

## 論 文 要 旨

## Intraepidermal Nerve Fiber Density and Nerve Conduction Study Parameters Correlate with Clinical Staging of Diabetic Polyneuropathy

〔 表皮内神経線維密度と神経伝導検査のパラメーターは  
糖尿病性多発神経障害の臨床病期と相関する 〕

有村愛子

## 【序論および目的】

糖尿病性多発神経障害(DPN)は慢性進行性に進展し、小径神経障害と大径神経障害に分類される。小径神経機能は温痛覚、自律神経、表皮内神経線維密度(IENFD)と関連し、大径神経機能は振動覚、神経伝導検査(NCS)と関連する。糖尿病では小径神経障害が大径神経障害に先行するが、DPNの病期分類は、未だ確立されたものではなく、NCSを必須項目とするDyckの病期分類が標準とされている。日本においては「糖尿病性神経障害を考える会」がDPNの臨床病期分類を提唱し、NCSと相関することが報告されている。しかしながら小径神経障害との関連については明らかでない。そこで糖尿病患者のIENFDと心電図R-R間隔変動(CVR-R)を小径神経障害の指標とし、DPNの臨床病期分類との関連を調べた。

## 【材料および方法】

2008年から2011年に当院糖尿病内科・神経内科に入院もしくは通院している糖尿病患者44症例において糖尿病臨床像の評価、神経学的診察、IENFDを測定するため皮膚生検を行い、NCS、CVR-R検査を施行した。治療後有痛性神経障害やサルコイドーシス、シェーグレン症候群など他の神経疾患合併例は除外した。臨床病期は臨床症状と神経学的所見からⅠ期(前症候期)、Ⅱ期(無症状期)、Ⅲ期(症状期前期)、Ⅳ期(症状期中期、自律神経障害を合併)、Ⅴ期(症状期後期、運動神経障害を合併)に分類した。臨床病期分類はNCSを必須項目とするDyckの病期分類と相関していることが報告されており、病期Ⅲ及びⅣ期は、Dyck分類のⅡ期に相当し、病期Ⅲ期及びⅣ期をあわせて分析を行った。

皮膚生検は外踝上10cmで径3mmのパンチバイオプシー針を用いて行った。皮膚生検に伴う有害事象は認めなかった。切片はザンボニ固定液で12~24時間固定後、20%スクロース入りフォスフェートに保存し、後に凍結マイクロトームで60 $\mu$ m切片に切断した。免疫染色は、1次染色に神経線維を染色するPGP9.5抗体、基底膜を染色するcollagenⅣ抗体を用い、2次染色にAlexa 594、Alexa 488を用いた。共焦点顕微鏡の40倍で基底膜から連続してみられる表皮内神経線維を測定した。少なくとも2つの切片から8~10のfieldを、1つのfieldにつき2 $\mu$ mずつ16sectionで表皮内神経線維密度を測定した。

すべての患者から文書によるインフォームドコンセントを得た。

統計は SPSS Version18.0 を用いて行った。結果は平均±標準偏差または%で表し、各病期間の違いは一元配置分散分析または Kruskal-Wallis test, Fisher's exact probability method を用い、相関は Spearman's rank correlation coefficient を用いて、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 【結果】

症例は「糖尿病性神経障害を考える会」から提唱されている DPN の臨床病期分類にしたがって、I 期 20 人、II 期 6 人、III+IV 期 12 人、V 期 6 人に分類された。病期間で年齢、BMI、HbA1c、糖尿病罹病歴に有意差はみられなかった。

IENFD (fiber/mm) は I 期  $13.8 \pm 7.1$ 、II 期  $9.8 \pm 15.2$ 、III+IV 期  $3.0 \pm 4.3$ 、V 期  $0.8 \pm 1.3$  ( $p < 0.001$ ) と病期が進行するにつれて有意に低下した。IENFD  $< 10$ /mm (I 期での 95% 下限値) の割合は、I 期 30.0%、II 期 66.7%、III+IV 期 91.7%、V 期 100% ( $p < 0.001$ ) と病期が進行するにつれて有意に増加した。

NCS で II 期 1 人、III+IV 期 2 人、V 期 5 人は、腓腹神経活動電位が検出されなかった。腓腹神経及び正中神経の感覚神経活動電位は V 期 6 例のうち、5 例が検出されなかった。正中神経の CMAP・MCV・SNAP と脛骨神経の CMAP・MCV は病期が進行するにつれて低下し、正中神経と脛腹神経の F 波潜時は病期が進行するにつれて延長した。

CVR-R は I 期  $4.41 \pm 2.65\%$ 、II 期  $3.09 \pm 1.95\%$ 、III+IV 期  $2.53 \pm 1.64\%$ 、V 期  $1.33 \pm 0.57\%$  ( $p = 0.004$ ) と病期が進行するにつれて低下した。CVR-R  $< 2\%$  の割合は、I 期 15%、II 期 33.3%、III+IV 期 33.3%、V 期 66.7% ( $p < 0.001$ ) と病期が進行するにつれて有意に増加した。

