

Characterization of the Autoantigen (s)
Recognized by the Islet Cell Surface Antibodies
(ICSA): Studies on Islet β -cells and Thyroid
Follicular Cells

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/2297/8397

抗膵島細胞膜抗体 (ICSA) に対する該当抗原： 膵島β細胞と甲状腺濾胞上皮細胞における解析

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任：竹田亮祐教授)

飯 川 能 彦

(平成4年9月24日受付)

インスリン依存性糖尿病 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) に種々の自己免疫性内分泌疾患の合併することが臨床的に知られている。とりわけ、慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis, CT) との合併頻度が高いが、その合併機序に関しては、今日なお一定の見解が得られていない。近年、臓器特異抗体である膵島細胞抗体 (islet cell (cytoplasmic) antibodies, ICA) や膵島細胞膜抗体 (islet cell surface antibodies, ICSA) が、多くの IDDM 患者血清中に検出されている。さらに、ICSA は、非インスリン依存性糖尿病 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) や CT 患者血清中にも検出されることが知られている。そこで今回、ICSA の該当抗原が膵島β細胞膜のみならず甲状腺濾胞上皮細胞膜にも存在するか否かを検討し、糖尿病と CT の合併に関する免疫機序を明らかにしようとした。ハムスターインスリノーマ細胞 (In-111) を標的細胞として、間接蛍光抗体法により、糖尿病やその他の自己免疫疾患患者で ICSA を測定した。その結果、IDDM 17例中1例 (1/17)、NIDDM 7/36、CT 6/68、NIDDM と CT の合併症例 3/20、甲状腺機能亢進症 3/18、および肝硬変 1/9で ICSA が検出された。慢性関節リウマチ 3例、全身性エリテマトーデス 3例、および正常者 6例では ICSA は検出されなかった。ICSA 陽性血清から抽出した免疫グロブリン分画が In-111 細胞と甲状腺細胞の細胞膜を認識するか否かを、間接蛍光抗体法と免疫沈降法を用い検討した。その結果、ICSA 陽性10症例中5例において、ヒト甲状腺乳頭腺癌細胞由来 TPC-1 細胞を用いての間接蛍光抗体法上、細胞表面に陽性蛍光を認めた。そこで、患者免疫グロブリン分画を In-111 細胞で吸収すると、全例で陽性蛍光は消失した。この事実は、In-111 細胞と TPC-1 細胞に ICSA に対する共通抗原が存在する可能性を示している。さらに、これら10例の ICSA 陽性血清につき、免疫沈降法を用い該当抗原を検討した。In-111 細胞膜成分を用いると、該当抗原として 64kD 蛋白が検出された。この 64kD 蛋白は、IDDM 1/1、NIDDM 2/3、CT 2/3、NIDDM と CT の合併症例 2/3で見出された。正常甲状腺濾胞上皮細胞膜を用い該当抗原を検討すると、やはり 64kD 蛋白が検出され、IDDM 0/1、NIDDM 1/3、CT 1/3、NIDDM と CT の合併症例 2/3で見出された。さらに、In-111 細胞と正常甲状腺濾胞上皮細胞の両者の 64kD 蛋白を認識する ICSA が1例で検出された。その1例は、NIDDM と CT の合併症例であった。以上の事実は、膵島β細胞と甲状腺濾胞上皮細胞には、ICSA に対する同一抗原または共通反応性抗原が存在することを示す。さらに、この成績は糖尿病と CT 合併にかかわる自己免疫的機序に、少なくとも一部説明を与えるものと考えられる。

Key words ICSA, 臓器特異抗原, 自己免疫性多内分泌腺疾患

近年、インスリン依存性糖尿病 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) の病因として、自己免疫機序の関与が明らかにされつつある。そして、IDDM 患者血中に、膵島細胞に対する自己抗体、すなわち、膵島細胞抗体 (islet cell (cytoplasmic) antibodies, ICA)^{1)~4)} や膵島細胞膜抗体 (islet cell surface antibodies, ICSA)^{5)~9)} 等の臓器特異的抗体が見いだされている。

一方、代表的な臓器特異的自己免疫疾患である慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis, CT) の患者血中には、サイログロブリンやミクロゾーム¹⁰⁾ 等に対する自己抗体が存在することが知られているが、IDDM 症例においてもこれらを含め種々の臓器特異抗体が検出されている¹¹⁾。さらに臨床的にも、IDDM と CT の合併症例が数多く存在することは知られているが^{12)~14)}、その合併

機序に関しては今日なお詳らかでない。しかしこの点に関し、ICSA が、膵島β細胞を特異的に傷害すること^{15)~17)}、また、CT 患者血中にも検出される頻度が低くないことが指摘されている^{18)~22)}。そこで著者は、ICSA の該当抗原が膵島β細胞と甲状腺濾胞上皮細胞に存在しているかどうかを検討した。

その結果、ICSA 陽性糖尿病患者の一部に、間接蛍光抗体法にて、膵島由来細胞と甲状腺由来細胞の両者を認識する ICSA 陽性の症例が存在することが判明した。また、この抗体を含む免疫グロブリン分画を膵島由来細胞で吸収すると、甲状腺由来細胞を認識しなくなった。さらに著者は、ICSA の該当抗原が膵島β細胞膜と甲状腺濾胞上皮細胞膜に共通に存在する可能性につき、該当抗原の性状を免疫沈降法にて検討を行ったので報

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CT, chronic thyroiditis; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD, glutamic acid decarboxylase; HT, hyperthyroidism; ICA, islet cell (cytoplasmic) antibodies; ICSA, islet cell surface antibodies; IDDM, insulin dependent diabetes

告する。

材料および方法

I. 材 料

対象として、IDDM 17例、非インスリン依存性糖尿病 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) 36例、CT 68例、糖尿病と CT の合併症例 20例 (IDDM 1例、NIDDM 19例)、糖尿病状態のない自己免疫性疾患として甲状腺機能亢進症 (hyperthyroidism, HT) 18例、肝硬変 (liver cirrhosis, LC) 9例、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 3例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) 3例、および対照として、正常人 (糖尿病と内分泌疾患およびそれらの家族歴のない) 6例の血清を材料とした。

II. ICSA, ICA の間接蛍光抗体法

1. 標的細胞として、ハムスターインスリンノーマ細胞 (In-111)^{23,24)} を用いた。この細胞は加熱非働化した10%ウシ胎児血清 (Gibco Lab., New York, U.S.A.), 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Gibco Lab.) を含む RPMI1640 培養液 (Gibco Lab.) にて培養維持した。

2. この In-111 細胞を tissue culture slide (Lab-Tek 8 chamber Fixed Gas ket, Illinois, U.S.A.) 内で培養、増殖後、0.01M リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.3) にて洗浄、次いで室温で1分間アセトン固定を行った。

3. その後、PBS にて洗浄し、0.5%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Fraction V, Armour Pharmaceutical Company, Illinois, U.S.A.) を含む PBS 150 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C, 15分間インキュベート後、再度 PBS にて洗浄した。

4. 被検希釈血清 (PBS にて1:5に希釈) を加え37 $^{\circ}$ C, 1時間インキュベートした。

5. PBS にて洗浄後、2 μ g/ml に希釈したビオチン化ヤギ抗ヒト免疫グロブリン (Vector Labs., California, U.S.A.) を 150 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C, 30分間インキュベートした。希釈液は 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.8, 0.04%アジ化ナトリウム, 0.15 M 塩化ナトリウム, 1% BSA を含む) を用い、500 μ g/ml とした。さらに、5%ウシ血清 (Gibco Lab.) を含む PBS で250倍に希釈した。

6. PBS にて洗浄後、8 μ g/ml に希釈した FITC 標識アビジン (Vector Labs.) を 150 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C, 15分間インキュベートした。FITC 標識アビジンは 0.5M 塩化ナトリウム, 10mM HEPES pH 8.0, 0.05%アジ化ナトリウムを含む希釈液を用い、2.5倍に希釈した。さらに、20mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.0, 0.15M 塩化ナトリウム, 0.1mg/ml BSA を含む) で 100倍に希釈した。

7. PBS にて洗浄後、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon, Fluophot VFD-R, 東京) にて観察した。そして、全細胞数の30%以上の細胞表面に蛍光の見られた血清を ICSA 陽性と判定した。また、細胞質内に蛍光の見られた血清を ICA 陽性と判定した。

