

제1형 당뇨병 환자에게서 radioligand binding assay, 면역방사계수측정법 및 방사면역측정법에 의한 GAD 항체의 측정

영남대학교 의과대학 내과학교실, 계명대학교 의과대학 내과학교실¹

윤지성 · 김재홍 · 오정현 · 남상엽 · 박진철 · 윤현대 · 원규장 · 조인호 · 이인규¹ · 이형우

서 론

제1형 당뇨병은 체장 소도의 만성적 베타 세포파괴를 특징으로 하는 T-cell 매개성 자가면역성 질환으로 유전적 감수성 및 각종 환경 요인 등이 발병에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 제1형 당뇨병에서 나타나는 자가항체로는 인슐린 자가항체(insulin autoantibodies, IAA)²⁾, 체장소도 세포질항체(islet cell antibodies, ICA)³⁾, GAD(glutamic acid decarboxylase) 항체⁴⁾ 및 IA-2 항체⁵⁾ 등이 있다. 이 중 간접면역형광법을 이용한 ICA는 제1형 당뇨병의 진단 및 고위험군의 예측에 전통적으로 많이 사용되고 있는 방법이나, 반정량적이고 각 실험실마다 검사의 표준화와 재현성에 다소 문제가 있다고 한다^{6,7)}. 이에 비해 GAD 항체는 일부 환자에게서 ICA가 발견 되기전에 먼저 나타남으로, 제1형 당뇨병 발병 당시의 지표로 ICA보다 예측력이 더 좋다는 보고도 있어, 제1형 당뇨병의 진단 뿐만 아니라 당뇨병 발병 위험성의 사전 평가에 유용한 표지자로 최근 관심의 대상이 되고 있다^{8,9)}. 또한 GAD 항체는 당뇨병 발병 후 오랜기간 양성을 유지함으로, 지진성 인슐린의존형 당뇨병 환자의 초기 진단에도 유용하게 이용될 수 있다고 한다¹⁰⁾. GAD 항체 측정에는 enzymatic immunoprecipitation

assay (EIP), radioligand binding assay (RBA), 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA), 면역방사계수측정법 (immunoradiometric assay, IRMA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence 및 Western blotting 등의 여러 방법들이 있다. 이러한 여러 방법에 따른 GAD 항체의 유병률은 다양하며, GAD 항체 측정 방법간의 민감도 및 예민도 등도 다양한 것으로 알려져 있다⁸⁾. 전통적으로 이용되고 있는 면역침전법에 의한 GAD 항체의 측정은 검사 시간이 오래 걸려 선별검사로는 다소 문제가 있어 간편하고 재현성이 있는 RBA가 널리 사용되고 있으며, 최근에는 ¹²⁵I-labelled human recombinant GAD를 이용한 RIA와 IRMA도 GAD 항체 측정에 사용되고 있다^{8,11)}.

저자들은 한국인 소아 제1형 당뇨병 환자에게서 RBA, IRMA 및 RIA를 이용한 GAD 항체의 유병률을 측정하고, ICA 역가와 측정 방법에 따른 GAD 항체 빈도의 연관성을 관찰하고, RIA 및 IRMA에 의한 GAD 농도와 RBA에 의한 GAD index의 연관성을 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

한국인 소아 제1형 당뇨병 환자 26명(남자 10명, 여자 16명, 평균 연령 14세)과 정상 대조군 10명(남자 5명, 여자 5명, 평균 연령 15세)을 연구 대상으로 하였다. 진단 기준은 공복시 혈청 C-펩타이드농도가 0.2

접수일자: 1999년 5월 18일

통과일자: 1999년 6월 8일

책임저자: 이형우, 영남대학교 의과대학 내과학교실

* 이 논문은 1997년도 천마의학재단 연구비 지원에 의한 것임

nmol/L미만인 경우를 제1형 당뇨병으로 하였으며, 발병 후부터 혈당 조절을 위해 인슐린을 필요로 하였으나, 공복시 혈청 C-펩타이드농도가 0.2 nmol/L 이상인 경우도 제1형 당뇨병에 포함시켰다.

2. 방법

1) 체장소도 세포질항체 (cytoplasmic islet cell antibodies, ICA)의 측정

O형 혈액형을 가진 환자로부터 얻은 사람의 체장을 절제한 후 즉시 액체질소를 이용하여 냉동보관하고 필요할 때마다 동결절편기를 이용하여 4 μm의 두께로 깎아 poly-L-lysine으로 coating된 슬라이드에 붙였다. 환자 혈청 200 μL에 rat liver acetone powder를 첨가한 후 원심분리시키고 그 상층액을 취하였다. Working solution [aprotinin +0.5% HSA (human serum albumin) in PBS (phosphate buffered saline)]으로 1:4 및 1:16으로 희석시킨 환자의 혈청 50 μL를 슬라이드에 떨어뜨리고 4°C에서 16~18시간 배양시켰다. 배양 슬라이드를 PBS로 3회 세척 후 이 슬라이드에 1:80으로 희석한 FITC-conjugated goat anti-human IgG (Sigma, USA) 50 μL를 떨어뜨리고 상온의 밀폐된 습한 용기내에서 30분간 배양시켰다. 이를 다시 PBS에 3회 세척 후 형광현미경 하에서 관찰하였다. 매 측정 시마다 체장소도 세포질항체 양성 및 음성의 표준혈청을 지표로 사용하였으며, 판정은 2명의 검사자에 의해 각각 양성 또는 음성으로 하였다. ICA의 역가는 단계적 희석법으로 측정한 수치를 JDF reference (80 JDF units)를 사용한 standard curve를 이용하여 얻어 8 JDF units 이상을 양성으로 하였고 이를 IDW-ICA proficiency program으로 확인하였다.

