Studies on the Serum Insulin in Diabetics by Three Methods

Taiso SHINDO

The 1st Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine,
Kyoto, Japan (Director : Professor Hideo Yoshida, M.D.)

Several methods have been used for the assay of insulin in human serum. The bioassay methods most commonly used utilize the insulin sensitivity of the glucose uptake by isolated rat diaphragm, or the oxidation of glucose by the isolated rat epididymal fat pad. More recently, immunochemical techniques have been widely used, which depend on competition between serum insulin and I^{131} -insulin for a limited amount of guinea-pig anti-insulin antibody. There are considerable differences in the results between bioassay and radioimmunoassay. Furthermore, these results have different significances. Pathogenesis of diabetes mellitus was studied by determination of serum insulin concentration in normal and untreated diabetic subjects before and after glucose loading. Serum insulin concentrations were determined using the rat diaphragm assay (DILA), the rat epididymal fat pad assay (FILA) and the radioimmunoassay technique (IRI) for the same serum samples and at the same time. Twenty-three subjects with no known diabetic heredity served as controls. All of them had normal glucose tolerance. Forth-five patients with diabetes mellitus except Kimmelsties-Wilson's syndrome had never received insulin or oral hypoglycemic agents. They were classified according to fasting blood sugar levels as either severe diabetic group with that above 200 mg/dl or mild diabetic group with that below 199 mg/dl. Ten chemical diabetics were contained in mild diabetic group. Mean fasting levels of DILA, FILA and IRI in normal subjects were $310 \pm 50 \mu\text{u/ml}$, $399 \pm 148 \mu\text{u/ml}$ and $21.3 \pm 7.3 \mu\text{u/ml}$; in mild diabetic group $203 \pm 74 \mu\text{u/ml}$, $531 \pm 92 \mu\text{u/ml}$ and $32.8 \pm 9.6 \mu\text{u/ml}$; in severe diabetic group $100 \pm 22 \mu\text{u/ml}$, $276 \pm 45 \mu\text{u/ml}$ and $9.3 \pm 1.9 \mu\text{u/ml}$, respectively. These observations indicate that fasting DILA levels are lowered in both diabetic groups, and fasting FILA and IRI levels are elevated in the mild diabetic group. But both FILA and IRI in severe diabetic group were lowered. Blood sugar, DILA, FILA and IRI were measured in serum obtained from normal and diabetic subjects in the fasting state, and thirty, sixty, ninety and one hundred and twenty minutes following 50 g oral glucose loading. In normal subjects, DILA, FILA and IRI rose briskly, reaching a peak within thirty to sixty minutes, and then declined gradually. Its mean peak levels of DILA, FILA and IRI were $673 \pm 114 \mu\text{u/ml}$, $821 \pm 168 \mu\text{u/ml}$ and $78.0 \pm 13.2 \mu\text{u/ml}$, respectively. In the mild diabetic group, the initial FILA was definitely delayed but its concentrations continued to rise for ninety minutes, eventually reaching average levels of FILA considerably higher than that achieved at any time in normal subjects, and the initial IRI was definitely delayed to ninety minutes. The mean peak levels of FILA and IRI were $1402 \pm 166 \mu\text{u/ml}$ and $79.6 \pm 14.8 \mu\text{u/ml}$ at ninety minutes after glucose loading. However, peak responses

of DILA in mild and severe diabetic groups to glucose loading were lowered and that in the severe diabetic group were more delayed than in normal subjects. Peak levels of DILA in mild and severe diabetic groups were $373 \pm 96 \mu\text{u/ml}$ and $181 \pm 40 \mu\text{u/ml}$ respectively. Peak responses of FILA and IRI in the severe diabetic group were more lowered and more delayed than in normal subjects. Mean peak levels of FILA and IRI in the severe diabetic group were $371 \pm 242 \mu\text{u/ml}$ and $17.7 \pm 8.0 \mu\text{u/ml}$ at ninety minutes after glucose loading.

The pattern of insulin response of chemical diabetes was very similar to that of the mild diabetic group. The observation shows diminished insulin effect to muscle tissues and suggests the possibility that the serum of mild diabetic subjects contains a large amount of ineffective insulin to muscle tissue but of effective insulin to fat tissue.

Therefore, the possibility that DILA inhibitor and FILA activator in mild diabetic subjects were the meaningful factors was suggested.

It was suggested that pancreatic insulin stores were decreased in severe diabetic subjects and that severe diabetic subjects might secrete less insulin shortly after glucose loading than normal subjects. Mean fasting levels of DILA, FILA and IRI in mild cases of juvenile diabetic subjects were $180 \pm 123 \mu\text{u/ml}$, $590 \pm 68 \mu\text{u/ml}$ and $37.0 \pm 2.6 \mu\text{u/ml}$, and those of DILA, FILA and IRI in severe cases of them were $93 \pm 7 \mu\text{u/ml}$, $275 \pm 22 \mu\text{u/ml}$ and $9.5 \pm 1.7 \mu\text{u/ml}$, respectively.

Peak responses of DILA in mild and severe cases of juvenile diabetic subjects were lowered and those in severe cases only were delayed more than in normal subjects. Mean peak level of DILA in mild cases was $415 \pm 141 \mu\text{u/ml}$ and that in severe cases was $169 \pm 23 \mu\text{u/ml}$ at ninety minutes after glucose loading. Peak responses of FILA and IRI in mild cases were delayed and those of FILA were elevated. Mean peak levels of FILA and IRI were $1550 \pm 166 \mu\text{u/ml}$ and $95.0 \pm 9.5 \mu\text{u/ml}$ at ninety minutes after glucose loading. Peak responses of FILA and IRI in severe cases were lowered and delayed, and the levels of FILA and IRI were $399 \pm 101 \mu\text{u/ml}$ and $21.0 \pm 6.4 \mu\text{u/ml}$ at ninety to one hundred and twenty minutes. These findings were obtained in Kimmelstiel-Wilson's syndrome. Therefore, the characteristic pattern of serum insulin response was not obtained in juvenile diabetic subjects and Kimmelstiel-Wilson's syndrome. (pp. 552~564)

三測定法による糖尿病患者の血中 Insulin 動態

京都府立医科大学第一内科学教室 (指導: 吉田秀雄教授)

進 藤 岱 三

(昭和43年1月30日受付)

