が多かつた。しかし、3,000単位以上の使用例では総使用量と抗体価との間には密接な関係を見出しがたい(図6)。

5. インスリン短期使用者における

結合抗体産生の状況

上述の検索で結合抗体の認められなかつた短期使用者について結合抗体出現の状況を経過を追つて観察した。図7に示した如く、4例ともに、注射開始後70~114日ではじめて検出された。この時の1日インスリン注射量、総注射量と結合抗体出現日数、抗体価との間には平行する関係は認められなかつた。

II 糖尿病のコントロール状態と

結合抗体価について

コントロール状態の評価は以下の如くおこなつた。Hagedorn-Jensen法で測定した毛細管血の血糖値が空腹時110  $\text{mg}/\text{dl}$  以下で、坂口食負荷後の2時間値、3時間値が180  $\text{mg}/\text{dl}$  以下であるものをコントロール良好とし、これを満足していないものをコントロール不良とした。インスリン注射開始後3カ月未満のものはコントロール状態の評価から除外した。3カ月以上のイ

表2 糖尿病のコントロール状態と結合抗体価

結合抗体価	コントロール状態		合計
	良好	不良	
0	5	1	6
1 ~ 100	9	11	20
101 ~ 200	9	11	20
201 ~ 300	4	9	13
301 以上	0	6	6
合計	27 (42%)	38 (58%)	65

図 6 インスリン総使用量と結合抗体価

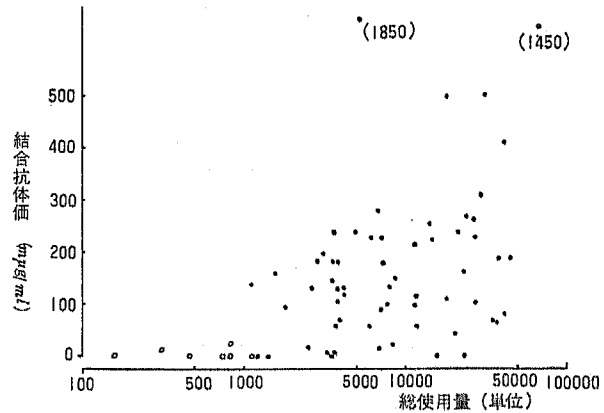
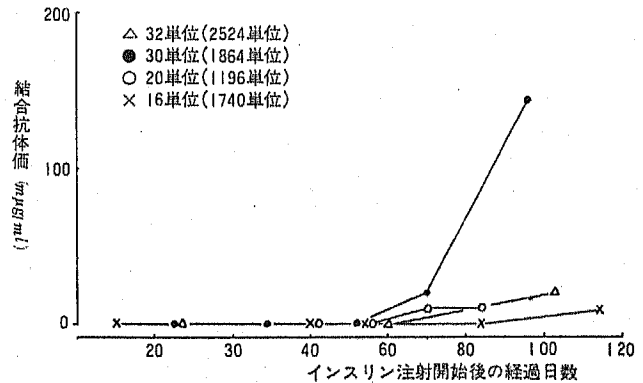


図 7 インスリン短期使用者の結合抗体価の変動



インスリン使用者65名のコントロール状態は良好群27例(42%)、不良群38例(58%)であつた。結合抗体価が $200\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のものは46例で、このうちコントロール良好群は23例、不良群は23例であつた。結合抗体価が $201\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものは19例で、このうちコントロール良好群は4例(21%)、不良群は15例(79%)であり、コントロール不良群が著しく多かつた。結合抗体価が $301\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示した6例はいずれもコントロール不良群であつた(表2)。

### Ⅲ インスリン感性テストと結合抗体について

インスリン感性テストはインスリンを3カ月以上使用している糖尿病患者10名についておこなつた。このうちコントロール良好のものは4例、不良のものは6例であつた。結合抗体価はコントロール良好群では $5\sim 265\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、不良群では $5\sim 410\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。血糖調節レベル(葛谷)は両群ともに高く、良好群では $124\sim 140\text{mg}/\text{dl}$ (平均 $132\text{mg}/\text{dl}$ )、不良群では $150\sim 170\text{mg}/\text{dl}$ (平均 $156\text{mg}/\text{dl}$ )であつた。インスリン感性指数はコントロール良好群では $1.24\sim 1.75$ 、不良群では $0.82\sim 1.25$ といずれの群でも悪かつた。

表3に示した如く、結合抗体価が $200\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の3例のインスリン感性指数は $0.82\sim 1.24$ (平均 $1.08$ )であり、結合抗体価が $200\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の7例では感性指数は $0.84\sim 1.75$ (平均 $1.24$ )であつた。これら両者の平均の間には有意の差は認められない(有意水準5%)。

### Ⅳ インスリン注射の結合抗体価に及ぼす影響について

3カ月以上のインスリン使用糖尿病患者4名についてレギュラー・インスリン(ウシ)12単位の皮下注射の抗体価に及ぼす影響を調べた。いずれもコントロール不良のものであつた。注射後の抗体価の最大変動の範囲は $5\sim 10\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ (平均 $7.7\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ )の低下であつたが、注射前に3回にわたつて測定した変動値 $5\sim 7\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ (平均 $6.3\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ )とくらべて有意の変動であるとは考えがたい(図8)。

