糖尿病患者における白血球遊走阻止試験

鹿児島大学医学部第一内科

(主任：金久卓也教授)

坂口 晋, 中沢 道夫, 中村 周治,
河野 泰子, 栢木 秀生, 川 明

Leucocyte Migration Inhibition Test in the Patients with Diabetes Mellitus

**Susumu SAKAGUCHI, Michio NAKAZAWA, Syuji NAKAMURA,
Yasuko KONO, Hideo HAZEKI and Akira KAWA**

The First Department of Internal Medicine

Kagoshima University School of Medicine

Kagoshima

(Director: Prof. Takuya Kanehisa, M.D.)

A leucocyte migration inhibition test (LMIT) was carried out in 28 healthy controls and 39 diabetics with special reference to age at onset, insulin-dependency, family history and retinopathy. The method employed was the agarose plate method (Clausen). The antigens used were rat liver mitochondria prepared according to Zamecnik, bovine pancreas extract prepared according to Nerup et al., and rat islet mitochondria prepared according to Howell.

The following results were obtained:

- 1) There was no significant difference between controls and diabetics as a whole, when the tests were performed with rat liver mitochondria as an antigen. There was also no difference between juvenile onset diabetics and maturity onset diabetics, insulin-dependent diabetics and insulin-nondependent ones, patients with a family history and others without a family history, and the patients with retinopathy and those without retinopathy as far as this antigen was used.
- 2) There was a tendency toward a higher incidence of a positive LMIT in juvenile onset diabetics and patients with retinopathy as compared with maturity onset diabetics and those without retinopathy when the tests were carried out with bovine pancreas extract as an antigen. But none of them reached statistically significant levels.
- 3) Statistically higher ($p < 0.05$) incidences of a positive reaction in LMIT were observed in juvenile onset diabetics and insulin-dependent patients as compared with maturity onset diabetics and insulin-nondependent patients when the patients were tested with rat islet mitochondria as an antigen.

Based on the above-mentioned results, the significance of autoimmune mechanism as a possible factor in the pathogenesis of juvenile and insulin-dependent diabetes mellitus was briefly discussed.

緒 言

糖尿病患者における免疫異常に関する検索は, その病因論に関連して最近注目を集めつつある。体液性免疫の面では, 糖尿病患者における抗ランゲルハンス氏島抗体⁽³⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²³⁾の検出を初めとして, 抗甲状腺抗体,⁽¹⁷⁾⁽²⁴⁾抗胃壁細胞抗体,⁽¹⁷⁾⁽³⁰⁾抗副腎抗体⁽²⁷⁾の出現が報告されている。

一方細胞性免疫に関しては, 脾への単核球浸潤⁽¹²⁾が早くから注目されていたが, 最近ではリンパ球芽球化反応の異常,⁽⁹⁾T・Bリンパ球 subpopulation の変化,⁽⁵⁾⁽¹⁵⁾特定のHLA抗原との関連⁽⁸⁾⁽²⁶⁾などが報告されるに到った。とくに, 白血球遊走阻止試験(LMIT)に関しては, 肝ミトコンドリア,⁽³³⁾⁽³⁴⁾thyroglobulin,⁽¹⁰⁾甲状腺マイクロソーム,⁽²⁵⁾さらにヒト,⁽²¹⁾ウシ胎児,⁽²⁹⁾ブタ⁽²⁸⁾等の脾抽出物を抗原として, その異常が報告されている。しかし, ランゲルハンス氏島成分を抗原とするLMITの報告はまだみられないようである。

我々は今回, 糖尿病患者における細胞性免疫能の異常を検出することを目的として, ラット肝ミトコンドリア, ウシ脾抽出物, ラット脾ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原とするLMITについて検索したので報告する。

Table 1. Subjects tested with rat liver mitochondria.

Control	Experimental										
	Onset		Insulin-dependency			Family History			Retinopathy		
	juvenile	maturity	(+)	(-)	not clear	(+)	(-)	not clear	(+)	(-)	not clear
	15	24	18	20	1	12	26	1	14	23	2
28	39		39			39			39		

Table 2. Subjects tested with bovine pancreas extract.

