

図 2. BMI と腹囲の関連

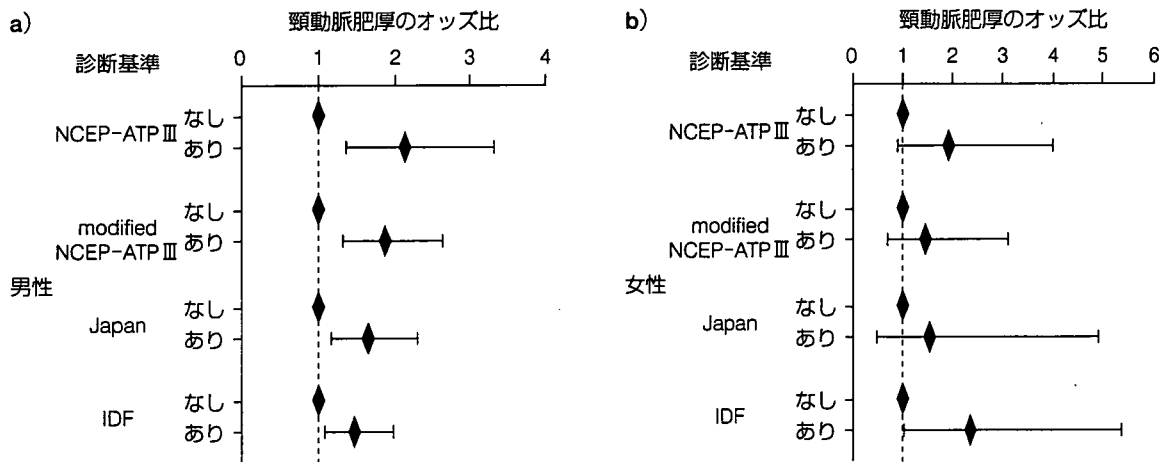


図 3. さまざまな診断基準によるメタボリックシンドロームと頸動脈壁肥厚

ロームと頸動脈硬化との関連が検討、報告されてきたが、そのなかで NCEP-ATP III 基準が、その簡便性という点から最も広く用いられてきたとあってよいだろう。日常臨床において、血中のインスリン値やアルブミン尿などが必ずしも測定されていないことも WHO の基準を用いた検討を少なくしている理由の 1 つとなっている。そのようなこともあり、同一集団を対象にして、いくつかの異なる基準で診断されたメタボリックシンドロームについて、その頻度や、動脈硬化病変の関連などを比較検討した報告は案外少ない。Skilton ら<sup>6)</sup>は、最近の論文で、少なくとも 1 つの心血管危険因子を有している 30~80 歳の症例を対象として、NCEP-ATP III, AHA/NHLBI<sup>5)</sup>, IDF の基準で診断されたメタボリックシンドロームと頸動脈硬化の関連について比較検討している。彼らの検討によるとメタボリックシンドロームの頻度は、男性では NCEP-ATP III (53%) < IDF (61%) <

AHA/NHLBI (66%), 女性では NCEP-ATP III (50%) < IDF (60%) = AHA/NHLBI (60%) の順であった。また、各基準で診断されるメタボリックシンドロームの頸動脈内膜中膜肥厚に対するオッズ比は、男性で IDF < NCEP-ATP III < AHA/NHLBI, 女性で NCEP-ATP III < AHA/NHLBI < IDF の順であった。これらのことから、男性では AHA/NHLBI 基準、女性では IDF 基準によるものが最も強いプレディクターである可能性が示唆される。彼らの知見は、本稿のわれわれの結果と同様に、最適なメタボリックシンドロームの診断基準が男女で異なる可能性を示している、とあっていいだろう。

いくつかの異なるメタボリックシンドロームの診断基準間の比較については、わが国からも他のグループの報告がある。Miyaki ら<sup>7)</sup>は、橈骨足背脈波伝播速度 (baPWV) を測定することで、同一の日本人集団 (工場従業員) において、わが国の基準あるいは IDF 基準で診

断されるメタボリックシンドロームと動脈硬化との関連について比較検討している。その結果、わが国の基準で診断されるメタボリックシンドロームはオッズ比2.08 (95% CI 0.90-4.81) で、IDF 基準で診断されるメタボリックシンドロームはオッズ比2.88 (95% CI 1.30-6.37) でbaPWV 高値と関連していた。さらに、メタボリックシンドロームと診断される割合は、わが国の基準14%、IDF 基準17%であった。IDF 基準のほうが、より多くの症例をメタボリックシンドロームと診断しており、オッズ比、統計的有意性ともわが国の基準と比較して良好であった。

また、われわれも、Skilton らが男性において動脈硬化の最も強いプレディクターとして示したAHA/NHLBI 基準について、他の基準と比較検討してみた。その結果、日本人男性においては、この基準が頸動脈硬化の最良プレディクターであるわけではない、ということを見出している<sup>9)</sup>。

以上から、頸動脈硬化のリスクが高い症例をアイデンティファイするのに、どのメタボリックシンドロームの診断基準を用いれば最適であるか、という問いに答えるためには、人種、性別などを勘案しなくてはならず、案外単純でないことがわかる。さらに、動脈硬化の指標を何に求めるかでも、結果が異なってくることも考えられる。実際、上述した Skilton ら<sup>9)</sup>の報告でも、動脈硬化の指標を頸動脈の内膜中膜肥厚におくか、頸動脈プラークにおくかによって、どの診断基準がもっとも有用であるかが異なっていた。

## おわりに

人間ドック受診症例を対象に、4つの診断基準で診断されるメタボリックシンドロームについて、その頻度、頸動脈内膜中膜肥厚との関連の2点から比較検討した。男性では、メタボリックシンドロームの頻度は、NCEP-ATP III<modified NCEP-ATP III<Japan<IDF の順であり、頸動脈肥厚との関連の強さは、IDF<Japan<modified NCEP-ATP III<NCEP-ATP IIIと、その逆の

順であることが明らかになった。男性では、どの基準を使用するかは、どの程度症例を絞り込むか、という点で異なっているだけである、と考えることもできるだろう。一方女性では、メタボリックシンドロームの頻度はJapan<IDF<modified NCEP-ATP III≒NCEP-ATP IIIであるが、メタボリックシンドロームと診断される頻度が、4つの基準中で最も少なかったわが国の基準は、メタボリックシンドロームと診断される頻度が多かったIDF 基準に比較して、頸動脈内膜中膜肥厚との関連が強いとは結論づけられなかった。

どの基準がもっとも早期動脈硬化病変の危険因子として優れているかは、人種、性別、対象集団によって異なると考えられる。しかしながら実際問題としては、健診や医療機関の受診者にとっては、対象集団によってメタボリックシンドロームの診断基準が違っては、煩雑であるだけでなく、インパクトにかけるようにも思われる。学術的な興味はあるものの、そのような情報を記憶しておくことは実際的ではないだろう。一方で、「メタボリックシンドロームの診断に用いられているコンポーネントをいくつ有しているか」、ということは、より簡単に判断に迷いが生じにくいと考えられるが、それでも充分有用性のある尺度である<sup>9)</sup>ことも忘れてはならないだろう。



## 文 献

- 1) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: *JAMA* 285: 2486, 2001
- 2) Ishizaka N *et al*: *Atherosclerosis* 181: 381, 2005
- 3) Matsuzawa Y: *J Jpn Soc Int Med* 94: 188, 2005
- 4) International Diabetes Federation, <http://www.idf.org/home>. 2005
- 5) Alberti KG *et al*: *Lancet* 366: 1059, 2005
- 6) Skilton MR *et al*: *Atherosclerosis* 190: 416, 2007
- 7) Miyaki K *et al*: *J Occup Health* 48: 134, 2006
- 8) Ishizaka N *et al*: *Atherosclerosis*, 2007 (in press)
- 9) Azevedo A *et al*: *BMC Cardiovascular Disorders* 7: 17, 2007



