

日本人小児 1 型糖尿病における  
インスリン分泌能の予測に関する研究  
—診断早期のグルカゴン負荷試験での C-ペプチドの  
頂値と膵  $\beta$  細胞の残存能の経時的変化について—  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系小児科学専攻

氏 名 吉田 圭

修了年 2021 年

指導教員 浦上 達彦

## 1. 緒言

糖尿病は、インスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。この疾患群の共通の特徴はインスリン効果の不足であり、それにより糖、脂質、蛋白質を含むほとんどすべての代謝系に異常をきたす。本疾患群でインスリン効果が不足する機序には、インスリンの供給不足（絶対的ないし相対的）とインスリンが作用する臓器（細胞）におけるインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）とがある。

糖尿病の原因は多用であり、その発症には遺伝因子と環境因子がともに関与する。インスリン供給不足は、膵 $\beta$ 細胞の量が破壊などによって減少した場合や、膵 $\beta$ 細胞自体に内在する機能不全によって起こる場合などがある。いずれの場合でも、機能的膵 $\beta$ 細胞量は減少しており、臓器において必要なインスリン効果が十分に発現しないことが発症の主要な機構である。

## 2. 目的

小児の1型糖尿病において発症時の自己抗体の有無や発症年齢が、発症後のインスリン分泌能の低下を規定する報告(1)はあるが、発症後のインスリン分泌能の変化とグルカゴン負荷試験(GST)の結果との関係性を評価した研究はない。GSTによる $\beta$ 細胞のインスリン分泌能を予測することは、1型糖尿病の小児に

における微小血管合併症の予防や予後の改善に役立つ可能性がある。

本研究は日本人小児 1 型糖尿病を対象として、診断後 1 か月以内に実施した GST における血清 C-ペプチド値が膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌能の経時的変化を予測する指標としての有用性を検討することを目的とした。

### 3. 対象と方法

#### 3-1. 対象

本研究は 1999 年から 2018 年までの間に駿河台日本大学病院、日本大学病院を受診した新規発症 1 型糖尿病の日本人小児 65 人（男児 25 人，女児 40 人，年齢 16 歳未満）を対象とした後方視的研究である。診断時の症状として 30 人の患者が DKA を合併し，20 人が DKA を示さないが糖尿病の主要症状である多飲または多尿を認めていた。また 15 人が学校検尿を契機に糖尿病と診断された。尚、1 型糖尿病の診断は日本糖尿病学会が定める診断基準に従った (2)。

#### 3-2. 方法

##### 3-2-1. グルカゴン負荷試験

糖毒性が改善し空腹時血糖値が 70～180 mg/dL となったことを確認した後，診断後 1 か月以内に GST を実施した。GST の方法としては，10 時間以上禁食に

した空腹状態でグルカゴン（グルカゴン G ノボ®, EA ファーマ株式会社, 東京都）を 0.03 mg/kg（最大 1 g）を静脈内投与し, 投与前, 投与後 3, 6, 9, 15 分後に採血し血清 C-ペプチド値（東ソー株式会社, 東京都）を測定した (3) .

診断後 0, 3, 6, 12, 24, 36, 60, 120 か月の時点で食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値を測定して, 診断後早期に行った GST の頂値との関係について検討した.

### 3-2-2. 血糖値および HbA1c

血糖値はグルコースオキシダーゼ法を用いて自動分析装置（GA-1171, アークレイ株式会社, 京都府, 日本）により測定した. HbA1c 値は高速液体クロマトグラフィー（アークレイ株式会社, 東京都, 日本, 正常範囲 4.7~6.2%）により測定した. HbA1c 値は NGSP 値で示した.

### 3-2-3. 膵島関連自己抗体

GAD 抗体および IA-2 抗体は ELISA 法により, IAA は RIA 法により測定用キット（いずれも株式会社コスミックコーポレーション, 東京都）を用いて測定した. それぞれのカットオフ値は GAD 抗体は 1.5 U/mL, IA-2 抗体は 0.6 U/mL, IAA は 0.4 U/mL を用いた.

