

ネコ抗インスリン IgG の生物学的結合特性に関する研究

2015年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

鈴木貴文

# ネコ抗インスリン IgG の生物学的結合特性に関する研究

鈴木貴文

目次

背景	1
第一章	
緒言	5
実験材料及び実験方法	7
実験結果	11
考察	17
小括	19
第二章	
緒言	20
実験材料及び実験方法	22
実験結果	26
考察	31
小括	34
第三章	
緒言	35
実験材料及び実験方法	37
実験結果	39
考察	42
小括	44
総括	45
謝辞	46
引用文献	47

## 背景

IgG に代表される免疫グロブリン（抗体）は B リンパ球から分化した形質細胞により産生される糖タンパク質であり、非自己である細菌やウイルス、腫瘍細胞などの異物（抗原）を認識して排除する液性免疫の重要な因子として知られている。また、過剰な免疫反応が自己に対して働くことが原因となって、正常な細胞や組織に対する IgG や IgM などの抗体が産生されることがあり、これらの抗体は自己抗体と呼ばれている。自己抗体はリウマチや重症筋無力症および全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患の患者の多くに認められ、正常な組織を傷害することでその病因となる[1]。いっぽう、健康な生体であってもさまざまな血清タンパク質や細胞表面物質、細胞内物質に反応する自己抗体が、特別な抗原刺激がなくても自然に産生され、このような自己抗体は自然自己抗体とよばれている[8]。自然自己抗体は、老化・変性した自己分子や腫瘍細胞などの排除、B リンパ球の分化抑制による免疫機能の調節など個体の恒常性を維持するための生体にとって必要な役割を担うと考えられている[24, 47]。

インスリンに対する抗体は、ヒトの 1 型糖尿病患者[32]やインスリン製剤による治療を受けたことのある患者[36]、インスリン自己免疫症候群の患者[6]においてその存在が示されてきた。ヒトの 1 型糖尿病患者においては、抗インスリン抗体はインスリン産生細胞である自身の膵臓  $\beta$  細胞を抗原として結合し、自己免疫性膵島炎を誘発して不可逆的な細胞障害を起こす。抗インスリン抗体の抗体価は、膵島炎の初期段階において上昇していることが報告されており[11, 48]、ヒトの 1 型糖尿病の診断マーカーの 1 つとされている[33]。また、ウシやブタ由来のインスリン製剤は、ヒトインスリンとはアミノ酸配列が異なる。このため他種動物由来のインスリン製剤を投与されているヒト糖尿病患者では、抗インスリン抗体が産生され、このような抗インスリン抗体は、投与されたインスリンと結合し、その効果を低減する“インスリン抵抗性”の原因となる[40, 46]。インスリン抵抗性により、食後高血糖が強く発現することや、投与されたインスリンの効果が遅れて現れるために、インスリン投与後の低血糖が通常よりも遅く発現することがある[46]。インスリン自己免

疫症候群は、インスリン製剤による治療の経験がないにも関わらず血中に抗インスリン抗体が認められ、突発的な低血糖を起こすことを臨床的特徴とする[5, 15, 19]。インスリン自己免疫症候群については、 $\alpha$ -リポ酸やメチマゾールなどのSH基をもつ物質の投与が誘発する可能性が報告されている[25]。これらの物質が持つSH基によってインスリンのS-S結合が還元され、A鎖とB鎖に開裂すると、通常は抗原として認識されない部分が分子表面に露出し、抗原として認識されて抗体が産生されると考えられている。インスリン自己免疫症候群の患者では、抗体の結合によってインスリン作用が阻害されるため、生理的に活性である血中のインスリン量が減少し、代償性にインスリン分泌が増加して、抗体と結合しているインスリンを含めた血中のインスリン濃度が上昇している。しかし、インスリン自己免疫症候群の患者が保有する抗インスリン抗体のインスリンに対する親和性が低い[12] ために突発的に抗体からインスリンが解離することがあり、重篤な低血糖を起こすことがある[2, 37]。このように、抗インスリン抗体はヒトにおいて血糖値のコントロールに悪影響を及ぼす存在として知られてきた。一方 Quintana ら[35] は、血糖値が正常である健康なヒトにおいてインスリンと結合するIgGやIgMが存在することを報告している。さらに健康なC57BL/6マウスにおいてインスリンと親和性のあるIgMが検出されたという報告[34]も存在する。ヒトやマウスにおいて確認された抗インスリン抗体は、自己免疫性膵島炎、インスリン抵抗性および突然の低血糖の原因とはなっておらず、生体に対する悪影響は報告されていない。これらのヒトとマウスにおける抗インスリンIgGやIgMは、外来性のインスリンに対する抗体ではなく、自己分泌インスリンに結合する自然自己抗体である。自然自己抗体は、老化・変性した自己分子や腫瘍細胞などの排除などの個体の恒常性を維持するために必要な役割を担う[24]と考えられていることから、ヒトやマウスにおいて確認されたIgGやIgMは、変性したインスリンを排除する役割を担う可能性がある。

ネコの抗インスリン抗体については、2000年にHoenigら[18]によって異種動物（ヒトおよびブタ）由来のインスリン投与歴のある糖尿病ネコの血清から検出されたことが報告されている。またHoenigら[18]は、インスリン投与歴のないネコではインスリンに対する自

己抗体が検出されなかったことも併せて報告している。2010年になって、Nishiiら[29]はインスリン投与歴のない健康なネコの血清にインスリンに親和性のある自己抗体(IgG)が存在することを初めて報告した。この報告では、放射性同位元素で標識したインスリンと抗インスリンIgGを用いたラジオイムノアッセイによって親和性が解析された。そのスキッチャードプロットは最初に急激に低下し、その後緩やかに低下する2相性の曲線となったことから、抗インスリンIgGが異なる親和性をもつIgG分子群から構成されることが示唆されている。Nishiiら[29]はインスリンのA鎖またはB鎖を認識する2種類の抗ラットインスリンモノクローナル抗体を用いたネコインスリン測定用サンドイッチELISAの開発過程において、無処置の血漿では不可能であったインスリン濃度の測定が、血漿から酸-アルコール処置によりグロブリンを除去することで測定可能となったこと、すなわち抗インスリンIgGが血清中でインスリンと結合し、濃度測定用の抗体との結合を阻害するために測定できない可能性を推察している。さらにNishiiら[29]は、抗ラットインスリン抗体を固相化したマイクロプレートにネコの血清を添加し、標識抗ネコIgG抗体を添加するサンドイッチELISAの検出系を利用して、ネコの血清中の抗インスリンIgG-インスリン複合体を検出している。またTakashimaら[44]は、測定した84頭の健康なネコの血清すべてから抗インスリンIgGを検出し、測定したインスリン濃度と抗インスリンIgG濃度がそれぞれ0.05-0.9  $\mu\text{M}$ と0.5-10.8  $\mu\text{M}$ であったこと、さらに抗インスリンIgG濃度は血清総IgG濃度と正の相関があったことを報告している。これらの報告[29, 44]から、ネコの血中にはインスリン分子をすべて結合する量の抗インスリンIgG分子が存在し、過剰に存在する抗インスリンIgGが分泌されたほとんどのインスリンに結合して、IgG-インスリン複合体の状態で全身を循環している可能性が考えられる。

内因性ホルモンに結合するタンパク質に関する研究はヒトの甲状腺ホルモン結合タンパク質において古くから行われてきた[30, 38, 43]。甲状腺ホルモンはアルブミン、チロキシン結合グロブリン、チロキシン結合プレアルブミンの3つのタンパク質に結合した状態で血中を循環している[31]。これらのタンパク質に関する研究はまずそれぞれのタンパク

質の精製を行い、その後個々のタンパク質のホルモン分子に対する親和性や最大結合容量などの結合特性を調べることで進められてきた[31, 42]。ネコの抗インスリン IgG に関する研究の最終的な目的は、ネコの保有する抗インスリン IgG の生理的役割を解明することであるが、本研究ではその最初のステップとして、抗インスリン IgG の生物学的性状、とくに結合特性を解明することを目的として、第一章では健康なネコの血清から抗インスリン IgG を分離・精製することを試みた。第二章では抗インスリン IgG のインスリンに対する結合親和性とエピトープを解析した。さらに第三章では、インスリンとその受容体の結合に抗インスリン IgG が与える影響について検討した。

## 第一章

### アフィニティークロマトグラフィーによるネコ抗インスリン IgG の分離精製

#### 緒言

IgG は血液や腹水を材料として、分子量や分子構造の違い、特異的な結合性を利用した精製方法を組み合わせて夾雑物を取り除き、段階的に純度を高めていくことで精製する。血液を材料として用いる場合、血液を凝固させ、遠心分離によって血清以外の細胞成分やフィブリンを除去する。次にアルブミンやトランスフェリン、リポタンパク質などの IgG 以外の様々なタンパク質が高濃度に存在する血清から IgG を回収するため、プロテイン A やプロテイン G をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーが用いられることが多い。プロテイン A やプロテイン G をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーは、プロテイン A やプロテイン G が IgG の Fc 領域と強い親和性を持つことを利用した精製法であり、IgG をワンステップで高純度に精製することができるという利点がある。しかし、プロテイン A やプロテイン G は IgG と強固に結合し、その親和性が高いために溶出には pH 3 付近の酸性バッファーを必要とすることが多く、酸性バッファーによる溶出は IgG が変性する可能性がある。血清から IgG を回収する別の方法として、Melon Gel カラムを用いたアフィニティー精製がある[17]。Melon Gel カラムには血清、培養上清、腹水に含まれる典型的なタンパク質と結合するリガンドが固定化されており、サンプルを Melon Gel カラムに通すことにより、IgG 以外のタンパク質がカラムに捕捉され、素通り画分に IgG (総 IgG) を回収することができる。Melon Gel カラムを用いたアフィニティー精製は生理的 pH に近いバッファー条件で精製操作を行うため、抗体の変性や凝集の心配がなく、また回収サンプルの中和や脱塩も必要ない。本研究では可能な限り IgG の変性を避けるため、Melon Gel カラムを用いたアフィニティー精製により総 IgG を精製した。さらに、これまでのネコにおける抗インスリン IgG に関する報告[29, 44]により、インスリンに比べて過剰に存在する抗インスリン IgG が分泌されたほとんどのインスリンに結合して、IgG-インスリン複合体



の状態です。全身を循環していることが示唆されていることから、本研究では Melon Gel カラムを用いて精製された総 IgG が内因性インスリンと複合体を形成している可能性を考え、インスリンと結合した IgG を解離させ、回収する目的で酸処理と限外濾過を行った。酸処理は Gerbitz ら [14] が報告したヒト糖尿病患者のインスリン-抗インスリン IgG 複合体から内因性インスリンを解離させた方法を一部改変して用い、IgG の分子量 (150,000 Da) とインスリンの分子量 (5,800 Da) の差を利用して両者を分離できる限外濾過ユニットによる精製と組み合わせることで、ネコの血清中の総 IgG をインスリンから遊離させて回収した。第一章では精製工程の最後に、回収された総 IgG からインスリンに親和性を有する IgG のみを精製するため、インスリンをリガンドにしたアフィニティークロマトグラフィーを行ったが、Nishii ら [29] の報告においてインスリンに対する親和性の異なる複数の抗インスリン IgG が存在することが示唆されているため、インスリンに対する親和性の異なる IgG 分子群を分けて溶出させる溶出条件を模索した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 血液サンプル

本研究ではインスリン投与歴のない臨床的に健康な8頭のイエネコ（雄4頭，雌4頭）から採取した血清を用いた。各個体の年齢，性別，体重，ボディーコンディションスコア（BCS）（4～5を標準体型とする9段階方式）[22]を表1に示す。遠心分離（4℃，1000×g，15分）して血清を分離後，混合して150 mlの血清プールとし，マイクロチューブに1 mlずつ分注して-80℃で保存した。

### 2. 抗インスリン IgG を含んだ総 IgG の精製

血清から抗インスリン IgG を含んだ総 IgG を精製するため Melon™ Gel Chromatography Cartridge (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) を用い，仕様書に従って精製した。この方法により総 IgG は生理活性を保ったままカラムを素通りして回収することができる[17]。

