50才以下で発症した糖尿病患者におけるミトコンドリア遺伝子変異陽性者と抗GAD抗体陽性者の頻度及び臨床像に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9404

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第1号　124－136（1999）

50才以下で発症した糖尿病患者におけるミトコンドリア遺伝子変異陽性者と抗GAD抗体陽性者の頻度及び臨床像に関する研究

金沢大学医学部医学科内科学第二講座（主任：馬渕　宏教授）
北　谷　真　子

ミトコンドリアDNAのtRNA$^{Leu\ (UUR)}$領域の塩基番号3243のAからGへの点変異（3243変異）はインスリン分泌異常の原因として注目されており，3243変異に伴う糖尿病は日本において全糖尿病患者の約1%をしめるといわれている．また抗グルタミン酸脱炭酸酵素（glutamic acid decarboxylase, GAD）抗体はインスリン依存型糖尿病（insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM）の診断指標及び予知指標として有用である．そこで，環境因子の関与が少ないと考えられる若年発症の糖尿病患者で，3243変異と抗GAD抗体の陽性率を調べ，それらの若年発症糖尿病への関与とそれら陽性例の臨床像を検討した．50才以下で発症した糖尿病患者120例（男68例，女52例）につき，早朝空腹時採血を行ない，血糖，HbA1c，抗GAD抗体，抗甲状腺抗体等を測定した．また末梢血白血球より抽出したDNAを用い，*Apa* Iによる消化を利用したPCR制限酵素切断多型（PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP）法と特異的PCR増幅法（amplification refractory mutation system, ARMS）により3243変異を検索した．120例の平均年齢は45±12（$\bar{X}$±SD）才，発症年齢は35±10才，空腹時血糖155±54mg/dl，HbA1c 7.7±2.0%であった．120例中IDDMは27例（22.5%），NIDDMは93例（77.5%）で治療内容は食事療法のみが19例（16.0%），経口剤が45例（37.5%），インスリンが56例（46.5%）であった．120例中3243変異は4例（3.3%）に，抗GAD抗体は10例（8.3%）に陽性であり両者とも陽性であった者はいなかった．3243変異陽性者4例の平均発症年齢は29±6才と若年発症の傾向が強かった．また平均体容量指数（body mass index, BMI）は16.4±1.5kg/m^{2}で抗GAD抗体陽性群や共に陰性であった群に比して有意に低値であった．平均空腹時血糖は188±48mg/dl，平均HbA1cは9.5±2.0%と血糖コントロールは不良であった．3243変異陽性者4例中3例に感音性難聴を認めた．抗GAD抗体陽性者10例の平均発症年齢は30±13才であり若年発症の傾向にあった．臨床病型は7例がIDDM，3例がインスリン非依存型糖尿病（non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM）と診断されており，また8例がインスリン治療中で，本抗体陽性者でインスリン依存度は高いと考えられた．本抗体陽性者の血糖コントロールは不良で，平均空腹時血糖は190±73mg/dl，平均HbA1cは9.4±2.0%であった．抗体陽性者10例中4例が抗甲状腺抗体を有した．今回の検討において，3243変異と抗GAD抗体の同時陽性例は無く，それぞれ糖尿病の独立した寄与因子と考えられた．

Key words insulin-dependent diabetes mellitus, non-insulin dependent diabetes mellitus, anti-glutamic acid decarboxylase antibody, mitochondrial DNA, gene mutation

糖尿病は，インスリンの作用不足によって起こる慢性の高血糖状態と定義される症候群であり，その病態は臨床的にも成因的にも様々である．

糖尿病は，1985年世界保健機構（WHO）分類[1]に基き，インスリン依存型糖尿病（Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM）とインスリン非依存型糖尿病（Non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM），栄養不良関連糖尿病，その他の二次性および遺伝性疾患に伴う糖尿病などに分類されてきていた．

IDDMは若年者に発症し，多くは急性発症し，ケトーシスやケトアシドーシスを起しやすく，インスリン治療が生存に必要なものとされる．発症には自己免疫が関与するものと考えられ，自己抗体はしばしば陽性であるとされている．一方NIDDMは中年以降に発症し，緩徐に進行し，ケトーシスは起しにくく，インスリン治療が時には必要であるものとされ，自己抗体は通常陰性であるとされる．このように1985年WHO分類では，臨床像，成因，残存インスリン分泌能，治療など，複数の指標によって糖尿病を分類している．

日常診療上，糖尿病症例では，若年者のNIDDM発症や，高齢者の急激なIDDM発症例が経験され，必ずしも明確に分類できない例も経験される．肥満糖尿病で，清涼飲料水の多飲にて糖尿病性ケトアシドーシスを来たすが，治療後糖代謝が正常化

平成10年11月27日受付，平成11年1月25日受理

Abbreviations：ADA, American diabetes association; AITD, autoimmune thyroid desease;ARMS,amplification refractory mutation system;BMI, body mass index; bp, base pair; GAD, glutamic acid decarboxylase;HLA, human leukocyte antigen;ICA, islet cell antibody; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus;MODY, maturity-onset diabetes

するソフトドリンクケトーシスといった病態も存在する．一方，診断当初はNIDDMと診断されながら，診断数カ月数年後に急激なインスリン分泌の低下を来たしインスリン治療が必要となる症例もある．発症年齢や発症様式，また一時期の治療法によって糖尿病を分類するのは困難である．IDDM，NIDDMは広く用いられた区分ではあったが，その枠組みから外れる糖尿病が多く報告されるようになってきた．遺伝子異常に伴う糖尿病としては，1985年WHO分類でインスリンやインスリン受容体の異常による糖尿病が区分されているが，それ以外にも遺伝子異常と関連した糖尿病がいくつか発見された．

若年性発症糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young, MODY) は，1975年にTattersallら[2]が若年発症の糖尿病多発家系を調査して提唱した概念であり，25才未満に診断され，3世代以上にわたりNIDDMを認め，優性遺伝形式を呈するもの，と定義された[3]．MODYはその臨床像が通常のNIDDMに比し，強く遺伝因子が関与するため発症年齢が低く，浸透率が高いと考えられ，遺伝的な連鎖解析に適していると考えられた．1991年にBellら[4]，1992年にはVionnetら[5]が特定遺伝子のマーカーと糖尿病との連鎖を認めそれぞれMODY 1，MODY2と命名した．以後現在までにMODY5までが同定され，特定遺伝子異常に伴った糖尿病が注目されるに至った[6]~[10]．

解糖系，TCA回路に引き続く膵β細胞内の酸化的リン酸化によるATPの産生は，インスリン分泌に重要な役割を担っており，ミトコンドリア遺伝子異常によりインスリン分泌不全を来すことは予想されていた．またミトコンドリア脳筋症の患者に糖尿病の合併が多いことは知られていたが，ミトコンドリア脳筋症における遺伝子異常の発見に引き続き，1992年Ballingerら[11]は10.4キロ塩基対のミトコンドリア遺伝子の欠失と糖尿病が3世代にわたり連鎖して母系遺伝していた一家系を報告した．続いてvan den Ouwelandら[12]は，メラス (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis,stroke-like episodes, MELAS) の75％にみられるtRNA-Leu3243番目のAからGへの変異 (3243変異) がやはり3世代にわたり母系遺伝していた糖尿病の一家系を報告した．

これらの遺伝子異常を伴う糖尿病が少しずつ解明されてきたが，その臨床型はIDDMからNIDDMまで様々であり，これらの糖尿病を従来のWHO分類によってIDDMやNIDDMと分類することは困難である．

従来IDDMの診断上の重要な指標として，膵ラ氏島抗体 (islet cell antibody, ICA)[13]，抗インスリン抗体 (insulin autoantibody)[14]等が使用されていたが，最近では，抗グルタミン酸脱炭酸酵素(glutamic acid decarboxylase, GAD)抗体が頻用されている．GADは抑制性神経伝達物質γ-アミノ酪酸(gamma-aminobutylic acid)をグルタミン酸より合成する酵素で，中枢神経組織，膵ラ氏島に豊富に存在している．全身の筋強直を特徴とするまれな神経疾患であるStiffman症候群ではGADに対する自己抗体が認められることが知られていたが，同症候群がしばしばIDDMを合併すること，GADの分子量が64kDに近いことなどから，1990年Baekkeskovら[15]がIDDM患者血中に出現する64KD抗体の対応抗原がGADであることを証明した．以後抗GAD抗体はIDDMの診断の指標として用いられるようになった．

一般的にはICAや抗GAD抗体などの膵ラ氏島に対する自己抗体はIDDMの診断指標とされているが，IDDM患者のみならず，臨床的にNIDDMと診断されている患者の中にも本抗体の陽性例が存在することが明らかになった．Kobayashiら[16][17]は，ICAが持続陽性で，NIDDMから徐々にIDDMへ移行する症例を，緩徐進行型インスリン依存型糖尿病 (slowly progressive IDDM, SPIDDM) と呼ぶことを提唱し，ICAがIDDMの診断指標としてのみならず，IDDMへの移行の指標としても有用なことを示した．1994年には，SPIDDMでは抗GAD抗体も持続して陽性であることが見い出され，抗GAD抗体がICA同様にIDDMの診断指標およびIDDMへの発症予知の指標として有用性を示した．