### Ⅴ 長期間インスリン使用者における結合抗体価の変動について

6カ月以上インスリン注射を続けているものについて抗体価の変化を経過を追つて観察した。コントロール良好群7例の変動範囲は1例を除き $-15\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}\sim$

表 3 インスリン感性テストと結合抗体価

症例	年齢 (才)	性	結合抗体価 ( $m\mu g/dl$ )	血糖調節レベル ( $mg/dl$ )	血糖最低値 ( $mg/dl$ )	最低値に達する時間 (分)	インスリン感性指数	コントロール状態
1	62	♂	410	155	110	55	0.82	不良
2	62	♂	265	124	62	50	1.24	良好
3	64	♂	230	146	87	50	1.18	不良
4	66	♀	190	150	108	50	0.84	不良
5	18	♂	140	154	103	50	1.02	不良
6	34	♀	95	125	60	50	1.30	良好
7	30	♂	70	138	68	40	1.75	良好
8	55	♀	40	170	120	40	1.25	不良
9	30	♂	5	164	105	55	1.07	不良
10	41	♀	5	140	68	50	1.44	良好

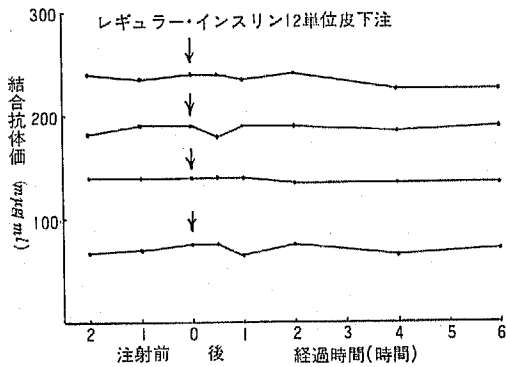


図 8 インスリン注射の抗体価に及ぼす影響

+20 $m\mu g/ml$  で、わずかの変動を示したに過ぎなかつた。これらのもののインスリン使用量の変動は-6単位~+8単位、平均2.2単位の増加であつた。残りの1例は50 $m\mu g/ml$ の低下を示したがインスリン量の変動はみられなかつた。コントロール不良群については14例について経過を観察した。4例を除き残りの10例の抗体価の変動範囲は-40 $m\mu g/ml$ ~+50 $m\mu g/ml$ であつた。これらの症例のインスリン使用量の変動は-4単位~+6単位、平均3.4単位の増加であつた。1450 $m\mu g/ml$ から1350 $m\mu g/ml$ に減少した例(図9-1)は、インスリン使用量の増加(6単位)した例である。410 $m\mu g/ml$ から300 $m\mu g/ml$ に減少した例(図9-2)はインスリン使用量が60単位から44単位に減少したものである。以上の成績より結合抗体価はインスリン長期使用者では比較的一定した値を保っていることが多いが少数のものでは著しい変動があることがわかる。この変動は必ずしもインスリン使用量の一定の変動を伴わないものようである(図9-1~図9-3)。

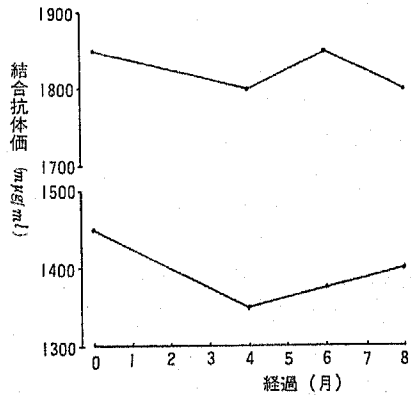


図 9-1 長期インスリン使用者における結合抗体価の経過変動 コントロール不良群

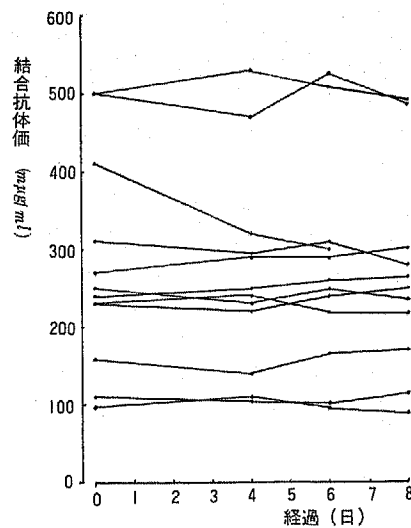


図 9-2 長期インスリン使用者における結合抗体価の経過変動 コントロール不良群

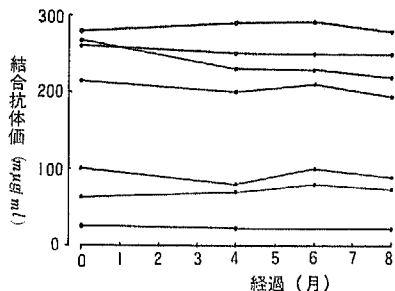


図 9 3 長期インスリン使用者における結合抗体価の経過変動 コントロール良好群

VI 糖尿病性網膜症と結合抗体価

網膜症の有無と結合抗体価との関係については、抗体価が200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のもの48名中網膜症を有するもの12名(25%)であり、抗体価が201 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものについては15名中網膜症を有するもの4名(27%)であり、両者の比率に差はみられない。次に網膜症の進展と結合抗体価との関係については、Wagener I期8名のうち200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のものは5例、201 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものは3例であり、II期5名のうち200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のものは4例、201 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものは1例であり、III期3名はいずれも200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。以上の成績からは網膜症の有無およびその進展と結合抗体価との間に一定の関係を見出しがたい。

