

インスリン抗体に関する研究 (第2報)

北海道大学医学部第2内科 (指導 鳥居敏雄教授)

工 藤 守

(受付: 1月7日, 1963)

I 序 論

インスリン抵抗性糖尿病特に非内分泌性インスリン抵抗性に関しては Field, Stetten¹⁾, Vallence Owen²⁾³⁾⁴⁾ のインスリン Antagonist, Field⁵⁾, Weinberg⁶⁾ Tyeler, Beigelman⁷⁾等の末梢組織異常及び Molcney, Coval⁸⁾, Armin⁹⁾¹⁰⁾, Wright¹¹⁾, Lowell¹²⁾¹³⁾等のインスリン抗体産生による考えがある。教室の清水¹⁴⁾は第1報でインスリン Bis-diazo-benzidine (後BDBと略す)赤血球凝集反応の基礎的検討とウサギにおけるインスリン抗体の検索, インスリン使用患者の B.D.B 凝集反応の臨床的意義を発表したが, 本報ではインスリン免疫モルモットのインスリン抗体の証明, と B.D.B 凝集抗体とマウスにおけるインスリン中和作用との関係を検討した。尚工¹⁵⁾標識インスリン抗体のマウス生体内分布をも測定した。

II 実験材料及び実験方法

1) 免疫動物と免疫方法:

体重 400 g ~ 700 g の雄モルモットを使用した。免疫方法は Freund's-Adjuvant 法及びヒツジ血球 B.D.B インスリン静注法を各群に分けて実施した。

第1報の清水¹⁴⁾の方法と同様に Freund's Adjuvant 法では1回免疫に1mg (約22~23単位) のインスリンを使用し免疫回数は4週毎計2回, 毎週1回計4回実施した。

ヒツジ血球 B.D.B インスリン静注法では, 第1報の清水の方法と同様に1回免疫に1.5mgのインスリンを用いた B.D.B ヒツジ赤血球抗原を毎週3回計12回実施した。

最終免疫終了後2週目に全採血を行った。採血した血清は血清分離後-10℃又は-20℃に凍結保存し, その部度溶解して使用した。

2) インスリン BDB 赤血球凝集反応

第1報に発表した如く, Arquilla-Stavitsky¹⁶⁾を更に改良した方法により実施し判定した。

3) 免疫モルモット腸管の Schultz-Dale 反応

免疫モルモット採血後直ちに回腸末端より約10cmの小腸管をとりだし, 37℃の Tyroid 液に浸し, 次いで Magnus 装置に入れキモグラフィオンに連絡し Tyroid 液灌流中で対照試験にヒスタミン溶液 (10~100γ/ml) を使用し, 更にインスリン溶液 (10~100γ/ml) を使用し, それに対する腸管収縮を描記せしめた。

4) 試験管内沈降反応

沈降反応は Ouchterlony¹⁶⁾¹⁸⁾ 法及び Preer¹⁷⁾¹⁸⁾ の法によつて実施した。Ouchterlony 法では非稀釈抗血清, 抗原はウシ結晶インスリン溶液 (濃度1mg/ml, 及び10mg/ml) を使用した。

Preer 法は直径2mm, 前後の可及的等大の毛細管の内面を0.3%寒天液にて被覆した後, 非稀釈抗血清0.02ml~0.03ml を入れ, その上に高さ5mm程度の寒天層を作り, 更に抗原であるインスリン溶液を0.02ml~0.03ml を重ねる。インスリンは結晶牛インスリンを使用し, その濃度は1mg/ml, 10mg/ml, 100mg/ml, を使用した。この試験管を4℃に保存し1週間以上にわたつて観察した。

5) マウス痙攣阻止試験

Molcney の方法により実施した。数時間から12時間断食せしめたマウス腹腔内に抗血清0.25ml 及び結晶ウシ・インスリン溶液0.25ml~0.5ml の混合物を注入し, 45度傾斜せる金網上におき, 低血糖による痙攣及び麻痺を起し, 金網より落下せるものの数を求める。尚1群を5匹とし対照群としては正常モルモット血清を使用する。インスリン中和力は全例マウスを落下し得る最小インスリン単位の存在範囲をもつて表現した。例えば0.2単位で%落下せしめ, 0.1単位で%落下せしめた場合にはその力価を0.1単位~0.2単位とし, その際抗血清0.25ml 使用するときの血清の力価を0.4単位/ml~0.8単位/ml と記載した。血清の力価の決定には0.25ml を使用したが例外的には0.5ml を使用した。

6) マウス実験糖尿病発症試験

発症試験は Moloney⁹⁾の方法及び Armin & Wright¹⁰⁾の方法によつた。

Moloney 法ではマウスの体重、尿糖及び血糖を測定した後、血清 1.0ml を腹腔内に3日間続けて注入し、その間尿糖、尿中アセトン体を測定し最終日に血糖測定を実施した。

Armin & Wright 法では抗血清 0.5ml をマウス頸静脈より注入し、注入前、注入後1時間、2時間、3時間、及び4時間の血糖値の変動を追求した。

尚血糖値はマウス尾静脈又は頸静脈から採血した試料について測定した。測定法は血糖は Hagedorn-Jensen 法、尿中アセトン体は Lange 法、尿糖は Nylander 法及び Testtape 法によつた。

糖尿病発症試験及びマウス痙攣阻止試験に使用したマウスは北海道大学理学部実験動物飼育室より提供を受けた B72 及び D.D strain の体重 20 g ~ 30 g 前後のものを使用した。