# 肥満がひき起こす メタボリックシンドローム

石坂 信和

厚生労働省が予防医学の観点からわが国の健康政策に導入し、「腹囲」というきわめてシンプルな診断基準と相まって、またたくまに国民に認知された“メタボリックシンドローム”。ここでは、「メタボリックシンドロームとは何か」という基本を、基礎研究の蓄積により明らかにされつつあるメカニズムを中心に紹介しよう。

## はじめに

脂肪組織は、単にエネルギーを貯蔵する臓器ではなく、さまざまな生理活性ペプチドを分泌する臓器であることが明らかになってきた(図1)。これらの生理活性物質はアディポサイトカイン(アディポカイン)とよばれる。アディポサイトカインにはアディポネクチン、レプチンなどのように脂肪細胞特異的に産生されるもの、腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、MCP-1などのように、脂肪細胞特異的ではないが、脂肪細胞においても産生されるものが含まれる。肥満、つまり脂肪細胞の肥大化は、脂肪細胞からのアディポカインの分泌パターンに変化を与え、メタボリックシンドロームの発症に関与することが明らかになってきた。これは、「肥満がメタボ

リックシンドロームをひき起こすメカニズム」として注目されている。

## メタボリックシンドロームとは？

—その疾患概念—

脂肪組織は、おもに皮下(皮下脂肪)や腹部の内臓周囲(内臓脂肪)に存在する。内臓脂肪の肥大化は、インスリン抵抗性を著しく増強することが明らかになってきた。インスリン抵抗性とは、インスリンが、場合によっては過剰に存在するにもかかわらず、その作用が障害されることにより、肝臓や骨格筋における糖の取込みがうまくいかず、血糖を十分に降下させることができない状態である。メタボリックシ

### サイトカイン

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1

### ホルモン

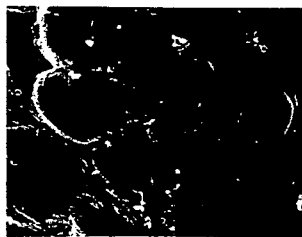
レプチン, レジスチン, アディポネクチン, アンジオテンシノーゲン

### 補体

アディプシン, 補体B, ASP

### 酵素

P450 アロマトラーゼ,  
17 $\beta$ HSD,  
17 $\beta$ HSD1, PAI-1, LPL,  
CTEP, ACE



脂肪組織

### プロスタサイクリン

PGE<sub>2</sub>

### 成長因子

VEGF, HGF

図1 脂肪細胞はさまざまなアディポサイトカインを分泌している [A. Pietroほか, *Diabetes*, 54, 917 (2005) より改変して引用]

ドロームは、内臓脂肪の肥大化などによってもたらされるインスリン抵抗性を基盤にして発症すると考えられている病態で、高血圧、高血糖、脂質異常のすべて、あるいはいくつかが集積している状態である。

欧米諸国のみならず、わが国においても、メタボリックシンドロームの増加が社会問題として顕在化している。この状況をうけ、2005年に8学会（日本肥満学会、日本動脈硬化学会、日本糖尿病学会、日本高血圧学会、日本循環器学会、日本腎臓病学会、日本血栓止血学会、日本内科学会）が合同で、わが国におけるメタボリックシンドロームの診断基準を作成した。この基準では、腹囲が男性で85 cm、女性で90 cmを超えることがメタボリックシンドローム診断の必須条件となっているため、「お腹がでていること＝メタボリックシンドローム」であるかのような誤解もあるようである。腹囲は内臓脂肪蓄積の目安であるので、たしかに「お腹がでていること」はメタボリックシンドローム発症の重要な背景因子であるということではある。海外のメタボリックシンドローム

の診断基準では、腹囲基準合致が必須条件でないものもある（図2）。

メタボリックシンドロームの診断基準をみると、血圧や血糖値などの、動脈硬化の主要な危険因子が、その構成要素に含まれていることがわかる。メタボリックシンドロームが存在すると、脳血管障害や心筋梗塞のリスクが上昇する所以である。どの基準においても「善玉コレステロール（HDLコレステロール）の低下」は、診断の構成要素に入っている。一方、確立された動脈硬化の危険因子である「悪玉コレステロール（LDLコレステロール）の上昇」は、インスリン抵抗性との関連が弱いので、メタボリックシンドロームの構成要素には含まれていない。

メタボリックシンドロームという名称は1999年にWHO（世界保健機関）により提唱された。一方、高血圧、高血糖、脂質異常がクラスターを形成して発症することは、1990年以前から知られており、死の四重奏、シンドロームX、インスリン抵抗性症候群などとよばれていた。20年くらい前か

	WHO (1999年)	米国(NCEP-ATPⅢ) (2001年、2004年改訂)	国際糖尿病連盟(IDF) (2005年、2007年改訂)	日本 (2005年)
肥満	糖尿病、IFG、IGT、インスリン感受性低下に加え、以下の二つ以上 ウエスト/ヒップ比>0.90(男) ウエスト/ヒップ比>0.85(女) and/or BMI>30 kg/m <sup>2</sup>	以下の五つの項目のうちから三つ以上 腹囲>102 cm(男) 腹囲>88 cm(女)	腹囲≥90 cm(男) 腹囲≥80 cm(女) *日本人向け基準値 に加えで以下の二つ以上	腹囲≥85 cm(男) 腹囲≥90 cm(女) に加えて以下の二つ以上
脂質異常	中性脂肪≥150 mg/dL and/or HDL-C<35 mg/dL(男) HDL-C<39 mg/dL(女)	中性脂肪≥150 mg/dL HDL-C<40 mg/dL(男性) HDL-C<50 mg/dL(女性)	中性脂肪≥150 mg/dL and/or中性脂肪低下薬使用 HDL-C<40 mg/dL(男) HDL-C<50 mg/dL(女) and/or-HDL-C改善薬使用	中性脂肪≥150 mg/dL and/or HDL-C<40 mg/dL
血圧	血圧≥140/90 mmHg	血圧≥130/85 mmHg and/or降圧剤使用	血圧≥130/85 mmHg and/or降圧剤使用	血圧≥130/85 mmHg
糖	糖尿病、IFG、or IGT	食前血糖≥100 mg/dL	食前血糖≥100 mg/dL	食前血糖≥110 mg/dL
その他	微量アルブミン尿			

IFGは空腹時血糖異常、IGTは耐糖能異常（上昇した血糖値を正常値に戻せない、糖負荷試験の2時間値の血糖が140 mg/dLから200 mg/dLの間に上昇している状態）。BMIは体重と身長から算出した肥満の指標で、[体重(kg)]/[身長(m)]<sup>2</sup>で表される。日本肥満学会で定められた標準値は22 (kg/m<sup>2</sup>)。25以上が肥満、18以下がやせ。

図2 メタボリックシンドロームの診断基準

らメタボリックシンドロームに相当する病態は、臨床的には知られていたわけである。メタボリックシンドロームの個々の構成要素は、動脈硬化の危険因子として確立しており、また、降圧剤や抗糖尿病薬などによる治療はメタボリックシンドロームの有無と関係なく行われることから、メタボリックシンドロームを、わざわざ新たな疾患概念として提唱する必要性を疑問視する意見もある(文献1)。メタボリックシンドロームというのは単一の疾患概念としてではなく、一連の病態を表している概念ととらえるべきであろう。

近年、肥満やメタボリックシンドロームが改めて注目されているもう一つの理由として、冒頭でも述べたように、精力的な基礎研究により、新たなアディポサイトカイン、およびその受容体が発見され、シグナルトランスダクション(情報伝達)が明らかになり、新しいアプローチの可能性が見えてきたことも背景にあるといえる。

### 肥満とメタボリックシンドロームをむすぶ “アディポサイトカイン”

肥満は、脂肪細胞の肥大によって生じる。肥満はインスリ

ン抵抗性を増悪させ、糖尿病や高血圧、メタボリックシンドロームを惹起することは臨床的によく知られている。脂肪細胞からは、さまざまなアディポサイトカインが分泌されているが(図3)、その中にはメタボリックシンドロームを抑制する方向に働く「善玉」アディポサイトカインと、メタボリックシンドロームを促進する方向に働く「悪玉」アディポサイトカインが存在する。「善玉」アディポサイトカインとしては、アディポネクチンやレプチンなどが、また「悪玉」アディポサイトカインとしては、TNF- $\alpha$ やMCP-1などがあげられる(表1)。