III. 吸収実験

ICSA は NIDDM や CT を有する患者血清においても検出されることが知られている^{21,22)}。そこで、この抗体が膵島細胞お

よび甲状腺濾胞上皮細胞と特異的に反応するか否かを検討するために以下の吸収実験を行った。

被検血清中の免疫グロブリン分画は硫酸塩析法によって得た。即ち、血清 2ml に PBS および飽和硫酸を各 2ml 加え、4 $^{\circ}$ C, 30分間攪拌後、4 $^{\circ}$ C, 1,200 \times G, 10分間遠心して得られた沈殿物を 1ml の PBS に溶かし、大量の PBS に対して 4 $^{\circ}$ C, 24時間透析して得た。

次に、In-111 細胞を含む培養液を 140 \times G, 1分間遠心して得た沈渣 50 μ l に、同等量の被検免疫グロブリン液 (PBS で10倍希釈) を加え37 $^{\circ}$ C, 1時間インキュベートした後、140 \times G, 1分間遠心し上清を得た。この上清を用いて、In-111 細胞と甲状腺乳頭腺癌細胞由来 TPC-1 細胞を標的細胞として、前述の Biotin-Avidin 法による間接蛍光抗体法にて、ICSA の特異性を検討した。なお、TPC-1 細胞は、1983年にヒト甲状腺乳頭腺癌細胞より確立された細胞株で、種々の検討の結果、正常甲状腺濾胞上皮細胞と同等の抗原性を有することが知られている (金沢大学癌研究所病態生理部、佐藤信生らの成績による。投稿予定)。

IV. 細胞膜抗原分画の調整と ICSA 該当抗原の同定

1. 膵島細胞膜

1) 膵島細胞の細胞膜抗原は In-111 細胞 (3.6×10^6 個) に 0.5% Nonidet P-40 (NP-40, Sigma, St. Louis, U.S.A.) 緩衝液を 1.0~1.5ml 加え、4 $^{\circ}$ C, 90分間可溶化した²⁵⁾。なお、NP-40 緩衝液は 0.15M 塩化ナトリウム, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 1,000KIE/ml トラジロール, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む。

2) 次いで、4 $^{\circ}$ C, 10,000 \times G, 90分間遠心して上清を得、その蛋白濃度を Folin-Lowry 法²⁶⁾ で測定した。ヨード標識はクロラミン T 法²⁷⁾ によった。即ち、上清蛋白 70 μ g/50 μ l に、1.0 mCi Na-¹²⁵I (DuPont, Wilmington, U.S.A.) と 7 μ g/15 μ l クロラミン T (和光純薬, 大阪) を加えて、7 μ g/15 μ l のチオ硫酸ナトリウムにて反応を止めた。この反応溶液を Sephadex PD-10 カラム (Pharmacia Fine Chemicals Ind., Uppsala, Sweden) にてゲル濾過後、溶出液の放射活性を測定し、最初のピークを標識抗原として得た。

3) また、被検血清中の免疫グロブリン分画は、前述の硫酸塩析法によって得、その蛋白濃度は Folin-Lowry 法で測定した。

4) 抗原蛋白の分離は Schwartz, Nathanson の方法²⁸⁾ を一部変更し行った。即ち、100 μ l の免疫グロブリン分画に同等量、同濃度の標識抗原を加え 4 $^{\circ}$ C, 60分間インキュベートした。さらに、1 μ g/ml の protein A sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals Ind.) を同等量加え 4 $^{\circ}$ C, 30分間インキュベートした²⁹⁾。その後 1,200 \times G, 10分間遠心して得られた沈渣を洗浄用緩衝液 (20mM Tris-HCl pH 8.1, 100mM 塩化ナトリウム, 1mM EDTA-Na, 0.5% NP-40 を含む) で 5~6 回洗浄し、SDS 緩衝液 (0.2mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2% SDS, 50mM dithiothreitol, 10%グリセロール, 5mg bromophenol blue を含む) を加え、5分間煮沸し、1,200 \times G, 5分間遠心して上清を得た。

mellitus; LC, liver cirrhosis; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus; NP-40, nonidet p-40; PBS, phosphate buffered saline; RA, rheumatoid arthritis; RIA, radioimmunoassay; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SLE, systemic lupus erythematosus

5) 上清は SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用い分子量マーカー (Oriental Yeast, 大阪) と共に 40mA で電気泳動し (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)²⁹⁾, 分子量マーカー蛋白ゲルを切離後乾燥, オートラジオグラフィに供した (XAR-5, Kodak, Rochester, U.S.A.). 分子量マーカー蛋白ゲルは silver stain (Bio-Rad, California, U.S.A.) にて染色後乾燥した.

2. 正常甲状腺濾胞上皮細胞膜

正常甲状腺組織の細胞膜抗原分画は倉田の方法³⁰⁾を一部変更し, 糖尿病および CT などの自己免疫疾患とそれらの家族歴を有しない症例の剖検時に入手した甲状腺組織を用いて, 以下のごとく作製した.

1) 湿重量約 50g の組織に 0.01M PBS, pH7.4 を約 50ml 加え, ユニバーサルホモジナイザー (日本精機, 東京) で氷冷下約 5 分間ホモジナイズした.

2) ビュヒナー濾斗上でガーゼ 2 枚, 4 枚, 8 枚を順次使い, 吸引濾過して得られた濾液を 4°C, 10,000×G, 30 分間遠心後, その沈渣に PBS を加えてテフロンホモジナイザーで約 5 分間攪拌し, 同様に遠心して沈渣を作製した. さらにこの操作を 3 回繰り返し, 最終の沈渣を得た.

3) この最終沈渣に 0.5% NP-40 緩衝液を 10ml 加え, 48 時間冷室中で攪拌した後, 4°C, 10,000×G, 30 分間遠心して上清を取り分け, 沈渣については再び同様の操作を繰り返した後



Fig. 1. Fluorescence micrograph of ICA (islet cell cytoplasmic antibodies)-positive In-111 cells.

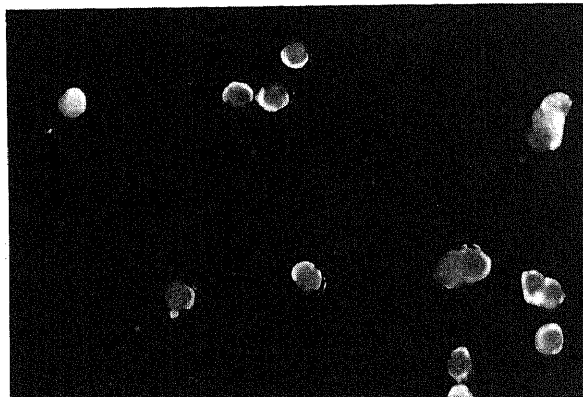


Fig. 2. Fluorescence micrograph of ICSA (islet cell surface antibodies)-positive In-111 cells.

上清を得た.

4) 2 回の抽出上清に 5~10 倍量の冷アセトンを加え, -20°C で一夜置いた後, 4°C, 1,200×G, 10 分間遠心して沈渣を得た.

5) この沈渣を 2ml の PBS で溶解後, Sephacryl 300 カラム (Pharmacia Fine Chemicals Ind.) でゲル濾過を行った. カラムの分子量マーカーとして 67kD の BSA (Pharmacia Fine Chemicals Ind.) を使用して 64kD 近傍の蛋白溶液を得た.

6) これを Spectrapor (Spectrum Medical Ind., California, U.S.A.) の筒に入れて冷室内で一晩扇風機にあてて濃縮し, Folin-Lowry 法で蛋白定量後, 前述のごとくクロロミン T 法にて標識し, 免疫沈降を行い SDS-PAGE に供した.

3. 患者抗体の臓器特異性の検討

患者抗体の臓器特異性を調べるため, 非内分泌組織である正常肝組織から前述のごとく, 細胞膜抗原分画を作製し, 免疫沈降を行い SDS-PAGE に供した.

