

インスリン受容体に関する研究

第 2 編

抗インスリン抗体のインスリン受容体への影響

岡山大学医学部第三内科学教室（主任：大藤 眞教授）

久保田 正 幸

（昭和56年1月17日受稿）

Key words：インスリン受容体，抗インスリン抗体，
親和定数。

結 言

インスリン抵抗性の発症機序の1因にインスリン投与により生体内に出現する抗インスリン抗体があげられる。しかし抗インスリン抗体がどのような機序でインスリン抵抗性を発現させるのかという問題は、十分解明されておらず、未だ不明な点が多い。

そこで筆者は臨床上高度のインスリン抵抗性を示し、かつ抗インスリン抗体価の高い極期の患者血清よりえた抗インスリン抗体と、緩解期の同一患者血清およびステロイド糖尿病の患者血清よりえた抗インスリン抗体を用いて、in Vitroにおいてヒト胎盤膜、モルモット肝臓膜および腎臓膜インスリン受容体に対する¹²⁵I-insulinの結合におよぼす抗インスリン抗体の影響を検討した。併せてヒト胎盤膜インスリン受容体と抗インスリン抗体のAffinity ConstantをScatchard Plotsより求め、抗インスリン抗体存在下での¹²⁵I-insulinとインスリン受容体のDynamicsを検討し考察を加えた。

材 料 と 方 法

- (1) ヒト胎盤膜インスリン受容体およびモルモット肝、腎臓膜インスリン受容体の作製法

ヒト胎盤は正常満期正常分娩胎盤を用いた。モルモット肝臓と腎臓は18時間絶食後朝9時に断頭して十分脱血させた後採取した。第1報に記した方法に準じ各々のインスリン受容体を作

製した。

- (2) ¹²⁵I-insulinの作製法

インスリンの標識はGavinらのChloramine T法の変法¹⁾でおこない、そのSpecific Activityは150~200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。

- (3) インスリン受容体の蛋白定量法

Bovine Serum Albumin (BSA) をスタンダードとしてLowry法²⁾により測定した。

- (4) 抗インスリン抗体の分離法

工藤らの方法³⁾に準じて抗インスリン抗体を分離した。Glycine 3.003gとNaCl 2.338gと0.1 N HCl 100mlを混合し蒸留水を加え500mlとした後、pH3.0に調整しGlycine-HClを作製した。平均分子量60,000のDextranと蒸留水で数回洗浄したNorit AのCharcoalを用いて0.5%と5% Charcoalとを等量混合したDextran-Coated Charcoalを作製した。患者血清1容とpH 3.0 Glycine-HCl Buffer 9容を十分に混和した後、0.25% Dextran, 2.5% Charcoal加0.1M Glycine-HCl Buffer 5容を入れ十分に混和し、その後4℃3,000rpm 10分間遠心した後上清をとり直ちに4N NaOHでpH7.4に調整した。その後上清をミニコンB-12で濃縮し、抗インスリン抗体を含む血清として使用するまで-20℃で凍結保存した。なおインスリン抵抗性糖尿病の患者の極期の血清は3倍に、寛解期とステロイド糖尿病患者の血清は10倍に濃縮した。濃縮倍率をかえた理由はインスリン受容体への¹²⁵I-insulinの結合におよぼす抗インスリン抗体価の影響をみるだけでなく、各々3者の血清中の抗イン

スリン抗体価をほぼ同一にし、抗インスリン抗体の特性の影響も併せてみるためである。抗インスリン抗体のない正常人血清を上記の方法と同様に処理し、コントロール血清として用いた。

(5) ^{125}I -insulin の Degradation 率

5% TCA Precipitation Test で90%以上のものを RRA に用いた。また5% TCA Precipitation Test で可溶性 ^{125}I -insulin は Degradation をうけているとした。 ^{125}I -insulin を24°Cで放置し、指定の時間毎に各々5% TCA Precipitation Test をおこない、開始時の5% TCA Precipitation Test の値を100%として経時的な ^{125}I -insulin の Degradation 率を表示した。同様に ^{125}I -insulin と300 μg のヒト胎盤膜インスリン受容体を24°Cで孵置し、指定の時間毎に4°C 3,000rpm 30分間遠心し、上清の ^{125}I -insulin について各々5% TCA Precipitation Test をおこない、開始時の5% TCA Precipitation Test の値を100%としてインスリン受容体による経時的な ^{125}I -insulin の Degradation 率を表示した。

(6) Binding Study

0.1ng ^{125}I -insulin と250~300 μg のヒト胎盤膜インスリン受容体、モルモット肝、腎臓膜インスリン受容体を24°Cで50mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 で孵置した。

(a) インスリン受容体への ^{125}I -insulin の結合におよぼす抗インスリン抗体の影響

抗インスリン抗体を含む血清を各々20 μl , 40 μl , 60 μl , 80 μl , 100 μl 加え以下の4群について抗インスリン抗体の影響を検討した。

I 群： ^{125}I -insulin と抗インスリン抗体をあらかじめ24°C 90分間孵置させた後、インスリン受容体を加え、さらに24°C 120分間孵置させる群。(以下 (I+I-ab) + R と略す)

II 群： ^{125}I -insulin とインスリン受容体と抗インスリン抗体を同時に加え、24°C 120分間孵置させる群。(以下 I + I-ab + R と略す)

III 群： ^{125}I -insulin とインスリン受容体をあらかじめ24°C 120分間孵置させた後、抗インスリン抗体をあらかじめ24°C 120分

間孵置させた後、抗インスリン抗体を24°C 90分間孵置させる群。(以下 (I+R) + I-ab と略す)

IV 群：インスリン受容体と抗インスリン抗体をあらかじめ30分間孵置させた後、インスリン受容体を1回孵置液で洗浄し、 ^{125}I -insulin を加え、さらに24°C 120分間孵置させる群。(以下 (I-ab + R) + I と略す)

なお I 群~IV 群のインスリン受容体への ^{125}I -insulin の結合を、正常人血清を各々20 μl , 40 μl , 60 μl , 80 μl , 100 μl を加えた時の特異的結合を100%として示した。

(b) 抗インスリン抗体への ^{125}I -insulin の結合
 ^{125}I -insulin と抗インスリン抗体を有する患者の血清各々20 μl , 40 μl , 60 μl , 80 μl , 100 μl を24°Cで50mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 で90分間孵置した後、Assay Volume と等量の25% Polyethylene Glycol (PEG) を加え、4°C 3,000rpm 遠心し、沈澱物の放射能活性を総結合とした。10⁴ ng/ml の Native Insulin 存在下での沈澱物の放射能活性を非特異的結合とし、総結合より非特異的結合をひいたものを特異的結合とした。

(c) ヒト胎盤膜インスリン受容体および抗インスリン抗体の Affinity Constant

300 μg のヒト胎盤膜インスリン受容体およびインスリン抵抗性糖尿病患者の極期および寛解期の血清60 μl 中の抗インスリン抗体へ ^{125}I -insulin と Native Insulin を競合させ、Displacement Curve をえた。それより Scatchard Plots を描き、各々の Affinity Constant を算出した。また ^{125}I -insulin と300 μg のヒト胎盤膜インスリン受容体とインスリン抵抗性糖尿病患者の極期の血清60 μl とを同時に孵置した時のヒト胎盤膜インスリン受容体の Affinity Constant を上記と同様にして算出した。