糖尿病の病態を解明する方法として、今日横隔膜法、副睪丸脂肪組織法及び免疫学的測定法の3つの測定方法を用いて同一血清中の insulin を測定する必要がある。そこで、これら3つの方法を用いて糖尿病患者の血中 insulin 動態を研究した。ブドー糖負荷前後の ILA 及び IRI は糖尿病の重症度により特異的な変動を示し、DILA-inhibitor が本症発病に重要な因子であると考えられる。

緒 言

糖尿病は、体内に於ける insulin の絶対的或は相対的欠乏に基因する代謝疾患であると定義されている。従つて、血中 insulin の測定が、糖尿病の病態解明の為に極めて重要な意義を持つている。1938年、Hemmingsen ら¹⁾は insulin の血糖下降作用に基いて、血中 insulin を測定しようとする in vivo bioassay を発表した。この方法は、その後 Anderson²⁾ 或いは、Bornstein³⁾ らにより改良されたけれども、感度が不充分である事、手技の煩雑さ、動物の死亡率の高い事等から広く用いられるには至らなかった。1940年、Gemmill⁴⁾は、ラットの剔出横隔膜のブドー糖摂取能、或いは、糖原合成能が in vitro で添加された insulin により著しく促進される事を報告した。それ以来、多くの研究者が、この方法を改良して血中 insulin を測定している⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。

1950年 Renold ら⁹⁾は、脂肪組織が活発な代謝を営んでいる事に注目し、insulin が in vitro でラットの剔出副睪丸脂肪組織のブドー糖摂取能を著しく亢進させることを確め、この事実を利用して血中 insulin を測定した。

更に、現在最も insulin に特異的であると考えられている免疫学的測定法が、1960年、Berson 及び Yalow¹⁰⁾により報告された。それ以後、免疫学的測定法を用いて多くの報告がある。

従つて、今日用いられている主な血中 insulin の測定法には、生物学的測定法、即ち、ラット剔出横隔膜法とラット剔出副睪丸脂肪組織法、及び免疫学的測定法の3つの方法がある。これら3つの方法も各々一長一短があり、生物学的測定法ではその測定されたものは insulin 様活性 (以下 ILA と略す) という言葉で表わされている如く、insulin それ自身の作用結果だけではなく、血清又は血漿中に含まれるその他の物質の有する生物学的効果の集約であると考えなければならない。一方、免疫学的測定法についても、抗原性を有するが、生物学的には非活性の insulin をも含めて測定されているのではないかという疑問がある¹¹⁾¹²⁾。それ故に、前述の3つの方法の内一つ又は2つの方法を用いて糖尿病の病態を論ずる事は危険である。亦、同時に1法又は2法による沢山の報告を比較検討する場合にも、研究対象及び同じ測定法であつても、用いる指標が異なる為に、糖尿病の研究の大きな障害になつている。免疫学的測定法で測定されたものが、全て生物学的活性を有するか否かは不明であり、生物学的測定法によるものが insulin 特異性という点で免疫学的測定法に比べて少ないことから insulin そのものの動きを反映しているともいい難い。そこで、ラット剔出横隔膜法、ラット剔出副睪丸脂肪組織法及び免疫学的測定法の3つの方法により、同一症例について、同時に血中 insulin を測定する事が、糖尿病の病態解明への近道であり、亦、ぜひ必要である。

著者は、glucose uptake を指標としたラット剔出横隔膜法⁵⁾⁶⁾、Glucose-1-¹⁴C から ¹⁴CO₂ 産生を指標としたラット剔出副睪丸脂肪組織法¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、及び dextran-coated charcoal を用いた免疫学的測定法¹⁶⁾¹⁷⁾の3つの血中 insulin 測定法で同一血清を同時に測定して、血中 insulin の面より糖尿病の病態を解明しようと試みた。

対象及び試験方法

1. 対 象

A) 正常対象群

正常対象群としては、当内科入院中の糖尿病の遺伝的素因のない、Broca's index $\pm 10\%$ 以内のブドー糖負荷試験正常の年令15才から66才の男10例、女13例、計23例を選んだ。

B) 糖尿病患者群

ブドー糖負荷試験で糖尿病と診断された、未治療の主として入院中の患者で、年令16才から68才迄の男30例、女20例、計50例を選んだ。本群の年令構成と正常対象群のそれとは殆んど同じであつた。これら50例を空腹時血糖値に基いて軽症群と重症群に分け、発病年令より若年性糖尿病患者群について、亦、特殊な病型として Kimmelstiel-Wilson、症候群についても観察した。

i) 軽症群

空腹時血糖値による重症度の判定は、140mg/dl 以下のものを軽症、199mg/dl 以下のものを中等症とするものが普通の様であるが本研究では、血中 insulin の変動に主眼を置いた為、空腹時血糖値199mg/dl 以下のものを軽症とした。年令は、19才から65才迄の男19例女14例、計33例であつた。この中には、空腹時血糖が正常範囲にあり、臨床症状のない chemical diabetes が、男8例、女6例、計13例含まれている。この他の20例は overt diabetes である。

ii) 重症群

空腹時血糖値 200mg/dl 以上のもので、年令16才から68才迄の男6例、女6例、計12例であつた。

iii) 若年性糖尿病患者群

発病年令30才迄のもので、男4例、女4例、計8例であつた。本群を、重症度により分けると、軽症群及び重症群共に4例宛であつた。

iv) Kimmelstiel-Wilson 症候群

糖尿病の late stage と考えられる多くの合併症を併発した特殊型の代表として Kimmelstiel-Wilson 症候群を選んだ。従つて、糖尿病の経過の長いものが多く、年令も52才から68才迄の5例であり全て男であつた。罹病期間20年の3例の内2例は insulin、1例は経口抗糖尿病剤にて治を受けており、これらの症例は、症状の悪化を見ることなく、しかも薬剤の影響を最少限に止める様に2~4日間休薬して試験を行なつた。薬剤の長期投与の影響は考慮されなければならない。insulin 治療を受けていた2例では、免疫学的測定法の成績は、参考に止めた。残り3例の罹病期間は、2~7年で治療も不十分で、経口抗糖尿病剤を時々服用する程度であり、薬剤の長期投与の影響はといふものと考えられる。尚、i) ~iii) 群の中には、本群の5例は含まれていない。

2. 試験方法

試験前少なくとも3日間、糖質300gの一定の食餌を摂取させ、各対象群共一晚絶食後、50g ブドー糖経口単回負荷試験（以下 GTT と略す）を行ない、負荷前、負荷後30分、60分、90分、120分及び180分に肘静脈より採血して、血清を分離後直ちに血糖、insulin 様活性及び免疫学的活性 insulin を測定した。但し、免疫学的測定法では、放射性同位元素 I^{131} の半減期が短く、damaged insulin が生ずるため測定可能な期間が短く、血清を -20°C にて凍結保存して測定した場合もある。亦、生物学的測定法では、一回当たり測定出来る資料数に限度があるために、横隔膜法では、負荷前、60分、120分の3点、副睾丸脂肪組織法及び免疫学的測定法では、負荷前、30分、60分、90分、120分の5点で測定した。血糖は採血せる6点で測定した。