### 3. インスリン-抗インスリン IgG 複合体からの内因性インスリンの除去

インスリン-抗インスリン IgG 複合体から内因性インスリンを解離させるため，Gerbitz ら[14]らが報告しているヒト糖尿病患者のインスリン-抗インスリン IgG 複合体から内因性インスリンを解離させた方法を一部改変して用いた。1 ml のメロンゲル精製液に対して150  $\mu$ l の1 N HCl を加え，30,000 Da の分子量を境に濾過できる限外濾過ユニット（Vivaspin 20; GE Healthcare, Uppsala, Sweden）に移し，3,500 rpm で30分遠心分離することで内因性インスリンを除去した。遠心分離後，中和のため20 ml の0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.14 M NaCl，pH 7.2（PBS）を濃縮液に加え，液量が約1 ml となるまで再び遠心分離し，再濃縮液をアフニティークロマトグラフィーに適用した。

### 4. アフニティークロマトグラフィー

ネコ抗インスリン IgG との特異的結合が確認されている [29] ウシインスリン (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) を HiTrap NHS (n-hydroxysuccinimide)-activated HP column (17-0716-01; GE Healthcare) に仕様書に従い固相化した。ネコインスリンとウシインスリンの違いはネコインスリンにおいて A 鎖の第 18 アミノ酸残基がヒスチジンであるのに対して、ウシインスリンではアスパラギンに変わっていることのみ [16] である。Nishii ら [29] はヨード標識ウシインスリンと非標識インスリンを用いたラジオイムノアッセイによりネコ抗インスリン IgG と結合したヨード標識インスリンが非標識インスリンに競合的に置き換わることからウシインスリンとネコ抗インスリン IgG の結合を確認している。

限外濾過した濃縮液に等量の結合バッファー (3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5) を加え、これを結合バッファーで平衡化したカラムに添加した。カラムを 1 時間室温でインキュベートした後、抗インスリン IgG は高速液体クロマトグラフィーシステム (PX-8010; Toso Co., Ltd., Tokyo, Japan) によりインスリンに対する親和性に応じて分画した。液体クロマトグラフィーシステムの機器構成は、ポンプ (CCPM; Toso Co., Ltd.), 脱気装置 (GASTORR BG-12, Flom, Tokyo, Japan), UV メーター (UV-8010, Toso Co., Ltd.), 解析装置 ( $\mu$ 7 Data Station; System Instrument Co., Ltd., Tokyo, Japan) である。

抗インスリン IgG の溶出に適切な条件を決めるため、塩化ナトリウムやグリシン, pH の異なるさまざまな溶出条件を試し、以下の 3 つの溶出条件においてピークが得られた。中でも溶出条件 3 において明確なピークが観察されたため、分離精製条件として以下の実験に用いた。条件 3 では 3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5 で 20 分間カラム内を洗浄した後、10 分間で 100% 3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5 から 50% 0.05 M phosphate buffer solution へ直線的に濃度勾配をかけて溶出した。続いて 5 分間そのまま 50% 0.05 M phosphate buffer で維持し、再び 10 分間で 50% 3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5 から 100% 0.05 M phosphate buffer に濃度勾配をかけて溶出した。最後にカラムは 0.05 M phosphate buffer で 15 分間洗浄した。溶出流速は 0.5 ml/min に設定し、1 つの試験管の溶出時間は 3 分間と

した。総溶出時間は 60 分であった。溶出したタンパク質は 280 nm の吸光度で検出した。

表1．供血ネコの概要

番号	年齢(歳)	性別	ボディーコンディションスコア	体重(kg)	採血量(ml)
1	6	去勢雄	5	4.00	12.0
2	9	雄	5	3.64	12.0
3	8	雄	4	3.28	12.0
4	4	避妊雌	5	3.12	12.0
5	10	雌	5	2.80	12.0
6	4	雄	5	3.60	49.5
7	4	雌	4	3.40	50.0
8	12	避妊雌	4	2.68	48.5

血液はインスリン投与歴のない臨床的に健康な8頭のイエネコ（雄4頭，雌4頭）から一頭あたり12～50 mlを採取した。供血ネコの年齢は4～12歳，ボディーコンディションスコア（9段階）は4～5，体重は2.68～4.00 kgであった。

## 実験結果

抗インスリン IgG のアフィニティークロマトグラフィーでは塩化ナトリウム、グリシンおよび pH の異なる 3 つの溶出条件（表 2）で分画が得られた。

条件 1 では、カラムに固相化したウシインスリンと抗インスリン IgG の結合条件 (3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5) のまま 20 分間カラム内を洗浄することで一つ目の分画 (A) が得られた。その後結合条件から 0.05 M phosphate buffer (PB) に溶出液を切り替えてステップワイズ溶出することで二つ目の分画 (B) が得られた。しかし、さらにその後 0.05 M PB, 0.1 M クエン酸, pH3 に溶出液を切り替えても三つ目の分画は観察されなかった。条件 1 によって得られた 2 つの画分を、それぞれ分画 A および分画 B とした (図 1)。条件 1 のクロマトグラフは高いピークが得られたが試験管番号 10 と 11 で一度分画の形が変わっており、二つの分画が重なって溶出されている可能性があった。

条件 2 では、条件 1 と同様にウシインスリンと抗インスリン IgG の結合条件のまま 20 分間カラム内を洗浄して素通り分画である一つ目の分画 (C) を得た後、溶出液を結合条件 (3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5) から 0.05 M PB に 40 分かけて切り替えてグラジエント溶出した。条件 2 では、図 2 に示すように、なだらかな分画 (D) が観察された。条件 2 によって得られた 2 つの画分を、それぞれ分画 C および分画 D とした (図 2)。この方法ではグラジエント溶出に時間をかけたため低いピークとなったが、この溶出条件でも試験管番号 18 から 19 にかけて吸光度が低下しており、二つの分画が重なって溶出されている可能性があった。

条件 3 では、ウシインスリンと抗インスリン IgG の結合条件のまま 20 分間カラム内を洗浄し、分画 (E) を溶出させた後、10 分間で溶出液の 50% を 0.05 M PB へ直線的に濃度勾配をかけて切り替えてグラジエント溶出し、5 分間そのまま維持し、再び 10 分間で溶出液を 100% 0.05 M PB に切り替えてグラジエント溶出した。この溶出条件では、これまでの条件で重なっていたと思われる F と G の二つの分画が明確に分離された。条件 3 によって得られた 3 つの画分を、それぞれ分画 E, 分画 F および分画 G とした (図 3)。分画 E はカラム

に固相化したインスリンに結合せずに溶出した素通り分画である。分画 F と分画 G に含まれるタンパク質はインスリンと結合していた IgG (抗インスリン IgG) であり, 分画 F は溶出液が 1.5 M NaCl, 0.75 M glycine の条件で溶出し, 分画 G は 0 M NaCl, 0 M glycine (0.05 M phosphate buffer) の条件で溶出した。

表2. 溶出条件の検討で用いた条件

	溶出条件1	溶出条件2	溶出条件3
1	3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5	3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5	3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5
	ステップワイズ溶出	グラジエント溶出(40分)	グラジエント溶出(10分)
2	0.05 M phosphate buffer	0.05 M phosphate buffer	50% 3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5 50% 0.05 M phosphate buffer (5分間維持)
	ステップワイズ溶出		グラジエント溶出(10分)
3	0.05M PB, 0.1M クエン酸, pH3		0.05 M phosphate buffer

溶出条件 1~3 において一つの溶出液は共通で、抗インスリン IgG をカラムに結合させる結合条件(3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5)を用いた。溶出条件 1 では結合条件の後、溶出液を 0.05 M phosphate buffer に切り替えステップワイズ溶出し、さらにその後 0.05M PB, 0.1M クエン酸, pH3 に切り替えた。溶出条件 2 では結合条件の後、溶出液を 0.05 M phosphate buffer に 40 分かけて切り替えてグラジエント溶出した。溶出条件 3 では結合条件の後、10 分間で溶出液の 50% を 0.05 M phosphate buffer へ直線的に濃度勾配をかけて切り替えてグラジエント溶出し、5 分間そのまま維持し、再び 10 分間で溶出液を 100% 0.05 M phosphate buffer に切り替えてグラジエント溶出した。



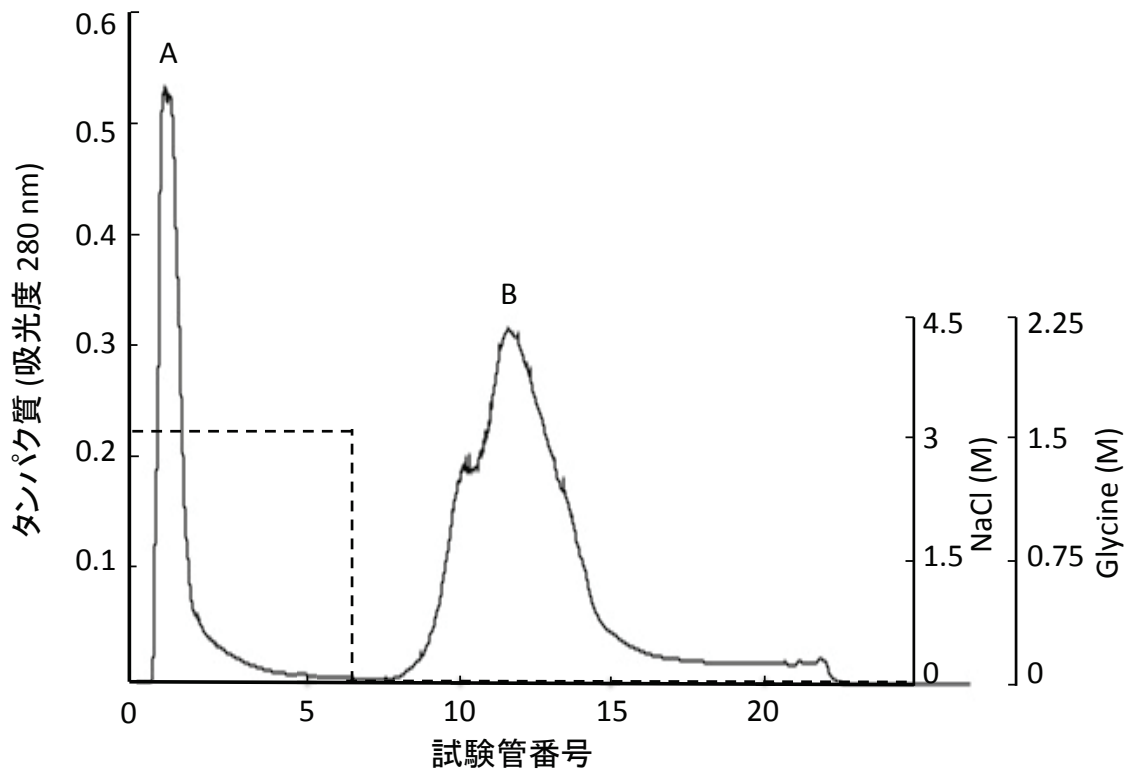


図1. 溶出条件1におけるクロマトグラフ

実線は280nmにおける吸光度，点線はNaClとglycineの濃度を示す。分画Aはインスリンカラムに結合しなかった素通り分画である。分画Bは0.05 M phosphate bufferの条件で溶出されたが試験管番号11で吸光度が低下していることから，試験管番号10をピークとする分画と試験管番号13をピークとする分画が重なって溶出されている可能性がある。その後0.05M PB, 0.1M クエン酸, pH3に溶出液を切り替えても三つ目の分画は観察されなかった。

