

インスリン自己免疫症候群に関する研究

(課題番号 63480274)

平成1年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書

平成2年3月

研究代表者 平 田 幸 正

(東京女子医科大学医学部 教授)

は し が き

研究代表者 平 田 幸 正

(東京女子医科大学医学部教授)

インスリン自己免疫症候群は1970年、わが国で最初に発見され、わが国における自発性重症低血糖症の原因疾患として、第3位にランクされている。わが国では1970年以降、1990年2月までにすでに148名の報告をみているが、欧米では、きわめて稀な疾患であり、そのため欧米における症例報告は、ごく小数にとどまっている。今回の研究は、本症候群においては、何故にインスリン注射を受けることなくインスリン自己抗体を生じ、さらにこの抗体によって何故に低血糖が惹起されるか、さらに本症候群における特有な HLA 抗原タイプが存在するか否かなどについて解明をすすめたものである。

研究課題

インスリン自己免疫症候群に関する研究

(課題番号63480274)

平成1年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書

平成2年3月

研究代表者 平 田 幸 正（東京女子医科大学医学部 教授）
研究分胆者 種 田 太 郎（東京女子医科大学医学部 講師）
内 潟 安 子（東京女子医科大学医学部 助手）
荷 見 澄 子（東京女子医科大学医学部 助手）
江 口 洋 子（東京女子医科大学医学部 助手）

研究経費

昭和64年度	5, 000千円
平成1年度	600千円
計	5, 600千円

研 究 発 表

(1) 学会誌等

Wasada T, Eguchi Y, Takayama S, Yao K, Hirata Y:

Reverse phase high performance liquid chromatographic analysis of circulating insulin in the insulin autoimmune syndrome.

J. Clin Endocrinol Metab 66:153-158,1988

Wasada T, Eguchi Y, Takayama S, Yao K, Hirata Y, Ishii S:

Insulin autoimmune syndrome associated with benign monoclonal gammopathy: Evidence for monoclonal insulin autoantibodies.

Diabetes Care 12:147-150, 1989

Uchigata Y, Yao K, Hasumi S, Hirata Y:

A human monoclonal IgG1 insulin autoantibody from the insulin autoimmune syndrome directed at a determinant at asparagine site on insulin B-chain.

Diabetes 38:663-666, 1989

Uchigata Y, Eguchi Y, Hasumi S, Hirata Y:

The immunoglobulin class and the ratio of κ : λ light chain of autoantibodies to human insulin in insulin autoimmune syndrome.

Autoimmunity 3:289-297,1989

植田太郎、嶺井里見、大森安恵、平田幸正:

赤血球のインスリン結合に及ぼすSH基薬剤の影響
Peptide Hormones in Pancreas 9:61-66, 1989

江口洋子:

インスリン自己免疫症候群におけるインスリン自己抗体の Scathard 解析について

東京女子医科大学雑誌59:1296-1305, 1989

江口洋子、平田幸正、荷見澄子:

日本におけるインスリン自己免疫症候群140例のうち報告のみられた26例の HLA 抗原タイプについての統計的分析

糖尿病32:887-892, 1989

(2) 口頭発表

Hirata Y.:

Update on the insulin autoimmune syndrome.

13th Congress of the International Diabetes Federation, Sydney, Australia, 1988年11月21日

植田太郎、嶺井里見、大森安恵、平田幸正:

赤血球のインスリン結合に及ぼすSH基薬剤の影響

第9回膵ホルモン研究会 1988年9月26日

植田太郎、江口洋子、高山澄子、八尾建史、平田幸正:

インスリン自己免疫症候群における血中インスリンのHPLC解析

第85回日本内科学会総会 1988年4月2日

江口洋子、荷見(高山)澄子、八尾建史、平田幸正:

我国におけるインスリン自己免疫症候群113例の臨床統計

第31回日本糖尿病学会総会 1988年5月26日

荷見(高山)澄子、戸辺一文、百村薫、越尾修、橋本裕子、平田幸正、春日雅人:

インスリン受容体抗体のインスリン作用機序に関する研究——受容体磷酸化への影響を中心として——

第31回日本糖尿病学会総会 1988年5月28日

内潟安子、八尾建史、荷見澄子、平田幸正:

ヒトインスリンB鎖-3を中心とした抗原決定基に対するヒトIgG₁(λ)インスリン自己抗体

第32回日本糖尿病学会総会 1989年4月22日

研 究 成 果

1 インスリン自己免疫症候群の統計

1970年、平田らはインスリン自己免疫症候群の第1例を報告した。本症例は自発性低血糖を1963年に発症したが、1968年に至って、診断され、その詳細は1970年、ようやく報告に至ったものであった。その後、わが国では1990年2月までに計148名の本症候群の報告を見たが、アメリカ、ヨーロッパ、日本以外のアジア諸国からの報告はなお18名にとどまっている。この間にわが国では2回の全国調査も施行され、わが国における自発性重症低血糖症の原因疾患として第3位に位置すると考えられている。日本における本症候群148名についての各種の統計を示すと下記の通りである。

1) わが国における発見例の発症年度別および男女別分布

日本における本症候群の148名を発症年度別に、さらに男女別に分けてみると表1の通りとなった。

表1 日本におけるインスリン自己免疫症候群の発症年別・男女別分類

(1990年2月まで)

発症年度	1963-1970	1971-1980	1981-1985	1986-	不 明	計
男	4	21	24	6	17	72
女	1	26	26	13	10	76

表1において発症年度が1981～1985年に頻度としてピークが示されたことは、どのような意味があるか不明である。従来、症例報告は、その疾患が珍しいものではなくるとともに減少するともいわれる。あるいはその他の理由によるものであるか不明である。男女差については現在までのところ大きいものではない。

なおこの表1で発症年度が不明というのは、学会の症例報告などで発症年度が明示されていないものであった。

2) 発症年齢および男女比

インスリン自己免疫症候群は、むしろ中高年者に発症しやすいこと、また男女比は20歳代を除いて、ほぼ等しいことが示された(表2)。すなわち発症年齢別にみると60歳代34名(男16名、女18名)ついで50歳代29名(男14名、女15名)であった。とくに70歳代においても27名であり、30歳代の13名の2倍となったことは注目を惹く。一般人口では70歳代は30歳代の約1/3であるからである。このことは本症候群の病因を考える上で重要であると思われる。すなわち高齢に至るとともに自己インスリンに対する自己免疫抗体の産生防止機構の消失が起こるといことが推測されるようである。

表2 日本におけるインスリン自己免疫症候群148名の発症年齢別、男女別頻度
(1990年2月までの報告例)

発症年齢	男	女	計
0~9	0	1	1
10~19	1	1	2
20~29	2	6	8
30~39	6	7	13
40~49	16	12	28
50~59	14	15	29
60~69	16	18	34
70~79	15	12	27
80~89	2	4	6
計	72	76	148

3) 低血糖頻発期間

インスリン自己免疫症候群の低血糖症の大きい特徴は、発作そのものは大量のインスリン注射時、あるいはインスリンノーマの低血糖のように重症であっても、その時期をグルコース静注あるいは大量の糖質投与で乗りきると比較的短期間の

うちに低血糖発作を見なくなるというものが多くことである。中には4～5日間の重症低血糖で終わるものもある。このことは本症候群の診断例数を実数以下にしている一つの原因となると思われる。発作頻発期間は148名中52名(35.1%)で1月未満であり、1年以上というものは8名(5.4%)にすぎない。なお、31名では発作頻発期間が不明であった。

これらの148名を発作頻発期間別に表3に示した。なおこの発作頻発期間は自然のコースによるものの他、後述する治療法によって短縮している可能性が大きいといえる。

表3 日本におけるインスリン自己免疫症候群148名における低血糖発作頻発期間
(1990年2月までの報告例)

