血中インスリン抗体に関する研究

第　1　編

血中インスリン抗体の新しい測定法

岡山大学医学部第3内科学教室（主任：大藤　眞教授）

柳　生　史　登

（昭和56年8月24日受稿）

Key words：インスリン抗体，血中遊離インスリン，
血中結合インスリン，ヨード化インスリン，

緒　　言

糖尿病の治療薬として日常用いられているインスリン製剤は，ウシ，ブタなどの膵から抽出された異種蛋白であり，抗原性を持つ．1938年，Bantingらは[1]，インスリン使用糖尿病患者の血清中にインスリン作用を中和する因子のあることを報告し，1955年，Moloneyら[2]により，その因子はインスリンに対する抗体であることが証明された．

インスリン抗体は，インスリン作用を中和して，インスリン抵抗性の原因と[3)~6)]なるのみならず，細小血管障害の増悪因子として注目されている[7)~8)]．しかし，逆にインスリン抗体は，血液中でインスリンとの結合体を形成しており，遊離インスリンを放出するbuffer actionを有するものとして，糖尿病コントロールのstabilityに関与しているとする報告[9)]もあり，臨床的にインスリン抗体を測定する必要性は大きい．

インスリン抗体の測定法として古くは，Prausnitz-Küstner反応[10)]，guinea pig anaphylaxis[11)]などの生物学的反応を利用していたが，これらの方法での測定感度は低いものであった．1959年，Berson φ Yalowは，放射性ヨード化インスリンを用いて鋭敏な測定法を開発した[12)]．彼らは，遊離インスリン（以下F）と結合インスリン（以下B）の分離に濾紙クロマト電気泳動を用いたが，その後，80%エタノール法[13)]，Polyethyleneglycol（以下PEG）法[14)]，Dextran coated charcoal法[15)]，二抗体法[16)]など，種々の分離法が報告された．しかし，測定原理はいずれの方法でも変わりなく，放射性ヨード化インスリンの抗体によるuptakeをみるものであるが，下記の2つの問題点が指摘されている．すなわち，1つは，測定する検体血清中に含まれる遊離ならびに抗体と結合しているインスリンが測定結果に影響することであり[17),18)]，他は，インスリンに放射性ヨードをlabelするために生じるインスリンの免疫学的活性の変化である[19),20)]．1974年，Dixonらは，血清にpH 3.5の塩酸グリシン緩衝液を加えてpHを下げて，抗体からインスリンを解離させ，Dexran coated charcoalでインスリンを吸着した後，放射性ヨード化インスリンのuptakeをみる方法を報告した[17)]．この方法においても，酸性化により抗体が変性を受けるために，酸性下の反応時間により測定値にばらつきが生ずることが知られている[18)]．

今回著者は，FとBの分離にPEGを用い，血清中の抗体と反応させるインスリンはnativeなものを使用し，かつ血清中の遊離ならびに結合インスリンに影響を受けない，新しいインスリン抗体測定法を考案したので報告する。

方　　法

1．測定原理

検体血清中のインスリン抗体は，インスリンとの結合体と遊離の抗体とに分かれている．この血清に過剰の抗原としてnative insulinを加えてincubateすると，遊離の抗体が飽和される．しかる後，PEGを加えて，インスリン—インスリン抗体結合体を含むγ-globulin分画を沈渣としてえる．そして，この沈渣を溶解して，酸性化することによってインスリンを抗体から解離させる．これに，再結合ならびにインスリン測定におけるインスリン抗体の影響を除外するため，PEGを加えてγ-globulin分画を沈渣として分離し，抗体から解離したインスリン量を測定することにより抗体価を求めた．

