

## ICA 512/IA-2 抗体新規 RIA 法の臨床的評価

## - Radioligand binding assay 法との比較検討 -

川崎 英二    世羅 康德    藤田 成裕    安部 幸弘    山内三爵子  
 尾崎 方子    宮副 治子    山川 賢一    魚谷 茂雄    瀧野 博文  
 山崎 浩則    山口 義彦    江口 勝美

要約：1型糖尿病における新しい膵島自己抗体として発見された ICA 512/IA-2 抗体の一般臨床での測定を目的としたキット (RIA 法) が開発された。今回われわれは、キットの判定の正確さを明らかにするために、1型糖尿病患者 72 例、2型糖尿病患者 127 例および健常人 71 例の血清を用いて、従来使用されている高感度の radioligand binding assay 法 (RBA 法) と、その 1型糖尿病における疾患感度および特異性を比較検討した。RIA 法および RBA 法による ICA 512/IA-2 抗体の陽性率は、1型糖尿病で 43.1% と 48.6%、2型糖尿病で 3.9% と 2.4% であり、健常人においては検出されなかった (特異性 100%)。両測定法の抗体価は有意な相関 ( $r=0.744$ ,  $p<0.0001$ ) を示したが、RBA 法での抗体価が低くなるにしたがい RIA 法で陰性となる血清が多く認められた。Standard deviation score を用いた検討では、RBA 法で高抗体価であるにもかかわらず RIA 法で低抗体価である血清がみられた。本 ICA 512/IA-2 抗体測定キットは特異性には優れているが、疾患感度は RBA 法にやや劣るため、RIA 法で陰性の場合には高感度法での再検や、他の膵島自己抗体との組み合わせが必要と考えられた。

Key words : ① ICA 512 抗体 ② IA-2 抗体 ③ 1型糖尿病 ④ 膵島自己抗体  
 [糖尿病 43 (12) : 1051~1056, 2000]

## 緒 言

1型糖尿病は、インスリン分泌細胞である膵ラ氏島β細胞の破壊によって発症する自己免疫疾患であり、血中には種々の膵島自己抗体が1型糖尿病の発症前から高率に検出される。したがって、膵島自己抗体は1型糖尿病の発症予知あるいは診断において重要なマーカーである<sup>1)</sup>。1974年、最初に発見された膵島自己抗体 ICA は測定に正常膵組織切片を要し、判定にも主観が入りやすく、国際的ワークショップにても測定施設により結果が異なるといった様々な問題点を有していた<sup>2)</sup>。分子生物学的手法の進歩に伴い、1980年代後半には ICA の対応抗原の同定を目的とした研究が盛んになり、1990年代にグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD), ICA 69, カルボキシペプチダーゼ H, ICA 512/IA-2 などの自己抗原が発見された<sup>3)</sup>。測定法もリコンビナント蛋白を用いた免疫沈降法, ELISA 法, RIA 法など種々の自己抗体測定法が開発され、その感度、

特異性が国際的ワークショップにおいて比較検討された<sup>4)</sup>。その結果、RIA 法が感度、特異性とも優れていることが明らかとなり、中でも自己抗原の cDNA と *in vitro* transcription/translation 法を利用した Radioligand binding assay (RBA) 法が簡便かつ高感度であるため、GAD 抗体および ICA 512/IA-2 抗体測定の主流となっている。また GAD 抗体測定系では、1型糖尿病患者の GAD 抗体のほとんどが GAD の立体構造を認識するため *E.coli* 由来のリコンビナント蛋白を抗原に用いると著しく感度が低下することが知られているが<sup>5,6)</sup>、ICA 512/IA-2 抗体については報告がない。今回われわれは、*E.coli* にて作成したリコンビナント蛋白を使用した新規 ICA 512/IA-2 抗体測定法の1型糖尿病における疾患感度および特異性を従来使用されている RBA 法と比較検討した。