3. 測定方法

A) ラット剔出横隔膜法

使用動物は、室温 $18\pm 3^{\circ}\text{C}$ の恒温室に於いて、Oriental 固型飼料を以つて2週間以上飼育した体重130g前後の Wister 系の雄性ラットを使用した。ラットを15時間絶食後、断頭屠殺し、速かに横隔膜を剔出する。

これを直ちに 5°C 以下に冷却した Gey & Gey Buffer (pH7.4) に浸した. 横隔膜の使用法は Vallance-Owen,⁵⁾ Cunningham⁶⁾ の hemidiaphragm technique の変法を用いた. 横隔膜を 4 等分して, 予め 200mg/dl の glucose を含む Gey & Gey Buffer 2.0ml を incubation medium として用意した flask 内に 2 片ずつ入れ, 1 ケの flask 中には hemidiaphragm が入る様にした. 充填ガスには 95~100% の酸素を用いた. 密栓後, 37.5°C で 90 分間 90 回転/分で incubate した. incubation 前後の medium 中の糖濃度を Hagedorn-Jensen 氏法¹⁸⁾ に依り測定した. medium 中の横隔膜片は incubation 後 Torsion-balance にて秤量した. 横隔膜の glucose uptake は, incubation medium 中の糖濃度の減少及び横隔膜の湿重量より奥村の方法¹⁹⁾ と同じく下記の式を以て算出した.

$$\text{Glucose uptake} = \frac{\text{incubation 前糖濃度} - \text{incubation 後糖濃度}}{\text{湿重量}} \times 20$$

incubation medium にブドウ糖加 Gey & Gey buffer のみを使用した場合の glucose uptake をその横隔膜の basal uptake とした. ラット 4 匹を一組とする実験で 8 ケの flask の内 2 ケを basal uptake 測定にあて, 他に被検液を夫々添加した場合, 後者の glucose uptake より, 同日に測定した basal uptake を差引いた値を以て, 被検液による extra-glucose (Δ -uptake), 殊にその被検液に insulin 溶液を用いた場合に insulin effect とした. 標準 insulin には豚結晶 insulin (Novo 社製) を用い, insulin 濃度と insulin effect は, insulin 濃度 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ u/ml の範囲で insulin 濃度を片対数グラフにとると直線関係を示し, その回帰直線は, $Y_c = 0.732X - 0.170$ で表わされる (Fig. 1). 血清 ILA 測定に際しては, 5 倍稀釈で行ない, 本法により測定された血清 ILA を DILA と略す.

B) ラット別出副睪丸脂肪組織法

Renold ら¹³⁾, Pfeiffer ら¹⁴⁾ 及び富川の方法¹⁵⁾ に準じて, ラット副睪丸脂肪組織を用い glucose-1-¹⁴C (R.C.C. より購入) から ¹⁴CO₂ への変化を指標とする方法により測定した. 即ち, 前法と全く同じ条件のラット 3 匹を断頭放血致死せしめ, 直ちに開腹, 速やかにしかも出来るだけ注意深く左右副睪丸脂肪組織を摘出し, Krebs-Ringer bicarbonate buffer に浮遊せしめる. 15 分後, 各組織末梢部を 3 分し, 合計 18 ケの組織片より 3 ケずつ取り, その湿重量を 80~120mg として, incubation flask に入れ, 95% O₂-5% CO₂ 混合ガスにて 2 分間ガス交換し, 好気的条件下で 37.5°C, 90 回転/分, 3 時間 incubate する. incubation 終了後, 1.8N-NaOH 0.2ml を center well に注入し, 他方, medium 中には 10N-H₂SO₄ 0.2ml を注入

Fig. 1. Standard regression line of rat diaphragm assay

Fig. 2. Standard regression line of rat epididymal fat pad assay

し、更に同条件で1時間 incubate して発せる $^{14}\text{CO}_2$ を NaOH に吸着させた。 $^{14}\text{CO}_2$ を吸着した NaOH を 3% BaCl₂ と 2.5% NH₄Cl の混合溶液を入れた遠沈管に移し、Ba $^{14}\text{CO}_3$ として gas flow counter でその total count を測定し、self-absorption を補正して、counts/min/mg tissue weight を算出した。

incubation medium は、毎回新調した pH7.4 の Krebs-Ringer bicarbonate buffer を使用し、glucose 300mg/dl, gelatin 200mg/dl の濃度に溶解したもの 1.9ml に D-glucose-1- ^{14}C 0.2 μC (0.1ml) を加えて 2 ml とした。insulin 作用濃度直線の作製には豚結晶 insulin (Novo 社製) を用い、insulin 濃度 10^{-2} ~ 10^{-6} u/ml の範囲では、insulin 濃度と $^{14}\text{CO}_2$ の cpm/mg との両対数の間に、直線関係を示し、その回帰直線は、 $Y_0=0.1037X+2.5066$ で表わされる。(Fig. 2) 血清測定に際しては、5 倍稀釈にて測定し、本法に測定された血清 ILA を FILA と略す。

C) 免疫学的測定法

豚 insulin をモルモットに皮下注射して抗 insulin 血清 (以下 AIS と略す) を作製した。標準 insulin には human insulin (Novo 社製)、I 131 -insulin には高比放射能の pork I 131 -insulin (Dainabbot 社製) を使用した。dextran-coated charcoal は dextran 80 及び charcoal (Merk 社製) を pH7.4 の barbital acetate buffer に溶解して作成した。血清 AIS 及び I 131 -insulin の稀釈には牛血清 albumin を 5% の割合で添加した pH7.4 の barbital acetate buffer を使用した。

之を用いて Herbertら¹⁶⁾の dextran-coated charcoal 法の吉田ら¹⁷⁾の変法に従った。10 $\mu\text{u/ml}$ の I 131 -insulin 0.5ml, 20,000 倍稀釈の AIS 0.5ml と標準 insulin 又は 2 倍稀釈血清 1.0ml を加えて全量 2 ml とし、これを 4℃ で 4 日間 incubate した。その後 dextran-coated charcoal 3.0ml を加えて、直ちに室温で 3000 rpm で 15 分間遠沈し、上清の free insulin と沈澱の bound insulin を分離した後、well-type scintillation counter で夫々を count した。 $\%F = \frac{F}{B+F} \times 100$ より各標準 insulin 濃度の %F を求め、%F を縦軸に、標準 insulin 濃度を横軸にとり、片対数グラフに plot した。(Fig. 3)

