

令和元年9月3日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01846

研究課題名(和文) 膵関連自己抗体の早期検出法の開発と食・生活パターン解析による生活指導法の構築

研究課題名(英文) Development of an early detection method of pancreatic-related autoantibodies and construction of life guidance based on dietary and lifestyle pattern analysis

研究代表者

橋田 誠一 (Hashida, Seiichi)

徳島文理大学・大学共同利用機関等の部局等・教授

研究者番号：10156268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：従来ELISAの100-1,000倍高感度のGAD抗体やインスリン自己抗体およびIA-2抗体検出法を開発し、これらを組み合わせた2種抗体(GAD抗体およびIA-2抗体)の高感度マルチ抗体検出法を開発した。1型糖尿病患者血清では、実測値/予想値比が48～162%、的中率は28/28(100%)であった。その結果、1回の同時検出法による陽性抗体検出率が向上し、高感度マルチ抗体検出法の有用性が示唆された。また、高感度検出法の自動化装置も上市化でき、現在、これに搭載するキットの開発を行なっている。一方、コホート研究における抗体陽性者と食生活パターン解析では、特筆すべき結果は見当たらなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病や緩徐進行1型糖尿病では、発症前の早い時期に数種の膵島関連自己抗体が発現し、徐々にインスリンを分泌する膵臓細胞が破壊されることにより、最終的にインスリンの絶対的欠乏に至り発症すると考えられている。そのため、数種の膵島関連自己抗体が測られ診断されていたが、従来の酵素免疫測定法(ELISA法)では、検出感度が低いため、早期の発見または低濃度の自己抗体を検出することが困難であった。今回、報告者はこれら膵島関連自己抗体の高感度検出法や高感度マルチ抗体検出法を開発し、また、自動化機器も上市化しているため、膵臓細胞機能が残っている早期に診断・治療されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The highly sensitive antibody detection methods (ADM) for GAD, insulin and IA-2 antibody could achieve 100-1,000 times higher sensitivity than that of the conventional ELISA. Furthermore, a highly sensitive multi-antibody detection method (multi-ADM) for two antibodies (GAD antibody and IA-2 antibody) could be developed. According to this detection method, in the serum of patients with type 1 diabetes, the ratio of the measured value / expected value was 48-162%, and the predictive value was 28/28 (100%). As a result, the detection rate of positive antibodies by one simultaneous detection method was improved, suggesting the usefulness of the high sensitivity multi-ADM. In addition, a highly sensitive automatic detector has been completed and can be marketed, and a kit for highly sensitive ADMs are currently being prepared. On the other hand, no significant results were found in antibody-positive subjects and in dietary pattern analysis of cohort study samples.

