抗ラ氏島細胞膜抗体 (ICSA) 対応抗原の 解析並びにその認識機序に関する研究

浜松医科大学第三内科
(主任: 山崎 昇教授)

袴 田 睦, 伊 藤 光 泰

Analysis of Islet Cell Surface Antigen Reactions with Islet Cell Surface Antibodies (ICSA)

Mutsumi HAKAMATA and Mitsuyasu ITOH

Third Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School
of Medicine, Hamamatsu, Japan
(Director: Prof. Noboru Yamazaki)

Islet cell surface antibodies (ICSA) have been detected in the sera of many patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). They have also been demonstrated to affect the plasma membranes of β -cells *in vitro*. To determine the pathogenetic role of ICSA in IDDM, we studied their prevalence and their relationship to lymphoblastogenesis (LBG) in diabetes as well as in other autoimmune diseases. Furthermore, islet cell antigens (IAg) were characterized from rat pancreatic islet cells, using an affinity column consisting of human IgGs including ICSA.

ICSA titers were measured by indirect immunofluorescence. Sera were determined as ICSA-positive when they reacted to more than 10% of 50-100 cells. The LBG investigation was carried out after a 4-day incubation with phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM), or concanavalin A (Con A). The LBG induced by IAg was investigated after an 8-day incubation. Lymphocytes included 75% CD3-positive cells and 5% CD20-positive cells. IAg were purified from ICSA-positive IgG coupled to CNBr-activated sepharose 4B. The prevalence of ICSA was 39% in patients with IDDM (11/28), 15% in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) (16/109), 14% in Graves' disease (3/22), 29% in Hashimoto's disease (5/17), 12% in rheumatoid arthritis (3/25), 20% in systemic lupus erythematosus (SLE) (7/35), and 33% in Sjögren's syndrome (2/6). No ICSA were detected in 27 normal subjects.

Although sera from the patients with autoimmune diseases contained antinuclear antibodies, antithyroid antibodies and/or rheumatoid factor, there was no relationship between the prevalence of such antibodies in patients with ICSA and those without it. In 3 patients (60%) with ICSA-positive IDDM, the lymphoblastogenic responses to PHA and

PWM were decreased. A similar decrease was observed when comparing ICSA-positive NIDDM to ICSA-negative NIDDM (PHA: $p<0.05$; PWM: $p<0.01$). However, there was no relationship between HbA_{1c} and the LBG response or between HbA_{1c} and the presence of ICSA.

The relative molecular weights (Mr.) of the IAg reacting with ICSA-positive IgG were around 67, 64, 55, and 20K in all but three patients with diabetes mellitus. IAg with a Mr. around 30K or less than 14K were also demonstrated in some patients with diabetes mellitus. The Mr. of IAg was the same in three patients with autoimmune disease as in diabetes mellitus, but it differed in three other similar patients. The LBG response to rat IAg eluted from an affinity column containing self-IgG was positive in four patients (80%) with IDDM, in three patients (50%) with NIDDM, and in all four patients with SLE. On the other hand, the LBG response to rat IAg eluted from an affinity column consisting of IgG from a patient with NIDDM (No. 6) was positive in four patients (80%) with IDDM, in four patients (67%) with NIDDM, and in three patients (50%) with autoimmune disease. One patient with SLE, who has a family history of diabetes, showed as high a response in the LBG test as did those with IDDM.

These results suggest that common antigens reacted with the ICSA detected in diabetes mellitus and that they were recognized by lymphocytes from patients with IDDM, which may have implications for the pathogenesis of diabetes mellitus.

結 言

インスリン依存性糖尿病 (IDDM) の病因として、自己免疫機序の関与が明らかにされてきた。抗ラ氏島細胞抗体 (Islet cell surface antibodies: ICSA) は、発症直後の IDDM 患者血中に高率に出現する自己抗体であり³³⁾³⁰⁾⁴³⁾⁴²⁾¹⁵⁾, *in vitro* において膵 β 細胞を特異的に障害すること³¹⁾¹³⁾²⁷⁾³⁵⁾⁴⁸⁾, さらに、細胞膜に対する抗体であることより、IDDM の発症と深く関連をもつとされている⁷⁾。我々は、ICSA がいかなる免疫機能異常により出現するかを明らかにする目的で、ICSA の疾患特異性と他の免疫学的機能との関連性を検討するとともに、ICSA 陽性患者血中 IgG に対応するラ氏島抗原を同定し、さらにこれら患者リンパ球がこの抗原を認識し免疫応答を生ずるか否かについて検討し、ICSA の病因的意義について考察した。

対 象 と 方 法

(1) 対象

IDDM 28例 (男19例, 女9例, 18~59歳, 平均 $\pm$ 標準偏差 39.0 ± 13.8 歳), インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 109例 (男52例, 女57例, 13~80歳, 平均 54.4 ± 14.5 歳), 健常成人27例 (男22例, 女5例, 24~90歳, 平均 42.6 ± 24.6 歳), 糖尿病合併のない自己免疫疾患105例 (男9例, 女96例, 20~74歳, 平均 42.4 ± 13.0 歳) [バセドウ病22例, 橋本病17例, 慢性関節リウマチ (RA) 25例, 全身性エリテマトーデス (SLE) 35例, シェーグレン症候群 (SjS) 6例] を対象とした。対象例は全て浜松医科大学第三内科に通院または入院中の患者より無作為に抽出した。IDDM と NIDDM