未知血清の %F より毎回作成した標準直線を利用して、未知血清の insulin 濃度を求めた。本法により測定した血中 insulin を IRI と略す。

D) 血清測定法

血糖測定は、Hagedorn-Jensen 氏法¹⁸⁾を用いた。

4. 測定成績

A) 正常対象群

1) 空腹時値

本群23例の空腹時血糖値は 67~99mg/dl で、平均空腹時血糖値は 83mg/dl (SD $\pm$ 9) であった。(Fig. 5) 空腹時 DILA は 210~400 $\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 DILA 310 $\mu\text{u/ml}$ (SD $\pm$ 50) は空腹時 FILA は 200~650 $\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 FILA は 399 $\mu\text{u/ml}$ (SD $\pm$ 148) であった。空腹時 IRI は 16~28 $\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 IRI は 21.3 $\mu\text{u/ml}$ (SD $\pm$ 7.3) であった。これら平均空腹時値を各々の正常値とした。以上の如く、空腹時血清 ILA は血清 IRI より著しい高値を、更に FILA は DILA より高い値を示した。(Fig. 4)

2) GTT と血清 insulin 反応

本群の GTT 時の平均血糖曲線は、Fig. 5 に示した。GTT 時の血清 insulin 反応は、Fig. 6 に示した。

Fig. 3. Standard regression line of radio-immunoassay

Fig. 4. Fasting serum insulin levels

Fig. 5. Blood sugar during GTT in normal subjects

正常者に於ては、血糖の頂値は負荷後30分にあり、ILA及びIRIの頂値は60分にあり、各々の値は、DILA $673\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 114$), FILA $821\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 168$) 及び IRI は $78\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 13.2$) であった。即ち、血糖の上昇が膵ラ氏島の β 細胞に働いて insulin 分泌が促された事を示している。血糖と同様に ILA 及び IRI も120分では前値に復し、血糖とILA及びIRIの反応がよく平行した。負荷後60分 DILA 及び FILA は前値の約2倍に増加しており、IRI は前値の約4倍に増加している。

B) 糖尿病患者群

1) 空腹時値

i) 軽症群

空腹時血糖値は、86~182mg/dl で、平均空腹時血糖値は、131mg/dl ($\text{SD}\pm 30$) であった。(Fig. 7) 空腹

Fig. 6. Serum insulin response during GTT in normal subjects

Fig. 7. Blood sugar during GTT in mild diabetics

正常値より低かった。しかし、1例では $400\mu\text{u/ml}$ と高かった。FILA は $380\sim 665\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 FILA は $540\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 91$) で正常値より高かった。IRI は $23\sim 38\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 IRI は $32.7\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 5.5$) で、正常値より高かった。以上の如く、正常対象群に比べ DILA は低く、FILA 及び IRI は高かった。亦、chemical diabetes との間には、差異は認められなかった。これらの値は Fig. 4 に示したが、×印は chemical diabetes の値を示している。

ii) 重症群

空腹時血糖値は $228\sim 319\text{mg/dl}$ で、平均空腹時血糖値は 269mg/dl ($\text{SD}\pm 31$) であった。(Fig. 9) DILA は $80\sim 135\mu\text{u/ml}$ で軽症群より更に低く、平均空腹時 DILA は $100\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 22$) で、重症になる程空腹時 DILA は低くなった。FILA は $225\sim 390\mu\text{u/ml}$ で、軽症群では正常群より高かったものが、本群では低値となり、空腹時 FILA は $276\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 45$) であった。IRI も FILA と同じ傾向で、空腹時 IRI は $7.4\sim 14\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 IRI は $9.3\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 1.9$) であった。以上の如く、糖尿病では、DILA

時血糖値が正常範囲にあるものでも、ブドウ糖負荷後の血糖の頂値は、 170mg/dl 以上で、全て糖尿病と診断された。これらの患者は、臨床症状はなく、chemical diabetes で、空腹時平均血糖値は 202mg/dl ($\text{SD}\pm 21$) であった。軽症群の DILA は、例外的に2例は $400\mu\text{u/ml}$, $450\mu\text{u/ml}$ と高かったが、平均空腹時 DILA は、 $203\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 74$) と、正常値より低かった。空腹時 FILA は、 $200\sim 1600\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 FILA は $531\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 92$) で、DILA とは逆に正常値より高かった。FILA は、2例は $1600\mu\text{u/ml}$ 及び $1200\mu\text{u/ml}$ と異常に高く、亦、3例は $300\mu\text{u/ml}$ 以下の 200 , 215 , $230\mu\text{u/ml}$ と低かった。これらの5例を除くと $380\mu\text{u/ml}$ から $740\mu\text{u/ml}$ の範囲にあった。IRI は $6.4\sim 90\mu\text{u/ml}$ の範囲にあり、 $6.4\mu\text{u/ml}$ と $10\mu\text{u/ml}$ の2例の低いものもあったが、平均空腹時 IRI は $32.8\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 9.6$) で、正常値より高かった。

chemical diabetes の DILA は、 $130\sim 400\mu\text{u/ml}$ で、平均空腹時 DILA は、 $226\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD}\pm 87$) で、

Fig. 8. Serum insulin response during GTT in mild diabetics

Fig. 9. Blood sugar during GTT in severe diabetics

は常に低く、重症になると更に低くなり、FILA 及び IRI は軽症群ではやや高く、重症になると何れも低くなった。

iii) 若年性糖尿病患者群

本群は、insulin の絶対的不足によると考えられている、そこで若年性糖尿病のみについて検討した。Fig. 4 に示した如く、本群が絶対的な insulin 不足による事を証明する特徴的所見は得られなかった。軽症例の空腹時血糖値は 119~170mg/dl で、平均空腹時血糖値は 134mg/dl ($SD \pm 21$) (Fig. 11 実線) DILA は 1 例 450 μ u/ml と高値であつたが、他の 3 例では 130~200 μ u/ml で、平均空腹時 DILA は 240 μ u/ml ($SD \pm 123$), FILA は 500~690 μ u/ml で、平均空腹時 FILA は 590 μ u/ml ($SD \pm 68$), IRI は 33~40 μ u/ml で、平均空腹時 IRI は 37 μ u/ml ($SD \pm 2.6$) であつた。(Fig. 4 $\times$ 印) 即ち、軽症群と全く同じ傾向を示した。重症例では、空腹時血糖値は 228~270mg/dl で、平均空腹時血糖値は 248mg/dl ($SD \pm 16$) であつた。(Fig. 11 点線) DILA は 85~100 μ u/ml で平均