2) Glutamic acid decarboxylase (GAD) 항체의 측정

(1) Radioligand binding assay (RBA)

위싱턴 대학(University of Washington)의 RH Williams Laboratory에서 기증받은 human islet GAD65 cDNA를 Promega's TNT coupled Reticulocyte Lysate System Kit (USA)를 이용하여 *in vitro*에서 transcription 및 translation시켜 충분한 양의 ³⁵S-labelled GAD65 항원을 얻고 이를 환자의

혈청과 함께 4°C에서 16~18시간 면역침전시킨 뒤 얻어진 immunoprecipitated antigen에 다시 protein A sepharose 50 μL를 가한 후 1시간 배양한 뒤 wash buffer로 5번 세척하여 protein A sepharose에 결합된 GAD65 항체의 radioactivity를 beta-counter를 이용하여 구하였다.

GAD index는 측정하고자 하는 검체의 beta count에서 표준 음성 혈청의 beta count를 뺀 값을 표준 양성 혈청의 beta count에서 표준 음성 혈청의 beta count를 뺀 값으로 나누어 얻었으며, 대조군의 GAD 역가보다 검체의 2 standard deviation (SD) 이상인 경우를 양성으로 하였다.

(2) Radioimmunoassay (RIA)

영국 RSR 사의 ¹²⁵I-labelled human GAD kit를 사용하였다. 혈청 20 μL와 eukaryocytic recombinant production system을 이용하여 만든 ¹²⁵I-labelled GAD 50 μL를 혼합하여 실온(20~25°C)에서 2시간 배양후 solid phase protein A 50 μL를 추가하여 실온에서 1시간 더 배양하였다. 2~8°C 사이의 assay buffer 1 mL를 첨가한 후 4°C에서 1,500 Xg로 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 감마카운터로 1분 정도 ¹²⁵I를 측정하였다. 2.7 U/mL 이상인 경우를 양성으로 하였다.

(3) Immunoradiometric assay (IRMA)

미국 Elias사의 ¹²⁵I-labelled human GAD kit를 사용하였다. 혈청 20 μL와 eukaryocytic recombinant production system을 이용하여 만든 ¹²⁵I-labelled GAD II 100 μL를 혼합하여 2시간 배양후 200 μL의 anti-human IgG를 추가하여 30분간 더 배양하였다. 1 mL의 assay buffer를 더한 후 3000 Xg으로 15분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 감마카운터로 1분 정도 ¹²⁵I를 측정하였다. 70 U/mL 이상인 경우를 양성으로 하였다.

3. 통계적 분석

결과는 평균±표준편차로 표시하였으며 각 군간의 평균의 비교는 chi-square test, 일원적 ANOVA 및 Student's unpaired t-test로 하였으며, 그리고 각 결과 간의 상관 관계는 Pearson's correlation을 이용하였다.

Table 1. ICA and GADA Prevalence in the Subjects

Patient group	No.	ICA	GADA (RBA)	GADA (RIA)	GADA (IRMA)
Type 1 DM	26	12 (46%)	10 (38%)	10 (38%)	8 (31%)
Control	20	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)

RBA: Radioligand binding assay, RIA: Radioimmunoassay

IRMA: Immunoradiometric assay

Table 2. Relation between ICA and GADA (RBA&RIA)

GAD antibody	ICA		Total
	Positive	Negative	
Positive	9	1	10
Negative	3	13	16
Total	12	14	26

통계학적 유의 수준은 $p < 0.05$ 미만으로 하였다.

결 과

소아 제1형 당뇨병 환자군의 당뇨병 평균 이환기간은 4 ± 3 년, 공복시 혈장 C-펩타이드는 0.36 ± 0.23 nmol/L, 체질량지수는 19 ± 2.3 kg/m²이었다. 제1형 당뇨병 환자군에서 ICA의 유병률은 46%이었으며, RBA 및 RIA에 의한 GAD 항체의 유병률은 모두 38%이었고, 그리고 IRMA에 의한 GAD항체의 유병률은 31%이었다. 대조군에서는 RBA에 의한 GAD 항체가 10%에서 양성이었으며, RIA 및 IRMA에 의한 GAD 항체 그리고 ICA의 유병률은 0%이었다 (Table 1).

