

抗ラ氏島細胞質抗体 (islet cell cytoplasmic antibodies). およびその対応抗原の性状に関する免疫化学的研究

岡山大学医学部第一内科学教室 (主任: 長島秀夫教授)

高 橋 健 二

(昭和61年11月7日受稿)

Key words: islet cell cytoplasmic antibodies (ICA)

islet cell antigens

plant lectin

Maclura pomifera agglutinin

immunoblotting

緒 言

I 型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM) 患者血中に出現する抗ラ氏島細胞質抗体^{1)~3)} (islet cell cytoplasmic antibodies: ICA) は, その発症に免疫的機序の関与を示す臓器特異的血中自己抗体であり, 診断および病態解明のために重要な抗体である。しかし, 本抗体が I 型糖尿病の発症と直接どうかかわっているかの証明はまだなく, さらに ICA をめぐる抗原抗体系についての詳細も不明の点が多く, とりわけ, ICA がラ氏島細胞質を構成するどの蛋白に対して産生されるのかもわかっていない。この抗原抗体系を明らかにすることは, I 型糖尿病の発症機構を知る上で, さらには抗原の同定は ICA の定量的な特異的高感度測定系を開発する上でも必要である。

したがって, 以上のような問題を考慮して, ICA の対応抗原蛋白の性状を解明することを目的に, その種交叉動物であるラット⁴⁾の膵ラ氏島蛋白を用いて, ICA が結合するラ氏島蛋白の抗原 peptide を明らかにし, さらに植物レクチンの一種である *Maclura pomifera* agglutinin (MPA) が結合するラ氏島糖蛋白とこの ICA との反応性について検討を行った。

材 料 と 方 法

実験動物

8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (日本クレア社) を用いた。

血清

蛍光抗体間接法¹⁾により ICA 陽性の I 型糖尿病患者血清 4 例で, 抗体価がヒト腭法で 640 倍, 640 倍, 80 倍, 80 倍であり, 同時にラット腭法⁴⁾ではそれぞれ 640 倍, 640 倍, 40 倍, 40 倍のものを使用した (Table 1)。このうち血清 4 は, Lernmark⁵⁾ に準じて膜蛍光抗体間接法で検出した islet cell surface antibodies (ICSA) が陽性であった。

ラットラ氏島蛋白の調整

以下の 2 方法によりラットの膵ラ氏島から粗抗原を得た。

1) ラットラ氏島の detergent lysates (islet lysates): ラット膵より Lacy ら⁶⁾の方法に準じて以下のごとく islet を収集した。すなわち, 2 匹のラットをネンブータル麻酔下 (0.8 ml/Kg) に開腹し, 総胆管カニュレーションより 15 ml の HANKS 液 (日水製薬) を注入して膨化させた膵の体尾部 (約 0.8 g/2 匹) を摘出し, 小ハサミで細切したのち, collagenase (Boehringer

Table 1 Patient sera

serum No.	patients		titer of ICA on the pancreas of		ICSA
	age	sex	human	rat	
1	19	female	1:640	1:640	-
2	28	female	1:640	1:640	-
3	15	female	1:80	1:40	-
4	29	female	1:80	1:40	+

Mannheim 社) 20 mgを細切臍全量に混じ, 37℃の水浴中で12分間激しく用手振盪して十分外分泌部を消化させた. この消化させた臍に HANKS による洗浄と遠沈 (1500 rpm, 30秒間) をくり返し加え, 最後の pellet より stereomicroscope 下に単離された islet を収集した. この方法で1回の実験当たり平均約200ケの islet を得た. 次の段階で使用するまで20% fetal bovine serum (Flow Labo.), 10% dimethyl sulfoxide-HANKS 液中に-80℃で凍結保存⁷⁾した. 次に, 凍結保存中の islet 約1000ケを急速解凍し, 20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4 (TBS) で3回洗浄の後, ガラス製ホモジナイザー (1 ml, WHEATON 社) で1200 rpm, 5分間 homogenize し, 遠沈した pellet に400 μ l の0.5% TritonX-100-TBS を加え, 傾斜回転器 (第一ラジオアイソトープ社) で4℃, 一夜, 60 rpm 回転させて蛋白を抽出した. この抽出液を12000 rpm, 5分間遠沈した上清をラ氏島可溶性蛋白溶液 (islet lysates) とした.