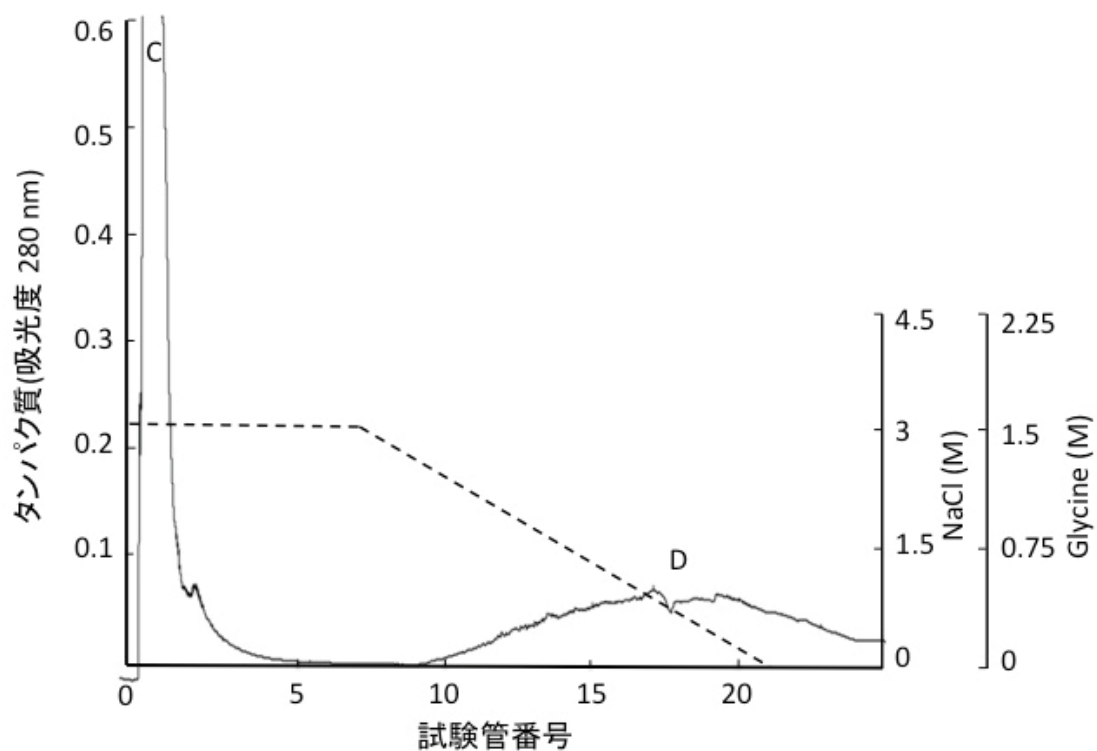


図2. 溶出条件2におけるクロマトグラフ

分画Cはインスリンカラムに結合しなかった素通り分画である。分画Dは溶出液を結合条件 (3 M NaCl, 1.5 M glycine, pH 8.5) から 0.05M PB に 40 分かけて切り替えてグラジエント溶出することで溶出された。試験管番号 18 で吸光度が低下しており、試験管番号 17 と試験管番号 19 をピークとする分画が重なって溶出されている可能性がある。

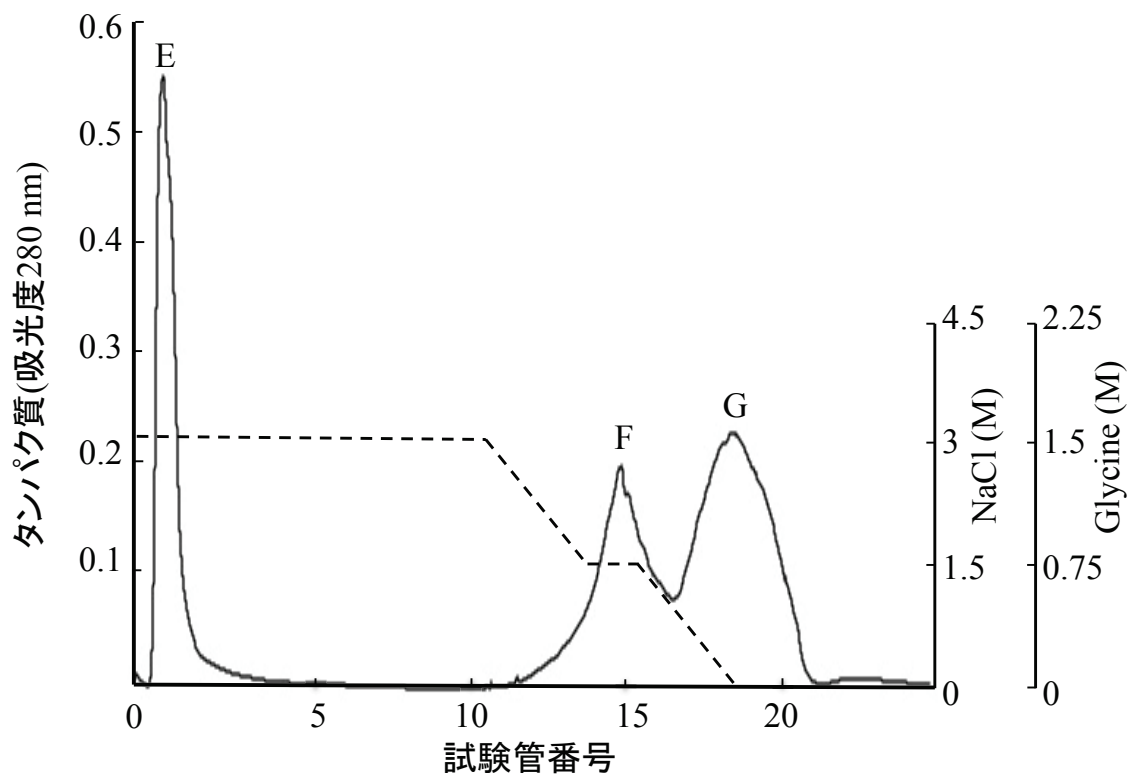


図3. 溶出条件3におけるクロマトグラフ

分画Eはインスリンカラムに結合しなかった素通り分画である。溶出条件3では、条件1および2で重なっていたと思われる2つの分画が明確にFとGに分離された。分画Fは1.5 M NaCl, 0.75 M glycine の条件で溶出され、分画Gは0 M NaCl, 0 M glycine (0.05 M phosphate buffer) の条件で溶出された。

## 考察

液体クロマトグラフィーは塩析を利用した沈殿や電気泳動ゲルによる分離などの手法と比べて大量のサンプル処理が可能であることや、生体分子の特性を利用して分離できることなどから、生体分子の分離、精製に広く利用されている。IgG と抗原の可逆的な結合には疎水性相互作用、静電相互作用、水素結合、ファンデルワールス力などの分子間引力が働いており、液体クロマトグラフィーによる IgG の精製では、特異的な親和性や表面電荷、疎水性など異なる分離特性の方法を組み合わせることで分子間引力に影響を与えることで精製効率を高めることができる。インスリンに対する親和性の異なる IgG 分子群を分けて精製するため、第一章ではインスリンに対する特異的な親和性と疎水性相互作用の違いによる分離を組み合わせることで利用した。まずインスリンを固相化したカラムを用いて抗インスリン IgG をインスリンに対する特異的な親和性を利用して吸着した。また抗インスリン IgG のインスリンに対する吸着を高い塩濃度とグリシン濃度の条件で行うことによって抗インスリン IgG とインスリンの静電相互作用を抑え、疎水性相互作用の影響を強めた。抗インスリン IgG の溶出には、低い塩濃度およびグリシン濃度の溶出液を用いて疎水性相互作用を弱めることで抗インスリン IgG を結合性の違いを利用して分離・精製した。塩濃度およびグリシン濃度の異なる溶出液を用いて溶出することで溶出液の pH の変化を最小限にしてインスリンの活性を維持できる温和な条件で分離ができる。溶出条件 1 のように、溶出液の塩化ナトリウムとグリシンの濃度を急激に低くすることで得られた高いピークを示す分画には IgG と推定されるタンパク質が高濃度に溶出されたが、分画が二つ重なっているような形をしているため、インスリンに対する親和性の異なる IgG 分子群が十分に分離されず、一度に溶出した可能性が考えられた。そこで条件 2 では、塩化ナトリウムとグリシンの濃度を徐々に低くするグラジエント溶出を行うことによってインスリンに対する親和性の異なる IgG 分子群の分離・溶出を試みた。しかし、条件 2 による分離法は、条件 1 で試みた分離法よりも検出されたタンパク質濃度が低くなったうえ、重なった分画の分離も不十分であったため、適切な分離法ではないと判断した。条件 3 では、溶出されるタンパク質の濃度を

高めるためにグラジエント溶出の時間を短くし、さらに分画の分離度を良好にするために20分間のグラジエント溶出を2回に分けて行った。最初の10分間のグラジエント溶出で分画Fが溶出され、5分間溶出液の条件を維持し、さらに塩濃度を低下させるグラジエント溶出を10分間実施することによって、分画Gが溶出するタイミングを遅らせて分離度を向上させることができた。溶出条件3では、インスリンに対する親和性の異なるIgG分子群を分けて溶出させることができたと考えられた。本研究で試みた塩濃度やグリシンの濃度の変化によるアフィニティークロマトグラフィーの結果から、抗インスリンIgGが異なる結合特性を持つ2つのIgG分子群から構成されることを示唆した。これは抗インスリンIgGのスキッチャードプロットが曲線となり、親和性の異なる2つのIgG分子群が存在する可能性を示したNishiiらの報告と一致する。このことから、ネコのインスリンには比較的親和性の低いIgG分子群（分画F）と親和性の高いIgG分子群（分画G）の大きく分けて2種類の抗インスリンIgG分子群が結合していると考えられた。分画Fと分画Gの抗インスリンIgGは溶出液の塩濃度とグリシン濃度の違いによって分離されたことから、インスリンとの疎水性相互作用が異なり、分画Fより分画Gのほうがインスリンとの結合性が強いことが示唆された。

## 小括

第一章ではウシインスリンを固相化したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりインスリンに対する親和性の異なる IgG 分子群を分けて溶出させることができた。このことは、抗インスリン IgG が 2 つの異なる結合特性を持つ IgG 分子群から構成されることを示唆する。また、2 つの IgG 分子群は、溶出液の塩濃度とグリシン濃度の違いにより分離されたことから、インスリンとの疎水性相互作用に違いがあると考えられた。

## 第二章

### 抗インスリン IgG のインスリンに対する結合親和性と抗原認識部位

#### 緒言

生体分子は単独では機能せず、特定の生体分子と相互作用することにより機能を発揮する  
場合が多い。生体分子と特定の生体分子の相互作用は、適切な結合特性（親和性と特異性）  
が必要である。生体分子の機能を解明する第一歩として特定の分子に対する親和性と特異  
性の解析が重要となる。結合親和性は、放射性同位元素で標識した分子を用いて結合型お  
よび解離型の分子濃度を測定し、スキッチャードプロット解析することで得られた解離  
定数（KD）として表される。スキッチャードプロット解析による結合親和性は多くの研  
究において分子間の結合の強さを表す尺度として使用されてきた。しかしこの方法は、放  
射性同位元素を利用した標識と、煩雑な実験手技が必要である。近年になって、表面プラ  
ズモン共鳴（surface plasmon resonance, SPR）現象を利用した分子間相互作用解析装置  
が開発され[23]、リアルタイムかつ高感度に生体内分子間の結合と解離の過程を非標識で  
観測し、結合速度定数(Ka)と解離速度定数(Kd)を求めてKDを算出することを可能にした。  
SPR現象を利用した分子間相互作用解析装置を用いることにより、KaとKdを求めること  
によって結合の強さがわかるだけでなく、その結合と解離が早いか遅いかという速度論的解  
析を行うことができるようになった。現在SPR現象を利用した分子間相互作用解析装置は  
創薬・食品添加物の研究分野など幅広い分野で利用されている[27, 28]。いっぽう、分子  
間の相互作用に関わる特異性の解析には、生体分子が特定の分子を認識して結合する部位  
を検討する目的で、特定の分子のアミノ酸配列を基にして合成された一定の長さのペプチ  
ドを用いて、生体分子のペプチドに対する結合性を評価するエピトープ解析が利用されて  
いる。結合部位を詳細に検討する工夫として、アミノ酸配列からペプチドを合成する際に、  
ペプチドの両端を前後のペプチドとオーバーラップさせることによって目的とする分子の  
すべての領域に対する結合性を評価できるように設計することや、マイクロプレートプレ

ートへのペプチドの固定により固定側のペプチド断端に対する分子の結合性が実際より低く評価されることを防ぐために、ペプチド断端をビオチンなどで修飾して結合方向を統一することが採用されている。

第一章で実施した抗インスリン IgG のアフィニティークロマトグラフィーではインスリンに対する親和性の異なる 2 つの IgG 分子群を分離・精製することができた。これら 2 つの IgG 分子群は、溶出された溶出液の塩濃度とグリシン濃度が異なることから、これらの分画に含まれる抗インスリン IgG のインスリンに対する結合特性が異なることが示唆された。また Takashima ら [44] はネコ抗インスリン IgG のモル濃度がインスリンのモル濃度に比べて著しく高いことから、血中にある抗インスリン IgG は分泌されたインスリンと結合し、インスリン-IgG 複合体として全身を循環している可能性を示している。インスリンと比べ多量に存在する抗インスリン IgG の 2 つの分画がどのような結合特性をもち、インスリンと結合するのかを検討することは、抗インスリン IgG の生理的役割を解明する上で重要な情報となる。第二章では第一章で得られた 2 つの抗インスリン IgG 分画について、インスリンに対する親和性と抗原認識部位を解析した。親和性解析は、抗インスリン IgG とインスリンの速度論的解析が可能であること、さらに高感度であるため解析に必要な抗インスリン IgG とインスリンの量が微量であることから、表面プラズモン共鳴分析装置を用いた。また抗インスリン IgG のインスリンに対する特異性の解析のため、インスリンのアミノ酸配列を基に合成したペプチドを用いて抗インスリン IgG の結合性（エピトープ）を検討した。