白人でも，1993年にZimmetら[18]が，30才以降に発症し，発症から6ケ月間以上はインスリン非依存性であった糖尿病患者を対象として調査したところ，インスリン依存性へ移行した症例で抗GAD抗体陽性者が74％，移行しなかった症例では抗体陽性者が4.3％であり，抗GAD抗体陽性の患者では将来IDDMに移行しうるとしてそれらを潜在性成人発症型自己免疫性糖尿病 (latent autoimmune diabetes mellitus in adults, LADA) と命名し，KobayashiらのSPIDDMに近い概念を提唱した．

以上より，遺伝子学的にも，また免疫学的にもIDDM，NIDDMの両型にまたがった病像を示す糖尿病の型が発見され，従来の病型分類に混乱がみられるようになってきた．

1997年7月に，米国糖尿病学会 (American Diabetes Assosiation, ADA) は，1985年WHO分類を改変し，成因を中心とした病型分類ADA案を発表した[19]．この案では，糖尿病を大きく1型糖尿病（膵β細胞破壊によるもの)，2型糖尿病（インスリン抵抗性とインスリン分泌不全によるもの)，その他の特殊な病型，妊娠糖尿病，の4つに分類している．この新分類におけるその他の特殊な病型，の中には，遺伝的β細胞機能異常という項目が設けられ，先に述べた，MODY1から3までとミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病が，それぞれ一つの病型として分類された．この分類では糖尿病を基本的には成因に基いて分類し，インスリン治療の必要性に基いたIDDM，NIDDMという分類は用いないこと，発症原因や機構の解明されているものはより詳細に細分化すること，などが提案されている．これは現在の1985年WHO分類上の混乱の解消を目的としている．

以上より，IDDM，NIDDMと既に臨床的に分類されている症例についても，再度成因論的に視点を変えて評価し，各症例の特徴を詳細化することが重要と考えられる．また自己抗体の評価は，各症例の予後や治療方針に影響を与えると考えられる．

今回私は，環境因子の関与が比較的少ないと考えられる若年発症の糖尿病患者で，比較的頻度の高いミトコンドリア遺伝子3243変異と，自己免疫異常の指標であり，インスリン分泌不全の予知指標と考えられる抗GAD抗体の2点について検討し，若年発症糖尿病への関与を検討し，3243変異と抗GAD抗体陽性

---

of the young; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus; PCR-RFLP, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; RRF, ragged-red fiber; SPIDDM, slowly progressive IDDM; SU剤, sulfonil urea剤; TBE, Tris-boric acid-EDTA

者の臨床像を比較検討した.

対象および方法

Ⅰ. 対 象

北陸3県に在住の，50才以下で発症し，現在外来通院中の糖尿病患者120例（男性68例，女性52例）を対象とした．対象者の臨床像を表1に示す．発症時，臨床的にIDDMと診断された者は27例（22.5％）で，NIDDMは93例（77.5％）であった．平均BMIは22.8±4.0 ($\bar{X}$±SD) kg/m^{2}と肥満傾向はなかった．平均空腹時血糖は155±54mg/dlで，平均ヘモグロビンA1c (hemoglobin A1c, HbA1c) は7.7±2.0%であった．IDDMの診断は，急性にケトーシスを伴って発症したもので診断直後のインスリン治療開始の条件を満たすこととした．

Ⅱ. 方 法

1．高分子DNAの抽出

対象者の末梢静脈血10mlを EDTA-2Na を抗凝固剤として採取し4℃にて移送し−20℃にて保存した．この末梢血を室温にて解凍後TritonX-100融解変法20) にて高分子 DNA を単離した．すなわち320mMショ糖液，1%TritonX-100，5mM MgCl2，10mM Tris-HCl (pH7.6) を含む融解液にて赤血球を溶血させ，遠心により沈澱として白血球を集めた．これをプロテアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) にて消化後，フェノール-クロロホルム (1：1) で1回，続いてクロロホルム-イソアミルアルコール (24：1) にて2回抽出し，最後にエタノール沈澱により DNA を分離した．こうして得られた DNA を10mM Tris-HCl，1mM EDTA-2Na (pH 8.0) に溶解の上 260nmにおける吸光度測定により濃度を求めた．

2．PCR

上記方法で調製したDNAを用いて，ミトコンドリア遺伝子tRNA^{Leu}の変異部位である塩基番号をコードする領域3243位を挟む20塩基長のプライマー common5' (5'-AGGACAAGAGAAATAAGGC-3',3130-3149) と common3' (5'-CACGTTGGGGCCTTTGCGTA-3',3423-3404) 1組を作成した (表2)．プライマーは DNA 合成機モデル ABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster, USA) を用いベータシアノエチルホスホアミダイド法[21] にて合成した．アンモニア水に溶解し55℃で一晩静置したうえで−20℃に冷却，真空下で遠心して乾燥，再滅菌蒸留水 1mlに溶解しカラム NAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) に通して精製した．260nmでの吸光度より濃度を測定し10pMになるように濃度を調整した．

DNA 断片の増幅には Saiki ら[22] による PCR 法を用いた．高分子DNA 1.5 μgを鋳型 DNA として40pMのプライマー1セットと200 μMの各デオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP,

Table 1. Clinical characteristics of 120 diabetic patients

Clinical and laboratory features	Number (%) of patients
Sex	
Male	68 (56.6)
Female	52 (43.4)
Age at sampling (years)	45±12
Age at onset (years)	35±10
Duration of diabetes (years)	9.4±8.0
BMI (kg/m^2)	22.8±4.0
FPG (mg/dl)	155±54
HbA1c (%)	7.7±2.0
Type of diabetes	
IDDM	27 (22.5)
NIDDM	93 (77.5)
Treatment	
Diet	19 (16.0)
OHA	45 (37.5)
Insulin	56 (46.5)

BMI, body mass index; FPG, fasting plasma glucose; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM, non insulin-dependent diabetes mellitus; OHA, oral hypoglycemic agent. Values represent $\bar{X}$±SD.

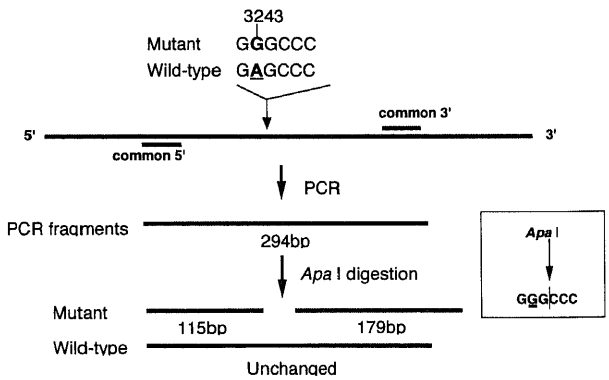


Fig. 1. Detection of mitochondrial DNA tRNA $^{Leu(UUR)}$ mutation at np3243 by PCR-RFLP. A DNA fragment encompassing the mutation site, which is generated by PCR using primers common 5' (AGGACAAGAGAAATAAGGCC, 3130-3149) and common 3' (CACGTTGGGGCCTTTGCGTA, 3423-3404) was digested with *Apa* I. *Apa* I cleaves the mutant sequence (GGGCCC) at position 3243 but not the wild-type sequence (GAGCCC). Positions of the undigested (294bp) and digested PCR fragments (115bp and 179bp) are indicated. Two fragments in the PCR products are formed for the mutated allele, but only one fragment for the wild-type.

Table 2. Suquences of oligonucleotide primers for PCR amplification

Primer	Sequence	Position
common5'	5'-AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3'	3130-3149
common3'	5'-CACGTTGGGGCCTTTGCGTA-3'	3404-3423
3243G3'	5'-TTTTATGCGATTACCGGGCc-3'	3243-3262

Small c at the 3' terminal of 3243G3' indicates the base complementary to the mutated base. common 5', forword primer; common 3', reverse primer; 3243G3', reverse primer.

dGTP, TTP) と 2.5単位の Taq ポリメラーゼ (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA) を10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl2, 0.01% ゼラチンを含む緩衝液に加え再滅菌蒸留水を加え計50 μlとなるようにして撹拌した．遠心して反応液を集め50 μlのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ，変性反応温度93℃，1分，アニーリング 温度52℃，1分，伸長反応温度72℃，3分の温度条件のもと30サイクルの反応を行った．

3．PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法

先に示したPCR法にて増幅されたミトコンドリアDNA3130位から3423位までの断片を用い，RFLP法で3243位のAからGへの変異の存在を確認しスクリーニングを行うため，制限酵素 *Apa* Iを用いた．この酵素は図1に示す通り変異を来したDNAのみに作用し，全長294塩基対 (base pair, bp) のDNA断片を115bpと179bpに切断する．ピペットにてミネラルオイルの下層より PCR 産物7 μlを取り出し，*Apa* I 2 μlとその反応用緩衝液1 μlを加え，酵素の至適温度37℃の条件下にて6時間反応させた．この反応産物8 μlを，DNA鎖長マーカーであるΦ-X174DNAの *Hae* Ⅲ消化産物とともに，10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (アトー，東京) を用いて，Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA,TBE) 泳動用緩衝液中で4℃のもと，200Vで120分泳動をおこなった．TBE緩衝液はTris-HCl 54g，ホウ酸 27.5g，0.5M EDTA 20ml に蒸留水を加え3000mlにしたものを保存用の5×TBE緩衝液とし，泳動直前に1×の濃度に希釈した．染色には BIO-RAD 銀染色キット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用いプロトコールに従って銀染色を行った．10%メチルアルコール 100mlにて30-60分間ゲルの固定を行い酸化剤 100mlにて5分間酸化させた．蒸留水で15分間に6-7回水を換えながらすすぎ余分な酸化剤を除き，銀染色溶液を加え20分間以上振とうさせた．その後30秒以内に洗浄し現像液を加えバンドの出現を確認した．ある程度以上バンドが濃くなった時点で 5%酢酸100mlを 5分間加え反応を停止させ，蒸留水で洗浄し30%メチルアルコール100mlに3日間以上浸してゲルを収縮させ，グリセオールを両面に均等に塗布して水に浸したセルロースフィルム二枚の間にはさみ正方形の枠に固定して乾燥させた．