はケトースの有無, 肥満歴の有無, 発症の経過, インスリン使用量, 一日尿中 C ペプチド排泄量またはグルカゴン1mg 静注後6分の血中 c ペプチド値 ($<1.8\text{ng/dl}$) により分類した。

ICSA 陽性症例のうち IDDM 5例, NIDDM 6例, 糖尿病を有しない自己免疫疾患6例 [SLE 4例, シェーグレン症候群 (SjS) 1例, RA 1例] の合計17例については, 各々の血清より精製した IgG と反応するラットラ氏島抗原を抽出し, 生化学的解析を行った。これら症例の profile を表1に示す。このうち, 11例の ICSA 陽性糖尿病例は, 肥満は認めず, 0.13~16年の罹病期間を有していた。HbA_{1c} でみた血糖コントロール状況は6.4~14.3%に分布した。PEG 法による¹²⁵I-インスリン結合率で示すインスリン抗体価は, 長期間動物インスリン使用歴を有する症例2, 3, 7で陽性を認めたが, ヒトインスリン使用例およびインスリン未使用例では陰性であった。75gOGTT 時の Insulinogenic index [$\Delta\text{IRI}/\Delta\text{BS}$ (30分)] および $\Sigma\text{IRI}/\Sigma\text{BS}$ は, NIDDM の症例7, 8で特に低値を示した。

(2) ICSA の測定

Lernmark らの方法に準じ, 既報²³⁾のごとく9週令の Wistar 系雄ラットからコラゲナーゼ法および DNase とヒアルロニダーゼ処理により遊離ラ氏島細胞を得て, 被験血清と反応させ, 洗浄後 FITC 標識抗ヒト IgG 抗体と結合させ, 間接蛍光抗体法で測定した。被験血清は56℃ 30分間非働化後, ラット脾細胞にてあらかじめ4℃ 4時間反応させ, 非特異的免疫グロブリンを吸収した。判定は2名の検者で行い, 50個以上のラ氏島細胞を計測し, 10%以上の陽性ラ氏島細胞を認めた場合を陽性と判定した。

(3) 非特異的 mitogen に対するリンパ球幼若化反応 (LBG)

糖尿病群の51例より得たヘパリン加末梢血10ml を得て, Ficoll-paque[®] 比重遠心法により単核球 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) を分離し, 既報¹⁸⁾のごとく, PHA ($1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$), PWM ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), ConA ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) に対するリンパ球の DNA 合成反応を³H-thymidine の細胞内取り込みを指標として測定した。

(4) ICSA 対応ラットラ氏島抗原の抽出

ICSA 陽性患者17例の血清から, 飽和硫酸沈澱法及び DEAE-Sephacel[®] イオン交換体 (Pharmacia 製) を用いたクロマトグラフィーにより IgG を分離精製した。非特異的 IgG をラット肝アセトン末と反応させて吸収後, 型通り臭化シアン活性化 Sepharose[®] 4B カラム (Pharmacia 製) にカップリングさせ, アフィニティーカラム (Econo-Column[®], $1.0 \times 20\text{cm}$) を作製した。これに Wistar 系雄ラット (9週令, 1回の実験当り6~8匹) からコラゲナーゼ法により得た遊離ラ氏島 ($1 \sim 2 \times 10^3$ 個) を Sonics & Materials 社製 sonicator を用い sonication により可溶化して添加した。Tris 緩衝液 (pH8.0) にて4℃ 12時間繰返し灌流した。次いで Glycin-HCl 緩衝液 (pH2.8) に切り替え, 280nm の吸光度をモニターして得られた酸溶出分画を, 24時間透析しさらに凍結乾燥後, 緩衝液に溶解した。これを ICSA 対応ラ氏島抗原とし, Lowry 法により蛋白量を測定し, 100℃ 2分間, 0.5% SDS と5% 2-メルカプトエタノール混合液中で可溶化し, Laemmli の変法に従い SDS-PAGE を行い, 分子量を解析した。染色は, Bio-Rad 社製シルバーステインキットを用いた。対照として, ICSA 陰性 NIDDM 患者および ICSA 陰性 SLE 患者より血清 IgG を抽出し, 同様にアフィニティーカラムを作成し, 可溶化ラ氏島ホモジェネートを添加し, 酸溶出分画を SDS-PAGE に供した。