#### 3-2-4. HLA

HLA クラス II 抗原遺伝子の DQB1 と DRB1 の各遺伝子について DNA タイピングを施行した。そして、DRB1\*04:05-DQB1\*04:01, DRB1\*08:02-DQB1\*03:02, DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 を、日本人における 1 型糖尿病の疾患感受性を示すハプロタイプと判断した (4)。

#### 3-3. 統計解析

すべての統計解析は IBM SPSS Statistics 23.0 (International Business Machines Corp, Armonk, NY, USA) および R version 3.5.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて行い, 結果は平均値±標準偏差 (SD) として示した。

食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値が 0.2 ng/mL 未満となる時期を予測するためのグルカゴン負荷試験での血清 C-ペプチドの頂値のカットオフ値は Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析により行った (検出力が 80% 以上)。食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値のグループ間比較は, Mann-Whitney U 検定を用いて行った。診断 3, 6, 12, 24, 36, 60, 120 か月後における食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値が 0.2 ng/mL 未満となることに寄与する因子の探索にはロジスティクス回帰分析を行い, 単変量解析で  $p < 0.05$  の有意

水準にあった変数（診断時の年齢, GST での血清 C-ペプチド頂値, 診断時の HbA1c 値, 性別, 診断時のケトアシドーシス, 膵島関連自己抗体（GAD 抗体, IA-2 抗体, IAA）, HLA）を多変量解析の独立変数とした。すべての解析において両側検定で  $p < 0.05$  を有意水準とした。

### 3-4. 倫理的配慮

本研究は日本大学病院臨床研究審査委員会（承認番号 20171003）の承認を得ている。今回の研究は既存のカルテのみを用いた後方視的研究であったため、オプトアウトを行い、個別のインフォームドコンセントの対応は不要である。

## 4. 結果

### 4-1. 対象の特徴

対象の平均年齢は  $7.3 \pm 4.0$  (1.0~15.9) 歳であった。診断時の平均 HbA1c 値は  $11.1 \pm 2.6$  (6.6~16.0) %であった。学校検尿を契機に診断された群の対象は、急性発症の群の対象よりも統計学的に有意に年齢が高く ( $9.7 \pm 2.7$  歳 v.s.  $6.7 \pm 3.9$  歳,  $p < 0.01$ ) , HbA1c 値は低かった ( $10.4 \pm 2.6\%$  v.s.  $11.3 \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.05$ ) 。膵島関連自己抗体に関しては、29 人の患者がグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 抗体, インスリノーマ関連抗原 2 (IA-2) 抗体, インスリン自己抗

体 (IAA) のうち 1 つの抗体を認め、36 人の患者が 2 つ以上の膵島関連自己抗体を認めた。GAD 抗体, IA-2 抗体, IAA の陽性率は各々 64 例中 49 例 (71.4%) , 42 例中 30 例 (71.4%) , 49 例中 34 例 (69.3%) であった。またヒト白血球抗原 (HLA) に関しては、日本人 1 型糖尿病の疾患感受性ヒト白血球抗原 HLA (29) を有する患者は 49 人であった。

#### 4-2. グルカゴン負荷試験

GST における負荷前, 3, 6, 9, 15 分後の平均血清 C-ペプチド値は各々  $0.38 \pm 0.41$  ng/mL,  $0.73 \pm 0.71$  ng/mL,  $0.75 \pm 0.74$  ng/mL,  $0.71 \pm 0.69$  ng/mL,  $0.54 \pm 0.47$  ng/mL であった。グルカゴン投与してから 6 分以内に血清 C-ペプチドの頂値を認めたのは 46 人, 9 分後に頂値を認めたのは 7 人であった。血清 C-ペプチド頂値の平均値は  $0.94 \pm 0.78$  ng/mL であった。学校検尿を契機に診断された群では GST における負荷前, 3, 6, 9, 15 分後の平均血清 C-ペプチド値は各々  $0.55 \pm 0.31$  ng/mL,  $1.23 \pm 0.75$  ng/mL,  $1.31 \pm 0.81$  ng/mL,  $1.22 \pm 0.77$  ng/mL,  $0.86 \pm 0.45$  ng/mL であり、急性発症の群では  $0.33 \pm 0.42$  ng/mL,  $0.57 \pm 0.61$  ng/mL,  $0.59 \pm 0.62$  ng/mL,  $0.56 \pm 0.57$  ng/mL,  $0.44 \pm 0.42$  ng/mL であった。