発作頻発期間	男	女	計
～1ヶ月	25	27	52
～3ヶ月	16	18	34
～6ヶ月	7	6	13
～12ヶ月	5	5	10
一年以上	6	2	8
不明	13	18	31
	72	76	148

4) 治療内容に関する統計

インスリン自己免疫症候群の一つの特徴は自然寛解の多いことであり、このことも、本症候群の診断率を減少させていると思われる。今回の148名についても少なくともその73名(49.3%)に自然寛解をみている。表4に示すように自然寛解を待たずにインスリンノーマと誤診して膵切除が施行され、切除後、本症候群と判明したものが6名ある。これら6名は膵切除により低血糖発作が消失しているが、血糖値の上では、なお血糖低値を示した例がある。またきわめて頑固な低血糖発作

を続け、しかも本症と診断されているために血漿交換を施行されたもの2名、ステロイド使用16名などが認められた。ただし、治療法の明示していないものが49名もある。恐らくはこれら治療法の明示していないものの多くは自然寛解例と思われるので上記の自然寛解の率ははるかに高いものと思われる。

表4 日本におけるインスリン自己免疫症候群における
治療内容
(1990年2月までの統計)

治療法	男	女	計
自然寛解	38	35	73
ステロイド	2	14	16
膵切除	3	3	6
血漿交換	2	0	2
アザチオプリン	1	0	1
6-メルカプトプリン	0	1	1
不明	26	23	49
	72	76	148

5) インスリン自己免疫症候群とSH基薬剤

インスリン自己免疫症候群においてひとつの特徴的な所見として、本症候群を誘発すると思われる薬剤の分子の中に共通してSH基を有することであった。すなわち本症候群全例148名中、発作直前に何らの薬物も使用していなかったもの36名、使用していたもの57名、アンケートや学会報告でみるかぎり不明のもの55名であった。不明のものを除いた93名のうち54名のものにSH基を含むメチマゾール、チオプロニン、グルタチオンを使用中であった。メチマゾールは甲状腺機能亢進症に使用、チオプロニン、グルタチオンは皮膚疾患、慢性肝炎などに使用されたものであった。表5に示すようにメチマゾールは女性にチオプロニンは

男性に使用される機会が多い傾向があつたが全体として女性においてSH基薬剤使用の頻度がやや高いといえた。

表5 日本におけるインスリン自己免疫症候群の発症直前に使用されていた薬剤

	SH基を有する薬剤			その他薬剤	計
	メチマゾール	チオプロニン	グルタチオン		
男	10	14	1	0	25
女	16	10	3	3	32
計	26	24	4	3	57

2 日本におけるインスリン自己免疫症候群のHLA抗原タイプ

1) 目的

インスリン自己免疫症候群は、自己免疫症候患の一つであることから HLA 抗原タイプに特有なものが存在することが考えられた。1989年12月までに報告された HLA 抗原タイプをとりまとめて統計的処理を行ってみることにした。

2) 方法

対象は1970年から1990年2月までに報告されたインスリン自己免疫症候群32症例の HLA 抗原タイプであり、これらを主治医の了解のもとに統計をとった。HLA 抗原タイプ測定は全例、患者のリンパ球を用いるスタンダード法によって行われたものであった。対照として1983年第8回 HLA ワークショップで藤井らが報告した全国33ヶ所316家族における HLA 分析の成績を用いた。有意差検定は χ^2 -test によることにした。

今回の本症候群の HLA 抗原タイプ分析の成績は検査時期の差が大きく、そのため HLA-B locus についてはその内容が日本人では同様に B15と Bw62の2つの成績が示された。B15は Bw62と Bw63を含むものであるが、日本人の B15のほぼ全例は、Bw62であるといわれている。なお1970年報告の第1例はあらためて1987年に HLA 抗原タイプの測定を施行したため HLA-DR のタイプが判明したものである。

3) 成績ならびに考察

上記本症候群32名の HLA 抗原タイプは表6に示す通りであって、全体としてみると A11、B15(Bw62)、Cw4、DR4の頻度が高いこと、低血糖発作発現前に使用中の SH 基を有する薬剤の使用の有無との関係は少ないようにみえることなどが特徴的であった。HLA 抗原タイプの出現を症例数によって求め、全てのタイプについて検討したところ、表7に示すように A11 ($p < .01$)、B15 ($p < .001$)、Cw4 ($p < .001$)、DR4 ($p < .001$) となり、とくに B15(Bw62)、Cw4、DR4 の頻度が一般人口に比べて明らかに多く、B15 (Bw62)、Cw4、DR4は有意差を持って本症候群において頻度が高いといえた。

本症候群における HLA 抗原タイプに一つの傾向が明らかにみられることは、

本症候群の発現に自己免疫機能の遺伝的な背景が関与していることを示すものである。この際、抗原となるものがインスリンというきわめてはっきりした構造を持つ物質であり、また大量の自己抗体が産生されると低血糖という特有な症状を呈すること、しかも低血糖を防止しておけば、障害を残すことなく、多くは一過性に病態が経過してしまうというという特徴があり、本症候群は特異な疾患であることを思わせる。

表6 日本におけるインスリン自己免疫症候群の HLA 抗原タイプ

Patient	reported	sex	age	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	drugs
MH	1970(Hirata)	M	47	24	w52 w62	w 1 w 3	4 w 6	
TO	1978(Takei)	F	8		15 w54			
IM	1980(Sakamoto)	M	71	9	15 40	w 4		tiopronin
MN	1981(Kouno)	M	68	9		w 4		
HI	1982(Inomata)	F	72	2 11	15 w61	w 3 w 4		glutathione
MF	1982(Inomata)	F	52	11 w33	15 w35	w 3 w 4		tiopronin
II	1983(Awaya)	F	25	9	5			methimazole
TK	1984(Fukushima)	F	52	11 w33	44 w62	w 4	4 w13	
MS	1984(Shibata)	M	31	11 26	w35 w62	w 3 w 4	2 4	methimazole
KT	1985(Otsuka)	F	62	11 w24	w54 w62	w 1 w 3	4	tiopronin
AN	1985(Nakamura ')	F	58	w24	w52 w61	w 3	4	glutathione
TN	1985(Sato ')	F	71	w24	w52 w62	w 4	2 4	glutathione
SO	1986(Yoshikawa ')	M	45	24	w22 w62	w 1 w 4	1 2	methimazole
MN	1987(Kato ')	M	61	11 w33	w48 w58	w 3	w52 w53	
NY	1987(Ishikawa)	M	36	2 24	35 w54	w 1	4	tiopronin
HU	1988(Tsukuda ')	M	43	24 26	w62	w 3 w 4	2 4	tiopronin
MK	1988(Kawanishi)	F	48	2 w24	w62	w 3 w 4		tiopronin
KT	1988(Fuzihira)	F	39		w62	w 4	4	methimazole
IY	1987(Ishigaki)	F	82	11	w62	w 4		
ST	1987(Tsuchida)	M	71	11 24	w52 w62	w 4		
SM	1987(Ishikawa)	F	80	2 24	w62	w 3	4 w13	
TI	1987(Takagi)	M	47	11 24	44 w62	w 4	4 w 9	
FH	1987(Ito)	F	46		w62	w 4	4	methimazole
HA	1987(Tanigawa)	M	83	11 24	w52 w62	w 4	4	
MY	1987(Kurahachi)	F	61	w24 26	w35 w61	w 3	4 w 9	tiopronin
FM	1987(Kanzaki)	F	53	w24 w31	15 w54	w 1 w 4		methimazole
	1988(Kobayashi)	F	46		w62	w 4	4	tiopronin
HY	1989(Hirata)	M	36	11 24	w60 w62	w 4	4 w 9	
SO	1989(Kurahachi)	M	54	11 31	16 w62	w 4 w 7	2 4	tiopronin
MA	1989(Hososhima)	F	83	2 24	7 w62	w 3 w 7	1 4	
RO	1989(Nagakubo)	F	66	11	w62	3 4	4 9	tiopronin
AU	1989(Kobayashi)	F	61	11 24		w 6	w53	methimazole