Fig. 10. Serum insulin response during GTT in severe diabetics

空腹時 DILA は 93 μ u/ml ($SD \pm 7$) であり、FILA は 240~302 μ u/ml で、平均空腹時 FILA は 275 μ u/ml ($SD \pm 22$). IRI は 7.6~11.6 μ u/ml で、平均空腹時 IRI は 9.5 μ u/ml ($SD \pm 1.7$) であつた。(Fig. 4 $\bullet$ 印) 重症例は、DILA, FILA 及び IRI 共に正常値より低く、当然の事ではあるが、重症群と全く同じ傾向であつた。従つて、若年性糖病でも血中 insulin は重症度による差異が認められたに過ぎなかつた。

iv) Kimmelstiel-Wilson 症候群

空腹時血糖値は、120~180mg/dl あつた (Fig. 13). DILA は 150~250 μ u/ml で、低値であつた。FILA は 185~500 μ u/ml で、やや低いものが 2 例、やや高いものが 1 例、2 例は正常範囲にあつた。IRI は 13~24 μ u/ml で、低いものが 2 例で、正常範囲のものが 3 例あつた。以上の如く、空腹時の ILA 及び IRI については、少数例の為か、一定の傾向が認められなかつた。しかし、空腹時血糖値 200mg/dl でも、FILA の低い症例が認められた。それには、治療の影響も全く否定は出来ないと考える (Fig. 14).

Fig. 11. Blood sugar during GTT in juvenile diabetics

値 227mg/dl ($SD \pm 41$) とし, 120分値 199mg/dl ($SD \pm 48$) と軽症群より常に低くかつた。しかし, DILA, FILA 及び IRI は, 軽症群と全く一致し, DILA の頂値の低下 FILA の過剰及び遅延反応, IRI の遅延反応が認められた。(Fig. 8 点線)

従つて, chemical diabetes は, 軽症群の中では血糖値は低いが, ILA 及び IRI は, 軽症群のそれと差異は認められなかつた。

ii) 重症群

GTT の平均血糖曲線は, Fig. 9 に示した。前値 269mg/dl で, 頂値は, 60分で 410mg/dl ($SD \pm 81$), 120分 で 388mg/dl ($SD \pm 73$) あつた。DILA は, 60分で 166 μ u/ml ($SD \pm 22$) で, 僅かに上昇し, 120分でも 181 μ u/ml ($SD \pm 40$) と更に僅かに上昇し, 頂値の低下及び遅延が認められた。FILA は, 90分を頂値 371 μ u/ml ($SD \pm 242$) として僅かに上昇し, 120分 で 344 μ u/ml ($SD \pm 251$) と下降しているが, 前値には復

2) GTT と血清 insulin の変動

i) 軽症群

GTT の平均血糖曲線は Fig. 7 の実線で示した如く, 負荷後60分又は90分で頂値に達し, 120分でも血糖 166mg/dl で前値に復さず, 耐糖能の低下を認めた。DILA は, 前述の如く, 前値は 203 μ u/ml で, 既に正常値より低く, 負荷後, DILA は上昇するが頂値は 373 μ u/ml ($SD \pm 96$) で, 正常値より低かつた。120分では 335 μ u/ml ($SD \pm 76$) と下降するが, 前値に復していない。FILA の前値は 527 μ u/ml と高く, 負荷後, 著しく上昇し90分で頂値 1402 μ u/ml ($SD \pm 166$) に達し, 過剰反応を呈し, 正常者に比べて頂値の遅延が認められ, 120分でも 960 μ u/ml ($SD \pm 117$) で, 前値に復さなかつた。IRI の前値は 28.8 μ u/ml で高いが, 負荷後の IRI の上昇は, 正常者と同程度であつた。しかし, 頂値の遅延が認められた (Fig. 8 実線)。

chemical diabetes の GTT の平均血糖曲線は Fig. 7 の点線で示した如く, 前値102mg/dl 90分を頂

Fig. 12. Serum insulin response during GTT in juvenile diabetics

Fig. 13. Blood sugar during GTT in Kimmelstiel-Wilson's syndrome

さなかつた。即ち, FILA でも頂値の低下及び遅延が認められた。本群では, GTT で FILA が30分及び60分で下降し, 90分及び120分で僅かに上昇するものが認められ, insulin 分泌の著しい遅延を示した。IRI は, 前値 $9.3\mu\text{u/ml}$ で, 30分値, $11.6\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 4.5$), 60分値, $16.6\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 8.0$), 90分値 $17.7\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 8.0$) で, 120分値 $18.4\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 8.5$) を頂値として平坦に僅かに上昇し続け, 頂値の遅延と低下が認められた。以上の如く, 本群では, ILA 及び IRI 共に前値も低く, GTT に対する insulin 分泌も最も少なく, 膵島の機能障害の著しい事を現わしている。

iii) 若年性糖尿病患者群

GTT の平均血糖曲線を, Fig. 11 に示した。実線は軽症例を, 点線は重症例を表をしている。前値は軽症例 134mg/dl ($\text{SD} \pm 21$) 重症例 248mg/dl ($\text{SD} \pm 16$) で, 軽症例は60分を頂値 249mg/dl ($\text{SD} \pm 31$) とし, 重症群は60分からゆるやかに120分迄上昇し続け, 120

Fig. 14. Serum insulin response during GTT in Kimmelstiel-Wilson's syndrome

分を頂値 378mg/dl ($\text{SD} \pm 64$) として, 180分では軽症例 169mg/dl ($\text{SD} \pm 31$) 重症群 316mg/dl ($\text{SD} \pm 64$) に下降した。即ち, 軽症例では, DILA は, 前値 $240\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 123$) で, 正常値よりやや低く, 60分で頂値 $415\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 141$) となり, 120分で $320\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 90$) と下降したが, 前値には復さなかつた。FILA は, 前値が $590\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 68$) と正常値より高く, 90分で頂値 $1550\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 166$) と著しく高く, 更に遅延し, 120分でも $1025\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 125$) と下降した。IRI は, 前値 $37.0\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 2.6$) で, 正常値より高く, 90分で頂値 $95\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 9.5$) と高く, 頂値は遅延し, 120分では, $59\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 12.5$) と下降した。各々の頂値は, DILA では正常値より低く, FILA 及び IRI では高く遅延反応を示した。亦, 軽症群より全体的にやや高かつた。