(d) Dissociation Study

300 μg のヒト胎盤膜インスリン受容体にあらかじめ結合していた ^{125}I -insulin の Dissociation 率を、Dilution のみとインスリン抵抗性糖尿病患者の極期の血清各々20 μl と100 μl 添加時と10⁴ ng/ml の Native Insulin 添加時の Dissociation 率を各々経時的に求めた。

結 果

(I) 基礎的検討

(i) ^{125}I -insulin とインスリン受容体の特異的結合の経時的変化

Fig. 1 は24℃でのヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulin の特異的結合の経時的変化を示した図である。特異的結合は孵置後60分

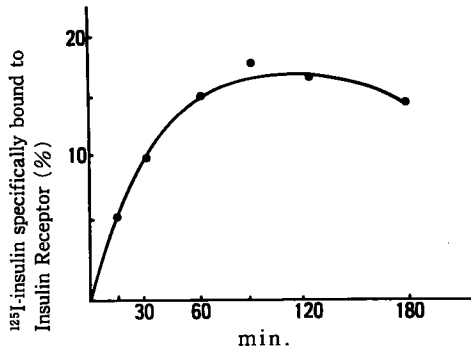


Fig. 1 Time course of ^{125}I -insulin binding to insulin receptor

14%に達し、90分では16.4%に達したが、3時間まではほぼ平衡状態を保った。一方非特異的結合は孵置後15分ではほぼ頂値に達し、その値はその後3時間まで有意の変化を示さなかった。

(ii) ^{125}I -insulin と抗インスリン抗体の特異的結合の経時的変化

Fig. 2 は24℃での Glycine-HCl Buffer 処理後ミニコン B-12 で3倍に濃縮した極期の患者の血清100 μl 中の抗インスリン抗体への ^{125}I -insulin の特異的結合の経時的変化を示した図であ

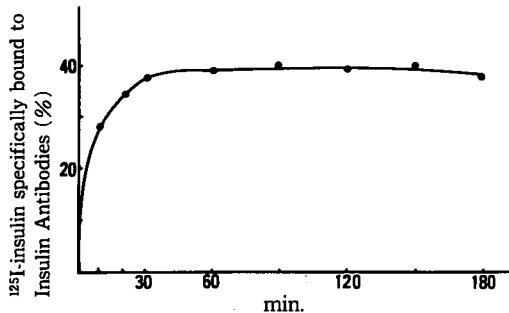


Fig. 2 Time course of ^{125}I -insulin binding to insulin antibodies

る。孵置後30分ではほぼ平衡状態に達し、その平衡状態は3時間まで続いた。一方非特異的結合

は10分ではほぼ頂値に達し、その値はその後3時間まで有意の変化を示さなかった。

(iii) ^{125}I -insulin の Degradation 率

Fig. 3 の実線は ^{125}I -insulin の24℃での経時的 Degradation 率を、波線は ^{125}I -insulin の24℃でのインスリン受容体による経時的 Degradation 率を示した図である。24℃ではほぼ2.5時間まで

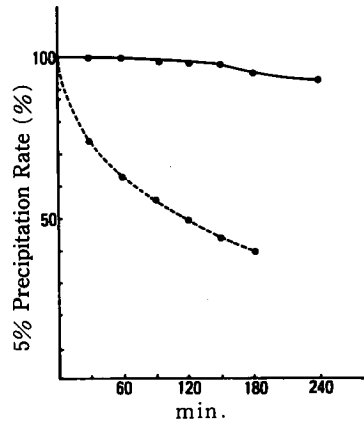


Fig. 3 Time course of degraded ^{125}I -insulin

- degradation rate of ^{125}I -insulin incubated with buffer
- - -● degradation rate of ^{125}I -insulin incubated with insulin receptor

^{125}I -insulin は Degradation を受けなかったが、3時間で5.2%、4時間で8%の ^{125}I -insulin が Degradation を受けていた。24℃でインスリン受容体によって、0.5時間で25.9%、1時間で37.5%、1.5時間で44.1%、2時間で50.9%、2.5時間で57.1%、3時間で60.4%の ^{125}I -insulin が Degradation を受けていた。

(iv) インスリン受容体の Degradation 率

Fig. 4 は24℃でのインスリン受容体の Degradation 率を示した図である。0.25時間で1.6%、0.5時間で4.3%、1時間で13.8%、1.5時間で16.6%、2時間で19.6%のインスリン受容体が Degradation を受けていた。

(v) ^{125}I -insulin と患者血清中の抗インスリン抗体との特異的結合

Fig. 5 は Glycine-HCl Buffer 処理後ミニコン B-12 で3倍に濃縮した極期のインスリン抵抗性糖尿病患者および10倍に濃縮した寛解期のインスリン抵抗性糖尿病患者とステロイド糖尿病患

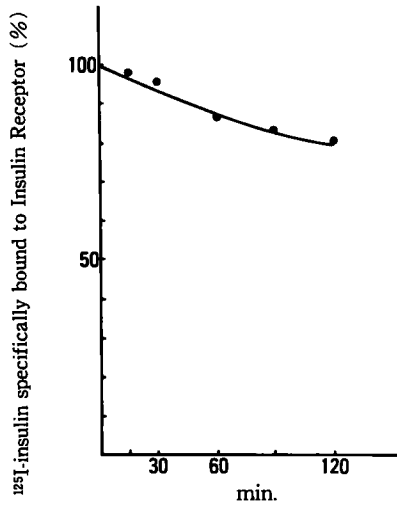


Fig. 4 Time course of degraded insulin receptor

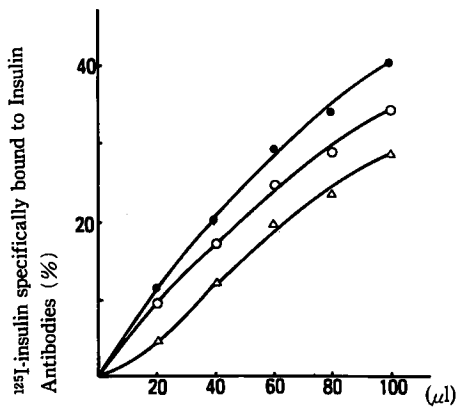


Fig. 5 Titers of insulin antibodies

- insulin antibodies from the patient in the insulin resistant period
- insulin antibodies from the patient in the remissive state
- △—△ insulin antibodies from the patient with steroid induced diabetes

者の血清中の抗インスリン抗体への ^{125}I -insulin の特異的結合を示した図である。極期の患者の血清 $20\mu\text{l}$, $40\mu\text{l}$, $60\mu\text{l}$, $80\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$ 中の抗インスリン抗体への ^{125}I -insulin の特異的結合は各々 11.5%, 20.0%, 29.8%, 34.2%, 40.1% であった。寛解期の患者血清では各々 9.4%, 16.7%, 24.5%, 28.9%, 34.2% であった。ステロイド糖尿病患者の血清では各々 4.5%, 12.4%, 19.6%, 23.5

%, 28.4% であった。

なお Glycine-HCl Buffer 処理後 Dextran-Coated Charcoal に遊離インスリンを吸着させ、さらにミニコン B-12 で 3 倍と 10 倍に濃縮した後の各々の患者血清中の IRI は 2ng/ml 以下であった。

(II) ^{125}I -insulin とインスリン受容体との特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響

(i) ヒト胎盤膜インスリン受容体

Fig. 6 は ^{125}I -insulin とヒト胎盤膜インスリン受容体との特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響を各々 4 群についてみた図である。