4. 抗 BSA 抗体の検出法

Colman らは³¹⁾, 間接蛍光抗体法による ICSA の測定に培養

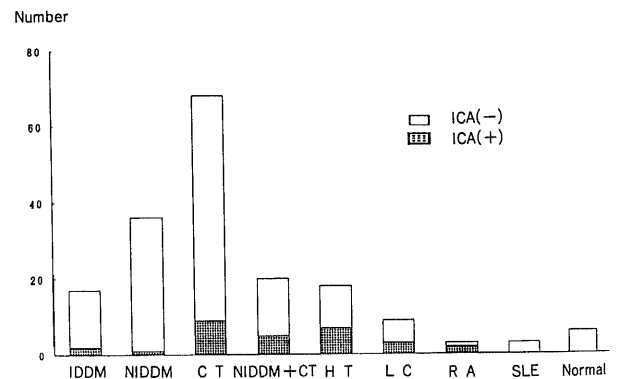


Fig. 3-a. Incidence of ICA in sera from patients with IDDM (2/17), NIDDM (1/36), CT (9/68), NIDDM with CT (5/20), HT (7/18), LC (3/9), RA (2/3), SLE (0/3), and from normal subjects (0/6).

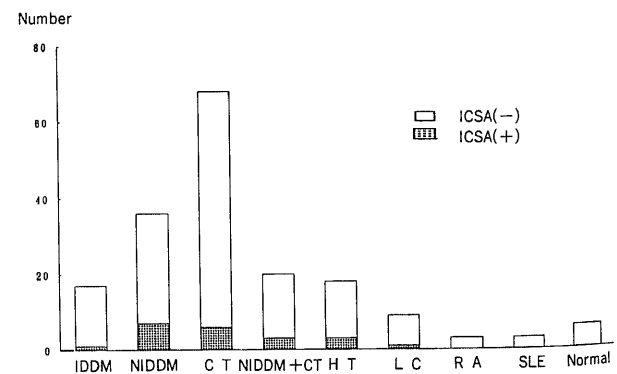


Fig. 3-b. Incidence of ICSA in sera from patients with IDDM (1/17), NIDDM (7/36), CT (6/68), NIDDM with CT (3/20), HT (3/18), LC (1/9), RA (0/3), SLE (0/3), and from normal subjects (0/6).

IDDM, insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus; CT, chronic thyroiditis; HT, hyperthyroidism; LC, liver cirrhosis; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus.

細胞を用いた場合、培養液中にアルブミンが存在するため、被検血清中の抗 BSA 抗体の存在を考慮しなければならないと報告している。抗 BSA 抗体の有無については、 $50\mu\text{g}/50\text{ml}$ BSA を前述のごとくクロラミンT法にて標識し、被検血清中の免疫グロブリン分画と免疫沈降を行い SDS-PAGE に供した。

成 績

1. ICA および ICSA の検出

図1は In-111 細胞を用いた間接蛍光抗体法における ICA 陽性像、図2は ICSA 陽性像の実際例を示す。臨床症例における検出結果は図3-a、図3-b で示すごとくである。

ICA は、IDDM (発症初期でない) では17例中2例、NIDDM では36例中1例、CT では68例中9例、糖尿病と CT の合併症例では20例中5例が陽性であった。HT では18例中7例、LC では9例中3例、RA では3例中2例が陽性であった。SLE と正常者では全例が陰性であった。ICSA は、IDDM では17例中1例、NIDDM では36例中7例、CT では68例中6例、糖尿病と CT の合併症例では20例中3例が陽性であった。HT では18例中3例、LC では9例中1例が陽性であった。RA、SLE、正常者では全例陰性であった。

以上、ICA、ICSA は共に種々の自己免疫疾患で見い出された。ICSA は従来の報告^{6)10)~22)}にあるように甲状腺疾患でも多く検出された。従って、これら抗体の臓器特異性(殊に甲状腺細胞に対する)につき、興味もたれたので次の検討を行った。

II. ICSA の臓器特異性に対する検討

In-111 細胞および TPC-1 細胞のいずれにも、抗細胞膜抗体陽性を示した症例を示す。図4 (表1の症例6) に示すごとく、被検免疫グロブリン分画を In-111 細胞で吸収前と後における、In-111 細胞を標的細胞とする ICSA 蛍光像である。吸収前(上段)は細胞表面に蛍光を認めるが、吸収後(下段)は消失している。図5は、図4と同一症例の In-111 細胞での吸収前と後における、TPC-1 細胞の蛍光像である。吸収前(上段)は細胞表面に蛍光を認めるが、吸収後(下段)は消失している。このように、ICSA は甲状腺濾胞上皮細胞膜抗原を認識している可能性があるため、以下の検討を行った。

ICSA 陽性の症例(表1に示す IDDM 1例、NIDDM 3例、CT 3例、NIDDM と CT の合併症例3例)につき、患者免疫グロブリン分画を In-111 細胞で吸収したところ、ICSA は全例陰性化した。次に、これら10症例の免疫グロブリン分画を用い、TPC-1 細胞につき間接蛍光抗体法を行ったところ、糖尿病4例中1例(症例2)で、CT 3例中2例(症例5、6)で、NIDDM と CT の合併症例3例中2例(症例9、10)で TPC-1 細胞表面に蛍光を認めた。そこで、これら5症例を含め全例の免疫グロブリン分画を In-111 細胞で吸収後、改めて TPC-1 細胞で間接蛍光抗体法を行ったところ全例で陰性であった。以上の結果は、膵島細胞膜と甲状腺濾胞上皮細胞膜には ICSA に対する共通抗原が存在することを示唆する。

III. 免疫沈降法による ICSA 該当抗原の検討成績

1. In-111 細胞を用いた検討

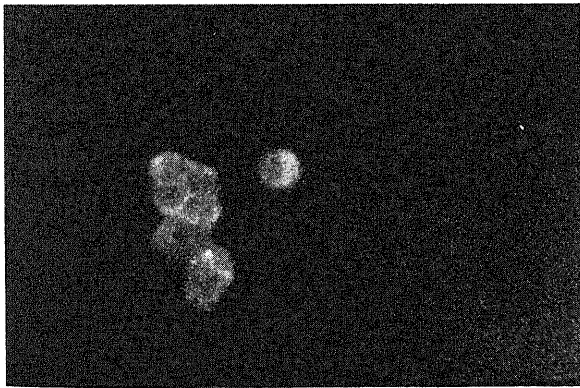


Fig. 4. Fluorescence micrograph of In-111 cells before (top) and after (bottom) absorption of ICSA-positive immunoglobulins with In-111 cells.

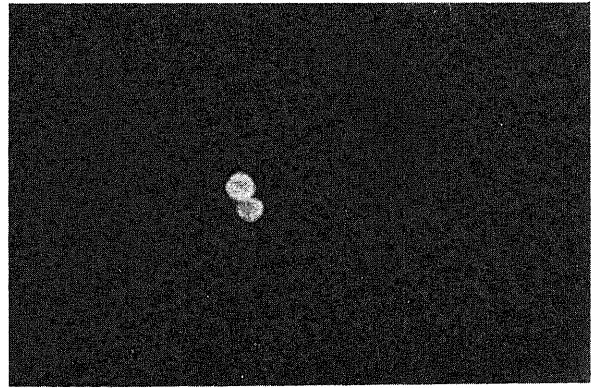


Fig. 5. Fluorescence micrograph of TPC-1 cells before (top) and after (bottom) absorption of ICSA-positive immunoglobulins with In-111 cells.

