

抗ラ氏島抗体 (ICA) 陽性長期罹病インスリン 依存型糖尿病患者における 64 KD 抗体

川崎 英二 瀧野 博文 魚谷 茂雄 奥野信一郎
高尾 幸男 横田 厚 赤澤 昭一 長瀧 重信

要約：インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 発症後5年以上経過した48例について、抗ラ氏島抗体 (ICA) および64 KD 抗体を測定し、ICA 陽性長期罹病 IDDM 患者における64 KD 抗体を検討した。対象48例中17例 (35.4%) がICA 陽性であった。ICA 陽性 IDDM は、発症年齢が 28.1 ± 13.5 歳とICA 陰性 IDDM (17.3 ± 10.6 歳) に比べ有意に高かった ($p < 0.05$)。ICA 陽性 IDDM 17例中12例が抗マイクロゾーム抗体陽性で、ICA 陰性 IDDM (31例中10例) に比べ有意に多く、またICA 陽性 IDDM は自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) の合併がICA 陰性 IDDM に比べ有意に多かった (17例中12例 vs 31例中8例; $p < 0.01$)。対象46例において64 KD 抗体を測定した。ICA 陽性 IDDM 15例中15例、ICA 陰性 IDDM 31例中3例に64 KD 抗体を認め、その陽性率はICA 陽性 IDDM に有意に高かった ($p < 0.001$)。また、ICA の抗体価の高い症例ほど64 KD 抗体のレベルも高い傾向を示した。ICA 陽性長期罹病 IDDM は64 KD 抗体も陽性を示しており、IDDM のひとつのサブタイプを形成すると考えられる。

Key words : ① 64 KD 抗体 ② 抗ラ氏島抗体 (ICA) ③ インスリン依存型糖尿病 (IDDM)
④ 長期罹病 ⑤ 自己免疫性甲状腺疾患 (AITD)

[糖尿病 35(11) : 885~891, 1992]

緒 言

インスリン依存型糖尿病 (IDDM) は、膵ラ氏島 β 細胞の特異的破壊によるインスリンの絶対的不足に基づいて発症し、その過程には自己免疫機序が強く関与していることが示唆されている¹⁻⁴⁾。IDDM の発症早期には、高率に膵ラ氏島構成成分に対する自己抗体が検出され、そのうち抗ラ氏島抗体 (ICA) の検出率は、内因性膵 β 細胞機能の消失に伴い IDDM 発症後 2~3年以内に急速に低下する¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾。一方、64 KD 抗体は、膵ラ氏島の分子量 64,000 の蛋白に対する自己抗体で、近年その対応抗原が GABA 合成酵素である glutamic

acid decarboxylase (GAD) であると報告された⁶⁾。64 KD 抗体の IDDM 発症早期における検討は多く認められるが⁷⁻¹¹⁾、長い罹病期間をもつ症例で検討した報告はみられない。今回我々は、発症後5年以上経過した IDDM 患者において ICA および 64 KD 抗体を検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は、1982年から1990年までに長崎大学第一内科を受診した日本人 IDDM 患者のなかで、発症後5年以上を経過していた48例である。男性

14 例, 女性 34 例で年齢は 8~68 (33.5±11.4) (Mean±SD) 歳, 罹病期間は 5~33 (12.0±7.1) 年であった。IDDM の診断は, 発症時のケトアシドーシスの存在, 食後血中 C ペプチド値, 24 時間尿中 C ペプチド排泄量, グルカゴン負荷に対する血中 C ペプチドの反応を参考にして行なった。また, Graves 病または橋本病を自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) とし, その診断は, 臨床症状, 甲状腺腫の有無, 甲状腺機能検査および抗甲状腺抗体の上昇, 甲状腺シンチ, 甲状腺の病理学的検査により行なった。

