

Title	インスリン非依存糖尿病と自己免疫：舘島関連自己抗体陽性者における細胞性免疫異常
Sub Title	
Author	鈴木, 竜司(Suzuki, Ryuzi) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.T155- T167
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050601-0155">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050601-0155</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

インスリン非依存糖尿病と自己免疫  
～膵島関連自己抗体陽性者における細胞性免疫異常～

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

すず き りゅう じ  
鈴木 竜 司

(平成 16 年 11 月 24 日受付)

**Key Words** : diabetes mellitus, slowly progressive type 1 diabetes, latent autoimmune diabetes in adults (LADA), glutamic acid decarboxylase (GAD), CXCL chemokine ligand-10 (CXCL-10) /interferon-inducible protein-10 (IP-10)

現在、日本における糖尿病患者は、740 万人にまで増加し、40 歳以上の国民の 6 人に 1 人といわれており、大きな社会問題になっている。糖尿病患者のうち、1 型糖尿病患者の占める割合は、かつては約 1% とかなり少なく、小児領域を中心とするものとされてきた。しかし、1996 年に膵島関連自己抗体の 1 つである抗 GAD65 抗体（以下、GAD65Ab；anti-glutamic acid decarboxylase 65 antibody）の測定が保険適用になって以来、2 型糖尿病と診断された患者の約 10% で GAD65Ab が陽性とする報告が出されており、従来考えられてきたよりもはるかに多くの 1 型糖尿病患者が存在していることが認識されてきた。このような患者では、食事療法が守られたとしても血糖コントロールが困難なことが多く、経口血糖降下薬であるスルホニル尿素薬を増量しても二次無効の状態となり、進行性にインスリン依存状態に陥ることが多い。結果として、インスリンが必要になった時点ですでに合併症が進行している例も少なくない。一方で、GAD65Ab が陽性でもインスリン非依存状態のまま経過する患者も存在し、GAD65Ab 陽性の糖尿病患者をすべて 1 型糖尿病患者として扱うべきなのかは結論が出ていない。したがって、GAD65Ab 陽性の糖尿病患者からインスリン依存に進行する緩徐進行 1 型糖尿病患者を早期にしっかりと診断し、的確に対応することが必要である。

1 型糖尿病は、膵 β 細胞破壊によるインスリンの欠乏を成因とする糖尿病と定義され、最終的にインスリン依存状態に陥ることが多く、かつてはインスリン依存型

糖尿病（IDDM；insulin-dependent diabetes mellitus）と呼ばれていた。大多数は膵 β 細胞を標的とする自己免疫疾患であり、特に T 細胞を主体とする細胞性免疫異常が成因として重要と考えられている。1 型糖尿病患者の 85-90% に膵島細胞抗体（ICA；islet cell antibody）、GAD65Ab、インスリン自己抗体（以下、IAA；insulin autoantibody）、抗 IA-2 抗体（以下、IA-2A；insulinoma associated protein-2 antibody）などの膵島関連自己抗体がみられる<sup>1), 2)</sup>。前述したように GAD65Ab は、一般臨床の場で測定可能であり、診断に有用なマーカーとなっている。一方、1 型糖尿病は、膵 β 細胞破壊の速度の差、すなわちインスリン依存状態に至るまでの期間による発症形式の違いで、劇症型<sup>3)</sup>、急性発症典型例（典型例）、緩徐進行型の 3 つの亜型に分類される。糖尿病発症からインスリン依存状態に至るまでの期間は、劇症型が 1 週間前後、典型例が 2-3 ヶ月程度、緩徐進行型は 6 ヶ月以上で、数年にわたることもあり、緩徐進行型は slowly progressive IDDM（もしくは slowly progressive type 1 diabetes）<sup>4)</sup>あるいは latent autoimmune diabetes in adults (LADA)<sup>5)</sup>と呼ばれている。緩徐進行型は、日本人に比較的多いとされ、インスリン非依存状態である期間に将来のインスリン依存状態への進行を予知できれば、早期からのインスリン治療などにより、残存する膵 β 細胞機能を保持できる可能性が報告されており<sup>6)</sup>、その予知は重要な意味がある。

緩徐進行 1 型糖尿病の早期診断、すなわち発症より 6

ヵ月以上インスリン治療を必要としない糖尿病（以下、本論文では、糖尿病発症より6ヵ月以上インスリン治療を必要とせず、臨床的に2型糖尿病と考えられる糖尿病をNIDDM; non-insulin-dependent diabetes mellitusと呼ぶ）において、インスリン依存状態への進行を予測するためには、GAD65Abの測定が最も重要と考えられている。日本人では、NIDDM患者の2.4-9.7%がGAD65Ab陽性と報告されている<sup>7-10</sup>。しかしながら、全てのGAD65Ab陽性例がインスリン依存状態へ進行するわけではなく、GAD65Ab陽性NIDDMのうち、GAD65抗体価が10 U/ml以上（正常1.3 U/ml未満）の高抗体価の患者（高抗体価群）においては高率にインスリン治療が必要になるが、1.3-9.9 U/mlの低抗体価の患者（低抗体価群）はインスリン治療が必要になることが少ないと報告されている<sup>10</sup>。また、GAD65Ab陽性NIDDM患者において、実際に組織学的に膵β細胞破壊を起こすと考えられる膵島炎（膵ランゲルハンス島へのリンパ球浸潤）の存在も証明されたが、これも、高抗体価群の症例であった<sup>11</sup>。現状では、GAD65Abが陽性ならば一般に1型糖尿病と診断されることが多いが、低抗体価群は1型として扱うべきなのか疑問が残る報告であった。しかしながら、高抗体価群と低抗体価群との間に病態の違いがあるかどうかは全く報告がない。今回著者は、この両群間の病態の違いを明らかにするため、1型糖尿病の成因がT細胞機能異常であるとされていることから、両群のT細胞を中心とする種々の細胞性免疫指標の差異を、1, 2, 3, の方法で検討した。

1. 末梢血リンパ球 (PBMC; peripheral blood mononuclear cells) のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン分泌能の検討

典型例の1型糖尿病の発症に、T helper 1 (Th1) /T helper 2 (Th2) バランスの不均衡が関与していることが、ヒト<sup>12-14</sup>およびマウス<sup>15, 16</sup>)において、ここ数年来報告されてきた。いずれも、PBMCのポリクローナルな刺激に対して、Th2タイプのサイトカインの低下またはTh1タイプのサイトカインの上昇を示すことが特徴とされた。今回、高抗体価群と低抗体価群において、PBMCの抗CD3抗体で刺激した際のサイトカイン分泌能を検討した。

2. 血清 CXC chemokine ligand-10 (CXCL-10)/interferon-inducible protein-10 (IP-10) (以下 IP-10 と略す) の検討

最近、活性化されたTh1細胞の局所への遊走を促進させるケモカインであるIP-10の血中レベルが典型例の1型糖尿病患者において上昇していることが報告された<sup>17</sup>。今回、高抗体価群と低抗体価群において、血清IP-10値を検討した。

3. 膵β細胞抗原特異的の刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数の検討

膵β細胞抗原に対するT細胞の特異的な反応を評価するために、GAD65刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数を測定し、高抗体価群と低抗体価群で比較検討した。

