

Insulin 抗体の研究

第二報

Insulin 補体結合反応

(その一) Insulin 補体結合反応に於ける補体結合低温24時間
延長法に就いて

岡山大学医学部衛生学教室 (主任: 緒方教授)

森 下 喬 之

〔昭和31年3月1日受稿〕

第1章 緒 言

緒方¹⁾教授指導のもとに教室多年の研究は輝しい発展をとげ、各種抗原に関し、沈降反応、補体結合反応、過敏反応の3方面より証明された多数の業績があるが、時に抗原に依り補体結合反応陰性なることが知られ、大田原教授²⁾³⁾はこの関係は結合方法にあることを認められ、又卵白に関して沈降反応陽性なるにもかかわらず、従来の方法では補体結合反応陰性なる場合が多く、今日この不可解な事実は抗原の分子量小なるためと考えられ、Virus 同様長時間の結合に依り、卵白 Albumin の如き分子量小なる抗原に於ても、補体結合反応の成立することは、既に教室に於て証明せられている。

著者は、分子量小なる Insulin に就いて、補体結合性抗体の検索を行つた。

周知の如く、抗原抗体の研究に必要欠ぐべからざるものは、補体結合反応並びに沈降反応であるが、Insulin 抗体の検索にあたり、始めて本反応を行つたのは Tuft⁴⁾(1928)である。即ち Insulin 治療中(糖尿病)蕁麻疹等のアレルギー症状を呈した患者血清を用い、沈降反応は一時的に陽性、補体結合反応は陰性の成績を得た。その後 Wasserman・Broh-Kahn・Mirsky⁵⁾(1940)等は家兎に賦活抗原を用いて Insulin 免疫をなし過半数に補体結合反応陽性成績を得た。然しながら沈降反応

は Insulin 製剤の性質上証明不確実であると述べた。その後研究の後を絶つていたが、山崎⁶⁾(1954)が補体結合反応及び凝集法により氏の研究を追試確認した。然しながら此等の実験は賦活抗原を用いることにより行われた免疫方法に就いての研究で、Insulin 単独免疫による補体結合性抗体の証明は極めて困難とされ、いまだ成功していない。

著者は Insulin 単独注射で家兎を免疫し、補体結合性抗体の検索を行つた。補体結合反応を行うにあたり、従来 Kolmer 法にて証明し得なかつたものを、当教室に於て、昭和6年大田原教授の創始になる抗原・抗体・補体3者の結合時間を低温24時間延長せしめることにより Insulin 補体結合性抗体を極めて容易に証明し得たのでここに報告する。

第2章 実験材料並に実験方法

第1節 実験動物

使用動物は体重2kg以上の強健な家兎。(体重2kg以下のものは免疫中斃死することあり。)

第2節 免疫原並に反應用抗原

免疫に使用した Insulin 及び試験抗原として使用した Insulin は魚類 Insulin (清水製薬 Iszilin の魚類を原料としたもの)、牛 Insulin (鳥居薬品 Fiselin の牛脾臓を原料としたもの)、結晶 Insulin (鯨)の3種と、試験抗原として魚肉・牛肉抽出液を用いた。抽出液は

魚肉(鯉)及び牛肉を各々別々に生理的食塩水でよく洗滌し、之を濾紙で水分をとつた後、之を秤量し、各々1gにつき生理的食塩水2ccの割合に混じ「ホモゲナイザー」で充分に磨滅し乳糜を作つた後之を寒剤中で凍結せしめて氷点下10°~15°Cとした後56°Cの温水中で急激に融解する。之を10回繰返して顕微鏡下に細胞を認めないまで行ふ。その後56°Cの重盪煎中で30分間温めた後之を氷室内に静置し時々振盪し、24時間後遠心分離し、上清液を試験抗原とした。

第3節 免疫方法

No. 1~No. 10の家兎に Insulin の20単位を第1週は5日間連続耳静脈内に注射し、2日間の休息を置いて第2週第3週も同様に繰返し、最終注射日より7日後採血し血清を分離した。Insulin 注射による低血糖反応は20%葡萄糖液の静脈内注射により防ぐ、この場合常に Insulin 注射後1時間たつて与え、其後は屢々行つた。