図6に ICSA 該当抗原を検討した際のオートラジオグラフィ像を示す。NIDDM 症例(表1の症例3, 4), CT 症例(症例6), そして NIDDM と CT の合併症例(症例8)では, 正常者には見られない 64kD 蛋白バンドを認めた。表1に示すごとく, 前述の ICSA 陽性であった糖尿病4例中3例(症例1, 3, 4)で, CT 3例中2例(症例5, 6)で, また, NIDDM と CT の合併症例3例中2例(症例8, 9)で, 同じく 64kD 蛋白バンドを認めた。

2. 正常甲状腺組織を用いた検討

ICSA 該当抗原を, 正常甲状腺組織を用いて調整した。この細胞膜抗原分画と患者血清の免疫グロブリン分画を用い同様に免疫沈降法を行った際のオートラジオグラフィ像を図7に示す。NIDDM 症例(表1の症例2), CT 症例(症例5), そして NIDDM と CT の合併症例(症例9)では, 正常者には見られない 64kD 蛋白バンドを認めた。表1に示すごとく, ICSA 陽性糖尿病4例中1例(症例2)で, CT 3例中1例(症例5)で, NIDDM と CT の合併症例3例中2例(症例9, 10)で同じく 64kD 蛋白バンドを認めた。In-111 細胞と甲状腺濾胞上皮細胞の両方の細胞膜抗原分画に 64kD 蛋白バンドを認めたのは CT 1例(症例5)と, NIDDM と CT の合併症例1例(症例9)であった。

3. ICSA の臓器特異性についての検討

糖尿病, 自己免疫疾患, およびそれらの家族歴を有しない剖検例から得た, 正常組織像の肝組織を用い同様に検討した。その細胞膜抗原分画と患者血清の免疫グロブリン分画を用い免疫沈降法を行った際のオートラジオグラフィ像を図8に示す。正常者, NIDDM 症例(表1の症例2, 3, 4), CT 症例(症例5, 6), そして NIDDM と CT の合併症例(症例8, 9, 10)のいずれにも 64kD 蛋白バンドは認めず, 表1に示すごとく, 症例5, 9を含め検討10症例の ICSA は臓器特異性のある抗体であることが判明した。

4. 培養細胞を用いた際の間接蛍光抗体法と免疫沈降法における問題点の検討

前述の In-111, TPC-1 細胞の培養液中には BSA 等のアルブミンが存在する。従ってこれらの細胞を用いて間接蛍光抗体法

を行った場合, もし患者血清中に抗 BSA 抗体が存在すると, 判定上偽陽性を呈する可能性も否定できない。さらにまた, 免疫沈降法上検出される 64kD 近傍蛋白がアルブミン自体である可能性も否定できない。そこで, ICSA 陽性患者血清の免疫グロブリン分画をとり, BSA との免疫沈降法を行った。その結果, 図9に示すオートラジオグラフィ像のごとく, NIDDM 症例(表1の症例2), CT 症例(症例5, 6), そして NIDDM と CT の合併症例(症例8, 9, 10)中, 少なくとも一部の症例(症例2, 6, 9, 10)ではこの 64kD 蛋白バンドは見られなかった。また, 表1に示す ICSA 陽性10症例の血清のうち糖尿病4例中2例(症例2, 3)で, CT 3例中1例(症例6)で, NIDDM と CT の合併症例3例中2例(症例9, 10)では, 同様に 64kD 蛋白バンドは見られなかった。この事実は, 正常者のみならず, 種々の疾患例においても, 抗 BSA 抗体陽性例が少なからず存在することを示唆する。また一方では, ICSA 陽性で 64kD 抗体を有する患者中に抗 BSA 抗体陰性例が存在することを示す。従って, 培養細胞を用いた ICSA, 64kD 蛋白検出に際し, 患者血清中の抗 BSA 抗体の存在を考慮しなければならない症例が少なくとも一部存在することが示唆された。

5. ICSA 陽性症例における間接蛍光抗体法と免疫沈降法の成績の検討

表1に示すごとく, ICSA 陽性症例を疾患別に検討すると, 糖尿病4症例中2例の血清では, 抗 BSA 抗体陰性でありながら, うち1例(症例2)で TPC-1 細胞表面に陽性蛍光を認め, 正常甲状腺濾胞上皮細胞膜の 64kD 蛋白抗原を認識する ICSA が存在した。他の1例(症例3)では In-111 細胞の 64kD 蛋白抗原のみ認識する ICSA が存在した。

CT 3症例中1例(症例6)の血清では, 抗 BSA 抗体陰性でありながら, In-111 細胞の 64kD 蛋白抗原を認識するとともに, TPC-1 細胞表面に陽性蛍光を認めたが, 正常甲状腺濾胞上皮細胞膜の 64kD 蛋白抗原を認識しない ICSA が存在した。なお症例5では, 抗 BSA 抗体は存在するものの, In-111 細胞と正常甲状腺濾胞上皮細胞のいずれの 64kD 蛋白抗原も認識する ICSA が存在した。

NIDDM と CT の合併3症例中2例の血清では, 抗 BSA 抗

Table 1. Clinical profiles of the patients, and a summary of the results of indirect immunofluorescence and immunoprecipitation studies using their ICSA-positive immunoglobulins

Case	Disease	Age	Sex	Duration of DM	MCHA	TGHA	Indirect immunofluorescence			Immunoprecipitation		
							In-111	TPC-1	TPC-1 after absorption with In-111	In-111	Thyroid	Anti-BSA antibody
1)	IDDM	71	♂	5~6y.	—	—	±	—	—	+	—	+
2)	NIDDM	60	♂	5~6y.	—	—	±	±	—	—	+	—
3)	NIDDM	72	♀	10y.	—	—	±	—	—	+	—	—
4)	NIDDM	68	♀	12y.	—	—	±	—	—	+	—	+
5)	CT	71	♀	—	80 ²	160 ²	+	±	—	+	+	+
6)	CT	64	♀	—	20 ²	—	+	+	—	+	—	—
7)	CT	68	♀	—	256000	80	±	—	—	—	—	+
8)	NIDDM+CT	48	♂	<1y.	80 ²	40 ²	±	—	—	+	—	+
9)	NIDDM+CT	75	♂	22y.	160 ²	10 ²	±	±	—	+	+	—
10)	NIDDM+CT	55	♂	2~3y.	20 ²	10 ²	+	+	—	—	+	—

+, positive fluorescence; ±, positive but weak fluorescence; —, negative; MCHA, microsomal hemoagglutinin test; TGHA, thyroglobulin hemoagglutinin test; IDDM, insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus; CT, chronic thyroiditis; In-111, hamster insulinoma cell line; TPC-1, human thyroid papillary adenocarcinoma cell line; BSA, bovine serum albumin.

体陰性でありながら、TPC-1 細胞表面に陽性蛍光を認め、正常甲状腺濾胞上皮細胞膜の 64kD 蛋白抗原を認識する ICSA が存在した。しかも、興味あることに、その中の 1 例 (症例 9) では、In-111 細胞の 64kD 蛋白も認識した。従って、この症例の血清中には、In-111 細胞と正常甲状腺濾胞上皮細胞のいずれの

細胞膜 64kD 蛋白抗原をも認識する ICSA が存在した。

考 察

IDDM の最大の機能的特徴はインスリン産生の喪失にあり、今日、膵島β細胞の自己免疫反応による選択的障害 (又は破壊) に起因すると考えられている。このような概念に相当する組織学的病変 "insulitis" は以前から報告されていたが、1965年 Gepts によりその臨床的意義が詳細に検討された³²⁾。しかし実際に、IDDM 患者血清中に自己抗体である ICA が存在することが証明されたのは1974年であり、以来、IDDM の発症、進展に自己抗体が関与することを示唆する報告が数多く見られる⁸⁾³³⁾³⁴⁾。

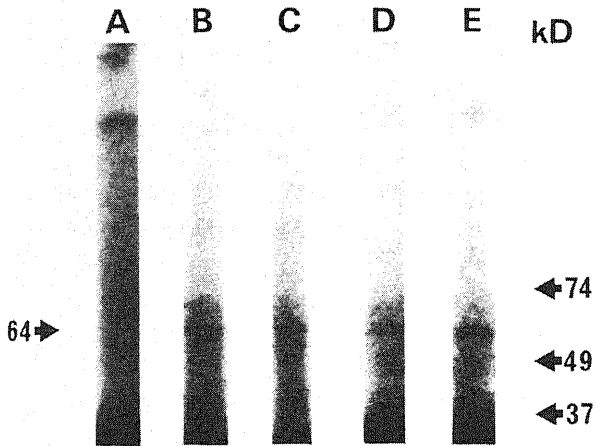


Fig. 6. Autoradiogram of the immune precipitates formed from solubilized ¹²⁵I-labelled-In-111 cells and patient antibodies. Immunoprecipitates with immunoglobulins from a healthy control subject (lane A) and patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (lane B, C), chronic thyroiditis (lane D) or the both diseases (lane E) were subjected to SDS-PAGE and then autoradiography. In lane B, C, D and E, a 64kD protein band is demonstrated.