## 実験材料および実験方法

### 1. 表面プラズモン共鳴分析法を用いた抗インスリン IgG の親和性解析

インスリンと抗インスリン IgG の結合親和性を解析するため、表面プラズモン共鳴分析法(BIAcore J; Biacore International AB, Uppsala, Sweden)を用いた。CM3 センサーチップ(GE Healthcare)を用いて、二つある流路のデキストラン表面を 0.2 M の n-ethyl-n'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (Amine Coupling Kit; GE Healthcare)と 0.05 M の n-hydroxysuccinimide (Amine Coupling Kit)の混合液を 140  $\mu$ l 添加することによって活性化した (図 4)。次に 10 mM の酢酸ナトリウム (pH 5.0)で 30  $\mu$ g/ml となるよう溶解したヤギ抗ネコ IgG 抗体(Goat Anti Cat IgG(H+L), 6080-01, Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) 180  $\mu$ l を添加することにより、この抗体をデキストラン表面に固定した。さらにヤギ抗ネコ IgG 抗体が結合していない活性化したセンサーチップのデキストラン表面をブロッキングするため 1.0 M のエタノールアミン (pH 8.5) (Amine Coupling Kit)を 80  $\mu$ l 添加した。最後に片方の流路のみにアフィニティークロマトグラフィーにより分画した抗インスリン IgG (20  $\mu$ g/ml)を 40  $\mu$ l 添加することによって抗インスリン IgG をデキストラン表面のヤギ抗ネコ IgG 抗体に固定した。ウシインスリン (Sigma-Aldrich Corporation)はアナライトとして、0.01 M の HEPES, 0.2 M の塩化ナトリウム, 0.05%の Tween20 と 6.6 mM の塩酸(pH 3.5)から成る HBS-N buffer (GE Healthcare)に 50  $\mu$ g/ml もしくは 100  $\mu$ g/ml で溶解した。抗インスリン IgG を添加した流路と添加していない流路の 2 つの流路にアナライト (インスリン) 溶液を流速 10  $\mu$ l/分, 25°Cで 80  $\mu$ l 添加した。デキストラン表面にヤギ抗ネコ IgG 抗体を介して固定した抗インスリン IgG にインスリンが結合する結合相の後、解離相として 4 分間同じ流速で HBS-N buffer を流してインスリンが抗インスリン IgG から解離する様子をモニタリングした。インスリンが抗インスリン IgG から解離した後、センサーチップを再利用するため 10 mM の glycine-HCl buffer solution (pH 1.7) を 80  $\mu$ l 添加した。

表面プラズモン共鳴分析法によりえられたセンサーグラムの解析は Biacore J evaluation software (BIAevaluation, Biacore International AB) で 1:1 Langmuir binding model を用い、結合速度定数 ( $K_a$ ) および解離速度定数 ( $K_d$ ) を求め、解離定数 ( $K_D$ ) を算出した。

## 2. 抗インスリン IgG の合成ペプチドに対する結合性解析 (エピトープ解析)

エピトープ解析には、ネコインスリンのアミノ酸配列をもとに作製し、ビオチン修飾した合成ペプチド (図 5) (Operon Biotechnology, Tokyo, Japan) を用いた。合成ペプチドはストレプトアビジンコートマイクロプレート (Immobilizer 96-well microplates, Nunc A/S Plastfabrikation, Roskilde, Denmark) にビオチンを介して同方向となるように結合させた。マイクロプレートに 200  $\mu$ l の 0.02 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.14 M NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.2 (PBS-T) を 3 回添加して洗浄した後、50 nM の合成ペプチドを 100  $\mu$ l ずつ添加して 2 時間室温でインキュベートして固相化した。再び上記の洗浄液で再び 3 回洗浄した後、抗インスリン IgG の非特異結合を減らすために、ブロックエース (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) 原液の 4 倍希釈液を 100  $\mu$ l ずつ添加して 2 時間インキュベートした。3 回洗浄した後、血清を免疫反応促進試薬である Can Get Signal 1 液 (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) で 100 倍希釈し、100  $\mu$ l ずつウェルに添加して室温で 30 分間インキュベートした。アフィニティークロマトグラフィーにより得た分画 F と G は、Can Get Signal 1 液で 10 倍希釈してウェルに分注 (100  $\mu$ l/well) し、血清と同様にインキュベートした。3 回洗浄した後、PBS-T で 20,000 倍に希釈した Horseradish Peroxidase-labeled Goat Anticat IgG-Fc detection antibody (Cat IgG ELISA Quantitation Set; Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) 100  $\mu$ l をウェルに添加して、1 時間インキュベートした。PBS-T (200  $\mu$ l) で 3 回洗浄して 100  $\mu$ l の TMB 液 (Cat IgG ELISA Quantitation Set) をウェルに添加し 10 分反応させた後、100  $\mu$ l の 1 M 硫酸により反応を停止させて 450 nm における吸光度を測定することによって抗インスリン IgG のインスリンに対するエピトープを解析した。

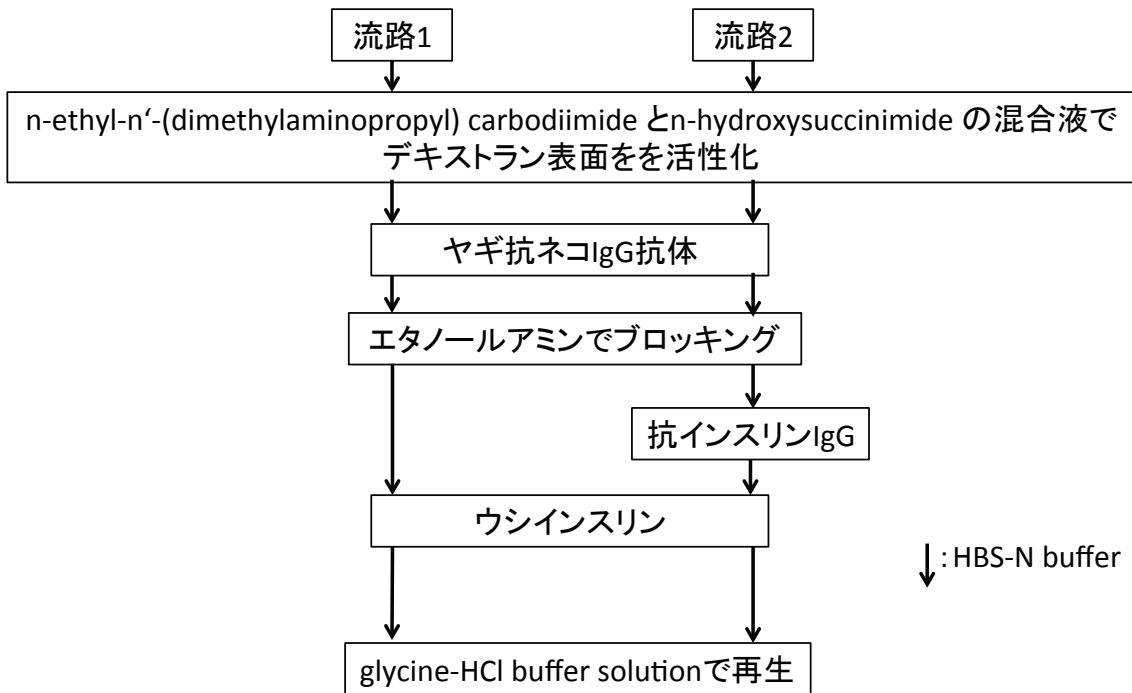


図 4. 表面プラズモン共鳴分析法を用いた抗インスリン IgG の親和性解析の手順

CM3 センサーチップを用いて、二つある流路のデキストラン表面を n-ethyl-n'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide と n-hydroxysuccinimide の混合液で活性化した。次にヤギ抗ネコ IgG 抗体を添加することにより、この抗体をデキストラン表面に固定した。さらにヤギ抗ネコ IgG 抗体が結合していない活性化したセンサーチップのデキストラン表面をブロッキングするためエタノールアミンを添加した。流路 2 だけにアフィニティークロマトグラフィーにより分画した抗インスリン IgG を添加することでデキストラン表面のヤギ抗ネコ IgG に固定した。抗インスリン IgG を添加していない流路 1 と添加した流路 2 の二つの流路にウシインスリンをアナライトとして添加した。ウシインスリンと抗インスリン IgG の結合相、解離相をモニタリングした後、glycine-HCl buffer solution を添加することでセンサーチップを再生した。

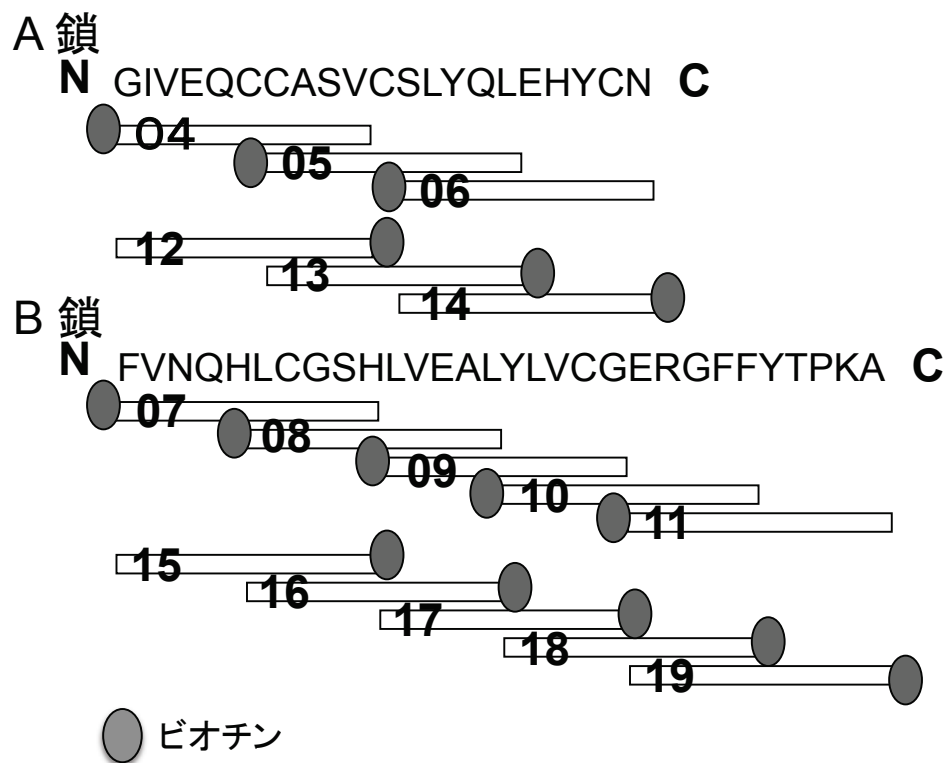


図 5. ネコインスリンのアミノ酸配列と合成ペプチドのアミノ酸配列  
 ネコインスリンのアミノ酸配列をもとに、抗体 (IgG) が認識するエピトープとなりうる 5～6 アミノ酸残基をオーバーラップさせた 10 アミノ酸残基からなる 16 種類の合成ペプチドを作成した。それぞれのペプチドの端はビオチンで修飾し、ビオチンを介してプレートに固定することで、ペプチドのプレートへの結合方向を統一した。

## 実験結果

### 1. 表面プラズモン共鳴分析法を用いた抗インスリン IgG の親和性解析

図6に表面プラズモン共鳴分析法を用いた抗インスリンIgGの親和性解析におけるセンサーグラムを示す。第一章で分離された抗インスリンIgGの分画を添加した流路のセンサーチップ表面の質量と添加しなかった流路の質量の差 (Resonance units:ウシインスリンの結含量) (黒線) は、インスリンを添加すると、センサーチップ表面に固定した抗インスリンIgGにインスリンが結合してセンサーチップ表面の質量が増加し (結合相)、インスリンの添加が終わるとインスリンの解離により質量が減少する1相性の結合と解離を示した。センサーグラムは結合相から解離相に移行する直前にResonance unitsが最大値となる。最大値は分画Fでは15.2 RUであったのに対して、分画Gでは23.2 RUであり、分画Fより分画Gのほうが高かった。赤線は非線形解析法を用いたカーブフィッティングにより作成された近似曲線を示す。センサーグラムと近似曲線はほぼ重なっており、良好なフィッティングを示したため、各分画のパラメーターを近似曲線から算出した (表3)。分画Fの結合速度定数は、分画Gと比較して4.4倍低く、解離速度定数は1.8倍高かった。[ $KD = Kd/Ka$ ]から算出される解離定数KDは、分画Fが $1.61e^{-4}$  M、分画Gが $2e^{-5}$  Mであり、分画Fが分画Gの10倍高い値を示した。