追加免疫として塩酸ピロカルピン(1:1000)0.2ccを Insulin 20単位と混じ、No. 11, No. 12家兎を同様に3週間免疫した。

第4節 実験方法

家兎抗体の補体結合法は本教室の慣用法⁷⁾を用い行つた。補体結合反応に於ける補体結合は先づ免疫血清(56°C1/2時間重盪煎中に加熱非働性としたもの)、試験抗原及び補体の3者をよく混和しつゝ37°Cの孵卵器中に1時間保つた後溶血系を加えて再び孵卵器中に2時間置き、反応を読みさらに氷室に放置して翌日成績を判定するものと、抗原・抗体・補体3者の結合を充分且つ極度に目的をもつて、37°Cの孵卵器中に1時間保つた後さらに氷室に24時間放置翌日溶血系を加えた後再び37°Cの孵卵器に2時間置き、同様に氷室に放置して翌朝成績を判定する場合との補体結合条件を2方法とした。(使用氷室は3°C)

実験は毎常厳密な対照(抗原、抗体、補体、溶血素、補体と溶血素)併置の下に行い、完全溶血阻止は(卅)、不完全溶血阻止はその

程度により(卅)(卅)(+)とし、完全溶血は(-)で表示した。

第3章 実験成績

第1節 魚類 Insulin (Iszilin) 免疫

魚類 Insulin 免疫家兎に於て、抗原・抗体・補体3者の結合時間を37°C1時間(以下AG+AK+K 37°C1時間)とする場合、同種 Insulin を試験抗原とすると陽性成績を得るが、異種 Insulin を試験抗原とする交叉反応では完全に陰性である。然し、抗原・抗体・補体3者の結合時間を37°C1時間後さらに3°C24時間延長(以下AG+AK+K 37°C1時間 3°C24時間)せしめると、同種の場合勿論交叉反応に於ても補体結合性抗体を証明する。各家兎に於ける成績を個々に見ると、No. 1家兎では(卅)乃至(卅)は同種の場合AG+AK+K 37°C1時間に於ては8単位~1単位の間でそれより増えても減つても(卅)以下の不完全溶血阻止乃至完全溶血(-)を呈し、AG+AK+K 37°C1時間 3°C24時間では10単位~0.25単位であり、交叉反応では8単位~2単位の間であり、その両側は同様(卅)~(-)となる。No. 2家兎では(卅)乃至(卅)はAG+AK+K 37°C1時間に於て同種の場合8単位~1単位の間で、その両側は(卅)~(-)を呈し、AG+AK+K 37°C1時間 3°C24時間では同種の場合10単位~0.25単位、交叉反応では6単位~2単位であり両側は(卅)~(-)を呈す。No. 3家兎では(卅)乃至(卅)はAG+AK+K 37°C1時間に於て同種の場合8単位~1単位の間でその両側は(卅)~(-)を呈し、AG+AK+K 37°C1時間 3°C24時間では同種の場合10単位~0.25単位、交叉反応では8単位~4単位で両側は(卅)~(-)を呈す。No. 4家兎では(卅)乃至(卅)はAG+AK+K 37°C1時間に於ては同種の場合8単位~1単位でその両側は(卅)~(-)を呈し、AG+AK+K 37°C1時間 3°C24時間では同種の場合10単位~0.5単位で、交叉反応では6単位~4単位でその両側は(卅)~(-)となる。(第1表参照)

第1表 魚 Insulin 免疫
同種市販 Insulin による補体結合反応

家 兔 別	性 別	体 重 (g)	免 疫 抗 原	補 結 反 應 抗 原	家 兔 血 清 使 用 量	Insulin 補体結合反応															
						AG+AK+K 37°C 1時間								AG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間							
						AG として使用した Insulin 単位								AG として使用した Insulin 単位							
						10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25
1	♂	2940	Iszlin (魚類)	Iszlin (魚類)	0.1	+	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
2	♀	3050	Iszlin (魚類)	Iszlin (魚類)	0.1	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3	♀	2800	Iszlin (魚類)	Iszlin (魚類)	0.1	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
4	♀	2270	Iszlin (魚類)	Iszlin (魚類)	0.1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