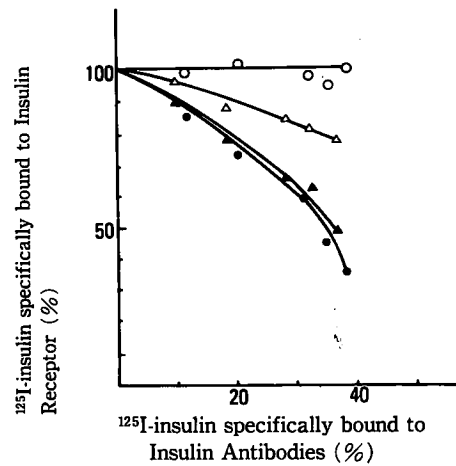


Fig. 6 Effect of insulin antibodies on human placental insulin receptor

- Group 1 : (I+I-ab)+R
- ▲—▲ Group 2 : I+I-ab+R
- Group 3 : (I+R)+I-ab
- △—△ Group 4 : (I-ab+R)+I

I 群では患者の血清 $20\mu\text{l}$, $40\mu\text{l}$, $60\mu\text{l}$, $80\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$ 中の抗インスリン抗体価が各々 11.6%, 20.1%, 31.4%, 34.3%, 38.6% であった時、患者の血清を添加することによりインスリン受容体への ^{125}I -insulin の特異的結合は、コントロール血清を添加した時の特異的結合を各々 100% とすると、各々 87.1%, 74.3%, 60.4%, 46.3%, 37.1% であり、特異的結合は阻害されていた。II 群では同様に抗インスリン抗体価が各々 8.9%, 17.6%, 27.9%, 31.6%, 36.2% であった時、インスリン受容体への ^{125}I -insulin の特異的結合は各々 90.1%, 78.4%, 67.4%, 61.7

%, 49.1%であり, 特異的結合は阻害されていた。しかしIII群では抗インスリン抗体価が各々11.6%, 20.1%, 31.4%, 34.3%, 38.6%であった時, インスリン受容体への¹²⁵I-insulinの特異的結合は各々99.2%, 101.6%, 97.6%, 95.7%, 102.7%と有意の変化はみられなかった。またIV群では抗インスリン抗体価が各々8.9%, 17.6%, 27.9%, 31.6%, 36.2%であった時, インスリン受容体への¹²⁵I-insulinの特異的結合は各々97.9%, 88.7%, 85.6%, 81.3%, 77.6%であり, 特異的結合は阻害されていた。

(ii) モルモット肝臓膜インスリン受容体

Fig. 7 は¹²⁵I-insulin とモルモット肝臓膜インスリン受容体との特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響を各々3群についてみた図で

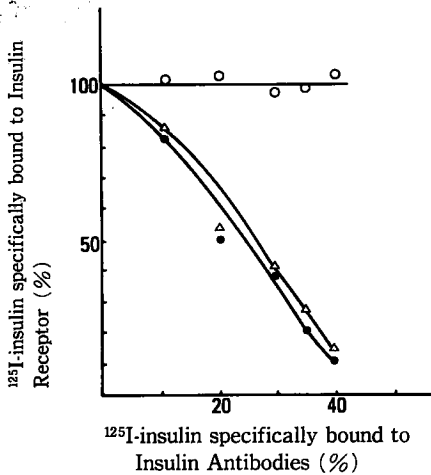


Fig. 7 Effect of insulin antibodies on insulin receptor of guinea pig liver

- Group 1: (I+I-ab)+R
- △—△ Group 2: I+I-ab+R
- Group 3: (I+R)+I-ab

ある。患者の血清20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l, 100 μ l中の抗インスリン抗体価が各々11.5%, 20.0%, 29.8%, 34.2%, 40.1%であった時, インスリン受容体への¹²⁵I-insulinの特異的結合は, I群では各々84.4%, 50.7%, 39.3%, 21.2%, 10.9%であり, II群では各々86.7%, 53.3%, 41.0%, 27.3%, 14.1%であり, I群, II群ともに特異的結合は阻害されたが, III群では有意の変化はみられなかった。

(iii) モルモット腎臓膜インスリン受容体

Fig. 8 は¹²⁵I-insulin とモルモット腎臓膜インスリン受容体との特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響を各々3群についてみた図である。患者の血清20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l, 100 μ l中の抗インスリン抗体価が各々11.5%, 20.0%, 29.8%, 34.2%, 40.1%であった時, インスリ

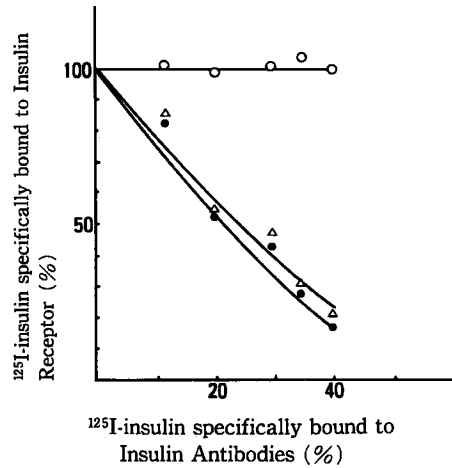


Fig. 8 Effect of insulin antibodies on insulin receptor of guinea pig kidney

- Group 1: (I+I-ab)+R
- △—△ Group 2: I+I-ab+R
- Group 3: (I+R)+I-ab

ン受容体への¹²⁵I-insulinの特異的結合は, I群では各々85.2%, 53.9%, 43.7%, 28.5%, 17.4%であり, II群では各々85.6%, 56.6%, 46.4%, 30.2%, 20.1%であり, I群, II群ともに特異的結合は阻害されたが, III群では有意の変化はみられなかった。

(III) ¹²⁵I-insulin とヒト胎盤膜インスリン受容体との特異的結合におよぼす各種抗インスリン抗体の影響

Fig. 9 は Glycine-HCl Buffer 処理後ミニコンB-12で3倍に濃縮した極期のインスリン抵抗性糖尿病患者および10倍に濃縮した寛解期のインスリン抵抗性糖尿病患者とステロイド糖尿病患者の血清中の3種の抗インスリン抗体のインスリン受容体への¹²⁵I-insulinの特異的結合におよぼす影響をみた図である。Fig. 9(a)はI群について, Fig. 9(b)はII群についてその影響をみた

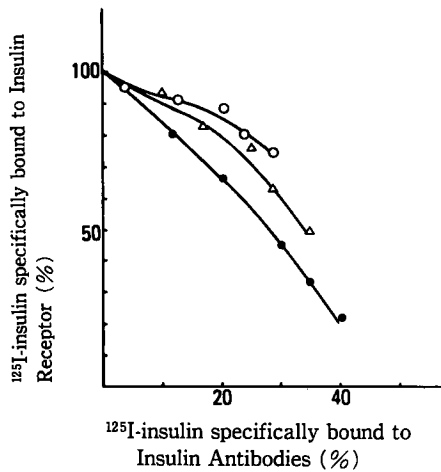


Fig. 9 (a) Effect of insulin antibodies on insulin receptor in group 1

- insulin antibodies from the patient in the insulin resistant period
- △—△ insulin antibodies from the patient in the remissive state
- insulin antibodies from the patient with steroid induced diabetes