次に糖尿病性網膜症の進展に関しては年齢、糖尿病の罹病期間、インスリン使用量、インスリン使用期間などとの関係が予想されているので、これらの因子について分析した。Wagener III期のもの3例については、すべて年齢が高く55才~71才であった。これら3名はいずれも収縮期および拡張期高血圧を有するものであった。その他の因子については網膜症との間に有意の関係を見出すことは困難であった(図10-1~図10-4)。

VII 糖尿病性腎症と結合抗体価

糖尿病性腎症の示標としては、尿蛋白とPSPテストを用いた。尿蛋白は非糖尿病性びまん性腎疾患や尿路感染症においても見出されるものであるが、これらの存在は病歴、尿沈渣所見、尿定量培養によりできうるかぎり除外した。図11に示した如く、尿蛋白陽性者は14例、陰性者は36例であった。尿蛋白陽性例の抗体価は0~310 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間に分散し、陰性例の抗体価は0~1850 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間に分散していた。以上の成績より尿蛋白陽性者において抗体価が高いという現象は見出しえなかつた。糖尿病罹病期間と尿蛋白およびインスリン使用量と尿蛋白の間にも一定の傾向を見出しがた

表 4 糖尿病性網膜症と結合抗体

結合抗体価	網膜症		Wagener 分類				
	なし	あり	I	II	III	IV	V
0	6	3	1	2	0	0	0
1~100	16	6	2	2	2	0	0
101~200	14	3	2	0	1	0	0
201~300	7	3	2	1	0	0	0
301 以上	4	1	1	0	0	0	0
合計	47	16	8	5	3	0	0