#### 4-3. 診断 120 か月後までの食後 1～2 時間後血清 C-ペプチド値の変化

診断後 0, 3, 6, 12, 24, 36, 60, 120 か月時の食後 1～2 時間後平均血清 C-ペプチド値は各々  $0.67 \pm 0.59$  ng/mL,  $1.19 \pm 0.96$  ng/mL,  $0.78 \pm 0.80$  ng/mL,  $0.59 \pm 0.64$  ng/mL,  $0.41 \pm 0.54$  ng/mL,  $0.21 \pm 0.29$  ng/mL,  $0.09 \pm 0.13$  ng/mL,  $0.04 \pm 0.04$  ng/mL であった. 診断時と診断後 3 か月, 24 か月, 36 か月, 60 か月, 120 か月の食後 1～2 時間後血清 C-ペプチド値には有意差を認めた (各々  $p < 0.001$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) .

診断後 3 か月, 6 か月および 12 か月における食後 1～2 時間後血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満となることを予測するためのグルカゴン負荷試験での血清 C-ペプチド頂値のカットオフ値は 0.20 ng/mL であった (AUC 0.867, 95%CI 0.745-0.990 ; AUC 0.774, 95%CI 0.634-0.914 ; AUC 0.804, 95%CI 0.695-0.914) . 24 か月後, 36 か月後, 60 か月後のグルカゴン負荷試験における血清 C-ペプチド頂値のカットオフ値は各々 0.69 ng/mL (AUC 0.828, 95%CI 0.721-0.936) , 0.60 ng/mL (AUC 0.777, 95%CI 0.636-0.918) , 0.70 ng/mL (AUC 0.848, 95%CI 0.715-0.982) であった.

#### 4-4. 食後 1～2 時間後の血清 C-ペプチド値 0.20 ng/mL 未満となることの予測因子

診断 3, 6, 12 か月後において単変量解析で有意な関連を認めた因子は診断時の年齢, 診断時の HbA1c, 診断時の DKA の合併, GST での C-ペプチドの頂値であった. 診断 24, 36 か月後においては診断時の年齢, 診断時の DKA の合併, GST での C-ペプチドの頂値であり, 診断 60 か月後においては診断時の年齢, GST での C-ペプチドの頂値であった. GST での血清 C-ペプチドの頂値が低いほど診断後 3 か月および 12 か月後の食後 1~2 時間後血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満であることと有意な関連を認めた (いずれも  $p < 0.01$ ) . 診断時の低い HbA1c 値および DKA の合併は, 診断後 3 か月, 6 か月および 12 か月後に食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満であること有意に関連していた (HbA1c は各々  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ , および  $p < 0.01$  ; DKA はそれぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , および  $p < 0.05$ ) . より若年で診断されるほど診断後 24 か月, 36 か月, 60 か月での食後 1~2 時間後血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満であることと関連していた (各々  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  および  $p < 0.05$ ) .