Control	Experimental										
	Onset		Insulin-dependency			Family History			Retinopathy		
	juvenile	maturity	(+)	(-)	not clear	(+)	(-)	not clear	(+)	(-)	not clear
	15	22	16	20	1	12	24	1	14	21	2
28	37		37			37			37		

Table 3. Subjects tested with rat islet mitochondria.

Control	Experimental										
	Onset		Insulin-dependency			Family History			Retinopathy		
	juvenile	maturity	(+)	(-)	not clear	(+)	(-)	not clear	(+)	(-)	not clear
	13	32	16	29	0	18	24	3	21	21	3
25	45		45			45			45		

対象及び方法

1. 対象

対象としては, 鹿児島大学第一内科で経過観察中の糖尿病患者のうち69才以下の者を用いた。対照としては正常健康成人を用いた。各実験における実験群と対照群の人数は表1, 2, 3に示した。

まず糖尿病患者と健康者を比較し、ついで糖尿病患者についてインスリン依存性の有無、発症年齢、家族歴の有無、糖尿病性網膜症の有無について検討した。なお本実験では、Cudworth & Woodrow⁽⁸⁾に従い、30才以下で発症したものを若年発症とした。又、発症年齢、インスリン依存性等の有無が明確にできなかった例は推計処理にさいして除外した。

2. 方法

①抗原

1) 肝ミトコンドリア

Zamecnik ら⁽³⁸⁾の方法に従い、ラット肝を彼らの記載したメディウムX中にてよく洗い、細切した後、もとの肝重量の10倍量のメディウムXを入れ、ホモジナイズし、500 g・5分遠沈した後上清を採り、500 g・5分遠沈を2回くり返す。その上清を採り、5000 g・20分遠沈した後上清と沈渣上層部を捨て、残った沈渣を再浮遊し、5000 g・15分間2回洗滌し、得られた沈渣をミトコンドリア分画とした。これを凍結・融解を5回くり返した後、4℃にて48時間透析し、蛋白量を測定し、適量ずつに分け、凍結乾燥の後-20℃にて保存、使用直前に蛋白量1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにPBSにて溶解した。

2) ウシ脾抽出物

Nerup ら⁽³⁹⁾の方法に準じて行った。成熟ウシ脾を採り出した後、脂肪組織・血管・結合組織をできるだけとりのぞき、細切した後ホモジナイズし、もとの重量の5倍量のハックス液中にて4℃・24時間静置後、6000 g・20分遠沈して上清を採り、再度6000 g・20分遠沈を2回くり返す。この上清を4℃・48時間透析した後、蛋白量を測定し、適量ずつに分け、凍結乾燥し、-20℃にて保存した。使用直前に蛋白量1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにPBSにて溶解して用いた。

3) ラット脾ランゲルハンス氏島ミトコンドリア

Howell ら⁽¹⁴⁾の方法に従い採取した。体重200~400 gのウィスター系ラットをネンブタール麻酔下で開腹し、胆管より氷冷ハックス液を約10~14ml注入し、脾尾部・体部をとり出す。氷冷しながらハックス液で洗い、血管・脂肪組織をとりのぞきながらできるだけ細かく均等にきりきざむ。ハックス液で洗滌した後、コラゲナーゼ(Worthington Biochem, Type 4)を7 mg/ml脾組織となるように加えて、37℃温浴中にて8~10分激しく手で振盪して、一様に泥状になったものに氷冷ハックス液を加える。3000回転数秒、2000回転数秒各1回、1000回転・30秒間3回洗滌した後、Ficoll重層遠沈法により800 gで10分間遠沈した後、11%と21%の境界層を採り、ハックス液で洗滌してラ氏島を集めた。

このラ氏島に0.3 M蔗糖・リン酸緩衝溶液(4℃・pH 6.0)を加え、低回転(約700~1000rpm)にてホモジナイズする。600 g・5分遠沈後上清を採り、600 g・5分再遠沈する。上清を5500 g・5分遠沈し、沈渣を再浮遊させて5500 g・10分遠沈する。沈渣を凍結・融解を5回くり返した後、48時間透析を行い、蛋白量を測定し、適量に分けて凍結乾燥し、-20℃にて保存する。使用直前に、蛋白量1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように溶解して用いた。