7) I^{131} 標識モルモット抗血清グロブリンのマウス生体内分布に関する実験

i) I^{131} 標識抗体作製

モルモット抗血清を50%飽和硫酸法にて分割して得たグロブリンを Talmage 変法¹⁹⁾により I^{131} 標識を行った。

A液: I^{131} (carrier free) 2 mc/ml 0.01N 沃度加里 0.5ml 0.5N 塩酸 20滴

B液: 0.1N 亜硝酸ナトリウム 20滴

C液: 20mg/ml グロブリン液 5.0ml

0.2M 重炭酸緩衝液 (PH 10.0) 5.0ml

A液にB液を加え (黄色に着色) 次いでC液を加え (黄色が消失)よく混和せしめ室温30分放置する。更に50%飽和硫酸溶液で再び分割後、流水に12時間以上透析し、更に $1/15$ M 磷酸緩衝液 (PH 7.2) に2時間透析する。グロブリン定量は Folin の Tyrosin 法により測定した。

ii) 臓器内分布

上記の方法により作製した抗血清グロブリン5mgをマウス頸静脈より静注し、注入後18時間、3日、7日後に断頭し、血液、脾臓、肝臓、脾臓及び筋肉の一定量につき Scintillation-Counter により放射能を測定し、組織 1 g に対する抗体グロブリンの量を算出した。

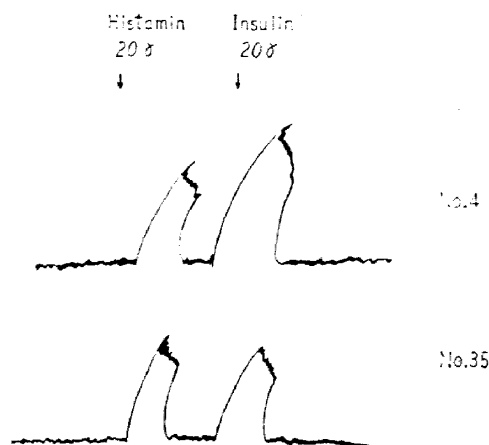
本研究に使用したインスリン製剤及び結晶ウシ・インスリンは鳥居製薬株式会社、武田製薬株式会社及び小玉商事株式会社よりの提供を受けた。

III 研究結果

1) Schultz-Dale 反応

インスリン免疫モルモットのインスリンに対する Schultz-Dale 反応は凝集反応が陰性であつても全例に陽性に認められ Freund's adjuvant 法及び BDB 処理インスリン免疫法による差はなかつた。

第1図 免疫モルモット腸管 Schultz-Dale 反応



2) 沈降反応

試験管内沈降反応は Ouchterlony 法 Preer 法に於いてもウサギ抗血清と同様に全例に陰性であつた。

3) BDB 凝集価及びインスリン中和力

BDB 凝集価は Freund's adjuvant では免疫回数が多し群に凝集価の高いものが認められる。しかし BDB 凝集価は第1報¹⁰⁾でのウサギの場合と同様に BDB 処理インスリン免疫にて凝集価の昇が著明であつた。

Frund's adjuvant 法では BDB 凝集価とインスリン中和力の間には正の相関 ($r = +0.728$) が見られた。しかし BDB 処理インスリンによる免疫群では BDB 凝集価が高いにもかかわらず中和力が低く凝集価と中和力の間には相関がみられなかつた。

4) マウス実験糖尿病発症試験

マウス実験糖尿病発症試験では Moloney 法による試験では全例に糖尿の出現を認め更に血糖値は1例を除く9例に上昇を認められたが著明なものでなかつた。体重は8例が減少したが血糖値との関係は認められなかつた。

以上の結果によりモルモット抗血清腹腔注入法では血糖変動が著明でないため Armin, Wright 法により血糖変動を検討した。

結果は表 (表4) 図 (図3) に示す如く最も高い血糖

表1 モルモット抗血清のインスリン
中和力と凝集価 (I)

No.	免 疫 法	インスリン中和力 (単位/ml)	BDB 凝集価
1	ノボレンテ 毎週20単位 Freund's adjuvant	0.6~0.8	512×
2		0.1~0.2	0×
3		0.1~0.2	0×
4		0.4~0.6	8×
5	ノボレンテ 4週毎20単位 Freund's adjuvant	0.1~0.2	0×
6		0.4~0.6	4×
7		0	0×
8		0.1~0.2	2×
9	イスジリン 毎週20単位 Freund's adjuvant	0.8~1.0	640×
10		0.1~0.2	0×
11		0.2~0.4	20×
12		0.2~0.4	0×
13		0.4~0.6	20×
14		0.2~0.4	128×
15		0.4~0.6	64×
16		0.2~0.4	80×
17		0.2~0.4	24×
18		0.4~0.6	64×
19	イスジリン 4週毎20単位 Freund's adjuvant	0	4×
20		0.2~0.4	4×
21		0.2~0.4	0×
22		0.4~0.6	10×

表2 モルモット抗血清のインスリン
中和力と凝集価 (I)

No.	免 疫 法	インスリン中和力 (単位/ml)	BDB 凝集価
23	Freund's adjuvant	0.2~0.4	4×
24		0.2~0.4	8×
25	結晶ウシ・インスリン 4週毎1mg Freund's adjuvant	0.2~0.4	0×
26		0.1~0.2	0×
27		0.6~0.8	160×
28		0.1~0.2	0×
29		0.2~0.4	0×
30		0.6~0.8	160×
31		0.4~0.6	80×
32		0.4~0.6	80×
33		0.8~1.0	80×
34		0.1~0.2	0×
35	ヒツジ血球BDBウシ・インスリン 1.5 mg毎週3回	0.1~0.2	2560×
36		0.6~0.8	160000×
37		0.6~0.8	160000×
38		0.2~0.4	2560×
39		0.8~1.0	80000×
40		0.1~0.2	0×
41		0.1~0.2	80000×
対照		0	0×