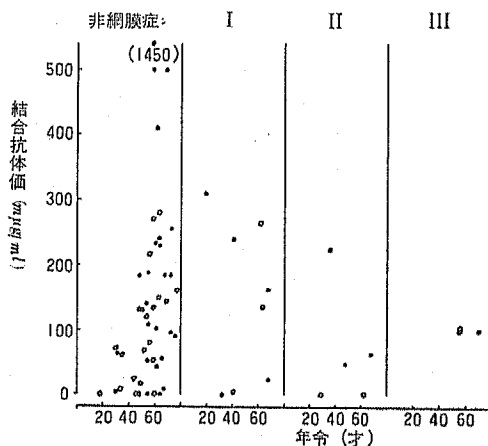


図10-1 糖尿病性網膜症と結合抗体価 年齢との関係 (○: コントロール良好群 ●: 同不良群) ローマ数字は Wagener 病期

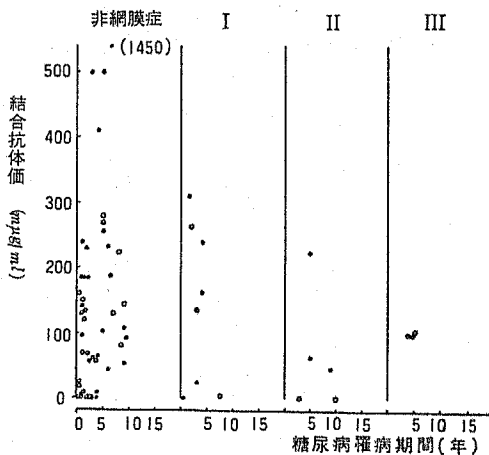


図10-2 糖尿病性網膜症と結合抗体価 糖尿病罹病期間との関係

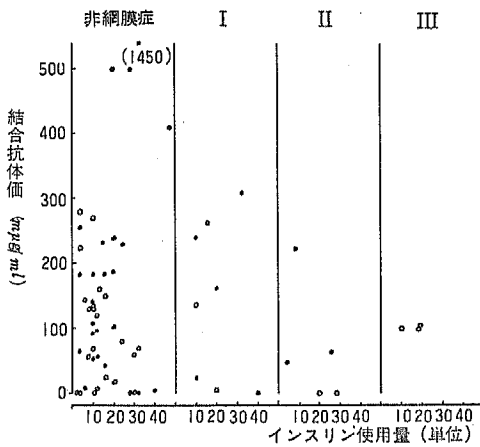


図10-3 糖尿病性網膜症と結合抗体価  
インスリン使用量との関係

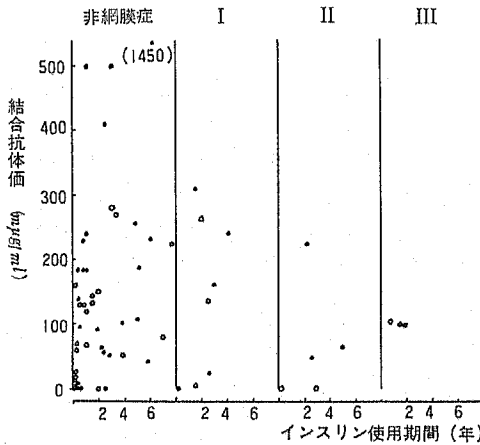


図10-4 糖尿病性網膜症と結合抗体価  
インスリン使用期間との関係

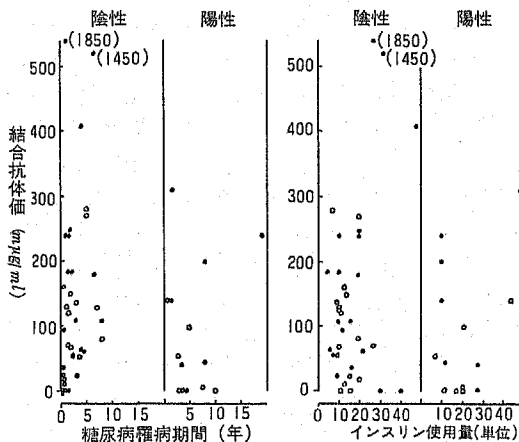


図11 尿蛋白と結合抗体価

い。

P S Pテストは20例についておこなつた。15分値が26%以上のものは12例であり、抗体価は0~260m $\mu$ g/mlの間に分布していた。15分値が25%以下のものは8例で、その抗体価の分布は0~410m $\mu$ g/mlであつた。両群の間には有意の差を見出しがたい(図12)。

以上の成績より糖尿病性腎症の示標として尿蛋白とP S Pを用いた場合には、これらと結合抗体価との間には有意の相関関係を見出しがたい。

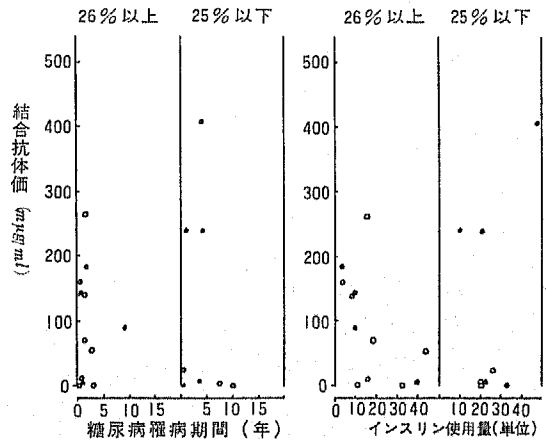


図12 P S Pテストと結合抗体価  
P S P値は15分値を示す

考 按

インスリン抗体の糖尿病における意義については、臨床とときとしてみられるインスリン抵抗性糖尿病に高い抗体価がみられたという報告<sup>②⑬⑭⑮⑯⑰⑱</sup>から糖尿病患者のインスリンに対する感受性にインスリン抗体が関与しているのではないかということが予想される。一方、インスリン大量使用者に糖尿病性網膜症が多かつたという報告<sup>⑲</sup>や螢光抗体法を用いた研究<sup>⑲⑳</sup><sup>㉑㉒</sup>などから糖尿病性血管障害に対するインスリン抗体の関与の可能性は充分考えられるところである。インスリンの抗原性を含めてこれらのことを検討してみたい。

インスリンの抗原性は近年に至るまで疑問とされていたが、Moloney 氏<sup>㉓</sup>はマウス瘰癧阻止法を用いた動物実験でインスリンの抗原性を証明している。以来、インスリンの抗原性については多くの研究がなされ、インスリンの血糖降下作用を阻止する中和抗体、試験管内でインスリンと沈降反応を生じる沈降抗体、I<sup>131</sup>インスリンを示標として濾紙電気泳動法などで分離しうる結合抗体、補体消費を利用する方法により検



出される抗体などの存在が報告されている<sup>①</sup>。

ヒトにおけるインスリン抗体の出現頻度については、Berson ら<sup>②</sup>は結合抗体法を用いて検索し3カ月以上インスリンを使用しているヒトの血中には常に抗体が認められ、インスリンを使用していないヒトでは認められないことを報告している。インスリン使用者において結合抗体が高頻度に見出されることについては著者を含めて報告者の見解は一致している<sup>③④⑤⑥</sup>。インスリン結合抗体がインスリンを使用していないヒトにおいても存在するか否かは、結合抗体が外来性インスリンに対する抗体であるか否かという問題に関連しており興味あるところである。これに関して、田坂氏ら<sup>⑦</sup>はインスリン非使用者で経口抗糖尿病剤のみの投与を受けている糖尿病患者10名のうち1名に結合抗体を見出したことを報告している。大根田氏ら<sup>⑧</sup>も糖尿病でインスリン未使用者81名について検索し17例が結合抗体陽性であったと述べている。補体消費法を用いてインスリン未使用者に抗体を見出したというPáv らの報告<sup>⑨</sup>もあり、ヒトにおける結合抗体がインスリン未使用者にもみられる可能性は直ちには否定できない。Páv らは膵組織の炎症過程にもとづいて変化した内因性のインスリンが流血中に出て、これに対して抗体が産生されるのではないかと考えている。同種インスリンの注射によつてブタに結合抗体が産生されたという報告<sup>⑩⑪</sup>があるが、Brunfeldt<sup>⑫</sup>やLockwood<sup>⑬</sup>の考えているように、製剤化の途中でインスリンが抗原性をおびてきたために同種抗体が生じるものとすれば、インスリン未使用者に内因性変性インスリンによつて産生された結合抗体が存在しうる可能性を間接的に支持するものと云えるかもしれない。しかし、インスリンの第3次構造（ラセン状のアミノ酸鎖の3次元的存在様式）、第4次構造（分子単位の集合体ないし重合体）が十分に解明されていない現在<sup>⑭</sup>、変性インスリンという特殊な条件を考慮することは現状では問題の残るところと思われる。

