estrogen administration to the castrated rats induces remarkable decrease in number and progesterone cannot give an influence upon them. A decided conclusion was not able to be drawn as to the glycogen content (identified by PAS reaction) in the epithelial cells following the estrogen and progesterone administrations. It was probable, however, that the action of progesterone to the precipitation of fat granules is superior in degree to that of estrogen.

A Study for the Binding of Corticoids with Plasma Protein and its Clinical Significance

By

Nozomu TAKEUCHI

The 3rd department of Internal Medicine, Osaka Univ. (Director : Prof. Dr. I. Donomae)

The binding of corticoids with plasma protein was studied with the methods of dialysis equilibrium, paper electrophoresis, ultraviolet absorption and deproteinization, and the significance of its binding was discussed from the clinical view point.

The results obtained are as follows :

- 1) Plasma free 17-hydroxycorticosteroids bind almost with plasma protein, chiefly α -globulin and albumin, physiologically. But conjugated 17-hydroxycorticosteroids bind at the lower rate. At the high concentration of corticoids in plasma after the administration of cortisol in vivo or in vitro, the binding ratio decreased remarkably.
- 2) The protein binding of corticoids is very loose and easily affected by alterations of medium pH, corticoid concentration and presence of organic solvents.
- 3) The corticoids dissociated from the binding with protein have the biological activity.
- 4) Protein bound corticoids seem to be protected from the degradation in the liver.
- 5) It may be explained by the protein binding of corticoids that the renal clearance rate of free corticoids is very low.
- 6) The binding state is considered as "corticoid pool" which keep off the degradation of corticoids in the liver and the excretion from the kidney.

Studies on Insulin Antibody

By

**Masaharu HORINO, Yukimasa HIRATA, Takeshi SATO, Mitsuo ITO,
Hidetaka SHIROUZU and Norimasa MAKINO**

Second Department of Internal Medicine (Director : Professor Shibanosuke Katsuki),
Faculty of Medicine, Kyushu University

The insulin antibody produced in guinea pigs by injecting insulin with Freund adjuvant apparently has no effect on the endogenous insulin of the guinea pig. However, when the plasma containing

the antibody was injected to animals other than guinea pig, it seems to suppress the action of insulin of the animal received the immune plasma. The immune plasma prevents the initial hypoglycemia which is considered to be ascribable to the release of insulin by β -cell destruction produced by alloxan. The gamma-globulin fraction of the immune plasma was found to be increased, and the plasma reacts with insulin by precipitation. Glucokinase and glucose-6-phosphatase activities of the tissue-homogenate were not affected by the immune plasma.

On the Insulin Metabolism with Insulin-I¹³¹

By

Ryohei YOSHIOKA

Department of Pathology, Kyoto Prof. Med. College (Director : Prof. M. Araki M.D.)

The distribution of labeled insulin in vivo has been studied (13) (14) (15). I have studied the distribution and the metabolism of I¹³¹ labeled insulin in rats treated with alloxan and other factors which disturb the mechanism of carbohydrate metabolism, and further intraorganic distribution of labeled insulin according to microautoradiograph of kidney and liver.

Methods : Radioactivity was counted with G.M. tube. I¹³¹ labeled insulin was prepared with partly modified Pressman's method (5). The biological activity of labeled insulin appeared to be not so low (Table 1). Labeled insulin of 80 μ C per 4 units was injected intravenously into rats, and after 20 minutes rats were sacrificed. Specimens of kidney and liver were fixed with 10% formol, and embedded within carbowax. The slide was covered with the emulsion of Ilford G-5 stripping type, and exposed 30 days under 2°C. In these treatments, γ -ray activities of specimens were lost (Table 2, 3). The image of these microautoradiographs showed the localization of protein binding I¹³¹, i.e. insulin I¹³¹ (14).

Result : 1) The blood level of the control rat injected 80 μ C of inorganic carrier free I¹³¹ showed equally to the level of other rats administrated with labeled insulin (Table 7.) Uptake of the kidney of this rat was 0.75% : this was equivalent to 1/10-1/20 of that of rats injected with labeled insulin (Table 8). Uptake of the liver was also very small, but that of the lung, pancreas and muscle were equally to that of the rats injected with labeled insulin. In addition the thyroid gland showed uptake of 4%, but scarcely could the thyroid injected with labeled insulin take up.