表3 モルモット抗血清の腹腔内注入によるマウス糖尿病発症試験

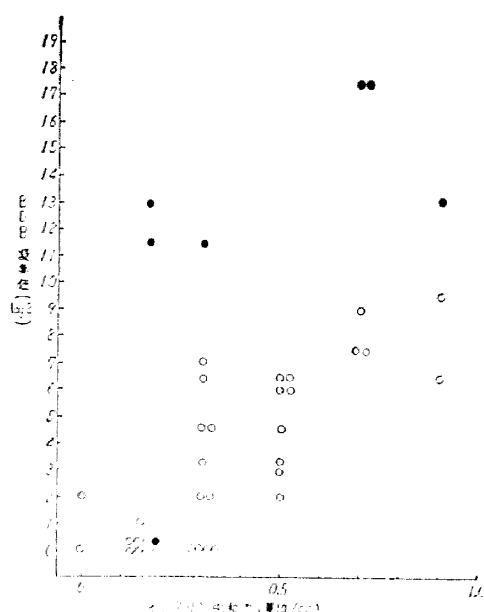
マウス No.	モルモット No.	注 入 前			注入後1日		2 日		3 日		
		血糖 (mg/dl)	体重 (g)	尿糖	体重 (g)	尿糖	体重 (g)	尿糖	血糖 (mg/dl)	体重 (g)	尿糖
1	1	50	22	—	21	+	20	+	84	21	+
2	4	105	20	—	18	+	18	+	121	18	+
3	6	68	26	—	24	+	26	+	123	25	+
4	8	67	24	—	23	+	23	+	90	24	+
5	9	127	28	—	28	±	26	+	139	26	+
6	11	145	30	—	27	+	26	+	141	28	+
7	19	59	20	—	20	+	22	+	132	23	+
8	22	78	30	—	28	+	27	+	86	27	+
9	27	149	28	—	28	+	26	+	150	26	+
10	30	143	30	—	27	+	27	+	163	27	+
11	正常	76	20	—	18	—	18	—	112	18	—
12	正常	122	22	—	21	—	20	—	109	20	—
13	生食	107	26	—	26	—	24	—	86	25	—

表4 モルモット抗インスリン血清によるマウス血糖の変動とBDB
凝集価マウス壙室阻止試験によるインスリン中和力との関係

	抗血清 No.	BDB 凝集価	インスリン 中和力 (単位/ml)	血 糖 値 (mg dl)				
				空腹時	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間
*F・A免疫群	14	128×	0.2~0.4	138	178	210	264	212
				166	228	230	204	185
	15	64×	0.4~0.6	132	170	183	177	210
				154	188	204	202	180
BDBインス リン免疫群	16	80×	0.2~0.4	118	221	340	348	381
				135	259	402	390	445
	18	64×	0.4~0.6	132	244	269	329	280
				108	260	170	216	196
BDBインス リン免疫群	35	2560×	0.1~0.2	113	164	154	126	140
				121	148	156	155	117
	37	160000×	0.6~0.8	141	135	154	145	120
				106	175	175	178	170
対照 (正常モル血清)		0×	0	116	188	194	157	105
				163	207	233	177	132
対照 (正常モル血清)		0×	0	142	170	130	100	90
				160	193	163	118	106

* Freund's adjuvant の略

第2図 免疫モルモット抗血清のBDB凝集価
とインスリン中和力との関係



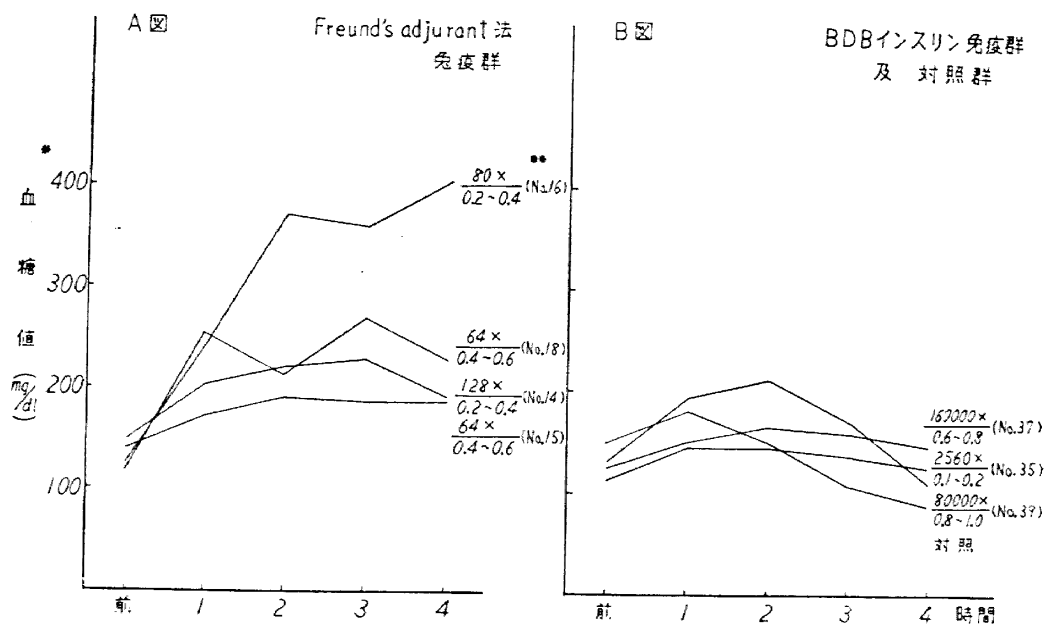
● BDB化インスリン免疫
○ Freund's Adjuvant 免疫 ($r = +0.728$)

の上昇を示した抗血清は抗血清番号 No. 16であつた。そのBDB凝集価は80×インスリン中和力は0.2単位/ml~0.4単位/mlで注入後4時間にて平均413mg/dlの高血糖を示した。