第1表 GAD65Ab陽性NIDDM患者（高抗体価群，低抗体価群），典型例1型糖尿病患者，GAD抗体陰性が確認された2型糖尿病患者のそれぞれの特徴

	高抗体価群	低抗体価群	典型例1型糖尿病	2型糖尿病
人数	36	48	36	47
性別 (男/女)	19/17a	14/34c	11/25c	30/17
年齢 (歳)	51.6±2.6 <sup>a,b</sup>	58.9±2.1 <sup>b</sup>	37.3±2.4 <sup>c</sup>	57.8±2.2
罹病期間 (年)	7.1±1.1 <sup>a,c</sup>	12.0±1.3 <sup>b</sup>	6.6±1.1 <sup>c</sup>	13.0±1.4
C-ペプチド (ng/ml)	1.0±0.2 <sup>b,c</sup>	1.3±0.1 <sup>b</sup>	0.6±0.7 <sup>c</sup>	2.0±0.3
GAD65Ab (U/ml)	913.8±545.6	3.4±0.3	1934±1722.2	<1.3
IA-2A 陽性者	46%	28%	37%	測定せず
DR4 保有者	58%	44%	59%	測定せず
DR9 保有者	54%	44%	52%	測定せず
DR4 or DR9 保有者	85%	81%	96%	測定せず
A24 保有者	46%	43%	測定せず	測定せず
インスリン治療者	81%	54%	100%	68%

平均値±標準誤差で示した。a: p<0.05 (低抗体価群に対して), b: p<0.05 (典型例1型糖尿病患者に対して), c: p<0.05 (2型糖尿病患者に対して)

C-ペプチド: 空腹時血清 C-ペプチド, GAD65Ab: 抗 GAD65 抗体, IA-2A: 抗 IA-2 抗体

## 対象と方法

1. 末梢血リンパ球 (PBMC) のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン分泌能の検討

### 1) 対象患者 (第 1 表)

糖尿病診断から 6 ヶ月以上インスリン治療を必要としなかった GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者 84 名を対象とし、診断時の GAD65 抗体価が 10 U/ml 以上の高抗体価群 (n=36, 51.6±2.6 歳, 男女比 19/17, 罹病期間 7.1±1.1 年, 空腹時血清 C ペプチド 1.0±0.2 ng/ml) と、1.3-9.9 U/ml の低抗体価群 (n=48, 58.9±2.1 歳, 男女比 14/34, 罹病期間 12.0±1.3 年, 空腹時血清 C ペプチド 1.3±0.1 ng/ml) に分けた。また対照として、急性発症典型例の GAD65Ab 陽性 1 型糖尿病患者 (n=36, 37.3±2.4 歳, 男女比 11/25, 罹病期間 6.6±1.1 年, 空腹時血清 C ペプチド 0.6±0.7 ng/ml) と GAD65Ab 陰性 2 型糖尿病患者 (n=47, 57.8±2.2 歳, 男女比 30/17, 罹病期間 13.0±1.4 年, 空腹時血清 C ペプチド 2.0±0.3 ng/ml) を加えた。高抗体価群と低抗体価群で、抗 IA-2 抗体 (IA-2A) の陽性率 (46 vs. 28%), 日本人 1 型糖尿病で多いとされる HLA DR4 または DR9<sup>18)</sup> の保有率 (85 vs. 81%), インスリン依存への進行が速いとされる HLA A24<sup>3), 19)</sup> の保有率 (46 vs. 43%) ともすべて有意差はなかった。その他、インスリン治療者の割合など、4 群の特徴は第 1 表に示した。患者は、慶應義塾大学病院, 埼玉社会保険病院, 済生会中央病院の通院者で同意の得られた者とした。

### 2) PBMC の抗 CD3 抗体による刺激

各患者から 10 ml の末梢血を採取し、Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia, Sweden) を用いて PBMC を分離した。2% の熱処理非活性化仔牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) (JRH Biosciences, USA) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies, USA) を含んだ L-グルタミン添加 RPMI-1640 液 (Life Technologies, USA) を培養液 (以下, 2% FBS-RPMI) とし、 $1 \times 10^6$  個の PBMC を 96 穴丸底細胞培養プレート (Beckton Dickinson, USA) 上で 100  $\mu$ l の 2% FBS-RPMI 中に浮遊させた。抗 CD3 抗体 (HIT 3a; PharMingen, USA) を 2% FBS-RPMI 中に 10  $\mu$ g/ml の濃度で調製し、100  $\mu$ l ずつ加えた。最終液量 200  $\mu$ l の 2% FBS-RPMI 中に  $1 \times 10^6$  個の PBMC, 抗 CD3 抗体濃度は 5  $\mu$ g/ml とした。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 40-48 時間培養し、上清を回収し、サイトカイン計測まで数日間-20°C で冷凍保存した。

### 3) PBMC の CD4, CD8, CD45RO 陽性細胞分画の評価

各患者から分離した PBMC  $1 \times 10^6$  個を、2% の FBS を含んだリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (以下, 2% FBS-PBS) 100  $\mu$ l に浮遊させ、抗 CD4-FITC 抗体 (Becton Dickinson) と抗 CD8-PE 抗体 (Becton Dickinson) を加えて、4°C で 10 分間静置させ染色した後、フローサイトメーター (EPICS ALTRA; Coulter, USA) を用いて解析した。また同様の方法で、抗 CD4-FITC 抗体と抗 CD45RO-PE 抗体 (PharMingen) で染色して、解析した。

### 4) サイトカインの計測

Th1 タイプのサイトカインとしてインターフェロン (IFN)- $\gamma$ , Th2 タイプのサイトカインとしてインターロイキン (IL)-10 を計測した。上清中のサイトカインの計測には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた。すなわち、平底 96 穴プレート (Nunc, Denmark) に、PBS に溶かして 10  $\mu$ g/ml の濃度とした各モノクローナル抗体 (抗 IFN- $\gamma$  抗体 (NIB 42; PharMingen), 抗 IL-10 抗体 (JES3-9D7; PharMingen)) を、各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ加えて、4°C で一晚静置しコーティングをした。0.1% の Tween20 (BioRad, USA) を加えた PBS (以下, 0.1% Tween20-PBS) で洗浄した後、1% の仔牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) (Sigma, USA) を含んだ PBS (以下, 1% BSA-PBS) を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加え、37°C で 1 時間静置しブロッキングをした。0.1% Tween20-PBS で洗浄後、採取された上清または各サイトカインのスタンダード検体 (PharMingen) を各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ加えて、2 時間室温で静置した。0.1% Tween20-PBS で洗浄後、ビオチン化した各抗体 (抗 IFN- $\gamma$  抗体 (4S-B3; PharMingen), 抗 IL-10 抗体 (JES3-12G8; PharMingen)) を 1% BSA-PBS に溶かして 5  $\mu$ g/ml の濃度とし、各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ加えて、室温で 1 時間静置した。その後、AB 溶液 (Vectastain ABC kit; Vector, USA) を各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ加えて 30 分静置した後、2, 2'-azinobis-3-ethyl benz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma) を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加えて、405 nm での発色を ELISA リーダー (BIO-RAD; Richmond, USA) で調べた。検体はすべて二重に計測し、スタンダード検体より得られたスタンダードカーブより各サイトカインの濃度を求めた。IFN- $\gamma$  と IL-10 の検出感度はそれぞれ 40 pg/ml, 30 pg/ml であった。同様の方法で、Th2 タイ

プのサイトカインとしてIL-4も計測したが、このELISAシステムでは大部分の検体が検出感度以下となり検討できなかった。

### 5) 自己抗体の測定

GAD65抗体価は、recombinant human GAD65 (RSR Ltd, UK)を用いたGAD65 Ab kitにより測定した。この測定法では、陽性は1.3 U/ml以上(健常人の平均+3×標準偏差)と定義され、感度、特異度とも100%である(国際糖尿病免疫ワークショップ, 実験室ID番号305)。陽性結果は、ヒト膵GAD65をコードするcDNA (pEx 9, ワシントン大学 Ake Lernmark 教授より提供)より作製した<sup>[35S]</sup>-GAD65を用いた、後述のIA-2Aの測定と同様のradioligand binding法(インデックス0.020以上が陽性)<sup>7)</sup>でも確認した。