(5) ラ氏島抗原に対する LBG

患者より得たヘパリン加末梢血20ml を, Ficoll-paque® 比重遠心法さらに Percoll® 比重遠心法にてリンパ球と単球に分離した。リンパ球分画は, Coulter 社製モノクローナル抗体を用いて染色し, EPICS-V® にて flow cytometry で解析したところ, 75%が CD3陽性細胞, 5%が CD20陽性細胞を含んでいた。単球分画は, 非特異的エステラーゼ染色により, 87%がエステラーゼ染色陽性細胞であった。リンパ球分画と単球分画を再び10:1の割合に混合し, 96穴丸底マイクロプレート上に well あたり細胞数 2×10^6 個分注し, 抗原添加後, 37℃, 5% CO₂下に8日間培養した。ハーベスト20時間前に0.25 μ Ci の ³H-thymidine を添加し, シンチレーションカウンターで thymidine の細胞内取り込みを測定した。抗原は, 抽出した0.1~1.0 μ g/well のラットラ氏島抗原を用いた。各実験は triplicate で行い, 培養8日後の cell viability は90%を示した。intraassay variation の CV 値は, mean $\pm$ SD=20 $\pm$ 16%であったことから, CV 値の3SD 以上, すなわち stimulation index (SI) 1.60以上を示した場合を陽性と判定した。

統計学的検討は, Wilcoxon's rank sum test と, χ^2 検定を用いた。

結 果

1) 各種疾患の ICSA 陽性率(Fig. 1)

ICSA 陽性率は, IDDM39%と最も高率であったが, 他の疾患でも NIDDM15%, バセドウ病14%, 橋本病29%, RA12%, SLE20%, SjS33%を示し, 健常成人は0%であった。ICSA 陽性 NIDDM の16例のうち, 3例は合併疾患をもち, それぞれ SLE, RA, バセドウ病であった。

Fig. 1 Prevalence of positivity for ICSA of sera from patients with diabetes, autoimmune diseases, and normal subjects. Numbers in parenthesis indicate the number of subjects.

2) ICSA と他の自己抗体との関連性 (Fig. 2)

各種自己免疫疾患では、種々の自己抗体が血中に存在し、それらとの交差反応も考えられるため、ICSA と、抗核抗体・甲状腺自己抗体・RA 因子との相関を検討したが、ICSA 陽性群と陰性群との間にはこれらの抗体の陽性率には有意差を認めなかった。

3) 糖尿病群での、ICSA と非特異的 mitogen に対する LBG との関連性 (Fig. 3)

ICSA 陽性 IDDM の、PHA, PWM, ConA に対する LBG 反応は、ICSA 陰性 IDDM に比べ低反応の傾向を認めたが、推計学的には有意差を認めなかった。しかし、特に PHA, PWM に対して、ICSA 陽性5例中3例 (60%) が正常反応の下限以下を示し、低反応であった (正常対照群 PHA: 34000~60000cpm, PWM: 13600~26400cpm)。ICSA 陽性 NIDDM の PHA に対する反応は 27444 ± 19010 cpm (mean $\pm$ SD) であり、ICSA 陰性 NIDDM の 44430 ± 15854 cpm に対し有意に低値であった ($p < 0.05$)。同じく、ICSA 陽性 NIDDM の PWM に対する反応は 8859 ± 5942 cpm であり、ICSA 陰性 NIDDM の 16184 ± 6006 cpm に対し有意に低値であった ($p < 0.01$)。ConA に対する反応は、ICSA 陽性・陰性両群間に差を認めなかった。これら糖尿病群の LBG 反応と糖代謝異常の程度 (HbA_1c) とは、関連性は認められなかった。さらに ICSA 陽性・陰性群間において、IDDM, NIDDM とともに HbA_1c に差を認めず、これら mitogen に対する低反応性は糖代謝の悪化による二次的なものではないと考えられた。

4) ICSA 陽性 IgG と反応性を有した、ラットラ氏島抗原の分析

(a) SDS-PAGE による分子量解析 (Fig. 4)

アフィニティークロマトグラフィーを利用して得られた、17例 (表1) の ICSA 陽性 IgG と反応したラットラ氏島抗原の SDS-PAGE を行った。3例 (case1, 2, 11) を除き IDDM, NIDDM とともに、分子量67K, 64K, 55K, 20KDa に共通した band が認められ、一部には30K, 14KDa 以下の band も認められた。他の ICSA 陽性自己免疫疾患では、3例 (case12, 15, 17) が ICSA 陽性糖尿病群と共通した分子量の抗原を示したが、他の3例の band は分子量が異なった。これら

Fig. 2 The incidences of antinuclear antibodies (ANA), antimicrosomal antibodies (MCHA), antithyroglobulin antibodies (TGHA) and rheumatoid factor (RA) in patients with or without ICSA.

の band は, IgG の H 鎖, L 鎖とは明らかに異なる分子量であり, アフィニティーカラムから解離した IgG とは考えられない。また, 対照として, ICSA 陰性 NIDDM 患者の血清 IgG から作成したアフィニティーカラムに添加したラ氏島抗原からは, 酸溶出分画がほとんど得られず, SDS-PAGE でも band は認められなかった (Fig. 4-a)。一方, 糖尿病合併のない ICSA 陰性 SLE 患者 IgG から作成したアフィニティーカラムからは, SDS-PAGE にて分子量20KDa の band が認められ (Fig. 4-b), この分子量の band は ICSA 対応抗原以外の非特異的な抗原である可能性が考えられた。

(b) ラ氏島抗原に対する LBG の検討

それぞれの自己の IgG と反応して得られたラ氏島抗原に対する LBG 反応を, 各症例からリンパ球を得て同時に培養し, 検討した。IDDM 群では, 5例中4例が, 各々の IgG と反応して得られた抗原 (蛋白量0.1 μ g/well 以上) と反応し, SI 1.6以上の陽性反応を示した (Fig. 5)。

Table 1 Profiles of the patients with ICSA-positive serum which was used in affinity chromatography.