2．測定法

測定法を図1に示した．すなわち，Phosphate

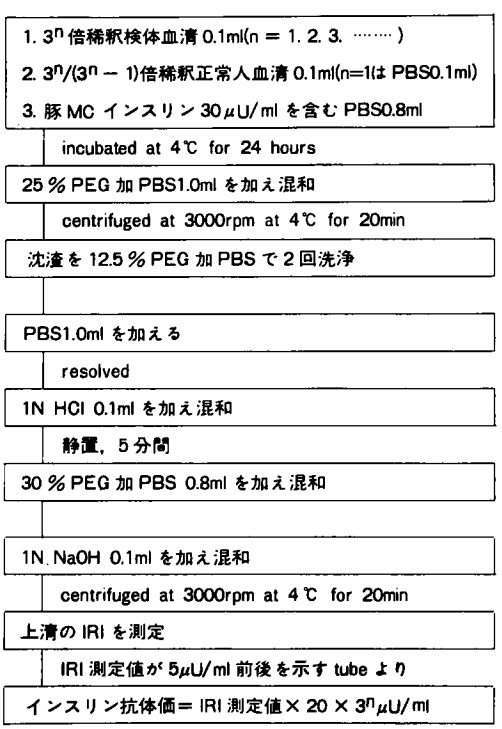

図1．測定操作

buffer saline（以下PBS）で3^n倍稀釈した検体血清0.1mℓに，$3^n/3^n-1$（n＝1，2，3，4，n＝0はPBSのみ）倍稀釈した正常人血清 0.1 mℓを加え，γ-globulin 量を大略一定とした．それに30μU/mℓの豚Monocomponent（以下MC）インスリンを含むPBS 0.8mℓを加え，4℃において24時間incubateした．つぎに，25% PEG加 PBS 1.0mℓを加え，混和後，4℃において3000 RPM，20分間遠沈し，インスリン—インスリン抗体結合体を含むγ-globulin分画を沈渣としてえた．この沈渣を12.5% PEG加PBSで2回洗浄した後，PBS 1.0mℓに溶解し，1NHCl 0.1mℓを加えpHを下げ5分間放置し，インスリンと抗体を解離させた．それに30% PEG加PBS 0.8mℓを加え，混和後，1NNaOH 0.1mℓにてpHを中性にもどし，4℃において3000RPM，20分間遠沈しγ-globulin分画を沈殿させた．そして，上清中のimmuno-reactive insulin（以下IRI）をPhadebas Insulin Kitを用いた一抗体法で測定した．インスリン抗体価は，測定値が5 μU/mℓ前後を示すtubeの測定値を20×3^n倍してμU/mℓで表わした．すべての操作は氷水中で行なった．

3．基礎的検討

1）incubation時間および温度の影響

インスリン抗体を含む血清0.1mℓに40μU／mℓの豚MCインスリンを含むPBS 0.9mℓを加え，37℃において1時間，2時間，3時間，6時間，4℃において6時間，12時間，24時間，48時間incubateした．つぎに，図1のschemaにしたがって，抗体と結合したインスリンを回収し測定した．その結果，図2に示すように結合インスリン量は4℃においては24時間でplateauに

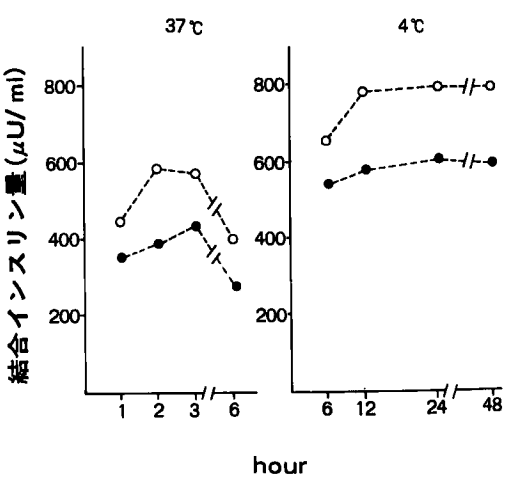

図2．incubation時間および温度の影響
症例H. A.：○……○
症例N. O.：●……●

達した．37℃においては2～3時間でpeakを示したが，4℃におけるより低値であった．このようにincubation温度を上げるとincubation時間を短縮できるが，インスリンのdegradationの影響を強く受けるため，以後の実験は4℃において24時間のincubationとした．