異種市販 Insulin による補体結合反応 (交叉反応)

1	同	同	Iszlin (魚類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
2			Iszlin (魚類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3			Iszlin (魚類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-
4	上	上	Iszlin (魚類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	卅	卅	卅	+	+	-

AG - AK - H 卅 K 卅 H+K -

第2節 牛 Insulin (Fiselin) 免疫

牛 Insulin 免疫家兔に於て、AG+AK+K 37°C 1時間では、同種 Insulin を試験抗原とせる場合、及び異種 Insulin を試験抗原とする交叉反応の場合とも完全に陰性であり、AG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間に於てのみ、同種及び交叉反応とも補体結合性抗体を

証明し得た。各家兔に於ける成績を個々に見ると、No.6 家兔では(卅)乃至(卅)は同種の場合 10単位~0.5 単位であり、交叉反応では 8 単位~1 単位で両側は(卅)~(-)を呈し、No.7 家兔では(卅)乃至(卅)は 10 単位~0.25 単位、交叉反応では 8 単位~1 単位でその両側は(卅)~(-)を呈す。No.8 家

第2表 牛 Insulin 免疫
同種市販 Insulin による補体結合反応

家 兔 別	性 別	体 重 (g)	免 疫 抗 原	補 結 反 應 抗 原	家 兔 血 清 使 用 量	Insulin 補体結合反応															
						AG+AK+K 37°C 1時間								AG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間							
						AG として使用した Insulin 単位								AG として使用した Insulin 単位							
						10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25
6	♀	2370	Fiselin (牛類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7	♂	2400	Fiselin (牛類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
8	♀	2380	Fiselin (牛類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
9	♀	2960	Fiselin (牛類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-
10	♀	2600	Fiselin (牛類)	Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-

異種市販 Insulin による補体結合反応 (交叉反応)

6	同	同	Fiselin (牛類)	Iszlin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7			Fiselin (牛類)	Iszlin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
8			Fiselin (牛類)	Iszlin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
9			Fiselin (牛類)	Iszlin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-
10	上	上	Fiselin (牛類)	Iszlin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-

AG - AK - H 卅 K 卅 H+K -

兎では(卅)乃至(卅卅)は同種の場合10単位~0.5単位で交叉反応では10単位~2単位である。No.9家兎では(卅)乃至(卅卅)は同種及び交叉反応とも10単位~2単位である。No.10家兎では(卅)乃至(卅卅)は同種の場合10単位~1単位,交叉反応では10単位~4単位である。(第2表参照)

以上の成績によりAG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間に於て魚類 Insulin 免疫家兎並に牛 Insulin 免疫家兎に於ける補体結合反応は,同種 Insulin を試験抗原とする場合と,異種 Insulin を試験抗原とする交叉反応の場合とに明に差があり,(卅)乃至(卅卅)に要する抗原 Insulin 最小単位は,魚 Insulin 群では同種の場合,0.25単位乃至0.5単位であり,交叉反応に於ては2単位乃至4単位のInsulinを必要とした。又,牛 Insulin 群では同種の場合,0.25単位~2単位であり,交叉反応に於ては1単位~4単位である。(第3表参照)

第3節 結晶 Insulin (鯨)を試験抗原とする場合。

AG+AK+K37°C 1時間では,魚類 Insulin 免疫家兎及び牛 Insulin 免疫家兎とも全例陰性で,AG+AK+K37°C 1時間 3°C 24時間では両群とも全例に補体結合性抗体を証明し,

一般に魚類 Insulin 群に比し牛 Insulin 群に

第 3 表

明確な反応に要した抗原 Insulin 最小単位

	家兎	Iszilin (同種 Insulin)		Fiselin (異種 Insulin)	
		単位	反応	単位	反応
魚類 Insulin 群	1	0.25	+	2	+
	2	0.25	++	2	++
	3	0.25	+++	4	+++
	4	0.5	+++	4	+++
牛 Insulin 群	6	0.5	+	1	+
	7	0.25	++	1	++
	8	0.5	++	2	++
	9	2	++	2	++
	10	1	++	4	++