重症群では, DILA は前値 $93\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 7$) で低く, 120分で頂値 $169\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 23$) となり, 頂値の低下及び遅延が認められた。FILA は前値 $275\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 22$) と低く, 90分で頂値 $399\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 101$) で低く, 120分で $388\mu\text{u/ml}$ ($\text{SD} \pm 82$) と下降した。IRI は前値 $9.5\mu\text{u/ml}$ で低く, 120分で頂値 $21.0\mu\text{u/ml}$

(SD±6.4)と低くかつた。従つて DILA FILA 及び IRI で過少遅延反応を呈した。

iv) Kimmelsiel-Wilson 症候群

GTT の血糖曲線を Fig. 13 に示した。点線は、治療中の症例であり、実線は治療不十分な症例である。治療不十分な3症例では、空腹時血糖は、200mg/dl 以下であるが、糖負荷後、血糖は著しく上昇した。DILA は、前値は低く、糖負荷後も頂値の低下を示した。FILA は、前値の高い1例は負荷後、過剰反応を呈し、2例は頂値の遅延が認められ、残り2例は頂値の低下が認められた。

IRI は、前値が正常範囲にある2例で頂値の遅延を、他の3例で頂値の低下及び遅延が認められた。insulin 治療を受けた症例では全て低値であつた (Fig. 14)。糖負荷後の血清 insulin の反応に一定の傾向を認めなかつた。

総括並びに考按

生物学的測定法で測定された血清 ILA は、insulin に関係する事は明らかであるが、他の因子が、生物学的測定法による血清 insulin の定量を阻止する多くの証明がある。殆んど証明は、横隔膜法を用いた実験によるものではあるけれども、これらの因子は、副睪丸脂肪組織法でも阻止される様に思われる。しかし、副睪丸脂肪組織法による血清 insulin 定量を阻止する程の因子が血中に存在するかどうか不明である。副睪丸脂肪組織法では、insulin と同様の作用を、growth hormone, prolactin 及び corticotrophin が示すが、横隔膜法では、これらの hormone が、glucose uptake を増強しない事²⁰⁾は、興味深い。生物学的測定法で、insulin の定量を阻止する因子が、免疫学的測定法にも阻止的に働くとは考えられないが、免疫学的測定法の insulin 特異性についても尚、不明の点が多い。

本研究に用いた3つの測定法の内では、免疫学的測定法が最も信憑性があると考えられている。副睪丸脂肪組織組織法の指標に CO₂ 産生を用いると、growth hormone, adrenalin, corticotrophin 等の作用は著しく減弱し、本法の insulin 特異性は満足すべきものである²¹⁾との考えもあるが、少くとも glucose uptake を指標とするよりは、insulin 特異性は高いと思われる。以上の如く、現在用いられている血中 insulin 測定法は、必ずしも満足すべきものではないが、これらの成績を総合することにより、糖尿病の insulin の分泌異常を幾らかでも説明しうるものと考えられる。

正常者の ILA 及び IRI は、多くの研究者により、多くの異なつた方法で測定されてきた。空腹時 DILA は、各報告者により可成りの相違がある。Vallance-Owen ら²²⁾によると非稀釈血清で、平均 64 μ u (40~60 μ u/ml) であり、Seltzer 及び Smith²³⁾もほぼ同じ値を得ている。しかし、Willebrands²⁴⁾らは、5倍稀釈血清で測定し、100~3000 μ u/ml であつたと報告しており、非稀釈血清に比べ、5~20倍の稀釈血清を用いる事により、insulin 効果が増大することを見出し、現在では、専ら稀釈血清が用いられている。この様に測定に使用する血清の稀釈が、大きな意義を持つている。吉田⁸⁾、奥村¹⁹⁾は、4倍稀釈血清を用いて、正常者平均空腹時 DILA は 330 μ u/ml (260~400 μ u/ml) であり、辻ら²⁵⁾も 100~500 μ u/ml であつたと報告しており、著者の成績と一致する。Vallance-Owen,²²⁾ Wright ら²⁶⁾は、正常者にブドウ糖を負荷すると、前値約 60 μ u/ml であつたものが、負荷後 100~800 μ u/ml に増加したと報告しており、著者の成績と一致し、血糖曲線と平行して変動した。FILA に就いても非稀釈血清より稀釈血清で高い値が報告されている。Lyngsoe²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾は、非稀釈血清で 70.6 μ u/ml、5倍稀釈血清で 173.7 μ u/ml であつた。しかし、この値は、著者の値より低く、著者の値は Martin ら³⁰⁾及び Daweke ら³¹⁾と一致する。ブドウ糖負荷後は、DILA と同様に上昇し、Steinke ら³²⁾によると3~6倍に増加し、著者の成績では、2倍に増加した。空腹時 IRI は Berson ら¹⁰⁾によると平均 21 μ u/ml (0~66 μ u/ml) で、Herbert ら¹⁶⁾も同じ値であり、著者の成績と一致している。Charcoal 法は、free 及び bound insulin の分離に抗体を用いず操作が簡単で短時間に出来るので本研究に採用した。ブドウ糖負荷後 IRI も増加し、諸家の報告によると約3~6倍に増加し、著者の成績も4倍に増加した。亦、DILA, FILA, IRI はよく平行した。

従つて、3つの血中 insulin 測定法で各々多くの研究者の成績と一致し、各々間違いなく血中 insulin の

動きをとらえているものとする。

正常者の空腹時値について観察すると、ILA と IRI の値には著しい差異があり、一般に認められた事実である。この差異の確かな説明はなされておらず、IRI には稀釈による影響もない。Partamian ら³³⁾は、生物学的には活性であるが、免疫学的には非活性の血清蛋白又は血清中の insulin の存在、他の動物では insulin 作用を促進する様な hetero-specific factor の存在、細胞表面で insulin 様作用を促進する intravascularly restricted protein の存在及び insulin の一部が AIS と反応しないような他の因子と結合しているのではないかと考えている。この問題は今後に残された重要な問題である。Gjedde ら³⁴⁾は、DILA と FILA の値は同じであつたと報告しているが、著者の成績では、FILA は DILA よりやや高かつた。この事は、横隔膜法に対する inhibitor、副睪丸脂肪組織法に対する activator も関与するかも知れないが、Antoniades ら¹¹⁾の唱える“free”及び“bound”insulin の概念より当然の事であろう。