### 2. 抗インスリン IgG の合成ペプチドに対する結合性 (エピトープ解析)

図7に分画された抗インスリン IgG (分画FおよびG) と血清において最も高い吸光度を示したペプチドNo. 19の吸光度を1とし、それに対する相対的な吸光度を示す。分画Fと分画Gが高い吸光度を示した合成ペプチドは、共通する部分が多かった。分画FおよびGはインスリンB鎖のカルボキシル末端に相当する合成ペプチドNo. 19のほか、ペプチドNo. 18 (B鎖の16番目から25番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)、ペプチドNo. 8 (B鎖の6番目から15番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)、No. 13 (A鎖の7番目か

ら 16 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)および No. 15 (B 鎖の 1 番目から 10 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)にも高い吸光度を示した。しかし、ペプチド No. 5 (A 鎖の 7 番目から 16 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)に対する吸光度は他のペプチドに対して分画 F と分画 G の吸光度の差が大きく、分画 G では分画 F より高い吸光度を示した。インスリンのアミノ酸配列の同じ部位を基にした合成ペプチドであるペプチド No. 13 とペプチド No. 5 において、ペプチド No. 13 では分画 F と分画 G において吸光度の差は小さかったのに対して、プレートへの結合のためのビオチン修飾の位置が No. 13 とは逆であるペプチド No. 5 では差が大きかった。血清はインスリン B 鎖のカルボキシル末端に相当する合成ペプチド No. 19 のほか、ペプチド No. 18 (B 鎖の 16 番目から 25 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)、ペプチド No. 5 (A 鎖の 7 番目から 16 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)にも高い吸光度を示した。

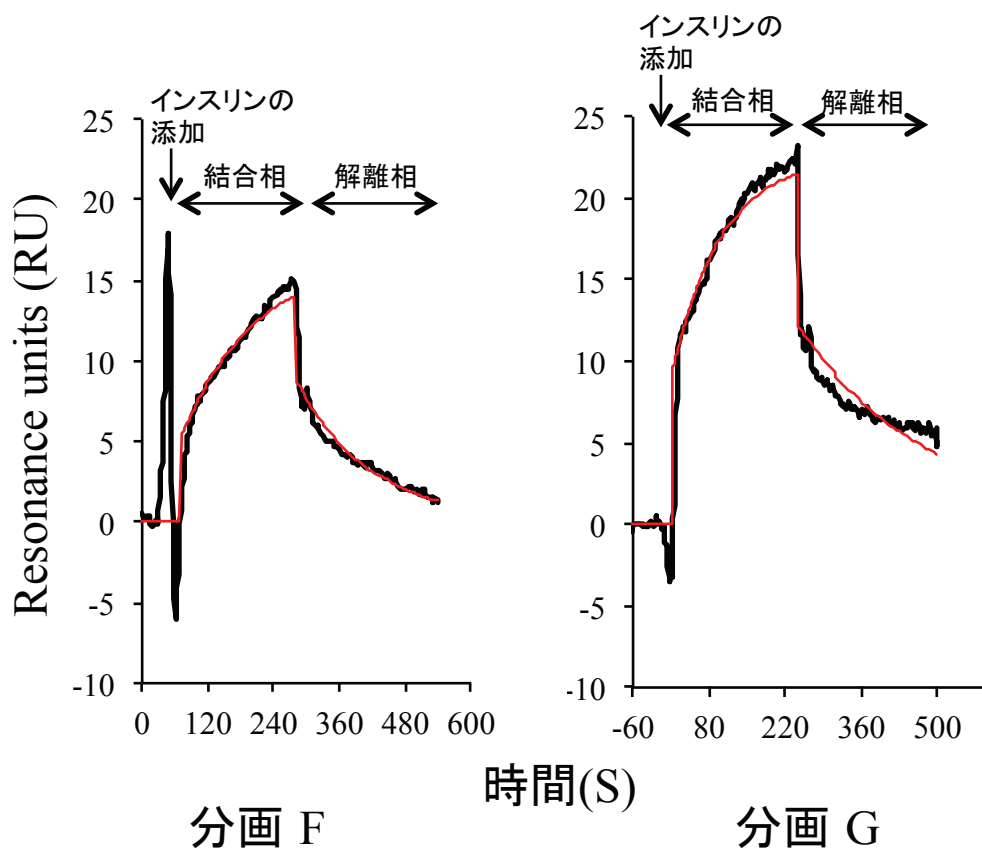


図 6. 表面プラズモン共鳴分析法を用いた親和性解析におけるセンサーグラム

センサーチップに固定した抗インスリン IgG にウシインスリンを添加し、結合相と解離相のセンサーチップ表面の質量をリアルタイムに測定した。黒線は抗インスリン IgG を添加した流路のセンサーチップ表面の質量と添加しなかった流路の質量の差 (Resonance units: ウシインスリンの結合量) を示し、赤線は非線形解析法を用いた近似曲線を示す。インスリンを添加するとセンサーチップ表面に固定した抗インスリン IgG にインスリンが結合してセンサーチップ表面の質量が増加し (結合相)、インスリンの添加が終わるとインスリンの解離により質量は減少した。Resonance units の最大値は分画 F では 15.2 RU であったのに対して、分画 G では 23.2 RU であり、分画 F より分画 G のほうが高かった。

表3. 親和性解析により算出された各分画のパラメーター

算出定数	分画F	分画G
Ka (1/Ms)	45.9	202
Kd (1/s)	$7.38e^{-03}$	$4.04e^{-03}$
KD (M)	$1.61e^{-04}$	$2.00e^{-05}$

Ka : 結合速度定数, Kd : 解離速度定数, KD : 解離定数,  
KD = Kd/Ka

分画 F の結合速度定数は分画 G と比較して 4.4 倍低く, 解離速度定数は 1.8 倍高かった。解離定数 KD は, 分画 F が  $1.61e^{-4}$  M, 分画 G が  $2.00e^{-5}$  M であり, 分画 F のほうが 10 倍高かった。



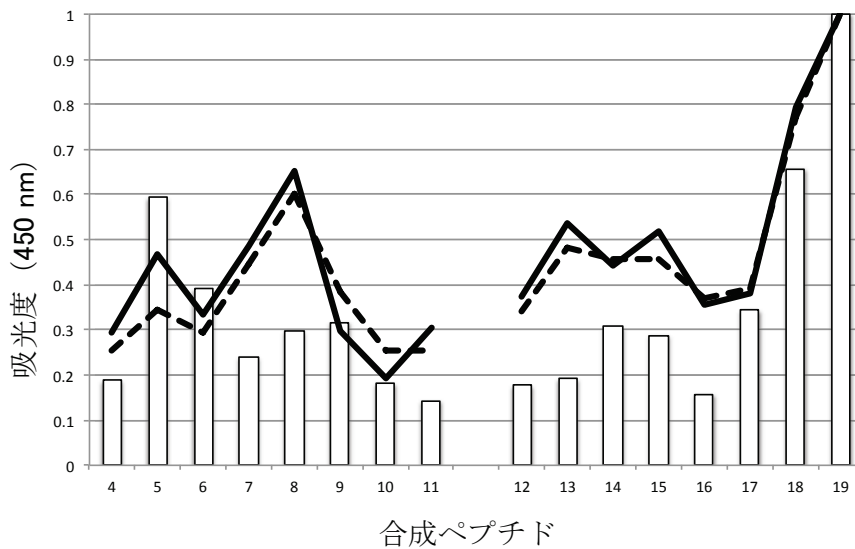


図 7. 抗インスリン IgG の合成ペプチドに対する結合性 (エピトープ解析)  
 □ 血清,    - - 分画 F,    — 分画 G

16 種類の合成ペプチドを固相化したマイクロプレートに血清とアフィニティークロマトグラフィーによる分画を添加し、標識抗ネコ IgG 抗体により検出した。それぞれのサンプルにおいて最も高い吸光度を示したペプチド No. 19 の吸光度に対する相対的な吸光度を示した。分画 B および C はインスリン B 鎖のカルボキシ末端に相当する合成ペプチド No. 19 のほか、ペプチド No. 18、ペプチド No. 8、No. 13 および No. 15 にも高い吸光度を示した。分画 B と分画 C の合成ペプチドに対する吸光度の違いは、ペプチド No. 5 において最も大きく、分画 C では分画 B より高い吸光度を示した。血清はインスリン B 鎖のカルボキシ末端に相当する合成ペプチド No. 19 に最も高い吸光度を示し、ペプチド No. 18、ペプチド No. 5 にも高い吸光度を示した。

## 考察

第二章では第一章においてインスリンを固相化したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより得られた抗インスリン IgG の 2 つの分画 (F および G) のインスリンに対する親和性と抗原認識部位を解析した。分画 F および G のインスリンに対する親和性解析では、分画 G の結合速度定数は分画 F と比較して 4.4 倍高く、解離速度定数は 1.8 倍低かった。このことは、分画 G に含まれる抗インスリン IgG 群は、分画 F の抗インスリン IgG 群と比べてインスリンと短時間で結合し、ゆっくりと解離することを示す。結合速度定数と解離速度定数から算出された分画 F と分画 G のインスリンに対する KD 値は、それぞれ  $1.64 \times 10^{-4}$  M (低親和性 IgG) と  $2 \times 10^{-5}$  M (高親和性 IgG) であり、分画 G の親和性が分画 F より 10 倍高かった。分画 G に含まれる抗インスリン IgG のインスリンに対する結合は、分画 F より短時間で結合してゆっくりと解離する、結合力 (親和性) が 10 倍高い安定した結合であると考えられた。Kure ら [21] は表面プラズモン共鳴分析法 (biacore<sup>TM</sup> system) を用いてヒト糖尿病患者に認められた抗インスリン抗体のインスリンに対する親和性を、患者の低血糖発作経験の有無により 2 つのグループに分けて解析している。この報告によると、低血糖発作の経験がない患者が保有する抗インスリン抗体のインスリンに対する KD 値は  $3.73 \pm 6.91 \times 10^{-8}$  M であったのに対し、低血糖発作経験のある患者では  $5.44 \pm 10.3 \times 10^{-5}$  M であった。Kure ら [21] は低血糖発作経験のある患者の保有する抗インスリン抗体のインスリンに対する親和性が、低血糖発作経験のない患者に比べて低いことを示し、この低血糖発作はインスリンに対する親和性の低い抗インスリン IgG がインスリンから突発的に解離して、インスリンが作用する [3, 4] ことが原因であると推定している。血糖値が不安定で、時に予期しない低血糖発作を起こすヒト糖尿病患者の抗インスリン抗体の平均 KD 値 ( $5.44 \pm 10.3 \times 10^{-5}$  M) は、本研究において算出したネコ抗インスリン IgG の分画 G ( $2.00 \times 10^{-5}$  M) と同程度であり、分画 F はさらに親和性が低くインスリンとの結合が不安定であると考えられる。しかし健康なネコでは低血糖症状を認めないことから、抗インスリン抗体とインスリンが突発的に解離することは考えられず、ネコの保有する抗インスリン抗体は、血中

に存在するが、低血糖などの異常の原因とはならないと考えられた。ネコにおける抗インスリン IgG に関するこれまでの報告[29, 44]において、血液中に存在する抗インスリン IgG は、膵臓から分泌されたインスリンのほとんどに結合し、IgG-インスリン複合体として全身を循環していることが示唆されている。本研究により、ネコにおける抗インスリン IgG から分離精製された2つの IgG 分子群は、インスリンに対する親和性が異なることが示された。抗インスリン IgG がインスリンと結合していると仮定すると、実際に結合する抗インスリン IgG とインスリンの総体的な親和力 (avidity) は、2 価の IgG1 分子とインスリン 2 分子の相互作用が相乗的に働くことによって大きくなり、また異なる親和性の IgG とインスリンの組み合わせにより avidity と結合の安定性の異なる IgG-インスリン複合体が形成される可能性がある。