RBA 및 RIA에 의한 GAD 항체 양성군과 음성군의 임상적 특성을 비교시 평균 유병 기간은 GAD 항체 양성군이 2.8 ± 2.2 년, GAD 항체 음성군이 4.6 ± 2.4 년이었고 공복시 혈장 C-펩타이드는 GAD 항체 양성군이 0.27 ± 0.14 nmol/L, GAD 항체 음성군이 0.15 ± 0.11 nmol/L이었으나 두 군 사이에 유의성은 없었고, 그리고 나이, 신체질량지수 및 공복시 혈당 농도 등도 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다. ICA 와 RBA 및 RIA에 의한 GAD항체의 연관성을 보면, GAD 항체가 양성이면서 ICA양성인 환자는 9명, GAD 항체 음성이면서 ICA양성인 환자는 3명, GAD

항체 양성이면서 ICA음성인 환자는 1명, GAD 항체 음성이고 ICA항체도 음성인 환자는 13명으로 유의한 연관을 보였으며 ($p < 0.001$), ICA 와 RBA 및 RIA에 의한 GAD항체의 일치율은 각각 26명 중 22명인 85%이었고, ICA 와 IRMA에 의한 일치율은 26명중 20명으로 77%를 보였다 (Table 2).

당뇨병 이환기간에 따라 환자군의 GAD 항체 유병률을 비교하면, RBA 및 RIA에 의해 측정된 GAD 항체 유병률은 유병기간이 1년 이하인 군에서 4명중 3명, 1년 이상인 경우 22명중 7명으로 유병 기간이 증가할수록 ICA와 GAD 항체의 빈도는 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$, Fig. 1). IRMA에 의해 측정된 GAD 항체 유병률은 유병기간이 1년 이하인 군에서 4명중 2명, 1년 이상인 경우 22명중 6명으로 유병 기간이 증가할수록 ICA와 GAD 항체의 빈도는 감소했으나, 유의한 차이는 없었다 (Fig. 1).

ICA의 역가에 따른 RBA 및 RIA에 의한 GAD 항체의 빈도는 ICA 20 JDF unit 미만에서 GAD 항체 유병률이 50% (2/4), ICA 20-80 JDF unit에서 86% (6/7), ICA 80 JDF unit 이상에서 100% (1/1)로 ICA의 역가가 증가할수록 GAD 항체의 빈도가 증가되었으나, 각 군간에는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 1). IRMA에 의한 GAD 항체의 빈도도 ICA 20 JDF unit 미만에서 GAD 항체 유병률이 25% (1/4), ICA 20-80 JDF unit에서 71% (5/7), ICA 80 JDF unit 이상에서 100% (1/1)로 ICA의 역가가 증가할수록 GAD 항체의 빈도가 증가되었으나, 각 군 사이에 유의한 차이는 없었다 (Fig. 2).

ICA 역가와 RBA에 의한 GAD index, RIA에 의한 GAD 농도 및 IRMA에 의한 GAD 농도는 의미있는 양의 상관관계를 보였고 ($p < 0.01$, Fig. 3), RBA에 의한 GAD index와 RIA에 의한 GAD 농도 및 IRMA에

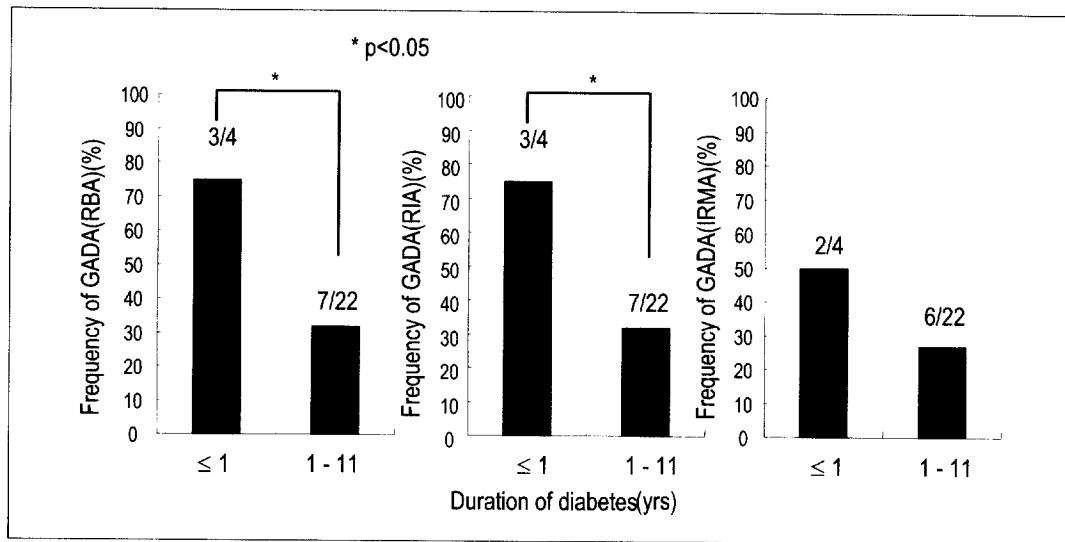


Fig. 1. Frequency of GADA by duration in the patients with Type 1 DM.