表7 日本におけるインスリン自己免疫症候群 (IAS) の HLA 抗原タイプのうちとくに頻度の高いものに関する分析 (χ^2 -test による)

HLA	IAS	General Population	χ^2 -test	R.R.	SH-drug	IAS	* χ^2 -test
A11	14/28 (50.0%)	112/645 (17.4%)	P<01	4.8	+	7/17 (41.2%)	n s
	-				7/11 (63.6%)		
B15 (Bw62)	25/30 (83.3%)	134/650 (20.6%)	P<001	19.3	+	14/18 (77.8%)	n s
	-				11/12 (91.7%)		
Cw4	21/30 (70%)	65/635 (10.2%)	P<001	20.5	+	13/18 (72.2%)	n s
	-				8/12 (66.7%)		
DR4	19/22 (86.4%)	175/439 (39.9%)	P<001	9.6	+	11/13 (84.6%)	n s
	-				8/9 (88.9%)		

* SH基を有する薬剤の低血糖発作前使用の有無によるHLAの頻度の有意差

3 インスリン自己免疫症候群の血清インスリンのHPLC分析

1) 目的

自己インスリンに対するインスリン自己抗体の産生が本症候群の主症状である低血糖を惹起することは、本症候群の血清中から抽出されるインスリンの極めて大量であること、このインスリン量の減少とともに発作の消失することなどから十分に説明出来るようである。しかし何故に自己インスリンに対してインスリン抗体を産生するかは不明であり、まずインスリンがヒトインスリン以外のインスリン分子に変化して抗原性を有するに至ることが考えられる。とくにSH基を有する薬剤使用が、明らかに誘引の一つとみられることから自己インスリンがSH基を含む薬剤によって変化を受けることも考えられる。

2) 対象および方法

対象

今回の血清抽出インスリンのHPLC分析の対象となった症例は表8に示す通りであって、A群はインスリン自己免疫症候群5名および発作には至らないものの明かなインスリン自己抗体を有する1名であり、血清蛋白の¹²⁵I-インスリン結合率は49-86% (PEG法)、総抽出IRI 3501~790613 pmol/Lであった。症例2はgoldthioglucose使用歴があり、症例4、5はメチマゾール使用例であった。症例6は、偶然の機会にインスリン自己抗体を認めたものであるが重症の低血糖発作を欠くものであった。これらの6例においては、いずれもインスリン注射を受けたことはなかった。さらにインスリン注射を受けていた糖尿病患者でインスリン抗体高値の4症例(症例7~10)およびインスリン抗体は有しないもののインスリン抵抗性を示し高インスリン血症を認めた2症例(症例11~12)を対照とした。

方法

インスリン自己免疫症候群では、症例6は別として、自発性低血糖発作時期の血清について検討した。血清1.0~3.5mlをBio-Gel P-30カラム(1.5×76cm)、1M酢酸でゲル濾過し、各分画についてIRIを測定した。単一ピークの遊離インスリン分画をプールし、凍結乾固後、10mM塩酸に再溶解してHPLC試料とした。

逆相HPLCはWaters Associates (Milford, MA, U.S.A.)社製の各unitsを使

表8 血清抽出インスリンのHPLC分析の対象となった症例

Characteristics of the study patients									
Patient no.	Age (yr)/sex	Duration of hypoglycemia	^{(125)I} Human insulin binding to serum (%) ^a	IRI (pmol/L)		CPR (pmol/L)	Ig class		Comment
				Total	Free		[κ (%)/λ (%)] ^b		
A. Insulin autoimmune syndrome									
1	71/M	38 days	86.0	53,813	438 ^c	7,944	IgG/47.7/36.8	Diabetic GTT ^d	
2	52/F	>5 yr	73.2	16,503	73	3,476	IgG/52.3/35.1	Normal GTT, goldthioglucose used for bronchial asthma	
3	64/M	>2 yr	82.4	6,307	43	1,159	IgG/1.2/22.3	Monoclonal gammopathy	
4	49/M	26 days	72.8	5,094	44	2,979	IgG/39.8/14.1	Methimazole therapy for hyperthyroidism	
5	31/M	1.5 yr	67.5	790,613	99	63,552	IgG/40.0/8.4	Diabetic GTT, methimazole therapy for hyperthyroidism	
6	68/F		49.0	3,501	72	1,324	IgG/20.5/4.1		
B. Diabetes and insulin treatment									
7	63/M		58.2	1,873	65	199		Porcine insulin (30 U/day)	
8	73/F		48.1	1,815	79	99		NPH-type human insulin (20 U/day)	
9	52/F		34.9	223	108	1,225		Lente-type human insulin (24 U/day)	
10	38/M		35.8	1,421	93	0		Porcine/bovine insulin (36 U/day)	
C. Hyperinsulinemia									
11	13/F		3.3	1,306 → 6,364 (After meal)		1,192		Insulin resistance syndrome (type A)	
12	60/F		1.9	316 → 2,246 (After glucose)		927		Unknown etiology	

^a ^{(125)I}Human insulin (10,000 cpm) was incubated with serum, and the mixture was precipitated with 12.5% Polyethylene Glycol 6000. The antibody titer was expressed as a percentage (bound to total ratio).

^b Serum samples were preincubated with ^{(125)I}human insulin and then precipitated with specific antiserum to human IgG, IgM, and κ- and λ-light chains.

^c At hypoglycemic attack (plasma glucose, 1.4 mmol/L).

^d Glucose tolerance test.

用し、カラムは μ Bondapak (C18, 0.39 \times 30cm, 10 μ m) を用いた。移動相は0.1% TFA と acetonitrile 29% (isocratic)、および29–60% linear gradient 系で解析した。流速1ml/min.、isocratic 相は0.4ml/tube、gradient 相は0.8ml/tube でそれぞれ分取した。[Ala^{B26}、Thr^{B30}]-bovine、bovine, human, porcine, [Leu^{A3}-human および human proinsulin の各標準品を混合し、本条件下に波長214nm で分析すると、各ピークは上の順に出現し、明確に分離された。したがって、以下の検討では最も溶出の早い[Ala^{B26}、Thr^{B30}]-bovine インスリンを内部標準として各試料に添加し、その IRI ピークを基準として相互に比較することで同定を行った。

一方、合成ヒトインスリンを methimazole 8.8×10^{-3} mol/L 存在下および非存在下に、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で37°C、24時間ゆっくりと振とう孵置した後、インスリン構造の変化につき HPLC で検討した。