エピトープ解析において、ネコの抗インスリン IgG の分画 F と分画 G は、インスリン分子の B 鎖のカルボキシル末端にあたる合成ペプチド (No. 19, インスリン B 鎖分子の 20 から 30 アミノ酸残基) に対する親和性が最も高かった。インスリンのインスリン受容体に対する結合部位は A 鎖の 2, 3, 19 アミノ酸残基と B 鎖の 23, 24 アミノ酸残基である[7]とされており、B 鎖の 23, 24 アミノ酸残基は、分画 F と分画 G が最も高い親和性を示した部位と共通であった。特に B 鎖のカルボキシル末端はインスリンとインスリン受容体の結合初期段階の立体構造変化において重要な役割を果たすことが報告されており[26]、これは抗インスリン IgG が血液中においてインスリンの受容体結合部位に結合し、インスリンとインスリン受容体の結合を阻害する可能性があることを示している。Kahn ら[20]や Shechter ら[41]は、マウスの肝臓ホモジネート試料のリソソーム画分や線維芽細胞の単分子膜においてブタインスリンを抗原としてモルモットに産生させたポリクローナルな抗インスリン抗体 (自然自己抗体ではない) とインスリンの多分子複合体が、細胞膜の受容体を集合させ、多くの受容体を活性化することによってインスリンの生物活性を高めている可能性を報告している。また高島[45]はインスリンに対する親和性の低い抗インスリン IgG の分画 F が細胞へのインスリン添加に誘導される受容体チロシンキナーゼシグナルの活性化を増強す

ることで糖取り込み能を増強したことを示し、このインスリンの作用増強効果に分画Fの抗インスリン IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関与することを推定している。本研究におけるエピトープ解析の結果において分画FおよびGが、インスリン分子のB鎖のカルボキシル末端（ペプチドNo. 19）と、B鎖の16から25アミノ酸残基（No. 18）、B鎖の6から15アミノ酸残基（No. 8）、B鎖の1から10アミノ酸残基（No. 15）およびA鎖の7から16アミノ酸残基（No. 13）に比較的高い親和性を示しており、ネコ抗インスリン IgG は、分画FとGの両方がインスリンに対して複数の認識部位を持つと考えられる。分画Fに含まれる抗インスリン IgG は、インスリンの複数の部位を認識して結合することによってインスリンと架橋して多分子複合体を形成している可能性が考えられ、分画Gに含まれる抗インスリン IgG も同様に多分子複合体を形成している可能性が考えられた。また分画Fおよび分画Gにおいて吸光度が高かったペプチドNo. 13とプレートへの結合方向が逆であり、ペプチド断片のアミノ末端でプレートへ固相化したペプチドNo. 5に対する吸光度は、分画Fが分画Gよりも低く、分画Fと分画Gとの吸光度の差は、すべての合成ペプチドの中で最も大きかった。本研究における抗原認識部位の検討において、分画Fと分画Gが高い親和性を示したペプチドはその多くが共通しており、分画Fと分画Gの抗インスリン IgG のインスリンに対する抗原認識部位の傾向は同じであると考えられたが、ペプチドNo. 5に対する分画Fと分画Gの吸光度には差があった。分画Fと分画GのペプチドNo. 5に対する結合性の違いは、インスリンの立体構造や作用に異なる影響を与える可能性も考えられた。本研究におけるエピトープ解析の結果において、血清はインスリン分子のB鎖のカルボキシル末端にあたる合成ペプチド（No. 19、インスリンB鎖分子の20から30アミノ酸残基）に対する親和性が最も高く、B鎖の16から25アミノ酸残基（No. 18）およびA鎖の7から16アミノ酸残基（No. 5）に対しても高い吸光度を示した。この結果は分画FとGの親和性の高い部位とほぼ同じであり、分画FとGに含まれる抗インスリン IgG のインスリンに対する抗原認識部位は、血清全体に含まれるインスリン親和性の IgG の性質を示すことが確認された。

## 小括

第二章では表面プラズモン共鳴分析法による親和性解析により、分画 F の抗インスリン IgG 群は分画 G の抗インスリン IgG 群と比べてインスリンに対する結合が遅く、解離が早いことが示された。また分画 F と分画 G のインスリンに対する KD 値は、それぞれ  $1.64 \times 10^{-4}$  M (低親和性 IgG) と  $2 \times 10^{-5}$  M (高親和性 IgG) であり、分画 G の親和性の方が 10 倍高いことが示された。さらにエピトープ解析により、ネコの抗インスリン IgG の分画 F と分画 G はインスリン分子の B 鎖のカルボキシル末端にあたる合成ペプチド (No. 19, インスリン B 鎖分子の 20 から 30 アミノ酸残基) に対する親和性が最も高いことが示された。抗インスリン IgG が末梢血液中においてインスリンの受容体結合部位に結合し、インスリンとインスリン受容体の結合を阻害する可能性がある。さらに、分画 F, G ともペプチド No. 19 以外に、ペプチド No. 18 (B 鎖の 16 番目から 25 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)、ペプチド No. 8 (B 鎖の 6 番目から 15 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド)、No. 13 (A 鎖の 7 番目から 16 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド) および No. 15 (B 鎖の 1 番目から 10 番目までのアミノ酸配列による合成ペプチド) にも親和性を示し、ネコ抗インスリン IgG は、分画 F と G の両方がインスリンに対して複数の認識部位を持つと考えられた。分画 F および分画 G に含まれる抗インスリン IgG はそれぞれ、インスリンの複数の部位を認識して結合することによってインスリンと架橋して多分子複合体を形成している可能性がある。第一章で分離精製された 2 つの抗インスリン IgG 分子群において、インスリンに対する親和性は異なることが示されたいっぽう、抗原認識部位の傾向は同じであると考えられた。

### 第三章

#### 抗インスリン IgG がインスリンとインスリン受容体の結合に与える影響

##### 緒言

インスリン受容体は肝臓、筋肉、脂肪細胞などさまざまな組織の細胞膜上に存在し、インスリンが結合する  $\alpha$  サブユニットと、細胞膜を貫通する  $\beta$  サブユニットから構成される。インスリンが  $\alpha$  サブユニットに結合すると、 $\beta$  サブユニットの立体構造変化を引き起こし、 $\beta$  サブユニット上のチロシンキナーゼ部分が活性化することによって、グルコース取り込みのためのシグナル伝達が活性化される。

抗インスリン抗体の存在がインスリンのインスリン受容体への結合に与える影響については、異種動物由来のインスリン投与に対する抗インスリン抗体に関する研究[3, 4, 10]があり、抗インスリン抗体が投与インスリンの受容体結合を阻害し、インスリン作用を減弱することが報告されている。本研究の第二章では、エピトープ解析により、ネコの抗インスリン IgG の低親和性 IgG 群と高親和性 IgG 群は、インスリン分子 B 鎖のカルボキシル末端にあたる合成ペプチドに対する親和性が最も高いことが示された。インスリン分子の B 鎖のカルボキシル末端はインスリンとインスリン受容体の結合初期段階の立体構造変化において重要な役割を演ずる[26]。このことから、抗インスリン IgG が末梢血液中においてインスリンの受容体結合部位に結合し、インスリンとインスリン受容体の結合を阻害する可能性があると考えられた。

さらに第二章では、エピトープ解析の結果からネコの抗インスリン IgG がインスリンと架橋して多分子複合体を形成している可能性が示された。Kahn ら[20]や Shechter ら[41]は、異種動物由来のインスリン投与に対する抗インスリン抗体の存在化でインスリンの作用が増強されること報告し、この作用増強効果は、抗インスリン抗体がインスリンと多分子複合体を形成し、受容体凝集を誘導することに起因すると推定した。またこれらの報告は、抗インスリン抗体の存在がインスリンの受容体結合能を増強することも報告しており、こ

の結果についても抗インスリン抗体がインスリンと形成する多分子複合体に誘導される受容体凝集に起因すると推定している。ネコにおいて、抗インスリン IgG がインスリンの受容体結合能を増強するかどうかはわかっていない。しかし、抗インスリン IgG がインスリンとともに多分子複合体を形成している可能性が示されたことは、Kahn ら[20]や Shechter ら[41]の報告のように、ネコにおいても抗インスリン IgG がインスリンの受容体結合能を増強する可能性が考えられる。

インスリンは、細胞膜上のインスリン受容体の一部に結合することによって、シグナルタンパク質のリン酸化を誘起する。インスリンの生理活性に抗インスリン IgG が与える影響については、高島[45]はネコの培養脂肪細胞を用いた試験において、インスリン刺激時のインスリン受容体の受容体チロシンキナーゼシグナルタンパク質である IRS-1 と Akt のリン酸化が低親和性抗インスリン IgG の存在下で増強されることを示している。このことは、ネコの抗インスリン IgG がインスリンとインスリン受容体の結合に影響を与え、インスリンの受容体への結合量を増加させることによってシグナルタンパク質のリン酸化を増強している可能性を示す。第三章では、インスリンのインスリン受容体への結合量が、抗インスリン IgG の存在下で変化するのかどうかを検討した。インスリンの標的器官であり、インスリン受容体へのインスリンの特異的結合が報告されているネコの肝臓組織[13]から分離した細胞膜タンパク質を用いて、抗インスリン IgG の存在下におけるインスリンとインスリン受容体の結合の程度を評価した。

## 実験材料および実験方法

### 1. ネコ肝臓組織からの細胞膜タンパク質の抽出

この試験には、他の研究（動物実験承認番号 07050）で採取・保存していた健康なネコの肝臓を使用した。肝臓組織の細胞膜タンパク質は、市販の細胞膜タンパク質抽出キット（Proteo Extract® Native Membrane Protein Extraction Kit, Calbiochem, San Diego, CA）により抽出した。1回の抽出に 50 mg の凍結ネコ肝臓組織を用い、得られた膜タンパク質画分は混合して合計 10 ml の膜タンパク質プールとした。膜タンパク質プールの総タンパク質濃度は市販のタンパク質測定キット（Pierce® BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL）により測定した。膜タンパク質プールは 1 ml ずつ分注して $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

### 2. 競合 ELISA による特異性の確認

膜タンパク質とウシインスリンの結合の特異性を確認するため、膜タンパク質を固相化したマイクロプレートに非標識ウシインスリンと標識ウシインスリンを添加し、標識ウシインスリンの膜タンパク質への結合を評価した。96 ウェルのポリスチレンマイクロプレート（Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark）に PBS で 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した膜タンパク質を分注（100  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、 $4^{\circ}\text{C}$ で 1 晩インキュベートして固相化した。溶液を吸引除去し、PBS-T200  $\mu\text{l}$  を添加、吸引することで 3 回洗浄した後、ブロッキング液（Block Ace, DS ファーマバイオメディカル, 大阪）の原液を 4 倍希釈し、分注（100  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）して $4^{\circ}\text{C}$ で 1 晩インキュベートした。ブロッキング液を吸引除去し、0.02 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.14 M  $\text{NaCl}$ , 0.05% Tween20, pH7.2 (PBS-T) で 3 回洗浄した後、17  $\mu\text{M}$  に PBS で希釈した標識ウシインスリン（Insulin-Peroxidase labeled from bovine pancreas, I2133, Sigma, Poole, UK）（50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）と 520  $\mu\text{M}$  から 220  $\mu\text{M}$  に PBS で階段希釈した非標識ウシインスリン（Insulin from bovine pancreas, I5500, Sigma, Poole, UK）（50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）を添加し室温で 2 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、PBS-T で 3 回洗浄した後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) 液（TMB One Component HRP Microwell Substrate, Bethyl



Laboratories, Montgomery, TX) を分注 (100  $\mu$ l/well) した。室温で 15 分インキュベートして 2 N 硫酸 (100  $\mu$ l/well) で反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。

### 3. 抗インスリン IgG がインスリンとインスリン受容体の結合に与える影響

96 ウェルのポリスチレンマイクロプレート (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) に PBS で 100  $\mu$ g/ml に希釈した膜タンパク質を分注 (100  $\mu$ l/well) し、4°C で一晩インキュベートして固相化した。溶液を吸引除去し、PBS-T 200  $\mu$ l を添加・吸引することによって 3 回洗浄した後、ブロッキング液 (Block Ace, DS ファーマバイオメディカル, 大阪) の 4 倍希釈液を各ウェルに分注 (100  $\mu$ l/well) して 4°C で一晩インキュベートした。ブロッキング液を吸引除去し、PBS-T で 3 回洗浄した。その後、17  $\mu$ M の濃度に PBS で希釈した標識ウシインスリン (Insulin-Peroxidase labeled from bovine pancreas, I2133, Sigma, Poole, UK) (50  $\mu$ l/well) と PBS (50  $\mu$ l/well) をコントロールとして添加した。または標識ウシインスリン (50  $\mu$ l/well) と、1) 血清から総 IgG を精製して限外濾過により内因性インスリンを除去したサンプル、2) 第一章で得られた分画 F、3) 第一章で得られた分画 G を、それぞれ PBS で 0.5, 0.1, 0.02, 0.004, 0.0008, mg/ml に希釈した溶液 (50  $\mu$ l/well) を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、PBS-T で 3 回洗浄した後、TMB 液 (TMB One Component HRP Microwell Substrate, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) を分注 (100  $\mu$ l/well) した。室温で 15 分インキュベートして硫酸 (2 N) (100  $\mu$ l/well) で反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。試験は 1 つのサンプルにつき 3 回繰り返し、結果は平均値  $\pm$  標準偏差で示した。