2. ICA 測定法

ヒト臍 (血液型 O 型) 新鮮凍結切片と, ペルオキシダーゼ標識プロテイン A を用いた酵素抗体法⁹⁾にて測定し, 抗体価を JDF units に換算して表わし, 2.5 JDF units 以上を陽性とした。我々はこの方法を用いて Immunology and Diabetes Workshop (IDW) における ICA Proficiency Test に参加しており, 第 4 回の ICA Proficiency Test における我々の成績は Lab validity, Lab consistency, Lab sensitivity, Lab specificity はそれぞれ 97%, 95%, 94%, 100%であった。

3. 64 KD 抗体測定法

Wistar ラット (雄; 250~300 g) よりコラゲナーゼ法にて臍ラ氏島を単離し, PRMI 1640 培養液 (FBS 10%) にて 37°C, CO₂ 5% の条件下で培養した。数日後, 単離ラ氏島を methionine-free RPMI 1640 培地にて 2 回洗浄し, 1 時間 methionine-free RPMI 1640 培地にて培養後, 0.5 mCi/ml の [³⁵S]methionine (Amersham International, Amersham, UK; >500 Ci/mmol) を加え, さらに 4 時間培養した。標識されたラ氏島は, 0.5 mM methionine を含んだ RPMI 1640 培養液にて 2 回, TNMB 液 (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM methionine, 10 mM benzamidine/HCl) にて 1 回洗浄後, 1% Triton X-114, 1% Trasylol, 5 mM EDTA, 0.1 mM p-chloromercuribenzenesulfonic acid を含む TNMB 液にて氷上に 2 時間孵置し可溶化した。可溶性蛋白を 100,000×g, 4°Cにて 30 分間遠心して得られた上清に, 血清を 10 μl 加え 4°Cにて一晩孵置した。免疫複合体を 100 μl の protein A

-Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) にて沈降させ, 8% SDS-PAGE により分離し, Amplify (Amersham International) を用いてフルオログラフィーを行なった。64 KD のバンドの有無にて判定を行ない, バンドの強さはデンシトメーターにて定量化し, 各 assay に 64 KD 抗体強陽性の発症早期 IDDM 患者血清を陽性コントロールとして使用し, その血清の 64 KD のバンドに対するパーセントとして表わした。デンシトメーターによる intraassay および interassay の coefficient variation はそれぞれ 7.9%, 15.3%であった。

4. 他の自己抗体の測定

抗マイクロゾーム抗体 (ATMA) と抗サイログロブリン抗体 (ATGA) を赤血球凝集反応 (SERODIA AMC, SERODIA ATG; FUJIREBIO, Tokyo, Japan) にて測定し, 抗体価 10²以上を陽性とした。

5. 臍 β 細胞機能

食後 2 時間の血中 C ペプチド値と, グルカゴン負荷テストによって評価した。グルカゴン負荷テストは, 早朝空腹時にグルカゴン (Novo Co.,

Table 1 Clinical characteristics of ICA positive and ICA negative IDDM patients

	ICA (+) IDDM	ICA (-) IDDM
Number (M/F)	17 (7/10)	31 (7/24)
Age (yrs)	37.5±14.3	31.3±13.4
Age at onset (yrs)	28.1±13.5*	17.3±10.6
Duration of DM (yrs)	9.8± 4.7	13.5± 7.8
ATGA positive	3 (17.6%)	5 (16.1%)
ATMA positive	12 (70.6%)**	10 (32.3%)
AITD	12 (70.6%)**	8 (25.8%)
Graves	7 (41.2%)	4 (12.9%)
Hashimoto	5 (29.4%)	4 (12.9%)
Postprandial CPR (<0.3 ng/ml)	15 (88.2%)	25 (80.6%)

(Mean±SD)

* : significant difference between two groups (p<0.05)