IENFD と糖尿病関連因子との相関は、年齢 ( $r = 0.037$ ,  $p = 0.811$ )、BMI ( $r = 0.101$ ,  $p = 0.514$ )、HbA1c ( $r = -0.269$ ,  $p = 0.077$ )、糖尿病罹病歴 ( $r = -0.100$ ,  $p = 0.517$ ) と有意ではなかった。

一方、IENFD は NCS の各パラメーター及び CVR-R と有意な相関を示した (NCS との相関  $r = 0.378 \sim 0.636$ ,  $p < 0.05$ 、CVR-R との相関  $r = 0.399$ ,  $p = 0.007$ )。

### 【考察】

我々の研究から、DPN の臨床病期分類は神経障害の進行を反映していると考えられた。IENFD は境界型糖尿病や早期の糖尿病の時期から障害されることが報告されている。本研究においても DPN の早期の病期において IENFD はバラツキが大きく (I 期 1.3–25.9 /mm、II 期 0–36/mm)、一方、III 期以降で IENFD は明らかに低下しており、神経障害の進行を反映していると考えられた。早期の神経障害では神経線維の脱落と再生を繰り返しているが、病期が進行すると神経障害は不可逆となる可能性が示唆された。

我々の研究では糖尿病性神経障害の危険因子と IENFD との相関を認めなかった。DPN の臨床病期分類は臨床的に有用であることが示されたが、自律神経障害を合併する IV 期の症例数が少なかったため、各病期間の自律神経障害についての検討ができなかった。今後は、さらに症例数を増やして自律神経障害を検討し、各病期における治療方針についても検討が必要である。

### 【結論】

糖尿病性神経障害を考える会から提唱されている DPN の臨床病期分類は、小径神経障害及び大径神経障害のいずれの進行程度も反映した。

(Diabetes Research and Clinical Practice. in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 223 号		学位申請者	有村 愛子、
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	出雲 周二	副査	武田 泰生
	副査	米澤 傑	副査	久保田 龍二

**Intraepidermal Nerve Fiber Density and Nerve Conduction Study Parameters Correlate with Clinical Staging of Diabetic Polyneuropathy**  
**(表皮内神経線維密度と神経伝導検査のパラメータは糖尿病性多発神経障害の臨床病期と相関する)**

糖尿病の合併症の診療において糖尿病性網膜症や腎症は、病期分類に基づいた治療方針が確立しているが、糖尿病性神経障害については病期分類および治療方針が未だ確立されていない。糖尿病性多発神経障害の診断基準及び病期分類は、神経伝導検査を必須項目とする Dyck の病期分類が標準とされているが、神経伝導検査を施行可能な施設は限られており、一般の診療に適さないのが問題であった。そこで問診と簡便な神経学的診察により行われる糖尿病性多発神経障害の簡易診断基準及び臨床病期分類が、「糖尿病性神経障害を考える会」から提唱されている。今回、学位申請者は糖尿病性多発神経障害の臨床病期分類について、臨床的な神経障害の程度を用いて妥当性を検討する研究を行った。症例は糖尿病患者 44 症例(1 期 20 人、2 期 6 人、3+4 期 12 人、5 期 6 人)で、糖尿病臨床像、神経学的所見、大径神経障害の指標として神経伝導検査、小径神経障害の指標として表皮内神経線維密度、心電図 R-R 間隔変動係数を用い、神経生理学的・病理学的研究を行った。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) 臨床像の特徴について病期間で年齢、BMI、HbA1c、糖尿病罹病歴に有意差はみられなかった。インスリン治療・網膜症・腎症の割合は病期の進行とともに増加し、糖尿病の自然史と関連した。
- 2) 運動及び感覚神経の活動電位・伝導速度は病期の進行とともに有意に低下し、F 波潜時は病期の進行とともに有意に延長し、大径神経障害の指標である神経伝導検査は臨床病期分類と相関した。
- 3) 表皮内神経線維密度及び心電図 R-R 間隔変動係数は、病期の進行とともに有意に低下し、小径神経障害の指標として臨床病期分類と相関した。
- 4) 表皮内神経線維密度と心電図 R-R 間隔変動係数・神経伝導検査のパラメータは相関した。
- 5) 早期の神経障害においても一部に表皮内神経線維密度及び心電図 R-R 間隔変動係数の低下を認めた。また、表皮内神経線維密度の低下は、心電図 R-R 間隔変動係数・神経伝導検査のパラメータの異常よりも先行する可能性が示唆された。
- 6) 今回の検討で糖尿病性多発神経障害の臨床病期分類は小径・大径神経障害を反映し、神経障害の進行の判定、療養指導や治療方針の策定に有用であると考えられた。