糖尿病患者の内、軽症群では、空腹時 DILA は低下し、FILA 及び IRI は増加していた。亦、chemical diabetes でも同じ傾向であつた。奥村¹⁹⁾も DILA は糖尿病患者で低いことを認めている。Steinke ら³⁶⁾は、prediabetes 及び overt diabetes の空腹時 FILA が正常者より高く、之は高血糖に対する二次的反應であると共に、筋肉組織に対する insulin antagonist の増加によると述べている。空腹時 IRI は、正常者に比べて高いと、Yalow ら³⁷⁾は報告している。GTT に対する insulin 反応を見ると、DILA は全例で正常者に比べて頂値が低く、FILA は過剰遅延反應が認められ、IRI は頂値は正常範囲であるが、遅延反應を示した。Vallance-Owen ら³⁸⁾も横隔膜法を用いて若年性糖尿病で GTT に対する内因性 insulin の動員は不十分であつたと述べ、Seltzer 及び Smith²³⁾も insulin 分泌は不十分であり、之は、“insulogenic reserve”の減弱によると考えている。Alp ら⁵⁴⁾によると FILA は、CO₂ 産生を指標とすると過剰反應であつたが、lipid への転換を指標とすると有意の上昇を認めなかつた。Power ら³⁹⁾は、著者と同様、過剰反應を認めている。FILA は、指標を異にすれば異なつた成績が出る可能性があることを示唆している。

Buchanan ら⁴⁰⁾によると、GTT に対する IRI の遅延反應は、糖尿病に特徴的であるが、それは、ブドウ糖の insulin に対する刺激の閾値の上昇を示しているのか insulin の合成又は分泌に異常があるのか不明であると述べている。一方 Berson ら⁴¹⁾は、過剰遅延反應が特徴的であると報告している。従つて、軽症糖尿病及び chemical diabetes では、充分ではないが相当量の insulin が糖刺激によつて分泌されるにも拘らず、DILA に対する antagonist の増加、FILA に対する activator³⁵⁾の作用によつて非常に複雑な insulin 像を呈しているものと考えられる。横隔膜法に対して inhibitor として働く Vallance-Owen⁴²⁾らの Synalbumin 又は TCA-ethanol extract は、糖尿病で阻害作用が強いが、副睪丸脂肪組織法では、activator として働く⁴³⁾ことより、糖尿病では DILA が低く、FILA は高いのであろう。重症群では、空腹時 DILA は勿論、FILA 及び IRI も低値を示した。Ketoacidosis では DILA は検出出来ず³⁾、FILA、IRI も重症になると低下する事が認められている^{44), 45)}。亦、GTT でも DILA、FILA 及び IRI の反應は減弱し、過少遅延反應となり、これ迄の報告を支持している^{23), 46), 40)}。従つて、重症糖尿病では、antagonist の増加に対する代償性 insulin 分泌に耐えられず、膵β細胞の疲弊を来し、insulin 分泌機能の著しい低下を示唆している。FILA では、糖負荷後、30分、90分で減少し、その後、増加傾向を示すものがあり、著しい insulin の分泌遅延と考えられるが、この様な例で、DILA 及び IRI は糖負荷後、増加は少ないが、少なくとも、減少傾向は見られず、FILA のみに見られた事を充分説明出来なかつた。今後の検討を要する点である。しかし、阿部⁴⁷⁾は、糖尿病患者に GTT を行なつて、FILA のみを測定し、糖負荷後 FILA の増大を認めなかつたと報告し、この FILA 反應が糖尿病の特徴であると述べている。

若年性糖尿病患者は、空腹時及び糖負荷後共に DILA は低値であつた事は、従来の報告に一致する。空腹時 FILA に関しては高いとの報告^{32), 49)}が多く、昏睡に近い未治療の若年性糖尿病に於いても高かつたと Beigelman ら⁵⁰⁾は報告している。しかし、Fig. 4 に示した如く、軽症例では高かつたが、重症例では低かつた。空腹時 IRI は低く、insulin deficiency であると Berson⁴⁵⁾及び Buchanan ら⁴⁰⁾は述べているが、Johansen 及び Lundback⁵¹⁾によると若年性軽症糖尿病の IRI の動態は、成人型糖尿病のそれによく似ているといつて

いる。糖負荷に対しても、軽症例は軽症群の、重症例は重症群の血清 insulin 動態を示し、Johansen 及び Lundback の成績を支持した。Berson 及び Buchanan との成績の違いは対象を異にしている為かもしれない。亦、Elliot ら⁵²⁾ は、若年性糖尿病の血清 insulin の insulinase による分解率が、正常者と異なることにより、異常 insulin の分泌を想定し、糖尿病と遺伝との関連性があるのではないかと想定している。

Kimmelstiel-Wilson 症候群は、長期に亘る糖尿病罹患の末にたどりついた糖尿病性血管合併症の完成像であると考えて、少数例ではあるが検討した。しかし、全く未治療のまま、本症候群を診ることは稀であり、従って、血中 insulin についての報告も殆んど見られない。山田ら⁵³⁾ は in vivo の insulin 測定法を用いての報告で、血管合併症を有する糖尿病は、合併症のない糖尿病に比し、血中 ILA の低下を認め、合併症の頻度が増す程低下する傾向を認めている。著者の成績でも、ILA 及び IRI の低下しているものも認められるが、一定の傾向が得られなかった。

結 語

ラット剔出横隔膜法、ラット剔出副睪丸脂肪組織法及び免疫学的測定法を同一材料に用いて、糖尿病患者の血清 ILA 及び IRI を測定した。

軽症群の空腹時 FILA 及び IRI は正常者に比べて高く、多量の insulin が分泌されていると考えられるが、DILA は低く、筋肉組織に対しての insulin 作用は低下している。又、その為にこそ代償性に多量の insulin が分泌されているのであろう。糖刺激に対して、DILA は過少反応、FILA は過剰遅延反応、IRI は遅延反応であつた。chemical diabetes 軽症群と差異を認めなかった。従って、軽症群では DILA を下げる DILA-inhibitor が重要な因子である。重症群では、空腹時 DILA, FILA 及び IRI 三者共に低く、糖刺激に対して三者共に過少反応であつた。即ち、重症群では insulin 分泌の低下が認められる。