IA-2Aの測定はradioligand binding法を用いた<sup>20)</sup>。すなわち、ヒト膵IA-2のC末側の主要なエピトープを有するcDNA (ICA 512.bdc, コロラド大学 George S Eisenbarth 教授より提供)をpc DNA II (Invitrogen, USA)に組み込み、*in vitro* transcription/translation system (Promega, USA)を用いて<sup>[3H]</sup>-IA-2を作製した。20,000 cpmの標識蛋白を、反応溶液(20 mM Tris hydroxymethyl aminomethan, 150 mM NaCl, 0.15% Tween 20, 0.1% Aprotinin, 10 mM benzamidine)中で25倍希釈した患者血清と4℃で一晩反応させた。免疫複合体を50 μlの50%プロテインA-セファロースビーズ(Pierce, USA)で沈降させた後、multiscreen assay system (Millipore, USA)を用いて反応溶液で洗浄後、セファロースビーズを回収し、トップカウント(Packard, USA)で放射活性を測定した。測定値は陽性および陰性コントロール血清を用いて、インデックスとして下式のごとく計算した。IA-2抗体インデックス=(未知検体のカウント-陰性コントロールのカウント)/(陽性コントロールのカウント-陰性コントロールのカウント)

正常人におけるインデックスの分布によりインデックス0.010以上を陽性とした。

### 2. 血清IP-10値の検討

血清IP-10濃度はELISA法により測定した<sup>21)</sup>。すなわち、平底96穴プレートに、抗IP-10抗体(αhIPb)をPBSに溶かして20 μg/mlの濃度として、各ウェルに50 μlずつ加えて、4℃で一晩静置しコーティングをした。0.05% Tween20-PBSで洗浄後、ブロックエースを各ウェルに100 μlずつ加え、室温で2時間静置しブ

ロッキングをした。0.05% Tween20-PBSで洗浄後、患者血清またはIP-10のスタンダード検体を各ウェルに50 μlずつ加えて、1時間室温で静置した。0.05% Tween20-PBSで洗浄後、ビオチン化抗IP-10抗体(αhIPd)を1% BSA-PBSに溶かして0.3 μg/mlの濃度として、各ウェルに50 μlずつ加えて、室温で1時間静置した。0.05% Tween20-PBSで洗浄後、streptavidin-conjugated β-D-galactosideを各ウェルに50 μlずつ加えて1時間静置した。0.05% Tween20-PBSで洗浄後、0.01% 4-methyl-umbelliferyl-β-D-galactosideを各ウェルに50 μlずつ加えて10分間震盪し、2 mol/lの炭酸塩を各ウェルに100 μlずつ加え反応を停止させた後、460 nmでの発色をELISAリーダー(Fluorascan II; Labsystems, UK)で調べた。スタンダード検体より得られたスタンダードカーブよりIP-10濃度を求めた。検出感度は10 pg/mlであった。健常人の血清IP-10濃度の平均値は、41.5 pg/mlであった<sup>17)</sup>。

### 3. 膵β細胞抗原特異的刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数の検討

抗原特異的なサイトカイン反応を調べるため、GAD65刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数を計測した。患者の全血500 μlを5 mlポリスチレン丸底チューブ(Beckton Dickinson)に入れ、10% FBSと1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含んだL-グルタミン添加RPMI-1640液を培養液(10% FBS-RPMI)として500 μl加え、さらに1 μgの抗CD28抗体(L293; Beckton Dickinson)を副刺激として加えたものを2本用意し、1本にはリコンビナントGAD65 (RSR, UK)を5 μg/ml加えた。攪拌後、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で72時間培養し、最後の4時間は10 μg/mlのブレフェルジンA (Sigma)を加えた。培養後、それぞれ300 μlずつ別のチューブに分け、20 μlの抗CD4-PC5抗体(Coulter, France)を加え攪拌し、室温で15分間静置した。4 mlのFACS lysing solution (Beckton Dickinson)を加え攪拌し、室温で10分間静置した。1600回転で5分間遠心後、上清を捨て、細胞を0.1% BSA-PBSで洗浄し、1.5 mlのFACS permeabilizing solution (Beckton Dickinson)を加え攪拌し、暗室温で10分間静置した。0.1% BSA-PBSで洗浄後、一方に20 μlの混合抗体(抗IFN-γ-FITC抗体と抗IL-4-PE抗体; Beckton Dickinson)と一方に20 μlの混合アイソタイプコントロール(抗IgG2a-FITC抗体と抗IgG1-PE抗体; Beckton Dickinson)を加え攪拌し、暗室温で30分間静置した。洗浄後、フローサイトメー

ター (EPICS ALTRA) を用いて解析した。

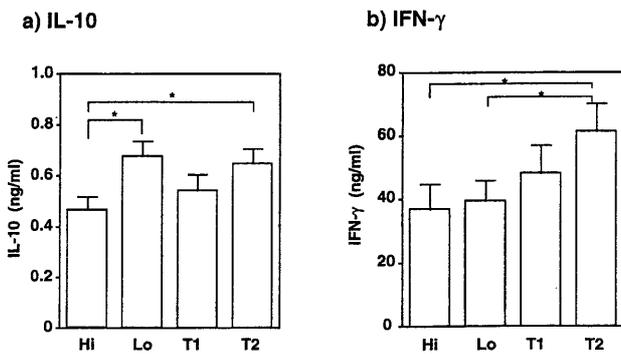
#### 4. 統計学的解析

サイトカイン濃度の群間の比較は、正規分布を示したため unpaired *t*-test を用いて解析した。成績は平均値±標準誤差で示した。血清 IP-10 値あるいは GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数の群間の比較は、正規分布を示さないため Mann-Whitney *U*-test を用いて解析した。血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数の相関は、Spearman の順位相関を使用した。

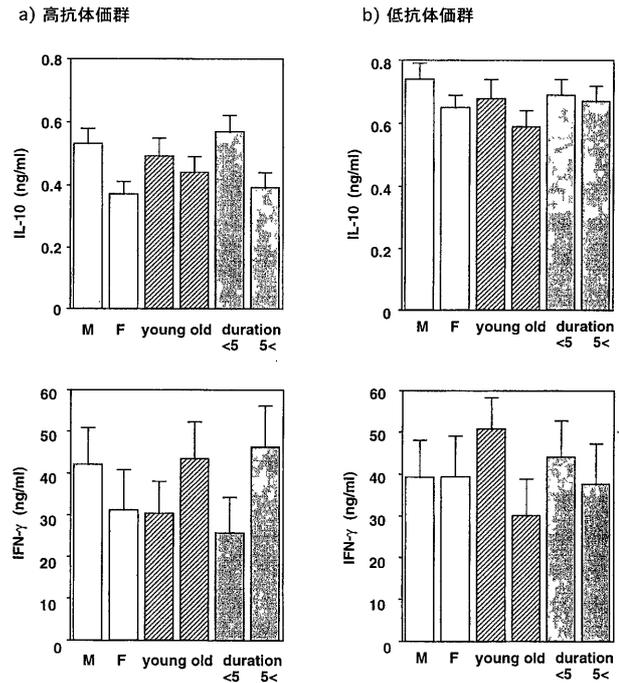
## 結果

### 1. 末梢血リンパ球 (PBMC) のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン分泌能の検討

はじめに、ポリクローナルな T 細胞の反応を比較するため、PBMC の抗 CD3 抗体刺激 (5  $\mu$ g/ml) に対するサイトカイン分泌能 (Th2 タイプのサイトカインとして IL-10, Th1 タイプのサイトカインとして IFN- $\gamma$ ) を 4 群で比較した。第 1 図に示すように、IL-10 産生能は、高抗体価群 (n=36, 0.46 $\pm$ 0.05 ng/ml) が低抗体価群 (n=48, 0.68 $\pm$ 0.06 ng/ml) と 2 型糖尿病患者 (n=47, 0.65 $\pm$ 0.06 ng/ml) に比して、有意に低値を示した (それぞれ、*p*<0.05, *p*<0.05)。IFN- $\gamma$  産生能は、