図である。Fig. 9(a)に示す様に3倍に濃縮した極期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l, 100 μ l中の抗インスリン抗体価が各々11.5%, 20.0%, 29.8%, 34.2%, 40.1%であった時、インスリン受容体への 125 I-insulinの特異的結合は、コントロール血清を添加した時の特異的結合を各々100%とすると、各々81.2%, 67.4%, 45.4%, 32.7%, 21.8%であり、特異的結合は阻害されていた。同様に10倍に濃縮した寛解期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清中の抗インスリン抗体価が各々9.4%, 16.7%, 24.5%, 28.9%, 34.2%であった時、インスリン受容体への 125 I-insulinの特異的結合は各々94.2%, 82.6%, 76.1%, 64.5%, 49.7%であり、特異的結合は阻害されていた。また10倍に濃縮したステロイド糖尿病患者の血清中の抗インスリン抗体価が各々4.5%, 12.4%, 19.6%, 23.5%, 28.4%であった時、インスリン受容体への 125 I-insulinの特異的結合は各々94.0%, 91.9%, 88.6%, 81.2%, 74.5%であり、特異的結合は阻害されていた。一方Fig. 9(b)に示す

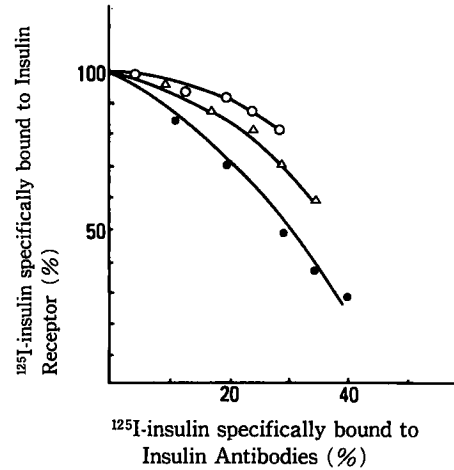


Fig. 9 (b) Effect of insulin antibodies on insulin receptor in group 2

- insulin antibodies from the patient in the insulin resistant period
- △—△ insulin antibodies from the patient in the remissive state
- insulin antibodies from the patient with steroid induced diabetes

様に3倍に濃縮した極期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清中の抗インスリン抗体価が各々11.5%, 20.0%, 29.8%, 34.2%, 40.1%であった時、インスリン受容体への 125 I-insulinの特異的結合は、コントロール血清を添加した時の特異的結合を各々100%とすると、各々83.9%, 70.0%, 49.8%, 37.4%, 27.7%であり、特異的結合は阻害されていた。同様に10倍に濃縮した寛解期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清中の抗インスリン抗体価が各々9.4%, 16.7%, 24.5%, 28.9%, 34.2%であった時、インスリン受容体への 125 I-insulinの特異的結合は各々96.4%, 87.1%, 80.8%, 70.2%, 58.9%であり、特異的結合は阻害されていた。また10倍に濃縮したステロイド糖尿病患者の血清中の抗インスリン抗体価が各々4.5%, 12.4%, 19.6%, 23.5%, 28.4%であった時、インスリン受容体への 125 I-insulinの特異的結合は各々98.5%, 93.4%, 92.0%, 87.0%, 80.1%であり、特異的結合は阻害されていた。

(IV) 抗インスリン抗体添加時のヒト胎盤膜

インスリン受容体の Dissociation Study

Fig. 10 は Dilutionと 10^4 ng/mlの Native Insulinと極期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清 $20\mu\text{l}$ および $100\mu\text{l}$ を添加した時の Dissociation Studyをみた図である。10分後、30分後、60分後、90分後、120分後で、Dilutionのみでは各々

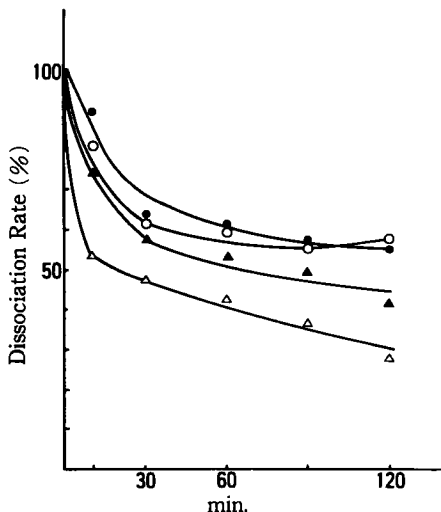


Fig. 10 Dissociation study

- dilution only
- dilution + serum of insulin antibodies $20\mu\text{l}$
- ▲ dilution + serum of insulin antibodies $100\mu\text{l}$
- △ dilution + native insulin 10^4 ng/ml

10.9%, 36.6%, 38.9%, 42.6%, 45.0%の ^{125}I -insulinが, Dilution + Native Insulin 10^4 ng/mlでは各々45.4%, 51.4%, 56.8%, 62.6%, 71.4%の ^{125}I -insulinが Dissociationした. 一方 Dilution + Glycine-HCl Buffer 処理後3倍に濃縮した極期の血清 $20\mu\text{l}$ 添加では各々19.4%, 37.6%, 39.4%, 42.8%, 43.0%の ^{125}I -insulinが, Dilution + 極期の血清 $100\mu\text{l}$ 添加では各々25.7%, 41.4%, 46.7%, 50.9%, 58.7%の ^{125}I -insulinが Dissociationした.

(V) ヒト胎盤膜インスリン受容体の Scatchard Plots 解析

Fig. 11 は 24°C でヒト胎盤膜インスリン受容体へ ^{125}I -insulinと Native Insulinを競合させて求めた Displacement Curveよりえた Scatchard Plotsである。図に示したようにヒト胎盤膜インスリン受容体は各々 Affinity Constant の異なる

2種のインスリン受容体, すなわち High Affinity-Low Capacity, Low Affinity-High Capacityからなり, 各々の Affinity Constantは

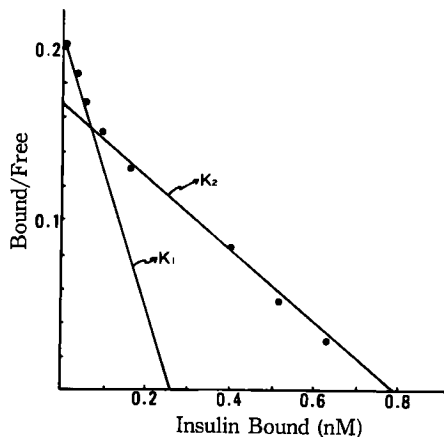


Fig. 11 Scatchard plots of insulin receptor

$$K_1 = 0.792 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 0.218 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$K_1 = 0.792 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 0.218 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $K_e = 0.267 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった.

(VI) 抗インスリン抗体添加時のヒト胎盤膜インスリン受容体の Scatchard Plots 解析

Fig. 12 は 24°C で Glycine-HCl Buffer 処理後3倍に濃縮した極期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清 $60\mu\text{l}$ 存在下で, ヒト胎盤膜インスリン受容体へ ^{125}I -insulinと Native Insulinを競合させて求めた Displacement Curveよりえた

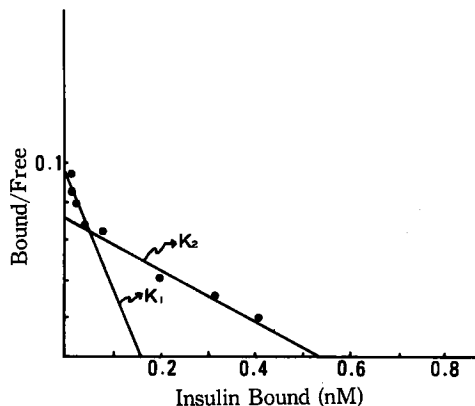


Fig. 12 Scatchard plots of insulin receptor in the presence of insulin antibodies

$$K_1 = 0.600 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 0.132 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