Patients profiles

Patient group		Age (y.o)	Sex	Obesity (%)	Duration of diabetes (yrs)	Family histories of diabetes	HbA1c (%)	Insulin antibodies (%)	U-CPR (μ g/day)	75g OGTT AIRI/ABS	SI
IDDM	1	18	M	-24.3	0.13	(-)	14.3	5.1	22	—	—
	2	30	F	-19.2	6	(+)	9.4	20.5	0.9	0	0.055
	3	43	F	+8.7	15	(+)	10.1	11.4	0	0	0.018
	4	45	F	-23.6	6	(-)	9.3	6.9	0	0.016	0.027
	5	54	M	-32.6	10	(+)	8.2	8.4	3.9	0	0.018
NIDDM	6	23	F	-3.8	4	(+)	6.4	5.0	150	0.184	0.115
	7	34	F	-10.6	15	(-)	8.6	42.3	41	0	0
	8	38	F	-7.2	16	(+)	5.9	5.0	35	0	0.032
	9	38	M	-35.4	10	(-)	7.8	7.5	45	0.019	0.032
	10	56	F	-7.6	8	(+)	7.3	4.7	32	0.798	0.495
	11	77	F	-4.4	16	(+)	11.5	6.8	35	0.025	0.069
Auto-immune diseases	12	33	F	-14.8	0	(-)	4.5	4.2	43	0.968	0.851
	13	34	F	-27.0	0	(-)	3.6	3.9	95	0.636	0.344
	14	39	F	-3.7	0	(+)	4.9	5.9	49	1.591	0.434
	15	39	F	-1.7	0	(-)	5.1	5.1	74	3.256	0.544
	16	51	F	-4.1	0	(-)	6.1	6.3	51	3.688	0.392
	17	62	F	-26.4	0	(-)	4.7	3.5	89	0.725	0.264

Fig. 3 Lymphoblastogenesis in patients with diabetes mellitus. (a)IDDM, (b)NIDDM. Each dot represents ^3H -thymidine (^3H -TdR) incorporation by cultured lymphocytes in response to PHA, PWM or ConA. Vertical bars represent the SD of the mean in each group. The blastogenetic responses to PHA and PWM were significantly lower in patients with ICSA-positive NIDDM [$p < 0.05$ (★) and $p < 0.01$ (☆), respectively].

Fig. 4 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of detergent extracts of rat islets by affinity chromatography.

(a): The protein extract from a patient with ICSA-negative NIDDM. (b): The protein extract from a patient with ICSA-negative SLE. Numbers 1-17: The protein extracts from patients with ICSA-positive IDDM (1-5), NIDDM (6-11), SLE (12-15), Sjögren's syndrome (16) and rheumatoid arthritis (17). Aliquots ($\sim 2 \mu\text{g}$ protein per lane) were applied to the gel and were stained with silver solution. The molecular weight standards used were phosphorylase b (Mr. 94,000), bovine serum albumin (Mr. 67,000), ovalbumin (Mr. 43,000), soybean trypsin inhibitor (Mr. 20,100) and α -lactalbumin (Mr. 14,400).

NIDDM 群でも、症例6と症例11で高い LBG 反応が認められ、症例8でも抗原蛋白量 $1\mu\text{g}$ の時、陽性反応が認められた。しかし、残りの3例は反応が認められなかった (Fig. 6)。自己免疫疾患では、SLE の4例全例が、いずれかの抗原量で陽性反応を示したが、SjS 及び RA の2例は反応を認めなかった。SLE4例のラ氏島抗原は、67KDa 付近の band を共通して有していた (Fig. 4, 7)。症例6は SLE を合併し、血漿交換療法にて多量の IgG を得たため、affinity chromatography により抗原を多く得ることができた。症例6の詳細については既に報告した²⁵⁾。この症例は NIDDM であるが、多施設共同研究における blind study で他大学の別の測定法でも ICSA 陽性が確認されており、その血清 IgG の対応抗原が IDDM において認められた67K, 64K, 55K, 20KDa の分子量と共通性をもつため、このラ氏島抗原を使い、同様の方法で各症例の LBG 反応を比較検討した (Fig. 8)。IDDM5例中3例 (症例3, 4, 5) は、自己由来の IgG により精製されたラ氏島抗原だけでなく同じ分子量をもつ NIDDM 由来の IgG 対応抗原に対しても、同程度の陽性反応が認められた。2例の NIDDM (症例8, 11) も同様であった。症例1は、自己由来の IgG 対応抗原に対しては反応を認めなかったが、この症例6由来の抗原には陽性反応を示した。自己免疫疾患

Fig. 5 Lymphoblastogenesis in response to islet cell antigens in patients with ICSA-positive IDDM. Mixtures of lymphocytes and monocytes (10:1) were cultured with islet cell antigens (IAg) for 8 days and were pulsed with ^3H -thymidine (tdR) 20 hours before harvesting. The stimulation index (SI) represents incorporation of ^3H -tdR by cells incubated with IAg divided by the number of incorporating cells incubated without IAg. An SI of over 1.6 was determined as a positive response.