2) MPA レクチン結合性糖蛋白 (MPA lectin-binding glycoproteins: MPA-GP) の精製: ラットラ氏島細胞と結合する種々の植物レクチンのうち, ラ氏島に特異的な結合性のある MPA レクチン (Fig. 1) を ligand に用いた affinity chromatography 法により以下のごとく MPA-GP を得た. ラット1匹分の臍に5.0 ml の0.5% TritonX-100-TBS を加え homogenize し, 4℃一夜さきの傾斜回転器を用いて蛋白を抽出し, この1200 rpm, 5分間の遠沈上清を1回当たり0.5 ml ずつ MPA-agarose (E. Y. 社) カラム (bed volume 2.0 ml) に apply し, TBS を用いて洗浄したのち0.3 M D-galactose (MERCK 社) を含有する0.05% TritonX-100-TBS で結合した

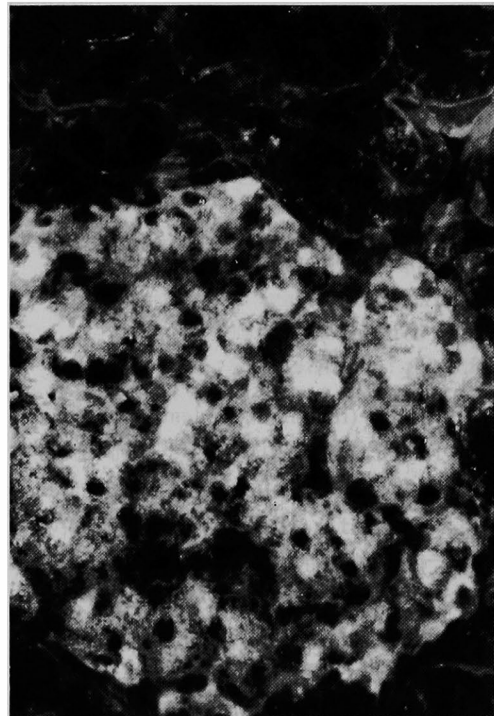


Fig. 1 Rat pancreas cryostat section (acetone-fixed) stained with FITC-labeled MPA (E. Y. Labo., diluted in 1:4 with PBS). Bright fluorescence of islet cells is seen, whereas no fluorescence of acini is visible (400 $\times$).

糖蛋白を溶出し, これをくり返した. この溶出分画を限外濾過 (TOYO, UH-1) を用いて濃縮して全量600 μ l とし, これを MPA-GP として次の実験に供した.

ICA 陽性血清の吸収操作

以下の2方法で ICA 陽性患者血清の吸収操作を行った.

1) 被検血清 (血清 1) 100 μ l に対し rat acetone liver powder (Sigma 社) 20 mg [0.01M リン酸緩衝食塩液, pH 7.4 (PBS) を用いてあらかじめ湿潤状態にしておく] を混じ, 室温で 2 時間振盪して吸収操作を行い, 12000 rpm, 5 分間遠沈してその上清を用いた.

2) 前述した方法によりラット臍より得た 100 ケの単離 islet をさらに Lernmark の方法⁹⁾により分散細胞とし, これを 55°C, 30 分間非働化した被検血清 (血清 3) 100 μ l と混ぜ, 37°C, 1 時間 incubate して吸収操作を行った.

SDS-PAGE と immunoblotting 法

1) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE): これは Laemmli ら¹⁰⁾の方法によった. すなわち, islet lysates または MPA-GP の粗抗原蛋白溶液に同量の 1.25% 2-ME, 2.5% SDS-Tris-HCl (pH 6.8) を加え, 95°C, 5 分間加熱処理したものを試料とした. これを 1 孔当り 50 μ l ずつ入れ, 30mV, 4 時間の条件で電気泳動し 15% 分離ゲルに蛋白を展開した. 泳動後, ゲルの 0.25% Coomassie brilliant blue R (Sigma 社) 染色または銀染色 (銀染色キット, 第一化学薬品) を行って泳動パターンを観察した.