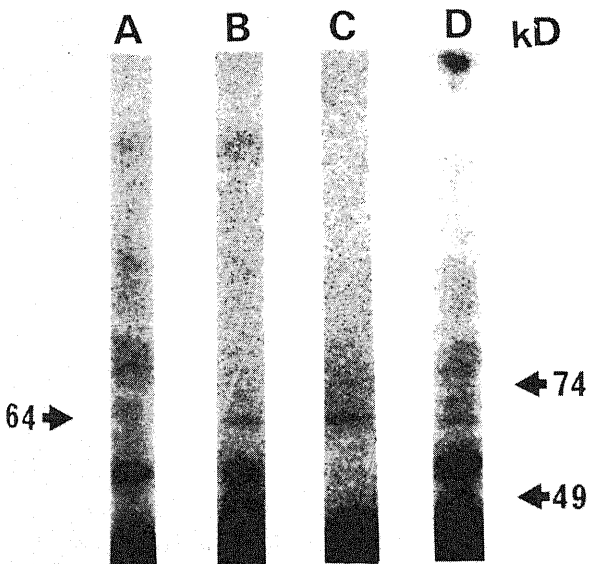


Fig. 7. Autoradiogram of the immune precipitates formed from solubilized ¹²⁵I-labelled-normal thyroid cells and patient antibodies. Immunoprecipitates with immunoglobulins from a healthy control subject (lane A) and patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (lane B), chronic thyroiditis (lane C) or the both diseases (lane D) were subjected to SDS-PAGE and then autoradiography. In lane B, C and D, a 64kD protein band is demonstrated.

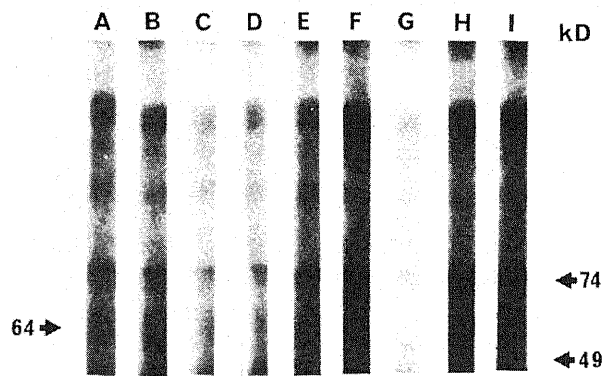


Fig. 8. Autoradiogram of the immune precipitates formed from solubilized ¹²⁵I-labelled-normal liver cells and patient antibodies. Immunoprecipitates with immunoglobulins from a healthy control subject (lane A) and patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (lane B-D), chronic thyroiditis (lane E, F) or the both diseases (lane G-I) were subjected to SDS-PAGE and then autoradiography. No specific protein bands are demonstrated.

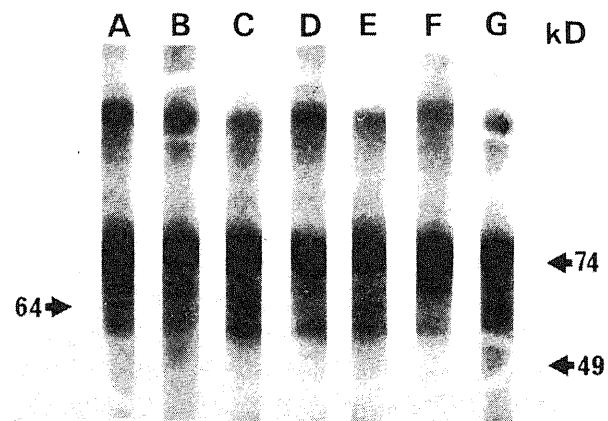


Fig. 9. Autoradiogram of the immune precipitates formed from ¹²⁵I-labelled-BSA and patient antibodies. Immunoprecipitates with immunoglobulins from a healthy control subject (lane A) and patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (lane B), chronic thyroiditis (lane C, D) or the both diseases (lane E-G) were subjected to SDS-PAGE and then autoradiography. In lane B, D, F and G, a 64kD protein band is not demonstrated.

ICAは発症直後のIDDM患者に高頻度に見られ、時に発症前から出現し、経過とともに消失することが知られている^{33,35}。しかしながら、ICAは膵島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³⁶、IDDMの病因に関与しているかどうか疑問視する研究者もいる³⁷。

一方、ICSAは膵島β細胞に特異的¹⁹、補体存在下では膵島β細胞に特異的に細胞障害性を持つことが示されており¹⁵⁻¹⁷、IDDMの発症、進展に最も強く関連することが示唆されている^{19,38}。

ICSAの検出には、従来ラット^{61,62}又はマウス¹⁵の単離膵島細胞、ヒトβ細胞株⁵やラットβ細胞株(RINr細胞)²¹等を用いた間接蛍光抗体法が採用されてきた。これらの方法では、ICSAは対照正常人で2~3%、IDDMで30%、発症直後のIDDMで70%前後の陽性率と報告されている⁹。また、ICAと同様に糖尿病の臨床的発症以前からも出現し、経過とともに消失することが知られている^{16,39}。さらに、日本人のNIDDMでも約15%に出現することが報告されている^{21,22}。今回の検討では、ハムスターインスリノーマ細胞株であるIn-111細胞を用いた。根岸³⁹はこの細胞を標的細胞として間接蛍光抗体法を用いてICSAを判定したが、¹²⁵I-抗ヒトIgG抗体を用いたradioimmunoassay(RIA)法や、¹²⁵I-protein A binding assay法による測定と良好な相関が認められたと報告している。さらに、RIA法によるICSA測定値はラット膵島細胞を用いた測定値と良好な相関をも認める成績を示した。さらに、RIA法によると、IDDM 17例中7例(41%)、NIDDM 27例中3例(11%)でICSAが検出されているので、In-111細胞はICSA測定に有用と結論づけられている。今回、著者がIn-111細胞を用いて検討したICSA陽性症例は、IDDMでは17例中1例と出現頻度は低かったが、多くは発症から4~5年以上経過した症例であったためと考えられた。また、NIDDMでは36例中7例(20%)で検出された。

IDDM症例における免疫系の多彩な異常については、古くから他の自己免疫疾患の合併や抗膵島抗体以外の自己抗体が種々見られること等から支持されてきた⁸。とりわけ臓器特異性自己抗体としては、thyroglobulin^{40,41}やthyroid peroxidase⁴¹(以前はマイクロゾーム抗原といわれていた^{42,43})に対する自己抗体、TSI(thyroid stimulating immunoglobulins)⁴⁴、TBII(thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins)⁴⁴、insulin receptor⁴⁵、H⁺、K⁺-ATPase⁴¹、intrinsic factor⁴⁶、tubulin⁴⁷、immunoglobulin⁴⁸に対する自己抗体などが挙げられている。また、これらの自己抗体とIDDMの発症の間の遺伝的素因も指摘されている⁴⁹。事実、我々もCTの合併疾患を調査したところ糖尿病の合併が約10%にも達した成績を得ている⁵⁰。さらに今回の検討で、CT 68例中6例(9%)、HT 18例中3例(17%)にICSAが検出され、従来の報告^{61,62}に一致した。しかも、NIDDMとCTの合併症例においても20例中3例にICSAを認めたことは興味深い。さらに、ICSAによって認識される抗原が、とりわけ、間接蛍光抗体法で甲状腺濾胞由来細胞(TPC-1)の細胞表面に10例中5例に発現していた事実より、ICSA対応抗原が膵島細胞と甲状腺濾胞上皮細胞に共通である可能性が想定された。

膵島β細胞を特異的に認識する、抗insulin⁵¹⁻⁵⁴、抗proinsulin以外の、自己抗体の該当抗原については64kD、38kD蛋白^{55,56}が報告されている。これらの報告では、遊離ヒト膵島あるいはラット膵島を³⁵S-methionineでラベルした免疫沈