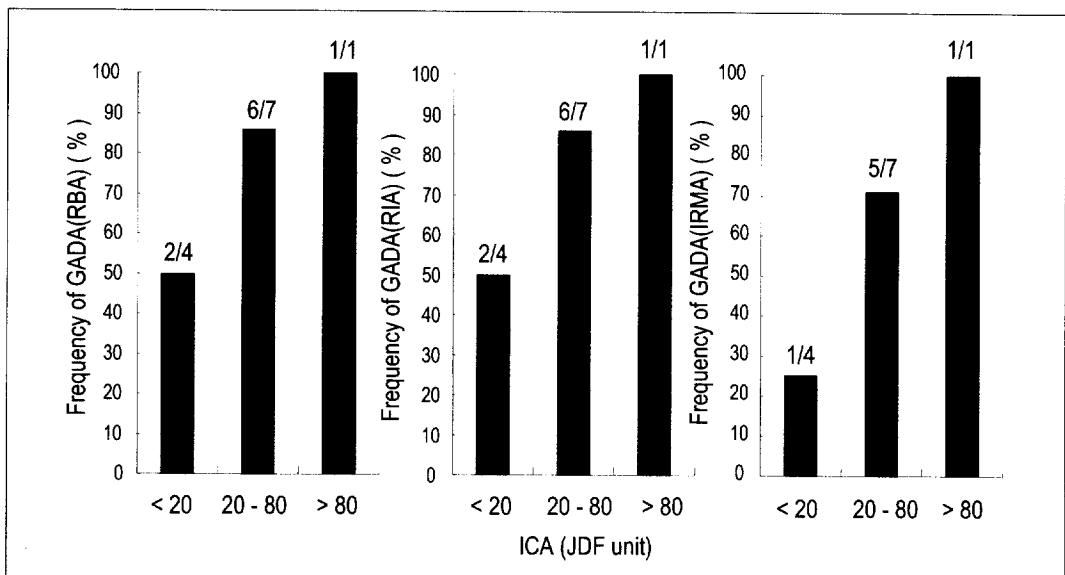


Fig. 2. Frequency of GADA by the JDF units of ICA.

의한 GAD 농도 간에도 유의한 상관 관계를 보였다 ($p < 0.01$, Fig. 4).

고 찰

제1형 당뇨병의 발생이 자가면역항체에 의한 체장

소도 베타세포의 파괴와 관련이 있다고 알려진 이래, ICA는 제I형 당뇨병의 진단 및 제I형 당뇨병이 발병 되기 전 당뇨병의 발병을 예측할 수 있는 표준 혈청 표지자로 이용되어 왔다^{1,3,7)}. 한국인 소아 제I형 당뇨 병 환자를 대상으로 한 본 연구에서는 간접면역형광 법에 의해 ICA를 측정하였으며, ICA 유병률은 46%

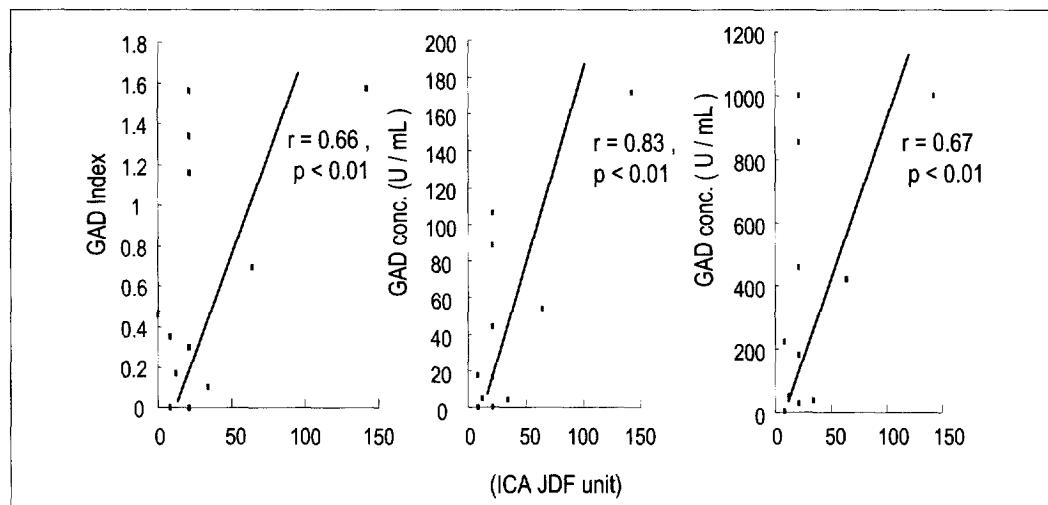


Fig. 3. Correlation between ICA titer and GAD Index (RBA), GAD conc.(RIA) and GAD conc. (IRMA)