なお、蛋白定量はFolin法⁽²⁰⁾にて行い、器具はすべてシリコン処理したものを用いた。

② 白血球遊走阻止試験(LMIT)

Clausen⁽⁶⁾⁽⁷⁾の方法を基本とし、今井⁽¹⁶⁾、峠⁽³⁵⁾の方法を参考として、少し改変して行った。

1) 寒天培地の作製

アガロース600mg、アガー600mgにイオン交換水を加えて100 mlとし、これをオートクレーブにて滅菌後、48℃恒温槽内に約30分間冷却、TC-199(10x) 11.5 ml、ウマ血清12 ml、ペニシリン10000単位、ストレプトマイシン10mg、7%重曹2 mlを加えた後、約10 mlずつプラスチックシャーレ(Falcon 3002, 60×15mm)に分注する。これを37℃、5% CO_2 ・95% airの培養槽内に約48時間静置し、pH 7.3付近に安定した後用いた。

2) 白血球

ヘパリン0.5mlを入れた注射器にて、肘静脈より12mlの採血を行い、6%デキストランを1ml加えて転倒混和後、37℃50分間静置する。上清を採り、PBS 40mlと混じて1400rpm・10分遠沈後、沈渣を1000rpm・10分ずつ2回PBSにて洗滌、10%ウマ血清加TC-199に浮遊させ細胞数を算定、1400rpm・10分遠沈後、適量のTC-199を加えて細胞数をおおむね 2×10^6 /mlに調整した。

3) 抗原の添加及び培養

抗原及びPBSを小試験管に3.3 μ lずつ分注し、これに前記白血球浮遊液を30 μ lずつ加え、37℃・30分前培養を行った。2日前に作製した寒天平板に直径2mmの穴をあけ、各穴に10 μ lずつの対照及び抗原を含む白血球浮遊液を入れ、5%CO₂・95%airにて20時間培養した。

4) 判定

培養槽からとり出した後、シャーレにホルマリンを入れ約1時間静置固定し、Boodier⁽²⁾の方法に従い87℃温浴中に2分間浮かべた後、静かに沈めて寒天を融解させ静かにとりのぞき、水洗後乾燥させる。拡大鏡下に縦横の直径を測定し、面積を算定して遊走指数を算出した。

$$\text{遊走指数 (M.I.)} = \frac{\text{抗原を加えた時の遊走面積}}{\text{抗原を加えない時の遊走面積}}$$

Fig. 1. LMIT performed with rat liver mitochondria as an antigen in healthy controls and diabetics. The method employed was Clausen's agarose plate method, and the antigen was prepared according to Zamecnik. The results obtained in 39 diabetics were compared with those in 28 healthy controls.

成績

1) 肝ミトコンドリア

抗原としてラット肝ミトコンドリアを用いた時の正常人28人のLMITのMIは 1.07 ± 0.13 であった。従って1 σ をとり、MIが、0.94以下の者をLMIT陽性とし、 χ^2 検定によって有意差の検定を行った。

ラット肝ミトコンドリアを抗原として用いた場合、糖尿病患者全体、あるいは若年発症糖尿病群、インスリン依存性糖尿病群のLMIT陽性率と対照群のそれとの間に有意差はみられなかった (Fig 1)。又、若年発症群と成人発症群、インスリン依存性の有る群と無い群、家族歴を有する群と有しない群、網膜症を有する群と有しない群を比較したさい、いずれにおいても有意差を認め得なかった (Fig 2)。

2) ウシ豚抽出物

成熟ウシ豚粗抽出物を抗原として用いた時のLMITの結果をFig 3に示した。

正常健康成人28人のMIは 0.99 ± 0.08 でMIが0.91以下のものを陽性者とした。若年発症群と成人発症群を比較すると、若年発症群におけるLMIT陽性率は高い傾向が見られた ($P < 0.10$)。又、網膜症を有する群では有しない群に比し、白血球の遊走は抑制される傾向が見られた。しかし、いずれも推計学的には有意ではなかった。

3) ラット豚ランゲルハンス氏島ミトコンドリア

ラット豚ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原として用いて行ったLMITの結果をFig 4に示した。正常健康人25人のMIは 0.97 ± 0.06 でMIが0.91以下のものを陽性者とした。

Fig. 2. LMIT performed with rat liver mitochondria as an antigen in diabetics. The test was carried out in 39 diabetics with special reference to age at onset, insulin dependency, family history and retinopathy. The normal range was defined as mean ± 1 SD obtained in 28 healthy controls.