Scatchard Plots である。図に示したように抗インスリン抗体存在下でもヒト胎盤膜インスリン受容体は各々 Affinity Constant の異なる 2 種のインスリン受容体、すなわち High Affinity-Low Capacity, Low Affinity-High Capacity からなり、各々 Affinity Constant は $K_1=0.600 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $K_2=0.132 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $K_e=0.176 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。Fig. 11 と Fig. 12 の Scatchard Plots を比較すると、抗インスリン抗体を添加することによってヒト胎盤膜インスリン受容体の Affinity Constant, K_1 , K_2 , K_e およびインスリン受容体数が低下することが示された。

(VII) 抗インスリン抗体の Scatchard Plots 解析

Fig. 13 と Fig. 14 は抗インスリン抗体へ ^{125}I -insulin と Native Insulin を競合させて求めた

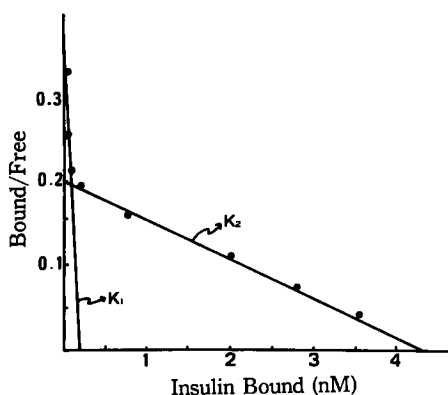


Fig. 13 Scatchard plots of insulin antibodies from the patient in the insulin resistant period

$$K_1 = 1.810 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 0.046 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

Displacement Curve よりえた Scatchard Plots である。Fig. 13 は、Glycine-HCl Buffer 処理後 3 倍に濃縮した極期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清 $60 \mu\text{l}$ 中の抗インスリン抗体の Scatchard Plots を示し、Fig. 14 は 10 倍に濃縮した寛解期のインスリン抵抗性糖尿病患者の血清 $60 \mu\text{l}$ 中の抗インスリン抗体の Scatchard Plots を示している。図に示すように極期および寛解期の患者の血清中の抗インスリン抗体は単一のものではなく、Affinity Constant の異なる 2 種の抗インスリン抗体からなっている。Fig. 13 に示

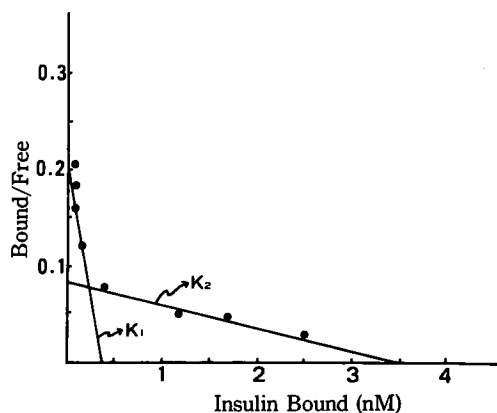


Fig. 14 Scatchard plots of insulin antibodies from the patient in the remissive state

$$K_1 = 0.542 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 0.025 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

すように極期の患者血清中の抗インスリン抗体の Affinity Constant は High Affinity-Low Capacity $K_1=1.810 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Low Affinity-High Capacity $K_2=0.046 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $K_e=0.083 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。Fig. 14 に示すように寛解期の患者血清中の抗インスリン抗体の Affinity Constant は High Affinity-Low Capacity $K_1=0.542 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Low Affinity-High Capacity $K_2=0.025 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $K_e=0.060 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。Fig. 13 と Fig. 14 の Scatchard Plots より、極期に比し寛解期では抗インスリン抗体の Affinity Constant, K_1 , K_2 , K_e が低下していることが示された。

考 察

RRA の確立以後各種のホルモン受容体に関する研究が著しい進展をとげた。なかでもインスリン受容体および末梢でのインスリン反応の様相に関する近年の研究の進歩にともない、各種病態時におけるインスリン受容体の解析とインスリン作用の伝達機構の解明がおこなわれつつある。そしてインスリン作用の発現機序の第 1 段階が、生物学的活性を有する循環血中インスリンのインスリン受容体への特異的結合にあることが明らかになってきた。

ケトアシドーシスがなくてインスリンの 1 日

投与必要量が200単位をこえる糖尿病は、インスリン抵抗性糖尿病と呼ばれている。RRAの進展にともないインスリン抵抗性糖尿病の発生機序も、インスリン作用発現の場としてのインスリン受容体を中心に以下の3群、すなわち(1)インスリン受容体前にインスリン低抗性の原因のある群 (Prereceptor Disorder), (2)インスリン受容体そのものにインスリン抵抗性の原因のある群 (Receptor Disorder), (3)インスリン受容体後にインスリン抵抗性の原因のある群 (Post-receptor Disorder) に分類することができる。(1)群は種々のインスリン拮抗ホルモンやインスリン作用に拮抗する Synalbumin⁴⁾ や Bound Insulin⁵⁾ 等の血清因子や生体内での著しいインスリンの分解の亢進⁶⁾ およびインスリン投与により生体内に出現する抗インスリン抗体等によっておこってくるものである。(2)群は Kahn⁷⁾ らが提唱しているように、若年女子で成長促進や男性化を示し、インスリン受容体の一次的欠如を有すると思われるもの、すなわち Type A と、血清中にインスリン受容体へのインスリン結合の阻害をもたらせる因子を有するもの、すなわち Type B に2分される。(3)群は、Leprechaunism⁸⁾ あるいは尿毒症など種々の病態でみられるように、標的器官のインスリン受容体数や Affinity Constant に何ら変化を認めず、かつ血中インスリンのインスリン受容体への特異的結合があるにもかかわらず、インスリン作用の伝達機構に障害のあるものである。

抗インスリン抗体の発見は Banting⁹⁾ らが1938年インスリン投与患者の血清中にインスリン阻害因子が存在すると提唱したことに始まる。その後 Berson と Yalow¹⁰⁾ がこの循環血清因子が γ -グロブリンであると証明し、さらにそのインスリン結合特性を詳細に分析した。そして抗インスリン抗体の免疫グロブリンは IgG, IgM, IgA, IgE, IgD に含まれるが、このうち IgE はインスリンアレルギーと関連があるとされている。

インスリン抵抗性糖尿病の病因が抗インスリン抗体である症例は今まで数多く報告されている¹¹⁻¹³⁾。そしてその病因に関しては抗インスリン抗体の解析が試みられ、生体内のインスリンプール中の生物学的活性を有する遊離インスリン

が循環血中の抗インスリン抗体に結合されることで、生物学的活性を失うことであると説明されている。さらに抗インスリン抗体は単一のものではなく、2つの異なる Affinity Constant, すなわち High Affinity-Low Capacity, Low Affinity-High Capacity からなることが証明された。そして Partamian¹⁴⁾ らは抗インスリン抗体によるインスリン抵抗性の発現は抗インスリン抗体の Affinity Constant に強く影響されるとし、Kerp¹⁵⁾ らは免疫グロブリンが IgG である抗インスリン抗体について、その10%は High Affinity-Low Capacity であり、その Affinity Constant $10^8 \sim 10^9 M^{-1}$ に達し、のこり90%は Low Affinity-High Capacity であり、その Affinity Constant は $10^7 \sim 10^8 M^{-1}$ であったと述べている。