第 1 図 PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対する IL-10 (a), IFN- $\gamma$  (b) の産生能の 4 群間の比較。Hi (n=36) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo (n=48) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群), T1 (n=36) : 典型例 1 型糖尿病患者, T2 (n=47) : 2 型糖尿病患者。  
\**p*<0.05。IL-10 産生能は、高抗体価群が低抗体価群と 2 型糖尿病患者に比して有意に低値を示した。IFN- $\gamma$  産生能は、高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった。

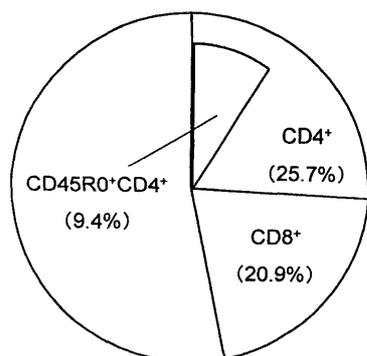


第 2 図 性別、年齢、罹病期間の GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群 (a), 低抗体価群 (b)) におけるサイトカイン産生能への影響。PBMC を抗 CD3 抗体で刺激した際のサイトカイン (IL-10, IFN- $\gamma$ ) 産生量を示す。M : 男性, F : 女性, young : 年齢平均値よりも若年, old : 年齢平均値よりも高齢, duration : 罹病期間, <5 : 5 年未満, >5 : 5 年以上。高抗体価群, 低抗体価群各々において、性別、年齢、罹病期間は、IL-10 および IFN- $\gamma$  産生量に有意な影響を与えなかった。

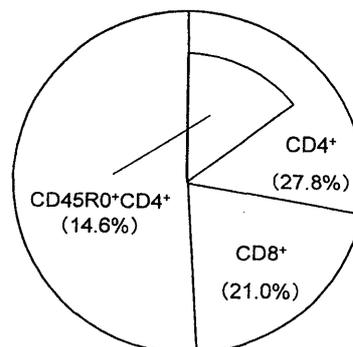
高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった (両群とも 2 型糖尿病患者に比して有意に低値を示した)。

第 1 表に示すように、4 群間において、性別、年齢、罹病期間に差異が存在したため、これらが高抗体価群, 低抗体価群各々においてポリクローナルな刺激に対する T 細胞のサイトカイン分泌能に影響を与えないかどうか確認した。第 2 図に示すように、男女差については、高抗体価群で、IL-10 産生能は男性 0.53 ng/ml に対して女性 0.37 ng/ml, IFN- $\gamma$  産生能は男性 42.1 ng/ml に対して女性 31.1 ng/ml, 低抗体価群で、IL-10 産生能は男性 0.74 ng/ml に対して女性 0.65 ng/ml, IFN- $\gamma$  産生能は男性 39.2 ng/ml に対して女性 39.4 ng/ml と有意差を認めなかった。年齢差については各群の年齢平均値よりも若年か高齢かで比較したところ、高抗体価群で、IL-10 産生能は若年 0.49 ng/ml に対して高齢 0.44 ng/ml, IFN- $\gamma$  産生能は若年 30.3 ng/ml に対して高齢

a) 高抗体価群

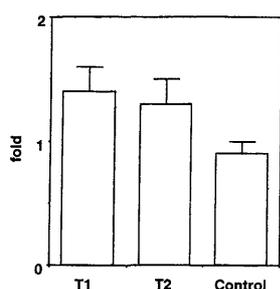


b) 低抗体価群

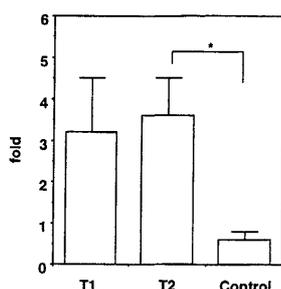


第3図 GAD65Ab陽性NIDDM(高抗体価群(a), 低抗体価群(b))における末梢血T細胞分画(CD4陽性細胞, CD8陽性細胞, CD45RO陽性CD4陽性細胞)の検討。CD4<sup>+</sup>:CD4陽性細胞, CD8<sup>+</sup>:CD8陽性細胞, CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>:CD45RO陽性CD4陽性細胞。高抗体価群と低抗体価群で, 末梢血T細胞分画に有意差はなかった。

a) IL-10

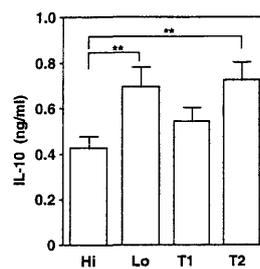


b) IFN-γ

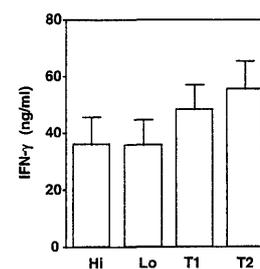


第4図 PBMCの抗CD3抗体刺激に対するIL-10(a), IFN-γ(b)の産生能のインスリン治療前と2週間後の変化の検討(2週間後の値/治療前の値)。T1(n=13): 典型例1型糖尿病患者, T2(n=20): 2型糖尿病患者, Control(n=9): インスリン治療をせずに2週間の間隔を開けて同様に検討した健常者。\*p<0.05。典型例1型糖尿病患者, 2型糖尿病患者ともに, インスリン治療によってIL-10およびIFN-γ産生能が亢進した。

a) IL-10



b) IFN-γ



第5図 PBMCの抗CD3抗体刺激に対するIL-10(a), IFN-γ(b)の産生能の4群間の比較(インスリン治療者のみ)。Hi(n=29): GAD65Ab陽性NIDDM(高抗体価群), Lo(n=26): GAD65Ab陽性NIDDM(低抗体価群), T1(n=36): 典型例1型糖尿病患者, T2(n=30): 2型糖尿病患者。\*\*p<0.01。IL-10産生能は, 高抗体価群が低抗体価群と2型糖尿病患者に比して有意に低値を示した。IFN-γ産生能は, 高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった。

(Suzuki R et al : J Autoimmun 20 : 83-90, 2003のFig. 1より許可を得て転載)

43.4 ng/ml, 低抗体価群で, IL-10産生能は若年0.68 ng/mlに対して高齢0.59 ng/ml, IFN-γ産生能は若年50.7 ng/mlに対して高齢30.0 ng/mlとやはり有意差を認めなかった。罹病期間については5年未満か5年以上

上かで比較したところ, 高抗体価群で, IL-10産生能は5年未満0.57 ng/mlに対して5年以上0.39 ng/ml, IFN-γ産生能は5年未満25.6 ng/mlに対して5年以上46.3 ng/ml, 低抗体価群で, IL-10産生能は5年未満