** : significant difference between two groups (p<0.01)

ATGA : anti-thyroglobulin antibodies

ATMA : anti-thyroidal microsomal antibodies

AITD : autoimmune thyroid disease

CPR : C-peptide immunoreactivity

Graves : Graves' disease

Hashimoto : Hashimoto's thyroiditis

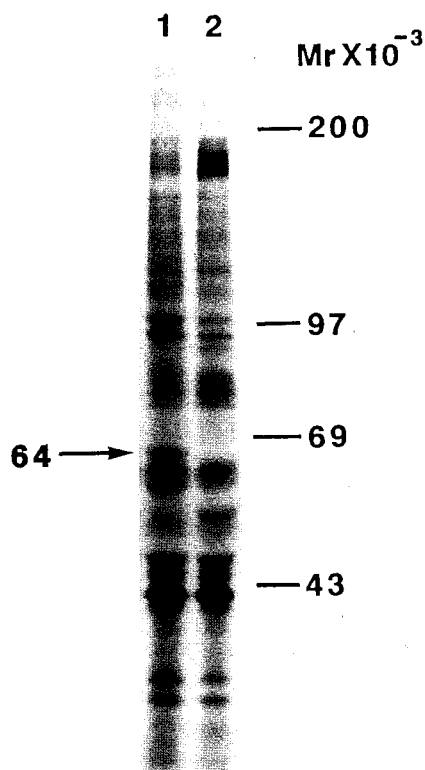


Fig. 1 Fluorograph of SDS-PAGE of immunoprecipitates of [³⁵S]methionine labeled rat islet cell lysates. lane 1: 64K antibody-positive IDDM sera, lane 2: 64K antibody-negative IDDM sera

LTD., Copenhagen, Denmark) 1 mg を静注し、前、3分、5分、10分、15分、30分と採血、血中Cペプチドの反応をみた。Cペプチドはラジオイムノアッセイ (C-peptide RIA-DAIICHI RI, Tokyo, Japan; 測定範囲 0.3~30 ng/ml) にて測定した。

6. 統計解析

χ^2 検定と Mann-Whitney test により行ない、 $p < 0.05$ を有意と判定した。数値は Mean \pm SD で示した。また、相関についての有意差検定は Spearman's Rho test により行なった。

結果

対象 48 例中 17 例 (35.4%) が ICA 陽性であった。ICA 陽性 IDDM の臨床的特徴は Table 1 に示すように、ICA 陰性 IDDM に比べ発症年齢が

28.1 \pm 13.5 歳と有意に高く、また、抗マイクロゾーム抗体陽性例および自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 合併例が 17 例中 12 例 (70.6%) と有意に多かった。性比、罹病期間、血中Cペプチド測定感度以下の症例の割合は両群間において差を認めなかった。

64 KD 抗体は対象 48 例中 46 例について測定した。Fig. 1 に 64 KD 抗体の測定結果を示す。レーン 1 は 64 KD 抗体陽性、レーン 2 は 64 KD 抗体陰性である。46 例の IDDM 患者 (ICA 陽性 15 例、ICA 陰性 31 例) において、18 例 (38.1%) が 64 KD 抗体陽性であった。さらに、ICA 陽性および陰性 IDDM でみると、ICA 陽性 IDDM では 15 例全例に、また、ICA 陰性 IDDM では 31 例中 3 例に 64 KD 抗体を認め、その陽性率は、ICA 陽性 IDDM に有意に高かった ($p < 0.001$)。Table 2 に 64 KD 抗体陽性 18 例の臨床的特徴および ICA の抗体価と 64 KD 抗体のレベルの関係を示す。ICA 陽性・64 KD 抗体陽性例 15 例中 12 例に AITD の合併を認めたが、ICA 陰性・64 KD 抗体陽性例 3 例はいずれも AITD の合併を認めなかった。ICA の抗体価と 64 KD 抗体のレベルの関係では、64 KD 抗体のレベルの高いものほど ICA の抗体価も高い傾向を示し、両者の間には弱い相関関係を認めた ($r = 0.59$, $p < 0.001$; Spearman's Rho test)。しかし、ICA の抗体価が 20 JDF units 以下の低 ICA 抗体価の症例においても 64 KD 抗体は明確に認められ、1 例は 156% control と非常に高いレベルであった。64 KD 抗体のレベルと罹病期間、さらに血中Cペプチド値とは相関を認めなかった。