次いで抗血清番号 No.18 (BDB凝集価64×, インスリン中和力0.4単位/ml~0.6単位/ml)が高い血糖の上昇を認めた。抗血清番号No. 14 (BDB凝集価128×インスリン中和力0.2単位/ml~0.4単位/ml)もそれらにつぐ血糖上昇を認めた。更に抗血清番号No. 15 (BDB凝集価64×インスリン中和力0.4単位/ml~0.6単位/ml)は1時間, 2時間での血糖上昇は軽度であるが3時間, 4時間での血糖降下遅延を認めた。これらはいずれも Freund's adjuvant 法による免疫群である。

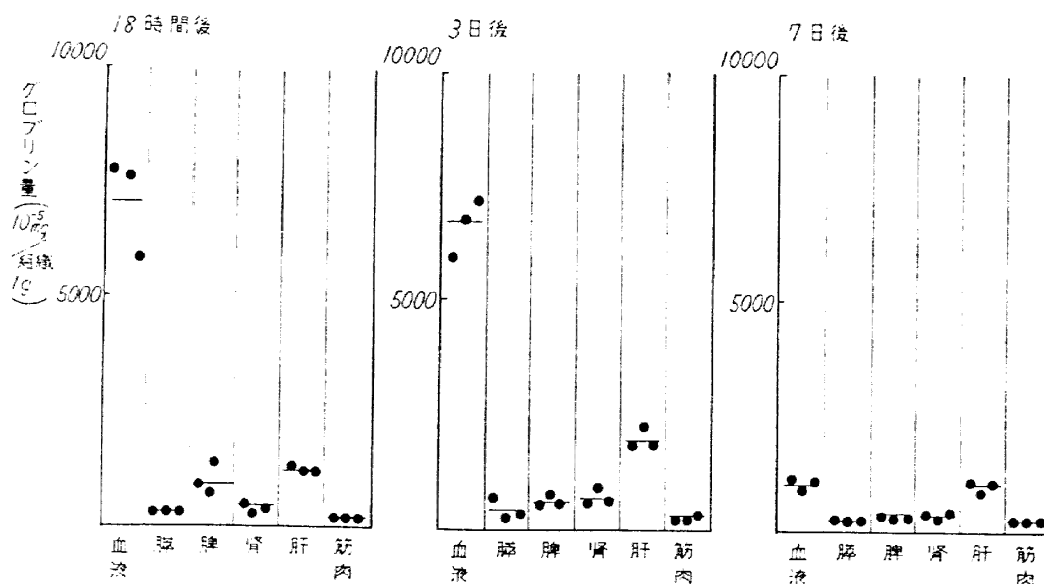
抗血清番号No. 37 (BDB凝集価160000×, インスリン中和力0.6単位/ml~0.8単位/ml)及び抗血清番号No. 35 (BDB凝集価2560×, インスリン中和力0.1単位/ml~0.2単位/ml)は軽度の血糖上昇が認められた。抗血清番号No. 39 (BDB凝集価80000×, インスリン中和力0.8単位/ml~1.0単位/ml)は注入後2時

第3図 モルモット抗血清静注法によるマウス血糖の変動



* 血糖値は1群(2匹)の平均値をもつて表現した

** 分子の数はBDB凝集価, 分母の数はマウス痙攣阻止試験によるインスリン中和力を示す()内数字は抗血清番号を示す。

第4図 I^{131} 標識正常モルモット血清グロブリンのマウス臓器内分布

間にて平均 213.5mg/100ml の血糖上昇を認めたが血糖降下遅延は認められなかった。これは全群ヒツジ血球 BDB インスリン免疫群である。

BDB 処理インスリン免疫血清は凝集価が高く且つマウス痙攣阻止試験によるインスリン中和力が高くても、Freund's adjuvant 法による免疫血清に比べるとマウ

ス血糖上昇は弱い様である。

5) I^{131} 標識インスリン抗血清の臓器内分布

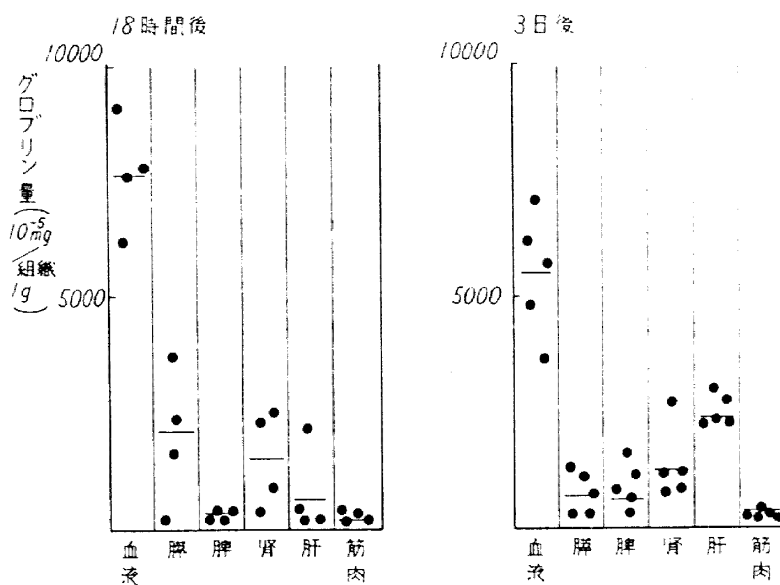
モルモットのインスリン抗血清の BDB 凝集価及びマウス痙攣阻止試験によるインスリン中和力を検した。次に抗血清のグロブリンを硫酸で分離した後 I^{131} で標識しマウス生体内に注入した。マウスでは対照実験として正

常(非免疫)モルモット血清グロブリンの I^{131} 標識したものの注入を行った。対照群では18時間後、3日後に於いては血液中の濃度が一番高く18時間後では肝臓、脾臓、が次ぎ腎臓、膵臓、筋肉となり、3日後には血液に次ぎ肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、及び筋肉の順となっている。7日後においては血液中の I^{131} 標識グロブリン量が低下し肝臓中の分布量とほぼ等しく次いで腎臓、脾臓、筋肉、膵臓と低値を示している。