3) 結果

a) HPLC による血中インスリンの分析

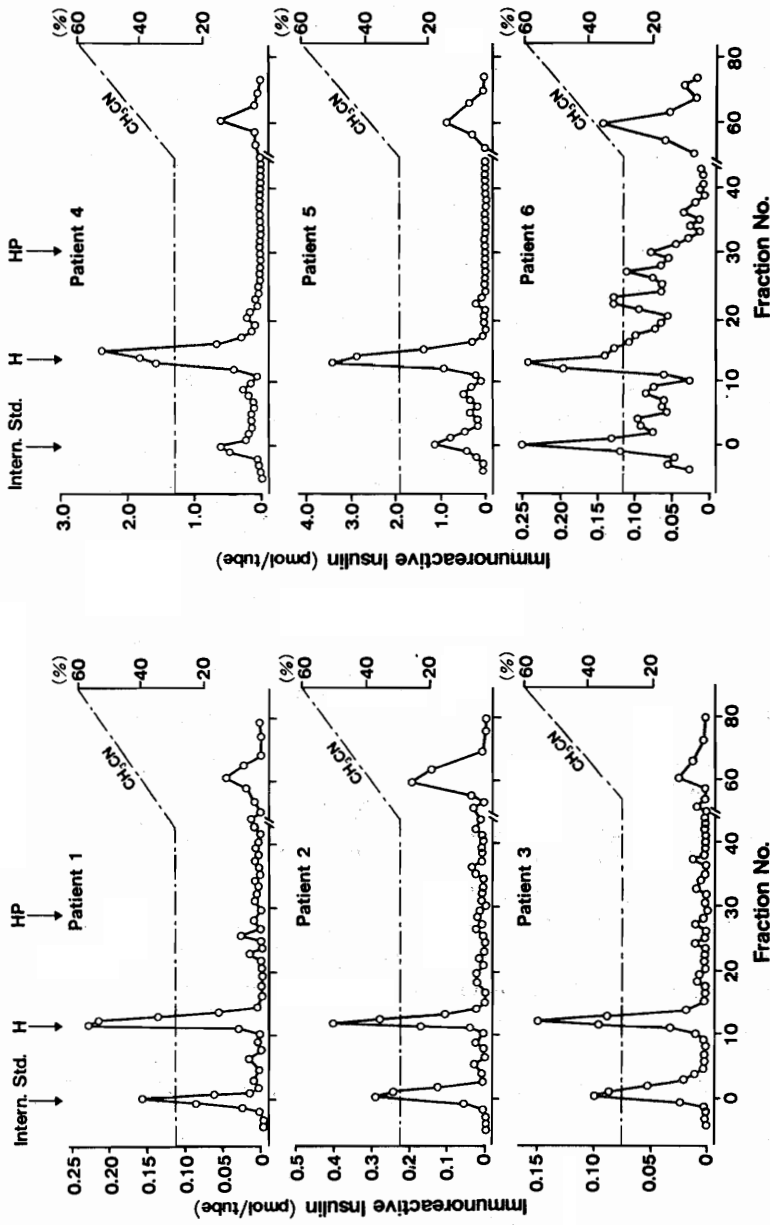
図1は表8のインスリン自己免疫症候群5名およびインスリン自己抗体を認めた1名における IRI 溶出パターンを示した。いずれも acetonitrile 29% (isocratic) で、内部標準から13番目の合成ヒトインスリン標品と一致する位置に IRI の主要ピークが認められた。また同時に、後半の gradient 相 (CH₃CN 38% 近傍) にも疎水性の強い IRI の小ピークが全例に共通して認められた。

図2はインスリン治療中の患者で、使用したインスリンの動物種に一致した主要インスリンピークを認めると同時に、後半の gradient 相で、インスリン自己免疫症候群の場合と同じく同一の位置に小さな疎水性のピークが検出された。

図3は高インスリン血症例を示すが、いずれもヒトインスリンに一致するピークの他に、1例では明らかに gradient 相に同様な小ピークが認められた。

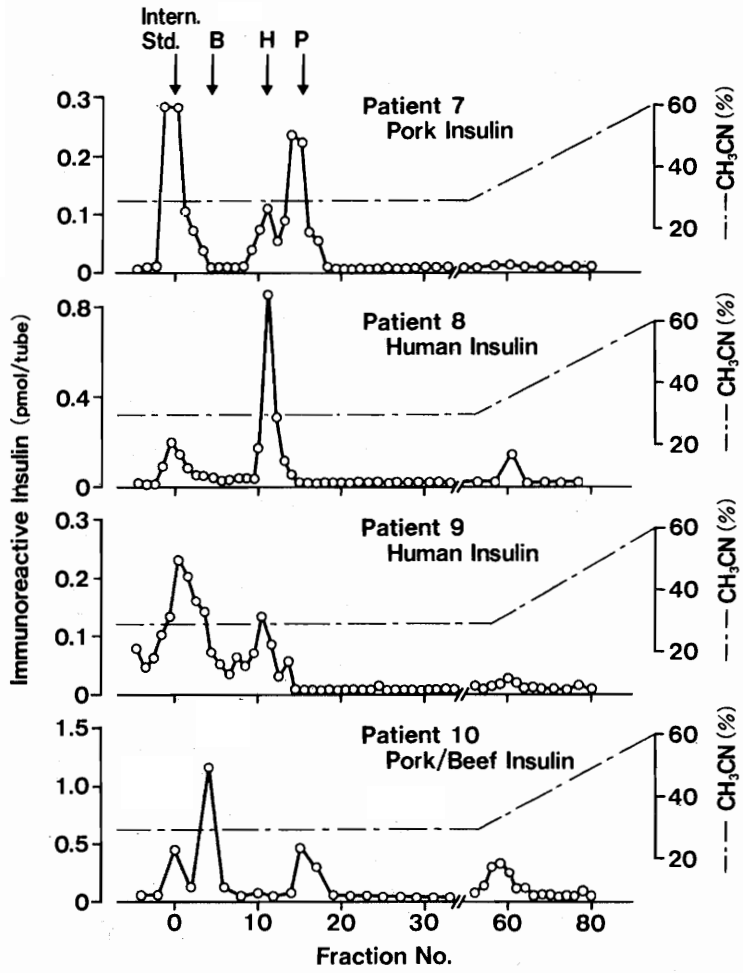
b) in vitro における SH 基薬剤の影響——

合成ヒトインスリンを高濃度 (8.8×10^{-3} mM) の methimazole と incubate した後、HPLC、214nm の溶出パターンを比較した。対照 (methimazole 非存在下) と比べ、高濃度の methimazole に曝露されたインスリンのカラム保持時間 (retention time) には全く変化を認めなかった (図4)。



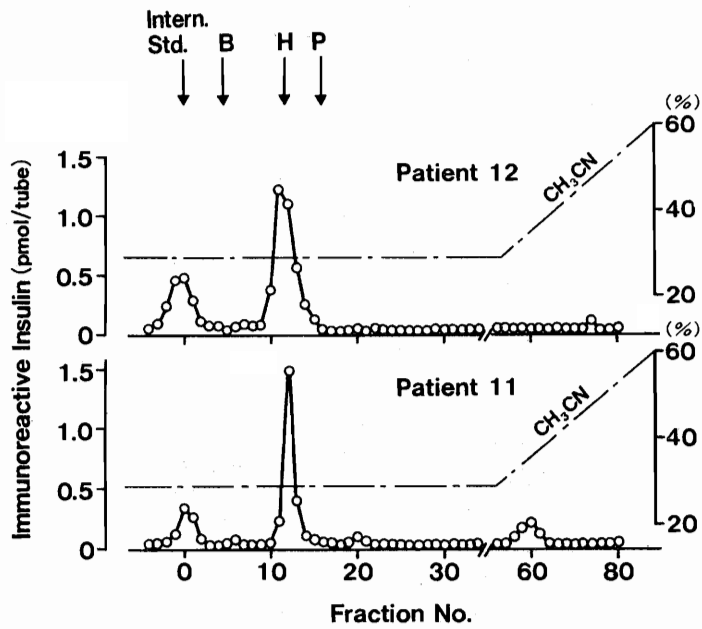
RP-HPLC profiles of serum IRI in the six patients with the insulin autoimmune syndrome. Fraction number was adjusted according to the elution position of the internal standard (Intern. Std.; fraction 0), which was (Ala⁸³⁶, Thr⁸³⁰)bovine insulin. H, Semisynthetic human insulin; HP, biosynthetic human proinsulin.