本研究は、糖尿病性多発神経障害の臨床病期分類を神経生理学的、病理学的研究によりその妥当性を証明した臨床上有意義な研究内容である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 223 号	学位申請者	有村 愛子
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	出雲 周二	副査 武田 泰生
	副査	米澤 傑	副査 久保田 龍二

主査および副査の5名は、平成24年11月19日、学位申請者 有村愛子君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めるとともに、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 網膜症は必ずしも病期分類と相関していないのは何故か。発症の原因は何が考えられているのか。

(回答) 網膜症を認めない症例数は病期の進行とともに減少を認めたが、前増殖網膜症に関しては、レーザー治療により、病期の進行が止まることから、前増殖・増殖に関しては相関が得られていないと思われる。細小血管障害の原因は高血糖によるポリオール代謝やプロテインキナーゼC (PKC) 活性化、終末糖化産物 (AGE) の蓄積、酸化ストレスなどが原因と報告されている。

質問2) 表皮内神経線維密度と腓腹神経生検の所見、神経伝導検査との相関は報告されているのか。

(回答) Hermannら (Neurology, 1999) により、表皮内神経線維密度は、腓腹神経生検の小径有髄神経の密度と相関し、また腓腹神経伝導検査のSNAPとも相関することが報告されている。

質問3) 表皮内神経線維密度と神経学的所見との関連は報告されているのか。

(回答) 疼痛や温度覚などとの関連は報告されているが、振動覚やアキレス腱反射などとの神経学的所見との相関を示す報告はない。

質問4) 表皮内神経線維密度の評価は、データのばらつきが大きく、神経線維密度をみただけで小径神経障害の有無をいえるのか。もっと詳細な評価について、例えば表皮内で分岐しているもの、表皮内のネットワークなど、どのような評価があるのか？

(回答) 表皮内神経線維密度の評価だけでなく、神経線維の長さを評価する方法もある。表皮内で分岐しているもの、膨化している神経は再生している神経である可能性が指摘されている。

質問5) 論文の Figure 1 の点線の位置がずれているのではないか。

(回答) スライドのように修正した。

質問6) 神経線維の膨化は再生としてとらえていいのか。

(回答) カプサイシンを塗布して、正常者、糖尿病で神経障害のない患者、糖尿病で神経障害のある患者で1年後の表皮内神経線維の再生を観察した研究がある。神経線維の膨化は小径神経の異常所見として考えられている。

質問7) 一般的には大径神経よりも小径神経が先に障害されているのか。

(回答) 例えば、耐糖能異常 (IGT) や早期の糖尿病神経障害、サルコイドーシスなどの患者においても、早期より神経伝導検査が正常であっても表皮内神経線維密度が低下していることが報告されている。糖尿病初期における腓腹神経生検では、小径有髄神経

## 最終試験の結果の要旨

の脱落が優位にみられ、小径有髄神経が先に障害されると考えられている。

質問 8) 皮膚生検が最初に神経障害をとらえられるとしていいのか。

(回答) そのように考えている。

質問 9) 感覚伝導検査の波は何を観察しているのか。

(回答) 神経の活動電位を観察している。

質問 10) 大径神経や小径神経の太さはどのようにして決めているのか。

(回答) Hermann ら (Neurology, 1999) の報告では、 $7\mu\text{m}$  以上を大径有髄神経線維、 $7\mu\text{m}$  未満を小径有髄神経線維と決めている。無髄神経線維は倍率をあげて 5000 倍で観察している。

質問 11) 1 生検検体からどのくらい解析しているのか。

(回答) 共焦点顕微鏡の 40 倍を用いて、1 視野につき Z 軸方向に  $2\mu\text{m}$  ずつ、16 スライスとり、8-10 セクションの平均値を出している。

質問 12) 表皮内神経線維密度を調べることによって病期分類を決めることは可能か。また、1 期・2 期の段階から表皮内神経線維密度にばらつきがあるのはどうしてか。

(回答) 表皮内神経線維密度の程度から病期分類を決めることはできないと考えている。1 期・2 期の早期の神経障害では、神経線維の脱落・再生を繰り返していると考えられていることから、表皮内神経線維密度のばらつきがみられると考えている。

質問 13) 正常者においても表皮内神経線維密度の報告にばらつきがあるのは何故か。他の疾患が混ざっている可能性はないのか。

(回答) 表皮内神経線維密度の評価については、2005 年、Dyck が「Peripheral Neuropathy」を編集するまで施設により異なる神経線維カウント法が用いられてきた。また、観察方法に違い (蛍光免疫法と明視野観察法) もある。一方、検者間での誤差は、基底膜を正確に評価することにより少なくなることが報告されており、正常者でのばらつきは神経線維カウント法、観察方法の違いによることが原因としてあげられる。