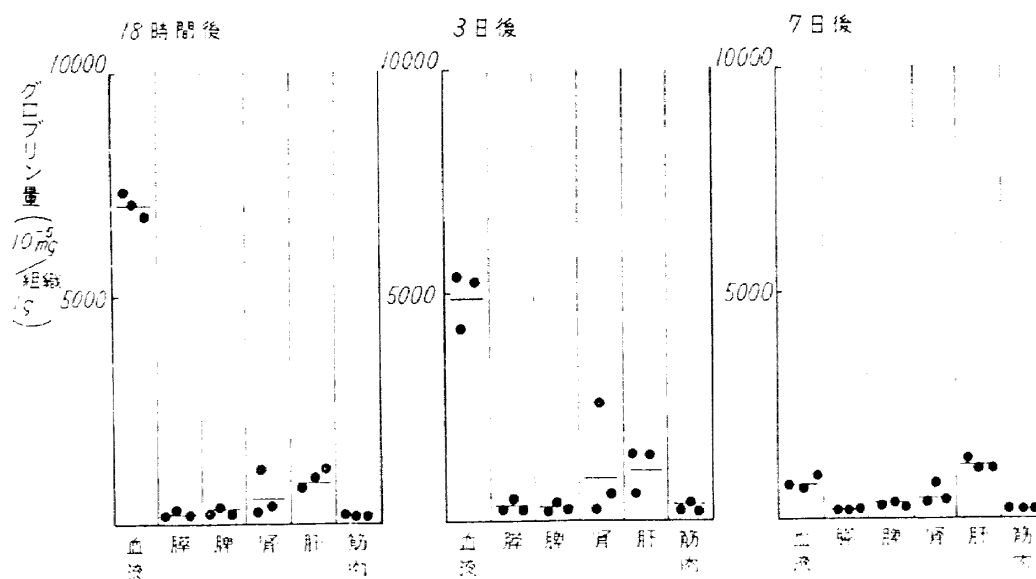
抗血清番号No. 10 (BDB凝集価 $O \times$, インスリン中和力 0.1単位/ml ~ 0.2単位/ml) は注入後18時間で標識グロブリンは血液中の濃度が一番高く次いで膵臓が高く腎臓、肝臓ついで脾臓、筋肉の順となっている。注入後3日では血液中濃度が一番高く肝臓、腎臓、脾臓次いで筋肉の順となっていたがこの群は7日後の観察をまたずして全群死亡した。

抗血清番号No. 4 (BDB凝集価 $8 \times$, インスリン中

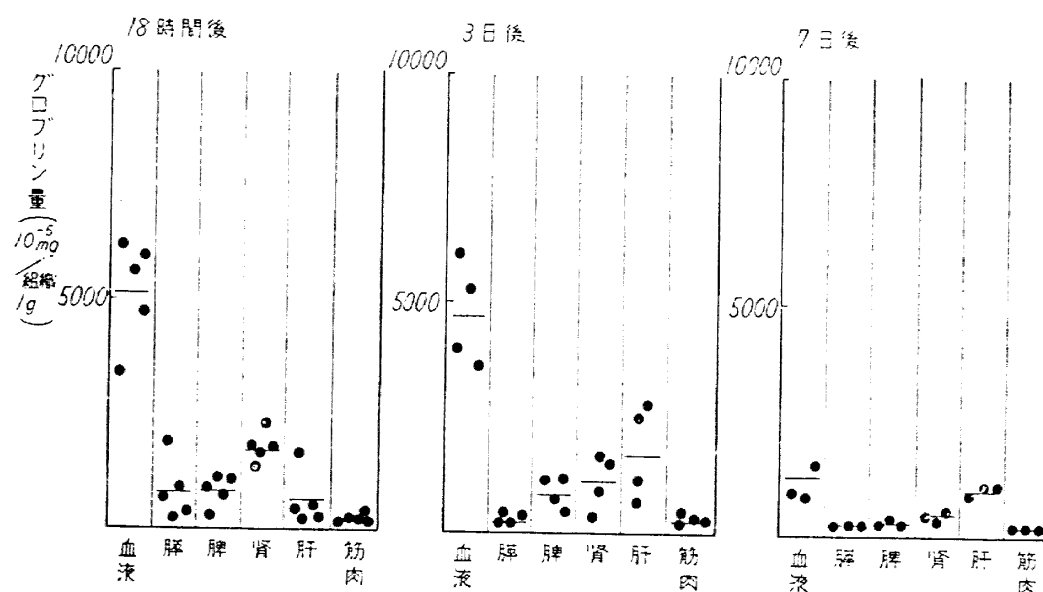
第5図 I^{131} 標識抗インスリンモルモット血清のマウス臓器内分布 (I)
BDB凝集価 $\times O$ インスリン中和力 1.2 ~ 0.2単位/ml



第6図 I^{131} 標識抗インスリンモルモット血清のマウス臓器内分布 (II)
BDB凝集価 $\times 8$ インスリン中和力 0.4 ~ 0.6単位/ml



第7図 I^{131} 標識抗インスリンモルモット血清のマウス臓器内分布 (Ⅱ)
BDB凝集価 $\times 512$ インスリン中和力 $0.6 \sim 0.8$ 単位/ml



和力 0.4 単位/ml ~ 0.6 単位/ml) のもの注入後18時間、3日に於いては血液中の I^{131} 標識グロブリン濃度が高く肝臓、腎臓と次ぎ筋肉、脾臓、膵臓となっている。7日後では肝臓が一番高く血液、腎臓と次ぎ脾臓、膵臓、筋肉となっている。

抗血清番号No. 1 (BDB凝集価 $512 \times$, インスリン中和力 0.6 単位/ml ~ 0.8 単位/ml) のもの注入後18時間、3日に於いて血液中標識グロブリン濃度が一番高く、18時間では腎臓、脾臓、膵臓、肝臓そして筋肉となっている。3日目では肝臓、腎臓、脾臓と次ぎ筋肉、膵臓、は低く差が認められない。注入後7日では血液次いで肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、筋肉となっている。