反応を明瞭に認めた。(卅)乃至(卅卅)に要した最小 Insulin 単位は No.2家兎は0.4mg 即ち9.4単位, No.3家兎では0.3mg 即ち7.05単位, No.4家兎は0.3mg 即ち7.05単位, No.6家兎は0.3mg即ち7.05単位, No.7家兎は0.1mg 即ち2.35単位, No.9家兎では0.5mg 即ち11.75単位, No.10家兎では0.3mg 即ち7.05単位である。No.1, No.8家兎では認められない。(第4表参照)

第4表 結晶 Insulin による補体結合反応

家兎	性別	免疫抗原	家兎血清使用量	Insulin 補体結合反応															
				AG+AK+K 37°C 1時間								AG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間							
				AG として使用した結晶 Insulin mg								AG として使用した結晶 Insulin mg							
				0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012
1		Iszilin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-		
2		Iszilin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	-		
3		Iszilin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	+	+	-		
4		Iszilin (魚類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	+	-	-	-		
6		Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	-		
7		Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+		
8		Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	+	-	-	-		
9		Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	+	-	-		
10		Fiselin (牛類)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	+	-	-	-		

鯨結晶 Insulin 1mg = 23.5 単位

第4節 魚肉及び牛肉抽出液を試験抗原とする場合

魚類 Insulin 免疫家兎は魚肉抽出液で、牛 Insulin 免疫家兎は牛肉抽出液を試験抗原と

して補体結合反応を行い (AG+AK+K 37°C 1時間) 全家兎に陽性成績を得た。(第5表 第6表参照)

第5表 魚肉抽出液による補体結合反応

家兎	免疫抗原	補体結合抗原	家兎用血清量	AG+AK+K 37°C 1時間							
				抗原 3% (Protein) を原液とする							
				5×	10×	20×	40×	80×	100×	250×	500×
1	Iszilin (魚類)	魚肉抽出液	0.1	+++	++	-	-	-	-	-	-
2			0.1	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
3			0.1	+++	+++	+++	+	+	-	-	-
4			0.1	+++	+	-	-	-	-	-	-

第6表 牛肉抽出液による補体結合反応

家兎	免疫抗原	補体結合抗原	家兎用血清量	AG+AK+K 37°C 1時間						
				抗原 2.3% (Protein) を原液とする						
				5×	10×	20×	40×	80×	100×	250×
6	Fiselin (牛類)	牛肉抽出液	0.1	+++	+++	++	+	-	-	-
7			0.1	+++	+++	+	-	-	-	-
8			0.1	+++	+++	++	-	-	-	-
9			0.1	+++	+++	+	-	-	-	-
10			0.1	+++	+++	++	-	-	-	-

第5節 塩酸ピロカルピン混合 Insulin 免疫.

No. 11, No. 12の2例とも AG+AK+K 37°C 1時間では、同種 Insulin を試験抗原とする場合陽性、異種 Insulin を試験抗原とする交叉反応では陰性である。AG+AK+K 37°C 1時間3°C 24時間では同種の場合及び交叉反応とも陽性である。(第7表参照)

第7表 塩酸ピロカルピン (1・1000) 加魚類Insulin (Iszilin) 免疫 同種市販 Insulin による補体結合反応

家兎	性別	体重	免疫抗原	補体結合抗原	家兎血清使用量	Insulin 補体結合反応																
						AG+AK+K 37°C 1時間							AG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間									
						AG として使用した Insulin 単位							AG として使用した Insulin 単位									
						10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	
11	♀	2480	Iszilin (魚)	Iszilin (魚)	0.1	+	++	+++	+++	+++	++	+	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
12	♀	2550			0.1	-	+	++	+++	+++	++	+	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+

異種市販 Insulin による補体結合反応

11	同上	同上	Iszilin (魚)	Fiselin (牛)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
12	同上	同上			0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	++	+
						AG	AK	H	K	H+K													
						-	-	+++	+++	-													

第6節 免疫終了後の Insulin 補体結合性抗体.