## 実験結果

### 1. 競合 ELISA による特異性の確認

プレートに固相化した膜タンパク質に、標識インスリンと 520  $\mu\text{M}$  から 220  $\mu\text{M}$  に階段希釈した非標識インスリンを添加して競合的に結合させ吸光度を測定した (図 8)。非標識インスリンの濃度が 220  $\mu\text{M}$  のときの吸光度が最も高く、非標識インスリンの濃度が上昇するに伴って吸光度が徐々に低下した。

### 2. 抗インスリン IgG がインスリンとインスリン受容体の結合に与える影響

図 9 に、コントロールとして標識インスリンのみを膜タンパク質と反応させた場合、1) 標識インスリンと総 IgG を膜タンパク質と反応させた場合、2) 標識インスリンと低親和性抗インスリン IgG を膜タンパク質と反応させた場合、3) 標識インスリンと高親和性抗インスリン IgG を膜タンパク質と反応させた場合の吸光度を示す。標識インスリンのみを膜タンパク質と反応させた場合の吸光度に対し、標識インスリンと総 IgG を膜タンパク質と反応させた場合、標識インスリンと低親和性抗インスリン IgG および高親和性抗インスリン IgG を膜タンパク質と反応させた場合において吸光度の有意な差は認められず、添加 IgG 濃度による吸光度の差も認められなかった。

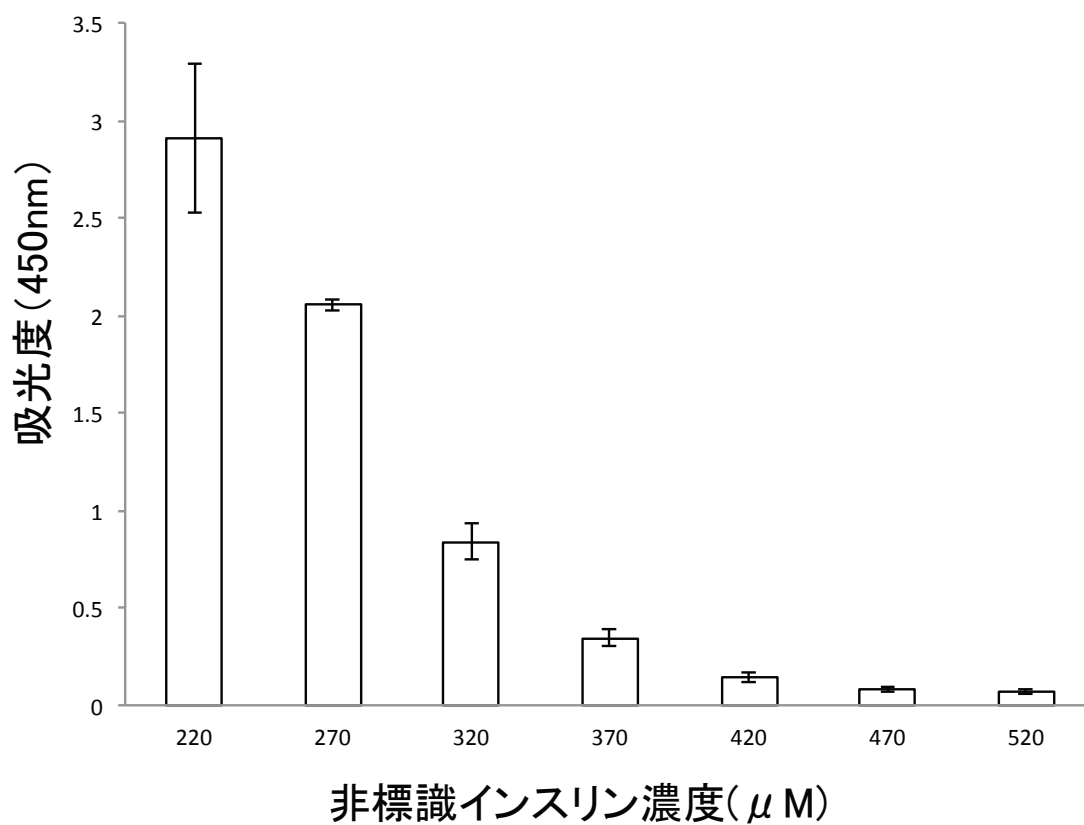


図 8. 競合 ELISA による特異性の確認

96 ウェルのポリスチレンマイクロプレートに固相化した膜タンパク質に標識インスリンと階段希釈した非標識インスリンを添加し吸光度を測定した。非標識インスリンが高濃度になるにつれ吸光度が低下した。

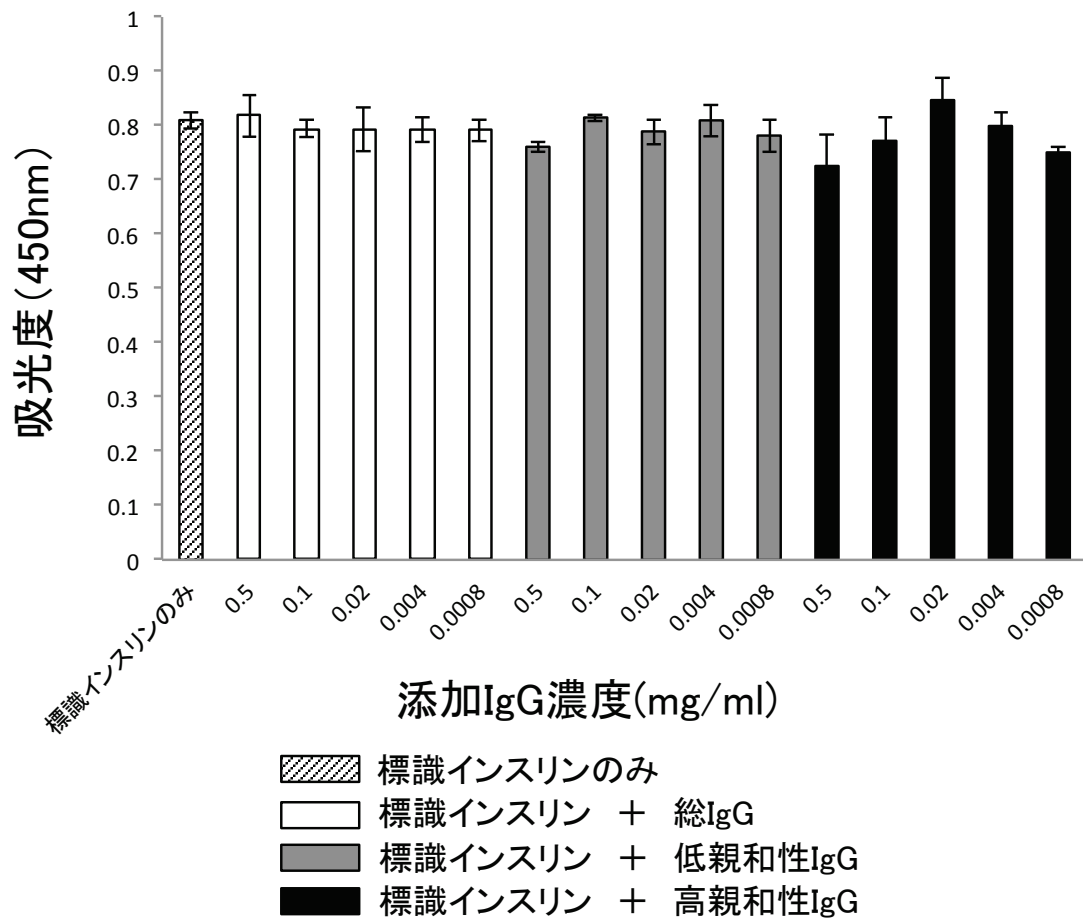


図9. インスリンの受容体結合に抗インスリン IgG が与える影響

96 ウェルのポリスチレンマイクロプレートに固相化した膜タンパク質に標識インスリンのみ、標識インスリンと総 IgG、標識インスリンと低親和性 IgG、標識インスリンと高親和性 IgG をそれぞれ各濃度で添加し吸光度を測定した。標識インスリンのみを添加した場合の吸光度に対し、標識インスリンと総 IgG を添加した場合、標識インスリンと低親和性抗インスリン IgG および高親和性抗インスリン IgG を添加した場合において吸光度の有意な差は認められなかった。

## 考察

異種動物由来のインスリン投与に反応して産生された抗インスリン抗体については、投与インスリンの受容体結合の阻害によるインスリン作用の阻害[3, 4, 10]と、それに相反する結合の増強によるインスリン作用の増強[20, 41]という両方の効果が報告されている。ネコの抗インスリン IgG がインスリンの受容体結合に与える影響は、ネコの抗インスリン IgG が内因性インスリンに結合する自然自己抗体であることから、異種動物由来のインスリン投与に反応して産生された抗インスリン抗体がインスリン受容体結合に与える効果とは根本的に異なる可能性がある。

第三章では、インスリンとインスリン受容体の結合に抗インスリン IgG が与える影響を検討するため、ネコの肝臓組織から精製した膜タンパク質をマイクロプレートに固相化し、インスリンと抗インスリン IgG を添加してインスリンのインスリン受容体への結合を評価した。細胞膜にはインスリン受容体以外にもトランスフェリン受容体やアセチルコリン受容体など多くのタンパク質が存在し、添加したインスリンがこれらの受容体に非特異的な結合をすることが考えられたため、インスリン受容体とインスリンの結合性が用量依存性に変化することを確認し、調製した細胞膜に存在するインスリン受容体が、添加するインスリンと特異的に反応することを確認する必要がある。プレートに固相化した膜タンパク質に標識ウシインスリンと階段希釈した非標識ウシインスリンを添加すると、非標識インスリンの濃度の上昇にともない徐々に吸光度が低下した。このことは、非標識ウシインスリンと標識インスリンが競合的に反応し、両方のインスリンが、膜タンパク質の中のインスリン受容体に特異的に結合していることを示すと考えられた。

第二章で実施した抗インスリン IgG のインスリンに対するエピトープ解析において、低親和性抗インスリン IgG および高親和性抗インスリン IgG は、両方ともインスリン分子の B 鎖のカルボキシル末端を最も強く認識した。インスリン B 鎖のカルボキシル末端は、インスリン受容体への結合において重要な役割を演ずることから、抗インスリン IgG がインスリンの受容体結合を阻害する可能性が考えられた。しかし、第三章で実施したインスリン

の受容体結合に抗インスリン IgG が与える影響の検討において、抗インスリン IgG を添加しても、標識インスリンと細胞膜に存在するインスリン受容体の結合量は低下しなかった。このことから、低親和性抗インスリン IgG および高親和性抗インスリン IgG の存在下においても標識インスリンのインスリン受容体への結合は阻害されないと考えられた。抗インスリン IgG の存在化において標識インスリンのインスリン受容体への結合が阻害されない理由としては、インスリンとインスリン受容体の相互作用においてインスリン-受容体結合の初期の解離定数が $\sim 6.4$  nM [9, 39] であることから、抗インスリン IgG に結合していたインスリンが解離して、より高い親和性を示すインスリン受容体と結合する可能性が考えられた。

固相化したインスリン受容体へのインスリンの結合量を評価した本研究の実験系においては、固相化した受容体の数と添加したインスリンの量の割合が重要であり、受容体の数に対して過剰に多量のインスリンが添加された場合、抗インスリン IgG とインスリンの結合が飽和状態に達し、仮に抗インスリン IgG にインスリンの受容体結合量を増加させる作用があっても受容体の数が足らずに結合が頭打ちになり、正しい実験結果が得られない可能性が考えられた。本研究において、抗インスリン IgG を添加しても、インスリンのインスリン受容体への結合量は増加しなかったが、受容体の数に対してインスリンの添加量を少なくした実験は実施していないため、抗インスリン IgG がインスリンの結合量を増加させるかどうかは本研究の結果からは不明である。