考察

ICA の IDDM 患者における検出率は、発症直後には 100% 近く罹病期間が長くなるにつれ急速に低下するが、5 年以上にわたって持続陽性を示す症例も認められる⁵⁾¹²⁾。今回我々は、ICA 陽性長期罹病 IDDM 患者における 64 KD 抗体を検討するために、5 年以上の罹病期間を有する IDDM 患者においてまず ICA を測定した。ICA 陽性長期罹病 IDDM は、ICA 陰性 IDDM と比べ臨床的に次の 2 つの特徴を認めた。

Table 2 Clinical characteristics and correlation between levels of 64K antibodies and ICA titers in 64K antibody-positive patients

No.	Sex	duration (yrs)	CPR* (ng/ml)	AITD	ICA (JDF units)	64KA (%control)
1.	F	13	<0.3	Hashimoto	1280	118
2.	M	12	<0.3	Hashimoto	160	84
3.	M	10	<0.3	Graves	160	70
4.	F	7	0.6	Graves	160	38
5.	F	5	1.2	Graves	160	54
6.	F	5	<0.3	Hashimoto	80	70
7.	F	15	<0.3	(-)	20	32
8.	M	6	1.5	Graves	20	35
9.	M	24	<0.3	Graves	2.5	156
10.	M	12	<0.3	(-)	2.5	18
11.	M	10	<0.3	(-)	2.5	20
12.	F	9	<0.3	Hashimoto	2.5	41
13.	F	7	<0.3	Graves	2.5	33
14.	F	6	<0.3	Hashimoto	2.5	17
15.	M	6	<0.3	Graves	2.5	32
16.	F	7	<0.3	(-)	<2.5	18
17.	F	19	<0.3	(-)	<2.5	80
18.	F	19	<0.3	(-)	<2.5	130

* C-peptide values measured at 5 min after injection of 1 mg glucagon

CPR : C-peptide immunoreactivity

ICA : islet cell antibodies

64KA : 64K antibodies

AITD : autoimmune thyroid disease

Graves : Graves' disease

Hashimoto : Hashimoto's thyroiditis

一つは発症年齢が有意に高いということであり、もう一つは抗マイクロゾーム抗体陽性例および AITD 合併例が有意に多いということである。IDDM の発症年齢は 10~14 歳の間にピークがあり、ほとんどは 20 歳未満に発症することが知られている¹³⁾。今回の我々の検討の結果、ICA 陰性 IDDM の発症年齢は平均 17.3 歳であるのに対し、ICA 陽性 IDDM では平均 28.1 歳であった。さらに、ICA 陽性長期罹病 IDDM は 70.6% の症例において、抗マイクロゾーム抗体陽性であり、さらにそれら患者は AITD を合併していた。このことは、不均一な IDDM において、ICA 陽性長期罹病 IDDM は、免疫異常が強く関連した IDDM のひとつのサブタイプを形成するものと考えられる。

64 KD 抗体は、膵 β 細胞の分子量 64,000 の蛋白に対する自己抗体で、近年その対応抗原が抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素である

glutamic acid decarboxylase であると報告された⁶⁾。64 KD 抗体は、IDDM の発症早期には 70~90% に検出され、さらに IDDM 発症前より ICA よりも早期から出現すると報告されている⁷⁻¹¹⁾。今回 5 年以上の罹病期間をもつ IDDM 患者において 64 KD 抗体を測定した。その結果、ICA 陰性 IDDM では 31 例中 3 例 (9.7%) が陽性であったのに対し、ICA 陽性 IDDM では 15 例全例 (100%) に 64 KD 抗体が検出され、その陽性率は ICA 陽性例に有意 ($p < 0.001$) に高かった。さらに、ICA の抗体価と 64 KD 抗体レベルの関係について検討したところ、両者の間には弱い相関関係を認めた。

今日 ICA 測定の感度および特異性には研究室間でかなりのバラツキが認められるため、そのバラツキを小さくする目的で IDW において ICA Proficiency Test が行なわれている。第 4 回の Proficiency Test における測定結果の解析では、