インスリン未使用者には結合抗体を見出しえないとする報告はBerson らの他にDeckert<sup>⑮</sup>、平田氏<sup>⑯</sup>の報告がある。補体消費法を用いたVan de Wiel らの報告<sup>⑰</sup>も同様である。インスリン未使用者にみられる結合抗体について平田氏は、インスリンおよび被検体の変性にもとづく見せかけの陽性所見である可能性を示唆している。著者も古くなつたI<sup>131</sup>インスリンを用いた場合には、時として放射能のピークを2カ所に見出すことがあつたが、このような場合には添加インスリンによる結合抗体価の算出が不可能であつたことから考えて、平田氏の示唆する可能性は充分

考えられるものと思われる。著者の成績では、Berson ら<sup>②</sup>と同様、インスリン未使用者では結合抗体を見出しえなかつたこと、非糖尿病患者でもインスリン注射を受けているものには結合抗体が証明されたこと、および結合抗体はインスリンの注射を開始してから8週間以上を経過したもののみ見出されたことは、結合抗体が外来性インスリンに対する抗体である可能性を示しているものと思われる。

インスリン使用期間と結合抗体価との関係については、尾上氏ら<sup>⑱</sup>は注射開始後1年以内では関連性があるようにみえるが、それ以上の長期では長期投与例が必ずしも高いということはなかつたと報告している。大根田氏ら<sup>⑲</sup>も使用期間とのあいだに関連がみられたとしている。著者の成績では、6カ月以内では使用期間と抗体価の間に関連性がみられた。すなわち、結合抗体産生に少くとも8週間を要すること、その後しばらくの間（注射開始後6カ月）は、抗体価が上昇するが、その後は使用期間と抗体価の間には密接な関係を見出してない。6カ月以上注射を続けているものの経過観察でも抗体価の著しい変動は、ほとんどの例でみられなかつた。Palumbo ら<sup>⑳㉑</sup>も、3年間の経過観察で大部分のものは抗体価の変動が著しくなかつたと報告している。Spellacy ら<sup>㉒</sup>によれば、インスリン結合抗体の半減期は25日である。このように半減期が比較的長いこと、インスリンを絶えず注射していることが結合抗体の安定性を生じているのかもしれない。

インスリン注射量と結合抗体価との関係については、1日量との間に関係がみられ注射量の多いものほど抗体価が高い傾向にあるとの報告<sup>㉓㉔</sup>もあるが、著者の成績では、4単位～24単位の間ではそのような傾向はみとめられなかつた。結合抗体価が比較的高く300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をこえる例は、いずれも26単位以上のインスリンを必要としていた。さらに30単位をこえる例でも低い抗体価を示したものもあつた。さらにインスリン総使用量が3,000単位をこすと抗体価との間に多くの場合密接な関係がみられなかつた。以上の成績と経過を追つて観察したさいに抗体価が比較的安定したものであつたという成績とから、抗体価の比較的低い例(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)では、生体内での結合抗体の意義は、結合抗体がインスリン必要量というかたちで血糖降下抑制作用を反映しているものではなくて、生体内ではインスリン拮抗物質<sup>㉕</sup>、阻害物質<sup>㉖</sup>あるいはインスリン分泌動態などの生体の調節機構のかけに隠れてしまう程度のいわば注射による単なる副産物と解釈することもできるのではなからうか。

糖尿病のコントロール状態と結合抗体の関係については、poor controlまたはlabileの症例には抗体価の高いものが多いという報告<sup>④</sup>がある。インスリン抵抗性糖尿病に高い抗体価を見出した報告<sup>⑥⑦⑧⑨⑩⑪⑫⑬⑭⑮⑯⑰⑱⑲⑳㉑㉒㉓㉔㉕㉖㉗㉘㉙㉚㉛㉜㉝㉞㉟㊱㊲㊳㊴㊵㊶㊷㊸㊹㊺㊻㊼㊽㊾㊿</sup>もある。著者の成績では、抗体価が300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のものではコントロール良好、不良ともにみられたが、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をこえる比較的高い抗体価を示した6例はいずれもコントロール不良であった。これらのことより結合抗体は高濃度では糖尿病の血糖調節に関与しているものと考えられる。臍別出者のインスリンの1日必要量は40単位前後であると云われている<sup>⑳㉑</sup>が、Bersonら<sup>⑩</sup>が示している如き遊離インスリンと結合インスリンの可逆的平衡関係が生体内でも行われているものとするれば、高濃度の結合抗体が血糖調節に関与し、ひいてはコントロール状態にも関係してくることは考えられるところである。Proutら<sup>⑳</sup>は結合抗体の役割をかれらが名づけた Insulin-carrying protein ( $\alpha_1$ グロブリン)からインスリンを奪うものではないかと考えているが、高濃度の結合抗体が血中に存在すれば、その結果、生体の機能に必要なインスリン量の不足が生じコントロール状態は悪くなるのであろう。