では, SLE の3例 (症例13, 14, 15) が自己由来の IgG 対応抗原だけでなく NIDDM 由来の IgG 対応抗原に対しても陽性反応が認められ, 特に家族歴に糖尿病のある症例14は両者に対し強い LBG 反応を示した。これら SLE3例のラ氏島抗原は, 67KDa 付近の band のみ症例6の NIDDM と共通した分子量を示した。

Fig. 6 Lymphoblastogenesis in response to islet cell antigens in patients with ICSA-positive NIDDM. The method used and the mode of evaluation were the same as in Fig. 5.

考 察

IDDM の発症に, 膵ラ氏島β細胞を中心とした自己免疫機序の成立が深く関連している。IDDM 患者血清中には種々の自己抗体の存在が認められており, 特に膵島細胞抗体 (Islet cell antibodies: ICA) と ICSA, 更にインスリン自己抗体が注目されている⁴⁷⁾²⁾¹⁶⁾。ICA は発症直後の IDDM 患者の60~70%に見いだされ, 診断的意義の高い抗体であるが, 膵β細胞のみならずα, δ細胞とも反応することから細胞特異性が低く, また target である抗原が細胞質内に存在することから, IDDM の病因に関与しているか否か疑問視する研究者もいる⁷⁾。一方, ICSA はβ細胞に特異的で, 補体存在下で細胞障害性をもつことが示されており³¹⁾¹³⁾²⁷⁾³⁵⁾⁴⁸⁾, IDDM の病因と関連している可能性がある。ICSA の疾患特異性については, これまで IDDM で30%, 発症直後の IDDM では70%前後の陽性率と報告されているが⁷⁾²²⁾, NIDDM⁴⁶⁾²⁹⁾³⁷⁾や甲状腺疾患³⁴⁾, IDDM を発症しやすい先天性風疹症候群¹⁹⁾, また高齢者³⁸⁾での陽性例も認められている。我々の結果では, IDDM の ICSA 陽性率はこれまでの報告例と一致し, NIDDM, パセドウ病, 橋本病でも陽性例が認められ

たが、RA, SLE, SjS でも陽性例が認められた。IDDM, NIDDM の分類は、主として臨床経過、インスリン分泌能、インスリン使用量などから判定しているが、ICSA 陽性 NIDDM は、将来 IDDM に進展していく ICA 陽性 NIDDM 症例と同様、いわゆる slowly progressive IDDM である可能性が考えられ²⁰⁾²⁸⁾、実際この群のなかには尿中 c ペプチド排泄量・インスリン分泌反応の低い例が認められたことも、この考えを支持しているかもしれない。

非特異的 mitogen に対する LBG は、ICSA 陽性 NIDDM 群が ICSA 陰性群に比べ、PHA・PWM に対して低反応であることが認められた。一部の ICSA 陽性 IDDM 群においても PHA に対して著しい低反応が認められた。細胞性免疫の一指標である、非特異的 mitogen に対する LBG については、これまで IDDM での検討がされているが、相反する結果が報告されており³²⁾¹²⁾³⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾¹⁷⁾²⁶⁾、ICSA との関連性については報告がほとんどない。我々の IDDM 動物モデルでの検討では、ICSA 出現時期に PHA・PWM に対する LBG 反応の低下が示されており²³⁾、ヒトの場合の今回の結果と考え合わせ、ICSA 陽性糖尿病では、その背景にリンパ球機能異常が存在している可能性が示唆された。

今回の17例の ICSA 陽性 IgG と反応性を有したラットラ氏島抗原の分析では、糖尿病群では2例を除き、IDDM, NIDDM とともに分子量67K, 64K, 55K, および20KDa の共通した複数の抗

Fig. 7 Lymphoblastogenesis in response to islet cell antigens in patients with ICSA-positive autoimmune diseases. The method used and the mode of evaluation were the same as in Fig. 5.

原が抽出された。一方, 他の ICSA 陽性自己免疫疾患群では, これら糖尿病群で見いだされた分子量の一部と共通性が認められた。これらの結果から, Winkel らが報告している如く機能的に異なる ICSA の存在も考えられる²²⁾。自己免疫疾患で認められた ICSA は, 他の自己抗体との交差反応による可能性も考えられるが, 既知の抗核抗体, 甲状腺自己抗体, RA 因子とは相関性がなく, これらとの交差反応は, 考えにくい。但し, ICSA 陰性だが多彩な自己抗体を有する SLE 患者 IgG アフィニティーカラムからは, 20KDa の抗原が抽出され, この分子量の band は非特異的なものである可能性がある。むしろ, SLE の3例は67KDa 付近の抗原分子量を共通に持ち, 同じ抗原分子量を含んだ NIDDM 由来のラ氏島抗原にも LBG 反応を示した点, 特に家族歴に糖尿病を有した SLE では強い LBG 反応が認められた点から, 67KDa 付近の抗原と反応性を有する ICSA が, これら一部の自己免疫疾患と糖尿病では同一のものである可能性も考えられ興味深い。これまでの, ICSA 対応抗原の分析では, 数種類の分子量をもつタンパク抗原が報告されている¹⁰⁾⁴⁾³⁹⁾⁵⁾³⁶⁾⁶⁾。最近では, ヒトだけでなくラットにおいても64KDa の抗原が報告されている⁸⁾。今回のラットラ氏島を用いた検討でも, 64KDa を含む複数の抗原が認められ, それが糖尿病群の多くで共通性が認められた。本法では, 膜成分のみの抽出ではないため, これらの抗原の局在が膜成分にあるのか, 細胞質内あるいは核内にあるのかまでは断定できなかった。ICSA 対応抗原が細胞内に存在している可能性も考えられており⁹⁾, また橋本病でのマイクロゾーム抗体などと同様, 本来細胞内に存在するものが膜上に出現し²¹⁾, ICSA の target になっている可能性もある。この点に関しては, 今後さらに質的な分析が必要である。