研究分野：臨床化学

キーワード：1型糖尿病 緩徐進行型 膵島関連自己抗体 GAD抗体 IA-2抗体 インスリン自己抗体 高感度測定法
マルチ抗体測定法

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、インスリンを分泌する膵臓のβ細胞が破壊されることにより、インスリンの絶対的欠乏に至り発症すると考えられている。この1型糖尿病は、自己免疫疾患の1つであるとされており、1型糖尿病患者からは数種の膵島関連自己抗体(インスリン自己抗体、GAD (glutamic acid decarboxylase)抗体、IA(insulinoma-associated antigen)-2抗体等)が検出されている。糖尿病患者から膵島関連自己抗体が検出された場合は、1型糖尿病と診断される。しかし、やせ形の2型糖尿病患者の中には、発症時には膵島関連自己抗体は検出されず、食事や経口血糖降下薬により治療が可能な状態を示しているが、徐々にインスリン分泌能が低下し、平均3年でインスリン依存性糖尿病(1型糖尿病)に移行する例が見られた(2型糖尿病の10%弱程度)。この時点の患者血清中には膵島関連自己抗体が単独または重複して陽性を示しており、小林らはこのような亜型の1型糖尿病を緩徐進行1型糖尿病(Slowly progressive IDDM; SPIDDM)と名付けた。このSPIDDMは上述のように、β細胞が残存し、インスリン分泌能も若干残存しているため、β細胞障害の進行を阻止することが肝要であり、早期からインスリン少量投与が勧められている。SPIDDMの診断基準としては、まだ確立されていないが、糖尿病発症後6~12ヶ月の間、食事療法もしくは経口血糖降下剤で治療可能であること、およびGAD抗体が陽性もしくはGAD抗体、IA-2抗体、インスリン自己抗体の中から1つでも陽性であることとされている。SPIDDMの膵島関連自己抗体陽性率は、GAD抗体69%、IA-2抗体39%、インスリン自己抗体39%であり、GAD抗体はIA-2抗体、インスリン自己抗体に比べ有意に高いことが報告されている。上述の如く、GAD抗体については、SPIDDMにおいて陽性率が最も高く、1型糖尿病やSPIDDMを診断する上で大変重要な診断マーカーとされている。しかし、従来の酵素免疫測定法(ELISA法)では、検出感度が低いため、早期の発見または低濃度の自己抗体を検出することが困難であった。そのため、GAD抗体をはじめ、IA-2抗体やインスリン自己抗体に関する、新たな高感度酵素免疫測定法の開発が期待され、早期のSPIDDMの発見と、インスリン療法による早期治療が望まれていた。

2. 研究の目的

1型糖尿病やSPIDDMを高精度かつ早期に検出するために、膵島関連自己抗体を同時に検出する新規の高感度マルチ抗体(インスリン自己抗体、GAD抗体、IA-2抗体)検出法を開発する。まず、報告者らが開発した超高感度2点結合免疫複合体転移酵素免疫測定法(Immune Complex Transfer Enzyme Immunoassay; ICT-EIA法を応用し、ELISAより100-1,000倍高感度のGAD抗体やインスリン自己抗体およびIA-2抗体の高感度検出法を開発する。そして、これら3種の抗体検出法を組み合わせ、1回の測定による新規の高感度マルチ抗体検出法を開発する。さらに、これらの高感度検出法を検出できる自動検出機の開発を行う。また、これに組み込むためのこれら高感度抗体検出法のキット化も平行して行う。ついで、この検出法の有効性については、現在進行中の非介入型コホート研究の試料を用い実証をおこなう。一方、このコホート研究において抗体出現(膵障害)と食生活のパターンを解析し、別途開催している「糖尿病予防教室」での予備群に対する指導に導入し、膵障害リスクの軽減・改善のための有効な生活指導法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

二種抗体(GAD抗体およびIA-2抗体)の同時検出法の手順(図1)

血清(5 μl)に緩衝液A(95 μl)を加え、DNP標識GADとGAD標識-D-ガラクトシダーゼ、DNP標識IA-2、IA-2標識-D-ガラクトシダーゼを緩衝液Aに溶解した混合液(100 μl)に加え混合し、4℃で16時間インキュベーションし、DNP標識GAD・GAD抗体・GAD標識-D-ガラクトシダーゼからなる免疫複合体とDNP標識IA-2・IA-2抗体・IA-2標識-D-ガラクトシダーゼからなる免疫複合体を形成した。この反応液に抗DNP-IgG不溶化ポリスチレンビーズ1個を加え、0.5時間反応させ、ビーズ上に免疫複合体を捕捉した。このビーズを洗浄液(2 ml)で2回洗浄後、緩衝液Bに溶解した2 mM DNP-Lys(150 μl)と0.5時間反応させビーズから免疫複合体を溶出させた。抗DNP-IgG不溶化ポリスチレンビーズを取り除き、溶出液に抗ヒトIgG-IgG不溶化固相ポリスチレンビーズ1個を加え、さらに0.5時間反応させ、免疫複合体を転移させた。ビーズとの反応は、全て25℃で210回/分の振盪下で行った。再びビーズを洗浄液(2 ml)で2回洗浄後、ビーズに転移させた-D-ガラクトシダーゼ活性を0.2 mM 4-Methylumbelliferyl -D-galacto-pyranoside(蛍光基質:4MUG)(200 μl)を用いて30℃でインキュベーションし、0.1 Mグリシンナトリウム緩衝液(pH 10.5)(2 ml)を加え反応を停止後、蛍光分光光度計(F-2500、日立)を用いて測定した。なお、励起波長360 nm、蛍光波長450 nmを用い、蛍光強度は 10^{-8} M 4MUを100として換算した。