肥満のときに増加する、肥大化脂肪細胞は、非肥満の場合の小型脂肪細胞とは「善玉」アディポサイトカインの分泌パターンが異なることが明らかになってきており、このことが肥満とメタボリックシンドロームを結ぶメカニズムであると考えられている(図3)。すなわち、非肥満脂肪細胞では、「善玉」アディポサイトカインを多く分泌しているが、肥大化脂肪細胞では「善玉」アディポサイトカインの分泌は低下し、「悪玉」アディポサイトカインの分泌が増加する、というパターンに陥っている(文献10)。

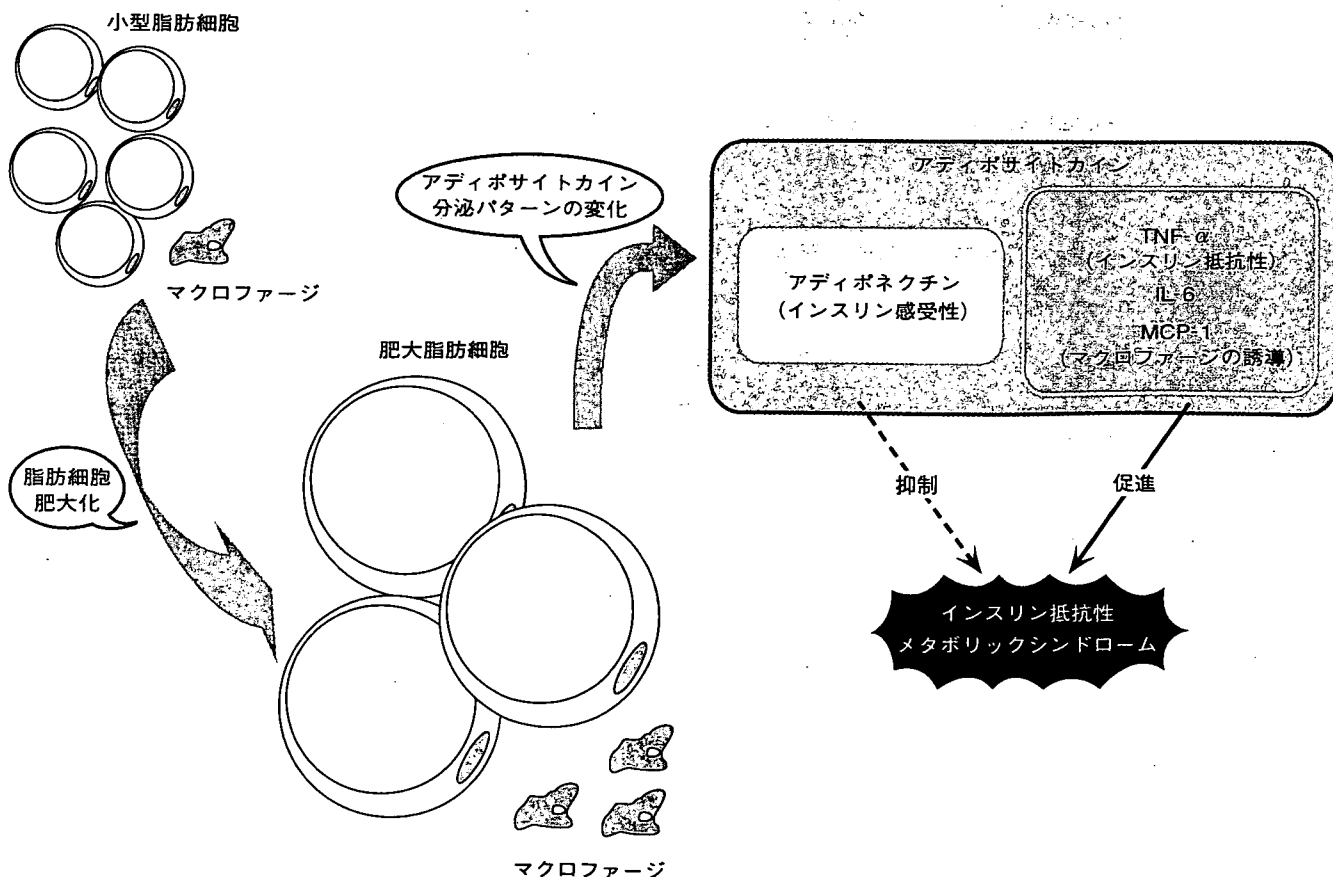
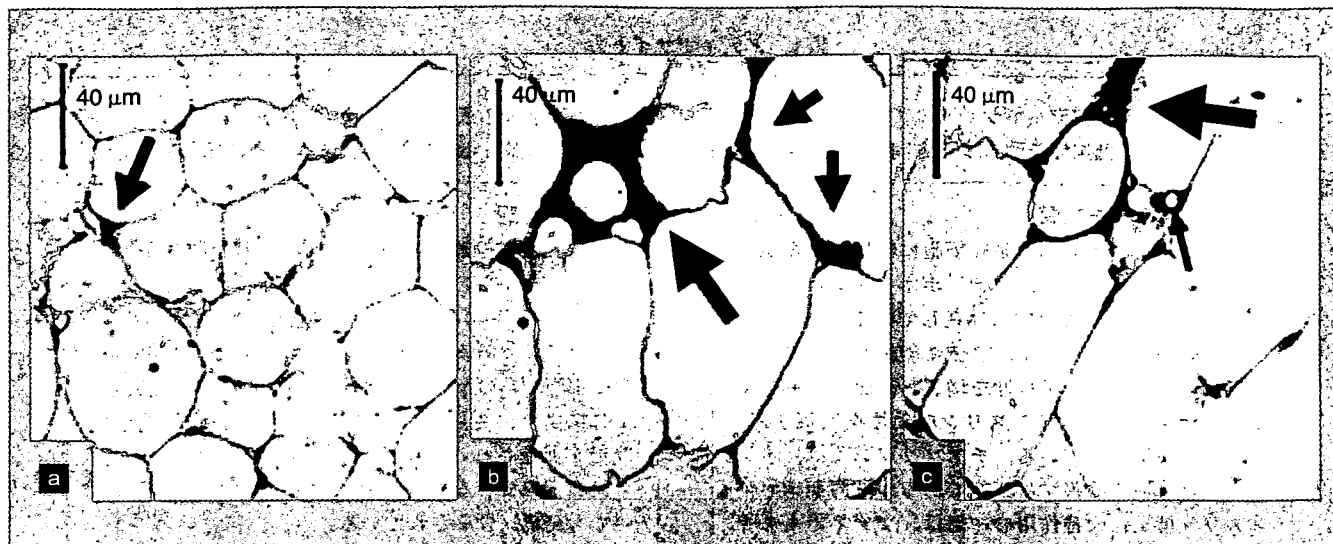


