博士（医学）　柳　澤　克　之

学 位 論 文 題 名

NPH インスリンの皮下からの吸収に関する研究

－NPH インスリン結晶からのインスリン放出機序についての in vitro study－

学位論文内容の要旨

I　目　　的

Neutral Protamine Insulin Hagedorn（NPH）は糖尿病治療に広く用いられているインスリン製剤の一つである。この製剤はインスリンとプロタミンを至適比率で中性条件下で混合したとき生じる結晶を懸濁液としたもので，作用時間を延長させることを目的としている。しかしNPH 結晶の皮下での溶解吸収機序は，現在でも充分に解明されておらず、また従来の血清中でのNPH 結晶の分解の検討でも物理化学的溶解であるか、酵素の関与する分解であるかが明確でなかった。著者は，immunoreactive insulin（IRI）およびプロタミンの主成分であるアルギニンの動態を指標としてNPH 結晶の血清中での分解を検討し，従来血清中でNPH 結晶中のプロタミン分解に働く酵素の主体として考えられていたプラスミン，さらに carboxypeptidase N のNPH 結晶の分解への関連について検討した。

II　方　　法

1．IRI の測定；2.5%BSA を含む0.1M燐酸緩衝液（pH7.4）で適宜希釈した検体について，インスリン・リアビーズ・キット（ダイナボット）を用い，radioimmunoassay で測定した。

2．アルギニン測定法；蒸留水で適宜希釈した検体について坂口法の Farbizewski 変法でL－アルギニンをスタンダードとして測定した。

3．Plasmin 活性の測定；Plasmin 活性はテストチーム PLG 2 キット（第一化学）を用い，合成基質S－2251を用いて測定した。

4．Carboxypeptidase N（CPN）の酸素活性の測定；Skidgel らの方法により，特異基質である furylacryloylalanyl－L－Lys（FA－Lys）の分解による336nm の吸光度の低下から求めた。

5．Protamine 分解活性の測定；Roirdan らの方法に従い，protamine の分解により産生

されるアルギニンの濃度より求めた。

6．蛋白量の測定；bovine serum albmin（BSA）を standard として Lowry 法で測定した。

7．Starch Block 電気泳動；中村らの方法に基づき施行し，Starch を pH8.6，イオン強度0.05の Veronal buffer で洗浄し，深さ1㎝，長さ35㎝，幅5㎝の支持体とし陰極より10㎝の部分に正常人血清4㎖を添加し，2mA／㎠で20時間泳動後，1㎝ごとの block に切断し，0.1M燐酸緩衝液（pH7.4）で抽出した。

8．血清による NPH 結晶の分解速度の測定；NPH は Humulin N U－100(Eli－lily, NPH インスリン結晶懸濁液，1㎖あたりインスリン100単位，プロタミン0.36㎎含有）を用い，NPH 0.5㎖と正常人血清または Krebs－Ringer phosphate buffer（KRPB）0.5㎖をガラス試験管内で混合し，4℃，または37℃で4時間までアクロバット・スターラー（エムエス器機）で撹拌しながら incubate した。その後，4℃で3000r.p.m. 20分間遠沈し，得られた上清を IRI 測定用検体として用いた。この上清0.5㎖に trichloroacetic acid（最終濃度10％）と silicotungstenic acid（最終濃度0.1％）溶液0.5㎖を加えて除蛋白し，3000r.p.m. 20分遠沈したのち，その上清を採取。これをアルギニン測定用検体として用いた。この IRI，アルギニンの濃度の変化を NPH 結晶分解活性の指標とした。

9．血清からの CPN の精製；CPN の精製は Oshima らの方法で行った。まず正常人血清50㎖を硫酸アンモニウム沈澱法（55％）で塩折，沈澱を0.02M燐酸緩衝液（pH6.8）に溶解し透折を行った。得られた検体を DEAE－Sephadex A－50（Pharmacia）column（2.5㎝×25㎝）に apply し，KCl linear gradient で分画した。各分画の FA－Lys 分解活性を測定し，活性分画を回収し，Minicon B15（W.R.Grace&Co.）で濃縮後，0.05M燐酸緩衝液（pH8.0）で透折した。さらに検体を arginine－ECH－Sepharose 4 B（Pharmacia）affinity column に apply した後，KCl linear gradient で分画した。各分画の FA－Lys 分解活性を測定し，活性分画を回収，精製標品とした。また，得られた精製各段階の検体において NPH 結晶分解活性および protamine 分解活性を検討した。

10．血清の電気泳動の分画による NPH 結晶の分解；正常人血清を Starch block による電気泳動で分画し，各 fraction について NPH 分解活性の検討を行った。また，plasmin 活性および FA－Lys に対しての分解活性も各泳動分画について測定した。

Ⅲ 成　　績

1．NPH と血清または KRPB による NPH 結晶の分解；NPH と血清または KRPB の混合液を incubate すると上清の IRI は 0 分より上清に全インスリン中の約 5 －10%を認めたが，NPH と KRPB を incubate した系，および 4 ℃で血清と NPH を incubate した系では，その濃度は時間経過によっても増加しなかった。37℃で血清と NPH を incubate した系では，時間経過とともに増加が認められた。アルギニンも IRI と同様に NPH と KRPB を incubate した系，および 4 ℃で血清と NPH を incubate した系では変化がなかったが，37℃で血清と NPH を incubate した系では濃度の増加を認めた。