図1 インスリン自己免疫症候群(表8のpatient 1~5)およびインスリン自己抗体を認めたが低血糖発作をみなかった1例(patient 6)の血中インスリン。HPLCパターンはすべて合成ヒトインスリンと一致した。



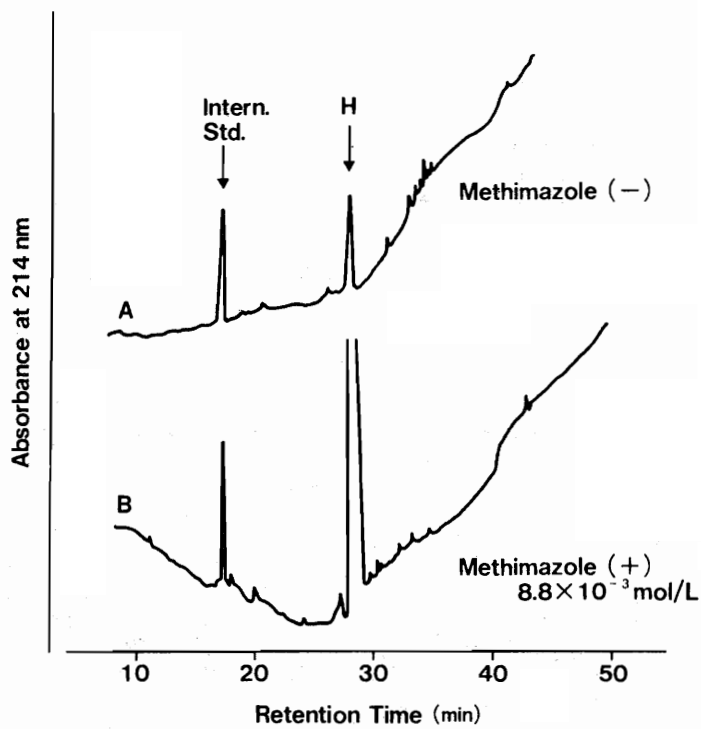
RP-HPLC profiles of serum IRI from four insulin-treated diabetic patients. Intern. Std., Internal standard ([Ala^{B26}, Thr^{B30}]bovine insulin); B, bovine insulin; H, human insulin; P, porcine insulin.

図2 インスリン使用中の患者の血清から抽出したインスリンの HPLC 分析



RP-HPLC profiles of serum IRI in two patients with endogenous hyperinsulinemia. The abbreviations are explained in Fig. 3.

図3 高インスリン血症を示した患者血清から抽出したインスリンのHPLC分析



Comparison by absorbance rate at 214 nm of the RP-HPLC elution profile of insulin incubated with (B) and without (A) methimazole (8.8×10^{-3} mol/L) in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C for 24 h. The abbreviations are explained in Fig. 3.

図4 in vitro でインスリンとメチマゾールを直接作用させた後のインスリンのHPLC分析。全く変化を認められない。

4 インスリン自己免疫症候群の発作期におけるインスリン自己抗体の Scatchard 分析

1) 目的

インスリン抗体は、もともとインスリン使用者に限って発現し、インスリン抵抗性の原因となりうると考えられた。また低血糖症を発見した場合、インスリン抗体を発見すれば、インスリン注射によって起こったものであるという証明になるといわれた。ところが、インスリン自己免疫症候群では、インスリン抗体を生じながら何故にインスリン抵抗性ではなく低血糖症を生ずるか、またインスリン自己抗体を生ずればむしろ糖尿病を起こすのではないかということは長い間の疑問とされた。すでに上述したように本症候群における血中インスリンはヒトインスリンそのものであり、かつてウシ、ブタインスリンのみしか発売されていなかった時期に採血された血清中のインスリンがヒトインスリンであることは上述の通りである。

次の問題として何故に低血糖症を生ずるかという問題に関しては、そのインスリン抗体の性質を分析し、低血糖発現に関係するか否かを検討する必要がある。

2) 対象および方法

対象

今回 Scatchard plot 法によって分析を行う対象として、インスリン自己免疫症候群として報告された症例のうち、低血糖症発作期間中に採血され、冷凍保存された血清を用いることとした。同一例で発作期間中にくりかえして採血されたものが1例あった。これら本症候群の6症例は表9に示す通りであった。対照としてはインスリン治療によりインスリン抗体を生じた糖尿病患者の血清を用いた。

方法

まず各血清から Dixon の変法で deinsulinization 処理を施行してインスリン抗体を free の形にした。ついて trace dose (5.6×10^{-12} mol/l) の ^{125}I -ヒトインスリンおよび各種濃度の cold human insulin を加え、PEG 法にて bound%、さらにそれぞれの添加インスリン濃度から抗体結合インスリン量 (B)、また添加インスリン中の free insulin (F) を求め、B/F 比および bound insulin 量から

表9 インスリン自己免疫症候群中血中インスリン抗体の Scatchard 分析を施行した患者の臨床像

症例	低血糖発症年月日	低血糖発作期間	誘因薬剤	治療	¹²⁵ I-インスリン結合百分率 %	T-IRI ×10 ⁻¹⁰ mol/l	F-IRI ×10 ⁻¹⁰ mol/l	CPR ×10 ⁻¹⁰ mol/l	インスリン抗体の免疫ブロッグリングラス (K:λ)
1 TS M 71 才	1983年 6月1日	38日	無		86.0	1216.0	2.3	86.6	IgG (47.7:46.8)
2 TK F 52 才	1981年 6月	6年以上	ゴールドチオ グハコース	ステロイド	67.2	499.2	0.9	13.3	IgG (55.3:44.2)
3 KU F 68 才	1980年 8月	4ヶ月	無	ステロイド	75.5	633.2	7.0	179.8	IgG (58.1:10.5)
4 SO M 45 才	1985年 8月	不明	メチマゾール	不明	82.6	71.8	0.9	85.2	IgG (65.7:48.6)
5 TH M 64 才	1980年	2年	無	血漿交換	73.0	56.4	0.4	6.7	IgG (6.6:58.5)
6 MS M 31 才	1984年 5月28日	3年以上	メチマゾール	対症療法	75.0	7526.4	0.9	639.4	IgG (64.3:15.6)

Scatchard plot を作製した。この plot のうち双曲線を示すものについては Rosenthal 法による非線形最小2乗法を用いて affinity および capacity を異にする2つの直線 (high affinity site および low affinity site) を求めた。

3) 成績ならびに考察

a) インスリン自己免疫症候群

インスリン自己免疫症候群6症例中4名については図5に示すような Scatchard plot を得た。この4名では oligoclonal antibodies ともいえる形であり、いずれも high affinity site が大きい部分を占めているといえた。しかもこの high affinity site の capacity は大きく affinity は比較的低値であった。また1例では、Scatchard plot は1つの直線となり、きわめて大きい capacity ときわめて小さい affinity を示した (図6)。さらに残りの1例では図7に示すように右側に凸の Scatchard plot を示した。これは時期を変えて頻回に検査を繰り返しても常に右側の凸の形を示すという特徴的なものであった。この prozone 現象は抗原が増加すればふたたび bound 抗原が free となるという意味をもつもので上記の affinity が小さいということとともに低血糖症をおこしやすいことの説明となるものであった。

b) インスリン注射によって生じたインスリン抗体

インスリン療法施行中の糖尿病患者の血清でインスリン抗体の Scatchard plot を求めると図8のように、いずれも high affinity site と low affinity site が認められた。

さらに上記のインスリン自己免疫症候群で Scatchard plot の双曲線あるいは直線と、5名のインスリン治療患者から求めた5つの Scatchard plot (双曲線) の affinity capacity よび capacity を表10に示した。両群を比べてみるとインスリン自己免疫症候群では high affinity site の k_1 が小さく、 b_1 が大きいことが特徴的であった。

まとめてみるとインスリン自己免疫症候群の発作頻発期のインスリン抗体の Scatchard plot でみる限り、インスリン療法によって生じたインスリン抗体に比べ、affinity は弱く、capacity は著明に大きいことがわかった。またまれであるにしても prozone 現象の著しいものがあった。