ラ氏島抗原そのものに対する LBG 反応の検討では, ICSA 陽性 IDDM では強い反応が認められ, 一方, 同じ ICSA 陽性 NIDDM では, 反応の認められない例もあった。この違いは, それ

Fig. 8 Maximum lymphoblastogenesis in response to islet cell antigens in patients with ICSA. The method of producing lymphoblastogenesis was the same as in Fig. 5. Open bars represent the maximal response to islet cell antigens eluted from an affinity column coupled with self-IgG. Hatched bars represent the maximal response to islet cell antigens eluted from an affinity column coupled with IgG from a patient with NIDDM (No. 6).

それぞれの対応抗原が同様の分子量であったことから、むしろ患者のリンパ球機能の違いであることが考えられた。このことは、既に報告したインスリンに対する LBG 反応の検討²⁴⁾からも支持され、すなわち、ICSA 陽性糖尿病では、非特異的抗原に対するリンパ球機能異常が考えられたが、さらに、ICSA 陽性 IDDM に至っては、特異抗原に対するリンパ球の反応にも異常があることが示唆された。これまでの IDDM の患者および動物モデルにおけるリンパ球機能の検討では、suppressor T cell の減少、K cell の増加、CD4陽性 cytotoxic T cell の増加などが報告されているが⁴⁵⁾¹⁾⁴⁴⁾¹⁴⁾¹¹⁾、今回の LBG と ICSA の検討から、こうしたリンパ球機能異常と ICSA 出現を同時に合わせもった状態より IDDM が発症していく可能性が考えられた。

結 語

今回の検討より、

- 1) ICSA の機能的多様性
- 2) 糖尿病 ICSA 対応抗原の共通性
- 3) ICSA 陽性糖尿病では非特異的 mitogen に対するリンパ球の反応低下
- 4) ICSA 陽性 IDDM ではさらにラ氏島抗原に対するリンパ球反応異常が示唆された。

謝辞：稿を終えるに臨み、御指導いただいた第三内科山崎 昇教授並びに研究に協力いただいた免疫・内分泌研究班各位に深謝いたします。

本論文の要旨は、第59回日本内分泌学会総会（1986年5月仙台）、第60回日本内分泌学会秋季大会（1987年11月東京）、第8回国際内分泌学会（1988年7月京都）、第28回・第31回日本糖尿病学会総会（1985年5月大津、1988年5月東京）にて発表した。

文 献

- 1) Alviggi, L., Hoskins, P.J., Pyke, D.A., Johnston, C., Tee, D.E.H., Leslie, R.D.G. and Vergani, D.: Pathogenesis of insulin-dependent diabetes: a role for activated T lymphocytes. *Lancet*, 2: 4-6, 1984.
- 2) Arslanian, S.A., Becker, D.J., Rabin, B., Atchison, R., Eberhardt, M., Cavender, D., Dorman, J. and Drash, A.L.: Correlates of insulin antibodies in newly diagnosed children with insulin-dependent diabetes before insulin therapy. *Diabetes*, 34: 926-930, 1985.
- 3) Bagdade, J.D., Root, R.K. and Bulger, R.J.: Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*, 23: 9-15, 1974.
- 4) Bækkeskov, S., Nielsen, J.H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J. and Lernmark, Å.: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature (Lond.)*, 298: 167-169, 1982.
- 5) Bækkeskov, S. and Lernmark, Å.: A β -cell glycoprotein of Mr 40000 is the major rat islet cell immunogen following xenogenic immunisation. *Diabetologia*, 27: 70-73, 1984.
- 6) Bækkeskov, S., Landin, M., Kristensen, J.K., Srikanta, S., Bruining, G.J., Mandrup-Poulsen, T., de Beaufort, C., Soeldner, J.S., Eisenbarth, G., Lindgren, F., Sundquist, G. and Lernmark, Å.: Antibodies to a 64,000