2) Immunoblotting 法: Towbin ら¹¹⁾の方法に準じ immunoblotting (Western blotting) を行った. すなわち, さきの SDS-PAGE の終えたゲルを 1 孔幅毎に切断し, nitrocellulose 膜 (Trans-Blot[®], BioRad 社) と密着させ LKB Transphor 装置で 90 V, 350 mA, 4°C, 16 時間の条件で蛋白を膜面に転写した. 転写の終えた nitrocellulose 膜を, 3% bovine serum albumin (BSA) 含有 TBS 中で未反応膜面を室温で 30 分間 block したのち, 吸収または未吸収の被検血清 (1% BSA-TBS で 50 倍に希釈) と 4°C, 一夜反応させた. 反応終了後, nitrocellulose 膜を TBS で洗浄し, peroxidase 標識抗ヒト IgG (DAKO 社, 1% BSA で 1000 倍に希釈) と室温で 1 時間反応させ, 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.05% H₂O₂ を含む TBS 中で発色反応を行った. band の発色が薄いものについては, 0.5% オスミウム酸で enhance した. なお, marker proteins (Pharmacia 社) は, 同一条件で同時に nitrocellulose 膜へ転写のの

ち, 0.1% amid black 10B (Sigma 社) で染色し, peptide band の分子量計算に供した.

MPA-GP と ICA 陽性血清との反応性

1) MPA-GP による ICA の吸収試験: MPA-GP 溶液 100 μ l 中の含有蛋白を 1% para-formaldehyde-saturated NH₄(SO₄)₂ 水で沈澱させ, 遠沈した pellet を PBS で洗浄したのち, 同じく PBS で 5 倍希釈した被検血清 (血清 1) 40 μ l と混じ, 室温で 1 時間静置して吸収操作を行った. この吸収血清の PBS による 5 倍毎の希釈系列を, ラット臍新鮮凍結切片 (5 μ m) と蛍光抗体間接法により反応させて, ラ氏島の特異蛍光を観察し, 同時に行った未吸収血清との反応と比較した.

2) FIA analyser による MPA-GP を抗原とした ICA 検出の試み (Fluoroimmunoassay: FIA 法) (Fig. 2): MPA-agarose (E. Y. 社) にラットラ氏島蛋白を結合させ, これを固相化抗原とする ICA の検出方法を試みた. そのシェーマを Fig. 2 に示す. 方法は, MPA-agarose の PBS 懸濁液 (20V/V%) を 1 検体当たり 150 μ l ずつシオノギ tube にとり, これにラット臍の 0.5% TritonX-100-PBS による抽出蛋白溶液 100 μ l を加え, 37°C 30 分間 incubate ののち, 5.0ml の 0.05% NonidetP-40 (NP40), 0.5% BSA-PBS で 2 回洗浄し, 次に ICA 陽性または陰

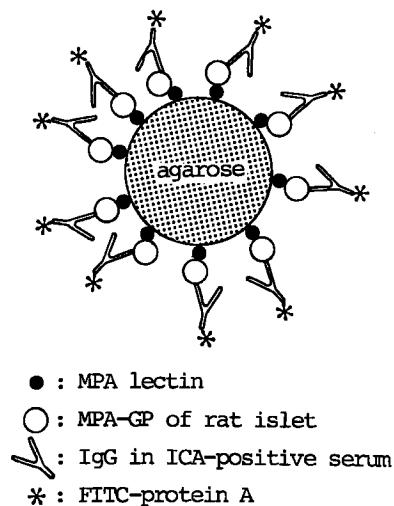


Fig. 2 Schema of method for detecting ICA using MPA-GP.

性の糖尿病患者 (IDDM) 血清 (PBSで5倍に希釈) を $50 \mu\text{l}$ 加えて 37°C 30分間 incubate し、同様に洗浄後、FITC 標識 protein A (Pharmacia 社, $1.7 \mu\text{g}/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}$ を加え同様の incubation, 洗浄を行い、最後に 2.0 ml の NP40-PBS を加えて各検体の蛍光を FIA analyserTM (BioRad 社) でカウント (fluoro photon count, FPC) した。同時に健常人血清についても同様の測定を行った。各群間の有意差検定は Student t-test で行った。

成 績

SDS-PAGE, immunoblotting の結果

islet lysates の泳動パターンの Coomassie 染色では、約 120 K dalton (Kd) より 25 Kd にかけて $24 \sim 26$ 本の peptide bands が認められた (Fig. 3)。この抗原蛋白と4例の被検血清との immunoblotting の結果、血清1では 59 Kd ,

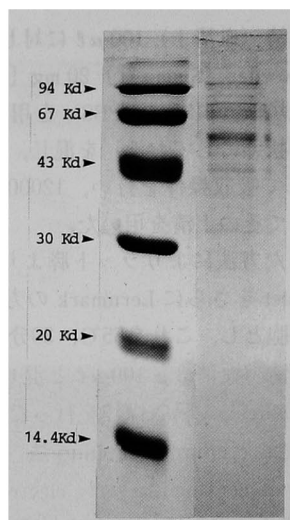


Fig. 3 SDS-PAGE of detergent lysates of rat islets. Left showed marker proteins of 94 Kd through 14.4 Kd . Staining with Coomassie brilliant blue R was performed.