それぞれ個々のGAD抗体、IA-2抗体、インスリン自己抗体の検出法の手順は、2種抗体検出法と同様。

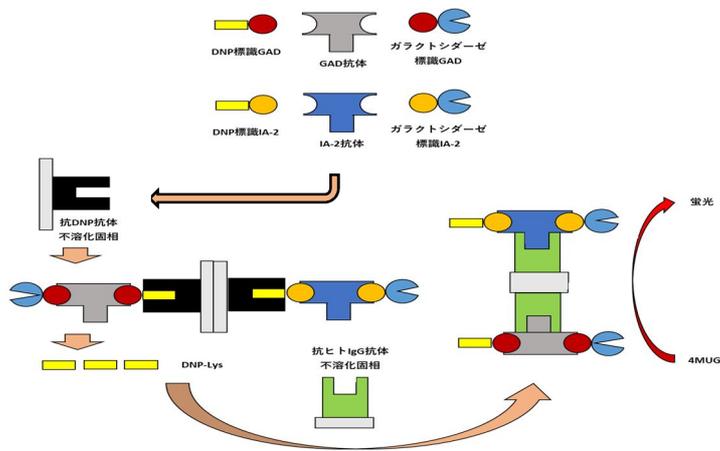


図1 二種抗体（GAD 抗体および IA-2 抗体）の同時検出法

4. 研究成果

4.1. 高感度 GAD 抗体, IA-2 抗体およびインスリン自己抗体検出法の感度

高感度 ICT-EIA（免疫複合体転移測定法）と市販 ELISA キットによる抗体の検出感度を抗体陽性者血清を用いて比較した。

高感度 GAD 抗体および IA-2 抗体検出法（ICT-EIA-I）は、市販 ELISA キットに比べ、100 倍高感度であった。また、高感度インスリン自己抗体検出法（ICT-EIA-II）は、市販 ELISA キットに比べ、1,000 倍高感度であった。

4.2. 1 型糖尿病患者における 3 種抗体（GAD 抗体, IA-2 抗体およびインスリン自己抗体）の陽性率と罹患期間による抗体陽性率の推移

76 名の若年性 1 型糖尿病患者血清中の 3 種の自己抗体（GADA、IA-2A、IAA）を高感度 ICT-EIA 法により測定した。その結果、3 種抗体のうち 1 つでも陽性であった比率は 81.6%（62/76 名） 全てが陰性であった比率は 18.4%（14/76 名）であった。それぞれの抗体では、IAA 陽性 61.8%（47/76 名） GADA 陽性 51.3%（39/76 名） IA-2A 陽性 10.5%（8/76 名）であった。内訳は、IAA のみ陽性 24.7%（19/76 名）、GADA のみ陽性 16.9%（13/76 名） IA-2A のみ陽性 1.3%（1/76 名） IAA 陽性かつ GADA 陽性 28.6%（22/76 名） IAA 陽性かつ IA-2A 陽性 3.9%（3/76 名） GADA 陽性かつ IA-2A 陽性 1.3%（1/76 名）、3 種の抗体全て陽性 3.9%（3/76 名）となった。（図 2）

罹患期間別にみると、11～20 年で陽性率は 96.2%（25/26 名） その内、IAA 陽性率 65.4%（17/26 名） GADA 陽性率 80.8%（21/26 名） IA-2A 陽性率 7.7%（2/26 名） 21～30 年で陽性率は 77.8%（28/36 名） その内、IAA 陽性率 69.4%（25/36 名） GADA 陽性率 36.1%（13/36 名） IA-2A 陽性率 13.9%（5/36 名） 31～40 年で陽性率 61.5%（8/13 名） その内、IAA 陽性率 38.5%（5/13 名） GADA 陽性率 38.5%（5/13 名） IA-2A 陽性率 7.7%（1/13 名）であった。（図 3、表 1）