図3 脂肪細胞の肥大化とアディポサイトカイン

表1 アディポサイトカイン

善玉アディポサイトカイン (インスリン抵抗性を改善する方向にはたらく)	悪玉アディポサイトカイン (インスリン抵抗性を増悪する方向にはたらく)
<p>■アディポネクチン■</p> <p>アディポネクチンは、脂肪細胞に特異的に発現しているペプチドである。アディポネクチンは5~10 µg/mLの高い濃度で血中に存在しているが、肥満や内臓脂肪増加で減少する。アディポネクチンの分泌低下は、インスリン抵抗性を増悪し、逆に、アディポネクチンの投与はインスリン感受性を回復する。臨床でも使用されている、チアゾリジン薬は、インスリン抵抗性を改善する薬剤であるが、同薬剤のインスリン抵抗性改善作用の一部は、アディポネクチン分泌亢進を介したものである可能性がある。</p> <p>血中アディポネクチンが低値となる一塩基多型(SNP)の保持者においてインスリン抵抗性が亢進していたことも、アディポネクチンがインスリン抵抗性のコントロールに重要な働きをしていることを支持している(文献2)。また、メタボリックシンドロームを増加させる喫煙は、アディポネクチンを低下させることも知られている。アディポネクチンは血中において、高分子量、中分子量、低分子量の少なくとも3種以上の多量体構造をとっている。これらの中では高分子量アディポネクチンが最もAMPキナーゼの活性化能が高く、脂肪酸を酸化して中性脂肪の蓄積を減らす。血中の総アディポネクチンよりも高分子量アディポネクチン比(高分子量/総アディポネクチン)の方が、インスリン抵抗性の予測においてより優れたバイオマーカーである、と報告されている(文献3)。</p> <p>山内敏正らは7回膜貫通型のアディポネクチン受容体 AdipoR1, AdipoR2を同定している。今後AdipoR1もしくはAdipoR2欠損動物を用いた解析から、さらなる新知見が得られるものと期待される(文献4)。</p>	<p>■TNF-α■</p> <p>肥大化脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸がマクロファージからのTNF-α分泌を促進すると考えられている。TNF-αは、インスリン抵抗性を惹起するサイトカインである。マクロファージからのTNF-αが、脂肪細胞からのMCP-1(下記参照)の分泌を促進し、これにより、さらにマクロファージの脂肪組織への遊走が促進されるという、悪循環が存在する可能性も提唱されている(文献5)。TNF-αは脂肪組織においても発現、分泌されている。</p>
<p>■レプチン■</p> <p>肥満マウスの原因分子として同定されたレプチンは、脂肪組織から分泌されるホルモンである。レプチンは、おもに視床下部に働きかけ、摂食抑制にはたらく。しかし、臨床的に肥満者ではレプチン抵抗性が存在することが提唱されており、血中レプチン濃度が高くても摂食抑制が働かないケースもある。肝臓におけるレプチンの過剰発現は著しいやせとインスリン感受性亢進に働く。レプチンも骨格筋でAMPキナーゼを活性化し、脂肪酸酸化促進が生じることが示されている。</p>	<p>■MCP-1■</p> <p>肥満の初期から脂肪組織では、MCP-1の発現が亢進している。MCP-1には、マクロファージ誘導作用がある。脂肪組織特異的に、MCP-1を過剰発現させると、脂肪組織におけるマクロファージが増加し、TNF-α, IL-6の発現が亢進し、耐糖能低下、インスリン抵抗性亢進が認められた(文献6)。逆に、MCP-1や、その受容体の欠損マウスにおいてはマクロファージの脂肪組織への浸潤の低下に加え、インスリン抵抗性、脂肪肝の改善が認められている(文献7,8)。</p>
	<p>■レジスチン■</p> <p>肥満によりレジスチンの発現は亢進し、チアゾリジン誘導体により低下する。レジスチンは、約100アミノ酸からなる比較的小さなタンパク質であり、おもに脂肪組織で発現している。レジスチンの抑制がインスリン作用を改善し、レジスチンの投与は耐糖能を低下する(文献9)。ヒトにおいては、レジスチンの主たる産生臓器はマクロファージであり、ヒトの血中レジスチン濃度が肥満や2型糖尿病に関連していたという報告もあるが、その役割は、いまだ議論のあるところでもある。</p>



a) Lean マウス：野生型マウス，b) diet-induced 肥満マウス：高脂肪食負荷肥満マウス，c) leptin-deficient 肥満マウス：レプチン欠損肥満マウス．肥満モデルの脂肪細胞では，F4/80（マクロファージのマーカー）陽性の細胞（矢印）の増加を認める．色矢印は，より集積した状態のものを示す．

図4 肥満による脂肪細胞へのマクロファージの集積 [S. P. Weisberg ほか, *J. Clin. Invest.*, 112, 1796 (2003) より改変して引用]

また、循環血液中のマクロファージも重要な役割を果たすと考えられている。すなわち、肥満が存在するとマクロファージ誘導作用のある「悪玉」MCP-1が発現し、循環血液中のマクロファージが脂肪組織へ浸潤する(図4)。活性化したマクロファージから分泌されるサイトカインTNF- $\alpha$ はそれ自体がインスリン抵抗性を惹起するうえ、脂肪細胞からのMCP-1の発現を促し、それがまたマクロファージをよび寄せるといふ悪循環をうながすとされている。(表1, 文献5)。このようにマクロファージは脂肪細胞肥大による形質転換を誘導する。一方、非肥満の場合、小型脂肪細胞から分泌されるアディポカインは、マクロファージの脂肪細胞への浸潤や活性化を抑制していると考えられている。

脂肪細胞の肥大化が、どのようにしてこのようなアディポサイトカイン分泌パターンの変化につながるについては不明な点が多い。

### 皮下脂肪の影響は？

肥満により、内臓脂肪が沈着し脂肪細胞が大型化すると、アディポサイトカインの分泌様式が変わってメタボリックシンドロームが誘導される、という流れを説明したが、皮下脂肪についてはどうだろうか？ 運動して皮下脂肪が減ると、インスリン抵抗性は改善するし、糖尿病のコントロールもよくなる。皮下脂肪も内臓脂肪と同様に糖・脂質代謝に相当悪

影響があるのではないかと感じられる方も少なくないだろう。

このことに関連して、興味深いデータがある。2004年に臨床医学の一流紙である *The New England Journal of Medicine* に掲載された論文では、BMI (= [体重(kg)]/[身長(m)]<sup>2</sup>) が平均35 kg/m<sup>2</sup> (!) を超える著明な肥満症の症例に対して皮下脂肪吸引を行い、脂肪吸引の前後における代謝異常の程度を比較した結果を報告している(図5)。おどろいたことに、皮下脂肪の吸引は、血圧、糖・脂質代謝異常には有意な影響を与えず、さらに血中のアディポネクチンやTNF- $\alpha$ の濃度にも影響を与えない、という結果だった。皮下脂肪の吸引では、(美容に対する効果はあるだろうが)メタボリックシンドロームの状態を改善することはできなかったことは、やはり、内臓肥満の改善がメタボリックシンドロームのコントロールに重要であることをサポートする結果であるといえる。

### おわりに

脂肪組織が単なるエネルギーの貯蔵庫ではなく、生理活性物質の産生・放出により全身の器官にアクティブに働きかける臓器であることが明らかになってきた。これには、わが国の研究者の日夜を分かたぬ研究も大いに貢献している。メタボリックシンドロームの疾患概念は本当に必要であるか、ま

腹部の写真

CT画像

脂肪吸引前



脂肪吸引後



このような皮下脂肪吸引治療では、インスリン抵抗性の改善は得られなかった。

図5 高度肥満者の皮下脂肪吸引 [S. Kleinほか, *The New England Journal of Medicine*, 350, 2549 (2004) より改変して引用]

た、診断には、どのような基準が最適であるか、など未解決な点もある。しかしながらこれらのことは、(内臓)肥満を背景因子として、血圧、糖・脂質代謝異常が「ひとまとめでなって発症してくる」ことを認識、理解することの重要性をいささかも減じないだろう。飽食、高齢化の時代にあっては、肥満によるメタボリックシンドロームの発症機序を解明し、それに基づき新たな治療法を提案する、というトレンドは一時のブームに終始せず、ますます加速されていくものと思われる。

#### 参考文献

1. R. Kahn, *Circulation*, 115, 1806 (2007); R. S. Beaserほか, *Circulation*, 115, 1812 (2007).
2. Y. Matsuzawa, *Atheroscler Suppl.*, 6, 7 (2005).
3. K. Haraほか, *Diabetes Care*, 29, 1357 (2006).
4. T. Yamauchほか, *Nat. Med.*, 13, 332 (2007).
5. T. Suganamiほか, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25, 2062 (2005).
6. N. Kameiほか, *J. Biol. Chem.*, 281, 26602 (2006).
7. H. Kandaほか, *J. Clin. Invest.*, 116, 1494 (2006).
8. S. P. Weisbergほか, *J. Clin. Invest.*, 116, 115 (2006).
9. C. M. Steppanほか, *Nature (London)*, 409, 307 (2001).
10. P. Trayhurnほか, *Br. J. Nutr.*, 92, 347 (2004).