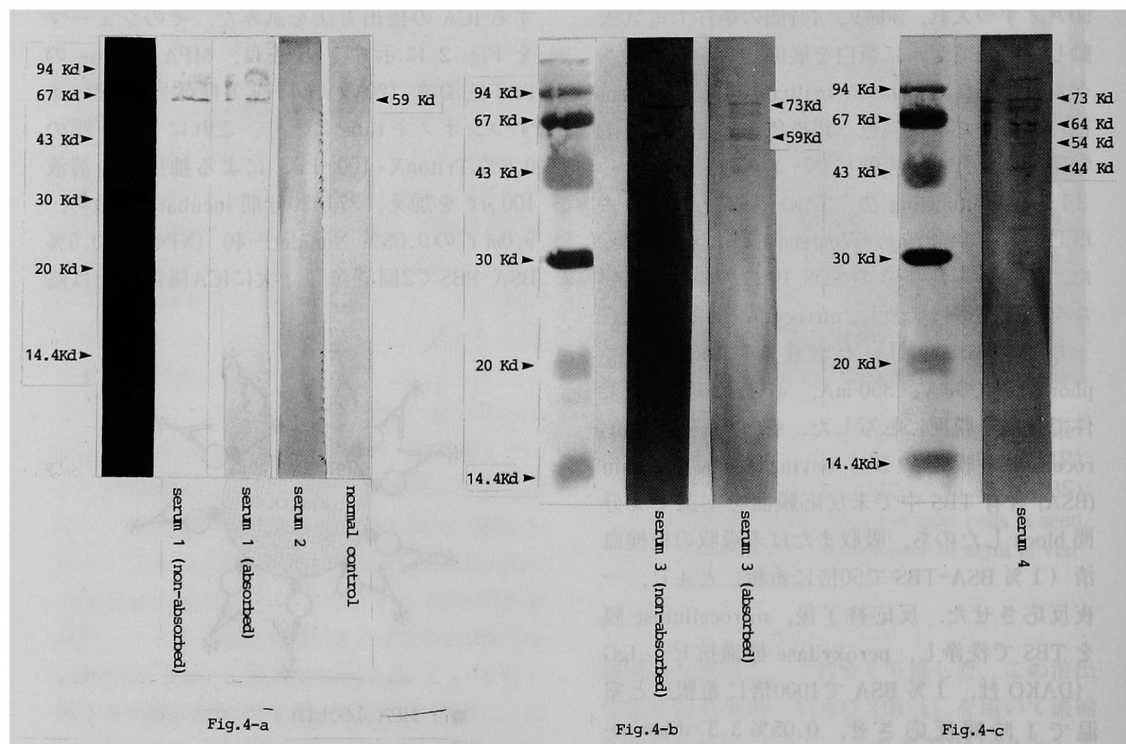


Fig. 4 Immunoblotting of ICA-positive sera using rat islet lysates.

Serum 1 (absorbed and non-absorbed), serum 2 and normal control (Fig. 4-a), serum 3 (absorbed, non-absorbed) (Fig. 4-b) and serum 4 (Fig. 4-c) were shown. No. of sera were same as in Table 1. Proteins (94 Kd through 14.4 Kd) for showing molecular weight reference were transferred on nitrocellulose membrane by same procedure as for islet lysates, and stained with 0.1% amide black 10B.

Table 2 Molecular weight (MW) of proteins reacted with 4 ICA-positive patient sera

serum No.	ICA titer (rat)	ICSA	MW of peptide(Kd)
1	1:640	-	59 (59)*
2	1:640	-	-
3	1:40	-	73,59 (73,59)**
4	1:40	+	73,64,54,44

* () shows MW after absorption with acetone liver powder of rat.