インスリン感性テストの成績については、抗体価を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を境にして分けた両群の間にインスリン感性指数の有意の差を見出しえなかつたことは、結合抗体とインスリン感性との間には相互関係はないとも考えられるが、コントロール良好群と不良群の間にも有意の抗体価の差を見出しえなかつたこと、および1例を除き抗体価が比較的低かつたことから、この結論は結合抗体価の低い場合についてのみあてはまるものではないかと思われる。高抗体価(410 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を示した1例の感性指数は低かつたが、高濃度下でのインスリン感性に結合抗体が関与しているのか否かは、直ちには結論を下すには至らない。

インスリン注射の抗体価に及ぼす影響については、予想に反して注射後に低下を示さず、ほとんど抗体価の変動がみられなかつた。低抗体価の範囲でこのようなことがみられたことについては解釈が困難である。

インスリン抗体と血管合併症の関連性については、Freedmanら<sup>㉑</sup>が蛍光抗体法を用いてインスリン治療を施した糖尿病性腎症の患者の糸球体、尿細管基底膜などに $\gamma$ グロブリンが存在することを見出して以来、注目されるところとなつている。その後、Blumenthalら<sup>㉒</sup>は、蛍光標識インスリンを用いて糖尿病性糸球体硬化腎および各種の非糖尿病性腎疾患の腎の硝子化病変について検索し、インスリンの結合がほ

とんどすべての糖尿病性糸球体硬化腎に認められたが、非糖尿病性腎では認められなかつたことを報告している。これらの結果より、かれらは糖尿病性腎症の成因にインスリンを抗原とする免疫現象が関与する可能性を示唆している。Colemanら<sup>㉓</sup>も同様の方法を用いて Kimmelstichl-Wilson 病変腎において Blumenthalらと同様の所見をえている。これらの報告からは生前のインスリン使用の有無は不明であるが、Farrantら<sup>㉔</sup>は同様の方法を用いて、インスリン治療をうけたことのない糖尿病患者6例のうち4例に特有の螢光を腎組織に見出ししている。平田氏<sup>㉕</sup>は家兎およびヒトの腎について螢光インスリンによる染色が必ずしも糖尿病病変に特有なものではないと報告している。螢光抗体法によるインスリン抗体と結合抗体の関係については明らかではないが、尾上氏ら<sup>㉖</sup>の示唆する如く、一抗体法で測定しうる可溶性抗体は二抗体法で沈降させることができる<sup>㉗㉘</sup>から、生体内で結合抗体が組織に沈着する可能性は考えられる。

著者は糖尿病性腎症を尿蛋白とPSPテストから推論したのであるが、尿蛋白の存在を糖尿病性腎症と直ちに結びつけることは厳密には問題が残るが、尿路感染、非糖尿病性腎疾患を除外すれば、尿蛋白は本症を比較的鋭敏に反映している<sup>㉙</sup>と云われている。著者の成績では、尿蛋白と流血中の結合抗体との間になんらの関係も見出されなかつた。武内氏<sup>㉚</sup>は糖尿病性腎症について蛋白尿陽性群に抗体陽性率が高かつたが、この群では罹病期間が長いものが多く、それだけインスリン使用の機会が多く抗体出現の可能性も多いかもしれないと述べている。この点について検討してみたが、尿蛋白陽性、陰性群の間にインスリン使用量の差は認められず、著者の成績からは、その可能性を見出すことができなかつた。

PSPテストに関しても尿蛋白と同様、結合抗体価との間に一定の関係を見出しえなかつた。以上の成績より、結合抗体が糖尿病性腎症の進展に積極的な意義をはたしているものとは考えがたい。

糖尿病性網膜症については、Colemanら<sup>㉛</sup>は糖尿病眼の伸展標本について螢光抗体法を用いて網膜小動脈瘤と毛様体基底膜に螢光インスリンが特異的に結合することを見出し、網膜症の成因が抗原抗体反応による可能性を示している。著者の成績からは、網膜症の有無と結合抗体価との間になんら関係を見出せなかつた。さらに網膜症のWagener分類と流血中のインスリン結合抗体価との間にも相互関係を見出しえなかつた。Wagener分類に関するかぎり網膜症の進展に関しては結合抗体を関係づけることはできないのではな

いかと思われる。

以上のことより、糖尿病性血管合併症の成因および進展に関しては、インスリン結合抗体は積極的な意義を有しているものとは考えがたい。

### 結 論

インスリン結合抗体を糖尿病患者および非糖尿病患者について測定した。インスリン使用糖尿病患者についてはコントロール状態、インスリン感性テスト、糖尿病性血管合併症などとの関係を含めて検討した。