- Mr human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. J. Clin. Invest., 79: 926-934, 1987.
- 7) Bottazzo, G.F., Pujol-Borrell, R. and Gale, E.: Etiology of diabetes: the role of autoimmune mechanisms. In: Alberti KGMM, Krall LP (Eds), The Diabetes Annual/1, Elsevier, Amsterdam. (1985) pp16-52.
- 8) Christie, M., Landin-Olsson, M., Sundkvist, G., Dahlquist, G., Lernmark, Å. and Bækkeskov, S.: Antibodies to a Mr-64000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed Type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia, 31: 597-602, 1988.
- 9) Colman, P.G., Campbell, I.L., Kay, T.W.H. and Harrison, L.C.: 64,000-Mr autoantigen in type 1 diabetes: evidence against its surface location on human islets. Diabetes, 36: 1432-1440, 1987.
- 10) Crump, A., Searce, R., Dobersen, M., Kortz, W.J. and Eisenbarth, G.S.: Production and characterization of a cytotoxic monoclonal antibody reacting with rat islet cells. J. Clin. Invest., 70: 659-666, 1982.
- 11) De Berardinis, P., Londei, M., James, R.F.L., Lake, S.P., Wise, P.H. and Feldmann, M.: Do CD4-positive cytotoxic T cells damage islet β cells in type 1 diabetes? Lancet, 823-824, 1988.
- 12) Delespesse, G., Duchateau, J., Bastenie, P.A., Lauvaux, J.P., Collets, H. and Govaerts, A.: Cell-mediated immunity in diabetes mellitus. Clin. Exp. Immunol., 18: 461-467, 1974.
- 13) Dobersen, M.J. and Scharff, J.E.: Preferential lysis of pancreatic β -cells by islet cell surface antibodies. Diabetes, 31: 459-462, 1982.
- 14) Drell, D.W. and Notkins, A.L.: Multiple immunological abnormalities in patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia, 30: 132-143, 1987.
- 15) Dyrberg, T., Poussier, P., Nakhoda, A.F., Bækkeskov, S., Marliss, E.B. and Lernmark, Å.: Time course of islet cell surface antibodies in the diabetic syndrome of the 'BB' Wistar rat. Diabetologia, 26: 156-165, 1984.
- 16) Eisenbarth, G.S.: Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. N. Engl. J. Med., 314: 1360-1368, 1986.
- 17) Fairchild, R.S., Kyner, J.L. and Abdou, N.I.: Specific immunoregulation abnormality in insulin-dependent diabetes mellitus. J. Lab. Clin. Med., 99: 175-186, 1982.
- 18) 船内正憲: パセドウ病における流血中免疫複合体の研究. 日内分泌会誌, 59: 1912-1927, 1983.
- 19) Ginsberg-Fellner, F., Witt, M.E., Yaginashi, S., Dobersen, M.J., Taub, F., Fedun, B., McEvoy, R.C., Roman, S.H., Davies, T.F., Cooper, L.Z., Rubinstein, P. and Notkins, A.L.: Congenital rubella syndrome as a model for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. Diabetologia, 27: 87-89, 1984.
- 20) Groop, L.C., Bottazzo, G.F. and Doniach, D.: Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. Diabetes, 35: 237-241, 1986.
- 21) Hanafusa, T., Pujol-Borrell, R., Chiovato, L., Hammond L.J. and Bottazzo, G.F.: Culture of human thyroid follicles with normal and reversed polarity. Ann. Endocrinol., 43: 25A, 1982.
- 22) Huen, A.H.-J., Haneda, M., Freedman, Z., Lernmark, Å. and Rubenstein, A.H.: Quantitative determination of islet cell surface antibodies using ^{125}I -protein A. Diabetes, 32: 460-465, 1983.