3 種の抗体の中で、どれかひとつでも陽性であるものは 81.6%で罹患期間 10 年以上と長い患者であっても高い陽性率であった。個別にみると、IAA、GADA が多くの検体から検出されたが、IA-2A 単独で検出された例もあることから、3 種抗体を測定する必要性が示された。また、罹患期間別では、短期、中期、長期に渡り、IA-2A は、全体的に陽性率が低かったものの、GADA、IAA 共に高い陽性率であった。特に罹患期間 31～40 年の検体でも、いずれかの抗体が陽性であるものは 64.3%と高い陽性率であった。罹患期間が長期になるに従い抗体陽性率は低下しているが、今回 ICT-EIA 法によって抗体検出感度が上昇したことにより、抗体陽性率が向上したと考えられる。

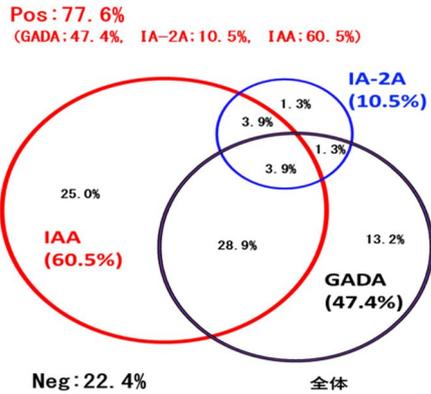


図2 3種抗体 (GADA、IA-2A、IAA) の陽性率の割合

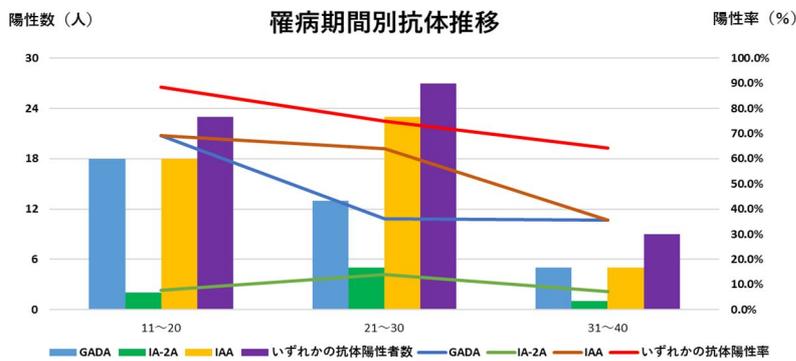


図3 罹病期間別抗体 (GADA、IA-2A、IAA) の推移

表1 患者組成と3種抗体 (GADA、IA-2A、IAA) の陽性数 (率)

| 罹病期間 | 人数 (男/女) | インスリン治療 | U-CRP | 陽性者 (率) | | | | |
|-------|-------------|---------|-------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| | | | | IAA | GADA | IA-2A | いずれか陽性 | 陰性 |
| 11-20 | 26人 (8/18) | + | 1人 | 17人 (65.4%) | 21人 (80.8%) | 2人 (7.7%) | 25人 (96.2%) | 1人 (3.8%) |
| 21-30 | 36人 (10/26) | + | 2人 | 25人 (69.4%) | 13人 (36.1%) | 5人 (13.9%) | 28人 (77.8%) | 8人 (22.2%) |
| 31-40 | 14人 (7/7) | + | 0人 | 5人 (35.7%) | 5人 (35.7%) | 1人 (7.1%) | 8人 (64.3%) | 5人 (35.7%) |
| 全体 | 76人 (25/51) | + | 3人 | 47人 (61.8%) | 39人 (51.3%) | 8人 (10.5%) | 62人 (81.6%) | 14人 (18.4%) |