2）BとFの分離にPEGを用いた時のインスリンの共沈の影響と抗原として加えるインスリン量

PEGを用いたpeptide hormoneのBとFの分離に関して他の分離法と比較した場合，抗原あるいは抗体は免疫学的変化を受けないが，peptide hormoneの共沈が多く，共沈量はγ-globulin量に平行することが知られている[21),22)]．このため今回の検討では，インスリン抗体を含まない血清（γ-globulin 0.7 g/dℓ～2.5 g/dℓ）を用いて，インスリンの共沈量を検討した．すなわち，0 μU/mℓ，50μU/mℓ，100μU/mℓ，1000 μU/mℓ，100000μU/mℓのMCインスリンを含むPBSを各々0.8mℓ tubeに分け，それぞれに血清0.1mℓと^{125}I-insulin（5 μU/mℓ，200μCi/μg）0.1 mℓを加え混和した．それに25% PEG加PBS 1.0mℓを加え混和後，4℃において3000RPM，20分間遠沈し，沈渣を12.5% PEG加PBSで2回洗浄後，沈渣の%countを求めた．図3に示すように，γ-globulin量2.5 g/dℓの血清においても共沈量はインスリン量と無関係に5.5%以下であった．したがって，今回の実験におけるように抗原として加えるインスリン量を30μU/mℓとした場合，検体血清中の遊離インスリンを考慮してもIRI測定検体中の共沈によるインスリン量は1 μU/mℓ以下（感度以下）となる．一方，高抗体価血清の測定の場合には，抗体価が高いために，加えるインスリン量は30μU/mℓでは充分でなくなる．このため，検体を稀釈して用いる必要がある．検体血清を3^{n}倍稀釈した場合は，検体中のγ-globulin量が稀薄となるため，正常人血清を加えてγ-globulin量を補正し，IRI測定値が5 μU/mℓ前後となるようにする．すなわち，高抗体価血清ではすでに大量の結合インスリンを含有しており，低倍稀釈の検体ではincubation後においてB>F≒30μUとなり，抗原過剰の状態とならない．そのため，3^{n}倍稀釈した検体を並列して測定することにより，IRI測定値が5 μU/mℓ前後を示す稀釈倍率のtube，すなわちincubation後におけるB/Fが1/3程度の抗原過剰のtubeよりインスリン抗体価を求めた．

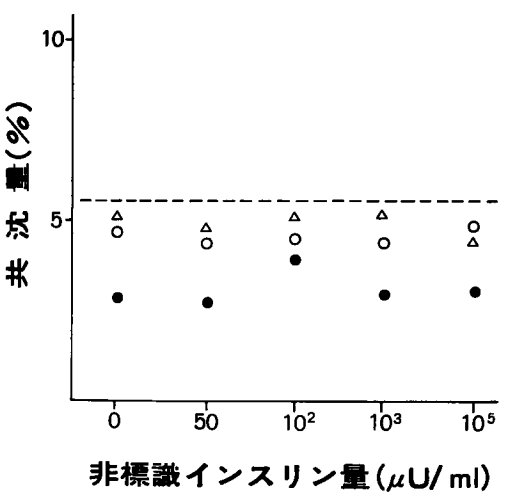

図3．PEGを用いたF/B分離における血清γ-globulin量および加えるインスリン量と共沈量
△：血清γ-globulin量2.5g/dℓ
○：〃　1.4 〃
●：〃　0.7 〃

3）解離のpH

i）インスリンの免疫学的活性の変化

氷水中において80μU/mℓ，120μU/mℓ，200μU/mℓのインスリンを含むPBSを0.8mℓづつ7本のtubeに分け，1本はPBS 0.2mℓ，他の6本は1 NHCl 0.1mℓを加えpHを1.68に下げ，それぞれ5分後，10分後，20分後，30分後，45分後，60分後に1 NNaOH 0.1mℓを加え中和して，インスリン値をIRIとして測定することにより，インスリンの免疫学的活性変化を検討した．図4に示すように，30分以内ではインスリンの免疫学的活性には変化が認められなかった．従って，今回の実験ではpH 1.68，5分間の処理とした．

ii）解離度

pH 1.68，5分間の処理におけるインスリン—インスリン抗体結合体の解離度を検討した．すなわち，インスリン抗体を含む血清0.1 mℓと^{125}I-insulin（5 μU/mℓ，200μCi/μg）0.9mℓと4℃，24時間incubateし，PEGを用いてBとFを分離し，Bのcountを求めた．さらに，B