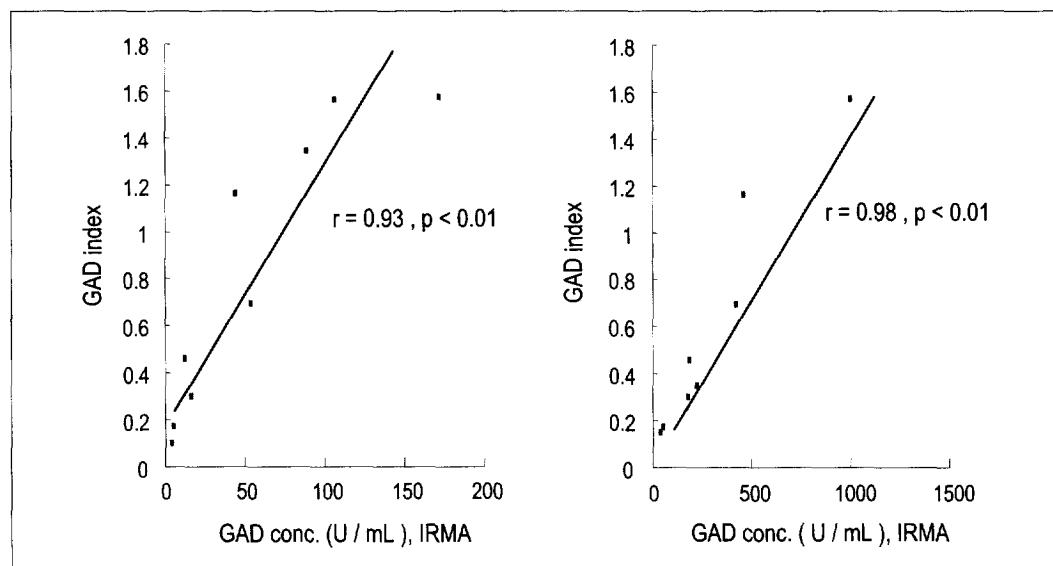


Fig. 4. Correlation between GAD index (RBA) and GAD conc. (RIA), GAD conc. (IRMA),

로 일반적인 백인에서의 유병률 60~80%에 비교하면 낮으나, Thai¹²⁾ 등이 평균연령 16세인 36명의 중국인 소아 제1형 당뇨병 환자에게서 보고한 유병률 30.6%라는 유사하였다. 그러나 전통적 방법인 간접면 역형광법에 의한 ICA 검사방법도 반정량적이고 양성 판정에 있어 주관적 scoring이 필요하고 여러 공여자의 췌장 조직에서 얻어진 결과로 변동이 많아 Juvenile

Diabetes Foundation (JDF) units를 통한 표준화에도 불구하고 검사의 표준화와 재현성이 제한이 있다. 이에 비해 Baekkeskov⁴⁾ 등에 의해 발견된 GAD항체는 제1형 당뇨병의 발병 전부터 질병 발생의 예측에 도움을 줄 뿐 아니라 일부 연구^{4,13)}에서는 ICA보다 먼저 발견되어, GAD 항체가 자가면역성 베타세포 파괴의 가장 초기 표지자임을 보여주었다. GAD의 2가지 주

요 형태는 GAD65와 GAD67로 두 개의 유전자에 의해 조절되며 아미노산 배열중 65%만이 동일하며, GAD65는 사람의 체장과 뇌조직에 모두 존재하나 GAD67은 사람의 뇌조직에만 분포한다¹⁴⁾. 제1형 당뇨병의 예측인자로서 GAD항체의 예민도는 70~90%정도로 ICA의 80~100%보다 낮으나, 당뇨병 제1도 근친에서 양성 예측도는 50% 정도로 ICA와 유사하다^{15~18)}. 제1형 당뇨병 환자의 GAD 항체 유병률은 측정 방법에 따라 코카시안 백인에서는 59~84%, 동양인에서는 5~83.4%, 그리고 한국인에서는 5~70% 정도로 다양하게 보고되고 있다^{19~28)}.

당뇨병 환자에게서의 이러한 다양한 GAD항체 유병률은 GAD항체 측정방법에 따른 내적 요인과 대상 환자의 발병 연령 및 이환기간의 차이가 주 원인으로 생각된다. 1st International GADA workshop⁹⁾의 결과에 의하면 GAD 항체의 측정에 있어 면역침전법, ELISA 및 면역형광법 등의 여러 검사방법 간에 상당히 높은 일치율을 보였는데, 이는 ICA와 IAA workshop^{29,30)}에서 동일 검사방법 내에서도 값의 현저한 차이를 보여준 결과와는 차이를 보여주는 것이나, 1st International GADA workshop에서는 제1형 당뇨병 및 대조군의 혈청수가 적어 각 검사방법간의 예민도와 특이도 측정에는 다소 문제가 있는 것으로 생각된다. 이에 비해 2nd International GADA workshop⁸⁾에서는 많은 환자를 대상으로 하여 GAD 항체 측정 방법의 예민도와 특이도를 조사하였다. 이 연구에서는 오래전부터 이용된 면역침전법에 의한 GAD항체 검사 방법은 시간이 많이 소요되고 조작의 어려움으로 재현성있는 객관적인 결과를 얻기 힘들다고 하였고, 재조합 GAD cDNA를 이용한 RBA에 의한 GAD항체는 평균 민감도 76.2%로 ELISA의 민감도 36.5%나 EIP (enzyme immunoprecipitation)의 민감도 49.9%보다 높았다. 저자들이 RBA로 구한 GAD 항체 유병률은 38%로 백인의 유병률 70~80%에 비교하면 낮으나, Thai¹²⁾ 등이 발병연령이 14.4세인 119명의 중국인 소아 제1형 당뇨병 환자에게서 보고한 유병률 38.7%와는 유사하였다. 또한 2nd International GADA Workshop⁸⁾에서 ELISA 또는 EIP에 의한 방법으로는 저농도의 GAD항체 측정이 불가능하다고 하였다.