No. 1, No. 6, No. 11 家兎に於ける交叉反応による Insulin 補体結合反応の出現状況及び

消失する迄の経過を観察するに、免疫終了日より7日が最高度に出現し、これを中心にして前後に減弱する。この Insulin 補体結合性抗体は、3~6ヶ月間持続する。(第8表、第

第8表 No. 1 家兎交叉反応
反応抗原に使用した Insulin 単位

日	単位	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	0.1
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
30	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
40	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
50	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
60	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
90	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
120	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
150	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
180	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第9表 No. 6 家兎交叉反応
反応抗原に使用した Insulin 単位

日	単位	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	0.1
3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
15	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
20	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
25	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
30	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
40	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
50	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
60	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
90	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第10表 No. 11 家兎交叉反応
反応抗原に使用した Insulin 単位

日	単位	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	0.1
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
30	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
40	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
50	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
60	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
90	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
120	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
150	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

9 表, 第10表)

第7節 臨床的応用

魚 Insulin で治療中或は治療後の糖尿病患者血清に就いて AG+AK+K 37°C 1 時間 3°C 24時間にて補体結合反応を行い, 2 例に交叉反応により Insulin 補体結合性抗体を証明した。(第11表参照)

第4章 総括並に考按

Tuft⁴⁾ (1928) が Insulin 治療中蕁麻疹等のアレルギー症状を呈した患者血清を用い, Insulin 抗体の検索をなし, 補体結合反応は陰性であつたと報告したが, その後 Wasserman・Broh-Kahn・Mirsky⁵⁾ (1940) 等は Insulin 免疫家兎血清にて補体結合反応を行い, 陽性成績を得, 山崎⁶⁾ (1954) も家兎にて補体結合反応陽性なる結果を得ている. 然しながらこれらの研究は家兎を免疫する場合, Insulin 単独注射ではなく, Wasserman等は馬血清或は塩酸ピロカルピンを, 山崎は馬血清, 塩酸

第11表 Insulin 治療 (Isziln) 糖尿病患者血清の同種 (Izsiln) 及異種 (Fiselin) Insulin を試験抗原とする補体結合反応

氏名	性別	年齢	体重	注射液総量	採血日	AG+AK+K 37°C 1時間 3°C 24時間											
						試験抗原はイソジリン (魚)						試験抗原はフィゼリン (牛)					
						10単位	8単位	6単位	4単位	2単位	1単位	10単位	8単位	6単位	4単位	2単位	1単位
花川	♂	41	58.7 kg	1229 単位	終了日より22日	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
沈	♀	47	48.9 kg	1905 単位	終了日より18日	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

ピロカルピン、豚血清を Insulin と混じて使用し、さらに Adjuvant 法も用いて免疫した。然もその陽性率は極めて低く Wasserman は 11例中 6 例陽性即ち 54.5%、山崎は 26 例中 16例陽性62%となつている。かく従来の実験は賦活抗原を免疫に使用することにより得た成績で、Insulin 単独免疫による Insulin 補体結合性抗体の証明は、いまだ成功した例を見ない。

著者は従来使用せられた馬血清、豚血清等は、Insulin 製剤中に含まれる夾雑蛋白による抗体の検索に障碍となるため、これを使用せず、唯一部の家兎に塩酸ピロカルピンを使用したにすぎない。他はことごとく Insulin 単独免疫を行い Insulin 補体結合性抗体の検索を行つた。

先ず交叉反応に於ては、従来第 1 期反応に於ける補体結合 37°C 1時間では、全例陰性で、単独免疫と塩酸ピロカルピン混合免疫とに差を認めない。次に第一期反応に於ける抗原・抗体・補体 3 者の結合時間を 37°C 1時間後さらに低温 24 時間延長せしめることにより、全家兎に鋭敏に補体結合反応陽性成績を得た。