**Table 1** Prevalence of ICA512/IA-2 autoantibodies in diabetic patients and healthy subjects

Subjects	n	ICA512/IA-2 autoantibodies	
		RIA n (%)	RBA n (%)
Type I diabetes	72	31 (43.1%)*	35 (48.6%)*
≤ 1 year	28	16 (57.1%)**	17 (60.7%)**
2-5 years	17	7 (41.2%)	10 (58.8%)
≥ 6 years	27	8 (29.6%)	8 (29.6%)
Type 2 diabetes	127	5 (3.9%)	3 (2.4%)
Insulin-treated	12	0 (0%)	2 (16.7%***)
Diet/OHA-treated	115	5 (4.3%)	1 (0.9%)
Healthy subjects	71	0 (0%)	0 (0%)

\*p&lt;0.0001 vs. type 2 diabetes and healthy subjects; \*\*p&lt;0.05 vs. ≥6 years

\*\*\*p&lt;0.05 vs. diet/OHA-treated.

## 対象と方法

### 1. 対象

対象は、1型糖尿病患者 72 例 (M:F=25:47, 平均発症年齢 21.3±17.0 歳, 平均罹病期間 4.0±3.6 年), 2型糖尿病患者 127 例 (M:F=67:60, 平均発症年齢 52.9±11.3 歳, 平均罹病期間 8.5±6.6 年), 健常人 71 例 (M:F=37:34, 平均年齢 30.2±6.7 歳) である。2型糖尿病患者のうち 12 例はインスリン治療者, 115 例は食事・経口血糖降下剤治療者である。糖尿病の診断と分類は 1999 年日本糖尿病学会の分類と診断基準<sup>7)</sup> に準じて行った。

### 2. E.coli 由来リコンビナント蛋白を用いた新規 RIA 法による ICA 512/IA-2 抗体の測定

*E.coli* にて作成したリコンビナント ICA 512/IA-2 を抗原として用いているコスミック社の IA-2 抗体測定キットを使用し, 以下のように測定した。pGEX-2 T vector (Pharmacia) に組み込んだ IA-2 cDNA (アミノ酸 604-979) を用いて *E.coli* にて IA-2 の GST (Glutathione S Transferase) の融合蛋白を作成し, Glutathione Sepharose カラムにて精製後, thrombin にて GST を切り離したりコンビナント IA-2 を chloramine T 法にて <sup>125</sup>I 標識したものを抗原として用いた。50 μl の <sup>125</sup>I 標識 IA-2 (30,000~40,000 cpm) を含むアッセイ緩衝液 (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 1% Tween-20) と血清 20 μl をシオノギチューブにて混和し, 4℃ で一晚静置後, 固相 protein A 溶液を 50 μl ずつ加えた。さらに冷却したアッセイ緩衝液を 1 ml ずつ加え, 4℃ にて 1 時間反応させた。アッセイチューブを 4℃, 1500 xg で 30 分遠心した後, 上清を吸引除去し γ カウンターにて放射活性を測定した。各アッセイに 0, 0.75, 2, 10 および 50 U/ml の標準血清と 2 種類の陽性コントロール血清を使用し, 標準血清より得られた total count (cpm) に対する結合率 (B/T%) と IA-2 抗体価 (U/ml) から

作成した標準曲線より未知検体の IA-2 抗体価を算出した。健常人 114 例より得られた抗体価の平均 +3 SD である 0.4 U/ml 以上を陽性とした<sup>8)</sup>。

### 3. Radioligand binding assay 法による ICA 512/IA-2 抗体の測定

PCR 法にて増幅した ICA 512/IA-2 (アミノ酸 601-979) の cDNA を pGEM-T vector (Promega, Madison, WI) に組み込み, *in vitro* transcription/translation 法にて ICA 512/IA-2 蛋白を <sup>35</sup>S-methionine で標識した。TBST (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.15% Tween-20) 50 μl にて希釈した <sup>35</sup>S 標識 ICA 512/IA-2 (20,000 cpm) と血清 2 μl を 4℃ にて一晚反応させ, 生じた免疫複合体を MultiScreen filtration plate (Millipore, Bedford, MA) において Protein A-sepharose で沈降させ, TBST にて洗浄後, 96 穴プレート用 β カウンター (MLC-2001, ALOKA CO., LTD., Tokyo, Japan) にて放射活性を測定した<sup>9)</sup>。各測定時に ICA 512/IA-2 抗体の陽性コントロール血清と陰性コントロール血清を使用し, 抗体価 (index) を以下のように計算した。Index = (未知検体の cpm-陰性コントロールの cpm)/(陽性コントロールの cpm-陰性コントロールの cpm)。健常人 204 例における index の 99 パーセンタイル値 0.018 を Cut-off 値とした。本測定法の第 3 回 IA-2 抗体 Proficiency Program における感度および特異性は, いずれも 100% であった。