- 23) Itoh, M., Funauichi, M., Sato, K., Kisamori, S., Fukuma, N., Hirooka, Y. and Nihei, N.: Abnormal lymphocyte function precedes hyperglycaemia in mice treated with multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia*, 27: 109-112, 1984.
- 24) Itoh, M., Hakamata, M. and Nihei, N.: Lymphoblastogenesis to specific antigens and the role of monocytes in diabetes with positive islet cell surface antibodies (ICSA). In: Shigeta, Y., Lebovitz, H.E., Gerich, J.E., Malaisse, W.J. (eds.), *Best approach to the ideal therapy of diabetes mellitus*. Elsevier, Amsterdam. (1987) pp151-154.
- 25) 伊藤光泰, 袴田睦, 後藤吉規, 奥川忠正, 仁瓶禮之: 多彩な自己抗体を認めた MODY の3姉妹例. ホルモンと臨床. 36 (増刊号): 212-215, 1988.
- 26) Jaworski, M.A., Colle, E. and Guttman, R.D.: Abnormal immunoregulation in patients with insulin dependent diabetes mellitus and their healthy first degree relatives. *Hum. Immunol.*, 7: 25-34, 1983.
- 27) Kanatsuna, T., Freedman, Z.R., Rubenstein, A.H. and Lernmark, Å.: Effect of islet cell surface antibodies and complement on the release of insulin and chromium from perfused Beta cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 47: 85-92, 1982.
- 28) Kobayashi, T., Itoh, T., Kosaka, K., Sato, K. and Tsuji, K.: Time course of islet cell antibodies and β -cell function in non-insulin-dependent stage of type I diabetes. *Diabetes*, 36: 510-517, 1987.
- 29) 国広 潔, 横川 泰, 小野順子, 高木良三郎, 野口志郎, 草場公宏: 甲状腺疾患ならびに全身性エリテマトーデスにおける Islet cell surface antibody の測定. 日臨免誌, 6: 550-554, 1983.
- 30) Lernmark, Å., Freedman, Z.R., Hofmann, C., Rubenstein, A.H., Steiner, D.F., Jackson, R.L., Winter, R.J. and Traisman, H.S.: Islet cell surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 299: 375-380, 1978.
- 31) Lernmark, Å., Sehlin, J., Täljedal, I.-B., Kromann, H. and Nerup, J.: Possible toxic effects of normal and diabetic patient serum on pancreatic β -cells. *Diabetologia*, 14: 25-31, 1978.
- 32) MacCuish, A.C., Urbaniak, S.J., Campbell, C.J., Duncan, L.J.P. and Irvine, W.J.: Phytohemagglutinin transformation and circulating lymphocyte subpopulations in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes*, 23: 708-712, 1974.
- 33) Maclaren, N.K., Huang, S.-W. and Fogh, J.: Antibody to cultured human insulinoma cells in insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 1: 997-1000, 1975.
- 34) 丸山太郎, 武井 泉, 谷山松雄, 片岡邦三, 松木 駿, 浜田 昇, 伊藤国彦: 甲状腺疾患と膵島細胞膜抗体 (ICSA). 糖尿病, 26: 633-637, 1983.
- 35) Maruyama, T., Takei, I., Matsuba, I., Tsuruoka, A., Taniyama, M., Ikeda, Y., Kataoka, K., Abe, M. and Matsuki, S.: Cell-mediated cytotoxic islet cell surface antibodies to human pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 26: 30-33, 1984.
- 36) 松葉育郎, 中村富美男, 白沢信行, 鶴岡 明, 森 豊, 石井賢治, 山田治男, 種瀬富雄, 石川 博, 池田義雄: インスリン依存性糖尿病の成因に関する研究-膵島細胞膜抗体の認識する抗原の検討-. 糖尿病, 29: 261-265, 1986.
- 37) 根岸清彦: インスリノーマ細胞を用いた ^{125}I -抗ヒト IgG 抗体による膵島細胞膜抗体測定法とその臨床応用. 糖尿病, 26: 485-496, 1983.
- 38) 大萩晋也, 南條輝志男, 川口篤則, 中井一彦, 西 理宏, 曾和亮一, 宮野元成, 近藤 溪, 三家登喜夫, 柏井健作, 小池通夫, 川 明, 宮村 敬: 膵島細胞膜抗体 (ICSA) の多様性について-高齢者における ICSA の検

- 討一. 糖尿病, 31: 701-707, 1988.
- 39) Ohgawara, H., Okano, T., Kataoka, K. and Sakurai, Y.: Distribution and redistribution of pancreatic islet cell surface antigen reactive with islet cell surface antibody in the rat. *Diabetologia*, 24: 117-121, 1983.
- 40) Pallavicini, M.G. and Nichols, W.K.: Inhibition of lymphocyte blastogenesis by factor(s) in alloxan-diabetic rat plasma. *Diabetes*, 25: 614-622, 1976.
- 41) Plouffe, J.F., Silva, J.Jr., Fekety, R. and Allen, J.L.: Cell-mediated immunity in diabetes mellitus. *Infect. Immun.*, 21: 425-429, 1978.
- 42) Pollard, D.R., Gupta, K., Mancino, L. and Hynie, I.: An immunofluorescence study of anti-pancreatic islet cell antibodies in the spontaneously diabetic BB Wistar rat. *Diabetologia*, 25: 56-59, 1983.
- 43) Pujol-Borrell, R., Khoury, E.L. and Bottazzo, G.F.: Islet cell surface antibodies in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: use of human fetal pancreas cultures as substrate. *Diabetologia*, 22: 89-95, 1982.
- 44) Quiniou-Debrie, M.C., Debray-Sachs, M., Dardenne, M., Czernichow, P., Assan, R. and Bach, J.F.: Anti-islet cellular and humoral immunity, T-cell subsets, and thymic function in type I diabetes. *Diabetes*, 34: 373-379, 1985.
- 45) Richens, E.R., Quilley, J. and Hartog, M.: An investigation into cytotoxic mechanisms in type I diabetes mellitus. *Acta. diabet. lat.*, 19: 329-337, 1982.
- 46) Van de Winkel, M., Smets, G., Gepts, W. and Pipeleers, D.: Islet cell surface antibodies from insulin-dependent diabetics bind specifically to pancreatic B cells. *J. Clin. Invest.*, 70: 41-49, 1982.
- 47) Wilkin, T., Armitage, M., Casey, C., Pyke, D.A., Hoskins, P.J., Rodier, M., Diaz, J.-L. and Leslie, R.D.G.: Value of insulin autoantibodies as serum makers for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 1: 480, 1985.
- 48) Yamada, K., Hanafusa, T., Fujino-Kurihara, H., Miyazaki, A., Nakajima, H., Miyagawa, J., Kono, N., Nonaka, K. and Tarui, S.: Demonstration of islet cell surface antibodies in sera of New Zealand black mice and inhibitory effect on insulin release. *Diabetes*, 35: 1262-1267, 1986.

(受付日: '89. 2. 27)