若年性糖尿病及び Kimmelstiel-Wilson 症候群では、特徴的所見が得られなかった。

3つの血清 insulin 測定法を用いることにより、DILA-inhibitor が糖尿病発症に重要な因子として働くことを認めた。

今後新しい insulin 測定法が見出されない限り、糖尿病の病態の研究には、本研究に用いた3つの血中 insulin 測定法を用いる必要がある。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった恩師吉田秀雄教授に深甚なる謝意を捧げ、種々御教示頂いた奥村賢太郎講師及び故富川哲夫博士に深謝の意を表します。尚、本研究に御協力頂いた阿部信行、阿部敦両学士に感謝致します。

文 献

- 1) HEMMINGSEN, A.E. : Acta Med. Scandinav., 90 : 105, (1938).
- 2) ANDERSON, E. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 94 : 321, (1957).
- 3) BORNSTEIN, J. : Australian J. Exp. Biol. and Med. Sc., 28 : 87, (1950).
- 4) GEMMILL, C.L. : Johns Hopk. Hosp. Bull., 66 : 232, (1940).
- 5) VALLANCE-OWEN, J. : Lancet, 1 : 983, (1954).
- 6) CUNNINGHAM, N.F. : J. Endocrin., 25 : 35, (1962).
- 7) RANDLE, P.J. : Brit. Med. J. : 1 : 1237, (1954).
- 8) 吉田秀雄 : 糖尿病, 2 : 11, (1959).
- 9) RENOLD, A.E., A. MARBLE and D.W. FAWCETT : Endocrinology, 46 : 55, (1950).
- 10) BERSON, S.A. and YALOW, R.S. : J. Clin. Invest., 39 : 1157, (1960).
- 11) ANTONIADES, H.N. : Endocrinology, 68 : 7, (1961).
- 12) SAMAN, N., FRASER, R. and DEMPSTER, W.J. : Diabetes, 12 : 339, (1963).
- 13) RENOLD, A.E., MARTIN, D.B. and DAGENAIS, Y.M. : J. Clin. Invest., 39 : 1487, (1960).
- 14) DITSCHUNEIT, H., CHANG-SU AHN, PFEIFFER, M. and PFEIFFER, E.F. : Klin. Wschr., 37 : 1234, (1959).
- 15) 富川哲夫 : 日本内分泌学会雑誌, 42 : 814, (1966).
- 16) HERBERT, V., K. LAU, C.W. GOTTLIEF and S.J. BLEICHER : J. Clin. End., 25 : 1375, (1965).
- 17) 吉田秀雄, 他 : 日本内分泌学会雑誌, 44 : 181,

- (1968). 18) HAGEDORN, H.C., HALSTRÖM, F. and JENSEN NORMAN : Hospitalstidende, 78 : 1193 (1935). 19) 奥村賢太郎 : 日本内分泌学会雑誌, 35 : 5164, (1960). 20) RANDLE, P.J. and TAYLOR, K.W. : Brit. Med. Bull., 16 : 209, (1960). 21) SHEPS, M.C., NICKERSON, R.J., DAGENAIS, Y.M., STEINKE, J., MARTIN, D.B. and RENOLD, A.E. : J. Clin. Invest., 39 : 1449, (1969). 22) VALLANCE-OWEN, J. and HURLOCK, B. : Lancet, 1 : 68, (1954a). 23) SELTZER, H.S. and SMITH, W.L. : Diabetes, 8 : 417, (1959). 24) WILLEBRANDS, A.F. and GROEN, J. : Diabetes, 5 : 328, (1956). 25) 辻昇三, 他 : 日本内分泌学会雑誌, 34 : 31, (1958). 26) WRIGHT, P.H. : Lancet, 6 : 261, (1967). 27) LYGSOE, J. : Acta Med. Scandinav., 171 : 356, (1962). 28) LYGSOE, J. : Acta Med. Scandinav., 172 : 41, (1962). 29) LYGSOE, J. : Acta Med. Scandinav., 172 : 601, (1962). 30) MARTIN, D.B. and DAGENAIS, Y.M. : Lancet, 2 : 76, (1958). 31) DAWEKE, H. and BACHI, I. : Metabolism, 12 : 319, (1963). 32) STEINKE, J., TAYLOR, K.W. and RENOLD, A.E. : Lancet, 1 : 30, (1961). 33) PARTAMIAN, J., E. RASIO and G.F. CAHILL : Metabolism, 15 : 60, (1966). 34) GJEDDE, F. : Acta Endocrinologica, 57 : 330, (1968). 35) 吉田秀雄 : 日本内分泌学会雑誌, 42 : 611, (1966). 36) STEINKE, J., J.S. SOELDNER, R.A. CAMERINI-DAVALOS and A.E. RENOLD : Diabetes, 15 : 502, (1963). 37) YALOW, R.S. and BERSON, S.A. : Diabetes, 9 : 254, (1960). 38) VALLANCE-OWEN, J., B. HURLOCK and N.W. PLEASE : Lancet, 2 : 583, (1955). 39) POWER, L., BERNARDO REYES-LEAL and J.W. CONN : Metabolism, 13 : 1297, (1964). 40) BUCHANAN, K.D. and McKIDDIE, M.T. : Diabetes, 16 : 466, (1967). 41) BERSON, S.A. and YALOW, R.S. : Diabetes, 14 : 549, (1965). 42) VALLANCE-OWEN, J., DENNES, E. and CAMPBELL, P.N. : Lancet, 2 : 336, (1958). 43) 吉田秀雄 : 日本内分泌学会雑誌, 43 : 574, (1967). 44) BEIGELMAN, P.M. and TRANQUADA, E.T. : Diabetes, 9 : 254, (1960). 45) BERSON, S.A. and YALOW, R.S. : Ciba Found. Colloq. on Endocr., 15 : 182, (1962), Churchill, London. 46) DAVID, N. PHEAR : Lancet, 1 : 955, (1962). 47) 阿部正和, 他 : 糖尿病, 8 : 178, (1965). 48) BAIRD, C.W. and BORNSTEIN, J. : Lancet, 1 : 111, (1957). 49) DAWEKE, H. : Acta Endocrinologica, 46 : 124, (1964). 50) BEIGELMAN, P.M. and TRANQUADA, E.T. : Diabetes, 11 : 179, (1962). 51) JOHANSEN, K. and LUNDBACK, K. : Lancet, 1 : 1257, (1967). 52) ELLIOT, R.B., D.O. BRIEN and C.C. ROY : Diabetes, 14 : 780, (1965). 53) 山田弘三, 他 : 日本内科学会雑誌, 52 : 1200, (1964). 54) ALP, H., LECANT, L., KILO, C., EGGEMAN, J. and KOCH, M.B. : Diabetes, 13 : 509, (1964).