### 4. 統計解析

測定法の感度を 1 型糖尿病患者における抗体陽性者の頻度, 特異性を健常人における抗体陰性者の頻度と定義した。データは平均 ± SD で示し, 各群間の比較は non-parametric Mann-Whitney U test で, 抗体の陽性率は  $\chi^2$  検定にて評価した。また抗体価の相関関係は直線回帰分析により検討した。Standard deviation score (SDS) を各々の 1 型糖尿病患者血清について次のように計算し, RIA 法および RBA 法の比較を

**Table 2** Prevalence of ICA512/IA-2 autoantibodies in patients with type 1 diabetes based on autoantibody levels measured by radioligand binding assay

ICA512/IA-2 autoantibody index by RBA	IA-2 autoantibod RIA		
	Positive	Negative	Positivity
Positive			
1.2 > $\geq 0.4$	15	0	100%
0.4 > $\geq 0.1$	7	1	87.5%
0.1 > $\geq 0.018$	7	5	58.3%
Negative			
0.018 >	2	35	5.4%

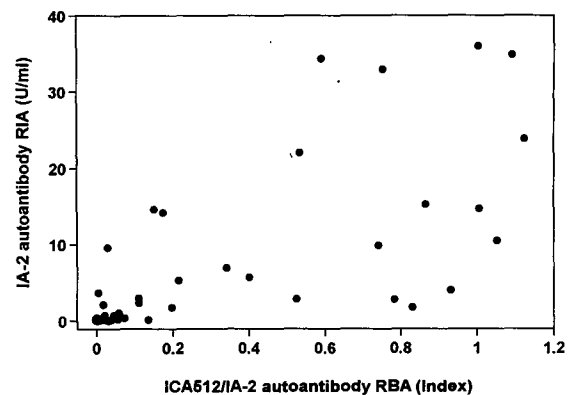
The cutoff index for RBA is 0.018.

Wilcoxon signed-rank test により行った。SDS = (検体の抗体価-健常人の平均抗体価)/健常人における抗体価の標準偏差。SDS は異なるタイプの測定法により測定された同一検体での抗体価を、それぞれの測定法独自の計算法により求められた値ではなく、cut-off 値の設定に使用した健常人の抗体価からの偏位として標準化して示すことのできる値で、異なる測定法により測定された検体の値を同じ尺度で比較するのに有用である<sup>10</sup>。p<0.05 を有意と判定した。

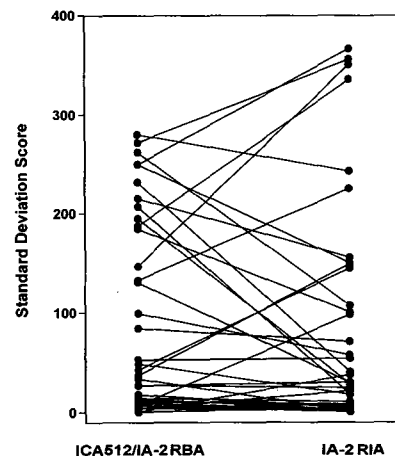
## 結果

*E.coli* 由来リコンビナント ICA 512/IA-2 を用いた RIA 法による ICA 512/IA-2 抗体の陽性率は、1 型糖尿病 72 例中 31 例 (感度 43.1%)、2 型糖尿病で 127 例中 5 例 (3.9%) であり、健常人 71 例においては検出されなかった (特異性 100%) (Table 1)。発症 1 年以下の 1 型糖尿病患者における陽性率は 57.1% (28 例中 16 例) で、罹病期間とともに減少し、発症 6 年以上の症例では 29.6% (27 例中 8 例) と有意に減少した (p<0.05)。一方 RBA 法では 1 型糖尿病の 72 例中 35 例 (感度 48.6%)、2 型糖尿病の 127 例中 3 例 (2.4%) に ICA 512/IA-2 抗体を認め、健常人 71 例ではすべて陰性であった (特異性 100%) (Table 1)。