#### あいまいな診断基準に混乱も

—なぜ腹囲の基準値は女性の方が大きいのか?—

メタボリックシンドロームをわざわざ新たな疾患概念として提唱する必要があるのかとの議論(文献1)がある一方、診断基準に対しても議論がある。メタボリックシンドロームの診断基準は図2のように世界的に統一されていない。こちらの診断基準を使えばメタボリック症候群だが、こちらの基準を使うとそうではないということも起こりうる。必須とする診断項目や、どの項目を重視するかということから、男女共通の値を採用するか男女別の値を採用するかということまでさまざまだ。

たとえば日本の基準値は男女共通の値だが、図2の日本以外は男女別の値を採用している。腹囲は男女別の値だと思われるだろうが、そうではない。腹囲決定の基盤である、「病気のリスクが高まる内臓脂肪面積は100 cm<sup>2</sup>以上」は、男女混合のCTスキャンデータから割り出した男女共通の値だ。その上で、男女別に内臓脂肪面積 vs 腹囲のグラフを作成し、そこから内臓脂肪面積100 cm<sup>2</sup>以上の腹囲をそれぞれ割り出している。そのため皮下脂肪の多い女性の基準値は男性より5 cm大きい。

内臓脂肪面積の基準値の算出方法への異論や、検討した女性の人数(196人)が男性(559人)と比べて少ないことなどから、国内では腹囲の基準値に対する議論がある。また、国際糖尿病連合(IDF)が日本人向けの基準値を男性90 cm以下、女性80 cm以下と修正したこともあり、混乱も起きている。



## Effect of *in vitro* Cultured *Anoectochilus formosanus* on Lipid Metabolism in Clinical Uses

Xiao-Ming Du,\* Ning-Yi Sun,† Norihiro Furusho,‡ Jun Hayashi‡ and Yukihiro Shoyama\*

\*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, †Graduate School of Medical Sciences

Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

‡Seiwa Pharmaceuticals Ltd., 1-12-15 Shiba-Daimon, Minato-ku, Tokyo 105-8585, Japan

**Abstract:** A clinical study was performed on the effect of *in vitro* cultured *Anoectochilus formosanus* HAYATA on lipid-metabolism. Sixty-six volunteers, including 36 healthy, 14 high-triglyceride-, 11 high-cholesterol- and 5 high-triglyceride- and high cholesterol- subjects, were administrated with *A. formosanus* (450 mg/day) for 6 months or 12 months. *A. formosanus* significantly decreased the concentrations of the serum levels of cholesterol, low density lipoprotein and very low density lipoprotein in all volunteers. The results of the present study suggested that *A. formosanus* might function as a liver activator resulting in improvement of lipid-metabolism.

**Keywords:** *Anoectochilus formosanus*; Lipid Metabolism; Clinical Uses.

### Introduction

Hyperlipidemia and obesity following customs of livelihood is a major health problem in developed nations with the escalation of obesity-related disease. The prevalence is increasing even in developing countries. This condition is associated with increased risk of cardiovascular, cerebrovascular, and type II diabetes. The magnitude of this health problem gives impetus to probe effective therapy, especially with natural crude drugs.

*Anoectochilus formosanus* HAYATA is an orchidaceous perennial herb. The whole plant has been used since ancient times as a folk remedy for the treatment of fever, pleurodynia, consumption, underdeveloped children, nephritis, and liver diseases. Recently, this herbal drug has also been used to treat hypertension and diabetes etc. (Kan, 1986; Zheng *et al.*,

Correspondence to: Dr. Yukihiro Shoyama, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel: (+81) 92-642-6545, Fax: (+81) 92-642-6580, E-mails: shoyama@phar.kyushu-u.ac.jp; shoyama@shoyaku.phar.kyushu-u.ac.jp.  
Present address: Faculty of Pharmaceutical Science, Nagasaki International University, 2825-7, Hausutenbosu-cho, Sasebo, Nagasaki 859-3298, Japan. Tel: (+81) 956-20-5653, E-mail: shoyama@niu.ac.jp

1996). Since the natural sources of *A. formosanus* have been largely depleted, commercial substitutes and adulterants are found in the Chinese herbal market (Lin and Namba, 1981a; 1981b). We therefore have started to investigate the micropropagation of this species by tissue culture techniques, and its chemical components and pharmacological profiles (Du *et al.*, 1998; 2000a; 2000b; 2000c; 2002). In the present paper, we report the effect of *in vitro* cultured *A. formosanus* on lipid metabolism in human volunteers.

## Materials and Methods

### *Plant Material and Preparation of Tablets*

*A. formosanus* was cultured *in vitro* in Seiwa Pharmaceuticals Ltd. by non-symbiotic germination and clonal propagation as described before (Du *et al.*, 2000b). The ripened fruits of *A. formosanus* plants were sterilized, and seeds in fruits were cultured on 1/2 MS medium supplemented with 1 mg/l 6-benzylaminopurine (BA) and 2 g/l peptone. The seeds were germinated at 25°C. After 30 days, the seeds germinated and formed protocorms. Afterwards, the seedlings, 6–8 mm in length, were transferred to 1/2 MS liquid medium to produce the multiple shoot complexes. They were cultured in 1/2 MS liquid medium supplemented with 0.3 mg/l BA and 0.03 mg/l  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) under shaking at 30 rpm. After 2 months, they were transferred to 1/2 MS liquid medium without growth regulator and stayed for 4 more months under the same condition resulting in 15 cm high and 2.8–3.3 g fresh weight per plant. The dried whole plants of *A. formosanus* were powdered and manufactured to tablets with excipient. Each tablet contains 37.5 mg of *A. formosanus* powder.

### *Subjects*

The clinical study was carried out in The Hospital of Medical Sciences, Kyushu University. Sixty-six subjects, 38 men and 28 women, aged 18–67 years with average age of 33.9 years were recruited for the study. The subjects participated voluntarily after a detailed explanation of the study protocol. None were taking any medication or vitamin supplementation during the study period.

### *Study Design*

The subjects were classified into 4 groups, normal healthy level [36 volunteers, triglyceride (TG): 30–150 mg/dl, total cholesterol (TC): 120–220 mg/dl], high-TG level (14 volunteers, TG: > 151 mg/dl), high-TC level (11 volunteers, TC: > 221 mg/dl), and high-TG and TC level (5 volunteers: TG: > 151 mg/dl; TC: > 221 mg/dl). The subjects were administered the tablets of *A. formosanus* for 6 months. After that, 21 volunteers in the normal health level, 7 volunteers in the high-TG level, 11 volunteers in the high-TC level, and 5 volunteers in the high-TG and TC level were further administered the tablets of *A. formosanus* for

6 months. During the treatment, the volunteers took 4 tablets of *A. formosanus* for 3 times per day (be equal to the powder of plant 450 mg/day).

#### *Anthropometry*

Physical examinations were measured by body weight, height, body mass index (BMI, weight/height<sup>2</sup>, kg/m<sup>2</sup>), and percent body fat (%). These were taken before and immediately after the end of treatment period.

#### *Serum Biochemical Parameters*

Blood samples were collected and analyzed before and after the end of the study period. The serum biochemical parameters measured were fasting blood TG, TG, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), chylomicron (CM), apolipoprotein (Apo A-I, Apo B, Apo E), glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP), cholinesterase (ChE), creatine phosphokinase (CPK), uric acid (UA), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) and hemoglobin A1C (HbA1C). These were measured following routine clinical laboratory procedures. The arteriosclerotic index (A.I.) was calculated by the equation of TC-HDL-C/HDL-C.