Fig. 3. LMIT performed with bovine pancreas extract as an antigen in diabetics. The antigen was prepared according to Nerup et al. The test was carried out in 37 diabetics with special reference to age at onset, insulin dependency, family history and retinopathy. The normal range was defined as mean $\pm$ 1 SD obtained in 28 healthy controls.

若年発症群にては成人発症群に比し，白血球の遊走能は有意に抑制されていた ($P < 0.05$)，又，インスリン依存性群では非依存性群に比し，白血球の遊走能は有意に抑制されていた ($P < 0.05$)，家族歴を有する群と有しない群，網膜症を有する群と有しない群の間には，LMIT陽性率に有意差は認められなかった。

Fig 5はインスリン依存性の有る若年発症患者群とインスリン非依存性成人発症患者群を比較したものであるが，白血球の遊走能は前者にて有意に抑制されていた ($P < 0.01$)。

考 案

糖尿病患者における LMIT について Richens ら⁽³³⁾⁽³⁴⁾ はラット肝ミトコンドリアを抗原とした場合，インスリン依存性患者群は健康人に比し白血球遊走抑制が有意に強かったと述べている。一方 MacCuish ら⁽²¹⁾ はインスリン依存性患者群と非依存性患者群，又，インスリン依存性患者群と正常健康人群の間に，ともに有意差を認めなかったと報告している。我々の実験では，正常健康人と糖尿病患者群の間には有意な差は認められなかった。また患者群を若年発症群と成人発症群，インスリン依存群と非依存群，遺伝歴を有する群と有しない群に分けて相互を比較してみたが，いずれの場合も白血球遊走抑制に有意差を認めることはできなかった。これは Richens らの成績と異なり MacCuish らの成績と一致している。MacCuish らは彼らの成績が

Fig. 4. LMIT performed with rat islet mitochondria as an antigen in diabetics. The antigen was prepared according to Howell. The test was carried out in 45 diabetics with special reference to age at onset, insulin dependency, family history and retinopathy. The normal range was defined as mean $\pm$ 1 SD obtained in 25 healthy controls.

Fig. 5. LMIT performed with rat islet mitochondria as an antigen in diabetics. Comparison between juvenile-onset insulin-dependent diabetics and maturity-onset insulin-non-dependent diabetics.

Richens らの成績と異なった理由として、そのミトコンドリアの採取法のちがいによるマイクロゾームの混入等の可能性を指摘している。しかし、我々の実験におけるミトコンドリア分画は、Richens らと同様に Zamecnik & Keller の方法により採取したものである。従って、抗原の差を以て我々の成績と Richens らの成績の差を説明することはできない。Richens らは Bendixen & Sjøberg⁽¹⁾の方法によって LMIT を行っており、白血球は培養期間ずっと、高濃度の抗原にさらされている。これに対し、我々が用いたアガロース平板法では、高濃度の抗原にさらされているのは30分間の前培養期間中のみであり、その後の培養期間においては抗原蛋白濃度は拡散により低下する。これが我々の成績と Richens らのそれが異なった原因であるかもしれない。我々は、後述するランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原として用いた実験と比較する目的もあって、この実験も抗原が少量ですむ寒天平板法を用いた。しかし、抗原の大量採取が容易で、しかも抗原性が弱いと考えられる肝ミトコンドリアについては、毛細管法の方が鋭敏である可能性もあり、この点については今後検討を要するものと考えられる。