4．特異的PCR増幅法

上記方法で調整したDNAを用いて，上記のPCR-RFLP法とは別に，3243変異に特異的なプライマーを作成，使用することによる特異的PCR増幅法 (amplification refractory mutation system, ARMS) によっても3243変異を確認した．谷山ら[23]の方法に順じて，H鎖側に表2にも示した変異特異的プライマー3243G3' (5'-TTTTATGCGATTACCGGGCC-3') を用い，対のプライマーとしてはcommon5'を使用し，PCR法により増幅した．この方法はプライマー3'末端側塩基にマッチした変異DNAは増幅されるが，ミスマッチの正常DNAは増幅されないという原理を利用した方法である[24]．図2に示す通り，変異を有する検体のみ132bpのDNAが増幅される．変性反応温度93℃，1分，アニーリング 温度62℃，1分，伸長反応温度72℃，3分の温度条件のもと30サイクルの反応を行った．ピペットにてミネラルオイルの下層より PCR 産物8 μlを取り出しDNA鎖長マーカーであるΦ-X174DNAの *Hae* Ⅲ消化産物とともに，10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (アトー，東京) を用いて，

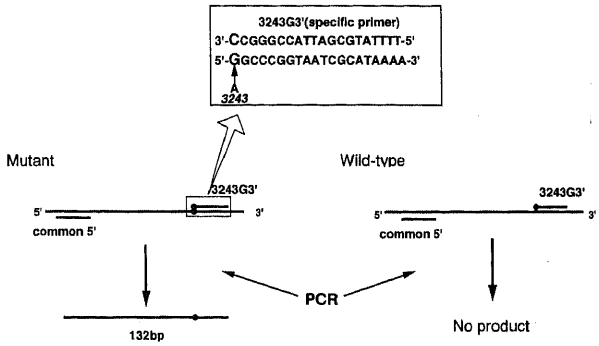


Fig. 2. Detection of mitochondrial DNA tRNA $^{Leu(UUR)}$ mutation at np3243 by ARMS. A 132 bp product is generated only if the 3'-terminal nucleotide of the mutation spesific primer (3243G3') matches the template. Note that primer 3243G3' contains an obligatory mismatch penultimate to its 3' end.

TBE泳動用緩衝液中で4℃のもと，150Vで90分泳動をおこなった．染色には先に述べたBIO-RAD銀染色キットを用いて銀染色を行い，ゲル固定，酸化等も前項に順じて行った．

5．抗GAD抗体の測定

対象者120例に早朝空腹時採血を行い，血清にて抗GAD抗体を測定した．

抗GAD抗体は，^{125}I標識精製ブタ脳GAD (GAD65，GAD67の両アイソフォームを含む) を抗原としたラジオイムノアッセイキット (Hoechst Japan Ltd.,東京) にて測定した[25]．すなわち，ブタ脳ホモジュネートよりGAD-1モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィーにより精製したGADを^{125}I標識したものを抗原とした．患者血清20 μl，125I標識GAD溶液100 μl，および100 μlの定量緩衝液 (1 nM 2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド，0.2 mMリン酸ピリドキシン，10 mMリン酸生理食塩水) を混和後，室温にて2時間反応させた．次に1mlの抗ヒトヤギIgG抗体を加え，さらに30分室温にて反応させた後，3000rpmで4度，30分遠心，上清を吸引した．沈殿の放射活性をガンマカウンターで測定し，既知濃度の患者血清から得られた検量線を元に抗GAD抗体価を算出し，結果は単位 (units, U)/mlで表示した[26]．抗GAD抗体測定用ラジオイムノアッセイ系の測定範囲は，高力価の抗GAD抗体を有することがわかっているIDDM患者血清を段階希釈して検量線を作成し，この結果を元にして測定範囲を4から256 U/mlと定めた．当キット添付の標準曲線作成用の最低標品濃度である4.0U/mlを最低検出限界とした．

6．統計処理

2群間の検定はχ^2検定もしくはFisherの直接確率計算法を用い，3群間の検定には分散分析 (ANOVA) を用い，いずれも危険率5%未満 ($p<0.05$) を統計学的有意差ありとした．また抗GAD抗体価と糖尿病罹病期間，HbA1c値はPearsonの相関係数の検定を用いそれぞれの相関を検定した．

成　　績

Ⅰ．ミトコンドリア遺伝子3243点変異(3243変異)陽性者並びに抗GAD抗体陽性者の検出

1・PCR-RFLP法並びにARMS法による3243変異陽性者の検出

50才以下で発症した糖尿病患者120例中，PCR-RFLP法によるスクリーニングにおいて，3例に3243変異陽性者が見出された．図3にその泳動パターンを示す．変異陽性例では179bpと115bpの変異バンドが認められた．症例14に関しては薄く179bpの変異バンドが認められるものの確定できなかった．また，同120例に対しARMS法により変異を確認したところ，PCR-RFLP法で陽性であった3例に加え，変異を確定できなかった症例14にも132bpの変異バンドを認め，合計4例に3243変異が認められた (結果は示さない)．スクリーニングとして用いられているPCR-RFLP法にて変異が確定できず，ARMSにより変異が確認された症例14において，家系内で遺伝子検索を行ったところ，図4に示す通り発端者の長女，次女，長男の子供3名すべてに両方の検査において3243変異が認められた．よって症例14は3243変異陽性者と判断し，結局120例中4例に3243変異が見い出され，その頻度は3.3%であった．表3に示すように4例いずれも女性であり，調査時の平均年齢は33±10才で，平均発症年齢は29±6才であった．血糖コントロールは不良で，平均空腹時血糖は188±48mg/dl，平均HbA1cは9.5±2.0%であった．臨床病型では症例11のみIDDMと診断されており，他の3例はNIDDMと診断されていた．治療は4例中3例がインスリン使用者であった．4例中2例に合併症を認め，他の2例には存在しなかった．

3243変異陽性者のうち，表3に示す症例11，症例12については発端者母親につき，また症例14については発端者の両親，長女，次女，長男につきPCR-RFLP法ならびにARMS法により3243変異の確認を行った．図5に4症例の家系図と，遺伝子解

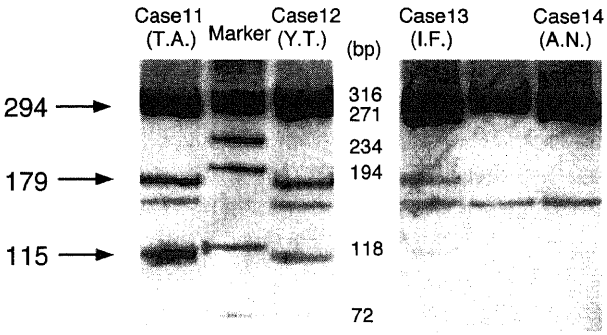


Fig. 3. Identification of the mitochondrial DNA tRNA $^{Leu\ (UUR)}$ mutation at np3243. PCR-RFLP analysis were performed for four patients, and 294 bp fragments (3130-3423) of mitochondrial DNA encompassing position 3243 were digested with *Apa* I and analyzed by acrilamide-gel (10-20%) electrophoresis. Case 11 (T.A.), case 12 (Y.T.), case 13 (I.F.), show the mutational pattern with 179 and 115bp fragments. In case 14 (A.N.), a slight digested band of 179bp can be seen. Marker, the molecucular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* Ⅲ.

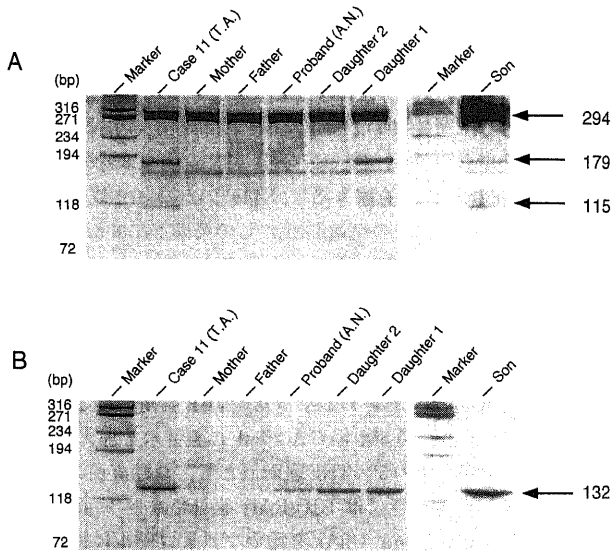


Fig. 4. Identification of the mitochondrial DNA tRNA $^{Leu(UUR)}$ mutation at np3243 in case 14 (A.N.) family.
(A) Results of PCR-RFLP analysis. Two daughters and a son show the mutational band. Mother and Father are negative for mutation. Proband (A.N.) shows a mutational band that is hard to recognize. Maker, ϕ X174/*Hae* Ⅲ digestion. The result of a mutant case 11 (T.A.) is also shown.
(B) Results of ARMS analysis. Generation of the 132 bp fragment (3130-3262) of mitochondrial DNA encompassing position 3243 is generated only if the mutation exists and analyzed by acrylamide-gel (10-20%) electrophoresis. Proband (A.N.), in which *Apa* I digestion did not detect mutation, is also demonstrated to have a mutation, in addition to the two daughters and a son. Maker, ϕ X174/*Hae* Ⅲ digestion. The result of a mutant case 11 (T.A.) is also shown.