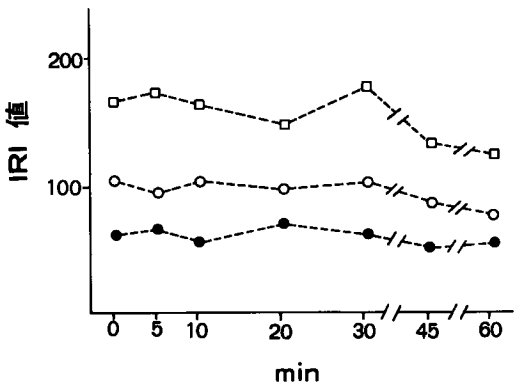

図4．インスリンのpH 1.68における免疫学的活性変化（氷水中）

をPBS 1.0mℓに溶解し，pHを1.68に下げ，5分後再びPEGを加えた後中和し，3000 RPM．20分間遠沈しγ-globulin分画を沈殿させ，上清のcountを求めた．そして，Bのcountに対する上清の%countを解離度とした．表1に示すように，平均92.3%の解離度であった。

表1．pH 1.68におけるインスリンの抗体からの解離度

症 例	total count	bound count	上 清 count	% count
S K	16890	6050	5530	91.2
S N	18670	10850	9850	90.8
K N	18920	7170	6540	91.2
K F	18190	3740	3550	94.9
N K	18960	7240	6710	92.7
I O	19140	10360	9180	88.6
H M	18920	9610	8920	92.8
K M	17660	6660	6450	96.8
S K	19470	4270	3970	93.0
S M	18480	5300	4800	90.6
平 均				92.3

4）IRI測定に及ぼすPEGの影響

IRI測定検体に12.5% PEGが含まれるので，PEGのIRI測定に及ぼす影響を検討した．IRI測定Kitの標準インスリンを通常のbufferと12.5% PEGを含むbufferで稀釈し，通常の標準カーブと12.5%PEGを含む標準カーブを作成した．図5に示すように，両カーブはほとんど一致し，12.5% PEGはIRI測定に影響しないことを確認した．

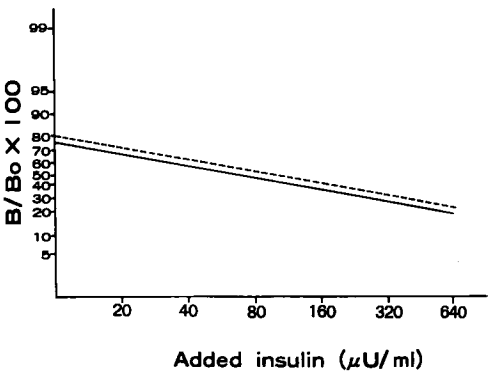

図5．IRI測定標準カーブ
PEG（+）：————
PEG（−）：----------

5）再現性

同一血清を日を変えて2回測定することにより，再現性を検討した．表2に示すように，Coefficient of variationは7.04%であった．

表2．再現性

症 例	1回 μU/ml	2回 μU/ml	co-efficient of variation(%)
S H	162	144	5.88
H M	198	222	5.71
U A	3780	3402	5.32
H M	1188	1566	13.73
M T	2700	3024	.5.66
S S	828	720	6.98
C K	80	102	12.09
H C	432	504	7.69
T N	＜20	＜20	0
S M	4320	3726	7.38
平 均			7.04