1 型糖尿病における両測定法の一致率は Table 2 に示すように 88.9% (64/72) で、抗体価は  $r=0.744$ ,  $p<0.0001$  と有意な正の相関関係を認めた (Fig.1)。RBA 法のみ陽性の血清は 6 例にみられたが、これらの抗体価 (index) は 0.020~0.137 (平均  $0.052 \pm 0.044$ ) と比較的 low 抗体価であった (Table 2)。RIA 法での陽性率を RBA 法の抗体価別に検討すると、 $\text{index} \geq 0.4$  の高抗体価群では 100% (15 例中 15 例)、 $0.4 > \text{index} \geq 0.1$  の中抗体価群で 87.5% (8 例中 7 例)、 $0.1 > \text{index} \geq 0.018$  の低抗体価群で 58.3% (12 例中 7 例) と低抗体価群において不一致例が多かった。しかし、RBA 法で陰性 (Index<0.018) と判定された 37 例中 2 例 (5.4%) において RIA 法で ICA 512/IA-2 抗体価が Cut-off 値である 0.4 U/ml を超えていた (Table 2)。



**Fig.1** Correlation of ICA 512/IA-2 autoantibody levels among patients with type 1 diabetes measured by RIA and RBA. ICA 512/IA-2 autoantibody levels are significantly correlated ( $r=0.744$ ,  $p<0.0001$ ).



**Fig.2** Comparison of standard deviation score between two assays in ICA 512/IA-2 autoantibody-positive patients with type 1 diabetes.

異なった測定系での ICA 512/IA-2 抗体価を同じスケールで評価するため、各々の 1 型糖尿病患者血清について、Cut-off 値の決定に使用した健常人血清の平均値からの deviation を示す Standard deviation score (SDS) を両測定法においてそれぞれ計算し、測定法の違いによる抗体価を比較した (Fig.2)。ICA 512/IA-2 抗体陽性例における平均 SDS は RIA 法で  $104.5 \pm$

116.2 (4.1~366.3), RBA 法で  $99.9 \pm 98.6$  (3.5~279.8) であり, 両測定法間に有意差を認めなかった ( $p=0.36$ ). しかし, RIA 法における ICA 512/IA-2 抗体価  $< 10$  U/ml (SDS  $< 100$ ) の中~低抗体価群においては RBA 法の SDS が RIA 法の SDS よりも有意に高値を示した ( $p=0.015$ ).

## 考 察

ICA 512/IA-2 は, 膵ラ氏島  $\beta$  細胞のインスリン分泌顆粒膜に存在し 979 個のアミノ酸からなる膜貫通型チロシンフォスファターゼ類似蛋白で, ICA 512/IA-2 抗体は発症早期 1 型糖尿病の 60-70% に検出される<sup>11)</sup>. われわれはこれまでに ICA 512/IA-2 抗体の主エピトープが, アミノ酸 601-979 番の cytoplasmic domain に存在することを解明しており<sup>12)</sup>, 本研究に使用した新規 ICA 512/IA-2 抗体 RIA 法および RBA 法にはその部位の fragment ICA 512/IA-2 を使用した. 1 型糖尿病の主要な膵島自己抗体として知られている GAD 抗体の場合, 抗原として *E. coli* にて作成した recombinant GAD を用いると測定感度が著しく低下することが報告されている<sup>5,6)</sup>. その理由として, *E. coli* 由来の GAD では 1 型糖尿病患者の GAD 抗体が認識するエピトープの立体構造が変化しているためであると推測されている. 今回の ICA 512/IA-2 抗体 RIA 法には *E. coli* 由来の recombinant 蛋白を用いているが, その感度および特異性は RBA 法に劣らないことより, ICA 512/IA-2 抗体測定においては *E. coli* 由来の蛋白も抗原として使用可能であることが明らかとなった. *E. coli* 由来の recombinant 蛋白を使用できることは, 真核細胞や baculovirus 系を利用して抗原を調整するのに比較し, 短時間で抗原を作成でき, また容易かつ安価であること, さらに一度に大量の抗原を調整することができるという利点がある.