Table 3. Clinical characteristics of patients with mitochondrial DNA 3243 A to G mutation

Case	Sex	Age at onset (Years)	Age at sampling (Years)	Duration (Years)	GADab (U/ml)	3243mut.	Type of diabetes	Treatment	BMI (kg/m^2)	History of obesity	FPG (mg/dl)	HbA1c (%)	Complication	Hearing Disturbance	Family history	TPOab or TGab
11.T.A.	F	25	23	3	<4.0	+	I	I	14.6	−	126	7.8	Neph	+	−	−
12.Y.T.	F	25	25	1	<4.0	+	N	SU	16.4	−	180	12.1	Ret, Neph, Neur	−	Mo	−
13.I.F.	F	40	36	4	<4.0	+	N	I	16.3	−	237	9.0	−	+	−	−
14.A.N	F	44	33	11	<4.0	+	N	I	18.2	−	210	8.9	−	+	Fa	−
$\bar{X}$±SD		33±10	29±6	4.5±4.6					16.4±1.5		188±48	9.5±2.0				

GADab, anti-GAD antibody; 3243mut., mitochondrial DNA 3243 A to G mutation; BMI, body mass index; FPG, fasting plasma glucose; TPOad, anti-thyroid peroxdase antibody; TGab, anti-thyroglobulin antibody; F, female; N, non-insulin dependent diabetes mellitus; I, insulin dependent diabetes mellitus; SU, sulfonylurea drugs; I, insulin; Neph, nephropathy; Ret, retinopathy; Neur, neuropathy; Mo, mother; Fa, father; +, positive for each variables; −, negative for each variables. Values represent $\bar{X}$±SD.

析の結果，糖尿病，及び難聴の有無について示す．症例11，症例12の母親はいずれの検査においても変異は認められなかった．症例11の母は検診等で糖尿病を指摘されたことはなかったが，症例12の母親は難聴を伴い境界型糖尿病にて通院していた．症例14では先に述べた通り発端者の長女，次女，長男にPCR-RFLP法，ARMS法両検査で3243変異が認められた．症例14の両親には両検査ともに変異は認められず，検診等で糖尿病と診断されたことはなかった．また長女，次女，長男において，変異陽性を確認後75g経口ブドウ糖負荷試験を施行したが，いずれも糖尿病型を呈さなかった．

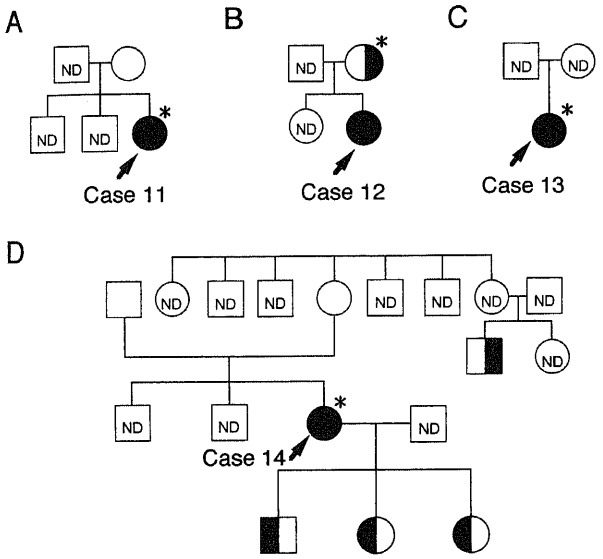


Fig. 5. Pedigree of case 11 (A), case 12 (B), case 13 (C) and case 14 (D). The arrow indicates the proband in each pedigree. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ◧, ◐, with mitochondrial DNA tRNA $^{Leu(UUR)}$ mutation at np3243; ◨, ◑, with diabetes mellitus; ●, with mitochondrial DNA tRNA $^{Leu(UUR)}$ mutation at np3243 and diabetes mellitus; *, with hearing disturbance; ND, not determined.

2．ラジオイムノアッセイ法による抗GAD抗体の測定，ならびに陽性者の検出

対象者120例中，抗GAD抗体4.0U/ml以上を示す陽性者は10例 (8.3%) であった．表4に示すように調査時の平均年齢は39±13才，平均発症年齢は30±13才であった．血糖コントロールは不良で，平均空腹時血糖は190±73mg/dl，平均HbA1cは9.4±2.0%であった．臨床病型は7例がIDDM，3例がNIDDMと診断されていた．治療は，IDDMと診断された7例と，NIDDMと診断された者の内1例の合計8例がインスリンで治療されており他の2例はスルホニル尿素剤 (SU剤) が使用されていた．合併症では10例中5例に何らかの合併症を認めた．

抗GAD抗体陽性者10例の抗体価は，1000U/ml以上が2例，11.0-20.0U/mlが1例，4.0-10.0U/mlが7例であった．今回検討した120例の抗GAD抗体の分布を，IDDM，NIDDM別に図6に示す．IDDMでは27例中7例 (25.9%)，NIDDMでは93例中3例 (3.2%) に抗体陽性者を認め，IDDMで陽性率は有意に高値であった (p=0.0011)．抗GAD抗体価と糖尿病罹病期間，抗体価とHbA1c値の間には有意な相関は認められなかった．

3．3243変異および抗GAD抗体同時陽性者の頻度

3243変異と抗GAD抗体の同時陽性者は存在しなかった．

Ⅱ．3243変異陽性者並びに抗GAD抗体陽性者の臨床像の比較

1．発症年齢

3243変異陽性者4例の平均発症年齢は29±6才，抗GAD抗体陽性者10例の平均発症年齢は30±13才で，ともに陰性であった群の平均年齢36±10才に比して若年発症の傾向にあったが，有意差はなかった (表5)．

2．インスリン依存性

3243変異陽性者4例のうちIDDMと診断されたのは1例であった(25.0%)．抗GAD抗体陽性者10例のうちIDDMと診断されたのは7例であった (70.0%)．これは3243変異，抗GAD抗体ともに陰性であった群の頻度106例中19例 (17.9%) に比し有意に高率であった (p=0.001) (表5)．また，抗GAD抗体陽性者におけるインスリン治療者は10例中8例 (80%) で，ともに陰性であ

Table 4. Clinical characteristics of anti-GAD antibody-positive patients

Case	Sex	Age at onset (Years)	Age at sampling (Years)	Duration (Years)	GADab (U/ml)	3243mut.	Type of diabetes	Treatment	BMI (kg/m^2)	History of obesity	FPG (mg/dl)	HbA1c (%)	Complication	Hearing Disturbance	Family history	TPOab or TGab
1.F.Y.	F	47	46	1	1870.0	−	N	SU	26.0	+	215	8.0	Neph	−	−	−
2.S.M.	M	46	13	3	1168.0	−	N	SU	19.7	+	135	6.5	−	−	−	+
3.N.N.	M	28	15	13	19.1	−	I	I	18.3	−	82	8.8	Neph	−	−	+
4.K.Y	F	16	12	4	8.7	−	I	I	28.4	−	195	10.9	−	−	−	+
5.T.S.	F	63	38	25	7.6	−	N	I	17.8	−	296	14.0	Ret, Neph, Neur	−	Mo,Sis	−
6.T.U.	M	43	32	11	7.5	−	I	I	22.7	−	267	8.8	−	−	−	−
7.S.S.	M	50	44	6	6.6	−	I	I	18.9	−	103	8.8	Neur	−	Mo,Sis	−
8.M.K.	M	36	31	5	4.7	−	I	I	21.1	−	275	10.1	−	−	−	−
9.R.H.	F	31	15	16	4.6	−	I	I	20.1	−	161	8.5	Ret	−	−	+
10.Y.T.	F	30	27	3	4.2	−	I	I	21.3	−	172	9.6	−	−	Fa	−
$\bar{X}$±SD		39±13	30±13	8.7±7.5					21.4±3.4		190±73	9.4±2.0				

GADab, anti-GAD antibody; 3243mut., mitochondrial DNA 3243 A to G mutation; BMI, body mass index; FPG, fasting plasma glucose; TPOad, anti-thyroid peroxdase antibody; TGab, anti-thyroglobulin antibody; M, male; F, female; N, non-insulin dependent diabetes mellitus; I, insulin dependent diabetes mellitus; SU, sulfonylurea drugs; I, insulin; Neph, nephropathy; Ret, retinopathy; Neur, neuropathy; Mo, mother; Sis, sister; Fa, father; +, positive for each variables; −, negative for each variables. Values represent $\bar{X}$±SD.