GAD항체 측정방법 중 최근에 개발된 RIA에 의한 측정은 항원으로 표지되지 않은 재조합 human GAD65 와 ¹²⁵I-protein A를 사용하여 GAD항체를 측정하는 방법으로, 1997년 Tiberti¹¹⁾ 등에 의해 보고되었다. 이 연구에서는 2nd International GAD Antibody Workshop⁸⁾의 검체 혈청을 이용해 GAD항체를 측정한 결과 유병률은 건강대조군에서 30명중 1명으로 3.3%, 제1형 당뇨병 환자군에서는 30명중 18명으로 60%를 보여, 2nd International GAD Antibody Workshop⁸⁾에서의 다른 측정법과 비교해서 높은 민감도 (85.7%)와 특이도 (93.9%)를 나타내었다. RIA에 의한 GAD항체 측정방법은 다른 방법들보다 간편하고 빠른 방법이므로 많은 수의 환자를 대상으로 한 전향적 연구도 가능하게 한다.

본 연구에서도 보다 쉽고 재현성 있는 RIA로 GAD 항체를 측정한 결과, RIA에 의한 GAD 항체 유병률은 소아 제1형 당뇨병 환자군에서 38%로 RBA와 RIA는 같은 결과를 보였으며, IRMA에 의한 GAD 항체는 31%로 다소 낮은 유병률을 보였다. RBA에 의한 GAD index와 RIA에 의한 GAD 농도간에도 유의한 상관 관계를 보였다. 이러한 GAD 항체 유병률은 구미의 보고에 비해 다소 낮은 편이었으나 Tsuruoka²⁸⁾ 등이 921명의 일본인 제1형 당뇨병 환자에서 GAD 항체 유병률이 35.4%라고 보고한 결과는 유사하였다. 또한, RBA와 RIA에 의한 GAD 항체 유병률의 차이를 보면, Tiberti¹¹⁾ 등이 RIA에 의한 GAD항체 양성 이 72%, RBA에 의한 GAD항체 유병률은 69.2%~77%로 보고하여 측정방법에 따라 GAD항체 유병률에 다소 차이가 있다는 것을 보여준다. 저자들의 경우에서는 RBA와 RIA에 의한 GAD항체 유병률의 차이는 없었다. RIA 와 IRMA에 의한 GAD 항체 유병률과의 차이는 RIA에서는 침전 buffer로 protein A를 사용하였으며, IRMA의 경우는 anti-human IgG를 사용한 것이 유병률 차이중의 한 원인이 되리라 생각된다. 본 연구에서 당뇨병의 가족력이 없는 정상 대조군에서 GAD항체가 10명 중 1명에서 양성을 보였는데, Roll 등³¹⁾의 연구에서는 이런 경우 추적검사에서 모두 음성으로 바뀌어 이들의 GAD에 대한 자가 면역 반응은 일시적인 것이라 하였다. 본 연구에서 GAD항체 유병

률이 코카시안에 비해 낮은 이유는 ICA 유병률에서와 같이 연구 대상의 유병 기간이 다소 길었고, 또한 인종 간의 면역학적 반응의 차이, 유전적 요인 및 환경적 요인의 차이 등으로 생각된다.

한편, 본 연구에서는 ICA와 GAD 항체의 관계도 관찰한 바, ICA와 RBA 및 RIA로 구한 GAD 항체의 일치율은 모두 85%였고, ICA와 IRMA에 의한 GAD 항체의 일치율은 75%로 Petersen 등³²⁾이 최근에 발병한 제I형 당뇨병 환자 132명에게서 ICA(87명)와 GAD 항체(60명)의 일치율이 69%로 보고한 것과 유사하였다. 그러므로 제I형 당뇨병 환자에게서 ICA와 GAD 항체는 높은 일치율을 보이며, 이로 보아 GAD 자체가 체장소도 세포질항원의 반응성의 일부분을 담당하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 한국인 소아 제I형 당뇨병 환자에게서 RBA에 의한 GAD 항체 측정과 함께 RIA에 의한 GAD 항체의 측정도 제I형 당뇨병의 진단 및 예측 표지자로 유용할 것으로 보인다. 특히, RIA에 의한 GAD 항체의 측정은 다른 방법들보다 간편하고 빠른 방법이므로 많은 환자를 대상으로 한 전향적 연구에 유용할 것으로 생각된다.

요 약

연구 배경: 제I형 당뇨병은 체도항원에 대한 혈청 항체를 가지고 있는 자가면역 질환으로 알려져 있다. 이들 항체 중 GAD 항체는 당뇨병 유병 기간에 따라 유병률이 감소되는 ICA와는 다르게 제I형 당뇨병 발병 후에도 오랜기간 지속적으로 검출된다고 보고되고 있으며 인슐린 자가항체 및 ICA에 비해 자가면역성 제I형 당뇨병의 진단 및 발병 예측에 더 유용한 것으로 알려져 있다. 그러나, 전통적 면역측정법에 의한 GAD 항체의 측정법은 검사 시간이 오래 걸려 선별 검사로는 다소 문제가 있어 GAD 항체 검사에 간편하고 재현성이 있는 정량적 radioligand binding assay가 이용되고 있으며, 최근 방사면역측정법에 의한 GAD 항체 검사법도 개발되었다. 저자들은 한국인 소아 제I형 당뇨병 환자에게서 RBA, IRMA 및 RIA를 이용한 GAD 항체의 유병률을 측정하여, GAD 항체의 측정방

법으로서의 IRMA 및 RIA의 유용성을 알아보았다.