従来、好んで用いられている交叉反応とは、Insulin 蛋白それ自体の抗体を研究するため、種類の異つた Insulin を試験抗原として反応を行うことで、Insulin 夾雑蛋白による抗体を除外するためである。Lewis⁸⁾ (1937)、Wasserman 等は牛 Insulin と豚 Insulin で、山崎は魚 Insulin と獣 Insulin で行つている。

著者は牛と豚の如き獣類相互に於ては類属

反応を起すことあるに反し、魚と牛ではかゝる反応はないことをたしかめ、魚 Insulin と牛 Insulin を用いた。

免疫に使用した Insulin と同種 Insulin を試験抗原とする場合と異種 Insulin を試験抗原とする交叉反応に於ては明らかに後者に反応減弱するを認め、交叉反応に於ける成績が Insulin 蛋白自体の成績で、同種 Insulin の場合は夾雑蛋白によるものも含まれていることを示している。魚 Insulin 免疫家兎に於て、抗原・抗体・補体 3 者の結合 37°C 1時間で、同種の場合は反応陽性であるが、交叉反応の場合は完全に陰性となる事実も、又魚肉及び牛肉抽出液により該血清がそれぞれ補体結合反応陽性となることも免疫血清が Insulin 蛋白抗体以外の他の夾雑蛋白による抗体の存在を示している。

これらの事実より Insulin 抗体の検索には、免疫に使用した Insulin より異種の Insulin により交叉反応を行うことが必要である。又 Wasserman 等が既に指摘したところであるが、尚且現在の極めて精製された Insulin も反復して注射される場合、Insulin 蛋白以外の夾雑蛋白抗体が出現することは興味ある点である。古くより欧米に於ては Insulin 抗体の研究には結晶 Insulin を用いられているが、吾国に於ては之を以つて行つた実験は無いようである。著者は上述の Insulin 抗体を確認するため結晶 Insulin を試験抗原として補体結合反応を行い全例陽性成績を得た。

著者が Insulin 単独免疫による Insulin 補体結合性抗体の検出に始めて応用した術式即

ち、第1期反応における抗原・抗体・補体3者の結合時間を37°Cの孵卵器に1時間後さらに氷室に24時間おき翌日溶血系を加えることは、当教室に於て昭和6年大田原教授が膠質色素の相互沈澱現象に於ける補体結合反応に於て従来用いられた普通の術式では終に補体結合を証明し得なかつたものを第1期反応に於ける補体結合時間を24時間延長したところ補体結合を成立せしめ得たことに始まり、その後同教授は同一免疫血清に於ける沈降素価と補体結合価並に其の結合帯の異同に関する研究に利用され、従来補体結合反応に於ける結合帯及び免疫価は沈降反応に於けるものと一致しなかつたが、これを一致せしめ得ることに成功し、その後教室の井上⁹⁾(昭29)は補体結合時間を1時間、6時間、24時間として結合帯及び免疫価の比較研究をなしている。又最近では緒方教授¹⁰⁾は従来証明困難とされた卵白 Albumin 抗体の検索に特殊な免疫方法と補体結合時間を37°C 2時間後2°C 24時間延長し極めて鋭敏に反応を証明され、結合帯1:1000、抗体価1:1000の高値を得られた。又最近 Virus 学の進歩にともない、日本脳炎その他 Virus 疾患に於ける補体結合反応の診断的意義は極めて大きい、この方面における補体結合反応術式は、補体結合を同様に低温長時間で結合せしめることによる。即ち Casals¹¹⁾¹²⁾(1941)が発表し、米国に於て広く行われている方法は抗原・抗体・補体3者の結合を氷室(4~8°C)内に16~18時間放置し次で室温に15分間放置してから溶血系を加え、又現在日本脳炎補体結合反応術式として我国に於て一般に行われている厚生省衛生検査指針¹³⁾では、抗原・抗体・補体3者の結合は氷室(2~8°C)に18~20時間入れることにより行われる。

かく卵白 Albumin 或は Virus の如く、特殊な抗体検索には、補体結合反応第1期反応に於ける補体結合時間を低温長時間行うことが必要欠くべからざる条件となつている。Insulin もこの羈絆に属するものである。このように甚だ緩慢に補体結合の進むことは、