一方抗インスリン抗体のインスリン受容体への影響についての記載をみると、Kahn¹⁶⁾ らは抗インスリン受容体抗体がインスリン作用をもつ機序として、細胞膜上でのインスリン受容体の Crosslinking または Aggregation を増強する事でインスリン作用を発現させるのであろうと述べ、抗インスリン抗体についても抗インスリン受容体抗体と同様の機序を推測している。さらに Shechter¹⁷⁾ らはモルモットから分離した抗インスリン抗体により 3T3 Fibroblast への ¹²⁵I-insulin の特異的結合の増加がみられたが、脂肪細胞への ¹²⁵I-insulin の特異的結合は減少したと述べている。そして抗インスリン抗体を添加して Scatchard Plots を解析すると、インスリン受容体は単一のものになったと報告している。

筆者が今回実験に用いた抗インスリン抗体は、極期と寛解期のインスリン抵抗性糖尿病患者とステロイド糖尿病患者の血清からえたものであった。抗インスリン抗体価は各々、インスリン抵抗性糖尿病の患者の極期には $4800 \mu U/ml$ 、寛解期には $1600 \mu U/ml$ であり、ステロイド糖尿病の患者では $960 \mu U/ml$ であった。インスリン抵抗性糖尿病の患者は極期には数ヶ月にわたり1日200単位のインスリンが投与されたが血糖のコントロールは不良であり、寛解期にはインスリン投与がおこなわれなかったが、良好なコントロールが保たれていた症例である。ステロイド糖尿病患者は過去にステロイドの投与をされたため

耐糖能異常をきたしインスリン1日20単位の投与がおこなわれたが、その後ステロイドの減量とともにインスリン投与量も漸減し、現在インスリンの投与はおこなわれておらず、かつ耐糖能も正常である症例である。

筆者はこれらの患者血清中に含まれる抗インスリン抗体を用いて、ヒト胎盤膜インスリン受容体に対する抗インスリン抗体の影響についての検討をおこなった。まず基礎的実験として抗インスリン抗体とヒト胎盤膜インスリン受容体と ^{125}I -insulin との間の実験条件について検討した。

時間経過についてみると、 24°C ではヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合は時間経過とともにゆるやかに上昇していき、1時間後にほぼ平衡状態に達し、その平衡状態はその後2時間続いた。一方 24°C では抗インスリン抗体への ^{125}I -insulinの特異的結合は時間経過とともに急激に上昇していき、0.5時間後にはほぼ平衡状態に達し、その平衡状態はその後2.5時間続いた。

そしてこの際の ^{125}I -insulinのDegradation率をみると、 24°C でBufferのみと孵置した ^{125}I -insulinは2.5時間後までほとんどDegradationをうけなかったが、ヒト胎盤膜インスリン受容体と孵置した ^{125}I -insulinは1時間後で37.5%、2時間後で50.9%、3時間後で60.4%のDegradationをうけた。大森¹⁸⁾らも 37°C でBufferのみと孵置した ^{125}I -insulinは1.5時間後までほとんどDegradationをうけなかったが、 37°C でヒト胎盤膜インスリン受容体と孵置すると20分後から ^{125}I -insulinのDegradationが強くなり、40分後で30.0%、1.5時間後で45.0%のDegradationをうけたと報告している。

一方インスリン受容体の 24°C でのDegradation率については、Bufferと孵置後30分後まではヒト胎盤膜インスリン受容体はほとんどDegradationをうけなかったが、1時間後で13.8%、2時間後で19.6%のDegradationをうけた。

上述の基礎的検討の後、筆者はヒト胎盤膜インスリン受容体およびモルモット肝臓膜と腎臓膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響を観察す

るとともに、ヒト胎盤膜インスリン受容体と抗インスリン抗体の各々のAffinity Constantを比較し、抗インスリン抗体存在下で ^{125}I -insulinとインスリン受容体とのDynamismについて考察し新知見をえた。そしてこれらの実験結果をもとに抗インスリン抗体が発現させるインスリン抵抗性糖尿病の病因について考察を加えた。

抗インスリン抗体を添加することによりヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合は実験結果で示したようにI群とII群では減少したが、III群では有意の変化がみられなかった。同様に抗インスリン抗体を添加することによりモルモット肝臓膜および腎臓膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合もI群とII群では減少したが、III群では有意の変化がみられなかった。またヒト胎盤膜インスリン受容体およびモルモット肝臓膜と腎臓膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合阻害率は添加する抗インスリン抗体価が高くなるにつれ上昇した。一方インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合阻害率は抗インスリン抗体価にのみ影響されただけではなく標的器官によっても異なった値を示した。すなわち添加する抗インスリン抗体価が同一であっても、結合阻害率は、ヒト胎盤膜<モルモット腎臓膜<モルモット肝臓膜インスリン受容体の順であった。IV群ではヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合は阻害されたが、その阻害率はI群とII群に比べ低値を示し、抗インスリン抗体価が高くなるにつれ上昇する傾向にあった。これは抗インスリン抗体がインスリン受容体をModulateするためというよりは、むしろ1回洗浄するだけでは抗インスリン抗体が十分とり除かれなかったためではないかと考えられる。

つぎにヒト胎盤膜インスリン受容体のDissociation率におよぼす抗インスリン抗体の影響をみると、Dissociation率はDilution<患者血清 $20\mu\text{l}$ <患者血清 $100\mu\text{l}$ <Dilution+Native Insulin 10^4ng/ml 添加の順であった。抗インスリン抗体価が高くなると、Dissociation率も上昇したが、これは抗インスリン抗体がインスリン受容体から遊離した ^{125}I -insulinと結合し、インスリン受容体への ^{125}I -insulinのRebindingをさ

せなくし、同時に抗インスリン抗体の Affinity Constant が著しく高いために、インスリン受容体からの ^{125}I -insulin の Dissociation 率も高くなったためではないかと考えられる。

インスリン抵抗性糖尿病患者の極期と寛解期およびステロイド糖尿病患者の血清を Glycine-HCl Buffer 処理後極期の患者血清を 3 倍に、寛解期とステロイド糖尿病患者の血清を 10 倍に濃縮してえた抗インスリン抗体で、I 群と II 群の実験をおこなった。患者血清の濃縮率に差異があるにもかかわらず、I 群、II 群ともにヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulin の特異的結合阻害率は、ステロイド糖尿病<インスリン抵抗性糖尿病の寛解期<インスリン抵抗性糖尿病の極期の順であった。従ってインスリン抵抗性糖尿病患者の極期に比べ寛解期の抗インスリン抗体では、結合阻害率の著しい改善がみられた。

筆者の Preliminary な観察によると、ヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulin の特異的結合阻害率は単に抗インスリン抗体価のみの影響をうけるだけではなく、抗インスリン抗体価がほぼ同一であっても異なった結合阻害率を示すのが常である。すなわち抗インスリン抗体価によって異なるだけではなく、結合阻害率は抗インスリン抗体の Affinity Constant によっても影響をうけると考えられる。今回の実験においてもインスリン受容体への ^{125}I -insulin の結合阻害率は、いずれも II 群に比べ I 群の方が高値を示した。これは ^{125}I -insulin とインスリン受容体と抗インスリン抗体間での反応時間の差と各々の次に述べる Affinity Constant の差を反映しているものと考えられる。

今回筆者はインスリン受容体についてだけではなく、インスリン抵抗性糖尿病患者の極期と寛解期の抗インスリン抗体の Affinity Constant を Scatchard Plots より求めた。3 倍濃縮の極期の抗インスリン抗体の Affinity Constant は、各々 High Affinity-Low Capacity $K_1=1.810 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Low Affinity-High Capacity $K_2=0.046 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $\bar{K}_e=0.083 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。一方 10 倍濃縮の寛解期の抗インスリン抗体の Affinity Constant は、各々 High Affinity-Low Capacity $K_1=0.542 \times 10^9$