2．希釈血清による NPH 結晶分解の変化：正常人血清を KRPB で 2 倍，4 倍，10倍に希釈し，希釈検体で NPH 分解活性を測定した。上清中の IRI，アルギニンともその増加速度は血清を希釈することにより低下した。

3．NPH 濃度による NPH 結晶分解の変化；NPH の濃度を NPH 製剤成分と同じ溶媒で25，50，100，200U／㎖に調整し，正常人血清と混合し NPH 分解活性を測定した。IRI，アルギニン濃度より求めた反応速度の Lineweaver－Burk の plot は直線となった。アルギニンの生成から求めた値は7.22U／㎖となった。

4．金属塩，キレート剤の NPH 結晶分解への影響：血清に同量の KRPB に溶解した $CoCl_2$，$CdCl_2$（最終濃度 2×10^{-4}M），ＥＤＴＡ（最終濃度 5×10^{-4}M）を加え，その0.5㎖と NPH0.5㎖を，37℃で 1 時間 incubate し，遊離した IRI，アルギニンの濃度を測定した。この濃度の $CoCl_2$，$CdCl_2$，EDTA はいずれもアルギニン，IRI 測定に影響を与えなかった。EDTA の添加により遊離アルギニン，遊離 IRI はそれぞれ対照の47%，88%に低下した。$CdCl_2$ を添加すると遊離 IRI，アルギニンは対照の88%，73%と軽度の低下を認めた。また $CoCl_2$ を添加した系では IRI，アルギニンは対照の131%，112%と軽度亢進した。精製酵素試料を使用した試験でも EDTA の添加によりアルギニンは対照の14%まで低下した。遊離 IRI は対照の71%に低下した。$CdCl_2$ を添加すると遊離 IRI，アルギニンは対照のそれぞれ68%，26%と低下を認め，また $CoCl_2$ を添加した系では IRI，アルギニンは186%，130%と亢進した。

5．血清の電気泳動の分画による NPH 結晶分解活性および CPN 活性部位の比較：Starch Block 電気泳動で得た血清蛋白分画区を用いた試験では NPH 結晶溶解活性はアルブミンと α_1 グロブリンの間の分画に存在し，一方 plasmin 活性は α_1 グロブリンから β グロブリンの間の分画に認められ，両者は明らかに異なった移動度を示した。また，FA－Lys の分解活性は，NPH 結晶溶解活性の強い部分と，ほぼ一致した。

6．CPN の精製と各段階における NPH 結晶分解活性：血清からの最終精製標品は原血清の436倍の FA－Lys 比分解活性の上昇を認めた。また protamine 分解比活性は237倍に上昇，NPH 結晶分解比活性も精製各段階で protamine 分解活性とほぼ平行し，IRI 遊離能で測定して213倍，アルギニン遊離能で測定して236倍に上昇した。

Ⅳ 考　　案

今回の検討において，NPH 結晶が血清と同じ組成の電解質溶液中や，4度での血清中ではほとんど溶解せず，37度の血清中でのみ溶解すること，また混和した上清中に IRI およびプロタミンの分解産物であるアルギニンの経時的な増加を認めたこと，血清や NPH の濃度と NPH 結晶分解速度の変化の関係などより，ＮＰＨ　結晶の分解それに伴うインスリン放出が，酵素によるプロタミン分解の反応とともに起きていることが示された。また電気泳動分画や金属塩，キレート剤の影響，さらに血清の酵素精製の検討より，作用する酵素は plasmin ではなく，CPN であることが示された。

一般に皮下注射された薬剤は皮下組織の細胞の間隙に pool または depot を作りそこから細胞間液中に拡散され，毛細管に吸収されるという過程を経るといわれる。NPH もこの過程を経ると思われるが，その間に結晶中のインスリンとプロタミンの開裂が起こることが特徴である。著者は血清での NPH 結晶の分解を，電解質の組成もほぼ等しい皮下組織の細胞間液のモデルとして検討した。

CPN がプロタミンの分解活性を有することは以前より報告があり，血清だけでなくリンパ液など他の体液中での存在も証明されているので，皮下でも NPH 結晶が本酵素の作用によりプロタミン部分が分解されて，インスリンが放出されると思われる。

NPH は臨床的に使用しやすい製剤として広く使われている。しかし，旧い時代に開発され普及したため，NPH の皮下での吸収機序については，製剤開発当時の研究は若干あるもののいまだ充分に解明されてはいなかった。今回の検討の結果から，酵素作用を吸収の一要因として考慮の上 NPH インスリンの投与を行う必要があると思われた。

Ⅴ 結　　語

1）In vitro における血清中での NPH インスリン結晶の分解によるインスリン遊離は，主に酵素の影響により起きるものと考えられた。

2）NPH 結晶の分解に関与する酵素は carboxypeptidase N と考えられ，NPH の皮下での

吸収や薬物動態と関連するものと思われ，NPH の臨床使用の上で留意すべき事項と思われる。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　中　川　昌　一