4.3.1 1型糖尿病患者における2種抗体 (GAD抗体およびIA-2抗体) の同時検出法の評価

1型糖尿病患者の血清を用いて2種抗体 (GAD抗体およびIA-2抗体) の同時検出法の評価を行った。その結果、GAD抗体またはIA-2抗体のいずれも陰性の検体は、陰性と判定され、また、いずれかまたは2種抗体とも陽性の検体は陽性と判定され、良好な結果となった。また、蛍光シグナル (強度) の実測/予想は $47.8 \sim 161.9 (94.9 \pm 24.1) \%$ 、CVは25.4%であった。さらに、陰性陽性的中率は $100 (28/28) \%$ と良好な結果であった。しかし、GAD抗体、IA-2抗体共に陰性となっている検体で、予想値よりも実測値が低値を示すものがあった (図4)。

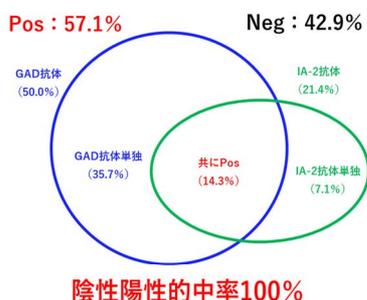


図4 2種抗体 (GADA & IA-2A)同時検出法による1型糖尿病患者血清の判定

4.4. 高感度 ICT-EIA 法の自動化装置の作成

世界で初めて、免疫複合体転移測定法 (ICT-EIA 測定法) の自動化が可能となり、GAD 抗体の検出においては、従来の ELISA 法の百倍高感度での検出が短時間(1/10 の時間)で可能となった。本技術を用いた汎用型超高感度免疫自動測定装置は、共同研究企業から上市された (図5)。



図5 全自動超高感度免疫測定装置 HI-1000

4.5. 考察

従来の ELISA 法の 100~1,000 倍高感度の GAD 抗体、IA-2 抗体及びインスリンの自己抗体の ICT-EIA 測定法を完成させた。さらに、これら 2 種 (GAD 抗体、IA-2 抗体; 保険適応) の自己抗体の同時検出法を完成させ、早期の SPIDDM の検出の準備ができた。今後は、今回の 2 種同時検出にインスリン抗体を組合せを発展させ、3 種 (GAD 抗体、IA-2 抗体及びインスリンの自己抗体)同時検出法を検証していきたいと考えている。また、超高感度免疫自動測定装置も完成し、上市化できた。今後は、上記自己抗体のキット化および上市化を行なっていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Watanabe T, Hashida S: The immune complex transfer enzyme immunoassay: Mechanism of improved sensitivity compared with conventional sandwich enzyme immunoassay; Journal of Immunological Methods. 査読(有) 459:76-80 (2018)
2. 河野友晴、沼田聡、藤本侑希、黒田暁生、安田哲行、宮下和幸、坂本扶美枝、片上直人、松岡孝昭、松久宗英、橋田誠一: IA-2 抗体の高感度検出法 (ICT-EIA 法) の開発と長期罹病若年性 1 型糖尿病患者における 3 種膵島関連自己抗体 (GADA, IA-2A, IAA) の検出について. 査読(有) 徳島文理大学紀要 第 96 号: 35-44 (2018)
3. Numata S., Umehara A., Katakami H., Inoue S. Hashida S: Development of a novel ultrasensitive enzyme immunoassay for human glutamic acid decarboxylase 65 antibody; Annals of Clinical Biochemistry. 査読(有) 53(4):495-503 (2016)

〔学会発表〕(計16件)

1. 河野友晴、藍場元弘、秦明子他; コホート研究における尿中アディポネクチンの腎障害指標の有用性に関する研究; 第 22 回日本病態栄養学会、2019 年 1 月 11-13 日、横浜
2. 藍場元弘、川東美菜、河野友晴他; 日常生活 (歩行運動及び階段運動) が食後のインスリン及び成長ホルモンの分泌に及ぼす影響; 第 22 回日本病態栄養学会、2019 年 1 月 11-13 日、横浜