これらの成績は、インスリン自己免疫症候群の血中インスリンの極めて大量

であることとともに低血糖症惹起の条件となるといってよいと思われた。

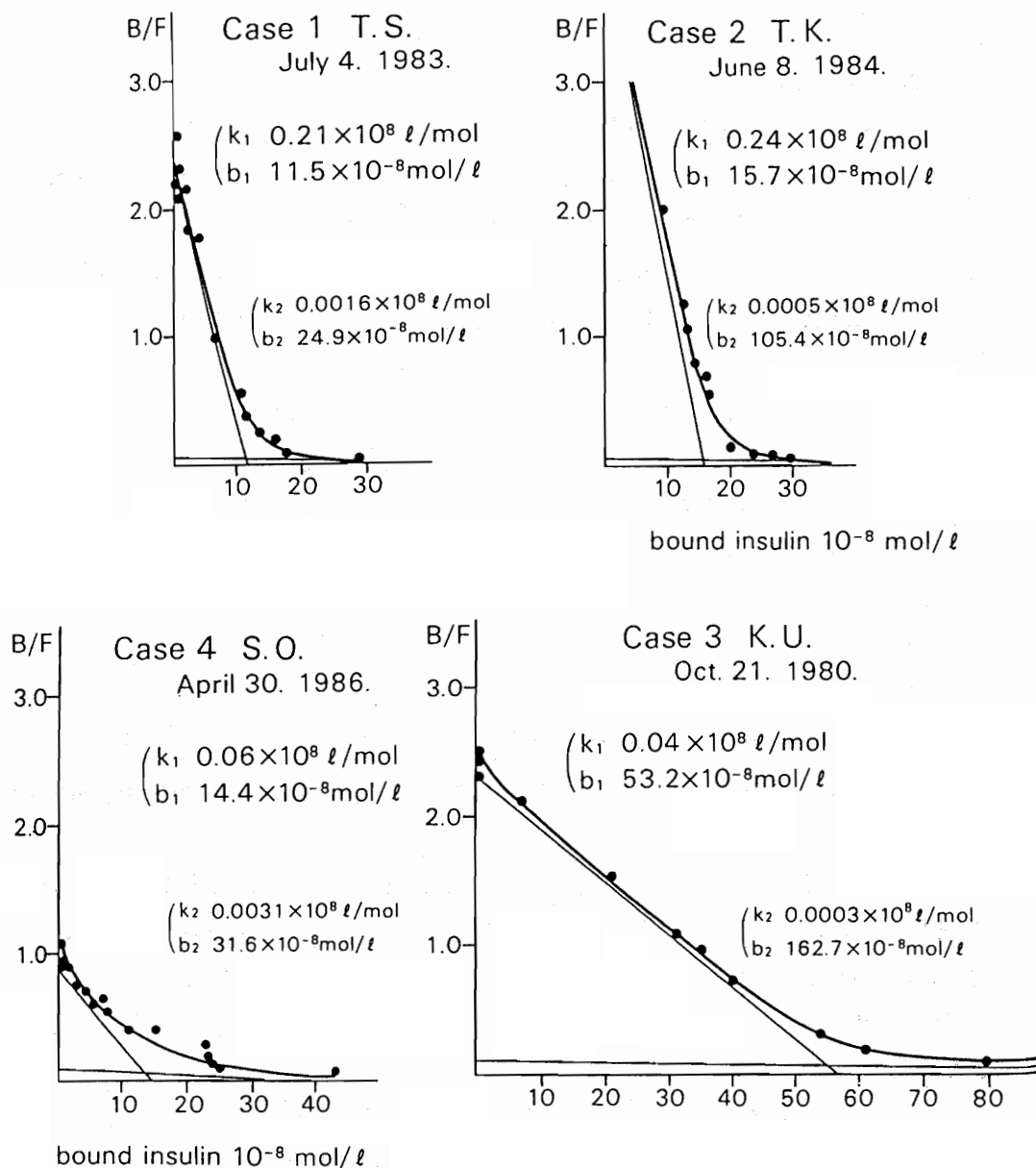


図5 インスリン自己免疫症候群の4症例にみられたインスリン自己抗体の Scatchard plot (表9中の第1~4例)

Case 5 T.H. Sep. 22. 1981.

T-IRI $879 \mu\text{U/ml}$ ($0.0563 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$)

(k $0.0036 \times 10^7 \text{ l/mol}$
 b $774 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$)

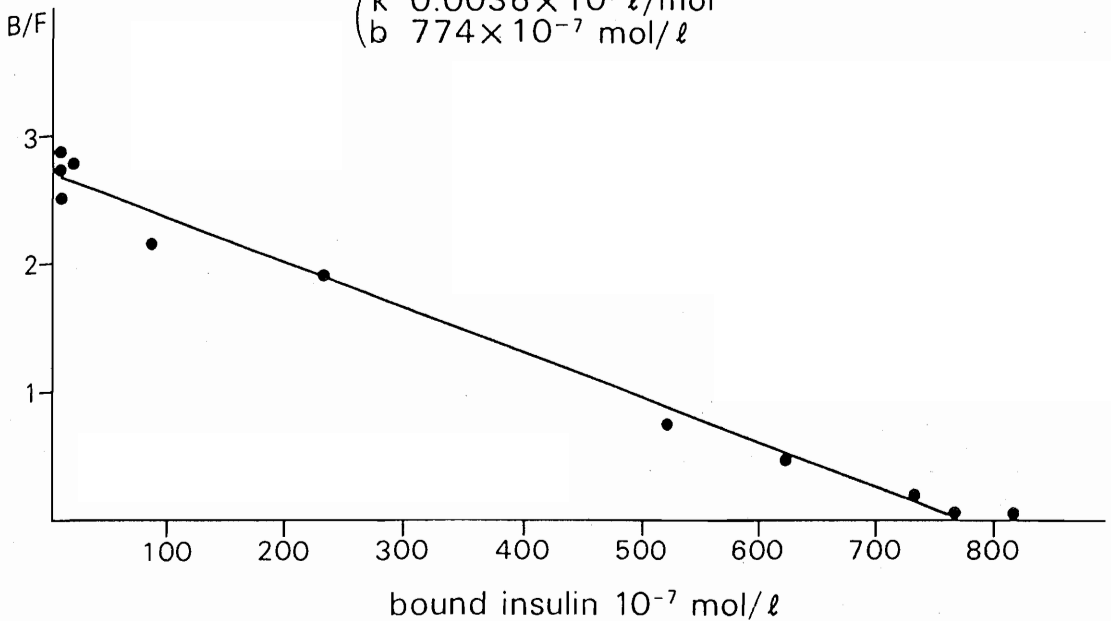


図6 インスリン自己免疫症候群のI症例 (TH表の中の第5例) にみられたインスリン自己抗体の Scatchard plot (直線を示し、きわめて大きい capacity ときわめて小さい affinity)

Case 6 M.S.