** () shows MW after absorption with viable cells of rat islets.

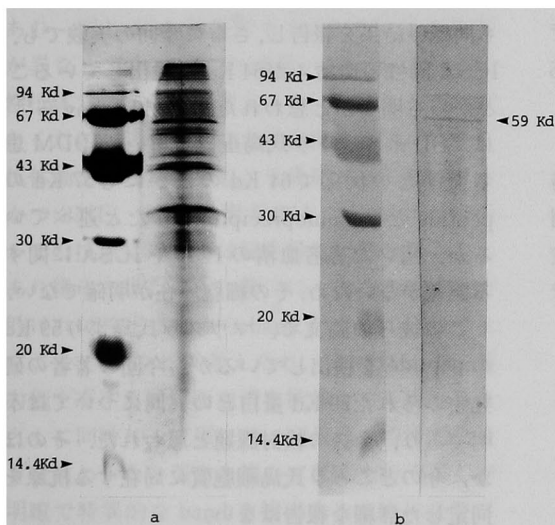


Fig. 5 SDS-PAGE and immunoblotting analysis of MPA-GP.

Silber staining of MPA-GP and marker proteins after SDS-PAGE was shown (a).

In (b), right showed immunoblotting pattern of ICA-positive serum (serum 1 in Table 1) against MPA-GP on membrane, and left showed marker proteins on membrane stained with 0.1% amide black 10B.

Table 3 Absorption test of ICA with MPA-GP

dilution serum	1:5	1:25	1:125	1:625
non-absorbed	++	++	++	+
absorbed	++	+	±	-

The test was performed by the method of indirect immunofluorescence using cryostat sections of rat pancreas. The serum used in this test was serum 1 shown in Table 1.

Fluorescent intensities of islet cells were showed as (++)~(-); (++)strong, (+)moderate, (±)weak and (-)negative fluorescence, respectively.

血清 3 では 73, 59 Kd, 血清 4 では 73, 64, 54, 44 Kd の peptide bands がそれぞれ認められた。血清 2 では band の出現がなかった。血清 1 を acetone liver powder で、さらに血清 3 を islet viable cells で吸収を各々行った場合も陽性 bands に変化はなかった。健常人血清との反応では band は認められなかった (Fig. 4-a, b, c)。Table 2 に結果の一覧を示した。

MPA-GP の銀染色では多数の bands が認められ、この peptide bands と血清 1 との反応では 59 Kd に band が検出された (Fig. 5-a, b)。

MPA-GP による ICA の吸収試験の結果

血清 1 を吸収試験に用いて、蛍光抗体間接法でラ氏島の特異蛍光を観察した。未吸収血清では 625 倍まで陽性であったが、吸収血清では 125 倍で弱陽性、625 倍で陰性であった (Table 3)。

MPA-GP を用いた FIA 法の結果 (Fig. 6)

Table 1 の 4 血清を含む IDDM 患者の ICA 陽性血清 6 例、ICA 陰性 6 例及び健常人血清 6 例を測定した結果は、陽性群は 258×10^3 FPC、陰性群は 185×10^3 FPC、健常群は 105×10^3 FPC であった。各群間で 5 % の危険率で有意差を認め、ICA 陽性群は陰性群より高値であった。

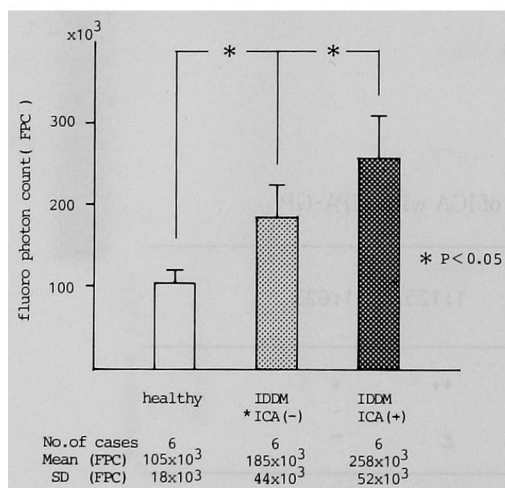


Fig. 6 Result of FIA detecting ICA-positive or -negative sera using FIA analyser (BioRad).

*ICA were examined by indirect immunofluorescence technique on the rat pancreas sections.