標識グロブリンの脾臓分布が認められたものは抗血清番号 No. 10の18時間、3日、と抗血清番号 No. 1のものの18時間であった。

IV 考 按

Lerman²⁴⁾ により1944年6例のインスリン抵抗性糖尿病患者で Prausnitz-Kustner 試験及び沈降反応が陽性である事が発表され、次いで1948年 Smelo が文献的考察により54例のインスリン抵抗性糖尿病10例に抗原抗体反応を示した事を発表した。

それ迄 Lewis²⁵⁾ 等により Schultz-Dale 反応によるインスリンの抗原性が論じられていたが、Moloney, Coval²⁾ はインスリンでモルモットを免疫してマウス座標阻止試験及マウス腹腔内注入による実験的糖尿病発症試験でインスリン中和抗体を証明した。このようにしてインスリンの抗原性が確立された。その後 Wasserman²⁶⁾

等は補体結合反応により, Arquilla, Stavitsky¹⁵⁾ はインスリンBDB赤血球凝集反応により, 又 Grodsky²⁰⁾ 等, Berson, Yalow²⁷⁾, Welsh, Henley²⁸⁾ 等は I^{131} 標識インスリンをインスリン治療中の患者に注射し、血清よりの消失時間(半減期)が延長することをみている。これは抗体とインスリンとの血中での結合により破壊速度が遅くなるためだと解釈している。本邦では勝木²⁹⁾, 細迫³⁰⁾ による沈降反応及びインスリン皮内反応による研究があるが我が教室の木島³¹⁾, 清水³²⁾ によるBDB凝集反応によるインスリンに対する抗体に対してこの様な種々の証明法があるが相互に関係があるかどうかは必ずしも明らかになっていない。沈降反応に関しては Valerie³³⁾, 勝木²⁹⁾, Steigerwald³⁴⁾ 等が感作動物、糖尿病患者に証明しているが本研究では Ouchterlony 及び Preer の方法を用いてすべて沈降反応陰性であった。これはインスリン抗体の証明の為には沈降反応の感度では不十分であり、沈降反応で検索する際には Steigerwald の如く不活性化した大量のインスリンで免疫するか、インスリンにインスリン抗体を結合させてより分子が大きくなる事が必要である様に思われる。

これはインスリンの分子量が相対的に小さく抗原性が他の蛋白より弱いためと考えられる。教室の清水³²⁾ によればウサギをBDB処理インスリンと Freund's adjuvant 法によって免疫した場合、両者のインスリン中和力とBDB凝集価の感度が異なるという。即ち Freund's adjuvant 法による凝集価は低い中和力が存在し、逆

にBDB処理インスリン免疫の場合凝集価が著しく高いが中和力が存在しないと云う。

著者の研究ではモルモットに於ける抗体はBDB凝集反応によつて証明される事が確認された。マウス痙攣阻止試験ではインスリン中和力がウサギの抗インスリン血清より遙かに強くみられた。モルモットを Freund's adjuvant 法で免疫した場合にはBDB凝集価とインスリン中和力には明らかな相関が認められる。しかしBDB処理インスリンで免疫した血清では前者より凝集価が高いが中和力は僅かであつて、この間には有意の相関がみられなかつた。このことからBDB凝集価とマウス痙攣阻止試験によるインスリン中和力とは異なる抗体であり、Freund's adjuvant 法で相関が認められるのはこの両者が並行して産生されるものと考え、Freund's adjuvant 法では吸収遅延があるがインスリンの生物学的活性が保たれている、これに対しBDB処理インスリンは生物学的活性が認められずこれによる免疫はインスリン分子内の生物学的活性基に対する決定群と反応する抗体を作り得ない可能性がある。

抗血清のマウス静注法による試験はマウス・インスリンに対する中和能を示すものと考えられるが Freund's adjuvant 法による抗血清のマウス・インスリン中和能はBDB処理インスリン免疫法に比して非常に強いが、マウス痙攣阻止試験では Freund's adjuvant 免疫群よりBDB処理インスリン免疫群が強いインスリン中和能を示した。これは Berson, Yalow^{21) 22) 23)} が I¹³¹ 標識インスリン結合を用いてモルモット抗血清で認めた様に抗体の反応がインスリンの種類特異性によつて異なる可能性があり、更に生体内インスリンと抽出精製されたインスリンの物理化学的性質の相違も関与するものと考えられる。

近年 Antoniadis, Gundersen^{34) 35) 36) 37)}等は血中インスリンの形態について遊離型及アルカリ性蛋白体に結合している結合型のある事をイオン交換樹脂、下垂体別出ラツテを用いて主張しているがそのインスリンの血中における種々の状態に対して抗体の中和能の相違が出て来るものではないかとも考えられる。

以上のように Freund's adjuvant 免疫法によるモルモットとウサギの抗体の相違は前者がインスリン中和力が大であること、マウスへ注射することによつて糖尿を惹起することが出来る点である。このことは Moloney も認めるところであるがこの原因は Berson 等によれば両者の抗体インスリンとの結合の強さに差があつて、そのためインスリン中和力が異なると考えている。

インスリン抗体が流血中インスリンのみに反応するものか更にインスリン産生臓器又は脾臓中に含有されているインスリンに対してもその結合能を示すものか否かを I¹³¹ 標識抗体によりマウス注入後の生体内分布により検討したが抗体による特徴ある臓器分布をしめなさい。