第2の実験として、成熟ウシ臍粗抽出物を抗原とした LMIT を行った。若年発症群にては成人発症群に比し、白血球遊走抑制が強い傾向が見られた ($P < 0.10$)。MacCuish ら⁽²¹⁾はヒト臍のミトコンドリア・マイクロゾームを含む粗抽出物を用いて LMIT を行い、若いインスリン依存性患者群にて白血球遊走抑制が強かったと報告しており、Nerup ら⁽²²⁾は、臍管結紮ブタ臍よりのミトコンドリアを除いたマイクロゾームや細胞内小器官を主成分とする分画を抗原として用い、糖尿病患者群における白血球遊走抑制は正常健康者群に比し強かったと報告している。又同じく Nerup ら⁽²²⁾は、ウシ胎児臍よりのミトコンドリアを除いた、マイクロゾームを含む細胞内小器官を主成分とすると思われる分画を抗原として用いて、発症1年以内の若年型糖尿病患者にて白血球遊走抑制が強かったと報告している。Nerup ら⁽²²⁾の実験で用いられた抗原は、外分泌組織に乏しく内分泌組織に富んだ臍より得られたものであり、我々の実験で用いられた抗原は外分泌組織を多く含んだ臍より採取したものである。従って、我々の成績を Nerup らの成績と比較するのは困難と思われるが、我々の成績は Nerup ら⁽²²⁾、MacCuish ら⁽²¹⁾の報告と類似している。

又、我々の実験では、合併症としての糖尿病性網膜症を有する群において有しない群に比し、推計学的に有意ではないが、白血球遊走抑制の傾向が見られた。網膜症の有無と細胞性免疫能との関連に関する研究は少く、我々の得た成績の意義は今後の検討に待たざるを得ない。しかし、Nerup ら⁽²²⁾の方法に従って作製した我々の抗原には臍の分泌組織以外の成分が含まれている可能性がある。Nerup ら⁽²²⁾の報告によると、この分画には膠原線維等を含まないとされている。しかし、この分画を抽出するために組織や細胞を破壊する操作にさいして、血管壁やその他の結合組織等の破碎成分が混じる可能性は充分残されている。従って、我々の成績は、糖尿病患者における細小血管障害としての網膜症の進展に、何らかの免疫学的機序が関与していることを示唆している可能性を否定できない。

第3の実験として、ラット臍ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原として LMIT を行った。ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原とした場合には、若年発症群では、成人発症群に比し、白血球遊走は有意に抑制されていた ($P < 0.05$)。また、インスリン依存群では、非依存群に比し、白血球遊走は有意に抑制されていた ($P < 0.05$)。若年発症でインスリン依存性を有する患者群と、成人発症でインスリン非依存性の患者群との比較では、この有意差はより強かった ($P < 0.01$)。

なお、ウシ臍抽出物を抗原とした LMIT においては、若年発症群では15例中7例が陽性を示し、インスリン依存群では16例中7例が陽性を示している。これに対し、ラット臍ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原として用いた LMIT には、若年発症群では13例中5例が陽性を示し、インスリン依存群では16例中6例が陽性を示している。即ち、ウシ臍抽出物を抗原として用いた時の方が、ラット臍ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原として用いた時より高い陽性率を示している。一方、成人発症群、インスリン非依存群にても、ウシ臍抽出物を抗原として用いた時の方が高い陽性率を示している。しかし、この両実験を比べる

と、 x^2 値は若年発症例で0.26, 成人発症例で0.30, インスリン依存例で0.13, インスリン非依存例で0.74で、いずれも有意差はなく、この両抗原を用いたLMITの感度はほぼ等しいと考えられた。このような条件下で、ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原とした場合にかぎって、若年発症あるいはインスリン依存群においてLMIT陽性率が高かったことは注目に値すると考えられる。

糖尿病患者におけるLMITにおいて、ランゲルハンス氏島又はそのミトコンドリアを抗原として用いた実験の報告は、我々の検索したかぎりではまだ存在しないように思われる。我々のこの成績は、若年発症・インスリン依存性の患者は、成人発症・インスリン非依存性の患者とは異なった病態を持っていることを示唆している。Gepts⁽¹²⁾は、若年発症糖尿病患者のうち、急激な経過をとり発症後3日ないしは180日の間に死亡した例に限って、免疫学的機序の関与を示唆するリンパ球と細網細胞を主とする浸潤が、膵ランゲルハンス氏島及びその周囲に高率に見られると報告しており、若年発症であっても、発症より2年以上の長期生存例においてはこの炎症所見は認められなかったと報告している。しかし、彼らのいう“急性若年型糖尿病”が“慢性若年型糖尿病”と、その発症機序において異なると断定する根拠は乏しいように思われる。彼らは、 β 細胞の水腫・核の異常がより著しいI型は、“急性型”及び“慢性型”にともに見られるのに対し、機能亢進を示唆するII型は、“急性型”においてのみ見られるとしている。しかし、同一症例の中で、I型とII型が混在した症例や、I型とII型の移行型と思われる所見が観察された症例もGepts⁽¹²⁾は記載している。このことは、急性の炎症を経過し、生存し得た患者の膵内分泌組織が疲弊し“慢性型”となり、急性期に見られた代償性機能亢進を示唆する所見が消失し、その結果としてI型を呈する可能性をも示唆している。もしこの考え方が正しいとすれば、我々の実験対象とした“慢性若年型”の糖尿病患者群において、ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原としたLMITで白血球遊走抑制が強いという成績は、Gepts⁽¹²⁾の記載した組織所見と矛盾しないものと考えられる。