陰性コントロール血清を測定したときの全研究室における平均の ICA 抗体価は 0~18 JDF units であり、また低抗体価における ICA の判定が非常に困難であることが報告されている¹⁴⁾。今回の我々の成績では、20 JDF units 以下の低抗体価を示す ICA 陽性 IDDM においても 64 KD 抗体は明瞭に検出されており、このことは低抗体価の ICA を示す症例においては、64 KD 抗体の方が I 型糖尿病のより良いマーカーであることを示している。さらに注目すべきことは、ICA 陰性 IDDM においても 3 例に 64 KD 抗体を認めたことである。これら 3 例は、全例 AITD は合併しておらず臨床的には他の ICA 陰性 IDDM と差を認めなかった。このことは、ラ氏島蛋白を metabolic に標識して免疫沈降法によって測定する 64 KD 抗体測定法が間接酵素抗体法にて検出する ICA 測定法よりもより感度が良いということを示しているのかも知れない。または、ICA の対応抗原について以前より報告されているように¹⁵⁻¹⁸⁾、ラ氏島の minor component である 64 KD 蛋白が ICA の対応抗原とは異なるものであるとも考えられる。

今回の我々の症例において、内因性膵 β 細胞機能を反映する血中 C ペプチド値は、ICA 陽性、陰性にかかわらずほとんどの症例で測定感度以下であった。C ペプチドが、残存する抗原としての膵 β 細胞の量を反映するものであるとすると、ICA または 64 KD 抗体陽性例ではそれぞれの抗体産生が何らかの要因で亢進していることが推測される。我々は、ICA 陰性 IDDM 患者の B リンパ球を EB virus で transform することにより高率に ICA が検出されることを報告しており¹⁹⁾、また AITD において高率に抗インスリン自己抗体が検出され自己抗体の polyclonal な産生が報告されている²⁰⁾。

今回の我々の検討にて、ICA 陽性長期罹病 IDDM において全例に 64 KD 抗体が検出され、高率に AITD を合併していたことは、AITD における自己免疫異常がこれら自己抗体の産生を促進させている可能性が推測される。

謝辞

本研究の遂行に当たり御協力頂きました三菱油化株式会社筑波総合研究所斎藤和子先生に深く感謝致します。

なお本論文の要旨は第 34 回日本糖尿病学会年次学術集会にて発表した。

文 献

- 1) Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiency. *Lancet* II : 1279-1282
- 2) Lernmark Å, Freedman ZR, Hofmann C, Rubenstein AH, Steiner DF, Jackson RL, Winer RJ, Traisman HS (1978) Islet-cell surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N Eng J Med* 299 : 375-380
- 3) Lendrum R, Walker G, Cudworth AG, Theophanides C, Pyke DA, Bloom A, Gamble DR (1976) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* I : 1273-1276
- 4) MacCuish AC, Barnes EW, Duncan LJP, Irvine WJ (1974) Antibodies to pancreatic-islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet* II : 1529-1533
- 5) Takahashi A, Tsujihata M, Yokota A, Yamaguchi Y, Ueda Y, Akazawa S, Miyake S, Nagataki S (1986) A new method of detection of islet cell antibodies (ICA) using peroxidase-labeled protein A, and incidence of ICA in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29 : 378-382
- 6) Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, de-Camilli P (1990) Identification of the 64 K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347 : 151-156
- 7) Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å (1982) Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298 : 167-169
- 8) Baekkeskov S, Landin M, Kristensen JK, Srikanta S, Bruining GJ, Mandrup-Poulson T, de-Beaufort C, Soeldner JS, Eisenbarth G, Lindgren F, Sundquist G, Lernmark Å (1987) Antibodies to a 64,000-Mr human islet cell protein precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*