Table 5. Comparison of the clinical features between the patients with mitochondrial DNA 3243 A to G mutation, anti-GAD antibody-positive patients, and double-negative patients

Clinical features	Number (%) of patients		
	3243 mut. positive n=4	GAD ab positive n=10	double negative n=106
Age at onset (years)	29±6	30±13	36±10
BMI (kg/m^2)	16.4±1.5 †‡	21.4±3.4	23.2±4.0
IDDM	1 (25.0)	7 (70.0 *)	19 (17.9)
Insulin treatment	3 (75.0)	3 (80.0 ¶)	44 (41.5)

3243 mut., mitochondrial DNA 3243 A to G mutation; GAD ab, anti-GAD antibody; BMI, body mass index; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus;
† $p<0.01$ compared with double negative patients, analysed by analysis of variance (ANOVA).
‡ $p<0.05$ compared with anti-GAD antibody positive patients, analysis by ANOVA.
*$p<0.01$, ¶ $p<0.05$ compared with double negative patients, by χ^2 test.
Values represent $\bar{X}\pm SD$.

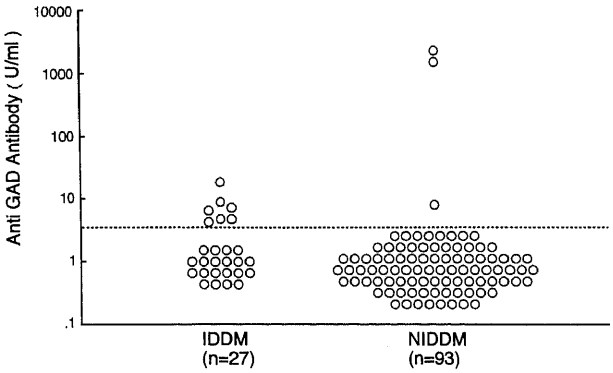


Fig. 6. Distributions of anti-GAD antibodies titers comparing IDDM and NIDDM patients. The area of under the dot line indicates the negative zone for anti-GAD antibody levels (<4.0U/ml). Each open circle shows one patient.

った群106例中44例 (41.5%) よりも有意に高率であった (p=0.041). 抗GAD抗体価別の治療内容は, 1000U/ml以上のNIDDM2例 (SU剤にて治療) 以外は, 11.0-20.0U/mlの1例 (IDDM), 4.0-10.0U/mlの7例 (IDDM6例, NIDDM1例) は全例インスリンにて治療されていた (表4).

3. BMI

3243変異陽性者群の平均BMIは16.4±1.5kg/m^2であり, 抗GAD抗体陽性者の平均21.4±3.4kg/m^2や, ともに陰性であった群の平均23.2±4.0kg/m^2に比し有意に低値であった (p=0.032, p=0.010) (表5).

4. その他の特徴的臨床像

表3に示すとおり3243変異陽性者4例中3例に難聴が認められた. 3243変異陽性者に抗甲状腺抗体の陽性者はいなかったが, 抗GAD抗体陽性者10例中, 抗甲状腺抗体を有した者は4例 (40%)であった (表4). そのうちIDDMは3例, NIDDMは1例であった. 抗甲状腺抗体陽性者4例の抗GAD抗体価は1168U/ml (NIDDM), 19.1U/ml, 8.7U/ml, 4.6 U/ml (3例IDDM) と様々であった. 3243変異陽性者で肥満歴を有する者はいなかったが, 抗GAD抗体陽性者では2例が肥満歴を有していた(表4).

考 察

本研究においては, まず3243変異と抗GAD抗体陽性の頻度を検討し, 各々の糖尿病への発症の寄与を検討した.

前述したとおりミトコンドリア3243遺伝子異常に伴う糖尿病は, 糖尿病の中でも頻度が高いことで注目されている. 本邦ではKadowakiら[27]をはじめKatagiriら[28], Odawaraら[29], Kishimotoら[30]がそれぞれに変異の頻度を調べ, その頻度は全糖尿病の約1%との報告であった. 諸外国の文献では, Gerbitzら[31]によると, 日本国内外での様々な文献よりIDDM, NIDDMすべてを含む3529例で3243変異があったのは52例 (1.5%) であったが, イギリスではSakerら[32]がコーカサス人の糖尿病患者中の3243変異の頻度は0.1-0.2%と少ないだろうと報告し, 人種間で本遺伝子異常の頻度が異なることが予想された.

今回は, 糖尿病の家族歴や母系遺伝の有無でではなく, 発症年齢が50才以下の症例に限定した研究であったが, 3243変異は120例中4例で, 3.3%と従来の報告より高率であった. これは今回の3243変異陽性者の発症年齢が平均29才であり, 若年発症と制限された糖尿病においては頻度が増したためと考えられた. よって, 本変異の頻度が比較的高いと考えられる本邦においては, 日常診療において, 若年発症の糖尿病患者では1%以上の頻度で3243変異陽性者が存在している可能性があり, 糖尿病の大きな病因の一つになっている可能性が示唆された. 本邦の若年発症糖尿病患者において, 他の臨床像とも合わせて注意深く本変異を疑うことが重要であると考えられた.

本遺伝子異常では母系遺伝が特徴の一つであり, 本研究では3243変異を有する4例のうち, 症例11, 症例12, 症例14の発端者の母親でPCR-RFLP法並びにARMS法にて遺伝子変異の確認を行ったが, いずれの症例の母親にも3243変異は検出されなかった. 今回は, 末梢血白血球を用いて遺伝子異常の検索を行ったが, 末梢血では変異遺伝子の割合が他の臓器と比較して少ないことが報告されており[12)30)], 3243変異を有していても同定できない可能性がある. 今回の研究でも本来は母が3243変異を有していても, 変異を同定できなかった可能性がある. 必ずしも本変異に伴う糖尿病が母系遺伝の形を取るとは限らず, 母系遺伝を確認できない糖尿病患者の中にも3243変異が存在

している可能性が示唆され，診療上この点にも注意が必要であると考えられた．また，今回ARMS法にて3243変異が検出された症例14について，長女，次女，長男の3例ともに3243変異が認められた．75g経口ブドウ糖負荷試験上では3例とも糖尿病型を呈さなかったが，今後糖尿病を発症する可能性があり，厳重な経過観察が必要と考えられた．

今回の症例14では従来のPCR-RFLP法において明確に異常バンドが認められなかったが，ARMS法で明確なバンドの検出があり，変異陽性を疑い家系内調査を行った．谷山ら[23]は，3243G3'プライマーが，変異を組み込んだプラスミドの変異を特異的に認識して増幅することを確認した．さらに彼らは，変異筋生検組織中の変異ミトコンドリアが確認された症例で，従来の*Apa* I 消化によるPCR-RFLP法にて末梢血白血球DNAに3243変異を検出し得なかった症例について，ARMS法にて明確なバンドを検出できたと報告している．ARMS法ではミスマッチプライマーを用いて行ったPCR産物をそのままアクリルアミドゲルに泳動するのみであり，RFLP法で用いる制限酵素による消化の手順を省略することができ，簡便である．今回の検討では症例14でPCR-RFLP法でかすかだが変異バンドが検出されたことと，子供3名すべてに変異を検出し得たことより3243変異陽性者と判断した．PCR-RFLP法とARMS法の両者での検出感度の検討は行われておらず，感度の厳密な比較はできないが，今回はARMS法によって検出された症例が1例追加され，3243変異検出におけるARMS法の有用性が示唆された．

抗GAD抗体の陽性頻度についても検討した．本抗体は先に述べた様に，IDDMの診断指標として，さらにはIDDMへの移行の指標としても有用と考えられている．臨床的にNIDDMと診断されている症例において抗GAD抗体を測定し，陽性頻度や，陽性者の臨床的特徴，特にインスリン分泌不全状態への移行を検討することは，広くIDDMの発症予防を考えるうえで重要であると考えられる．さらに従来よりIDDMの発症率が欧米諸国に比して少ない我が国において，自己免疫病の指標となる抗GAD抗体の頻度を調べ，一旦IDDMと診断された患者における自己免疫的発症機序の関与を評価することは興味深い．

一般に抗GAD抗体の陽性率は各報告によるばらつきが大きいが，本抗体は，IDDM患者において発症早期は陽性率が高く，経時的に陽性率が低下するといわれている．本邦ではTsuruokaら[33]が1995年に，本研究に用いたものと同キットを用いて1900例の糖尿病患者につき検討を行っているが，それぞれの陽性者は全IDDM患者では35.4%，一年以内発症のIDDM患者では50.3%，罹病期間一年以上のIDDM患者では31.5%であった．また全NIDDMにおける陽性者の頻度は4.3%であった．また，小林ら[34]の報告によると，発症1年以内のIDDM患者における抗GAD抗体の陽性頻度は64%，1-10年では44%，10年以上で15%であった．

本研究においては，検出限界値を4.0 U/mlと設定したところ，抗GAD抗体陽性者の頻度は全糖尿病患者120例中10例 (8.3%) であった．その内，臨床的にIDDMと診断された27例中で7例 (25.9%) が抗体陽性であり，NIDDMと診断された93例中3例 (3.2%) に比し陽性率は有意に高値であった．今回の症例ではIDDM患者の罹病期間は平均10年でありIDDMと診断された症例の陽性率としては参照報告と同程度で，罹病期間が経過した症例で陽性者の頻度が低下傾向であった．

IDDMにおける抗GAD抗体の頻度が人種間で異なり，日本人では低いとの報告がある[35]．今回の検討でもIDDM患者の本抗体の頻度は約26%であった．これはIDDMと臨床上診断された患者で，自己免疫機序を介さない糖尿病が含まれている可能性を示唆するものであり，今後糖尿病の成因が解明されていくにつれて，抗体を有さない者については別の糖尿病の分類に区分されていくことも考えられた．