2) The distribution of the kidney of alloxan diabetes rats was very small (Table 9, 10). On the contrary the uptake of liver and muscle were increased. If arranged according to value of blood sugar, it decreased the uptake of these kidneys with significant difference. The relative activity of small intestine of alloxan diabetes rats greatly decreased after contents were washed out. The uptake of the kidney of phloridin diabetes rat showed 34.3%, i.e. highest level of this experimental series (Table 11, 12). Administration of D860 increased the uptake of liver twice of the control rat, whose liver had been damaged histologically to the situation of desmolyse. In the insulin loaded rat γ -ray activities distributed to the liver 15.7%, to the kidney 9.9% : and liver and muscle showed high level as that of the control rat. On the contrary the uptake of liver injected with cortisone remained to 1/3 of that of the control liver, but distributed a larger amount to the intestine.

3) Autoradiograph of the kidney of rats injected with labeled insulin were well imaged, and no significant differences were noticed between various treatments. A few grains were localized on the

Insulin Antibody に関する 2, 3 の実験的研究

九州大学医学部勝木内科 (主任 勝木教授)

堀野 正治, 平田 幸正, 佐藤 猛
伊東 三夫, 白水 英高, 牧野 典正

I 緒 言

insulin 抵抗性は大別すれば, 体液性及び神経性の両者に分けられる. 体液性の原因の 1 つとして重要なものは, insulin antibody によるものであつて, 今回この insulin antibody に関する 2, 3 の実験を試みた.

II Insulin Antibody の産生

Lewis et al.¹⁾ は海狸に結核菌或はその死菌を投与すると, 種々の antigen に対して感受性が増強することを報じた. 又 Dienes et al.²⁾ 或は Freud³⁾ も同様なことを報告した. 更に Freund et al.⁴⁾ は結核菌, ラノリン, パラフィン油等を用いて, 海狸の感作を行つた. Lewis⁵⁾ は牛或は豚の insulin で海狸を感作し, その子宮の小片が牛や豚の insulin に応じて収縮するのを観察した. Bernstein et al.⁶⁾ は insulin で感作した海狸に insulin を投与すると, anaphylactic shock の起ることを報告した. Lowell⁷⁾ は insulin に抵抗性を有し, insulin を投与すると allergy 反応を示す患者の血清中に, 結晶性 insulin に対する 2 つの antibody が存在することを証明した. Landsteiner et al.⁸⁾ は Freund の adjuvant に人型結核菌 (死菌) 及び picrylchloride を投与し, picrylchloride に対する感作を行つた. Freund et al.⁹⁾ は eucerin に馬血清を加え, 更に結核菌 (死菌) を含むパラフィン油を混じて, 馬血清に対する感作を行い, この時加えたラノリン様物質が木質的ではなからうかと説いた. Wasserman et al.¹⁰⁾ は海狸を insulin で感作し, 感作に使つたのと異なる insulin で, anaphylactic shock が起ることを確めた. Rausch-Stroomann et al.¹¹⁾ は insulin adjuvant complex を用いて, 家兎に insulin 抵抗性を生ぜしめた. 最近 Moloney et al.¹²⁾ は Freund の adjuvant に insulin を加え, これを安定した water-in-oil emulsion の型で皮下注射し, 4 週間後再び同じ antigen を投与して, 海狸の血清中に強力な insulin neutralizing antibody を得, この血清を連続的に mouse に投与して, その血糖の上昇と尿中への acetone 体の排泄を認めた. 更に九大医化学山村教授¹³⁾ はこの Freund の adjuvant に結核菌を加え, antibody 産生に優れた成績をあげた. 私共の antibody 作成方法はこの山村教授の御教示によつたものである. この insulin adjuvant complex の 1 回の注射のみによつても, 海狸の血漿中に insulin antibody を認めるものもあつたが, 充分な強さの antibody 産生を得る為には, 更に 1~2 回の insulin adjuvant complex の注射を要した.

III 実験結果

(1) 免疫海狸の血糖値

Moloney et al. は免疫海狸の血糖値は正常値を示すと説いたが, 私共の実験でも免疫海狸の血糖値は略々正常値を示した (第 1 表).

(2) Insulin と免疫血漿との混合注射

正規 insulin (iszilin) と免疫海狸の血漿とを混じて家兎に静注した結果は, 第 1 表に示す如くである. 即ち 1 回免疫の血漿では insulin の血糖降下作用が可成り認められるが, 2 回免疫後の血漿は insulin の血糖降下作用を抑制したものが多かつた (第 1 表).