V 結 語

- 1) インスリン免疫モルモット腸管のインスリンに対する Schultz-Dale 反応は全例に陽性であつた。
- 2) モルモット血清のインスリンに対する沈降反応は Ouchterlony 法, Preer 法にても全例に陰性であつた。
- 3) Freund's adjuvant 法によるインスリン免疫モルモット抗血清のBDB凝集価とマウス痙攣阻止試験によるインスリン中和力とは正相関が認められた。
- 4) マウス痙攣阻止試験とマウス静注法によるインスリン中和力は Freund's adjuvant 法, BDB処理インスリン法の免疫法の相異により異なり、後者はBDB凝集価が高いがマウスの高血糖は殆んど認められなかつた。
- 5) I¹³¹ 標識抗インスリングロブリンのマウス生体内分布は一部のものを除き脾臓への局在化は認められなかつた。

稿を終るにあたり御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた鳥居敏雄教授および堀内助教に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Field, J.B., Tietz, F. & Setten, D.: Further characterization of an insulin antagonist in the serum of patients with diabetic acidosis, J clin Invest., 36 : 1588, 1957.
- 2) Vallerce Owen, J. & LuRens F.D.: Studies on insulin antagonism in plasma, Endocrinology, 60 : 625, 1957.
- 3) Vallerce Owen, J. & Dennes, E.: Insulin antagonism in plasma of diabetic patients and normal subjects, Lancet, II : 336, 1953.
- 4) Vallerce Owen, J. & Lilley, M.D.: An insulin antagonism associated with plasma-albumin, Lancet, I : 804, 1961.
- 5) Field, J.B.: Studies on steroid treatment of chronic insulin resistance, Diabetes, 11 : 165, 1962.
- 6) Field, J.B., Weinberg, Johnson, A.N. & Spots, P.: An unusual case of diabetes mellitus with increased pancreatic production of insulin, J Clin. Invest., 38 : 1003, 1959.
- 7) Tyler, R.D. & Beigelman, P.M.: Insulin resistant diabetic coma, Diabetes, 9 : 97, 1960.
- 8) Moloney, P.T. & Coval, M.: Antigenicity of insulin: Diabetes induced by specific anti-

- bodies, *Biochem. J.*, 59 : 179, 1955.
- 9) Armin, J, Grant, R.T. & Wright, P.H: Acute insulin deficiency provoked in the dog, pig and sheep by single injections of anti-insulin serum, *J. physiol.*, 153 : 131, 1960.
 - 10) Armin, J, Grant, R.T. & Wright, P.H.: Experimental diabetes in rats produced by parenteral administration of antiinsulin serum, *J. Physiol.*, 153 : 146, 1960.
 - 11) Wright, P.H: The production of experimental diabetes by mean of insulin antibodies, *Am. J. Med.*, 31 : 892, 1961.
 - 12) Lowell, F.C.: Immunologic studies in insulin resistance (I) Report of a case exhibiting variations in resistance and allergy to insulin, *J. clin. Invest.*, 23 : 225, 1944.
 - 13) Lowell, F.C: Immunologic studies in insulin resistance (II) The presence of a neutralizing factor in the blood exhibiting some characteristics of an antibody, *J. clin. Invest.*, 23 : 233, 1944.
 - 14) 清水昇: アレルギー, 12, 137—144, 1963.
 - 15) Arquilla, E.R. & Stavitsky, A.B. The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin, *J. clin. Invest.*, 35 : 458, 1956.
 - 16) Ouchterlony, O.: *Progress in Allergy*, S. Karger, Basel, 5 : 1, 1958.
 - 17) Preer, J.R, Jr: A quantitative study of a technique of double diffusion in agar, *J. Immunol.*, 77 : 52, 1956.
 - 18) Kabat & MAYER: *Experimental immunochemistry.*, 83~85, 1961.
 - 19) 福士雄幸: 抗ラット癌抗体の微量定量的研究: 日本病理学会会誌, 49 : 988, 昭和36年.
 - 20) Grodsky, G.H. & Forsham, P.H.: An immunochemical assay of total extractable insulin in man *J. Clin. Invest.*, 39 : 1070, 1960.
 - 21) Yalow, R.S. & Berson, S.A: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *J. clin. Invest.*, 39 : 1157, 1960.
 - 22) Yalow, R.S, & Berson, S.A: Species-specificity of human anti-beef, pork insulin serum, *J. Clin. Invest.*, 38 : 2017, 1959.
 - 23) Yalow, R.S, & Berson, S. A: Recent studies on insulinbinding antibodies, *Ann, New York Acad. Sci.*, 82 : 338, 1959.
 - 24) Lermann, J.: Insulin resistance, role of immunity in its production *Am. J. med. & Sci.*, 207 : 354, 1944.
 - 25) Lewis, J.H.: The antigenic properties of insulin, *Jour, A.M.A.*, 108 : 1336, 1937.
 - 26) Wasserman, P,B Broh-Kahn, RE & Mirsky, I,A: Antigenic property of insulin, *J. Immunol.*, 38 : 213, 1940.
 - 27) Yalow, R,S & Berson S.A.: I¹³¹ metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects, *J. clin. Invest.*, 35 : 170, 1956.
 - 28) Welsh,G,H, Henley, E,D Williams, R,H. & Cox, R,S. Insulin-I¹³¹ metabolism in man, plasma-binding, distribution and degradation, *Am, J. Med.*, 21 : 324, 1956.
 - 29) 勝木司馬之助等: 糖尿病発症の中樞性要因ならびにインスリン抗体の意識, 3 : 26, 1960.
 - 30) 紐迫有昌等: インスリン抗体に関する研究 (続報), 糖尿病 4 : 133, 1961.
 - 31) 木島鴻治等: インスリン抗体に関する研究, 糖尿病 3 : 60, 1960.
 - 32) Valerie, J, Cunliffe, A,C: A precipitating antibody to iusulin, *Nature* 192, 136 : 1961.
 - 33) Steigerwald, H. Neuere untersuchungen Über die antigen wirkung des insulins, *Klin, Wsch.*, 38 : 1960.
 - 34) Antoniades H.N, Studies on the state of insulin in blood: the state and Transport of insulin in blood, *Endocrinology*, 68 : 7, 19 61.
 - 35) Antoniades H.N & Gundersen, N,: Studies on the state of insulin in blood: dissciation of purified human blood insulin complex(es) by incubation with adipose tissue extracts in vitro, *Endocrinology*, 68 : 36, 1961.
 - 36) Antoniades, H,N,. Gundersen, K, & PYLE, H,M.: Studies on the state of insulin in blood: The role of glucose in the in vivo dissciation of iusulin complexes, *Endocrinology*, 69: 163, 1961.
 - 37) Antoniades, HN, Gundersen, K, Beigelman, P,M, Studies on the state, transport and regulation of iusulin in human blood, *Diabetes*, 11 : 264, 1962.