## 5. 考察

対象者の大多数は GST での血清 C-ペプチド値はグルカゴン投与後 3~6 分で頂値を認め、その後減少することが明らかとなった。これは過去の報告 (5) と類似しており、1 型糖尿病におけるグルカゴン負荷試験での C-ペプチドの反応は日本人と白人の人種差がないことが明らかになった。

本研究における ROC 解析では、診断時のグルカゴン負荷試験における血清 C-ペプチドの頂値のカットオフ値 0.20 ng/mL は、診断後 3, 6, 12 か月後の時点における食後 1~2 時間後血清 C-ペプチド値 0.20 ng/mL 未満となることの有意な予測因子であったのに対し、24, 36, 60 か月後の食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値 0.20 ng/mL 未満となることを予測するカットオフ値は、各々 0.69 ng/mL, 0.60 ng/mL, 0.70 ng/mL であった。これらの結果から、診断時の GST での C-ペプチドの頂値が 0.20 ng/mL 未満の場合は、診断後 1 年以内に食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満となることの有意な予測因子であることが明らかとなった。

本研究では多変量解析により、診断時の年齢がより若年であること、診断時に DKA を合併していること、診断時の HbA1c が低値であることが食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満となることと関連していることが明らかになった。これまでの研究でも、1 型糖尿病の発症年齢が低いことがイ

ンスリン分泌能の枯渇の危険因子であることが明らかにされている (6-8) .

Greenbaum ら (7) は, 空腹時血清 C-ペプチド値が温存されている患者は, 1 型糖尿病の発症時の年齢が高く, HbA1c 値が低いことを報告している. また Sorensen ら (8) は, 診断時年齢が  $\beta$  細胞残存能の最も強い予測因子であり, 診断から 3~6 年後において若年者では成人と比較して有意にインスリン分泌能が低かったと報告している. この結果は本研究と一致しており, 日本人小児でも白人と同様に若年発症がインスリン分泌の危険因子であることが明らかとなった. 思春期の小児ではインスリン抵抗性が高くなっている. そのため幼児と同じようにインスリン分泌が低下した場合でも症状が早期に出現しやすく, より早期に診断, 治療に至る可能性がある. 治療が早期に行われることにより, 幼児よりもインスリン分泌能がより長期間保たれると考えられる.

Mortensen ら (9) は, 診断時の DKA の合併は診断後 1 か月および 12 か月の MMTT での血清 C-ペプチド値の低下と有意に関連していることを報告している. 他の研究でも, 診断時の DKA の合併は小児の 1 型糖尿病の  $\beta$  細胞機能の低下と関連していることが示されている (10, 11) . さらに Buchanan ら (12) は, 小児 1 型糖尿病において診断時の HbA1c 値が MMTT における血清 C-ペプチド値を予測することを報告している. 本研究では診断時の DKA の合併と診断時のより低い HbA1c 値が, 診断後 3, 6, 12 か月後の食後 1~2 時間後

の血清 C-ペプチド値 0.20 ng/mL 未満となることの有意な予測因子であることを示したが, HbA1c 値が低値であることは, インスリン分泌の低下が急速であることを反映しているかもしれない. 膵島関連自己抗体が 1 つ陽性である患者と 2 個以上陽性である患者との間で, 食後 1~2 時間後血清 C-ペプチド値に有意差は認められなかった. Sorensen ら (7) は, 診断後の IA-2 抗体価の変化が診断から 3-6 年後のインスリン分泌能と関連していると報告した. 一方 Borg ら (13) は診断時の GAD 抗体および IA-2 抗体価が高値であることは, 診断から 5 年後のインスリン分泌能の低下を予測することを示した. しかし, Miller ら (14) は診断時の膵島関連自己抗体と血清 C-ペプチド値との間に関連は認められないと報告している. このように過去の報告で結果が異なる理由は不明である.