NIDDMにおける抗GAD抗体陽性率も，従来の報告と同程度であった．本研究において抗GAD抗体はIDDM患者のみならず，NIDDM患者にも陽性者が存在し，本抗体がIDDMの診断指標としてのみならず，IDDMへの移行の指標としても有用であると考えられた．また，NIDDMと診断されても抗GAD抗体を一度は測定し，IDDMへの移行の可能性を評価しておくことは重要であると考えられた．

今回の研究では，3243変異と，抗GAD抗体陽性の併発による，臨床像の修飾が注目すべき点の一つであった．外国の報告では，Vionnetら[36]，Abadら[37]はIDDM患者中3243変異は検出されなかったと報告した．本邦ではOdawara[29]ら，Uchigataら[38]が日本各地の施設のIDDMで3243変異の検索を行ったが陽性者は存在しなかったと報告した．逆に，3243変異を来している症例でICAや抗GAD抗体の陽性率を調べたところでは，Kishimotoら[30]は214例の家族歴を有するNIDDM患者で6例の3243変異陽性者を見出し，その中で抗GAD抗体，ICAが陽性であったものはいなかったと報告した．最近では1997年Taniyamaら[39]が3243遺伝子異常を有する糖尿病患者14例につき抗GAD抗体の有無を調べたが，結果は全員が抗体陰性であった．

一方，Okaら[40]はICAが陽性であったNIDDM27例に対して3243変異の有無を検索し，13-31ケ月後にインスリン依存状態に移行した3243変異を有する3例 (11.1%) を報告した．少なくともこれらの患者ではミトコンドリア遺伝子異常が膵β細胞の免疫応答の防御機構を弱め，緩徐に膵β細胞の破壊を進行させた可能性があると報告し，3例全員がIDDM関連ヒト白血球抗原 (human leukocyte antibody, HLA)-DR4，HLA-DQA1* 0301を有していたことも含めて，ミトコンドリア遺伝子異常の特定のIDDM感受性HLAの存在下の膵β細胞の免疫破綻およびIDDM誘発への関与を示唆した．

また，Kobayashiら[41]は，3243変異を有する31例の糖尿病患者につきICAや抗GAD抗体の有無，またHLAタイピングについて検討した．ICAを有した者は13例(42%)，そのうち抗GAD抗体を有した者は2例であり，31例中の6%を占めた．前のOkaらの報告のように，変異ミトコンドリアがT細胞の免疫防御機構を破綻させ，膵ラ氏島抗原関連抗体の産生を惹起する[42]と述べた．さらに，Odawaraら[43]が11件の文献より3243変異と膵ラ氏島抗原関連抗体の同時陽性者の頻度が低く，3243変異が自己免疫学的機序で膵β細胞破壊を起こす可能性が低いことを示したが，これに対しKobayashiら[44]は3243異常者の膵の組織所見では，膵島内分泌腺，外分泌腺ともにCD8陽性リンパ球の浸潤が有り，3243異常がIDDMの指標の一つに成り得ると述べた．

これらを統合して考えると，頻度は少ないが，ミトコンドリア遺伝子変異陽性者で，ある特定のHLAの保有者では，ミトコンドリア機能が低下した膵β細胞が徐々に死滅し，抗原提示が持続し，自己抗体が低抗体価で長期間持続する可能性が予想される．しかし今回の検討では3243変異陽性者で抗GAD抗体

は全例陰性であり，本変異陽性者では免疫学的機序を介さずに糖尿病の発症に関与したと考えられた．

次に，3243変異における臨床像について検討した．

まず発症年齢についてであるが，今回の検討では，3243変異陽性者の糖尿病の平均発症年令は29才と若年発症傾向であった．

ミトコンドリア遺伝子は母系遺伝を示し，その遺伝形式は細胞質遺伝である．ゆえにミトコンドリア遺伝子の変異が起こると各個体間，各臓器間で正常な遺伝子と異常な遺伝子の配分される割合が異なる (ヘテロプラスミー)．ヘテロプラスミーで疾患の重症度が規定されることが疑われ，異常ミトコンドリアの割合により糖尿病の臨床症状や発症時期が規定されることが予測される．発症にはまた，ミトコンドリア機能異常の閾値があると考えられる．生下時よりミトコンドリア遺伝子異常がある症例では，ヘテロプラスミーによって膵β細胞内における異常ミトコンドリアの割合が，加齢に伴う変異の増加 も加わって，糖尿病を発症するに足る閾値に達した時点で糖尿病が3243変異陰性例に比して早期に発症すると考えられる．3243変異患者に特徴的な臨床症状として，難聴，低身長，痩せなどが挙げられる．Gerbitzら[42]によると3243変異糖尿病に難聴を合併した症例は様々な文献より約60%であった．本邦のKatagiriら[28]，Kadowakiら[45]の報告では61%が難聴を有していた．本遺伝子変異に伴う難聴の特徴はYamasobaら[46]によれば，進行性の感音性難聴，全音域が障害されるが，高音域の障害がより強い，三半規官の異常はない，などであり，末梢血白血球の変異ミトコンドリア遺伝子の割合が多い患者では難聴の発症が早い傾向がみられたが，難聴の程度や進行速度とには相関が認められないと報告した．

本研究においては3243変異陽性者4例中3例 (75%) が難聴を有し，3243遺伝子異常を有すれば高率に感音性難聴を有するとする今までの報告と合致していた．難聴を伴う糖尿病では，3243変異を念頭に置くことが重要と考えられた．また難聴は，本遺伝子異常を疑う際の臨床上の良い指標と考えられた．

3243変異に伴う痩せに関しては，Suzukiら[47]が，Kishimotoら[30]の3243変異陽性者ではBMIが小さいとの報告に基きその原因につき考察している．本遺伝子異常ではミトコンドリアの形態異常に基く特異所見，例えば筋線維においては，赤色ぼろきれ様線維 (ragged-red fiber, RRF) と呼ばれる異常筋線維や，筋肉内の小動脈においてコハク酸脱水素酵素で強陽性に染まる異常ミトコンドリアの血管平滑筋内での集積像の所見が認められることがある．このような形態異常を有する3243変異陽性者は，有さない群と比して，血糖コントロール状況を反映するHbA1cや空腹時血糖とは関係なく，BMIが低いと報告した．

本研究においては，3243変異を有した4人の平均BMIは16.4 ± 1.5kg/m^{2}と低値であった．3243変異陽性者においてすべての症例でRRFなどの所見が認められるわけではなく，また今回の検討においては筋生検は施行されていないが，今回の検討における3243陽性者4例のBMIがすべて低値であったことから，筋などにおける異常ミトコンドリアの増加と痩せとの関連が示唆された．

3243変異を有する糖尿病の臨床病型についてであるが，発見当初からvan den Ouwelandら[12]が3243変異による糖尿病は臨床的にIDDM様であると報告したように，インスリンの分泌低下がその特徴とされている．その機序として，膵β細胞でのグルコース刺激によるインスリン分泌の際のミトコンドリア異常によるATP産生の低下が考えられている[48]．実際には，発症様式は先に述べたように様々であり，ケトアシドーシスを伴い急性にIDDM様の発症をする者から，偶然の機会に発見される者，緩徐にインスリン分泌不全が進行する者などがある．一般には多くがNIDDM様であり，インスリン分泌が低下し，SU剤の二次無効例の範疇に属すると考えられる症例が多い．3243変異では，インスリン分泌不全が早期から現れても枯渇には至らない例がほとんどである．3243変異により糖尿病が起こされる場合，異常ミトコンドリアがあまりにも多数存在する細胞は死滅してしまうため，膵β細胞内の異常ミトコンドリアの数はある程度限られて，破壊の進行は急速にはならないと考えられる．

今回の研究では，3243変異陽性者4例の糖尿病の臨床像をみると表3における症例11はIDDM様，症例13，14の2例は発症後数年でインスリン治療が開始されたいわゆるSPIDDM様の経過をたどっている．また症例12はNIDDMと診断されSU剤で治療中であるが，血糖コントロールはHbA1cが12.1%と陽性者4例中最も悪いにも関わらず，インスリン治療を拒否している症例である．いずれもインスリン依存度は高いが，典型的IDDMと診断されたのは一例のみであった．ミトコンドリア遺伝子異常のヘテロプラスミーによる糖尿病の多様性を示していると考えられた．

次に抗GAD抗体陽性者の臨床像について検討した．

抗GAD抗体陽性者10例中8例 (80%) がインスリン治療者であり（内1人がNIDDM，7人がIDDMと診断されている），10例中7例 (70%) がIDDMと診断された患者であった．本抗体陽性者においてインスリン依存度は高いと考えられた．

抗GAD抗体陽性はインスリン依存性の指標に成り得るとされるが，抗体価の病的意義は現在のところ統一した見解が得られていないため，抗GAD抗体陽性者について，その抗体価につき検討した．

IDDMにおける膵β細胞障害の機序は，膵β細胞に浸潤しているCD8陽性Tリンパ球の膵β細胞への直接障害が観察され，細胞性自己免疫による障害と考えられている[49]．一方IDDMのモデルマウスである非肥満糖尿病 (non-obese diabetic) マウスにおける検討から，膵β細胞のGADに対する反応が一連の免疫反応の初期段階で生じることや，この反応の阻害により，膵島炎の発症が抑制される[50]ことより，液性免疫が膵島炎に伴うと考えられる．よって抗GAD抗体の存在は膵島炎の証明には成り得ると考えられるが，抗体価の意味するところは明らかではない．