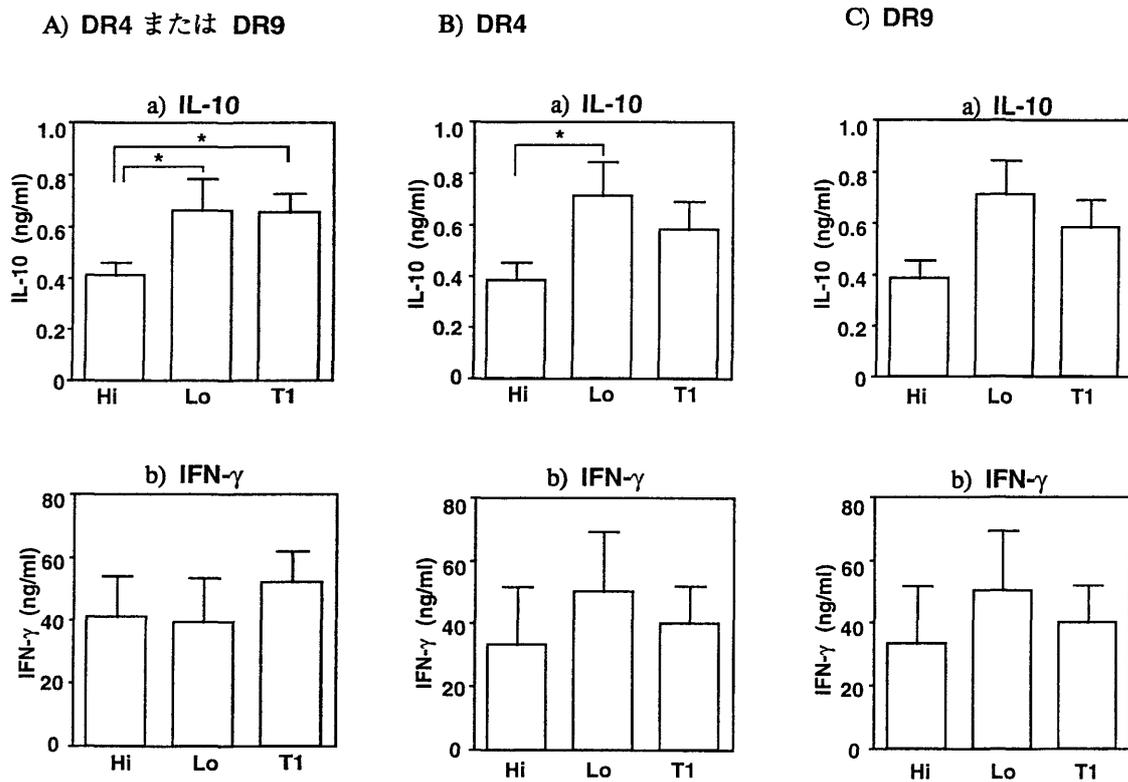
0.69 ng/ml に対して 5 年以上 0.67 ng/ml, IFN- $\gamma$  産生能は 5 年未満 44.1 ng/ml に対して 5 年以上 37.4 ng/ml と同様に有意差を認めなかった。

さらに、抗 CD3 抗体刺激では T 細胞すべてが刺激されるため、サイトカイン分泌能を検討する際には T 細胞の CD4, CD8 の占める割合に差がないことが前提となることを考慮し、末梢血 T 細胞分画につき検討した。その結果、第 3 図に示すように、高抗体価群と低抗体価群で、CD4 陽性細胞（高抗体価群 25.7% に対して低抗体価群 27.8%）、CD8 陽性細胞（高抗体価群 20.9% に対して低抗体価群 21.0%）、CD45RO 陽性 CD4 陽性細胞（高抗体価群 9.4% に対して低抗体価群 14.6%）に有意差がないことを確認した。

また、インスリン治療により PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対するサイトカイン産生能が変化するかを検討した。その結果、1 型糖尿病においては、インスリン治療 2 週

間後のサイトカイン産生能が治療前に比して、IL-10 は  $1.4 \pm 0.2$  倍、IFN- $\gamma$  は  $3.2 \pm 1.4$  倍、また 2 型糖尿病においては、IL-10 は  $1.3 \pm 0.2$  倍、IFN- $\gamma$  は  $3.6 \pm 0.9$  倍と、ともにインスリン治療によってサイトカイン産生能が亢進するという結果を得た（第 4 図）。

このためインスリン治療者に限定して PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対するサイトカイン産生能を再検討したところ、第 5 図に示すように、IL-10 産生能は、高抗体価群 ( $n=29$ ,  $0.42 \pm 0.05$  ng/ml) が低抗体価群 ( $n=26$ ,  $0.70 \pm 0.09$  ng/ml) と 2 型糖尿病 ( $n=30$ ,  $0.72 \pm 0.08$  ng/ml) に比して、有意に低値を示した（それぞれ、 $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ）。すなわち、高抗体価群は典型例の 1 型糖尿病 ( $n=36$ ,  $0.54 \pm 0.06$  ng/ml) と同レベルの、また低抗体価群は 2 型糖尿病と同レベルの IL-10 産生能を示した。IFN- $\gamma$  産生能にはやはり両群間に有意差はなかった。



第 6 図 PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対する IL-10 (a), IFN- $\gamma$  (b) の産生能の 3 群間の比較 (インスリン治療者における HLA タイプ別の検討). A : DR4 もしくは DR9 の保有者, B : DR4 保有者, C : DR9 保有者. Hi ( $n=20$  (A),  $n=13$  (B),  $n=13$  (C)) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo ( $n=14$  (A),  $n=10$  (B),  $n=6$  (C)) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群), T1 ( $n=26$  (A),  $n=16$  (B),  $n=14$  (C)) : 典型例 1 型糖尿病患者. \* $p < 0.05$ . IL-10 産生能は、DR4 もしくは DR9 の保有者および DR4 保有者で高抗体価群が低抗体価群に比して有意に低値を示し、DR9 保有者でも有意差はなかったが高抗体価群が低抗体価群に比して低値を示した。IFN- $\gamma$  産生能は、各 HLA タイプにおいて高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった。

日本人の1型糖尿病における疾患感受性 HLA タイプは DR4 および DR9 であるため、HLA タイプ別に再検討したところ、第6図に示すように、DR4 もしくは DR9 の保有者、DR4 保有者、DR9 保有者のいずれにおいても PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対する IL-10 産生能は同様の傾向が確認された。IFN- $\gamma$  産生能については、高抗体価群、低抗体価群とでやはり HLA タイプ別に分けても差を認めなかった。

2. 血清 IP-10 値の検討

4群の一部 [GAD65Ab 陽性 NIDDM 高抗体価群 (n=18), GAD65Ab 陽性 NIDDM 低抗体価群 (n=10), 典型例 1 型糖尿病患者 (n=16), 2 型糖尿病患者 (n=17)] について、血清 IP-10 値を比較した。以前、罹病期間の短い自己免疫性 1 型糖尿病において血清 IP-10 値が高いことが報告されているため<sup>17)</sup>、今回、罹病期間 10 年未満の患者に限定して検討した。血清 IP-10 値に影響を与えることが知られている慢性肝炎やその他ウイルス感染症の患者は含まれていないことを確認した。第2表に示すように、高抗体価群と低抗体価群で性別、年齢、罹病期間、HLA DR4 または DR9 の保有率 (高抗体価群 85% に対して低抗体価群 56%) には有意差を認めなかったが、IA-2A の陽性率 (高抗体価群 50% に対して低抗体価群 0%) には有意差を認めた。このため、高抗体価群において IA-2A 陽性者 (n=9) と IA-2A 陰性者 (n=9) とで血清 IP-10 値に違いがないか検討したが、陽性者は平均 150.7 (中値 34) pg/ml に対して、陰性者は平均 250.0 (中値 34) pg/ml であり有意差は認めなかった。また、インスリン治療者の割合 (高抗体価群 89% に対して低抗体価群 20%) にも有意差を認め

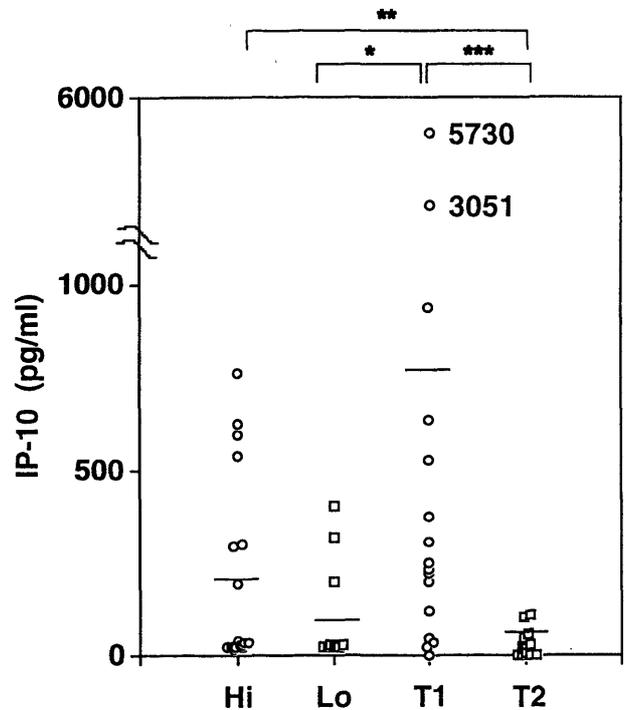
第2表 GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者 (高抗体価群, 低抗体価群; 罹病期間 10 年未満) の背景