分子量の小さいことに基因するものと考えられる。例えば、水島・赤堀¹⁴⁾によれば、之等の分子量は

	分子量
Insulin	35,000~41,000
Albumin	67,800~69,000
β -Globulin	88,000
β_1 -Globulin	90,000~93,000
γ -Globulin	153,000
Virus, tobacco necrosis	6,000,000
Virus, tobacco mosaic	59,000,000~ 42,600,000
Virus, turnip yellow mosaic	3,500,000
Virus, bean mosaic	6,630,000~ 7,000,000
Virus, tomato bushy stunt	7,000,000~ 10,600,000
Virus, potato ringspot	26,000,000
Virus, cucumber	40,000,000
Virus, rabbit papilloma	47; 100,000
Virus, influenza	200,000,000~ 322,000,000
Virus, polyhedral, Bombyx	1,000,000,000~ 2,000,000,000

となつており、いずれも分子量は小さいが、Insulin は表に示すように、Albumin よりも小さく、又 Virus のいずれよりもはるかに小さい。このことは従来 Kolmer 法による Insulin 補体結合性抗体証明困難の原因と考えられる。(尚 Haurowitz¹⁵⁾(1950)の如きは Insulin は分子量が小さいから抗原性がないものと考えている。) かく考える時本法は血清学に於て重要性を帯び、臨床方面に於て利用価値の高いものと言えよう。

Insulin アレルギーの問題は Tuft 以来 Allan・Scherer¹⁶⁾, Harten・Walzer¹⁷⁾, Yasuna¹⁸⁾, Goldner・Ricketts¹⁹⁾等々多数の学者により臨床的に検討されて来、Harten・Walzer は1923年より1940年の間の世界文献中から約200例の報告を集めている。Goldner・Ricketts は

Insulin で治療されている患者の約 20% は軽度な一時的部分的なアレルギー症状を表わし、30分～数時間続く腫脹や発赤が治療開始後 1 週間～10日以内に注射部位に生ず、痒痒を伴い硬結を生ずることもあるが特別の注意を払わなければ見のがすが、少数の患者は症状著明で、局所痛、頭痛、体温上昇、胃腸障碍、激しい痒痒症、蕁麻疹（全身に広がる）等があることがあり Insulin 治療の中止により軽快すると述べた。このような Insulin 治療により起つたアレルギー症状を始めて、Insulin の抗原性によると考えた Tuft は氏の所属する病院血清学主任 Miss Yagel が該血清に就いて Kolmer 法により補体結合反応を行い陰性であつたと述べ、山崎は Kolmer 法により Insulin 療法施行患者血清に就いて、Insulin 補体結合性抗体の検索をなし、Insulin 注射量 580～9500 単位を受けた患者 18 例の全部が陰性であつたと述べ氏の併用した凝集反応が 6 例陽性であつたことに比し、補体結合性抗体の検出の困難なることを述べている。

著者は Insulin 治療糖尿病患者血清 (Insulin アレルギー、Insulin 抵抗性等なし) に就いて交叉反応により Insulin 補体結合性抗体を証明し Insulin が人体に抗原性を有することを確認した。Cannon・Marshall²⁰⁾ は Insulin アレルギーの検索に普通の皮内反応と Passive Transfer Test の外に沈降反応が助けとなるだろうと述べている。然し沈降反応に就いては Wasserman は不確実性を指摘し、著者も結晶 Insulin を用い、しばしば行つた

が確実な反応を認め難く、これにより Insulin 抗体を確認することは出来なかつた。

第 5 章 結 論

1. Insulin 単独注射により家兎を免疫し、交叉反応により、補体結合反応第 1 期反応における抗原・抗体・補体 3 者の結合を 37°C 1 時間後さらに低温 24 時間延長せしめることにより、Insulin 補体結合性抗体を証明した。

2. 同種 Insulin を試験抗原とする場合と、異種 Insulin を試験抗原とする交叉反応による補体結合反応に於て、前者は後者より反応著明である。又該血清は魚肉及び牛肉抽出液をそれぞれ試験抗原として補体結合反応を行い陽性成績を得た。即該血清は Insulin 蛋白抗体以外の他の夾雑蛋白抗体を有す。