IDDMと診断された症例に対してHoeldtkeら[51]は，抗GAD抗体の抗体価が高い程血糖コントロールが不良であり，膵生検における膵炎の病理所見が著しいと報告したが，一方清野ら[52]は，罹病期間が5年以内のIDDM患者において，抗GAD抗体の抗体価が高い程，血中Cペプチド値が高く，インスリン分泌能が保持されていると報告した．また小林[53]は，SPIDDMでは急性発症のIDDMに比べて抗体価が高く，発症後長期間抗体価が陽性を示すと述べた．以上のように，抗GAD抗体価とインスリン分泌能や血糖コントロールとの相関に定説はない．

今回の研究では1000 U/ml以上が2例（いずれもNIDDM），11.0-20.0 U/mlが1例 (IDDM)，4.0-10.0 U/mlが7例 (IDDM6例，NIDDM1例) という結果であった．診断時にNIDDMで抗体価が7.6 U/mlであった1例はインスリン治療者であった．1000

U/ml以上の高値を示した2例はNIDDMと診断された症例で，現在SU剤にて治療されていた．この2例以外の抗体陽性者はインスリンにて治療されていた．本抗体がIDDMへの予知指標となることや，小林[53]が提唱するSPIDDMでは本抗体の抗体価が比較的高値をとり，長期間抗体価が持続することを考えると，本抗体1000U/ml以上の高値を示したNIDDMの2例は，まだ診断後1年，3年の症例であり，今後SPIDDMの転機をたどり，インスリン分泌が徐々に低下していく可能性があり，今後注意深い経過観察を要すると考えられた．また，抗GAD抗体価と糖尿病の罹病期間やHbA1c値との間にはそれぞれ有意な相関はなく，抗体価と糖尿病の臨床像との関連は本検討において不明であった．

抗GAD抗体陽性者につき，抗甲状腺抗体の陽性率につき検討した．IDDM患者では，種々の臓器に対する自己抗体が存在することが知られているが，そのうち甲状腺に対する自己抗体の出現頻度が最も高く，Grayら[54]報告によると，IDDMに合併した自己免疫性甲状腺疾患 (autoimmune thyroid disease, AITD) は7.6%であり，本邦のMimuraら[55]の報告によると，IDDMに合併したAITDは11.3%の頻度であった．IDDMと他の自己免疫疾患合併の機序としては，膵島の特異抗体としての抗GAD抗体との相関，相同性が注目されている．Kawasakiら[25]はIDDMと診断された58例につきAITDの有無と，抗GAD抗体の陽性率，抗体価について検討した．発症1年以内のIDDMでは，抗GAD抗体の陽性率と抗体価はともにAITDを有している群で有意に高値であった．発症3年後から22年後までのIDDM患者でも同様の結果であった．疾患を有する群と有さない群では，インスリンの分泌能には差を認めなかった．また清野ら[56]は，SPIDDMにつき抗甲状腺抗体の有無を検討し，抗GAD抗体高値の症例で抗甲状腺抗体が陽性になる傾向があると述べた．

今回の研究では抗GAD抗体陽性者10例中抗甲状腺抗体を有した者は4例 (40%)であった．その内IDDMが3例，NIDDMが1例であり，このNIDDMの症例は抗GAD抗体高値で後にSPIDDMに移行していく可能性の高い症例であった．抗体の同時陽性については，異なる臓器において共通したT細胞リンパ球の異常による細胞性免疫の異常が可能性として考えられた．抗GAD抗体陽性者について，特に他の自己抗体を有する場合，他の自己免疫疾患の出現を念頭に置くべきである．AITDはIDDMやSPIDDMに合併する頻度が高く，臨床上特に注意を要すると考えられた．

以上，ミトコンドリア3243遺伝子変異を伴う糖尿病と抗GAD抗体陽性の糖尿病につき頻度と臨床像を検討した．今後，糖尿病の成因解明が進められていくにあたり，糖尿病に関連する未知の遺伝子異常の発見もさる事ながら，既知の遺伝子異常につき検索し，糖尿病における位置付けを確立することが重要と考えられた．また今まで主として診断指針として利用されてきた糖尿病関連自己抗体が予知指標としても重要であり，臨床上広く活用されるべきであると考えられた．

結　論

50才以下で発症した糖尿病患者120例に対し，3243変異と抗GAD抗体陽性の頻度および各々の陽性者の臨床像について検討し，以下の結果を得た．

1．50才以下の比較的若年で発症した糖尿病患者120例において，ミトコンドリアDNA3243遺伝子異常者が4例 (3.3%)，抗GAD抗体陽性者が10例 (8.3%) 検出された．また両者の合併例は今回の検討では存在しなかった．

2．ミトコンドリア3243遺伝子異常者はBMIが低く，難聴を有する傾向があった．

3．抗GAD抗体陽性者10例中臨床的にIDDMと診断された者は7例で，インスリン治療者は8例であった．本抗体陽性者でインスリン依存度は高いと考えられた．

4．抗GAD抗体陽性者10例中4例に抗甲状腺抗体が認められた．抗GAD抗体陽性者においては他の自己抗体や自己免疫疾患の合併の検索が必要と考えられた．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜わりました恩師馬渕　宏教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究を直接御指導，御教示頂きました金沢大学医学部内科学第二講座の八木邦公助手，梶波康二助手，金沢大学医学部附属病院総合診療部の小泉順二教授，金沢大学医学部保健学科稲津明広助教授に心から謝意を表します．また，多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座糖尿病研究室，第一研究室の各位，ならびに高分子DNAの採取に際し御協力を頂いた山本幸夫氏に感謝いたします．さらに貴重な症例を御紹介頂いた関連病院の諸先生方に深く感謝いたします．

本研究の一部は第40回日本糖尿病学会年次学術集会（平成9年5月22-24日），第16回国際糖尿病学会議（平成9年7月20-25日）において発表した．

文　献

1）WHO Study group: Diabetes mellitus. Technical Report Series 727: 18, World Health Organization, WHO, Geneva, 1985

2）Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. Diabetes 24: 44-53, 1975

3）Fajans SS. Scope and heterogeneous nature of MODY. Diabetes Care 13: 49-64, 1990

4）Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox NJ. Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on chromosome 20q. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1484-1488, 1991

5）Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa P, Froguel P, Cohen D. Nonsense mutation in the glucokinese gene causes early -onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 356: 721-722, 1992

6）Vaxillarre M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Backmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. Nature Genet 9: 418-423, 1995

7）Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Beau MML, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Turner RC, Velho G, Chevre JC, Froguel P, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature 384: 455-458, 1996

8) Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. Mutations in the hepatucyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature 384: 458-460, 1996

9) Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to *IPF*1.Nature Genet 17: 138-139, 1997

10) Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Osamu T, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 β gene (*TCF2*) assosiated with MODY. Nature Genet 17: 384-385, 1997

11) Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya HV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. Maternally transmitted diabetes and deafness assosiated with a 10.4kb mitochondrial DNA deletion. Nature Genet 1 : 11-15, 1992

12) Van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Rultenbeek W, Sandkuiji LA, Vijlder MF, Struyvenberg PAA, Van de Kamp JJP, Maassen JA. Mutation in mitochondrial $tRNA^{leu(UUR)}$ gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. Nature Genet 1 : 368-371, 1992

13) Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ. Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. Lancet 2: 1097-1102, 1976

14) Pav J, Jezkova Z, Skrha F. Insulin antibodies. Lancet 2: 221-222, 1963

15) Baekkeskov S, Aanstoot H-J, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalhom, Folli F, Ritcher Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin -diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. Nature 347: 151-156, 1990

16) Kobayashi T, Itoh T, Kosaka K, Sato K, 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

17) Kobayashi T, Kajio H, Tamemoto K, Sugimoto T, Nakanishi K, Murase T, Kato N, Kosaka K, Okubo M. Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM. Diabetes Care 16: 780-788, 1993

18) Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowlay MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) : the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. Diabetic Med 11: 299-303, 1994

19) The Expert Committee On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 20: 1183-1197, 1997

20) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridization analysis of genomic DNA. J Med Genet 21 : 164-172, 1984

21) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites-a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett 22 : 1859-1862, 1982

22) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified γ-globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 324 : 163-166, 1986

23) 谷山松雄,鈴木吉彦,榎本章詳,佐藤温,杉田江里,杉田幸二郎,渥美義仁,松岡健平,伴良雄. 糖尿病患者における特異的PCR増幅法によるミトコンドリアDNA変異の検出. 糖尿病 38(5) : 401-404, 1995

24) Kaihara M, Taniyama M, Tadatomo J, Tobe T, Tomita M, Ito K, Ban Y, Katagiri T. Specific PCR amplification for N-ras mutations in neoplastic thyroid diseases. Endocrine Journal 41: 301-308,1994

25) Kawasaki E, Takino H, Yano M, Uotani S, Matsumoto K, Takao Y, Yamaguchi Y, Akazawa S, Nagataki S. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease. Diabetes 43: 80-86, 1994