M^{-1} , Low Affinity-High Capacity $K_2=0.025 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $\bar{K}_e=0.060 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。濃縮率に差があるにもかかわらず極期に比べ寛解期の抗インスリン抗体への ^{125}I -insulin の特異的結合および抗インスリン抗体の Affinity Constant はいずれも低下していた。すなわち極期と寛解期の抗インスリン抗体を比較すると、抗インスリン抗体価のみならず、その性状が異なっていることが立証された。

一方ヒト胎盤膜インスリン受容体の Affinity Constant を Scatchard Plots より求めた。High Affinity-Low Capacity $K_1=0.792 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Low Affinity-High Capacity $K_2=0.218 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $\bar{K}_e=0.267 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。3 倍に濃縮したインスリン抵抗性糖尿病患者の血清 $60 \mu\text{l}$ 存在下でのヒト胎盤膜インスリン受容体の Affinity Constant は各々、High Affinity-Low Capacity $K_1=0.600 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Low Affinity-High Capacity $K_2=0.132 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Average Affinity $\bar{K}_e=0.176 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。同時に抗インスリン抗体が存在する時にはインスリン受容体数が 20% 減少していた。すなわち抗インスリン抗体が存在する時には、Affinity Constant の低下およびインスリン受容体数の減少がみられた。

インスリン受容体および抗インスリン抗体と ^{125}I -insulin との反応は各々生物学的反応と免疫学的反応と異なっており、その Affinity Constant のみを単に比較することは問題があると思われるが、 ^{125}I -insulin とインスリン受容体と抗インスリン抗体の 3 者が存在する際のインスリン動態を考察するために今回あえて Affinity Constant を 1 つの指標として比較した。ヒト胎盤膜インスリン受容体：極期の患者の抗インスリン抗体：寛解期の抗インスリン抗体の Affinity Constant を各々比較すると、High Affinity-Low Capacity K_1 は 1 : 2.29 : 0.68, Low Affinity-High Capacity K_2 は 1 : 0.21 : 0.11, Average Affinity \bar{K}_e は 1 : 0.31 : 0.22 であった。一方ヒト胎盤膜インスリン受容体の \bar{K}_e ：極期の患者の抗インスリン抗体の K_2 は、1 : 0.058, ヒト胎盤膜インスリン受容体の K_2 ：極期の患者の抗インスリン抗体の K_1 は、1 : 8.30 であった。

またヒト胎盤膜インスリン受容体の K_1 :寛解期の患者の抗インスリン抗体の K_2 は、 $1:0.032$ 、ヒト胎盤膜インスリン受容体の K_2 :寛解期の患者の抗インスリン抗体の K_1 は、 $1:2.49$ であった。従って Affinity Constant を比較すると、ヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulin の特異的結合を阻害するのは、主に High Affinity-Low Capacity の抗インスリン抗体であると考えられる。

最後に抗インスリン抗体の存在下で、ヒト胎盤膜インスリン受容体の Affinity Constant の低下とインスリン受容体数の減少がみられた原因については十分に解明できていないのではあるが、今回の筆者の実験結果から以下のように推測できるものと思われる。すなわち K_2 に比べ K_1 の低下が軽度であることより考えて、 24°C での反応時間を比較すると ^{125}I -insulinとインスリン受容体との生物学的反応に比して、 ^{125}I -insulinと抗インスリン抗体との免疫学的反応の方が速いため、 ^{125}I -insulinの一部は主として High Affinity-Low Capacity の抗インスリン抗体と免疫複合体をつくり、免疫複合体をつくった ^{125}I -insulinはインスリン受容体に結合できず、のこった ^{125}I -insulinを High Affinity-Low Capacity, Low Affinity-High Capacity のインスリン受容体が各々の Affinity Constant で ^{125}I -insulinに対して競合的に作用するためではないかと推測される。いずれにしてもこのように抗インスリン抗体が存在する時にインスリン受容体の Affinity Constant の低下およびインスリン受容体数の減少がみられるということは、インスリン作用の発現を考えるにあたり重要な示唆を与えてくれるものと思われる。

以上のように生体内にインスリンと抗インスリン抗体とインスリン受容体およびインスリンと抗インスリン抗体の免疫複合体が存在する場合、インスリン受容体へのインスリンの特異的結合は、遊離のインスリン量や抗インスリン抗体価とともに、インスリン受容体と抗インスリン抗体の Affinity Constant に影響され、そして High Affinity-Low Capacity の抗インスリン抗体がインスリン抵抗性糖尿病の1因になるものと考えられる。

結 語

ヒト胎盤膜とモルモット肝臓膜と腎臓膜インスリン受容体を用いて、インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響を検討し次の結論をえた。

(1) 24°C でヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの結合は、時間経過とともにゆるやかに上昇し1時間後に平衡状態に達した。一方 24°C で抗インスリン抗体への ^{125}I -insulinの結合は、時間経過とともに急上昇し、0.5時間後に平衡状態に達した。

(2) 24°C で Buffer のみと孵置した ^{125}I -insulinは2.5時間後までほとんど Degradation をうけなかったが、 24°C でヒト胎盤膜インスリン受容体と孵置した ^{125}I -insulinは1時間後で37.5%、2時間後で50.9%、3時間後で60.4%の Degradation を受けた。

(3) 24°C で Buffer と孵置したヒト胎盤膜インスリン受容体は、0.5時間後で4.3%、1時間後で13.8%、2時間後で19.6%の Degradation をうけた。

(4) ヒト胎盤膜とモルモット肝臓膜と腎臓膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合は、I群(I+I-ab)+RとII群I+I-ab+Rでは阻害されたが、III群(I+R)+I-abでは有意の差はみられなかった。そして抗インスリン抗体価が高値になるにつれ結合阻害率も上昇した。またヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合はIV群(I-ab+R)+Iでも阻害された。

(5) ヒト胎盤膜インスリン受容体への ^{125}I -insulinの特異的結合におよぼす抗インスリン抗体の影響は、インスリン抵抗性糖尿病の患者の極期と寛解期の抗インスリン抗体では著しい差がみられた。極期の抗インスリン抗体に比べ寛解期の抗インスリン抗体では著しい特異的結合阻害の改善をみた。ステロイド糖尿病の患者の抗インスリン抗体での結合阻害率は前2者に比べ低値を示した。

(6) Dissociation Study では抗インスリン抗体価が高くなるにつれ、ヒト胎盤膜インスリン受容体からの ^{125}I -insulinのDissociation率は

上昇した。

(7) インスリン抵抗性糖尿病の患者の極期の血清中の抗インスリン抗体の Affinity Constant は各々 $K_1=1.810 \times 10^9 M^{-1}$, $K_2=0.046 \times 10^9 M^{-1}$, $\bar{K}e=0.083 \times 10^9 M^{-1}$ であり、一方寛解期の血清中の抗インスリン抗体の Affinity Constant は各々 $K_1=0.542 \times 10^9 M^{-1}$, $K_2=0.025 \times 10^9 M^{-1}$, $\bar{K}e=0.060 \times 10^9 M^{-1}$ であり、極期に比べ寛解期の抗インスリン抗体の Affinity Constant は低下していた。

(8) インスリン抵抗性糖尿病の患者の極期の血清60 μ l中の抗インスリン抗体存在下でのヒト胎盤膜インスリン受容体の Affinity Constant は各々 $K_1=0.600 \times 10^9 M^{-1}$, $K_2=0.132 \times 10^9 M^{-1}$, $\bar{K}e=0.176 \times 10^9 M^{-1}$ といずれもコントロ