考 察

発症早期の I 型糖尿病 (IDDM) 患者血清は、免疫沈降法によりヒトあるいは嚙歯目の豚ラ氏島蛋白と immunoprecipitation を形成することが Baekkeskov ら¹²⁾ によって報告されている。その抗原蛋白の分子量は主に 64 Kd であるとしているが、その細胞局在については検討されていない。彼らの、BB ラット血清を用い同様の方法で行った研究¹³⁾では、64 Kd の band を検出した血清は、ICSA 陽性、ICA 陰性であることから、この 64 Kd 蛋白は islet cell surface に局在することが考えられた。また、松葉ら¹⁴⁾も同様の結果を報告し、さらに今回の実験でも、ICSA 陽性の血清 4 が 64 Kd を検出していることから明らかと思われた。Baekkeskov ら¹⁵⁾は、SD 系ラットラ氏島蛋白を用い、IDDM 患者血清との反応で 64 Kd のほかにも 57 Kd の peptide と immunoprecipitate したと述べているが、用いた患者血清の ICA や ICSA に関する記載がないため、その細胞局在が明確でない。

この彼らの論文で、マウスラ氏島より 59 Kd の peptide を検出しているが、今回の著者の研究中みられた 59 Kd 蛋白との異同については不明であり、今後の検討課題と思われた。そのほか、今のところラ氏島細胞質に局在する抗原を同定した詳細な報告はない。

本研究で、ラット islet の detergent lysates との反応では、4 例の ICA 陽性血清が 73, 64, 59, 54, 44 Kd の合計 5 種類の分子量を有する peptides を認識した。bands の出現の仕方は一様でなく血清間で異なった。これらの peptides のうち、55 Kd は細胞一般に広く存在する細胞骨格蛋白 (cytoskeletal protein) の 1 つである tubulin と、44 kd は actin と分子量が一致し、さらに 73 Kd も Baekkeskov ら¹³⁾によればその一種であろうと述べ、これら 3 種の非特異的蛋白に注意を喚起している。なお、このうち 73 Kd 蛋白に関しては、Leiter ら¹⁶⁾が、糖尿病を呈する db/db マウスにおいては豚 B 細胞内に 73 Kd 蛋白が増加し、これはインスリン分泌顆粒に関連した蛋白であることを免疫電顕的観察で述べており、糖尿病の成因との関連性

を合わせて指摘している。しかし、この抗原と、ICA などラ氏島関連抗体との反応性については未検討であり今後課題が残された。

今回検出された5種類の peptides のうち、64 Kd は前述のごとく ICSA に関連した蛋白であると考えられた。一方、59 Kd は、4 血清のうち2血清に共通して認められ、血清を acetone liver powder あるいはラ氏島分散生細胞で吸収してもなお検出されることから、細胞骨格蛋白ともラ氏島細胞膜表面抗原とも細胞局在の異なる peptide で、ラ氏島細胞質内の ICA に特異的な蛋白であろうと考えられた。しかし、ICA 陽性でもこの band が認められない血清もあり、同じ ICA 陽性でも band の出現の仕方が異なっていた。これは第一に、ICA が多様性抗体であるためと考えられ、血清1と2のごとくたとえ切片を用いた蛍光抗体間接法で同じ抗体価を有していても、ラ氏島から抽出され、かつ2ME、SDS 処理を加えた peptides レベルでの抗原に対しては反応態度に差の出ることあり得ると思われた。第二に、血清の抗体価が低ければ検出感度から band が十分に染色されてこない¹³⁾ことが考えられ、その点から、高力価を有する新鮮な血清を抗体として用いるとともに同時に、抗原には一定量以上の可能な限り変性の少ない蛋白を用いて反応を行うことが明瞭で特異的な band を検出するために必要であることが示唆された。

本研究で行った SDS-PAGE, immunoblotting 法による抗原蛋白の解析法は、全 peptides の分子量と相対濃度が一度に観察される利点を有し、抗原解析に極めて有用な手段であるが、実施に当っては非特異的な peptide の介入に対して十分な注意が必要であった。とくに粗抗原に全細胞あるいは全臓器を用いる場合は細胞骨格蛋白などの非特異的な band の出現に対して検討を必要とすることが示唆された。なお、tubulin の特異性に関し、Rousset ら¹⁷⁾が、ラット脳より精製した tubulin を抗原に用いて SDS-PAGE, immunoblotting 法を行い、I 型糖尿病患者血清では有意に抗 tubulin 抗体活性が高く、I 型糖尿病における新しい自己抗体としての意義を主張したが、著者らの検討（未