	高抗体価群	低抗体価群
人数	18	10
性別 (男/女)	9/9	5/5
年齢 (歳)	46.5±3.7	52.5±4.8
罹病期間 (年)	3.8±0.7	2.2±0.5
IA-2A 陽性者	50% <sup>a</sup>	0%
DR4 保有者	46%	33%
DR9 保有者	69%	22%
DR4 or DR9 保有者	85%	56%
インスリン治療者	89% <sup>a</sup>	20%

平均値±標準誤差で示した。a: p<0.05 (低抗体価群に対して) GAD65Ab: 抗 GAD65 抗体, IA-2A: 抗 IA-2 抗体

たため、インスリン治療者 (n=18) とインスリン未使用者 (n=10) とで血清 IP-10 値に違いがないか検討したが、治療者は平均 169.5 (中値 34) pg/ml に対して未使用者は平均 165.1 (中値 24.5) pg/ml であり有意差は認めなかった。

第7図に示すように、高抗体価群の血清 IP-10 値 (平均 200.2 (中値 34) pg/ml) は、低抗体価群 (平均 108.9 (中値 26) pg/ml) より高い傾向を認め、2 型糖尿病患者 (平均 32.9 (中値 19) pg/ml) より有意に高かったが (p<0.01), 典型例 1 型糖尿病患者 (平均 793.0 (中値 242.5) pg/ml) とは有意差を認めなかった。一方、典型例 1 型糖尿病患者の血清 IP-10 値は、低抗体価群および 2 型糖尿病患者より有意に高かった (そ



第7図 血清 IP-10 値の 4 群間の比較 (罹病期間 10 年未満)。Hi (n=18): GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo (n=10): GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群), T1 (n=16): 典型例 1 型糖尿病患者, T2 (n=17): 2 型糖尿病患者。\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001。血清 IP-10 値は、高抗体価群が低抗体価群に比して有意差は認めなかったが高い傾向であった。典型例 1 型糖尿病患者が低抗体価群と 2 型糖尿病患者に比して有意に高値を示し、高抗体価群が 2 型糖尿病患者に比して有意に高値を示した。(Suzuki R et al: J Autoimmun 20: 83-90, 2003 の Fig. 2 より許可を得て転載)

れぞれ、 $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). 低抗体価群と 2 型糖尿病患者の血清 IP-10 値には有意差を認めなかった。以上より、高抗体価群と低抗体価群の血清 IP-10 値には違いがあると結論付けた。

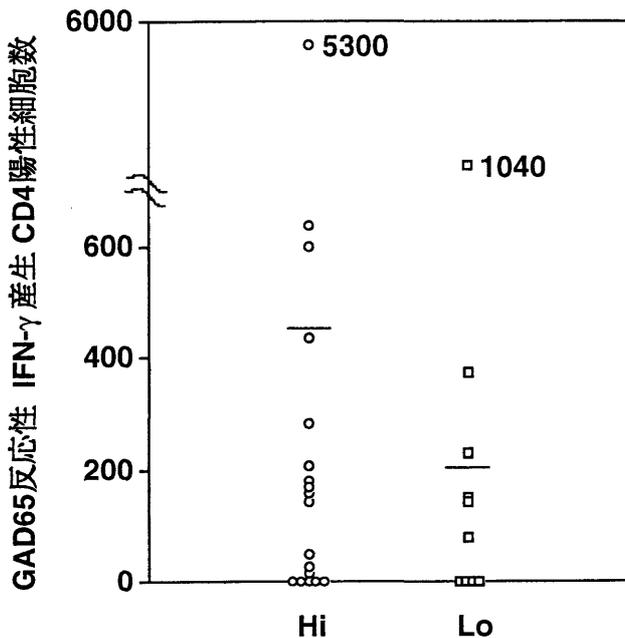
### 3. 膵 $\beta$ 細胞抗原特異的刺戟に反応する末梢血 CD4 陽性細胞数の検討

第 2 表に示した、GAD65Ab 陽性 NIDDM 高抗体価群 ( $n=18$ ) と GAD65Ab 陽性 NIDDM 低抗体価群 ( $n=10$ ) について、末梢血の GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数を検討した。抗原特異的に反応する T 細胞の検出には他に ELISPOT 法などがあり、この ELISPOT 法による検出感度は T 細胞 1,000-10,000 個に 1 個程度とされているが、Waldrop らによるとフローサイトメーターを用いた細胞内サイトカイン染色法を用いることにより CD4 陽性 T 細胞 50-1,000 個に 1 個の抗原特異的 T 細胞が検出可能であると報告されている<sup>22</sup>。今回の著者の検討では、健康人の末梢血 GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数の平均は CD4 細胞

50,000 個あたり 7.7 個であった。第 8 図に示すように、高抗体価群では低抗体価群に比して、CD4 細胞 50,000 個あたりの GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数は有意ではなかったが多くの傾向を示した (高抗体価群平均 456 個に対して低抗体価群平均 202 個)。このように高抗体価群は、血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数の両者とも、低抗体価群に比して高い傾向を示した。さらに血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数との相関について検討したところ、低抗体価群では両者の相関を認めなかったが、高抗体価群では両者に有意な正相関を認めた ( $p < 0.05$ )。以上により、血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数とが同時に高いことが、高抗体価群におけるインスリン依存状態への進行の速さに関与している可能性が示唆された。なお、今回末梢血 GAD65 反応性 IL-4 産生 CD4 陽性細胞数も測定したが、大部分の患者において検出感度以下であった。

## 考 察

GAD65Ab 陽性 NIDDM が、単に GAD65Ab が陽性というだけで抗体価にかかわらずすべて 1 型糖尿病と診断して良いかどうかは結論が出ていない。臨床的な経過からは、GAD65Ab 陽性 NIDDM の高抗体価群は、インスリン依存に進行しやすく、緩徐進行 1 型糖尿病のインスリン非依存期として良いが、低抗体価群は 2 型糖尿病として扱ってもよいのではないかと推察されている<sup>10</sup>。そこで、1 型糖尿病は大部分が T 細胞を主体とする細胞性免疫異常に基づく自己免疫疾患とされていることから、高抗体価群と低抗体価群の T 細胞機能の違いを評価することとした。今回の研究で、ポリクローナルな T 細胞の反応性を検討した結果、高抗体価群でのみ IL-10 産生能の低下が認められ、低抗体価群では認められなかった。過去のいくつか報告により、典型例 1 型糖尿病の発症に Th1/Th2 バランスの不均衡が関与していることが明らかにされている。すなわち、(1) 罹病期間の短い典型例 1 型糖尿病において phytohemagglutinin (PHA) 刺激に対する PBMC の IL-4 産生能が低下していたこと<sup>12</sup>、(2) 典型例 1 型糖尿病で PHA 刺激に対する全血の IFN- $\gamma$  産生能とその IL-4 または IL-10 産生能に対する比 (IFN- $\gamma$ /IL-4 または IFN- $\gamma$ /IL-10) が亢進していたこと<sup>13</sup>、(3) 典型例 1 型糖尿病で PHA 刺激に対する PBMC の IL-4 または IL-10 産生能の低下と長時間刺激による IFN- $\gamma$  産生能が亢進していたこと<sup>14</sup>、などがある。これらの報告はいずれも、典型例 1 型糖尿