ールに比べ Affinity Constant は低下しており、同時にインスリン受容体数も低下していた。

(9) インスリン受容体と抗インスリン抗体が同時に存在する時、 ^{125}I -insulin と競合的に結合し、その結合阻害率は遊離の ^{125}I -insulin 量と抗インスリン抗体価とともに、インスリン受容体と抗インスリン抗体の Affinity Constant に影響され、主として結合阻害をもはらすのは High Affinity-Low Capacity の抗インスリン抗体である。

謝 辞

稿を終るにあたり直接御指導をいただいた香川医科大学河西浩一助教授に感謝し、本研究の御指導、御校閲をうけた岡山大学第3内科大藤眞教授に深甚なる感謝の意を表す。

文 献

1. Gavin, J.R., Roth, J. and Freychet, P.: Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 747-751, 1972.
2. Lowry, O.W., Roseborough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
3. 工藤幹彦, 北原明夫, 豊田隆謙: 2抗体による血清インスリン結合抗体価定量. *糖尿病* **19**, 672-679, 1976.
4. Vallance-Owen, J. and Lilley, M.D.: An insulin antagonist associated with plasma albumin. *Lancet* **1**, 806-807, 1961.
5. Antoniadis, H.N., Gundersen, K., Beigelman, P.M., Pyle, H.M. and Bougas, J.A.: Studies on the state, transport and regulation of insulin in human blood. *Diabetes* **11**, 261-270, 1962.
6. Paulsen, E.P., Courtney, J.W., Duckworth, W.C.: Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin. *Diabetes* **28**, 640-645, 1979.
7. Kahn, C.R., Flier, J.S., Bar, R.S., Archer, J.A., Gorden, P., Martin, M.M., and Roth, J.: The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans: Insulin receptor disorders in man. *N. Engl. J. Med.* **294**, 739-745, 1976.
8. Dercole, A.J., Underwood, L.E., Groelke, J. and Plet, A.: Leprechaunism: Studies of the relationship among hyperinsulinism, insulin resistance, and growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **48**, 495-502, 1979.
9. Banting, F.G., Franks, W.R. and Gairns, S.: Anti-insulin activity of serum of insulin-treated patients. *Am. J. Psychiatry* **95**, 562-564, 1938.
10. Berson, S.A. and Yalow, R.S.: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.* **38**, 1996-2016, 1959.
11. Patterson, R., Orourke, J., Roberts, M. and Irena, S.: Immunologic reactions against insulin. I. IgG anti insulin and insulin resistance. *J. Immunol.* **110**, 1126-1134, 1973.

12. Davidson, J.K. and Debra, D.W.: Immunologic insulin resistance. *Diabetes* 27, 307-318, 1978.
13. Goldman, J. and Baldwin, D.: Equilibrium binding assay and kinetic characterization of insulin antibodies. *Diabetes* 27, 653-660, 1978.
14. Partamian, J.O. and Whitehouse, W.: The role of insulin antibody (Iab) affinity in insulin resistance (IR). *Diabetes* 27, 496, 1978.
15. Kerp, L., Steinhilber, S. and Kasemir, H.: Ein verfahren zum Nachweis insulin-binder Antikörper durch Differentialadsorption. *Klin. Wschr.* 44, 560-567, 1966.
16. Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarret, D.B., Flier, J.S. and Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 4209-4213, 1978.
17. Shechter, Y., Chang, K., Jacos, S. and Cuatrecasas, P.: Modulation of binding and bioactivity of insulin by anti-insulin antibody: Relation to possible role of receptor self-aggregation in hormone action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2720-2724, 1979.
18. 大森安恵: ヒト胎盤膜成分によるインスリンの分解. *糖尿病* 19, 360-367, 1976.

Studies on insulin receptor

Part 2

Effect of insulin antibodies on insulin receptors

Masayuki KUBOTA

Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. T. Ofuji)

Radioreceptorassay using particulate membrane of human placenta, liver and kidney of guinea pigs were carried out to investigate the effect of insulin antibodies on insulin receptors.

^{125}I -insulin binding to insulin receptors at 24°C increased slowly, binding in an apparent steady-state was reached within 1 h and continued for 3 h. ^{125}I -insulin binding to insulin antibodies at 24°C increased rapidly, binding in an apparent steady-state was reached within 0.5 h and continued for 3 h. ^{125}I -insulin incubated with buffer at 24°C was not degraded until 2.5 h, but ^{125}I -insulin incubated with $300\mu\text{g}$ of particulate membrane of human placenta at 24°C was degraded and its degradation rate was 37.5 % at 1 h, 50.9 % at 2 h, 60.4 % at 3 h. The degradation rate of particulate membrane of human placenta in the same condition was 4.3 % at 0.5 h, 1.8 % at 1 h, 19.6 % at 2 h. After these studies, the following four experiments were performed.

- Group 1 : ^{125}I -insulin was preincubated with insulin antibodies for 90 min., then insulin receptor was added to the incubation material. The mixture was incubated for 120 min..
- Group 2 : ^{125}I -insulin, insulin antibodies and insulin receptor were incubated together for 120 min..
- Group 3 : ^{125}I -insulin was preincubated with insulin receptor for 120 min., and insulin antibodies were added to the incubation material. The mixture was incubated for 90 min..
- Group 4 : Insulin antibodies were preincubated with insulin receptor for 30 min., then the mixture was washed once, ^{125}I -insulin was added, and the mixture was incubated for 120 min..

^{125}I -insulin binding to insulin receptor was inhibited in group 1, group 2, and group 4, but was not inhibited in group 3. The inhibition rate correlated positively with the titers of insulin antibodies. Different insulin target organs: human placental insulin receptor, and hepatic and renal insulin receptors of guinea pigs showed different inhibition rates. Insulin antibodies obtained in the insulin resistant period showed the most inhibition, but insulin antibodies from a patient with insulin resistant diabetes in the remissive state and from a patient with steroid induced diabetes showed decreased inhibition. The dissociation rate of ^{125}I -insulin from the insulin receptor was increased by insulin antibodies. Scatchard analysis showed that affinity constants of insulin antibodies (high affinity-low capacity component (K_1), low affinity-high capacity component (K_2) and average affinity constant ($\overline{K_e}$) in the insulin resistant period) were $1.810 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ (K_1), $0.046 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ (K_2), $0.083 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ ($\overline{K_e}$), respectively, and K_1 , K_2 and $\overline{K_e}$ of insulin antibodies in the remissive state of the insulin resistant diabetic were $0.542 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, $0.025 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, $0.060 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, respectively. K_1 , K_2 and $\overline{K_e}$ of insulin receptor in the presence of insulin antibodies were $0.600 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, $0.132 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, $0.176 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, respectively. The numbers of insulin receptors decreased in the presence of insulin antibodies.

The inhibition rate is thought to be influenced by affinity constants as well as titers of insulin antibodies. Comparing the affinity constants of insulin receptors and insulin antibodies in the insulin resistant period, the ratio of K_2 of insulin receptor to K_1 of insulin antibodies was 1 : 8.30 and the ratio of K_1 of insulin receptor to K_2 of insulin antibodies was 1 : 0.058. Comparing with affinity constants of insulin receptors and insulin antibodies in the remissive state, the ratio of K_2 of insulin receptor to K_1 of insulin antibodies was 1 : 2.49 and the ratio of K_1 of insulin receptor to K_2 of insulin antibodies was 1 : 0.032. Therefore binding inhibition of ^{125}I -insulin to insulin receptor is thought to be caused mainly by insulin antibodies of high affinity-low capacity component.