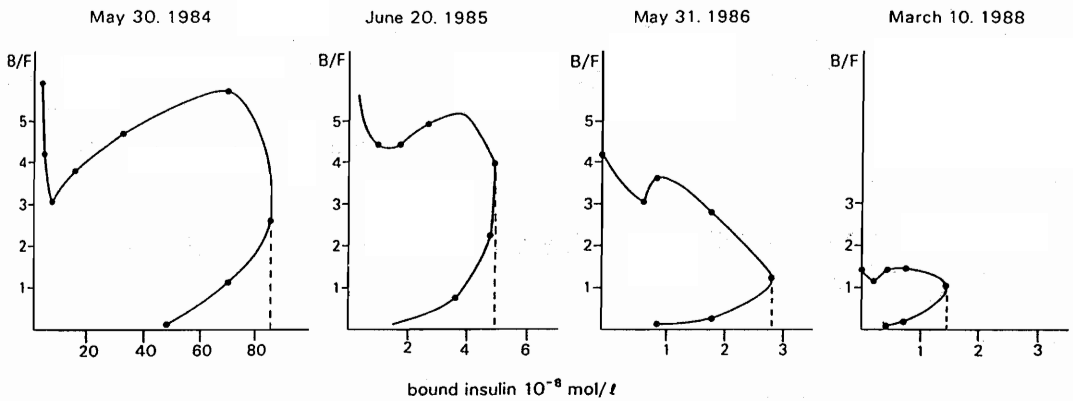


図7 インスリン自己免疫症候群のI症例 (MS表の中の第6例) にみられたインスリン自己抗体の Scatchard plot (prozone 現象著明で、年月を経て形態不変)

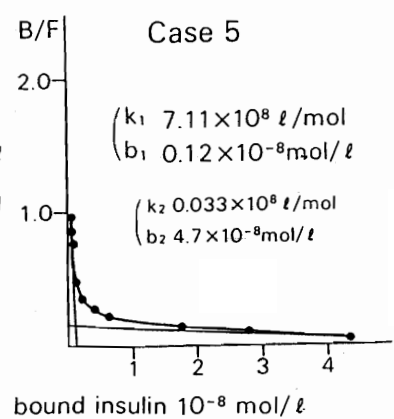
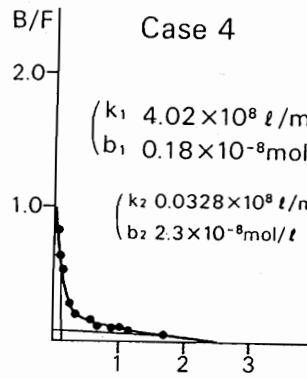
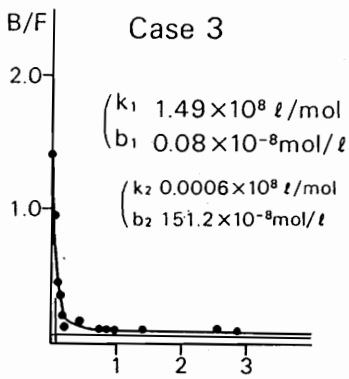
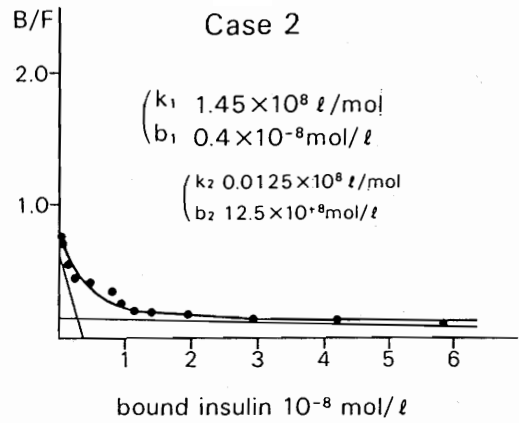
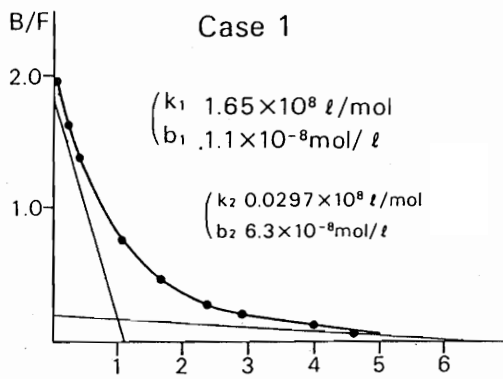


図8 インスリン使用中の糖尿病患者5症例の血中インスリン抗体の Scatchard plot

表10 Scatchard 解析によって求められた affinity constant (k_1, k_2)
及び binding capacity (b_1, b_2)、患者 1 ~ 5 は表 9 に一致

		high affinity site		low affinity site	
		k_1 ($10^8 \ell/\text{mol}$)	b_1 ($10^{-8} \text{mol}/\ell$)	k_2 ($10^8 \ell/\text{mol}$)	b_2 ($10^{-8} \text{mol}/\ell$)
インスリン自己免疫症候群	1	0.21	11.5	0.0016	24.9
	2	0.24	15.7	0.0005	105.4
	3	0.04	53.2	0.0003	162.7
	4	0.06	14.4	0.0031	131.6
	5*	K0.0036 $\times 10^{-7} \text{mol}/\ell$, b774 $\times 10^{-7} \text{mol}/\ell$			
インスリン治療患者	1	1.65	1.1	0.0297	6.3
	2	1.45	0.4	0.0125	12.5
	3	1.49	0.08	0.0006	151.2
	4	4.02	0.18	0.0328	2.3
	5	7.11	0.12	0.033	4.7

* インスリン自己免疫症候群症例NO.5は Scatchard plot が直線を示したため結合部位は1つしか存在しない。

5、 インスリン自己免疫症候群のインスリン抗体の免疫グロブリンクラス、sub-class および light chain について

1) 対象と方法

インスリン自己免疫症候群の低血糖発作期間中に採血しえなかったものを含む24名から採血した血清24サンプルについて、インスリン自己免疫症候群の免疫グロブリンクラス、subclass および light chain のタイプについて検討した。subclass の決定にはヒツジの anti-human IgG₁、G₂、G₃、G₄ -antibodies を使用した。Light-chain に関しても同じくヒツジの抗血清を使用した。24名の症例の年齢、性、使用中の薬剤などは表11に示す通りである。

2) 成績ならびに考察

以上の24症例の血清サンプルの中におけるインスリン自己抗体は全て IgG であり(表12)、さらにその subclass は1例(No.24)において、IgG₁のみで他の subclass はなかった(No.24)。このIgG₁のみであった症例はさきの Scatchard plot で直線を示した症例 TH であった。(表13)。さらに light chain タイプをみると kappa type のみを示した3名が存在した。上述の症例 TH すなわち No.24は lambda タイプのみを示すものであった(表14)。

表II インスリン自己抗体の免疫グロブリンクラス、subclass、light chain type を検討したインスリン自己免疫症候群24症例

Clinical summary of patients and sera

Patient No.	Age	Sex	Drug	Total IRI (μ U/ml)	125 I Human insulin binding (%)#
1	60	F	-	530	30.0
2	64	F	-	3200	63.0
3	52	F	-	500	28.4
4	46	F	-	875	74.0
5	50	M	-	270	34.3
6	37	M	MTZ	230	44.0
7	82	F	-	320 \uparrow	76.4
8	66	F	-	900 \uparrow	83.0
9	54	F	*	520	52.0
10	49	M	*	126	37.5
11	19	M	-	900 \uparrow	77.0
12	53	F	MTZ	3049	83.0
13	62	F	-	960	53.4
14	8	F	-	620	39.3
15	50	M	-	275	45.0
16	32	M	MTZ	2000	67.5
17	23	F	MTZ	1626	86.0
18	48	F	-	1200	64.0
19	68	F	MTZ	1000	44.0
20	52	M	-	520	40.0
21	47	M	-	3900	78.5
22	65	F	-	240	62.0
23	71	M	-	7500	86.0
24	64	M	-	879	88.0

M, male; F, female; -, no drug.
 MTZ, methimazole.
 *, α -mercaptopyronyl glycine.
 #, normal control, less than 5%.

表12 インスリン自己免疫症候群24症例（表11）のインスリン自己抗体の免疫グロブリンクラス

Immunoglobulin class of insulin autoantibodies

<i>Patient No.</i>	<i>IgG^a</i>	<i>IgM^a</i>	<i>IgA^a</i>
1	+	-	-
2	+	-	-
3	+	-	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	+	-	-
11	+	-	-
12	+	-	-
13	+	-	-
14	+	-	-
15	+	-	-
16	+	-	-
17	+	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
20	+	-	-
21	+	-	-
22	+	-	-
23	+	-	-
24	+	-	-
Normal control (n = 20)	-	-	-

+. OD > 0.25; -. 0.08 > OD

^aUsed alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG (γ), IgM (μ) or IgA (α), followed by incubation with the substrate solution. gave OD > 0.5 to wells coated with corresponding immunoglobulins.