1. 結合抗体は糖尿病患者、非糖尿病患者をとわず、インスリン使用者にのみ認められた。その頻度はインスリン使用糖尿病患者では72名中61名(84%)であつた。

2. 結合抗体が最も早く認められたのは注射開始後53日であつた。

3. 結合抗体価は注射開始後8週間をすぎると次第に上昇し、6カ月をすぎると殆んど変動を示さないものが多かつた。

4. 結合抗体価とインスリン1日使用量との間には4~24単位の範囲では何ら関係が認められなかつたが、抗体価が高いもの(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上)ではインスリン1日使用量が比較的少かつた。結合抗体価とインスリン総使用量との間には密接な関係を見出すことができなかった。

5. 糖尿病のコントロール状態については高抗体価(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上)を示すものはコントロール不良であつた。

6. インスリン感性指数との関係については抗体価が比較的低い(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)ものについては結合抗体との関連性を見出さなかつた。高抗体価(410 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の1例は感性指数が低かつた。

7. 結合抗体価が比較的低い(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)糖尿病患者にレギュラー・インスリン12単位を皮下注射したが抗体価は殆んど変動しなかつた。

8. 糖尿病性網膜症、腎症(尿蛋白、PSPテスト)と結合抗体との間には何ら関係が認められなかつた。

本論文の要旨は第8回日本糖尿病学会総会(1965)において発表した。

稿を終るにあたり、御指導御校閲をいただいた恩師、小田正幸教授に深甚なる謝意を表すると共に、本研究に終始御協力をいただいた浅間病院院長、吉沢国雄博士、信州大学小田内科、峯村直博士をはじめ教室の各位に感謝の意を表します。

### 文 献

- ①山村雄一・北川正保：インシュリン抗体と糖尿病，最新医学，18：317，1963 ②Yalow, R. S. & Berson, S. A. : Immunologic aspects of insulin, Amer. J. Med., 31 : 882, 1961 ③Berson, S. A., Yalow, R. S., Bauman, A., Rothschild, M. A. & Newerly, K. : Insulin- $I^{131}$  metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects, J. Clin. Invest., 35 : 170, 1956 ④小田正幸・峯村直・藤山正夫：糖尿病の動向，内科，17：61，1966 ⑤Unger, R. H. : High growth-hormone levels in diabetic ketoacidosis, J. A. M. A., 191 : 945, 1965 ⑥Field, J. B. & Stetten, D. Jr. : Humoral insulin antagonism associated with diabetic acidosis, Amer. J. Med., 21 : 339, 1956 ⑦Marsh, J. B. & Haugaard, N. : The effect of serum from insulin-resistant cases on the combination of insulin with the rat diaphragm, J. Clin. Invest., 31 : 107, 1952 ⑧Berson, S. A. & Yalow, R. S. : Clinical diabetes mellitus edited by Ellenberg and Rifkin, pp 194, 1962, McGraw-Hill Book Co., New York ⑨Berns, A. W., Owens, C. T., Hirata, Y. & Blumenthal, H. T. : The pathogenesis of diabetic glomerulosclerosis, Diabetes, 11 : 308, 1962 ⑩徳田久弥：網膜症の治療，綜合臨牀，14：1148，1965 ⑪Berson, S. A. & Yalow, R. S. : Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody, J. Clin. Invest., 38 : 1996, 1959 ⑫平田幸正：インスリン抵抗性糖尿病，最新医学，19：2123，1964 ⑬葛谷信貞：糖代謝位相に関する研究特に糖尿病治療との関係について，臨床，5：742，1952 ⑭Wagener, H. P. : Retinopathy in diabetes mellitus, Proc. Am. Diabetes Assoc., 5 : 201, 1946 ⑮Lowell, F. C. : Evidence for the existence of two antibodies for crystalline insulin, Pro. Soc. Exper. Biol. Med., 50 : 167, 1942 ⑯Colwell, A. R. & Weiger, R. W. : Inhibition of insulin action by gamma globulin, J. Lab. & Clin. Med., 47 : 844, 1956 ⑰Feldman, R., Grodsky, G. M., Kohout, F. W. & McWilliams, N. B. : Immunologic studies in a diabetic subject resistant to bovine insulin but sensitive to porcine insulin, Amer. J. Med., 35 : 411, 1963