本研究にはいくつかの限界がある. 第一に我々は MMTT を行わず通常の食事を摂取した後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値のみを評価しており, また空腹時血清 C-ペプチド値は評価していない. また GST は診断時にのみ実施し, 経時的に反復してその結果を評価していない. 空腹時血清 C-ペプチド値の測定と経時的に GST の結果を評価することで, さらなる膵 $\beta$ 細胞機能の評価ができると思われる. 第二に, 研究の対象者の数が少なく, 多変量解析において十分な検出力をもった統計解析ができないことである. したがって, さらに研究対象

者数をさらに増やして多人数で検討する必要がある。第三に、インスリン投与量および投与方法と GST および経時的な食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値との関係性を評価してないことが挙げられる。Fredheim ら (10) は、インスリン投与量によって残存  $\beta$  細胞機能が異なることを示しており、新たな研究としてインスリン投与量および投与方法との関係性について検討する必要がある。

## 6. まとめ

本研究において、日本人小児 1 型糖尿病を対象とした診断後 1 か月以内に施行した GST の 血清 C-ペプチドの頂値から食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値が 0.20 ng/mL 未満となる時期を予測することが可能であることが示された。また診断時の年齢、DKA の合併、HbA1c 値は、食後 1~2 時間後の血清 C-ペプチド値 0.20 ng/mL 未満となることの予測因子となる可能性がある。これらのことより、より早期にインスリン分泌が枯渇すると予測される症例を抽出することができるため、注意深く治療を行うことができる。血糖コントロールを良好に保つことで、将来の合併症の発症を予防あるいは遅延させ、予後の改善につながると思われる。

## 引用文献

1. Mortensen HB, Swift PG, Holl RW, Hougaard P, Hansen L, Bjoerndalen H, et al. Multinational study in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes: association of age, ketoacidosis, HLA status, and autoantibodies on residual beta-cell function and glycemic control 12 months after diagnosis. *Pediatr Diabetes* 2010;11:218-226.
2. Japanese Diabetes Society, The Japanese Society for Pediatric Endocrinology (2015). *Diabetes consensus guideline in pediatric and Adolescent*. Nankodo, Tokyo, Japan. (In Japanese)
3. Faber OK, Binder C. C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. *Diabetes* 1977;26:605-610.
4. Sugihara S, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, et al. HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with Type 1A diabetes and their families. *Pediatr Diabetes* 2012;13:33-44.
5. Davis AK, DuBose SN, Haller MJ, Miller KM, DiMeglio LA, Bethin KE, et al. Prevalence of detectable C-Peptide according to age at diagnosis and duration of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:476-481.
6. Kuhlreiber WM, Washer SL, Hsu E, Zhao M, Reinhold P, 3rd, Burger D,

et al. Low levels of C-peptide have clinical significance for established Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2015;32:1346-1353.

7. Greenbaum CJ, Anderson AM, Dolan LM, Mayer-Davis EJ, Dabelea D, Imperatore G, et al. Preservation of beta-cell function in autoantibody-positive youth with diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1839-1844.

8. Sorensen JS, Vaziri-Sani F, Maziarz M, Kristensen K, Ellerman A, Breslow N, et al. Islet autoantibodies and residual beta cell function in type 1 diabetes children followed for 3-6 years. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;96:204-210.

9. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet* 2014;383:69-82.

10. Fredheim S, Johannesen J, Johansen A, Lyngsoe L, Rida H, Andersen MLM, et al. Diabetic ketoacidosis at the onset of type 1 diabetes is associated with future HbA1c levels. *Diabetologia* 2013;56:995-1003.

11. Fernandez Castaner M, Montana E, Camps I, Biarnes J, Merino JF, Escriba JM, et al. Ketoacidosis at diagnosis is predictive of lower residual beta-cell function and poor metabolic control in type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 1996;22:349-355.

12. Buchanan K, Mehdi AM, Hughes I, Cotterill A, Le Cao KA, Thomas R, et al. An improved clinical model to predict stimulated C-peptide in children with recent-onset type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2019;20:166-171.
13. Borg H, Gottsater A, Landin-Olsson M, Fernlund P, Sundkvist G. High levels of antigen-specific islet antibodies predict future beta-cell failure in patients with onset of diabetes in adult age. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3032-3038.
14. Miller RG, Yu L, Becker DJ, Orchard TJ, Costacou T. Older age of childhood type 1 diabetes onset is associated with islet autoantibody positivity >30 years later: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabet Med* 2020. (ahead of print)