방법 및 대상: 한국인 제I형 당뇨병 환자 26명(남자 10명, 여자 16명, 평균 연령 14세)과 정상 대조군 10명(남자 5명, 여자 5명, 평균 연령 15세)을 대상으로 간접면역형광법에 의한 ICA 검사를 시행하고 그리고 RBA, IRMA 및 RIA 방법에 의해 GAD 항체를 측정하였다.

결과: RBA 및 RIA에 의한 GAD 항체 유병률은 제I형 당뇨병 환자군에서 모두 38%(10/26)이었고, IRMA에 의한 GAD 항체 유병률은 31%(8/26)이었다. RBA에 의한 GAD index와 RIA에 의한 GAD 역가 그리고 RBA에 의한 GAD index와 IRMA에 의한 GAD 역가사이 모두에서 양의 상관관계를 보였다.

결론: 이상의 결과로 한국인 제I형 당뇨병 환자에게서 RBA에 의한 GAD 항체 측정과 함께 RIA와 IRMA에 의한 GAD 항체도 제I형 당뇨병의 진단 및 예측의 표지자로 유용할 것으로 보이나, 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

=Abstract=

Measurement of GAD Antibodies Using Radioligand Binding Assay, IRMA and RIA in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus

Ji Sung Yoon, M.D., Jae Hong Kim, M.D., Jung Hyun Oh, M.D., Sang Yiup Nam, M.D., Jin Chul Park, M.D., Hyun Dae Yoon, M.D., Kyu Chang Won, M.D., Ihn Ho Cho, M.D., In Kyu Lee, M.D.¹, and Hyoung Woo Lee, M.D.

Yeungnam University, College of Medicine

Department of Internal Medicine

Keimyung University, College of Medicine

Department of Internal Medicine¹

Background: Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune disease in which serum antibodies against islet antigens have been recognized. These

antibodies include insulin autoantibodies (IAAs), cytoplasmic islet cell antibodies (ICA) and GAD antibodies. Recently, there has been increasing interest in the use of glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA) for the identification of subjects with increased risk of developing type 1 diabetes. GAD antibodies were first discovered in 1982 and is detected persistently after long duration of type 1 diabetes, whereas ICA is transient. However, because the classic immunoprecipitation assays of GAD antibodies is still rather time-consuming, a more simple and reproducible radioligand binding assay (RBA) is has been widely used recently. The RIA (radioimmunoassay) and IRMA (immunoradiometricassay) for GAD antibodies using ^{125}I -labelled human GAD has been developed. The aim of the present study is to evaluate the usefulness of each methods.

Methods: We measured GAD antibodies by RBA with in vitro synthesized recombinant ^{35}S -methionine-labelled GAD65, and protein A-sepharose to separate free from antibody-bound ligand and radioimmunoassay and immunoradiometric assay using ^{125}I -labelled human GAD kit, in addition to measurement of ICAs by standard indirect immunofluorescence technique in 26 patients with type 1 diabetes(male 10, female 16, mean age 14 years) and 10 normal controls(male 5, female 5, mean age 15 years).

Results: The overall prevalence of GAD antibodies by RBA and RIA in patients with type 1 diabetes was 38% (10/26), respectively. The prevalence of GAD antibodies by IRMA in patients with type 1 diabetes was 31% (8/26). The frequency of GAD antibodies by RBA,IRMA and RIA increased as the JDF unit of ICA increased. There is a significant correlation between the GAD index (by RBA) and GAD concentration (by RIAand IRMA).

Conclusion: These results suggest that GAD antibodies (by RIA or RBA or IRMA) is useful for screening and diagnosis of type 1 diabetes in Korean, but long-term prospective studies on large cohorts of patients is necessary.

Key Words: GAD antibodies, Type 1 diabetes mellitus

참 고 문 헌

1. Eisenbarth GS: *Type I diabetes mellitus: A chronic autoimmune disease.* *N Engl J Med* 314: 1360-1368, 1986.
2. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL: *Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment.* *Science* 222:1337-1339, 1983
3. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D: *Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiency.* *Lancet* 2:1279-1283, 1974
4. Baekkeskov S, Aantoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P: *Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.* *Nature* 347:151-156, 1990.
5. Pietropaolo M, Hutton JC, Eisenbarth GS: *Protein tyrosine phosphatase-like proteins.* *Diabetes Care* 20:208-214, 1997
6. Tatsuhiko U, Misao O, Yukinobu M, Teruo K, Hiroko M: *Serial changes in the prevalence of islet cell antibodies and islet cell antibody titer in children with IDDM of abrupt or slow onset.* *Diabetes Care* 18:1095-1099, 1995.
7. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, Gale EA, Bosi E:

- Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity.* *Diabetologia* 38:816-822, 1995.
8. Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E: *Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies-The second international GADAb workshop.* *Diabetes* 44:636-640, 1995.
 9. Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E, Bottazzio GF, Harrison LC: *High level of concordance between assays for glutamic acid decarboxylase antibodies-The first international GADAb workshop.* *Diabetes* 43:1005-1009, 1994.
 10. Zimmet P, Tuomi T, Mackay M, Rowley W, Knowles M, Cohen M, Lang D: *Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA)-the role of antibodies to GADA in diagnosis and prediction of insulin dependency.* *Diabet Med* 11:299-303, 1994
 11. Tiberti C, Falorni A, Torresi P, Vecchi E, Anastasi E, Dotta F, Di Mario U: *A new solid-phase radioimmunoassay to detect anti-GAD65 autoantibodies.* *J Immunol Methods* 24: 107-113, 1997
 12. Thai AC, Ng WY, Loke KY, Lee WR, Lui KF, Cheah JS: *Anti-GAD antibodies in Chinese patients with youth and adult-onset IDDM and NIDDM.* *Diabetologia* 40:1425-1430, 1997
 13. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å: *Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate specific human pancreatic islet cell proteins.* *Nature* 298:167-169, 1982
 14. Hao W, Linsong L, Mehta V, Lermark Å, Palmer JP: *Functional state of the β cell affects expression of both forms of glutamic acid decarboxylase.* *Pancreas* 9:558-562, 1994.
 15. Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG: *GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives.* *Diabetes* 47:592-597, 1998
 16. Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA: *Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group.* *Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie.* *Diabetologia* 39:1351-1356, 1996
 17. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: *Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies.* *Diabetes* 45:926-933, 1996
 18. Goris FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, Christie MR, Pipeleers DG: *IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry.* *Diabetologia* 40:95-99, 1997
 19. Akamine H, Komiya I, Shimabukuro T, Asawa T, Tanaka H, Yagi N, Taira T, Nagata K, Akarakaki K, Wakugami T, Takasu N, Powell MJ, Furmaniak J, Smith BR: *High prevalence of GAD65 (and IA-2) antibodies in Japanese IDDM patients by a new immunoprecipitation assay based on recombinant human GAD65.* *Diabet Med* 14:778-784, 1997
 20. Tuomi T, Zimmet P, Rowley MJ, Min HK, Vichayanrat A, Lee HK, Rhee BD, Vannasaeng S, Humphrey AR, Mackay IR: *Differing frequency of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase among Koreans, Thais and Australians with diabetes mellitus.* *Clin Immunol Immunopathol* 74:202-206, 1995
 21. Zimmet PZ, Rowley MJ, Mackay IR, Knowles

- WJ, Chen QY, Chapman LH, Serjeantson SW: *The ethnic distribution of antibodies to glutamic acid decarboxylase: presence and levels of insulin-dependent diabetes mellitus in Europid and Asian subjects.* J Diabetes Complications 7:1-7, 1993
22. Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Hoier-Madsen M, Boel E, Michelsen BK, Dyrberg T: *Detection of GAD65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay.* Diabetes 43:459-467, 1994
23. Rowley MJ, Mackay IR, Chen QY, Knowles WJ, Zimmet PZ: *Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus.* Diabetes 41:548-551, 1992
24. Karlsen AE, Hagopian WA, Petersen JS, Boel E, Dyrberg T, Grubin CE, Michelsen BK, Madsen OD, Lernmark A: *Recombinant glutamic acid decarboxylase (representing the single isoform expressed in human islets) detects IDDM-associated 64,000-M(r) autoantibodies.* Diabetes 41:1355-1359, 1992
25. 이형우, 원규장: 소아 제1형 당뇨병 환자에서 췌장 소도세포질 항체(ICA)와 GAD 항체. 당뇨병 22:145-154, 1998
26. 이현철: 한국인 젊은 연령에서 발생한 당뇨병의 특성. 당뇨병 22(부록 1):SI-5, 1998
27. 박용수, 이성희, 김태화, 김복현, 홍경만, 양현종, 정준용, 양세원, 고경수: 인슐린 의존성 당뇨병의 표지자로서 항 GAD 항체. 당뇨병 20:134-144, 1996
28. Tsuruoka A, Matsuba I, Ogata K, Mizushima Y, Ohta K, Nakagawa H, Yamada K, Watanabe H, Ikeda Y: *Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD-Ab) in Japanese insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM).* In: Proceedings in International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress. pp65-68, 1993
29. Bottazzo GF, Gleichmann H: *Immunology and diabetes workshop-report of the first international workshop on the standardization ICAs.* Diabetologia 29:125-126, 1986
30. Wilkin TJ, Schoenfeld SL, Diaz JL, Kruse U, Bonifacio E, Palmer JP: *Systematic variation and differences in insulin-autoantibody measurements.* Diabetes 38:172-181, 1989
31. Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG: *Associations of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients.* Diabetes 43:154-160, 1994
32. Petersen JS, Dyrberg T, Karlsen AE, Molvig J, Michelsen B, Nerup J, Mandrup-Poulsen T: *Glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies in prediction of β -cell function and remission in recent onset IDDM after cyclosporin treatment.* Diabetes 43:1291-1296, 1994