Abstracts of Originals

Studies on Insulin Antibodies

I. Bis-diazo-benzidine Hemagglutination of Immunized Rabbits & Insulin treated Patients

Noboru Shimizu

The Second Department of Medicine, (Director: Prof. Toshio Torii)

School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo

In the serological assay of insulin antibody, the author studied on the detection of optimal conditions of the bis-diazo-benzidine hemagglutination technique by Arquilla & Stavitsky. With this method, the demonstration of insulin antibody in the sera of immunized rabbits and insulin treated patients were performed.

The sera of 11 rabbits which immunized with insulin in Freund's adjuvant & alumprecipitated insulin had weak neutralizing activity to exogenous ox insulin, whereas hemagglutination titres were generally low.

Eight rabbits were immunized with insulin-conjugated sheep erythrocytes by use of bis-diazo-benzidine. High hemagglutination titres and no ability to neutralize the physiological action of insulin were demonstrated in all antisera. With this result, it was suggested the hemagglutination titres and the neutralizing activity to insulin were presented independently.

The sera of 46 insulin treated patients were tested by the hemagglutination technique for insulin antibody. Only 2 cases were found to have the hemagglutination titres of 1/64 and 1/256. There was no correlation between hemagglutination titres and daily requirement of insulin.

Attempts to demonstrate precipitin band by agar gel diffusion method in antisera of rabbits and patients were all unsuccessful.

Studies on Insulin Antibodies

II. Studies on Insulin Antibodies of Guinea-pigs immunized with Insulin

Mamoru Kudo

The 2nd Department of Internal Medicine (Director: Prof. T. Torii)

Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido

The antigenicity of insulin in guinea-pig was studied. A group of guinea-pigs was immunized with insulin coupled sheep erythrocytes by bis-diazotized benzidine and an other group was done with insulin in Freund's adjuvant.

The antibodies were demonstrated by BDB-hemagglutination test, Schultz-Dale's reaction, agar gel diffusion and two tests for insulin neutralization, in which the neutralization of exogenous ox insulin was demonstrated by mouse convulsion test and the neutralization of endogenous insulin in mouse was measured by hyperglycemia after injection of the antiserum.

Positive Schultz-Dale's reactions and negative agar gel diffusion tests were resulted in both antisera.

Antiserum immunized with insulin in Freund's adjuvant had low BDB-hemagglutination titer, positive mouse convulsions test and positive neutralizing activity of endogenous insulin in mouse.

High correlation was observed between the BDB-hemagglutination and the neutralization titer of exogenous insulin in mouse. On the other hand neutralization titer of exogenous insulin was independent.

The antiserum immunized by BDB-method had extremely high BDB-hemagglutination titer,

moderate neutralization titer of exogenous insulin in mouse, and no neutralizing activity of endogenous insulin in mouse, no correlation between the results of three methods was found. These discrepancies suggested that BDB conjugated insulin had few biological activity and that guinea pig antisera reacted in a different way two endogenous mouse and exogenous ox insulin.

Studies on the Vital Reactions by Anaphylaxis in the Liver

II. On the Periodic Observations of the Changes in the Reversed Anaphylaxis by the Anti-red Cell Serum

Akimitsu Yoshimi

Dept. of Pathology (Director: Prof. Yuji Hamamoto),

Dept. of Internal Medicine (Director: Prof. Kyo Hara),

Osaka Medical College, Osaka

The present investigation was carried out for the purpose of presenting information about the relationship between the morphological changes and the results of functional tests of the liver.

Based upon the theory of "Intravascular antigen antibody reaction", anti-rabbit red cell guinea pig serum (hemolytic titer: from 64 to 32) were injected through the hepatic artery or portal vein of rabbits.

Both histological changes in the liver and changes in various liver function tests caused by this reversed anaphylaxis were simultaneously investigated at intervals of 7, 15, (Group IV) 30, 40, (Group III) 60, (Group II) and 90 days (Group I) after a single provocative injection of antiserum.

In the histological examination of the liver in rabbits, 15 days after the injection, the granulation tissue with giant cells were seen remarkably surrounding the large area of focal necrosis and fresh fibrosis were developed. Various degree of degeneration of liver cells were found. In a few cases the productive endoarteritis and the fibrinoid swelling of arterial walls were discovered in the interlobular connective tissue.

Thirty days after, the small necrotic foci and thrombosis were presented.

Ninety days after, the major changes were remarkable fibrosis and the liver showed the post-necrotic cirrhosis at least in part. But in other part of the liver lobules localized limited inflammatory processes were remained, and the cords of parenchymal cells were somewhat dissociated.

On the contrary no significant changes were found in the control animals by injecting the normal guinea pig serum.

Then the electrophoretic pattern of serum protein fractions were as follows: a) decrease of total serum protein in Group I and Group II, b) declination of albumin in Group I, c) increase of gamma globulin in Group I and Group II.

The results of the liver function tests were positive in Group III only by the Cephalin-cholesterol flocculation test.

The significant correlation between these patho-histological changes and the grade of functional disturbances of the liver were discussed.