#### *Statistic Analysis*

Values were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed by Mann Whitney U-test and Wilcoxon signed rank test. The results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### **Results**

#### *Normal Health Subjects*

There were no significant differences in all anthropometry and serum biochemical parameters during 6 months of the administration period. On the other hand, the level of Apo E decreased significantly after 12-months-treatment and that of VLDL was also decreased remarkably (Table 1).

#### *High-TG Subjects*

The levels of TC, VLDL and Apo E were significantly lower after 12-months-treatment, although no difference was observed after 6 months-treatment (Table 2). The level of TG was decreased gradually during 12 months. The ratio of Apo B/Apo A-I was  $0.74 \pm 0.20$  after 6-months-treatment, while this was reduced to  $0.60 \pm 0.27$  after further 6-months-treatment.

**Table 1. Effect of *Anoetochilus formosanus* on Lipid Metabolism in Normal Health Subjects**

		0 Month	6 Months	6 Months	12 Months
		(36 Volunteers)		(21 Volunteers)	
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	23.9 ± 3.2	23.9 ± 3.1	23.7 ± 3.1	23.8 ± 3.3
Percent Body Fat	(%)	28.1 ± 4.6	29.4 ± 4.1	28.5 ± 4.4	28.2 ± 3.9
TG	(mg/dl)	90.1 ± 30.7	95.7 ± 41.4	93.9 ± 27.0	80.7 ± 25.9
TC	(mg/dl)	177.9 ± 31.4	183.7 ± 33.0	189.3 ± 25.3	178.3 ± 28.8
HDL-C	(mg/dl)	58.8 ± 13.2	54.5 ± 10.1	60.2 ± 15.1	54.7 ± 11.9
LDL	(mg/dl)	100.1 ± 26.2	109.3 ± 26.9	106.3 ± 21.9	107.4 ± 26.9
VLDL	(mg/dl)	124.9 ± 56.4	129.6 ± 61.8	129.9 ± 53.5	85.8 ± 36.5**
Apo A-I	(mg/dl)	147.6 ± 20.7	149.3 ± 21.8	148.8 ± 22.2	147.1 ± 27.6
Apo B	(mg/dl)	58.8 ± 13.2	79.9 ± 21.5	85.2 ± 17.0	93.5 ± 36.3
Apo E	(mg/dl)	5.1 ± 1.6	5.1 ± 1.3	5.1 ± 1.4	4.2 ± 0.9*
AST	(IU/l)	16.3 ± 5.5	16.9 ± 6.2	17.7 ± 6.5	18.2 ± 6.3
ALT	(IU/l)	17.7 ± 10.5	18.5 ± 11.7	19.1 ± 12.2	18.9 ± 10.3
ALP	(IU/l)	162.6 ± 53.2	160.4 ± 43.0	165.2 ± 63.9	159.0 ± 58.8
γ-GPT	(IU/l)	30.8 ± 34.2	31.8 ± 37.6	27.5 ± 19.5	31.5 ± 34.0

Values are presented as mean ± SD.

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 significantly different to those before treatment.

**Table 2. Effect of *Anoetochilus formosanus* on Lipid Metabolism in High-Triglyceride Subjects**

		0 Month	6 Months	6 Months	12 Months
		(14 Volunteers)		(7 Volunteers)	
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	25.6 ± 4.2	25.5 ± 4.4	25.4 ± 1.8	25.3 ± 2.3
Percent Body Fat	(%)	26.8 ± 7.2	27.8 ± 8.1	26.7 ± 6.6	26.7 ± 9.2
TG	(mg/dl)	242.4 ± 77.6	204.3 ± 48.2	207.6 ± 38.1*	159.3 ± 34.7**
TC	(mg/dl)	208.2 ± 50.4	203.9 ± 36.4	223.7 ± 56.2	202.4 ± 47.6*
HDL-C	(mg/dl)	45.9 ± 10.5	44.0 ± 11.5	49.9 ± 9.3	47.7 ± 10.2
LDL	(mg/dl)	115.6 ± 46.0	119.0 ± 33.2	132.2 ± 48.8	122.9 ± 45.3
VLDL	(mg/dl)	323.2 ± 87.3	321.7 ± 82.7	329.0 ± 77.7	165.0 ± 37.4**
Apo A-I	(mg/dl)	141.6 ± 29.0	140.0 ± 23.7	146.1 ± 21.2	158.6 ± 33.6
Apo B	(mg/dl)	104.6 ± 24.6	102.4 ± 24.4	108.1 ± 29.9	99.9 ± 53.9
Apo E	(mg/dl)	7.2 ± 2.3	6.9 ± 1.4	7.3 ± 2.0	5.8 ± 1.2*
AST	(IU/l)	24.6 ± 10.6	21.6 ± 6.7	23.4 ± 12.9	19.4 ± 6.5
ALT	(IU/l)	31.7 ± 19.5	27.6 ± 18.4	27.9 ± 20.6	22.0 ± 10.5
ALP	(IU/l)	204.2 ± 50.3	198.3 ± 54.6	198.0 ± 59.8	203.1 ± 77.9
γ-GPT	(IU/l)	62.1 ± 65.2	52.9 ± 43.1	56.1 ± 74.1	55.4 ± 61.2

Values are presented as mean ± SD.

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 significantly different to those before treatment.

### High-TC Subjects

The levels of AST and ALT were significantly lower after 6-months-treatment. These levels, however, returned to the original values after 12-months-treatment. The levels of VLDL and Apo E were significantly lower after 12-months-treatment (Table 3).

Table 3. Effect of *Anoectochilus formosanus* on Lipid Metabolism in High-Cholesterol Subjects

		0 Month	6 Months (11 Volunteers)	12 Months
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	25.8 ± 2.7	25.6 ± 3.1	25.6 ± 3.0
Percent Body Fat	(%)	25.6 ± 5.3	26.6 ± 5.8	25.4 ± 5.0
TG	(mg/dl)	227.0 ± 54.7	166.6 ± 46.6*	143.7 ± 50.3**
TC	(mg/dl)	248.5 ± 24.2	239.9 ± 18.5	235.8 ± 25.7
HDL-C	(mg/dl)	53.9 ± 12.5	50.3 ± 13.0	53.1 ± 14.8
LDL	(mg/dl)	156.3 ± 36.5	155.2 ± 24.8	160.3 ± 33.8
VLDL	(mg/dl)	289.9 ± 126.3	282.0 ± 132.6	150.0 ± 53.4*
Apo A-I	(mg/dl)	153.2 ± 31.2	146.0 ± 27.1	156.6 ± 39.5
Apo B	(mg/dl)	125.2 ± 14.5	120.0 ± 20.5	128.0 ± 56.3
Apo E	(mg/dl)	7.2 ± 2.9	6.9 ± 1.5	5.9 ± 1.5*
AST	(IU/l)	27.6 ± 10.0	21.3 ± 6.8*	24.9 ± 9.5
ALT	(IU/l)	35.3 ± 19.6	27.3 ± 14.4*	35.6 ± 18.4
ALP	(IU/l)	208.6 ± 53.8	207.0 ± 48.4	211.7 ± 56.5
γ-GPT	(IU/l)	84.9 ± 71.0	71.5 ± 61.8	78.4 ± 89.3

Values are presented as mean ± SD.

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 significantly different compared to those before treatment.

#### High-TG • TC Subjects

The levels of TC, LDL, AST and ALT were significantly lower after both 6-months- and 12-months-treatment. The level of VLDL was significantly decreased after 12-months-treatment. Furthermore, the levels of glucose and HbA<sub>1c</sub> were lower after 12-months-treatment compared to those before the treatment, although no significant difference was observed (Table 4).

There were no adverse effects observed during and after the treatment period.

#### Discussion

We selected volunteers who were not taking any medication or vitamin supplements for the clinical study. Furthermore, patients for primary care were selected from the university hospital. This is the reason why it was quite difficult to control the balance of individual group.