(3) 免疫血漿の家兎血糖に及ぼす影響

第1表 免疫血漿に Insulin を混じて家兎に静注せる場合

	海 豚		家兎に対する注射		家兎の血糖値の変化(mg/dl)											
	番 号	血糖値	plasma	insulin	V ₁	V ₂	10	20	30	40	50	60	90	120分		
I	No. 1	116	1 cc	0.5u	104	107	79	76	88	92	100	102	106	114		
	No. 2	95	//	//	98	99	102	78	69	76	82	81	85	91		
	No. 3	106	//	//	109	111	104	69	70	85	75	89	93	104		
	No. 4	115	//	//	112	103	101	81	77	87	96	101	110	112		
	No. 8	126	//	//	104	110	89	71	65	89	96	103	105	113		
II	No. 1	99	1 cc	0.5u	103	102	103	93	73	72	81	85	101	109		
	No. 2	112	//	//	106	104	107	107	113	125	125	137	145	152		
	No. 3	108	//	//	114	113	107	102	102	108	122	141	144	148		
	No. 4	90	//	//	104	107	126	134	130	126	125	126	114	117		
	No. 8	134	//	//	99	99	80	81	95	99	96	113	131	130		
control	No. 10	94	1 cc	0.5u	100	103	69	55	50	68	63	69	92	104		
	No. 11	118	//	//	110	110	94	74	60	69	71	71	100	107		
	No. 12	86	//	//	113	110	84	57	58	66	75	76	94	105		
	No. 13	123	//	//	99	103	86	66	49	58	66	72	91	105		
	No. 14	110	//	//	98	97	89	77	63	66	79	72	81	99		

I : 第 I 回の insulin adjuvant 注射後 1 ヶ月目 (血糖値は Hagedorn-Jensen 法による)

II : 第 II 回の //

免疫海豚の血漿を0.5cc 或は 1 cc 家兎に静注した場合、家兎の血糖値は明らかな上昇を示した。然し未処置の海豚の血漿は、家兎の血糖に殆ど影響を与えなかつた (第 2 表)。

第2表 免疫血漿を家兎に静注せる場合

海豚の番号	plasma の注射量	家兎の血糖値の変化 (mg/dl)													
		V ₁	V ₂	10	20	30	40	50	60	90	120	150	180	210	240分
No. 1	1 cc	106	101	98	103	109	119	121	122	139	142	146	139	127	118
//	0.5cc	101	98	124	137	144	144	143	138	133	103	94	93	89	93
No. 2	//	107	106	132	157	179	181	190	195	189	192	174	129	112	108
No. 4	1 cc	100	98	128	140	151	153	147	138	126	120	101	100	96	91
No. 9	//	104	101	152	186	204	226	233	240	255	240	230	202	165	123
control	1 cc	103	101	103	98	95	94	93	96	92	96	99	98	99	97
	//	117	118	124	126	125	124	119	117	114	114	118	116	114	115
	//	99	97	94	101	104	99	106	105	99	101	106	105	104	110

(4) 免疫血漿の Dithizone 糖尿病家兎の血糖に及ぼす影響

dithizone により糖尿病を発症せしめた家兎の血糖値も、免疫血漿の静注により明らかな上昇を示した (第 3 表)。

(5) Insulin と免疫血漿との沈降反応

寒天層内沈降反応として、寒天の層を隔てて insulin と寒天の層及び免疫血漿と寒天の層を接触せしめた

第3表 Dithizone 糖尿病家兎に疫血漿を静注せる場合

海狼の番号	plasma の注射量	家兎の血糖値の変化 (mg/dl)													
		V ₁	V ₂	10	20	30	40	50	60	90	120	150	180	210	240分
No. 1	0.5cc	342	348	350	354	354	370	366	376	386	372	372	390	376	370
No. 2	0.3 //	355	354	368	372	380	382	394	394	388	398	398	396	388	390
No. 3	0.5 //	424	420	424	426	434	430	420	434	486	466	462	472	466	455
No. 4	0.3 //	346	338	378	388	402	410	428	410	419	432	426	426	422	402
control	0.5 //	203	202	203	202	196	202	198	200	192	188	192	188	192	186
	// //	400	402	402	412	402	386	392	400	394	392	396	392	392	398

ところ, 寒天のみの中間層に明らかな白い ring の形成されるのを認めた. 又この沈降反応を起す強さと insulin neutralizing activity との間には相関関係はない様であつた.