次に、流血中抗ランゲルハンス氏島抗体(ICA)の問題がある。ICAは最初、自己免疫性疾患を合併する糖尿病患者に多く検出され、若年発症糖尿病にはあまり関係しないであろうとBottazzoら⁽³⁾、MacCuishら⁽²³⁾によって報告された。ところが、発症後期間の短い若年発症の患者においても多くみだされることが最近確認されるに至った⁽¹⁸⁾。しかし、我々のLMITの成績では罹病期間による差は認められなかった。Doniach⁽¹¹⁾はMIF陽性者とICA抗体陽性者は必ずしも一致せず、それぞれ糖尿病における免疫異常の異なった面を示すものであろうと述べている。ICAは体液性の因子であるのに対し、一般に、白血球遊走阻止因子を初めとする細胞性免疫に基づく反応が長期間の反応力を維持することを考えると、我々の成績とICAに関する知見は必ずしも矛盾するものではない。

Nerupら⁽³¹⁾⁽³²⁾、Wrightら⁽³⁷⁾は、それぞれウシ胎児膵抽出物、ラット膵ランゲルハンス氏島ホモジネートを或る種のマウスに投与する事により、膵ランゲルハンス氏島 β 細胞の変性、ランゲルハンス氏島或いはその周囲への単核球の浸潤を認め、また、耐糖能異常をマウスに発症させ得たと報告している。これは、膵ランゲルハンス氏島抗原が糖尿病の発症に強い関わりを持つことを意味すると考えられる。この成績と我々の成績を合わせて考えると、若年発症・インスリン依存性の患者の糖尿病の発症に、膵ランゲルハンス氏島を抗原とする何らかの自己免疫の機序が関与していることが想定される。

しかし一方、インスリン依存例においてLMIT陽性率が有意に高いことは、ここに示された成績が外因性インスリンあるいはそれに含まれる夾雑物に対する免疫反応である可能性を否定し難い。とくにウシ膵抽出物にはインスリンを含有していると考えられ、この場合、LMIT陽性の成績はインスリンに対する免疫反応である可能性を当然考慮しなければならない。これに対し、ラット膵ランゲルハンス氏島ミトコンドリア分画には、その抽出法から考えて、インスリンを含んでいるとは考え難い。しかしなお、インスリン製剤中に含まれる夾雑物に対する免疫反応である可能性を否定し難い。この問題は、今後インスリン投与前の新鮮発症例、あるいは精製インスリン製剤投与例等について検索することによって明らかにされるであろう。

最後に、我々の実験では、ラット肝ミトコンドリアを抗原として用いた場合には LMIT において何らの有意差も認められなかったが、ラット脾ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを用いると LMIT に明白な差が認められたことを指摘しておきたい。Goldstone ら⁽¹³⁾は Richens ら⁽³³⁾や Calder ら⁽⁴⁾の実験をも含めて考案し、ミトコンドリアには臓器特異性が無いと述べている。しかし、我々の成績はこれに反するものであり、ミトコンドリアの抗原性にも臓器特異性が存在しうることを示している。

結 語

糖尿病患者における LMIT について検索し、以下の成績を得た。

1. ラット肝ミトコンドリアを抗原とした場合、正常人と糖尿病患者、若年発症患者群と成人発症患者群、インスリン依存性患者群と非依存性患者群、家族歴を有する患者群と有しない患者群、糖尿病性網膜症を有する患者群と有しない患者群の各群間には有意差は認められなかった。