4．本測定法とWelborn法との比較

1）両者の相関

Welborn法は，従来のインスリン抗体測定法

のうち最も基本的なものである[13]．同一血清のインスリン抗体価を本測定法とWelborn 法で同時に測定し，比較した．対象は，岡山大学第三内科および関連病院を受診したインスリン使用歴3ヵ月以上の糖尿病患者25例で，年令は20才～81才，平均52.2才，男14例，女11例，インスリン使用量8U～160U/日および正常コントロール20例であった．Welborn法においては，uptake 5％以下を正常，uptake 5～15％をhypergammaglobulinemia等の影響を受ける範囲としてborderlineとしている．インスリン使用糖尿病患者25例のうち，Welborn法でuptake 15％以上であったもの16例（64％），5～15％であったもの9例(36％)，5％以下のもの0例（0％）であった．それに対して，本測定法では20μU/mℓ以上の抗体価を示したものは22例（88％）であった．Welborn法でuptake 5～15％であったものは本測定法では20μU/mℓ～860μU/mℓの範囲にあった．正常コントロール20例においては本測定法では全て20μU/mℓ以下であり，Welborn法では4.3％～9.7％であった．このように，低インスリン抗体価血清ならびに正常血清の一部がborderlineに含まれた．本測定法では2.5g/dℓのhypergammaglobulinemiaを示す血清でもそのために測定値が20μU/mℓを越えることはなく，Welborn法において5～15％のborderlineを設けざるを得なかった点より，低インスリン抗体価血清の測定においては本測定法が有利であった．つぎに，インスリン使用糖尿病患者25例について，横軸にWelborn 法での測定値，縦軸に本測定法での測定値をとり個々の例をプロットして図6に示した．両測定法は全体としては相関係数r＝0.846で有意（P＜0.001）の正の相関を示した．

2）両測定法で解離を示した症例の検討

本測定法で高値であるにもかかわらず，Welborn法では比較的低値をとるものを認め，図6中にAおよびBで示した．症例K．N．（図中A）と症例S．A．（図中B）につき中川らの方法[23]に従って血清中の遊離インスリンと結合インスリンの抽出を行なった．症例K．N．では遊離インスリン58.6μU/mℓ，結合インスリン4200μU/mℓ，症例S．A．では遊離インスリン7.6μU/mℓ，結合インスリン3600μU/mℓであり，両例とも結合インスリンは非常な高値を示した．このように，血清中に多量の結合インスリンを有する症例では，hot insulinのuptakeが結合インスリンによって阻害され，Welborn法では比較的低値をとるものと考えられ，本測定法の利点を確認した．

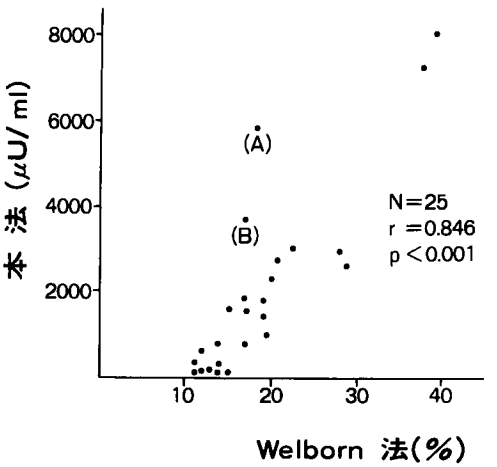

図6．同一血清の本測定法とWelborn法でのインスリン抗体価測定値の比較
A：症例K．N．
B：症例S．A．

考　　察

以上のように新しいインスリン抗体の測定法の原理，基礎的検討ならびに臨床応用について述べたが，前述したように従来のインスリン抗体測定法の2つの問題点を中心として，今回の測定法の利点について考察を加えてみたい．