降法を用いている。今回、著者はハムスターインスリノーマ細胞(In-111)を用い該当抗原の検討を行った。この点、In-111細胞での64kD蛋白抗原の報告は見られないが、ヒトのみならず、ラット由来のβ細胞においても64kD蛋白の抗原が報告されている^{22,65,67}。しかしながら近年、従来の遊離膵島細胞またはβ細胞株を用いた検討では、培養液中のBSA(Mr 67,000)等のアルブミンの存在が問題視されている³¹。そこで、今回の検討では患者血清中の抗アルブミン(BSA)抗体を検出し、ICSA該当抗原とBSAとの異同を確かめた。その結果、抗アルブミン抗体の存在しない症例血清のICSAでも、64kD蛋白抗原を認識することが判明した。

64kD蛋白は膵島のなかでもβ細胞の細胞膜にのみ存在し⁵⁹、64kD蛋白抗原に対する抗体は、ICAや抗インスリン抗体のないIDDM患者の発症時のみならず発症時に先行して血中に出現することが知られている^{59,60}。また、CT患者においてICAや抗インスリン抗体単独では、たとえこれが持続陽性であっても、IDDMの発症は見られないが⁶¹、64kD蛋白抗原に対する抗体がある症例ではIDDMが発症すると報告されている⁶⁰。さらに、64kD蛋白の発現は高グルコースレベルにより増加することが知られている⁶²。これらの成績より、従来の自己抗体に比べ、64kD蛋白抗原は、より早期に、そしてより深く糖尿病発症に係わるマーカーとして考えられている。前述のごとく、今回対象としたICSA陽性、患者免疫グロブリン分画を、In-111細胞膜分画と免疫沈降法を行った結果、認識抗原の分子量はやはり64kDであった。しかも、これらの血清は正常甲状腺細胞由来する64kD蛋白抗原をも認識した。ところが、一方で、ICSA陽性例でIn-111細胞膜分画に対して64kDバンドを示さない症例が存在することが判明した(表1に示す症例2, 7, 10)。この事実の解釈は必ずしも容易ではないが、Baekkeskovら⁵⁵もICSA陽性症例での64kD蛋白陽性の頻度は80~90%と報告している。しかも、ICSAと64kD蛋白の出現には解離がみられる症例があると報告しており、実験材料の動物種の相違によるかもしれないとしている。また、BBラットでもICSAと64kD蛋白の検出性は必ずしも一致していない⁶⁰。今回の検討で、最も興味深い事実は、1例ではあるが、NIDDMとCTの合併症例(症例9)で膵島由来In-111細胞と甲状腺濾胞由来TPC-1細胞の両方に蛍光反応を示す抗体を有し、しかも、この抗体は、In-111細胞と正常甲状腺濾胞上皮細胞膜の64kD蛋白を認識し、In-111細胞で吸収後はTPC-1細胞の蛍光反応が消失したことである。このことは、膵島細胞、甲状腺濾胞上皮細胞の対応抗原は免疫学的に極めて類似しているか、または同じであることを示すと考えられる。

最近になり、64kD抗原蛋白は、神経伝達物質であるγ-aminobutyric acid(GABA)の合成酵素のglutamic acid decarboxylase(GAD)であるとの興味ある報告がなされた⁶³。一方、その報告の以前から、GADは神経細胞のみならず膵島細胞に高濃度に存在し^{64,65}、しかもβ細胞のみに存在することが知られていた⁶⁶。またごく最近、GABA、GADがいずれもβ細胞のインスリン分泌顆粒とは別の、広く内分泌細胞の開口放出(exocytosis)に関与するであろうシナプス小胞(synaptic-like microvesicles)に局在する⁶⁷という注目されるべき事実が見いだされている。さらに、GADには64kDまたは65kD(GAD₆₄ or GAD₆₅)と67kD(GAD₆₇)があり^{68,69}、いずれもβ細胞に存在し、とくにGAD₆₄はシナプス小胞の膜上に局在する⁶⁹という報

告がある。従って、GAD₆₄ と 64kD 蛋白は同じものであるとする根拠が判明しつつあることになる。この点を踏まえ、さらに推論するならば、このような報告がなされる以前より GABA や GAD が神経系以外の組織にも存在すること⁷⁰⁾、とりわけ甲状腺濾胞上皮細胞や下垂体細胞などの内分泌細胞での存在が報告されている^{71)~73)}。これらの内分泌腺で、抗原としての GAD の発現が惹起されるならば、ICSA と共通の関連をもつことになる。

最後に、今回検討した一部の症例で、インスリンノーマ細胞株である In-111 細胞と甲状腺濾胞上皮細胞の 64kD 蛋白に共に反応する ICSA が存在した事実は、共通抗原の発現の観点から興味深い。そして、この事実は最近の GAD に関する知見と符合するとも推察される。いずれにせよ、著者の成績は、糖尿病と CT の合併に関する、あるいは多内分泌腺機能不全症に関する、自己免疫的機序に、少なくとも一部、説明を与えるものと考えられる。

結 論

抗膵島細胞膜抗体 (ICSA) 陽性の、糖尿病、慢性甲状腺炎、および両者の合併する計 10 症例において、患者血清中の免疫グロブリン分画を用い、間接蛍光抗体法および免疫沈降法にて該当抗原の性状について検討を行った。その結果、以下の成績を得た。

1. 間接蛍光抗体法にて検討すると、膵島由来 (In-111) 細胞、甲状腺由来 (TPC-1) 細胞のいずれの細胞表面にも、ICSA に対応する抗原の存在を示す蛍光の見られる患者血清があった。この血清を In-111 細胞で吸収すると全症例で TPC-1 細胞に対する蛍光は消失した。

2. さらに、免疫沈降法にて検討すると、これらの症例の一部において、In-111 細胞および正常甲状腺細胞の可溶性膜成分中の 64kD 蛋白抗原を認識する抗体 (ICSA) の存在が示された。抗 BSA 抗体とは明らかに異なり、両細胞の 64kD 蛋白抗原を認識する ICSA を、糖尿病と慢性甲状腺炎の合併 1 症例で見出した。

以上の成績は、膵島細胞と甲状腺濾胞上皮細胞の膜成分には、ICSA に対応する同一あるいは交叉反応性の 64kD 蛋白抗原が存在することを示す。このことは自己免疫性多内分泌腺疾患の成因論上、意義が深い。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御検閲を賜りました第二内科 竹田亮祐教授に深甚の謝意をあらわします。また、終始直接に御指導、御教示いただきました金沢大学第二内科、中林肇先生 (現 金沢大学保健管理センター教授) ならびに金沢大学病研究所病態生理部前教授、倉田自章先生に深く感謝いたします。

さらに、In-111 細胞と一部の検討血清を提供していただきました、埼玉医科大学第四内科 根岸清彦先生、また、一部の患者血清を提供していただきました、虎ノ門病院内分泌代謝科 小林哲郎先生に深く感謝いたします。

また、御助言、御協力いただきました金沢大学癌研究所病態生理部、佐藤信生先生ならびに同教室員各位と金沢大学第二内科第 2 B 研究室の先生方に厚く御礼申し上げます。

本論文の成績の一部は、第 28 回日本糖尿病学会総会 (1985 年 5 月 大津) にて発表した。

文 献

1) Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A. & Doniach,

D.: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2, 1279-1283 (1974).

2) MacCuish, A. C., Barnes, E. W., Irvine, W. J. & Duncan, L. J. P.: Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet*, 2, 1529-1531 (1974).

3) Lendrum, R., Walker, G. & Gamble, D. R.: Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet*, 1, 880-883 (1975).

4) Bottazzo, G. F., Dean, B. M., Gorsuch, A. N., Cudworth, A. G. & Doniach, D.: Complement-fixing islet-cell antibodies in type-I diabetes: Possible monitors of active beta-cell damage. *Lancet*, 1, 668-672 (1980).

5) Maclaren, N. K., Huang, S. W. & Fogh, J.: Antibody to cultured human insulinoma cells in insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 1, 997-999 (1975).

6) Lernmark, Å., Freedman, Z. R., Hofmann, C., Rubenstein, A. H., Steiner, D. F., Jackson, R. L., Winter, R. J. & Traisman, H. S.: Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 299, 375-380 (1978).

7) Weetman, A. P. & McGregor, A. M.: Autoimmune thyroid disease: Developments in our understanding. *Endocr. Rev.*, 5, 309-355 (1984).

8) Drell, D. W. & Notkins, A. L.: Multiple immunological abnormalities in patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 30, 132-143 (1987).