3. 該血清は結晶 Insulin を試験抗原として、Insulin 補体結合性抗体を証明した。

4. Insulin 補体結合性抗体は 3～6 ヶ月間持続し、免疫終了日より 7 日後に反応最強度に現われる。

5. Insulin 治療患者血清よりも、交叉反応により補体結合性抗体を証明した。

本論文要旨は昭和 30 年 11 月岡山医学会第 65 回総会に於て発表した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導、御鞭撻並に御校閲を賜つた恩師緒方教授に対し、衷心より謝意を表します。尚種々御援助を頂きました望月講師並に公衆衛生学教室緒方正名講師に対し深謝致します。

文 献

- 1) 緒方益雄：アレルギー，3，293 (昭 29)
- 2) 大田原一祥：第 337 回岡山医学会通常例会及び第 3 回日本聯合衛生学会演説 (昭 6)
- 3) 大田原一祥：岡山医学会雑誌，51；991 (昭 14)
- 4) Tuft, L.,: Am. J. Med. Sci. 176；707 (1928)
- 5) Wasserman, P., Broh-Kahn, R. H., & Mirsky, I. A., J. Immunol. 38；213 (1940)
- 6) 山崎敏雄：精神神経学雑誌，56，60 (1954)
- 7) 内藤達雄：岡山医学会雑誌，48；2829 (昭 11)
- 8) Lewis, J. H. J. Am. Med. Association 108；

- 1336 (1937)
- 9) 井上邦彌：岡山医学会雑誌，66；861 (昭 29)
- 10) 緒方益雄他 生物物理化学，2，167 (昭 30)
- 11) Casals, J., Palacios, R.: Science 93；162 (1941) J. Exp. Med. 74；409 (1941)
- 12) Casals, J., J. Exp. Med. 79，341 (1944)
- 13) 厚生省，衛生検査指針 II, (1950)
- 14) 水島三一郎，赤堀四郎：蛋白質化学，2.
- 15) Haurowitz, F.: Chemistry and Biology of Proteins. New York, Academic Press. P. 284

- (1950)
- 16) Allan, F. N., Scherer, L. R.: *Am. J. Med. Sci.* **185** ; 815 (1933)
- 17) Harten, M., Walzer, M.: *J. Allergy* **12** ; 72 (1940)
- 18) Yasuna, E.: *J. Allergy* **12** ; 295 (1941)
- 19) Goldner, M. G., Ricketts, M. T.: *J. Clin. Endocrinol.* **2** ; 595 (1942)
- 20) Cannon, P. R., Marshall, C. F.: *Am. J. Path.* **17** ; 442 (1941) *J. Immunol.* **38** ; 365 (1940)

Department of Hygiene, Okayama University Medical School.
(Director : Prof. Dr. M. Ogata)

Studies on the Insulin Complementfixation

No. 1. Method of enlarging 24 hours of complementfixing at low temperature on Insulin Complementfixation.

By

Takashi Morishita.

Complement-fixing antibodies were found from rabbit sensitized by simple injection of Insulin (fish Insulin & animal Insulin), without hitherto-used horse serum etc.

1) By the cross reaction between fish Insulin and animal Insulin, Insulin complement-fixing antibodies were found after one hour of fixing antigen, antibodies and complement at 37°C. and prolonged 24 hours at 3°C ; which were never found by Kolmer method.

Insulin, as its molecular weight is small, takes a long time to react Insulin complement-fixing just as the case of Virus.

2) Insulin sensitized serum is positive, when complement-fixing reaction is made using extracts of fish and beef as antigen. This shows that the serum contains foreign matters besides Insulin antigen.

3) The same results were obtained by using crystal Insulin as well as commercial Insulin.

4) Insulin complement fixing antibodies last 3 or 6 months, and strongest reactions are found 7 days after the sensitization.

5) Complement-fixing antibodies were found by a cross reaction rather than by serum of patients treated by Insulin.