26) 宮田英行, 堀江均, 中野義彦. NIDDM各種治療群における血清中抗ヒトGAD抗体の測定. 新薬と臨床 43: 2005-2010, 1994

27) Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, Tanabe Y, Sakura H, Awata T, Goto Y, Hayakawa T, Matsuoka K, Kawamori R, Kameda T, Horai S, Nonaka I, Hadura R, Akanuma Y, Yazaki Y. A subtype of diabetes mellitus assosiated with a mutation in the mitochondrial DNA. N Engl Med 330: 962-968, 1994

28) Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Anai M, Yamanouchi T, Tukuda K, Kikuti M, Kitaoka H, Ohsawa N, Yazaki Y, Oka Y. Mitochondrial diabetes mellitus: prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial $tRNA^{leu(UUR)}$ gene mutation in Japanese patients. Diabetologia 37: 504-510, 1994

29) Odawara M, Sasaki K, Yamashita K. Prevalence and clinical characterization of Japanese diabetes mellitus with an A-to-G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene. J Clin Endocrinol Metab 80: 1290-1294,1995

30) Kishimoto M, Hashiramoto M, Araki S, Ishida Y, Kazumi T, Kanda F, Kasuga M. Diabetes mellitus carrying a mutation in the mitochondrial $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene. Diabetologia 38: 193-200, 1995

31) Gerbitz K-D,Van den Ouweland JMW, Maassen JA, Jaksch M. Mitochondrial diabetes mellitus: a review. Biochem Biophys Acta 1271: 253-260, 1995

32) Saker PJ, Hattersley AT, Barrow B, Hammarsley MS, Horton V, Gillmer MD, Turner RC. UKPDS 21: low prevalence of the mitochondrial transfer RNA gene ($tRNA^{Leu(UUR)}$) mutation at position 3243bp in UK Caucasian type 2 diabetic patients. Diabetic Medicine 14: 42-45, 1997

33) Tsuruoka A, Matsuba I, Toyota T, Isshiki G, Nagataki S, Ikeda Y. Antibodies to GAD in Japanese diabetic patients: a multicenter study. Diab Res Clin Pract 28: 191-199, 1995

34) 小林哲郎. 臨床糖尿病マニュアル, 277頁, 南江堂, 東京, 1996

35) Akamine H, Komiya I, Shimabukuro T, Asawa T, Tanaka H, Yagi N, Taira T, Nacata K, Arakaki K, Wakugami T, Takasu N, Powell MJ, Furmaniak J, Smith BR. High Prevalence of

GAD65(and IA-2) antibodies in Japanese IDDM patients by a new Immunopretipitation assay based on recombinant human GAD65. Diabet.Med. 14: 778-784, 1997

36) Vionnet N, Passa P, Froguel P. Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus.Lancet 342: 1429-1430, 1993

37) Abad MM, Cotter PD, Fodor FH, Larson S, Ginsberg-Fellner F, Desnick RJ, Abdenur JE. Screening for the mitochondrial DNA A3243G mutation in children with insulin-dependent diabetes mellitus. Metabolism 46: 445-449, 1997

38) Uchigata Y, Mizota M, Yanagisawa K, Nakagawa Y, Otani T, Ikegami H, Yamada H, Miura J, Ogihara T, Mastuura N, Omori Y.Large-scale study of an A-to-G transition at position 3243 of the mitochondrial gene and IDDM in Japanese patients.Diabetologia 39: 245-246,1996

39) Taniyama M, Kasuga A, Suzuki Y, Ozawa Y, Handa M, Kobayashi A, Ban Y. Absence of antibodies to ICA512/IA-2 in NIDDM patients with the mitochondrial DNA bp3243mutation. Diabetes Care 20: 905,1997

40) Oka Y, Katagiri H, Yazaki Y, Murase T, Kobayashi T. Mitochondrial gene mutation in islet-cell-antibody-positive patients who were initially non-insulin dependent diabetes. Lancet 342: 527-528, 1993

41) Kobayashi T, Oka Y, Katagiri H, Falorni A, Kasuga A, Takei I, Nakanishi K, Murase T, Kosaka K, Lernmark A. Association between HLA and islet cell antibodies in diabetic patients with a mitochondrial DNA mutation at base pair 3243. Diabetologia 39: 1196-1200, 1996

42) Gerbits KD. Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? Diabetologia 35: 1181-1186, 1992

43) Odawara M, Yamashita K. Mutation at nucleotide position 3243 of the mitochondrial DNA as a cause of IDDM- a meta-analysis. Diabetologia 40: 1493-1495, 1997

44) Kobayashi T, Nakanishi K, Murase T. Response from authors. Diabetologia 40: 1495-1496, 1997

45) Kadowaki T, Sakura H, Otabe S, Yasuda K, Kadowaki H, Mori Y, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation in the mitochondrial gene. Muscle and Nerve Suppl 3: S137-S141, 1995

46) Yamasoba T, Oka Y, Tsukuda K, Nakamura M, Kaga K. Auditori findings in patients with maternally inherited diabetes and deafness harboring a point mutation in the mitochondrial transfer $RNA^{Leu(UUR)}$ gene. Laryngoscope 106: 49-53, 1996

47) Suzuki Y, Yaniyama M, Astumi Y, Hosokawa K, Asahina T, Shimada A, Murata C, Matsuoka K. Body type in mitochondrial diabetes. Diabetologia 40: 987-989, 1997

48) Sener A, Malaisse WJ. Stimulation by D-glucose of mitochondrial oxidative events in islet cells. Biochem J 246: 89-95, 1987

49) Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, Mackay EH, Swift PGF, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulitis. N Engl J Med 313: 353-360, 1985

50) Tisch R, Young X-D, Singer SM, Libiau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice. Nature 366: 72-75, 1993

51) Hoeldtke RD, Hobbs GR, Bryner KD, Marcovina SM, Horvath GG, Lernmark A, Byerly MR. Antibodies to GAD and glycemic control in recent -onset IDDM. Diabetes Care 20: 1900-1903, 1997

52) 清野弘明, 刈田明代 荒若信子, 山崎俊朗, 熱海真希子, 菊池宏明, 阿倍隆三. インスリン依存型糖尿病とslowly progressive IDDM患者のGAD抗体価とインスリン分泌能の関連. 糖尿病 41(7): 501-506, 1998

53) 小林哲郎. GAD抗体. 臨床検査 40: 1155-1159, 1996

54) Gray RS, Herd R, Clarke BF. The clinical features of diabetes with coexisting autoimmune thyroid disease. Diabetologia 20: 602-606, 1981

55) Mimura G. Immunogenetics of early-onset insulin-dependent diabetes mellitus among the Japanese: HLA, Gm, BF, GLO, and organ-spesific autoantibodies-the J.D.S.study. Diabetes Res Clin Pract 8: 253, 1990

56) 清野弘明, 山口宏, 平田昭彦, 山崎俊朗, 菊池宏明, 阿部隆三. Slowly progressive IDDMにおけるGAD抗体とHLA. 糖尿病 39: 893-899,1996

Frequency and Clinical Characteristics of Young Diabetic Patients with Mitochondrial DNA 3243 A to G Mutation or Anti-GAD Antibodies Masako Kitatani, Department of Internal Medicine (II) School of Medicine, Kanazawa Unversity, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108,** 124 — 136 (1999)

Key words IDDM, NIDDM, mitochondrial DNA, anti-GAD antibody, gene mutation

Abstract

Previous data posits the mitochondrial DNA $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene A to G mutation at nucleotide 3243 (mt3243 mutation) as a cause of diabetes in approximately one percent of Japanese diabetics, manifesting a wide range of diabetic phenotypes from IDDM to NIDDM. Futhermore, the anti-glutamic acid decarboxylase antibody (GAD ab) is useful in screening for IDDM and measuring insulin deficiency. To study the frequency of mt3243 mutation and GADab positives in diabetes and the clinical characteristics of diabetics with these two conditions, we examined 120 diabetic patients whose age at onset was less than 50 years. Mitochondrial DNA, isolated from peripheral leukocytes was amplified by polymerase chain reaction, and the A to G mutation was detected by Apa I digestion. GADab was measured by radioimmunoassay using GAD extracted from porcine brain tissue. Statistical analysis was performed with ANOVA and chi-squared test. The mt3243 mutation was detected in four of 120 patients (3.3%), and 10 patients were positive for GADab (8.3%). No patient was positive for both. Mean age was 45 ± 12 ($\bar{X} \pm$ SD) years and mean age of onset was 35 ± 10 years. Mean fasting plasma glucose was 155 ± 54mg/dl, mean HbA1c was 7.7 ± 2.0%. Mean age of onset for patients with the mt3243 mutation or GADab were lower than the double-negative group, though not significantly. Of the 10 GADab positive patients, 7 were IDDM, and 8 were treated by insulin. These patients had a higher insulin dependency. Mean body mass index of the mt3243 mutation group was 16.4 ± 1.5kg/m^2, significantly lower than the GADab positive and double-negative group. Of the 4 mt3243 mutation patients, 3 suffered from hearing disturbance. Of the 4 mt3243 mutation patients, none were positive for autoimmune thyroid disease and of the 10 GADab positives 4 tested positive for autoimmune thyroid disease. The mt3243 mutations account for about 3% of early onset of diabetes, and GADab positive patients account for approximately 8% of early onset diabetes. In addition to the early onset of diabetes, patients with the mt3243 mutation have lower BMI and also hearing disturbance. Most of the patients positive for GADab show an IDDM-like phenotype.