9) Carpenter, C. C. J., Solomon, N., Silverberg, S. G., Bledsoe, T., Northcutt, R. C., Klinenberg, J. R., Bennett, I. L. & Harvey, A. M.: Schmidt's syndrome (Thyroid and adrenal insufficiency): A review of the literature and a report of fifteen new cases including ten instances of coexistent diabetes mellitus. *Medicine*, 43, 153-180 (1964).

10) Irvine, W. J., Clarke, B. F., Scarth, L., Cullen, D. R. & Duncan, L. J. P.: Thyroid and gastric autoimmunity in patients with diabetes mellitus. *Lancet*, 2, 163-168 (1970).

11) Nerup, J. & Binder, C.: Thyroid, gastric and adrenal auto-immunity in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 72, 279-286 (1973).

12) Del Prete, G. F., Betterle, C., Padovan, D., Erle, G., Toffolo, A. & Bersahi, G.: Incidence and significance of islet-cell autoantibodies in different types of diabetes mellitus. *Diabetes*, 26, 909-915 (1977).

13) Nagaoka, K., Sakurami, T., Nabeya, N., Imura, H. & Kuno, S.: Antimicrosomal antibodies, gastric parietal cell antibodies and antinuclear factors in insulin dependent diabetes mellitus. *Endocrinol. Jpn.*, 26, 599-603 (1979).

14) Gray, R. S., Irvine, W. J., Toft, A. D., Seth, J., Cameron, E. H. D. & Clarke, B. F.: Unrecognized thyroid failure in diabetes mellitus. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 2, 221-224 (1979).

15) Lernmark, Å., Sehlin, J., Täljedal, I. B., Kromann, H. & Nerup, J.: Possible toxic effects of normal and

- diabetic patient serum on pancreatic B-cells. *Diabetologia*, 14, 25-31 (1978).
- 16) **Dobersen, M. J., Scharff, J. E., Ginsberg-Fellner, F. & Notkins, A. L.**: Cytotoxic autoantibodies to beta cells in the serum of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 303, 1493-1498 (1980).
- 17) **Dobersen, M. J. & Scharff, J. E.**: Preferential lysis of pancreatic B-cells by islet cell surface antibodies. *Diabetes*, 31, 459-462 (1982).
- 18) **Van De Winkel, M., Smets, G., Gepts, W. & Pipeleers, D.**: Islet cell surface antibodies from insulin-dependent diabetics bind specifically to pancreatic B cells. *J. Clin. Invest.*, 70, 41-49 (1982).
- 19) 国広 潔, 横川 泰, 野口志郎, 小野順子, 高木良三郎, 永淵法正, 草場公宏: 抗ラ氏島細胞膜抗体の検討—甲状腺疾患及び全身性エリテマトーデスについて. *糖尿病*, 25, 459 (1982).
- 20) 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: 甲状腺疾患と膵ラ氏島細胞膜抗体 (ICSA). *糖尿病*, 26, 633-637 (1983).
- 21) 鈴木将夫, 河津捷二, 根岸清彦, 渡辺敏郎, 外間朝哲, 高橋修樹, 松田ひとみ, 春藤俊一郎, 森谷茂樹, 井上郁夫, 竹井真一郎, 石井 淳: インスリン非依存型糖尿病における膵島細胞膜抗体 (ICSA) の臨床的意義: 膵島B細胞機能そしてHLA抗原との関連. *糖尿病*, 31, 801-808 (1988).
- 22) 袴田 睦, 伊藤光泰: 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. *日内分泌会誌*, 66, 700-714 (1990).
- 23) **Uchida, S., Watanabe, S., Aizawa, T., Kato, K., Furuno, A. & Muto, T.**: Induction of papillary ependymomas and insulinomas in the Syrian golden hamster by BK virus, a human papovavirus. *Gann*, 67, 857-865 (1976).
- 24) **Uchida, S., Watanabe, S., Aizawa, T., Furuno, A. & Muto, T.**: Polyoncogenicity and insulinoma-inducing ability of BK virus, a human papovavirus, in Syrian golden hamsters. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 119-126 (1979).
- 25) **Schwartz, B. D. & Nathenson, S. G.**: Isolation of H-2 alloantigens solubilized by the detergent NP-40. *J. Immunol.*, 107, 1363-1367 (1971).
- 26) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 27) **Greenwood, F. C., Hunter, W. M. & Glover, J. S.**: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89, 114-123 (1963).
- 28) **Kessler, S. W.**: Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.*, 115, 1617-1624 (1975).
- 29) **Laemmli, U. K.**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 30) 倉田自章: 甲状腺炎の免疫病理学—組織特異抗原の精製について. *日病理会誌*, 56 (補), 374-378 (1967).
- 31) **Colman, P. G., Campbell, I. L., Kay, T. W. H. & Harrison, L. C.**: 64,000-M, autoantigen in Type I diabetes. Evidence against its surface location on human islets. *Diabetes*, 36, 1432-1440 (1987).
- 32) **Gepts, W.**: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, 14, 619-633 (1965).
- 33) **Lernmark, Å. & Bækkeskov, S.**: Islet cell antibodies—Theoretical and practical implications. *Diabetologia*, 21, 431-435 (1981).
- 34) **Lernmark, Å.**: Islet cell antibodies. *Diabetic Med.*, 4, 285-292 (1987).
- 35) **Gorsuch, A. N., Spencer, K. M., Lister, J., McNally, J. M., Dean, B. M., Bottazzo, G. F. & Cudworth, A. G.**: Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet*, 2, 1363-1365 (1981).
- 36) **Bottazzo, G. F. & Doniach, D.**: Islet-cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus: Evidence of an autoantigen common to all cells in the islet of Langerhans. *Ric. Clin. Lab.*, 8, 29-38 (1978).
- 37) **Bottazzo, G. F., Pujol-Borrell, R. & Gale, E.**: Etiology of diabetes: the role of autoimmune mechanisms. *In* K. G. M. M. Alberti & L. P. Krall (eds.), *The Diabetes Annual 1*, p16-52, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1985.
- 38) **Toguchi, Y., Ginsberg-Fellner, F. & Rubinstein, P.**: Cytotoxic islet cell surface antibodies (ICSA) in patients with type I diabetes and their first-degree relatives. *Diabetes*, 34, 855-860 (1985).
- 39) 根岸清彦: インスリンノーマ細胞を用いた¹²⁵I-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).
- 40) **Simkins, S.**: Antithyroglobulin antibodies in diabetes mellitus. *Diabetes*, 17, 136-140 (1968).
- 41) **Landin-Olsson, M., Karlsson, A., Dahlquist, G., Blom, L., Lernmark, Å., Sundkvist, G. & co-workers**: Islet cell and other organ-specific autoantibodies in all children developing Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched control children. *Diabetologia*, 32, 387-395 (1989).
- 42) **Portmann, L., Hamada, N., Heinrich, G. & DeGroot, L. J.**: Anti-thyroid peroxidase antibody in patients with autoimmune thyroid disease: Possible identity with anti-mitochondrial antibody. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61, 1001-1003 (1985).
- 43) **Czarnocka, B., Ruf, J., Ferrand, M., Carayon, P. & Lissitzky, S.**: Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett.*, 190, 147-152 (1985).
- 44) **Bliddal, H., Bech, K., Johansen, K. & Nerup, J.**: Thyroid-stimulating immunoglobulins in insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.*, 14, 474-478 (1984).
- 45) **Maron, R., Elias, D., de Jongh, B. M., Bruining, G. J., van Rood, J. J., Shechter, Y. & Cohen, I. R.**:

Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin-dependent diabetes. *Nature*, **303**, 817-818 (1983).