- 79 : 926-934
- 9) Christie M, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Dahlquist G, Lernmark Å, Baekkeskov S (1988) Antibodies to a Mr-64,000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 31 : 597-602
 - 10) Christie MR, Daneman D, Champagne P, Delovitch TL (1990) Persistence of serum antibodies to 64,000-Mr islet cell protein after onset of Type 1 diabetes. *Diabetes* 39 : 653-656
 - 11) Atkinson MA, Maclaren NK, Sharp DW, Lacy PE, Riley WJ (1990) 64,000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335 : 1357-1360
 - 12) 山口義彦, 上田康雄, 竹馬庸裕, 前田恭男, 奥野信一郎, 明石政治, 山元秀文, 中西俊明, 赤澤昭一, 長瀧重信 (1990) 抗ラ氏島抗体 (ICA) 長期持続陽性インスリン依存型糖尿病患者の臨床的特徴. *糖尿病* 33 : 953-957
 - 13) Christau B, Kromann H, Christy M, Andersen O, Nerup J (1979) Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus (0-29 years at onset) in Denmark. *Acta Med Scand. Suppl.* 62 : 54
 - 14) Lernmark Å, Molenaar JL, van Beers 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
 - 15) Colman PG, Nayak RC, Campbell IL, Eisenbarth GS (1988) Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes* 37 : 645-652
 - 16) Powers AC, Bowen S, West S (1991) Carboxypeptidase H is an autoantigen of the ICA and is expressed on the cell surface of islet cells. *Diabetes* 40 suppl. 1 : 1A
 - 17) Pietropalo M, Castano L, Russo E, Powers A, Barnea O, Eisenbarth GS (1991) Utilization of a human λ gt 11 islet library to identify novel autoantigens associated with Type I diabetes. *Diabetes* 40 Suppl. 1 : 1A
 - 18) Rabin D, Pleastic S, Palmer-Crocker R, Rae PMM, Shapiro J, Garbosa J, Knowles W, Rowe C, Oles J (1991) Cloning and expression of islet cell autoantigens. *Diabetes* 40 suppl. 1 : 1A
 - 19) Yamaguchi Y, Chikuba N, Nakanishi T, Yamamoto H, Okuno S, Maeda Y, Akazawa M, Akazawa S, Nagataki S (1991) Production of islet cell antibodies from Epstein-Barr virus-transformed peripheral blood lymphocytes in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34 : 511-514
 - 20) Nuovo SA, Baker JR, Wartofsky L, Lukes YG, Burman KD (1988) Autoantibodies to insulin are present in sera of patient with autoimmune thyroid disease. *Diabetes* 37 : 317-320

Abstract

Autoantibodies to 64 KD Islet Cell Protein in Long-Standing IDDM Patients with Positive ICA

Eiji Kawasaki, Hirofumi Takino, Shigeo Uotani, Shinichiro Okuno, Yukio Takao,
Atsushi Yokota, Shoichi Akazawa, Shigenobu Nagataki

First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine,
Sakamoto-machi 7-1, Nagasaki 852, Japan

To investigate the clinical significance of autoantibodies to 64,000-Mr islet cell protein (64 K antibodies) in patients with long-standing insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) with positive islet cell antibodies (ICA), ICA and 64 K antibodies were assayed in 48 IDDM patients with a disease duration of more than 5 years. ICA were detected in 17 (35.4%) of 48 IDDM patients. Ages at onset of ICA positive IDDM (28.1 ± 13.5 y.o.) were significantly higher than those of ICA negative patients (17.3 ± 10.3 y.o.). The prevalence of autoimmune thyroid disease (AITD) in ICA positive patients was significantly higher than that in ICA negative patients (12/17 vs 8/31 ; $p < 0.01$). 64 K antibodies were detected in 15 of 15 ICA positive patients and 3 of 31 ICA negative patients, and the prevalence of patients positive for 64 K antibodies was significantly higher in ICA positive patients ($p < 0.001$). In ICA positive patients, the higher levels of 64 K antibodies were observed in patients who had higher ICA titer. These results demonstrate that long-standing IDDM patients with positive ICA were also positive for 64 K antibodies, and this patient group may compose a subtype of IDDM.