また、正常者における表皮内神経線維密度に関する Justin C ら (Arch Neurol, 1998) の報告では、正常者 98 例 (10 歳から 79 歳まで) の選択に際し、糖尿病や癌、化学療法の既往、アルコール多飲の有無などについて、電話調査を行い、神経内科医の診察により、他の神経疾患の合併を否定している。よって他の神経疾患を合併している可能性はないと考えられる。これらの対象においても、IENFD のばらつきを認め、正常者においてできさえも IENFD のばらつきがあるのかもしれない。

質問 14) 血糖コントロールが改善すると、神経線維密度は回復するのか。

(回答) IGT や早期の糖尿病患者では、血糖コントロールや生活習慣の改善により、表皮内神経線維密度が改善することが報告されている。カプサイシン塗布により表皮内神経を脱落させた後、糖尿病神経障害のない患者では表皮内神経線維密度が改善したという報告や、小径神経障害が主体の治療後痛性神経障害では、血糖コントロールにより、表皮内神経線維密度が改善したとの報告がある。自験例でも治療後痛性神経障害で表皮内神経線維密度が改善した症例を経験している。

質問 15) 神経末端が脱落していく機序はわかっているのか。

(回答) 長さ依存性の神経障害がいわれている。解剖学的特徴として、神経突起が長い神経ほど栄養因子が末端まで行き届きにくい、あるいは虚血などの障害を受けやすいことがあり、また生化学的特徴としてインスリン非依存性に糖の取り込みがあり、高血糖の影響による、ポリオール代謝異常やグリケーションなどが関与する可能性も考えている。

質問 16) 1 型糖尿病と 2 型糖尿病の神経障害に差はあるのか？

(回答) 2001 年に報告された日本臨床内科医会の研究によると神経障害の合併は 5 年

～10年の罹病期間では1型糖尿病では29%、2型糖尿病では31%であった。しかし、この研究に用いられた神経障害の診断基準が他の神経疾患を含んでいる可能性がある。調査によって神経障害の診断基準が様々であり、有病率が大きく異なる。1型糖尿病を対象としたEURODIAB IDDM Complication Study (自覚症状と神経学的所見による診断)では罹病歴7年未満では12%、フィンランドで行われた新規診断された2型糖尿病の神経障害 (神経伝導検査による診断) は8.3%と報告されている。

質問17) 臨床病期分類の2期について説明して下さい。

(回答) 両側下肢の末梢優位の症状、振動覚低下、アキレス腱反射異常のいずれか2項目 (DPNの簡易診断基準) を満たし、感覚障害・自律神経障害・運動障害のいずれもなければ2期である。

質問18) 患者の選択についてはどのようにしたか。

(回答) 糖尿病と診断された入院・外来における同意が得られた全ての患者を対象としている。

質問19) インスリン治療の割合が、3+4期で2期よりも少ないようであるが、何故か。

(回答) 大学病院という施設の専門性から、神経障害の病期が早期の段階にある2期の患者においてもインスリン治療を必要とする患者の割合が多いのではないかと考えている。

質問20) 14人の入院患者について、神経所見をとって臨床病期分類を行い、その後生検を行うことによるバイアスはないのか。

(回答) 皮膚生検を施行する日に神経所見を評価するようにしており、臨床病期分類へのバイアスはないと考えている。

質問21) 2期中で1例のSNAPが検出できなかったが、これは妥当な所見といえるのか。

(回答) 神経障害の程度からすると、2期に相当するこの1例は臨床病期分類を過小評価している可能性がある。

質問22) 神経障害は細小血管障害が原因として考えられていることから、表皮に分布する血管を評価することは行ったのか。

(回答) 皮膚生検において基底膜下の血管を評価する方法についてはコンセンサスが得られておらず、評価していない。IGTに対する腓腹神経生検において神経栄養血管の血管壁の肥厚が、10年後の神経障害の進展に関与していることが報告されているが、本研究では腓腹神経生検を行っておらず評価していない。

質問23) 陽性の自覚症状と今回の研究との関連性についてはどうか。

(回答) 有痛性神経障害では表皮内神経線維密度が低下しているという報告があるが、本研究でも同様の結果が得られており、陽性の自覚症状との関連はあると考えている。

質問24) IGTにおける小径神経障害はコンセンサスが得られているか。

(回答) 原因不明の有痛性神経障害の患者を調べるとIGTの存在が多く認められ、表皮内神経線維密度が低下していることがRajaballyら (Acta Neurol Scand, 2011) から報告されている。早期の糖尿病患者の腓腹神経生検で無髄小径神経線維の脱落が報告されている。

質問25) 1期でも尿蛋白陽性、神経障害なしと乖離しているがその理由は何か。

(回答) 合併症の進行の程度が異なる症例を時折認め、遺伝的な背景などが関与すると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。