- 46) Ungar, B., Stocks, A. E., Martin, F. I. R., Whittingham, S. & Mackay, I. R.: Intrinsic-factor antibody, parietal-cell antibody, and latent pernicious anemia in diabetes mellitus. *Lancet*, **2**, 415-418 (1968).
- 47) Rousset, B., Vialettes, B., Bernier-Valentin, F., Vague, P., Beylot, M. & Mornex, R.: Anti-tubulin antibodies in recent onset Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: comparison with islet cell antibodies. *Diabetologia*, **27**, 427-432 (1984).
- 48) Di Mario, U., Dotta, F., Crisa, L., Anastasi, E., Andreani, D., Dib, S. A. & Eisenbarth, G. S.: Circulating anti-immunoglobulin antibodies in recent-onset Type 1 diabetic patients. *Diabetes*, **37**, 462-466 (1988).
- 49) Hägglöf, B., Rabinovitch, A., Mackay, P., Huen, A., Rubenstein, A. H., Marnier, B., Nerup, J. & Lernmark, Å.: Islet cell and other organ-specific autoantibodies in healthy first-degree relatives to insulin-dependent. *Acta Paediatr. Scand.*, **75**, 611-618 (1986).
- 50) 中林 肇, 川東正範, 上田 操: 慢性甲状腺炎の臨床. 日内会誌, **63**, 1107-1108 (1974).
- 51) Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K. & Paquette, T. L.: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, **222**, 1337-1339 (1983).
- 52) Arslanian, S. A., Becker, D. J., Rabin, B., Atchison, R., Eberhardt, M., Cavender, D., Dorman, J. & Drash, A. L.: Correlates of insulin antibodies in newly diagnosed children with insulin-dependent diabetes before insulin therapy. *Diabetes*, **34**, 926-930 (1985).
- 53) Dean, B. M., Becker, F., McNally, J. M., Tarn, A. C., Schwartz, G., Gale, E. A. M. & Bottazzo, G. F.: Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: Correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia*, **29**, 339-342 (1986).
- 54) Palmer, J. P.: Insulin autoantibodies: Their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab. Rev.*, **3**, 1005-1015 (1987).
- 55) Baekkeskov, S., Nielsen, J. H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J. & Lernmark, Å.: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*, **298**, 167-169 (1982).
- 56) Baekkeskov, S., Dyrberg, T. & Lernmark, Å.: Autoantibodies to a 64-Kilodalton islet cell protein precede the onset of spontaneous diabetes in the BB rat. *Science*, **224**, 1348-1350 (1984).
- 57) Baekkeskov, S., Warnock, G., Christie, M., Rajotte, R. V., Larsen, P. M. & Fey, S.: Revelation of specificity of 64K autoantibodies in IDDM serums by high-resolution 2-D gel electrophoresis: Unambiguous identification of 64K target antigen. *Diabetes*, **38**, 1133-1141 (1989).
- 58) Christie, M. R., Pipeleers, D. G., Lernmark, Å. & Baekkeskov, S.: Cellular and subcellular localization of an M, 64,000 protein autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J. Biol. Chem.*, **265**, 376-381 (1990).
- 59) Baekkeskov, 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. & Lernmark, Å.: Antibodies to a 64,000M, human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.*, **79**, 926-934 (1987).
- 60) Atkinson, M. A., Maclaren, N. K., Scharp, D. W., Lacy, P. E. & Riley, W. J.: 64,000 M, autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet*, **335**, 1357-1360 (1990).
- 61) Betterle, C., Presotto, F., Pedini, B., Moro, L., Slack, R. S., Zanette, F. & Zanchetta, R.: Islet cell and insulin autoantibodies in organ-specific autoimmune patients. Their behaviour and predictive value for the development of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. A 10-year follow-up study. *Diabetologia*, **30**, 292-297 (1987).
- 62) Kämpe, O., Andersson, A., Björk, E., Hallberg, A. & Karlsson, F. A.: High-glucose stimulation of 64,000-M, islet cell autoantigen expression. *Diabetes*, **38**, 1326-1328 (1989).
- 63) Baekkeskov, S., Jan Aanstoot, H., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H. & De Camilli, P.: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, **347**, 151-156 (1990).
- 64) Briel, G., Gylfe, E., Hellman, B. & Neuhoff, V.: Microdetermination of free amino acids in pancreatic islets isolated from obese-hyperglycemic mice. *Acta Physiol. Scand.*, **84**, 247-253 (1972).
- 65) Okada, Y., Taniguchi, H. & Shimada, C.: High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science*, **194**, 620-622 (1976).
- 66) Vincent, S. R., Hökfelt, T., Wu, J.-Y., Elde, R. P., Morgan, L. M. & Kimmel, J. R.: Immunohistochemical studies of the GABA system in the pancreas. *Neuroendocrinology*, **36**, 197-204 (1983).
- 67) Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K. & De Camilli, P.: GABA and pancreatic β -cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J.*, **10**, 1275-1284 (1991).
- 68) Kaufman, D. L., Erlander, M. G., Clare-Salzler, M., Atkinson, M. A., Maclaren, N. K. & Tobin, A. J.: Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **89**, 283-292 (1992).
- 69) Aanstoot, H. J., Christgau, S. & Baekkeskov, S.: Pancreatic β -cell destruction is associated with absence of β -cell tolerance to two distinct forms of glutamic acid

decarboxylase. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **14** (Suppl. 1), S8 (1991).

70) Zachmann, M., Tocci, P. & Nyhan, W. L.: The occurrence of γ -aminobutyric acid in human tissues other than brain. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1355-1358 (1966).

71) Gebauer, H. & Pabst, M. A.: Autoradiographic localization of ^3H -GABA uptake in the thyroid gland of the

rat. *Cell Tissue Res.*, **220**, 873-879 (1981).

72) Vincent, S. R., Hökfelt, T. & Wu, J.-Y.: GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, **34**, 117-125 (1982).

73) Erdö, S. L. & Wolff, J. R.: γ -Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.*, **54**, 363-372 (1990).

Characterization of the Autoantigen (s) Recognized by the Islet Cell Surface Antibodies (ICSA): Studies on Islet β -cells and Thyroid Follicular Cells Takahiko Igawa, Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - *J. J. J. Med. Soc.*, **101**, 848-858 (1992)

Key words ICSA, organ-specific autoantigen, autoimmune polyglandular endocrinopathy

Abstract

Clinical association between insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) and other autoimmune endocrinopathies has been reported. Increased incidence of IDDM cases associated with chronic thyroiditis (CT) has been of particular interest, but the etiologic and pathogenic nature of the clinical association has not been clarified. Recently, it has become known that organ-specific autoantibodies such as islet cell (cytoplasmic) antibodies (ICA) and ICSA are present in sera of patients with IDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) or CT. The aim of the present study is to determine whether antigen (s) recognized by ICSA are present in the plasma membranes of both islet β -cells and thyroid follicular cells, and to clarify the immunological background in clinical association in patients with diabetes mellitus and CT. Sera from patients with diabetes or other autoimmune diseases were tested by indirect immunofluorescence technique using the In-111 cell (hamster insulinoma cell) as the target cell. ICSA-positive sera were found in one out of 17 patients with IDDM (1/17), in 7/36 NIDDM, in 6/68 CT, in 3/20 NIDDM with CT, in 3/18 hyperthyroidism, and in 1/9 liver cirrhosis patients. No ICSA were detected in three rheumatoid arthritis and three systemic lupus erythematosus patients, and six normal control subjects. To determine whether immunoglobulins isolated from the ICSA-positive serum recognize In-111 cells and normal thyroid follicular cells, indirect immunofluorescence and immunoprecipitation studies were performed. In five out of ten patients with ICSA-positive immunoglobulins, positive cell-surface fluorescences were detected on TPC-1 cells (human thyroid papillary adenocarcinoma cell line). The positive staining was not demonstrated after absorption of the ICSA-positive immunoglobulins with In-111 cells, suggesting the existence of common autoantigen (s) recognizable by ICSA in In-111 and TPC-1 cells. Characterization of the ICSA was further carried out by immunoprecipitation. When In-111 cell membrane fraction was used, 64kD protein was immunoprecipitated in 1/1 IDDM, in 2/3 NIDDM, in 2/3 CT, and in 2/3 NIDDM with CT. When normal thyroid follicular cell membrane was used for the study, 64kD protein was also immunoprecipitated in 0/1 IDDM, in 1/3 NIDDM, in 1/3 CT, and in 2/3 NIDDM with CT. In one case of NIDDM associated with CT, the patient serum immunoprecipitated 64kD protein from both In-111 cell and normal thyroid follicular cell membranes. These results indicate that at least some ICSA can recognize the same or a very closely-related antigen (s) in both islet β -cells and thyroid follicular cells, suggesting autoimmune mechanisms in clinical association of diabetes mellitus and CT.