第 8 図 GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群および低抗体価群) における GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数。Hi ( $n=18$ ): GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo ( $n=10$ ): GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群)。Y 軸は CD4 陽性細胞 50,000 個あたりの GAD65 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞数を示す。高抗体価群が低抗体価群に比して有意差は認めなかったが多くの傾向を示した。

病ではポリクローナルな刺激に対して「Th2の低下」あるいは「Th1の亢進」が特徴である、としている。今回明らかにされたIL-10産生能の低下を特徴とする高抗体価群は、典型例1型糖尿病と近い病態を有しており、低抗体価群とは異なると考えられた。IL-10はTh2細胞以外に、Th1介在免疫応答を抑制する調節性Th細胞であるTr1細胞からも産生されるサイトカインであり<sup>23)</sup>、本研究ではIL-4に関しての評価が困難であったことから、「Th2細胞の機能異常」とは断定できず、「Tr1細胞の機能異常」である可能性もあり、今後さらなる検討が必要と考えられるが、少なくともTh1を抑制するIL-10産生能の低下が高抗体価群の病態形成に関与していることが示唆された。一方で、IFN- $\gamma$ 産生能については高抗体価群と低抗体価群とで差を認めなかった。ポリクローナルな刺激による活性化では、IFN- $\gamma$ のようなTh1タイプのサイトカインは、メモリーCD4、ナイーブCD4、CD8細胞などから産生されるが、IL-10のようなTh2(もしくはTr1)タイプのサイトカインは、メモリーCD4細胞から主に産生される<sup>24)</sup>。そのため、抗CD3抗体刺激によるIL-10産生は、おそらく膵 $\beta$ 細胞抗原を含む何らかの抗原を認識したメモリーCD4細胞からのものと推察された。また、Th1タイプのサイトカインは、ポリクローナルな刺激ではなく、抗原特異的な刺激に対する反応をみるべきであり、末梢血のGAD65反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4陽性細胞数の測定を試みることにした。さらに、活性化されたTh1細胞の局所への遊走を促進させるケモカインであり、典型例1型糖尿病患者で高値を示すことが報告された血清IP-10値<sup>17)</sup>についても検討した。その結果、高抗体価群と典型例1型糖尿病における血清IP-10値は両群で有意な差を認めず、また低抗体価群と2型糖尿病の血清IP-10値についても有意差を認めなかった。一方で、高抗体価群の血清IP-10値は2型糖尿病に比較して有意に高く、また低抗体価群の血清IP-10値は典型例1型糖尿病に比較して有意に低かった。従って、局所(膵島)における病勢(膵島炎)の活動性については、高抗体価群は典型例1型糖尿病に類似しており、低抗体価群とは異なる病態であると推察された。ただし、慢性活動性肝炎において血清IP-10値が高値を示す<sup>21)</sup>ことが報告されていることから、今回の対象患者から肝炎患者を除外(HBs抗原およびHCV抗体陽性者を除外)しているものの、完全には膵島に関連した自己免疫の病態以外の原因によって血清IP-10値が高値を示している可能性を否定できないため、末梢血のGAD65反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4陽性細胞数の同時測定も不可欠と考えられた。その結果、高抗体

価群の方が低抗体価群に比してGAD65反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4陽性細胞数が多い傾向にはあるものの、両群ともにGAD65反応性CD4細胞が検出された。しかしここで重要なことは、高抗体価群においてのみ血清IP-10値とGAD65反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4陽性細胞数との間に有意な正相関を認め、低抗体価群ではこのような相関は認められなかったことである。この高抗体価群において認められた結果は、自己抗体陽性の典型例1型糖尿病において、同様に血清IP-10値とGAD65反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4陽性細胞数の有意な正相関を認めたとする報告<sup>17)</sup>と合致するものであった。このように高抗体価群のみにおいて両者が正相関した結果から、血清IP-10値は高抗体価群においてのみ膵島に関連した自己免疫反応を示すものと推察された。なお、今回、膵 $\beta$ 細胞抗原特異的的刺激としてGAD65のみを用いIA-2による検討をしなかった理由としては、GAD65は酵母によって作られたものであるのに対して、IA-2は大腸菌を用いて作られたものであり、エンドトキシン濃度が高いために非特異的な反応が検出される可能性が高いと考えたからである。本研究で用いたGAD65抗原はchromogenic assay法によってエンドトキシン濃度を測り、国際糖尿病免疫ワークショップにより問題ないとされる低濃度であることが確認されている。

膵 $\beta$ 細胞機能の残存しているGAD65Ab陽性NIDDMにおいては、インスリン依存状態への進展、すなわち緩徐進行1型糖尿病の可能性について診断することが重要である。インスリン依存状態に陥ると血糖値を良好に保つことが非常に困難となり、ひいては合併症出現の危険が高まるからである。膵 $\beta$ 細胞機能のまだ比較的保たれる早期の段階から少量のインスリン治療を開始することにより膵 $\beta$ 細胞機能の保持が可能かどうかは結論されていないが(最近、中間報告ではあるが、膵 $\beta$ 細胞機能の十分保たれた高抗体価群で、早期からのインスリン治療が膵 $\beta$ 細胞機能の保持に有効であることが確認された<sup>25)</sup>)、将来インスリン依存となる確率の高い患者群を抽出して、インスリンによる早期介入を試みる必要はあると考えられる。この際、インスリンを使用しなくてもインスリン依存にならない患者もいることを念頭に置き、不必要な介入は避ける必要がある。臨床的な経過からは、GAD65Ab陽性NIDDMにおいて、「インスリン治療への進展度」という観点でGAD65Abの抗体価のカットオフ値を検討した場合、カットオフ値を1.3 U/mlではなく10 U/mlに設定し直すべきと報告されている<sup>10)</sup>。著者の今回のGAD65Ab陽性NIDDM患者におけるT細胞機能に関する検討結果は、その報

告を強く支持するものである。低抗体価群においては、GAD65 反応性 CD4 陽性細胞が存在するものの、病勢（膵島炎）の活動性を必ずしも反映していないと考えられ、単に GAD65Ab が陽性というだけで典型例 1 型糖尿病と同様に治療されるべきではないと考えられる。高抗体価群や典型例 1 型糖尿病で認められた、膵島抗原反応性の T 細胞とそれを局所へ遊走させる IP-10 のような因子がともに同期して高値を示すことが病勢の進展に重要であると考えられる。

今回の対象において、高抗体価群と低抗体価群とで IA-2A の陽性率に有意な差を認めなかったが、IA-2A は膵β細胞の破壊と強い関連があると考えられており<sup>26)</sup>、今回の検討でも実際に低抗体価群の IA-2A 陽性患者は現在全員 (n=9) がインスリンで治療されていることから、低抗体価群であっても IA-2A 陽性患者についてはインスリン依存への進展の可能性を常に念頭に置く必要はある。また、GAD65Ab 陽性 NIDDM の自然史につき、UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) においては、インスリン依存への進展のリスクと年齢との関係が検討されており、45 歳未満では 3-6 年で高率にインスリン治療が必要となるが、45 歳以上では 3 割程度に留まることが報告されている<sup>27)</sup>。今回の検討においても実際、低抗体価群であっても 45 歳未満の患者は現在全員 (n=7) がインスリンで治療されていた。従って、低抗体価群であっても 45 歳未満の場合には早期にインスリン治療を開始する必要があることを示唆している。現状においては、GAD65 抗体価をまず確認し、IA-2A、年齢についても加味しながらインスリン依存への進行のリスクにつき予知を試みるべきではないかと考えられた。