The levels of TC and TG higher than 220 mg/dl and 150 mg/dl in serum, respectively, were considered to be hyperlipidemic. Since the VLDL and LDL levels depend on the increases of TC and TG, it is considered that the high-TC or TG levels may possibly induce high-lipoprotein. Cholesterol status is considered as an important factor, since the correlation has been established between the serum cholesterol level and risk of coronary heart disease, as well as the severity of atherosclerosis (Goldbourt *et al.*, 1985; Stamler *et al.*, 1986). Moreover, the increases of VLDL and LDL levels were also observed in the diseases of obesity, diabetes and nephrosis. Administration of *A. formosanus* significantly decreased the levels of TC, VLDL, LDL and Apo E. The results of the present study

**Table 4. Effect of *Anoectochilus formosanus* on Lipid Metabolism in High-Triglyceride • Cholesterol Subjects**

		0 Month	6 Months (5 Volunteers)	12 Months
<b>BMI</b>	(kg/m <sup>2</sup> )	25.2 ± 2.2	24.7 ± 2.1	23.7 ± 1.5
<b>Percent Body Fat</b>	(%)	25.0 ± 5.0	25.4 ± 5.5	22.6 ± 5.9
<b>TG</b>	(mg/dl)	209.0 ± 46.7	186.8 ± 43.9	160.8 ± 42.1*
<b>TC</b>	(mg/dl)	265.4 ± 23.5	238.2 ± 27.0*	237.5 ± 22.5*
<b>HDL-C</b>	(mg/dl)	52.6 ± 10.2	48.8 ± 10.4	53.0 ± 10.5
<b>LDL</b>	(mg/dl)	171.0 ± 22.7	152.0 ± 25.7*	143.5 ± 39.1*
<b>VLDL</b>	(mg/dl)	323.8 ± 103.2	363.0 ± 118.4	170.3 ± 28.1**
<b>Apo A-I</b>	(mg/dl)	154.2 ± 20.9	145.8 ± 24.9	171.3 ± 39.8
<b>Apo B</b>	(mg/dl)	130.2 ± 13.4	118.6 ± 23.9	107.5 ± 74.6
<b>Apo E</b>	(mg/dl)	7.6 ± 2.2	7.6 ± 1.5	6.4 ± 1.1
<b>AST</b>	(IU/l)	30.6 ± 13.5	23.2 ± 8.0*	22.3 ± 7.3*
<b>ALT</b>	(IU/l)	40.0 ± 27.5	29.2 ± 19.6*	23.0 ± 14.2*
<b>ALP</b>	(IU/l)	210.8 ± 69.2	203.2 ± 48.9	199.0 ± 61.5
<b>γ-GPT</b>	(IU/l)	96.2 ± 93.7	71.6 ± 57.3	70.8 ± 81.8
<b>Glucose</b>	(mg/dl)	100.8 ± 13.4	101.4 ± 21.2	89.7 ± 7.5
<b>HbA1C</b>	(%)	5.7 ± 0.8	5.7 ± 0.6	5.3 ± 0.3

Values are presented as mean ± SD.

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 significantly different compared to those before treatment.

suggest that *A. formosanus* may be useful for improvement of lipid-metabolism and the prevention of atherosclerosis. On the other hand, Nomura *et al.* (1988) confirmed the close correlation between hyperlipidemia, fatty liver and obesity in the previous investigation of nosographic (1988). In the present study, 10 volunteers have high-ALT and AST levels, and they also have higher levels of BMI, VLDL and LDL compared to those of the normal volunteers (data not shown). After administration of *A. formosanus* for 6 months, the levels of AST and ALT were significantly decreased, and after 12 months of treatment, the levels of TC, VLDL and LDL were also significantly reduced. From these results, it was believed that the improvement of lipid-metabolism effect of *A. formosanus* might be closely related to the improvement of liver function. The liver, the key organ of metabolism and excretion is continuously and variedly exposed to xenobiotics, because of its strategic placement in the body. The effect of *A. formosanus* on liver function will be further investigated.

In general, *A. formosanus* has been used from 4 to 40 g of fresh weight per day, although the present study only used a very low dose for volunteers (450 mg/day). The acute toxicological effects of water extracts of *Anoectochilus* species, including *A. formosanus*, were in a single dose of 5000 mg/kg p.o. (Liu *et al.*, 1998). No gross abnormalities were found in any organs of the treated animals at the necropsy, but the change of body weight of tested rats showed significant decrease in male and female rats at 7 and 14 days (Liu *et al.*, 1998). It was believed that *Anoectochilus* species were non-or less toxic products.

The components of the *in vitro* cultured *A. formosanus* have been investigated and a γ-lactone glucoside, kinsenoside was determined as a major component (Du *et al.*, 1998;

2000b). Investigation on the active constituent of *A. formosanus* on lipid-metabolism in mice and rats models has been evaluated. The liver TG level, which is closely associated with a fatty liver, was significantly reduced by kinsenoside, and in the 0.2% kinsenoside treated group, the level was reduced to that of the normal group, showing inhibition of lipid deposition. The typical histological views of the liver in the mice being fed the high-fat diet and the diet with kinsenoside were observed. The livers in the control group were considerably swollen, and the color and luster were those of fatty liver (Du *et al.*, 2001). However, these phenomena were not observed in the kinsenoside treated group. Therefore, the major component, kinsenoside may function for lipid metabolism in human also. Further systematic research in molecular level of components contained in *A. formosanus* is currently in progress in our laboratory.

### References

- Du, X.M., T. Yoshizawa and Y. Shoyama. Butanoic acid glucoside composition of whole body and *in vitro* plantlets of *Anoectochilus formosanus*. *Phytochemistry* 49: 1925–1928, 1998.
- Du, X.M., N.Y. Sun and Y. Shoyama. Flavonoids from *Goodyera schlechtendaliana*. *Phytochemistry* 53: 997–1000, 2000a.
- Du, X.M., N.Y. Sun, N. Irino and Y. Shoyama. Glycosidic constituents from *in vitro* *Anoectochilus formosanus*. *Chem. Pharm. Bull.* 48: 1803–1904, 2000b.
- Du, X.M., N.-Y. Sun, Y. Chen, N. Irino and Y. Shoyama. Hepatoprotective aliphatic glycosides from three *Goodyera* species. *Biol. Pharm. Bull.* 23: 731–734, 2000c.
- Du, X.M., N.-Y. Sun, T. Tamura, A. Mohri, M. Sugiura, T. Yoshizawa, N. Irino, J. Hayashi and Y. Shoyama. Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its anti-hyperliposis effect. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 65–69, 2001.
- Du, X.M., N.-Y. Sun, N. Takizawa and Y. Shoyama. Sedative and anticonvulsant activities of goodyerin, a flavonol glycoside from *Goodyera schlechtendaliana*. *Phytother. Res.* 16: 261–263, 2002.
- Goldbourt V., E. Holtzman and N.N. Neufeld. Total and high density lipoprotein cholesterol in the serum and risk of mortality. *Br. Med. J.* 290: 1239–1243, 1985.
- Kan, W.S. *Pharmaceutical Botany*. National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, 1986, p. 647.
- Lin, C.-C. and T. Namba. Pharmacognostical study on the crude drugs of *Orchidaceae* from Taiwan (VI). *Shoyakugaku Zasshi* 35: 262–271, 1981a.
- Lin, C.-C. and T. Namba. Pharmacognostical study on the crude drugs of *Orchidaceae* from Taiwan (VII). *Shoyakugaku Zasshi* 35: 272–286, 1981b.
- Liu, S.-Y., T.W. Chang, J.Y. Wang, A.H. Chang and S.C. Wang. Study on the varietal characters and acute toxicity of *Anoectochilus* spp. *J. Agric. Res. China* 47: 242–258, 1998.
- Nomura, H., S. Kashiwaji, J. Hayashi, W. Kajiyama, S. Tani and M. Goto. Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Jpn. J. Med.* 27: 142–149, 1988.
- Stamler J., D. Wenworth and J. Neaton. Is the relationship between serum cholesterol and risk of death from coronary heart disease continuous and graded? *JAMA* 256: 2823–2828, 1986.
- Zheng, C., Y.Z. Huang and L.F. Ji. Pharmacognostic studies on jinxianlian. Bencaologic review, resource survey and taxonomic identification. *Zhongcaoyao* 27: 169–172, 1996.