## 小括

第三章ではネコの肝臓組織から精製して固相化したインスリン受容体への標識インスリンの特異的な結合が，抗インスリン IgG の低親和性分画または高親和性分画を添加しても減弱しなかった。ただし，抗インスリン IgG の低親和性分画または高親和性分画を添加してもインスリンの受容体への結合が増強されないかについては，更なる検討が必要である。

## 総括

健康なネコが抗インスリン IgG を保有することが明らかにされた。抗インスリン IgG は、分泌されたほとんどのインスリンに結合して、IgG-インスリン複合体として血中に存在することが示唆されているが、その生理的役割はわかっていない。本研究では、ネコにおける抗インスリン IgG の生理的役割を解明する最初のステップとして、抗インスリン IgG の生物学的性状、とくに結合特性を解明することを目的とした。

第一章では、インスリンに対する親和性を基にして、ネコ抗インスリン IgG を大きく 2 種類の異なる親和性をもつ IgG 分子群に分離精製できることを示した。第二章では、第一章において分離された 2 つの抗インスリン IgG 分子群のインスリンに対する KD 値を表面プラズモン共鳴分析法により算出し、分画 F の KD 値が  $1.64e^{-4}$  M、分画 G の KD 値が  $2e^{-5}$  M であることから、前者を低親和性 IgG、後者を高親和性 IgG とした。また 2 つの IgG 分子群において、インスリンに対する抗原認識部位の傾向は同じであることを示し、インスリン分子の B 鎖のカルボキシル末端を含む複数の部位を認識することから、インスリンの受容体結合を阻害する可能性を示すとともに、抗インスリン IgG がインスリンの複数の部位を認識して結合することでインスリンと架橋して多分子複合体を形成している可能性を示した。第三章ではネコの肝臓組織から精製して固相化したインスリン受容体への標識インスリンの特異的な結合が、分離精製した 2 種類の抗インスリン IgG の存在により減弱されないことを示した。ただし、2 種類の抗インスリン IgG がインスリン受容体への標識インスリンの特異的な結合を増強しないかについては、更なる検討が必要である。

ネコの血中に存在する抗インスリン IgG は、すべてのネコが保有し、何らかの生理的役割を担っていると考えられる。抗インスリン IgG は親和性の異なる 2 つの抗インスリン IgG 分子群から構成され、インスリン分子の複数の部位を認識することから、インスリンとの多分子複合体の形成により、インスリンの作用に影響を与える可能性がある。また 2 つの抗インスリン IgG 分子群は、インスリンに対する親和性が異なり、その親和性の違いが原因となって、インスリンの作用に異なる影響を与える可能性がある。



## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導およびご高閲を賜りました岐阜大学獣医内科学研究室、北川均教授に深甚なる感謝の意を表します。終始ご指導を賜りました岐阜大学産業動物臨床研究室、大場恵典教授、比較生化学研究室、岩澤淳教授、獣医内科学研究室、西飯直仁准教授に、また、親和性解析の実施にあたりご協力をいただいた岐阜薬科大学薬物送達学大講座製剤学研究室、竹内洋文教授、田原耕平准教授に深謝いたします。研究遂行にあたりご助力いただいた獣医内科学研究室、高島諭博士をはじめ、獣医内科学研究室ならびに産業動物臨床研究室の大学院生および学部学生みなさまに深謝いたします。最後になりましたが、学位論文を指導、審査していただきました岐阜大学、志水泰武教授、帯広畜産大学、猪熊壽教授、岩手大学、佐藤れえ子教授、東京農工大学、渡辺元教授に深謝いたします。

## 引用文献

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. 2007. Diseases causes by immune responses: Hypersensitivity and autoimmunity. pp.419-440. *In*: Cellular and Molecular Immunology, 6th ed. (Abbas, A. K. ed.), Saunders, Philadelphia.
2. Archambeaud-Mouveroux, F., Huc, M. C., Nadalon, S., Fournier, M. P. and Canivet, B. 1989. Autoimmune insulin syndrome. *Biomed Pharmacother* **43**: 581-586.
3. Berson, S. A. and Yalow, R. S. 1959. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* **38**: 1996-2016.
4. Berson, S. A., Yalow, R. S., Bauman, A., Rothschild, M. A. and Newerly, K. 1956. Insulin-I131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin-treated subjects. *J Clin Invest* **35**: 170-190.
5. Bortolotti, D., Mothe-Satney, I., Ferrari, P., Gautier, N., Sonke, J., Palle, S., Bernard, G., Badetti, J. L., Fredenrich, A., Van Obberghen, E. and Canivet, B. 2006. Spontaneous hypoglycaemia in the presence of both anti-insulin antibody and anti-insulin receptor antibody. *Diabetes Metabol* **32**: 598-603.
6. Burch, H. B., Clement, S., Sokol, M. S. and Landry, F. 1992. Reactive hypoglycemic coma due to insulin autoimmune syndrome: case report and literature review. *Am J Med* **92**: 681-685.
7. Conlon, J. M. 2001. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides* **22**: 1183-1193.
8. Coutinho A., Kazatchkine, M. D. and Avrameas, S. 1995. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* **7**: 812-818.
9. De Meyts, P. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution.

*Bioessays* **26**: 1351-1362.

10. De Pirro, R., Fusco, A., Spallone, L., Magnatta, R. and Lauro, R. 1980. Insulin antibodies prevent insulin-receptor interactions. *Diabetologia* **19**: 118-122.
11. Devendra, D., Galloway, T. S., Horton, S. J., Evenden, A., Keller, U. and Wilkin, T. J. 2003. The use of phage display to distinguish insulin autoantibody (IAA) from insulin antibody (IA) idiotypes. *Diabetologia* **46**: 802-809.
12. Dozio, N., Scavini, M., Beretta, A., Sarugeri, E., Sartori, S., Belloni, C., Dosio, F., Savi, A., Fazio, F., Sodoyez, J. C. and Pozza, G. 1998. Imaging of the buffering effect of insulin antibody in the autoimmune hypoglycemic syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* **83**: 643-648.
13. Freychet, P., Roth, J., Neville, D. M. Jr. 1971. Insulin receptors in the liver: specific binding of [<sup>125</sup>I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 1833-1837.
14. Gerbitz, K. D., Kemmler, W. 1978. Method for rapid quantitation and characterization of insulin antibodies. *Clin Chem* **24**: 890-894.
15. Greenfield, J. R., Tuthill, A., Soos, M. A., Semple, R. K., Halsall, D. J., Chaudhry, A. and O'Rahilly, S. 2009. Severe insulin resistance due to anti-insulin antibodies: response to plasma exchange and immunosuppressive therapy. *Diabet Med* **26**: 79-82.
16. Hallden, G., Gafvelin, G., Mutt, V. and Jornvall, H. 1986. Characterization of cat insulin. *Arch Biochem Biophys* **247**: 20-27.
17. Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies. pp. 298-299. *In*: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
18. Hoenig, M., Reusch, C. and Peterson, M. E. 2000. Beta cell and insulin

- antibodies in treated and untreated diabetic cats. *Vet Immunol Immunopathol* **77**: 93-102.
19. Ishizuka, T., Ogawa, S., Mori, T., Nako, K., Nakamachi, T., Oka, Y. and Ito, S. 2009. Characteristics of the antibodies of two patients who developed daytime hyperglycemia and morning hypoglycemia because of insulin antibodies. *Diabetes Res Clin Pract* **84**: e21-23
  20. Kahn, C. R., Baird, K. L., Jarrett, D. B., Flier, J. S. 1978. Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **75**:4209-4213.
  21. Kure, M., Katsura, Y., Kosano, H., Noritake, M., Watanabe, T., Iwaki, Y., Nishigori, H. and Matsuoka, T. 2005. A trial to assess the amount of insulin antibodies in diabetic patients by surface plasmon resonance. *Intern Med* **44**: 100-106.
  22. Laflamme, D. 1997. Development and validation of body condition score system for cats: A clinical tool. *Feline Pract* **25**: 13-18.
  23. Löfås, S. and Johnsson, B. 1990. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J Chem Soc Chem Commun* **21**: 1526-1528.
  24. Lutz, H. U. and Miescher, S. 2008. Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease. *Autoimmun Rev* **7**: 405-409.
  25. Matsushita, S., Takahashi, K., Motoki, M., Komoriya, K., Ikagawa, S. and Nishimura, Y. 1994. Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB10405 and -DRB10406 complexes: Implication for the

- HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J Exptl Med* **180**: 873-883.
26. Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K., Smith, B. J., Watson, C. J., Záková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., Lawrence, M. C. 2013. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* **493**: 241-245.
27. Moeller, N., Mueller-Seitz, E., Scholz, O., Hillen, W., Bergwerff, A. A., Petz, M. 2007. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor. *Eur Food Res Technol* **224**: 285-292.
28. Myszka, D. G. and Rich, R. L. 2000. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *Pharm Sci Technolo Today* **3**: 310-317.
29. Nishii, N., Takasu, M., Kojima, M., Hachisu, T., Wakabayashi, K., Iwasawa, A., Maeda, S., Ohba, Y. and Kitagawa, H. 2010. Presence of anti-insulin natural autoantibodies in healthy cats and its interference with immunoassay for serum insulin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* **38**: 138-145.
30. Oppenheimer, J. H., Squef, R., Surks, M. I. and Hauer, H. 1963. Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alterations in nonthyroidal illness. *J Clin Invest* **42**: 1769-1782.
31. Oppenheimer, J. H., Surks, M. I., Smith, J. C. and Squef, R. 1965. Isolation and characterization of human thyroxine-binding prealbumin. *J Biol Chem* **240**: 173-180.
32. Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K. and Paquette, T. L. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics

- before insulin treatment. *Science* **222**: 1337-1339.
33. Potter, K. N. and Wilkin, T. J. 2000. The molecular specificity of insulin antibodies. *Diabetes Metab Res Rev* **16**: 338-353.
34. Quintana, F. J. and Cohen, I. R. 2001. Autoantibody patterns in diabetes-prone NOD mice and in standard C57BL/6 mice. *J Autoimmun* **17**: 191-197.
35. Quintana, F. J., Getz, G., Hed, G., Doany, E. and Cohen, I. R. 2003. Cluster analysis of human autoantibody reactivities in health and in type 1 diabetes mellitus: a bio-informatic approach to immune complexity. *J Autoimmun* **21**: 65-75.
36. Reeves, W. G. and Kelly, U. 1982. Insulin antibodies induced by bovine insulin therapy. *Clin Exp Immunol* **50**: 163-170.
37. Rendell, M., Hamilton, R. G., Drew, H. M. and Adkinson Jr, N.F. 1981. Exacerbation of diabetes mellitus by antibodies to exogenous insulin. *Am J Med Sci* **282**: 18-26.
38. Robbins, J. and Rall, J. E. 1960. Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol Rev* **40**: 415-489.
39. Schäffer, L. 1994. A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur J Biochem* **221**:1127-1132.
40. Scherthaner, G. 1993. Immunogenicity and allergenic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care* **16**: 155-165.
41. Shechter, Y., Chang, K. J., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P. 1979. Modulation of binding and bioactivity of insulin by anti-insulin antibody: relation to possible role of receptor self-aggregation in hormone action. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2720-2724.
42. Sterling, K., Hamada, S., Takemura, Y., Brenner, M. A., Newman, E. S. and Inada,

- M. 1971. Preparation and properties of thyroxine-binding alpha globulin (TBG).  
*J Clin Invest* **50**: 1758-1771.
43. Sterling, K. and Hegedus, A. 1962. Measurement of free thyroxine concentration in human serum. *J Clin Invest* **41**: 1031-1040.
44. Takashima, S., Nishii, N., Hachisu, T., Kojima, M., Kigure-Hoshino, M., Ogawa, S., Suzuki, T., Iwasawa, A., Ohba, Y. and Kitagawa, H. 2013. Natural anti-insulin autoantibodies in cats: enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of plasma anti-insulin IgG and its concentrations in domestic cats. *Res Vet Sci* **95**: 886-890.
45. 高島諭 (2013) 岐阜大学連合獣医学研究科博士論文.
46. Uchigata, Y., Hirata, Y. and Iwamoto, Y. 2009. Drug-induced insulin autoimmune syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* **83**: e19-20.
47. Van Haeften, T. W. 1989. Clinical significance of insulin antibodies in insulin-treated diabetic patients. *Diabetes Care* **12**: 641-648.
48. Wichterle, D., Stolba, P., Bendlova, B. and Krnakova, A. 1995. Anti-insulin antibodies and insulin resistance. *Vnitr Lek* **41**: 146-150.