*In vitro* transcription / translation 法を用いた ICA 512/IA-2 抗体の測定法 (RBA 法) は, 操作が簡便で測定感度および特異性にも優れているため研究室レベルでは頻用されている. しかし,  $^{35}\text{S}$  や  $^3\text{H}$  を標識抗原として用いるこの方法は,  $^{125}\text{I}$  標識抗原を用いる場合と異なり特別な測定機器やこれらの核種を使用するための使用施設許可が必要で, 一般臨床に応用するための検査センターでの測定は困難である. そこで今回キット化された  $^{125}\text{I}$  標識 IA-2 抗体測定法が一般臨床で応用されるにあたり, われわれはその感度および特異性を従来使用されている RBA 法と比較検討した. その結果, 健常人における特異性は優れた検査であることが明らかとなった. しかし, 1 型糖尿病において両測定法は抗体価に有意な相関 ( $r=0.744$ ,  $p<0.0001$ ) を認めるものの, RBA 法で高抗体価にもかかわらず RIA

法では低抗体価である血清がみられた. また, RBA 法で陽性と判定された血清の約 6 分の 1 が RIA 法では陰性であった. さらに, SDS を用いた検討から中~低抗体価群において RBA 法の SDS が有意に RIA 法よりも高値を示した. SDS は測定した検体の抗体価が健常人の抗体価からどの程度掛け離れているかを示す値で, 高 SDS を示す測定系ほど noise-signal 比が大きく優れた測定系であることを意味する. これまでの ICA 512/IA-2 抗体エピトープ解析の研究から, 同一血清において linear epitope を認識する抗体と conformational epitope を認識する抗体が混在していることが知られている<sup>12)</sup>. この conformational epitope を認識する抗体が *E. coli* 由来の ICA 512/IA-2 を使用している RIA 法における低抗体価に関与している可能性がある. その他, 抗原の精製度や  $^{125}\text{I}$  での標識効率なども関係していることも推測される. 1 型糖尿病の診断・発症予知にはインスリン自己抗体, GAD 抗体, ICA 512/IA-2 抗体など複数の膵島自己抗体を組み合わせる解析することが非常に有用であることが知られている<sup>13)</sup>. したがって, 新規 ICA 512/IA-2 抗体 RIA 法で陰性であるが 1 型糖尿病が強く疑われる症例において 1 A 型糖尿病か否かを評価する場合, より高感度の測定法 (例えば RBA 法) により確認する, 他の膵島自己抗体と組み合わせるなどの必要性があると考えられる.

## 謝 辞

今回の検討にあたり, ICA 512/IA-2 抗体 RIA キットを提供していただいたコスミックコーポレーションに深謝致します.

## 文 献

- 1) Kawasaki E, Gill RG, Eisenbarth GS (1999) Type 1 Diabetes Mellitus. In: Molecular mechanisms of endocrine and organ specific autoimmunity. Eisenbarth GS (ed) RG Landes Company, Texas, p 149-182
- 2) Lernmark Å, Molenaar JL, vanBeers WAM, Yamaguchi Y, Nagataki S, Ludvigsson J, Maclaren NK (1991) The fourth international serum exchange workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies. *Diabetologia* 34 : 534-535
- 3) Atkinson MA, Maclaren NK (1993) Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 92 : 1608-1616
- 4) Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E (1995) Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The second international GADAb workshop. *Diabetes* 44 : 636-640
- 5) Mauch L, Abney CC, Berg H, Scherbaum WA, Liedvogel B, Northemann W (1993) Characterization