まず，測定血清中の遊離ならびに結合インスリンの影響について述べる．Welborn法に代表される従来のインスリン抗体測定法は，hot insulinの抗体へのuptakeをみるものであるため，測定血清中の遊離ならびに結合インスリンが測定値に影響を与える．血清中のインスリン抗体とインスリンの反応はある定数で解離，結合している動的状態にあるとされている[24]．したがって，測定血清に加えられたhot insulin はしだいにインスリンーインスリン抗体結合体を形成している抗体とも結合していき，incubation時間を充分長時間とすれば，遊離型と結合型の

hot insulinのdistributionは一致する．症例K. N.においては，血清中の遊離インスリンは58.6μU/mℓ，結合インスリンは4200μU/mℓであり，結合インスリンは98.6%を占める．Welborn法では加えるhot insulinは血清1mℓあたり300μUであり，前述のようにhot insulinのdistributionが一致するまでincubateすれば，300μU総インスリン量が増加するための結合インスリンの増加がないと仮定しても，hot insulinの%uptakeは92.1%の近似値を示すと考えられる．しかし，実測値は17.6%である．したがって，従来のインスリン抗体測定法においては，インスリンのdegradationのためincubation時間には限度があり，血中に多量の結合インスリンを有する検体ではhot insulinのdistributionが平衡に達するまでの一過程をとらえていることになる．このため，検体中の結合インスリンにより，Welborn法でのインスリン抗体測定値すなわち%uptakeはみかけ上の低下を示す．また，症例K. N.においては，抗体からインスリンを解離し，血清中のすべてのインスリンを除去した後，300μUのhot insulinを加えるとすれば，incubation時の総インスリンが300μU/mℓと非常に減少するため抗体過剰の状態になり，uptakeは98.6%以上の値を示すと考えられる．以上のように，従来のインスリン抗体測定法においては，測定血清中の遊離インスリンはincubation時の総インスリンを増加させるため，結合インスリンはincubation時の総インスリンを増加させるため，および，hot insulinのdistributionが平衡に達するまでの一過程をとらえることになるため，みかけ上の%uptakeを低下させる．

測定検体中の遊離ならびに結合インスリンの影響を除外するため，Dixonは，血清にpH3.5の塩酸グリシン緩衝液を加え，抗体よりインスリンを解離させ，dextran coated charcoalでインスリンを吸着した後，hot insulinのuptakeをみる方法を報告した[9]．この方法では，酸性化によるインスリンと抗体の解離度および抗体の変性が問題となる．一般に，結合した抗原と抗体の解離はpHの低下に平行して進行する．Dixonは，インスリンとインスリン抗体の解離はpH3.5，5分間で90%，pH2.5，5分間で95%であったと報告している[17]．Dixonの方法では，酸性化による抗体の変性を考慮して，解離度を若干犠牲にしてpH3.5で処理しているが，pH3.5でも抗体の変性のため酸性下の反応時間により測定値にばらつきがみられ，多数検体の処理に問題があることが報告されている[18]．

本測定法では血清に過剰インスリンを加えincubateし結合したインスリン量を測定するため，血清中の遊離，結合インスリンは加えるインスリンの一部とみなすことができ，測定結果に影響を与えない．本測定法では，酸処理をincubation後に行なうため，抗体の変性は問題とならず，酸処理後インスリンをIRIとして測定するため，インスリンの免疫学的活性変化が問題となるが，pH1.68，30分間の処理でもインスリンの免疫学的活性変化はみられなかった．これらより，本測定法は，Dixonの方法と比較して，解離のpHをより下げうる点と酸性化の反応時間をbroadにとりうる点有利であった．

前述したように，本測定法での測定値はWelborn法での測定値と$r=0.846$と良い相関を示した．しかし，中には症例K. N.のように血清中に多量の結合インスリンを有する症例では，Welborn法では低値であるにもかかわらず本測定法では高値を示し，本測定法の利点を確認した．

つぎに，インスリンのヨード化による抗原性の変化について述べる．従来のインスリン抗体測定法においては，すべて放射性ヨード化インスリンの抗体への結合率をもとに算出されている．したがって，インスリンをヨード化することによる抗原性の変化が測定値に直接影響を与える．インスリンのヨード化による抗原性の変化には，インスリン分子にヨードを導入することによる変化とヨード化中の試薬との接触による変化の2面がある[25]．インスリン分子にヨードを導入することによる抗原性の変化については，Bersonら[26]，インスリン1分子あたりヨード1原子あるいは数原子までなら抗原性は増加し，多量のヨードを導入すると抗原性は消失することを報告している．また，ヨード化中の試薬との接触による変性インスリンはカラムその他