2. ウシ脾抽出物を抗原とすると、成人発症群に比し若年発症群にて、又、網膜症を有する群にて有しない群に比し、それぞれ白血球遊走は抑制される傾向が認められた。

3. ラット脾ランゲルハンス氏島ミトコンドリアを抗原として用いた場合、若年発症患者群にては成人発症患者群に比し、又、インスリン依存性患者群にては非依存性患者群に比し、それぞれ白血球遊走は有意に抑制されていた。

以上の成績に基き、若年発症インスリン依存性糖尿病の発症因子として、自己免疫機序の関連する可能性について論じた。

文 献

- 1) Bendixen, G. and Søbørg, M.: A leucocyte migration technique for in vitro detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in man. *Dan. Med. Bull* 16: 1-6, 1969.
- 2) Boddie, A.W.Jr., Holmes, E.C., Roth, J.A. and Morton, D.L.: Inhibition of human leukocyte migration in agarose by KCl extracts of carcinoma of the lung. *J. Cancer* 15: 823-829, 1975.
- 3) Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A. and Doniach, D.: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* II: 1279-1282, 1974.
- 4) Calder, E.A., McLeman, D., Barnes, E.W. and Irvine, W.J.: The effect of thyroid antigens on the in vitro migration of leucocytes from patients with Hashimoto thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.* 12: 429-438, 1972.
- 5) Cataneo, R., Saibene, V. and Pozza, G.: Peripheral T-lymphocytes in juvenile-onset diabetics (J.O.D.) and in maturity-onset diabetics (M.O.D.). *Diabetes* 25: 223-226, 1976.
- 6) Clausen, J.E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. *Acta. Allergol* 26: 56-80, 1971.
- 7) Clausen, J.E.: Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from tuberculin-stimulated cultures of human mononuclear leukocytes demonstrated by two step MIF agarose assay. *J. Immunol.* 110: 546-551, 1973.
- 8) Cudworth, A.G. and Woodrow, J.C.: HL-A system and diabetes mellitus. *Diabetes* 24: 345-349, 1975.
- 9) Delespesse, G., Duchateau, J., Bastenie, P.A., Lauvaux, J.P., Collet, H. and Govaerts, A.: Cell-mediated immunity in diabetes mellitus. *Clin. Exp. Immunol.* 18: 461-467, 1974.
- 10) Delespesse, G., Bastenie, P.A., Duchateau, J. and Kennes, B.: Cellular thyroid autoimmune reactions in diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 7: 59-61, 1975.
- 11) Doniach, D.: personal com-