表13 インスリン自己免疫症群24症例（表IIによる）のインスリン自己抗体 Ig G の subclass

The IgG subclass of insulin autoantibodies

Patient No.	$G_{1\mu}$	$G_{2\mu}$	$G_{3\mu}$	$G_{4\mu}$
1	1	1	1	1
2	1	0.83	1	0.81
3	1	0.66	0.83	0.78
4	1	0.76	0.73	0.61
5	1	0.66	0.66	0.66
6	1	0.43	0.52	0.48
7	1	0.43	0.53	0.53
8	1	0.61	0.60	0.60
9	1	0.88	0.80	0.65
10	1	0.87	1	0.88
11	1	0.54	0.50	0.73
12	1	0.62	0.70	0.70
13	1	1	1.67	0.72
14	1	0.40	0.83	0.50
15	1	0.59	0.65	0.51
16	1	0.49	0.89	0.81
17	1	0.46	0.84	0.64
18	1	0.24	0.84	0.50
19	1	0.38	0.56	0.33
20	1	0.16	0.11	0.11
21	1	0.50	0.50	0.59
22	1	0	0	0.12
23	1	0.56	0.75	0.83
24	1	0	0	0

^aData listed as ratio of G_x/G_1 ($x = 1, 2, 3$ or 4).

表14 インスリン自己免疫症候群24症例（表11）のインスリン自己抗体 Ig G の K、 λ light chain

Ratio of k: λ light chain of insulin autoantibodies

Patient No.	k	λ^a
1	1	1
2	1	0.17
3	1	0.18
4	1	0.24
5	1	0.22
6	1	0.38
7	1	0.15
8	1	0.40
9	1	0.62
10	1	0.61
11	1	0.75
12	1	0.25
13	1	0
14	1	0.62
15	1	0
16	1	0.05
17	1	0.51
18	1	0.29
19	1	0.13
20	1	0.33
21	1	0.26
22	1	0
23	1	0.60
24	0	1

^a Data listed as ratio of k: λ .

6 インスリン自己免疫症候群の中にインスリンモノクロナール抗体を持つもののあることの証明

1) 目的

インスリン自己免疫症候群がインスリンに対して特異的な抗体を作りうることの一つの証拠として、インスリン注射では今まで1例も証明されていなかったインスリンモノクロナール抗体の産生がありうる。このような症例を認めたので、これが果たして真のモノクロナール抗体であるか否かを検討した。

2) 方法

上述の患者 TH (表14のNO.24)インスリン抗体は IgG₁ のみ lambda light chain のみであり、かつ Scatchard plot では一つの直線であった。この患者 TH からインスリン抗体を、ヒトインスリンとカップリングしたセファロース4B カラムによって精製し、BALB/C マウスに投与し、さらにその spleen cell から hybridoma をつくり、上記インスリン抗体に対する抗イディオタイプ抗体 (anti-TH) を作製した。

3) 成績ならびに考察

上記患者 TH のインスリン抗体に対する抗イディオタイプ抗体 (anti-TH) を使用し、患者 TH のインスリン抗体は、一種類の抗イディオタイプ抗体で阻止できるか否かを検討したところ、図9にみるように患者 TH のインスリン抗体とヒトインスリンとの結合が、上述のようにして求められた anti-TH によってのみ阻害されることが証明された。このことは、患者 TH のインスリン抗体がモノクロナール抗体であることの証明となるものであった。

Inhibition of TH-IAA binding to human insulin by anti-TH

Various concentrations of anti-TH (○), anti-YK (△), and mouse IgG (●) were incubated with 1 μg of TH-IAA, and mixtures were assayed in plates coated with 0.5 μg of human insulin. When no inhibitor was present, ~0.78 O. D. was noted.

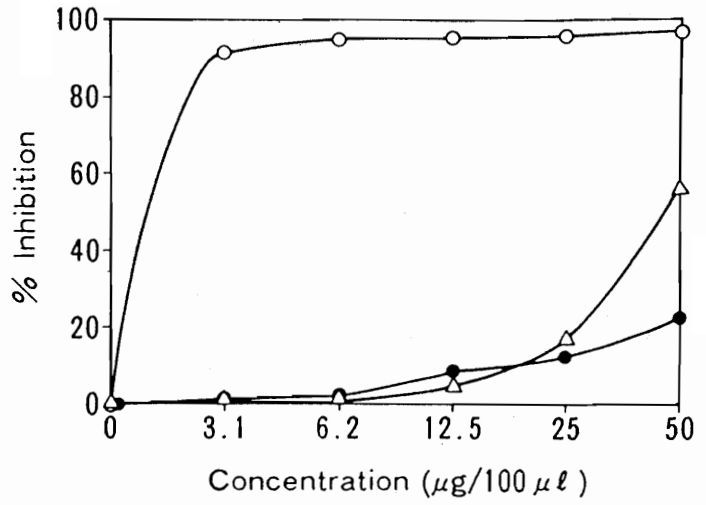


図9 Scatchard 分析でヒトインスリンに対して single-binding affinity をもつインスリン自己免疫症候群患者 (TH) のインスリン抗体に対する抗イディオタイプ抗体の特異的抑制作用

7 SH基を有する薬剤とインスリン自己抗体の産生に関する研究

1) 臨床所見とHPLC成績からみたSH基を有する薬剤の関係

上述のようにSH基を有する薬物のある種のもの、とくにメチマゾールおよびチオプロニンの使用は、インスリン自己抗体産生に促進的に働くようにみえる。

そこですでにふれたように、これら薬剤の使用とHLA抗原タイプとの関係、SH薬物使用の有無別のHPLC分析上のヒトインスリンピークの差、さらにインスリン自己抗体の免疫グロブリンクラス、subclassの相異など検討したが、とくにSH基を有する薬物が直接インスリンに作用すると考えられるものはなかった。

in vitroでこれら薬剤とインスリンを直接incubateしても分析上なお変化のみられないことは上述の通りであった。

2) リガンド (^{125}I -insulin) の赤血球受容体への結合性に対するSH基を有する薬物の影響

インスリンをSH基を有するメチマゾールとin vitroで37°C12時間incubateした後、HPLCでインスリンの構造に変化のないことを確かめた後、赤血球のインスリン受容体との結合について検討したのであるが、incubation前後で結合能は全く不変であった。現在のところ、少なくともメチマゾールそのものが、インスリンの構造あるいは機能を障害するという証明は出来ないことになった。

まとめ

今回、わが国で1990年2月までに報告されたインスリン自己免疫症候群148症例について、その発症年齢は高齢者に頻度が高いこと、男女差の少ないこと、HLA抗原タイプではとくにHLA-B15(Bw62)、Cw4、DR4が有意に高頻度であることが証明された。血清から抽出されたインスリンがHPLC分析によって合成ヒトインスリンと全く同一部位に証明されること、インスリン抗体クラスはIgGであるが、そのsubclassは各種あること、1例ではあるがIgG₁、lambda型light chainのみを有し、モノクローナルインスリン抗体であることが証明されるものがあったことなどが判明した。とくにScatchard分析によると、少なくとも低血糖症頻発期のインスリン抗体ではインスリン注射中の糖尿病患者に認める抗体に比べbinding capacityが著明に高く、逆にaffinityが著明に低いことが認められた。またまれではあるが、prozone現象の明かなものが存在した。なおSH基薬物の発作前使用を、本症候群に多数証明することは明らかであったが、どのような機転で誘発に働くかは、今回の研究では明らかにすることが出来なかった。