今回の検討により、GAD65Ab 陽性 NIDDM の高抗体価群と低抗体価群において、T 細胞機能につき差異が存在することが確認された。この違いは両者の病態を考える上で非常に重要な知見であり、膵β細胞機能の残存している GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者を「細分類する」必要性を示唆しており、膵β細胞機能を保持するために介入を行う際の適応の決定に大きく寄与するものと考えられた。

## 総 括

GAD65Ab 陽性 NIDDM では、GAD65 抗体価が 10 U/ml 以上の高抗体価群は高率にインスリン依存状態へ進行するが、10 U/ml 未満の低抗体価群はインスリン非依存状態のまま経過すること多い。この両群間の病態

の差を明らかにするため、両群における T 細胞機能の差異を検討した。その結果、

1. 末梢血リンパ球をポリクローナルに刺激した際の IL-10 産生能については、高抗体価群が低抗体価群に比して有意に低値であった。
2. 血清 IP-10 値は、高抗体価群が低抗体価群より高い傾向を示した。
3. 末梢血の GAD65 反応性 CD4 陽性細胞は、高抗体価群、低抗体価群、ともに検出されたが、高抗体価群においてのみ血清 IP-10 値と GAD65 反応性 CD4 陽性細胞数との有意な正相関を認めた。
4. この GAD65 反応性 CD4 陽性細胞と血清 IP-10 値がともに高値を呈することが、高抗体価群におけるインスリン依存状態への進展に関与すると推察された。
5. GAD65Ab 陽性 NIDDM において、高抗体価群と低抗体価群との間に T 細胞機能の差異が認められ、これらの成績は過去に報告されていた両者の臨床像の違いを強く支持する結果であった。

以上は、高抗体価群においては早期にインスリンによる介入を開始し、将来の内因性インスリン分泌能の枯渇を予防し、一方、低抗体価群においてはインスリンを早期から使用せずに経過観察してもよいという GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者に対する治療（あるいは介入）方針の裏付けとなる重要な知見と考えられた。また、膵β細胞機能の残存しているこのような GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者群の「細分類」の必要性が示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し、直接御指導、御校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗講師に深謝いたします。さらに、本研究に終始、御指導、御協力いただいた埼玉社会保険病院内科丸山太郎先生に感謝いたします。また、血清 IP-10 値の測定に御協力頂いた東京大学大学院医学研究科分子予防医学教室成見正作先生に深謝いたします。

本論文は、Suzuki R, Shimada A, Maruyama T, Funae O, Morimoto J, Kodama K, Oikawa Y, Kasuga A, Matsubara K, Saruta T, Narumi S : T-cell function in anti-GAD65<sup>+</sup> diabetes with residual β-cell function. *J Autoimmun* 20 : 83-90, 2003 の一部を含む。

本論文の要旨は、第42, 43, 44回日本糖尿病学会年次学術集会 (1999, 2000, 2001年), 第98回日本内科学会講演会 (2001年), 第29, 30回日本免疫学会年次学術集会 (1999, 2000年), 第62回アメリカ糖尿病学会総会 (2002年), 第4回 Immunology of Diabetes Society Congress (1999年, イタリア) にて報告した。

文 献

- 1) Tisch R, McDevitt H : Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85 : 291-297, 1996
- 2) The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus : Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20 : 1182-1197, 1997
- 3) Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y : A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *N Engl J Med* 342 : 301-307, 2000
- 4) Kobayashi T, Tamemoto K, Nakanishi K, Kato N, Okubo M, Kajio H, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K : Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM. *Diabetes Care* 16 : 780-788, 1993
- 5) Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Mackay IR : Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adult with non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 42 : 359-362, 1993
- 6) Kobayashi T, Nakanishi K, Murase T, Kosaka K : Small dose of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive  $\beta$ -cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical features of NIDDM. *Diabetes* 45 : 622-626, 1996
- 7) Kasuga A, Maruyama T, Ozawa Y, Takei I, Falorni A, Lernmark A, Saruta T : Antibody to Mr 65,000 isoform of glutamic acid decarboxylase are detected in non-insulin-dependent diabetes in Japanese. *J Autoimmun* 9 : 105-111, 1996
- 8) Abiru N, Takino H, Yano M, Kawasaki E, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Akazawa S, Nagataki S : Clinical evaluation of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients with autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. *J Autoimmun* 9 : 683-688, 1996
- 9) Maruyama T, Kasuga A, Ozawa Y, Nagata A, Abiko F, Suzuki Y, Saruta T : Glutamic acid decarboxylase (GAD65) antibodies and insulin auto-antibodies in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J* 44 : 43-51, 1997
- 10) Kasuga A, Maruyama T, Nakamoto S, Ozawa Y, Suzuki Y, Saruta T : High-titer autoantibodies against glutamic acid decarboxylase plus auto-antibodies against insulin and IA-2 predicts insulin requirement in adult diabetic patients. *J Autoimmun* 12 : 131-135, 1999
- 11) Shimada A, Imazu Y, Morinaga S, Funae O, Kasuga A, Atsumi Y, Matsuoka K : T-cell insulinitis found in anti-GAD65<sup>+</sup> diabetes with residual  $\beta$ -cell function. *Diabetes Care* 22 : 615-617, 1999
- 12) Bermann MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldiver FJ, Dadufalza V, Buckingham BA : Decreased IL-4 production in new onset type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 157 : 4690-4696, 1996
- 13) Kallmann BA, Huther M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H : Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 46 : 237-243, 1997
- 14) Rapoport MJ, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A, Bistritzer T : Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 11 : 635-642, 1998
- 15) Shimada A, Rohane P, Fathmann CG, Charlton B : Pathogenic and protective roles of CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> cells correlate with cytokine profiles in spontaneously autoimmune diabetic mouse. *Diabetes* 45 : 71-78, 1996
- 16) Shimada A, Charlton B, Taylor EC, Fathmann CG :  $\beta$ -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067, 1996
- 17) Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S : Elevated serum IP-10 level observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 : 510-515, 2001
- 18) Maruyama T, Shimada A, Kasuga A, Kasatani T, Ozawa Y, Ishii M, Takei I, Suzuki Y, Kobayashi A, Takeda S, Matsubara K, Saruta T : Analysis of MHC class II antigens in Japanese IDDM by a novel HLA-typing method, hybridization protection assay. *Diabetes Res Clin Pract* 23 : 77-84, 1994
- 19) Homeyman MC, Harrison LC, Drummond B, Colman PG, Tait BD : Analysis of families at risk for insulin-dependent diabetes mellitus reveals that HLA antigens influence progression to clinical disease. *Mol Med* 1 : 576-582, 1995
- 20) Kasuga A, Ozawa Y, Maruyama T, Ishihara T, Amemiya S, Saruta T : Autoantibody against ICA512 did not improve test sensitivity for slowly progressive IDDM in adults. *Diabetes Care* 20 : 679-689, 1998
- 21) Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T : Expres

- sion of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 158 : 5536-5544, 1997
- 22) Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ : Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry : evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 99 : 1739-1750, 1997
- 23) Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG : A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389 : 737-742, 1997
- 24) Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C : Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159 : 197-207, 1993
- 25) Maruyama T, Shimada A, Kanatsuka A, Kasuga A, Takei I, Yokoyama J, Kobayashi T : Multicenter prevention trial of slowly progressive type 1 diabetes with small dose of insulin (the Tokyo Study) : preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 1005 : 362-369, 2003
- 26) Yamada K, Yuan X, Inada C, Hayashi H, Koyama K, Ichikawa F, Eisenbarth GS, Nonaka K : Combined measurements of GAD65 and ICA512 antibodies in acute onset and slowly progressive IDDM. *Diabetes Res Clin Pract* 35 : 91-98, 1998
- 27) Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R : UKPDS 25 : Autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 350 : 1288-1293, 1997