で除去されるが，すべての変性インスリンの除去は困難である．臨床においてインスリン抗体価の推移を観察する場合，従来の測定法においては，インスリン1分子あたりのヨード数ならびに変性インスリン含有率のそろった放射性ヨード化インスリンを使用する必要がある．このため，カラムを通してインスリン1分子あたり1原子のヨードのみが結合したインスリンを精製する方法が報告されている[27]が，精製後の時間の経過に伴ないインスリンは変性していく．したがって，従来，インスリン抗体価の経過について正確を期する場合，血清を保存しておき後で同時に測定する必要があった．

本測定法では，抗体とincubate するインスリンはnativeなものを使用し，測定操作中のインスリン測定にはヨード化インスリンを使用するが，標準カーブを作成するためヨード化によるインスリンの抗原性変化は結果に影響を与えない．そのため，Dixonの方法を含めた従来のインスリン抗体測定法よりインスリン抗体価の刻々の変化を知る必要のある時有利であると思われた．

結　　語

放射性ヨード化インスリンの結合率をみる方法によらず，incubationにはnative insulinを用い，測定血清中の遊離ならびに結合インスリンに影響されないインスリン抗体測定法を考案し，以下の結論を得た．

1．本測定法はWelborn法での測定値と比較してr＝0.846（P＜0.001）と良好な相関を示した．
2．Welborn法と比較して高感度であった．
3．測定血清中の結合インスリン値の高い症例ではWelborn法と比較してより高値の測定結果を得た．
4．血清を前処理するDixonの方法と比較して，酸処理を低いpHで行うことができ，反応時間もbroadにとりえた．
5．Dixonの方法を含めた従来の測定法と比較して，incubationに放射性ヨード化インスリンを用いないため，特に同一症例の抗体価の経過観察に有利と考えられた．

以上のように，今回著者が考案した新しい抗インスリン抗体の測定法は，従来の測定法よりも，原理的にも，実際的にも優れており，臨床的利用に極めて有用な測定法であると思われた．

稿を終えるにのぞみ，終始御指導を賜わり，かつ御校閲をいただきました恩師大藤眞教授に深謝するとともに，日夜御指導御鞭韃をいただいた河西浩一講師，資料提供に御協力いただいた関係諸氏に厚くお礼申し上げます．

（本論文の要旨は，第21回日本糖尿病学会総会において発表した．）

文　　献

1．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.
2．Moloney, P.J. and Coval, M.: Antigenicity of insulin. Diabetes induced by specific antibodies. *Biochem. J.* **59**, 179—185, 1955.
3．Karam, J.H., Grodsky, G.M. and Forsham, P.H.: Insulin-resistant diabetes with autoantibodies induced by exogenous insulin. Successful treatment by insulin withdrawal. *Diabetes* **18**, 445—454, 1969.
4．Frikkr, M.J., Gingerich, R.L., Stranahan, P.D., Carter, G., Bauman, A.K., Greider, M.H., Wright, P.H. and Lacy, P.E.: Distribution of injected insulin and insulin-antibody complex in normal and insulin-immunized animals. *Diabetologia* **10**, 345—351, 1974.
5．中川昌一：インスリン抗体．糖尿病の進歩，第4集．診断と治療社．東京，pp.51—55, 1970.