発表）では健常人血清でも tubulin と思われる 54Kd の band を検出することがあり、必ずしも特異性を認めなかった。

最近、シアル酸を残基にもつ糖蛋白が ICA の標的抗原ではないかとの報告¹⁹⁾がなされ、ラ氏島細胞質内糖蛋白抗原の存在が ICA との関連で注目されている。いくつかの植物レクチンが豚ラ氏島糖蛋白と結合する^{8,19,20)}ことはすでに知られており、そのうち MPA は、ラットラ氏島細胞質と特異的な結合性を有し、外分泌細胞とは結合しない⁸⁾。したがって今回の研究でも、MPA-agarose ゲルカラムを用いた affinity chromatography 法で、ラット豚の可溶性蛋白よりラ氏島の MPA-GP を得ることができた。この蛋白は銀染色で多数の peptides に分かれたが、このうち59 Kd の peptide と ICA が結合した。さらに、この MPA-GP によって ICA が吸収されることが確認されたことより、ラ氏島可溶性蛋白中の59 Kd 蛋白と MPA-GP 中の59 Kd 蛋白は同一の peptide であり、したがって ICA の対応抗原である59 Kd 蛋白は MPA 結合性を有することが示された。

MPA-GP を固相化抗原として行った FIA 法で、ICA 陽性群が陰性群に比して有意に高値を示した。しかし、陰性群の中にもかなり高い値を示した症例もあり、MPA-GP が粗抗原であることから ICA とは別の非特異的結合の存在を示していた。今後、より多数例の血清について FIA 法を行い、I 型糖尿病の病態や ICA の抗体価との関係も含めて検討することが、この検査法を実際に臨床に応用するために必要であると考えられた。

ICA の対応抗原の性状の一端は今回解明されたが、その細胞組織局在の詳細はなお不明である。その局在はラ氏島細胞質内のミトコンドリア、マイクロゾームあるいはインスリン分泌顆粒等の細胞内小器官の inner membrane が考えられている²¹⁾がまだその証明はない。今後、今回の SDS-PAGE, immunoblotting 法に加え、subcellular fraction による各種吸収試験²²⁾さらには免疫電顕的観察による解析などが必要と考えられた。

結 論

SD 系ラット膵のラ氏島細胞可溶化蛋白と MPA レクチン結合性糖蛋白 (MPA-GP) の二種を粗抗原とし, ICA 陽性血清と結合する peptides を SDS-PAGE, immunoblotting 法により解析し, さらに FIA 法による ICA 測定法の開発を試みた。

その結果, ラット膵ラ氏島蛋白における ICA の対応抗原の 1 つは 59 Kd の分子量を有する peptide であることがわかった。また, この peptide は MPA レクチン結合性を有するとともに, ICA 自身にも多様性が存在した。さらに, MPA-GP を固相化抗原とした ICA の FIA 法

による簡易測定法が開発可能なことがわかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲をいただいた岡山大学医学部第一内科学教室長島秀夫教授ならびに御援助と励ましをいただいた岡山大学保健管理センター所長山吹隆寛教授に深謝いたします。また, 終始直接御指導をいただいた同センター辻孝夫助教授に心より謝意を表します。

本論文の要旨は第27回および第29回日本糖尿病学会総会において発表した。

文 献

1. Bottazzo GF, Florin-Christensen A and Doniach D: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2 (1974) 1279-1282.
2. MacCuish AC, Barnes EW, Irvine WJ and Duncan LJP: Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with co-existent autoimmune disease. *Lancet* 2 (1974) 1529-1531.
3. Lendrum R, Walker G, Cudworth AG, Theophanides C, Pyke DA, Bloom A and Gamble DR: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* 2 (1976) 1273-1276.
4. 高橋健二: 抗ラ氏島細胞質抗体 (islet cell cytoplasmic antibodies) とその対応抗原の種交叉性に関する免疫組織学的研究. 糖尿病 (投稿中)
5. Lernmark Å, Freedman ZR, Hofmann C, Rubenstein AH, Steiner DF, Jackson RL, Winter RJ and Traisman HS: Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N Engl J Med* (1978) 299, 375-380.
6. Lacy PE and Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* (1967) 16, 35-39.
7. 大野進: ラット膵ランゲルハンス氏島の凍結保存に関する実験的研究 (形態学的観察と生物学的機能維持). 日外会誌 (1979) 80, 611-626.
8. Tsuji T, Yamaguchi H, Yamabuki T, Takahashi K, Matsuura K and Naito K: Binding of islet cell cytoplasmic antibody from insulin-dependent diabetes mellitus patients and plant lectin (Maclura pomifera agglutinin) to pancreas islet cells. *Jpn J Allergol* (1986) 35, 988-992.
9. Lernmark Å: The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* (1974) 10, 431-438.
10. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) 227, 680-685.
11. Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76, 4350-4354.
12. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J and Lernmark Å: Autoantibodies in

- newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* (1982) 298, 167-169.
13. Baekkeskov S, Dyrberg T and Lernmark Å: Autoantibodies to a 64-Kilodalton islet cell protein precede the onset of spontaneous diabetes in the BB rat. *Science* (1984) 224, 1348-1350.
 14. 松葉育郎, 中村富美男, 白沢信行, 鶴岡明, 森豊, 石井賢治, 山田治男, 種瀬富男, 石川博, 池田義雄: インスリン依存性糖尿病の成因に関する研究 — 膵島細胞膜抗体の認識する抗原の検討 —. *糖尿病* (1986) 29, 261-265.
 15. Baekkeskov S and Lernmark Å: Rodent islet cell antigens recognized by antibodies in sera from diabetic patients. *Acta Biol Med Germ* (1982) 41, 1111-1115.
 16. Leiter EH and Kuff EL: Intracisternal type A particles in murine pancreatic B cells: immunocytochemical demonstration of increased antigen (p73) in genetically diabetic mice. *Am J Pathol* (1984) 114, 46-55.
 17. Rousset B, Vialettes B, Bernier-Valentin F, Vague P, Beylot M and Mornex R: Anti-tubulin antibodies in recent onset Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: comparison with islet cell antibodies. *Diabetologia* (1984) 27, 427-432.
 18. Nayak RC, Omar MAK, Rabizadeh A, Srikanta S and Eisenbarth GS: Cytoplasmic islet cell antibodies: evidence that the antigen is a sialoglycoconjugate. *Diabetes* (1985) 34, 617-619.
 19. Maylié-Pfenninger M-F and Jamieson JD: Distribution of cell surface saccharides on pancreatic cells: II. lectin-labeling patterns on mature guinea pig and rat pancreatic cells. *J Cell Biology* (1979) 80, 77-95.
 20. 高橋健二, 辻孝夫: 抗ラ氏島抗体に対する対応抗原と MPA レクチン結合性糖蛋白の異同性. *消化器と免疫* No. 13, 医歯薬出版, (1984) 90-95.
 21. Lernmark Å and Baekkeskov S: Islet cell antibodies — theoretical and practical implications. *Diabetologia* (1981) 21, 431-435.
 22. Nerup J and Lernmark Å: Autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* (1981) 70, 135-141.

Immunochemical Studies of Islet Cell Cytoplasmic Antibodies (ICA) and Characteristics of Their Target Antigens

Kenji TAKAHASHI

The First Department of Internal Medicine, Okayama University

Medical School, Okayama 700, Japan

(Director: Prof. H. Nagashima)

In the present study, the antigen proteins of Sprague-Dawley rat pancreas islets recognized by islet cell cytoplasmic antibodies (ICA) cross-reactive with rat islets were characterized. A detergent lysate of rat islets (islet lysate) and *Maclura pomifera* agglutinin-binding glycoprotein (MPA-GP) of rat pancreas were used as antigen sources. Reactivities of these two crude antigen proteins against 4 ICA-positive sera from patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus (IDDM) were examined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting, and by fluoroimmunoassay (FIA).

Two of the 4 ICA-positive sera specifically bound a peptide of 59kdalton (Kd) from islet lysates. This peptide was detected even after absorption of sera with rat acetone liver powder or viable rat islet cells. One serum sample was examined for reactivities to MPA-GP, and the serum bound a peptide of 59Kd from MPA-GP. In an absorption test of the serum with MPA-GP, decreased specific fluorescence of rat pancreas islets was shown by an indirect immunofluorescent technique. The binding activity of MPA-GP to ICA-positive sera measured by the FIA method was higher in the ICA-positive sera than in the ICA-negative sera.

It was concluded that a peptide of 59Kd is one of the target antigen proteins of ICA, and that the peptide has binding activity with MPA. It was suggested that ICA can be measured by the FIA method using MPA-GP. It was also suggested that ICA in sera from Type 1 diabetic patients is heterogenous and that the target antigen is polyvalent.