- munication. 12) Gepts, W.: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14: 619–633, 1965. 13) Goldstone, A.H., Calder, E.A., Barnes, E.W. and Irvine, W.J.: The effect of gastric antigens on the in vitro migration of leucocytes from patients with atrophic gastritis and pernicious anemia. *Clin. Exp. Immunol.* 14: 501–508, 1973. 14) Howell, S.L., Fink, C.J. and Lacy, P.E.: Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans. *J. Cell. Biol.* 41: 154–161, 1969. 15) Hubert, C., Duchateau, J., Kennes, B. and Delespesse, G.: B- and T-lymphocytes in diabetes mellitus. Preliminary results. 115–116: Ed. by P.A. Bastenie and W. Gepts, *Immunity and autoimmunity in diabetes mellitus*, American Elsevier Publishing Co. Inc., New York. 1974. 16) 今井浩三, 阿部 弘, 谷内 昭: 白血球遊走阻止試験の改良. *医学のあゆみ* 94: 26–28, 1975. 17) Irvine, W.J., Clarke, B.F., Scarth, L., Cullen, D.R. and Duncan, L.J.P.: Thyroid and gastric autoimmunity in patients with diabetes mellitus. *Lancet* II: 163–168, 1970. 18) Irvine, W.J., McCallum, C.J., Gray, R.S., Campbell, C.J., Duncan, L.J.P., Farguhar, J.W., Vaughan, H. and Morris, P.J.: Pancreatic islet-cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease, and HLA type. *Diabetes* 26: 138–147, 1977. 19) Lendrum, R., Walker, G. and Gamble, D.R.: Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet* I: 880–883, 1975. 20) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275, 1951. 21) MacCuish, A.C., Campbell, C.J., Duncan, L.J.P. and Irvine, W.J.: Cell mediated immunity to human pancreas in diabetes mellitus. *Diabetes* 23: 693–697, 1974. 22) MacCuish, A.C., Urbaniak, S.J., Campbell, C.J., Duncan, L.J.P. and Irvine, W.J.: Phytohemagglutinin transformation and circulating lymphocytes subpopulations in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes* 23: 708–712, 1974. 23) MacCuish, A.C., Barnes, E.W., Irvine, W.J. and Duncan, L.J.P.: Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet* II: 1529–1531, 1974. 24) 長岡研五, 鍋谷 登, 桜美武彦, 深瀬政市: 糖尿病患者の抗甲状腺抗体. *日内分泌会誌*. 51: 573–579, 1975. 25) 長岡研五, 鍋谷 登, 桜美武彦, 久野昭太郎: 糖尿病患者の細胞性免疫学的研究. (第一報)・*日内分泌会誌*. 53: 1–8, 1977. 26) 中沢道夫, 中村周治, 坂口 晋, 河野泰子, 柳木秀生, 川元孝久, 園田智子, 山下俊作, 川 明: 日本人糖尿病患者における HLA. *医学のあゆみ*. 100: 682–684, 1977. 27) Nerup, J., Bendixen, G. and Binder, C.: Autoimmunity in diabetes mellitus. *Lancet* II: 610–611, 1970. 28) Nerup, J., Andersen, O.O., Bendixen, G., Egeberg, J. and Poulsen, J.E.: Anti-pancreatic cellular hypersensitivity in diabetes mellitus. *Diabetes* 20: 424–427, 1971. 29) Nerup, J., Andersen, O.O., Bendixen, G., Egeberg, J. and Poulsen, J.E.: Anti-pancreatic, cellular hypersensitivity in diabetes mellitus. Antigenic activity of fetal calf pancreas and correlation with clinical type of diabetes. *Acta. Allergol.* 28: 223–230, 1973. 30) Nerup, J. and Binder, C.: Thyroid, gastric and adrenal auto-immunity in diabetes mellitus. *Acta. Endocrinol.* 72: 279–286, 1973. 31) Nerup, J., Andersen, O.O., Bendixen, G., Egeberg, J., Gunnarsson, R., Kromann, H. and Poulsen, J.E.: Glucose intoler-

ance and islet damage in mice immunized with homologous endocrine pancreas. — A preliminary communication. *Horm. Metab. Res.* 6: 173–175, 1974.

32) Nerup, J., Andersen, O.O., Bendixen, G., Egeberg, J., Gunnarsson, R., Kromann, H. and Poulsen, J.E.: Cell-mediated immunity in diabetes mellitus. *Proc. R. Soc. Med.* 67: 506–513, 1974.

33) Richens, E.R., Ancill, R.J., Gough, K.R. and Hartog, M.: Cellular hypersensitivity to mitochondrial antigens in diabetes mellitus. *Clin. Exp. Immunol.* 13: 1–7, 1973.

34) Richens, E.R., Irvine, W.J., Williams, M.J., Hartog, M. and Ancill, R.J.: Cellular hypersensitivity to mitochondrial antigens in diabetes mellitus and its relationship to presence of circulating autoantibodies: *Clin. Exp. Immunol.* 17: 71–75, 1974.

35) 峠 哲哉，関口守正，佐丸義夫，藤井源七郎，服部孝雄：寒天内白血球遊走阻止試験の基礎的条件の検討・アレルギー. 24: 591–598, 1975.

36) Whittingham, S., Mathews, J.D., Mackay, I.R., Stocks, A.E., Ungar, B. and Martin, F.I.R.: Diabetes mellitus, autoimmunity, and ageing. *Lancet* I: 763–767, 1971.

37) Wright, P.H., Gingerich, R.L., King, S. and Lacy, P.E.: Pancreatic lesions induced in rabbits and guinea-pigs with pancreatic antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 25: 328–337, 1976.

38) Zamecnik, P.C. and Keller, E.B.: Relation between phosphate energy donors and incorporation of labelled aminoacids into protein. *J. Biol. Chem.* 209: 337–354, 1954.