6. Danidson, J.K. and Debra, D.W.: Immunologic insulin resistance. *Diabetes* **27**, 307—318, 1978.
7. Blumenthal, H.T., Alex, M. and Goldenberg, S.: A non-atheromatous proliferative vascular lesion of the retina in diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **31**, 382—396, 1961.
8. 平田幸正：インスリン抗体．その他糖尿病性腎症の病因に関連して．糖尿病 **8**, 162—168, 1965.
9. Dixon, K., Exton, P.D. and Huhes, H.R.: Insulin antibodies in aetiology of labile diabetes. *Lancet* **1**, 343—347, 1972.
10. Engelbring, N.H. and Arkins, J.A.: Insulin allergy and insulin resistance. *J. Allergy* **33**, 62—68, 1962.
11. Wasserman, P. and Mirsky, I.A.: Immunological identity of insulin from various species. *Endocrinology* **31**, 115—118, 1942.
12. 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.
13. Welborn, T.A., Richards, R. and Fraser, T.R.: Simple test for insulin antibodies in sera, using ^{131}I-insulin and ethanol precipitation. *Br. Med. J.* **1**, 719—722, 1967.
14. 中川昌一：インスリン抗体測定法．*Diabetes J.* **4**, 39—41, 1976.
15. Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W. and Bleicher, S.J.: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 1375—1384, 1965.
16. Skom, J.H. and Talmage, D.W.: Nonprecipitating insulin antibody. *J. Clin. Invest.* **37**, 783—786, 1958.
17. Dixon, K.: Measurement of antibodies to insulin in serum. *Clin. Chem.* **20**. 1275—1281, 1974.
18. 工藤幹彦，北原明夫，豊田隆謙：2抗体法による血清インスリン結合抗体価定量．糖尿病 **19**,672—679, 1976.
19. Kitagawa, M., Onoue, K., Okumura, Y., Arai, Y. and Yamamura, Y.: Immunological studies of insulin II. *J. Biochem.* **48**, 483—489, 1960.
20. 八木：抗原—抗体反応の化学．蛋白質．核酸．酵素 **2**, 1422—1428, 1966.
21. Polson, A., Potgieter, G.M., Largier, J.F., Mears, G.E.F. and Jouhert, F.J.: The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 463—475, 1964.
22. Desbuquois, B. and Aurbach, G.D.: Use of polyethyleneglycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 732—738, 1971.
23. 中川昌一，中山秀隆，佐々木蕎，芳野宏一，千 君英，篠崎堅次郎，青木 伸，真下啓明：インスリン治療患者の血中遊離インスリン定量法．PEG抽出法．糖尿病 **15**, 403—408, 1972.
24. 中山秀隆：インスリン抗体．総合臨床 **27**, 1519—1524, 1978.
25. 小坂樹徳，細谷憲政，織田敏次：糖尿病研究．医学書院．東京, pp. 40—48, 1970.
26. Berson, S.A. and Yalow, R.S.: Insulin in blood and insulin antibodies. *Am. J. Med.* **40**, 676—690, 1966.
27. Freychet P., Roth, J. and Neville, D.M.Jr.: Monoiodoinsulin. Demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 400—408, 1971.

Clinical Studies on Insulin Antibodies

Part I. A New Method for Quantitative Determination of Insulin Antibodies

Fumito YAGYU

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. T. Ofuji)

A new method is described for quantitative determination of insulin antibodies. In this method, the insulin binding capacity of non-iodinated insulin is determined. Diluted serum containing insulin antibodies was saturated by native insulin. Bound insulin in the incubated serum was fractionated by polyethyleneglycol(PEG). After the precipitated bound insulin was acidified, insulin antibodies were separated by PEG again and immunoreactive insulin in the supernatant was measured. The titer of insulin antibodies is expressed as microunits of insulin antibodies per milliliter of serum. The determination is not influenced by free or antibody bound serum insulin. The co-efficient of variation of insulin antibody titers was 7.04%. There was a significant correlation ($r=0.846$, $p<0.001$) in serum antibody titers between our method and that of Welborn, but more sensitive results were obtained by our procedure. In patients with high bound insulin titers, reasonably accurate determinations were demonstrated. Acidification of samples was able to be performed at lower pH and longer reaction time was available. Another advantage of this method is that the changes in the titer of insulin antibodies in individual patients can be followed accurately, because in other methods identical purity of hot insulin is not always available for each test. The diagnostic tool provided by this new method proved useful for diabetic patients being treated with insulin.