(6) 疫血漿中の γ -Globulin

Sehon¹⁴⁾ は insulin neutralizing antibody は γ -globulin にありと報じ, Solomon¹⁵⁾ は insulin 治療中の患者の γ -globulin 中には, 恐らく insulin antibody が存在すると説いた. 私共は疫海狼の血漿を, 濾紙電気泳動法により分離したが, control 群に比較して γ -globulin の増加が認められた (第4表).

(7) 疫血漿による Alloxan 低血糖の防止

alloxan を家兎に静注すれば, 著明な低血糖が発現し, 頻回の glucose の注射が必要となる. この低血糖の成因としては, Langerhans 島の insulin が放出されることによると広く考えられている. この低血糖に対して疫血漿の大量を注射したところ, 血糖の上昇を来たして, glucose の注射を要せず糖尿病期に移行した. 尚この alloxan 糖尿病に於ける実験は, 白水が詳細な報告を行う予定である.

(8) 組織粥の Glucokinase 及び Glucose-6-Phosphatase 活性に及ぼす影響

疫血漿を家兎腎組織粥に加えて, 組織中の glucokinase 活性に及ぼす影響を検したが, control 群との間に差は認められなかつた. 又白鼠腎組織粥中 glucose-6-phosphatase 活性にも影響を及ぼさなかつた.

第4表 疫海狼の血漿蛋白内

海狼の番号	AI %	$\alpha + \beta$ %	γ %
No. 1	41.9	23.3	34.8
No. 2	45.9	22.2	31.9
No. 6	43.9	25.0	31.1
No. 8	41.2	28.9	29.9
No. 9	40.8	29.5	29.7
control	51.2	31.2	17.1
	50.6	28.3	21.1
	49.7	31.4	18.7
	53.1	33.6	13.3
	51.5	30.8	17.7

IV 考按並に結語

上述の insulin antibody に関する実験は何れも今後の検討を要するものであるが, これ迄の成績は次の如きものである. (1) 海狼に Freund の adjuvant と共に insulin を与える時は, insulin antibody を産生するが, この antibody はそれ自身の endogenous insulin には作用しないと考えられる. (2) この疫血漿を他種の動物(海狼以外の)に注射すると, その動物の insulin を抑制することによってと思われる過血糖を招来する. (3) 家兎の insulin の放出によって考えられる alloxan 低血糖をこの疫血漿は防止する. (4) 疫血漿の γ -globulin は増加しており, 又疫血漿と insulin は沈降反応を示す. (5) 組織粥の glucokinase 及び glucose-6-phosphatase 活性には影響を及ぼさなかつた.

insulin antibody の産生は山村氏法に従つた, 御教示を戴いた山村雄一教授に深謝します.

(尚, 本報告の要旨は第31回日本内分泌学会総会に於いて堀野の発表したものである)

文 献

- 1) Lewis, P.A. a. Loomis, D. : J. Exp. Med. 40 : 503, 1924. Lewis, P.A. a. Loomis, D. : J. Exp. Med. 41 : 327, 1925. Lewis, P.A. a. Loomis, D. : J. Exp. Med. 43 : 263, 1926. 2) Dienes, L. a. Schoenheit, E.W. : J. Immunol. 19 : 41, 1930. Dienes, L. : J. Immunol. 28 : 105, 1935. 3) Frenud, J. : J. Exp. Med. 60 : 669, 1934. 4) Freund, J. Casals-Ariet, J. a. Horsmer, E.P. : Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. 37 : 509, 1937. 5) Lewis, J.H. : J. Amer. Med. Ass. 108 : 1336, 1937. 6) Bernstein, C. Kirsner, J.B. a. Turner, W.J. : J. Lab. clin. Med. 23 : 938, 1938. 7) Lowell, F.C. : Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. 50 : 167, 1940. 8) Landsteiner, K. a. Chase, M.W. : J. Exp. Med. 71 : 237, 1940. 9) Freund, J. a. McDermott, K. : Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. 49 : 548, 1942. 10) Wasserman, P. a. Mirsk, I.A. : Endocrinology 31 : 115, 1942. 11) Rausch-Stroomann, J.G. u. Sauer, H. : Klin. Wschr. 31 : 551, 1953. 12) Moloney, P.J. a. Coval, M. : Bioch. J. 59 : 179, 1955. 13) U. Yamamura et al. : J. Biochem. 45 : 947, 1958. 14) Sehon, A.H. et al. : J. Lab. clin. Med. 45 : 765, 1955. 15) Solomon, A.B. : J. clin. Invest. 35 : 170, 1956.