3. 藍場元弘、橋田誠一、藤本侑希他；食品の単独摂取による血糖値及びインスリン分泌の検討；第65回日本栄養改善学会、2018年9月3日-5日、新潟
4. 藍場元弘、河野友晴、川東美菜他；食後における歩行運動及び階段運動による成長ホルモンの分泌；第5回日本スポーツ栄養学会、2018年7月21日-22日、京都
5. 川東美菜、藍場元弘、戎谷友希他；食後血糖値およびインスリン分泌抑制を目的とした筋肉への電気刺激の有効性の検討；第61回日本糖尿病学会、2018年5月24日-26日、東京
6. 河野友晴、沼田聡、藤本侑希他；超高感度測定法(ICT-EIA 法)による若年性1型糖尿病患者における3種の膵島関連自己抗体；第61回日本糖尿病学会、2018年5月24日-26日、東京
7. 藍場元弘、川東美菜、河野友晴他；食べる順番による血糖値及び尿中インスリン分泌量の変動-4. 野菜及び肉を先に食べる影響について；第61回日本糖尿病学会、2018年5月24日-26日、東京
8. 藤本侑希、渡辺敏弘、森本彩他；腎障害予測指標としての尿中アディポネクチンに関する検討；第21回日本病態栄養学会、2018年1月12-14日、京都
9. 小川直子、犬伏知子、松下純子他；2年間の糖尿病予防教室における栄養教育効果の検討；第64回日本栄養改善学会、2017年9月13日-15日、徳島
10. 犬伏知子、小川直子、松下純子他；糖尿病予防を目的とした炭水化物量の低減指導が骨密度に及ぼす影響；第64回日本栄養改善学会、2017年9月13日-15日、徳島
11. 藤本侑希、渡辺敏弘、森本彩他；尿中アディポネクチンの腎障害予測マーカーに関する研究；第60回日本糖尿病学会、2017年5月18日-20日、名古屋
12. 藤本侑希、藍場元弘、川東美菜他；食べる順番による血糖値及び尿中インスリン分泌量の変動 - 3. タンパク質の影響について；第20回日本病態栄養学会、2017年1月14,15日、京都
13. 犬伏知子、小川直子、南方俊継他；糖尿病予防を目的とした炭水化物摂取量低減が骨密度に及ぼす影響；第63回日本栄養改善学会学術総会、2016年9月7-9日、青森
14. 小川直子、南方俊継、犬伏知子他；糖尿病予防を目的とした炭水化物摂取量低減を継続させる栄養教育法の検討 第63回日本栄養改善学会学術総会、2016年9月7-9日、青森
15. 藤本侑希、藍場元弘、川東美菜他；食べる順番、およびタンパク質食による血糖値及び尿中インスリン濃度の変動；第63回日本栄養改善学会学術総会、2016年9月7-9日、青森
16. 濱田淳平、大沼裕、平井洋生他；THP-1 ヒト単球細胞においてツニカマイシンによる小胞体ストレスはレジスチン発現を増強する；第59回日本糖尿病学会、2016年5月13日-15日、京都

〔産業財産権〕

出願状況（計4件）

- 1.名称：Method for producing antibody reagent.、発明者：橋田 誠一、沼田 聡、種類：：方法、番号：：US20180003707A1、出願年：2018、国内外の別： USA
- 2.名称：免疫複合体転移法により被検物質を検出するための抗体試薬及びその製造方法、並びにその抗体試薬の利用、発明者：橋田 誠一、森本 彩、渡辺 敏弘、山垣内 孝博、種類：：方法、番号：：特願2016-129759、出願年：2018、国内外の別： 国内
- 3.名称：被検物質の検出方法、検出用試薬キットおよび検出用試薬、発明者：橋田 誠一、渡辺 敏弘、種類：：方法、番号：：特願2015-152795、出願年：2017、国内外の別： 国内
- 4.名称：I型糖尿病の早期診断マーカーであるGAD抗体の高感度測定法、発明者：橋田 誠一、沼田 聡、種類：：方法、番号：：PCT/JP2014/052600、出願年：2016、国内外の別： 国内