- of a linear epitope within the human pancreatic 64-kDa glutamic acid decarboxylase and its autoimmune recognition by sera from insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Eur J Biochem* 212 : 597-603
- 6) Tuomi T, Rowley MJ, Knowles WJ, Chen QY, McAnally T, Zimmet PZ, Mackay IR (1994) Autoantigenic properties of native and denatured glutamic acid decarboxylase : evidence for a conformational epitope. *Clin Immunol Immunopathol* 71 : 53-59
- 7) 葛谷 健, 中川昌一, 佐藤 譲, 金澤康徳, 岩本安彦, 小林 正, 南條輝志男, 佐々木 陽, 清野 裕, 伊藤千賀子, 島 健二, 野中共平, 門脇 孝 (1999) 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病* 42 : 385-404
- 8) 松浦信夫, 内潟安子, 浦上達彦, 川崎英二, 菊池信行, 小林哲郎, 杉原茂孝, 丸山太郎 (1999) 1型糖尿病における IA-2 抗体の測定および GAD 抗体との組合せ解析—多施設における検討—. *プラクティス* 16 : 567-572
- 9) Sera Y, Kawasaki E, Abiru N, Ozaki M, Abe T, Takino H, Kondo H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Akazawa S, Nagataki S, Uchigata Y, Matsuura N, Eguchi K (1999) Autoantibodies to multiple islet autoantigens in patients with abrupt onset type 1 diabetes and diabetes diagnosed with urinary glucose screening. *J Autoimmun* 13 : 257-265
- 10) Palmer J, Wilkin TJ, Kurtz AB, Bonifacio E (1990) The third international workshop on the standardization of insulin autoantibody measurement. *Diabetologia* 33 : 60-61
- 11) 川崎英二, 赤澤昭一, 江口勝美 (1999) ICA 512/IA-2 抗体の radioligand binding assay 法. *Diabetes Journal* 27 : 79-82
- 12) Kawasaki E, Yu L, Gianani R, Verge CF, Babu S, Bonifacio E, Eisenbarth GS (1997) Evaluation of islet cell antigen (ICA) 512/IA-2 autoantibody radioassays using overlapping ICA 512/IA-2 constructs. *J Clin Endocrinol Metab* 82 : 375-380
- 13) Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietroapolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS (1996) Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA 512 bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45 : 926-933

**Abstract**

**Clinical Evaluation of New Radioimmunoassay for ICA 512/IA-2 Autoantibodies  
– Comparative Analysis with Radioligand Binding Assay –**

Eiji Kawasaki, Yasunori Sera, Naruhiro Fujita, Takahiro Abe, Mikako Yamauchi, Masako Ozaki,  
Haruko Miyazoe, Kenichi Yamakawa, Shigeo Uotani, Hirofumi Takino, Hironori Yamasaki,  
Yoshihiko Yamaguchi and Katsumi Eguchi

The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan

To determine the assay accuracy of a newly developed radioimmunoassay (RIA) kit for ICA 512/IA-2 autoantibodies, we analyzed kit disease sensitivity and specificity compared to highly sensitive radioligand binding assay (RBA) using sera from 72 patients with type 1 diabetes, 127 patients with type 2 diabetes, and 71 healthy subjects. The prevalence of ICA 512/IA-2 autoantibodies by RIA and RBA were 43.1% and 48.6% in type 1 diabetics, and 3.9% and 2.4% in type 2 diabetics. No healthy subjects were positive in either assay (specificity 100%). Although ICA 512/IA-2 autoantibody levels correlated significantly between RIA and RBA, some sera showed negative results in RIA but positive in RBA in a low titer range. With analysis using the standard deviation score (SDS) in each serum from patients with type 1 diabetes, we observed some sera with high SDS by RBA but low SDS by RIA even though all were positive. The newly developed RIA has high specificity but lower disease sensitivity than RBA. Re-evaluation of the sera using the assay with higher sensitivity or combined analysis with other islet-autoantibodies required in type 1 diabetic patients negative for ICA 512/IA-2 autoantibodies measured by this RIA.