- ⑩Kühnau, J. Jr. & Stritzky, A.: Mit Schweineinsulin erfolgreich behandelte Insulin-resistenz bei Diabetes mellitus Mitteilung über zwei Fälle, Schweiz. Med. Wschr. **93**: 914, 1963
- ⑪Palumbo, P. J., Molnar, G. D. & Tauxe, W. N.: Adrenal steroid therapy in insulin resistance A clinical and immunologic study, Mayo Clinic Proc., **39**: 161, 1964
- ⑫Merimee, T. J.: Insulin resistance Study of effect of 6-mercaptapurine, Lancet **1**: 69, 1965
- ⑬Németh, L.: Über die Retinopathia diabetica, Klin. Mbl. Augenhk. **144**: 589, 1964
- ⑭Freedman, P., Peters, J. H. & Kark, R. M.: Localization of gamma-globulin in the diseased kidney, Arch. Intern. Med. **105**: 524, 1960
- ⑮Coleman, S. L., Becker, B., Canaan, S. & Rosenbaum, L.: Fluorescent insulin staining of the diabetic eye, Diabetes, **11**: 375, 1962
- ⑯Coleman, S. L. & Becker, B.: Localization of gamma globulin in the human diabetic eye, Amer. J. Ophthal., **55**: 239, 1963
- ⑰Moloney, P. J. & Coval, M.: Antigenicity of insulin Diabetes induced by specific antibodies. Biochem. J., **59**: 179, 1955
- ⑱田坂仁正・入江 実・井出健彦・金沢康徳・小坂樹徳: 糖尿病患者血清の Insulin との結合, 糖尿病, **7**: 135, 1964
- ⑲油谷友三・尾上久吾・小橋邦維・藤中真一: Insulin 抗体の産生とその臨床的観察, 糖尿病, **7**: 136, 1964
- ⑳山形敏一・大根田昭・久保田幸率: インスリン抗体に関する研究, 第2報 臨床的研究, 糖尿病, **8**: 186, 1965
- ㉑Páv, J., Jezlová, Z. & Skrha, F.: Insulin antibodies, Lancet, **2**: 221, 1963
- ㉒Brunfeldt, K. & Deckert, T.: Antibodies in the pig against pig insulin, Acta Endocrinol., **47**: 367, 1964
- ㉓Lockwood, D. H. & Prout, T. E.: Antigenicity of heterologous and homologous insulin, Metabolism, **14**: 530, 1965
- ㉔Prout, T. E.: The chemical structure of insulin in relation to biological activity and to antigenicity, Metabolism, **12**: 673, 1963
- ㉕平田幸正: 追加, 糖尿病, **8**: 187, 1965
- ㉖Van de Wiel, Th. W. M. & Van de Wiel-Dorfmeijer, H.: Insulin antibodies, Lancet, **1**: 561, 1964
- ㉗Palumbo, P. J., Molnar, G. D. & Tauxe, W. N.: The relationship of insulin antibody concentration to insulin needs of diabetic patients, Excerpta Medica, **74**: 173, 1964
- ㉘Spellacy, W. N. & Goetz, F. C.: Insulin antibodies in pregnancy, Lancet, **2**: 222, 1963
- ㉙Goldner, M. G. & Clark, D. E.: The insulin requirement of man after total pancreatectomy, J. Clin. Endocrinol., **4**: 194, 1944
- ㉚McCullagh, E. P., Cook, J. R. & Shirey, E. K.: Diabetes following total pancreatectomy Clinical observations of ten cases, Diabetes, **7**: 298, 1958
- ㉛Prout, T. E., Odak, V. V., Dendinos, G. J. & Lockwood, D. H.: The insulin-carrying protein of normal human serum, Diabetes, **12**: 144, 1963
- ㉜Far-rant, P. C. & Shedden, W. I. H.: Observations on the uptake of insulin conjugated with fluorescein isothiocyanate by diabetic kidney tissue, Diabetes, **14**: 274, 1965
- ㉝平田幸正: インスリン抗体 その他糖尿病性腎症の病因に関連して, 糖尿病, **8**: 162, 1965
- ㉞尾上久吾・小橋邦維・藤中真一: Insulin 抗体の測定法とその意義について, 日本臨床, **24**: 753, 1966
- ㉟中島 滋: 糖尿病性腎障害に関する臨床的研究 第1報 糖尿病患者の臨床所見, 糖尿病, **7**: 247, 1965
- ㊱武内重五郎: 糖尿病性腎症の臨床概説, 糖尿病, **8**: 152, 1965
- ㊲Palumbo, P. J., Molnar, G. D. & Tauxe, W. N.: Serum protein binding of exogenous insulin in menstruating and pregnant patients, Diabetes, **13**: 634, 1964
- ㊳Segal, B. M.: Insulin inhibition and antagonism, Metabolism, **13**: 753, 1964
- ㊴Sehon, A. H., Kaye, M., McGarry, E. & Rose, B.: Localization of an insulin-neutralizing factor by zone electrophoresis in a serum of an insulin-resistant patient, J. Lab. & Clin. Med., **45**: 765, 1955
- ㊵Deckert, T.: Insulin antibodies and autoimmunization, Excerpta Medica **74**: 169, 1964
- ㊶Morgan, C. R. & Lazarow, A.: Immunoassay of insulin: Two antibody system, Diabetes, **12**: 115, 1963
- ㊷Levine, R.: Analysis of the actions of the hormonal antagonists of insulin, Diabetes, **13**: 362, 1964
- ㊸Colwell, A. R.: Editorial Vascular disease in diabetes, Diabetes, **14**: 110, 1965
- ㊹Skom, J. H. & Talmage, D. W.: Nonprecipitating insulin antibodies, J. Clin. Invest., **37**: 783, 1958
- ㊺Field, J. B.: Studies on steroid treatment of chronic insulin resistance, Diabetes, **11**: 165, 1962