副　査　教　授　石　橋　輝　雄

副　査　教　授　西　　信　三

Neutral Protamine Hagedorn Insulin（NPH）は糖尿病治療に広く用いられているインスリン製剤の一つである。この製剤はインスリンとプロタミンを至適比率で中性条件下で混合したときに生じる結晶の懸濁液で，作用時間の延長を目的として作られている。しかし NPH 結晶の皮下での溶解吸収機序は，現在でも充分に解明されておらず、また従来の血清中での NPH 結晶の分解の検討でも物理化学的溶解であるか、酵素の関与する分解であるかが明確でなかった。本研究は，immunoreactive insulin（IRI）およびプロタミンの主成分であるアルギニンの動態を指標として NPH 結晶の血清中での分解を検討し，従来血清中で NPH 結晶中のプロタミン分解に働く酵素の主体として考えられていたプラスミン，さらにプロタミン分解酵素といわれる carboxypeptidase N（CPN）の NPH 結晶の分解への関連について検討したものである。

その結果，

1．NPH を血清または Krebs－Ringer phosphate buffer（KRPB）と incubate すると IRI は上清に 0 分より全インスリン中の約 5 －10％を認めた。しかし，NPH と KRPB を incubate した系，および 4 ℃で血清と NPH を incubate した系では，その濃度は時間経過によっても増加しなかった。それに対し37℃で血清と NPH を incubate した系では，時間経過とともに増加が認められた。アルギニンも IRI と同様に NPH と KRPB を incubate した系，および 4 ℃で血清と NPH を incubate した系では変化がなかったが，37℃で血清と NPH を incubate した系では上清中の濃度の増加を認めた。

2．正常人血清を KRPB で 2 倍，4 倍，10倍に希釈した希釈検体と NPH を incubate すると，上清中の IRI，アルギニンともその増加速度は希釈に伴って低下した。

3．NPH の濃度を NPH 製剤成分と同じ溶媒で25, 50, 100, 200U／㎖に調整し，正常人血清と incubate した結果，IRI，アルギニン濃度より求めた反応速度の Lineweaver－Burk の plot はそれぞれ直線となった。また，アルギニンの生成から求めた Km 値は7.22U／㎖となった。

4．Starch Block 電気泳動で得た血清蛋白分画を用いた試験では NPH 結晶分解活性はアルブミンと α_1 グロブリンの間の分画に存在し，一方 plasmin 活性は α_1 グロブリンから β グロブリンの間の分画に認められ，両者は明らかに異なった移動度を示した。また，CPN の特異基質である furylacryloylalanyl－L－Lys（FA－Lys）の分解活性は，NPH 結晶溶解活性の強い部分とほぼ一致した。

5．血清から精製で FA－Lys 比分解活性が原血清の436倍となった CPN の精製標品を用いた試験では protamine 分解比活性は237倍に上昇した。NPH 結晶分解比活性も精製各段階で protamine 分解活性とほぼ平行し，最終段階で IRI 遊離能で測定して213倍，アルギニン遊離能で測定して236倍に上昇した。

6．血清に同量の KRPB に溶解した $CoCl_2$，$CdCl_2$（最終濃度 2×10^{-4}M），EDTA（最終濃度 5×10^{-4}M）を加え，その検体と NPH を，37℃で incubate し，遊離した IRI，アルギニンの濃度を測定した結果では，EDTA の添加により遊離アルギニン，遊離 IRI はそれぞれ対照の47％，88％に低下した。$CdCl_2$ の添加で遊離 IRI，アルギニンは対照の88％，73％と軽度の低下を認め，また $CoCl_2$ を添加した系では IRI，アルギニンは対照の131％，112％と軽度亢進した。精製酵素試料を使用した試験でも EDTA の添加によりアルギニンは対照の14％まで低下し，遊離 IRI は対照の71％に低下した。$CdCl_2$ を添加すると遊離 IRI アルギニンは対照のそれぞれ68％，26％と低下を認め，また $CoCl_2$ を添加した系では IRI，アルギニンは186％，130％と亢進した。なお，この濃度の $CoCl_2$，$CdCl_2$，EDTA はいずれもアルギニン，IRI 測定に影響を与えなかった。

以上の結果は NPH 結晶の分解それに伴うインスリン放出が，酵素によるプロタミン分解の反応とともに起きていることを示しており，また電気泳動分画や血清の酵素精製の検討，さらに金属塩，キレート剤の影響の特性より，作用する酵素は plasmin ではなく，CPN であることが示された。今回の検討の結果から，酵素作用を吸収の一要因として考慮の上 NPH インスリンの投与を行う必要があると思われた。

試問に際し石橋教授より NPH　結晶の性状，NPH 結晶からの IRI とアルギニンの遊離速度の相違，inhibitor, activator による IRI とアルギニンへの効果の差異について質問があったが申請者は概ね適切な答弁をした。また副査の西教授，石橋教授による本研究に関しての審査と面接を受け，合格と判定された。

以上により，本論文は学位授与に値するものと判定した。