## Original Article

## Transient elastography for patients with chronic hepatitis B and C virus infection: Non-invasive, quantitative assessment of liver fibrosis

Eiichi Ogawa,<sup>1</sup> Norihiro Furusyo,<sup>1,2</sup> Kazuhiro Toyoda,<sup>2</sup> Hiroaki Takeoka,<sup>2</sup> Shigeru Otaguro,<sup>1</sup> Maki Hamada,<sup>1</sup> Masayuki Murata,<sup>1</sup> Yasunori Sawayama<sup>1</sup> and Jun Hayashi<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Department of General Medicine, Kyushu University Hospital, and <sup>2</sup>Department of Environmental Medicine and Infectious Diseases, Kyushu University, Fukuoka, Japan

**Aim/Methods:** The aim of the present study was to compare the diagnostic performance of transient elastography (FibroScan) with that of serum fibrosis markers and stages of hepatic fibrosis by biopsy in 68 patients with chronic hepatitis B virus (HBV) and in 161 patients with hepatitis C virus (HCV) infection.

**Results:** The serum levels of hyaluronic acid ( $r = 0.601$ ) and type IV collagen ( $r = 0.663$ ) significantly positively associated with the FibroScan values (all  $P < 0.05$ ). Classified by fibrosis stages, the median values of FibroScan were 3.5 kPa for F0, 6.4 kPa for F1, 9.5 kPa for F2, 11.4 kPa for F3, and 15.4 kPa for

F4 in patients with chronic HBV infection, and were 6.3 kPa for F0, 6.7 kPa for F1, 9.1 kPa for F2, 13.7 kPa for F3, and 26.4 kPa for F4 in those with chronic HCV infection. The values were significantly correlated with fibrosis stage for both (HBV,  $r = 0.559$ ,  $P = 0.0093$ , and HCV,  $r = 0.686$ ,  $P < 0.0001$ ).

**Conclusion:** These results suggest that FibroScan is an efficient and simple method for evaluating liver fibrosis in patients with chronic infection, both for HBV and HCV.

**Key words:** hepatitis B virus, hepatitis C virus, liver fibrosis, transient elastography

## INTRODUCTION

HEPATITIS B VIRUS (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections are the main causes of chronic liver disease,<sup>1,2</sup> and the prognosis of patients with chronic liver disease is determined primarily by the extent and progression of fibrosis. Hepatic fibrosis is a wound-healing response to chronic liver injury, which may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC).<sup>3</sup> Activation of hepatic stellate cells, the major source of the extracellular matrix, is a main event in hepatic fibrosis.<sup>4</sup> Once cirrhosis is established, fibrosis has generally been considered to be irreversible. The diagnosis of cirrhosis is made clinically on the basis of signs of end-stage liver disease, such as liver failure,

ascites, jaundice, variceal bleeding, encephalopathy and HCC.

Percutaneous liver biopsy remains the standard method for assessing fibrosis. When making a prognosis and deciding when to start antiviral treatment, it is important to know the degree of fibrosis. However, liver biopsy is an invasive and painful procedure<sup>5</sup> that can have life-threatening complications,<sup>6</sup> which may limit its acceptance by patients and make repetition difficult for difficult-to-treat patients. Moreover, the accuracy of liver biopsy in assessing fibrosis can be questioned because of sampling error and intra- and interobserver variability that may lead to the over- or understaging of fibrosis.<sup>7–10</sup> Therefore, there is a need for alternative non-invasive methods for evaluating the grade of hepatic fibrosis and its severity in liver disease.

Transient elastography (FibroScan®; Echosens, Paris, France) is a novel, rapid, non-invasive, and reproducible method for measuring liver stiffness<sup>11</sup> that determines the elasticity of organs by measuring the velocity of a low-frequency shear wave going through the liver. The harder the tissue, the faster the shear wave propagates.

Correspondence: Dr Norihiro Furusyo, Department of General Medicine, Kyushu University Hospital, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8582, Japan. Email: furusyo@genmedpr.med.kyushu-u.ac.jp  
Received 5 March 2007; revision 23 April 2007; accepted 5 May 2007.



**Table 1** Characteristics of 68 patients with chronic HBV infection and 161 patients with chronic HCV infection at the time of the FibroScan® examination

Characteristic	Chronic HBV infection n = 68	Chronic HCV infection n = 161
Male/Female	35/33	64/97
Age (years)	47.6 ± 12.5	59.4 ± 12.6
Alanine aminotransferase (IU/L)	36.5 ± 42.0	44.2 ± 32.0
Aspartate aminotransferase (AST; IU/L)	40.2 ± 69.8	44.6 ± 39.4
γ-Glutamyltranspeptidase (IU/L)	43.1 ± 44.6	49.0 ± 55.8
Total bilirubin (mg/dL)	0.88 ± 0.40	0.85 ± 0.38
Platelet count (10 <sup>9</sup> /L)	170 ± 56	142 ± 55
AST-to-platelet count ratio index†	0.57 ± 0.68	0.88 ± 0.94
Albumin (g/dL)	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.4
HBeAg positive (%)	20 (29.9)	
Serum HBV-DNA level (log copies/mL)‡	4.61 ± 1.77	
HCV genotype 1b/2		118/38
Serum HCV-RNA level (kIU/mL)		1629 ± 1283

†Calculated as AST (/upper limit of normal range) × 100/PLT (10<sup>9</sup>/L).

‡Logarithmic transformed copies/mL.

Data are shown as mean ± standard deviation.

HBV, hepatitis B virus; HBeAg, hepatitis Be antigen; HCV hepatitis C virus; PLT, platelet count.

Recent reports suggest that FibroScan can predict hepatic fibrosis in patients with HCV.<sup>12–15</sup>

The aim of the present study was to compare the diagnostic performance of FibroScan with that of serum fibrosis markers and stages of hepatic fibrosis by biopsy in patients with chronic HBV or HCV infection.

## METHODS

### Patients

BETWEEN MARCH 2005 and March 2006, 229 patients were enrolled into this study, 68 with chronic HBV infection and 161 with chronic HCV infection. Chronic infection was defined as hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) positive or positive for both antibody to HCV (anti-HCV) and serum HCV-RNA by polymerase chain reaction for over 6 months. Patient characteristics are shown in Table 1. Clinical parameters included aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ-glutamyltranspeptidase (γ-GTP), total bilirubin, platelet count, prothrombin time (PT), albumin, hyaluronic acid, type IV collagen, hepatitis B e antigen (HBeAg), HBV-DNA, HCV-RNA and HCV genotype. PT was measured for only 54 (79.4%) of the 68 chronic HBV-infected patients and 134 (83.2%) of the 161 chronic HCV-infected patients. We also calculated AST-to-PLT ratio index, using 45 IU/L

as an upper limit of the normal AST range (ULN), as previously recommended for evaluating liver fibrosis.<sup>16</sup>

$$\text{AST-to-PLT ratio index} = \frac{\text{AST}(/ \text{ULN}) \times 100}{\text{platelet count} (\times 10^9/\text{L})}$$

Criteria for the study exclusion were: (i) positivity for antibody to human immunodeficiency virus or positivity both for HBsAg and anti-HCV; (ii) clinical or biochemical evidence of hepatic decompensation such as ascites; (iii) excessive alcohol or drug abuse; (iv) having HCC; and (v) under or within 6 months after treatment with antiviral or immunosuppressive agents. Patients who fulfilled the above criteria were recruited at the Department of General Medicine, Kyushu University Hospital.

Informed consent was obtained from all patients before enrollment into this study. The study was approved by the institutional Ethics Committees of the hospitals involved and conducted in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonization of guidelines for good clinical practice.

### Liver stiffness measurement by FibroScan

Liver stiffness measurement by FibroScan was done in the right robe of the liver through the intercostal spaces with the patient lying in the dorsal decubitus position

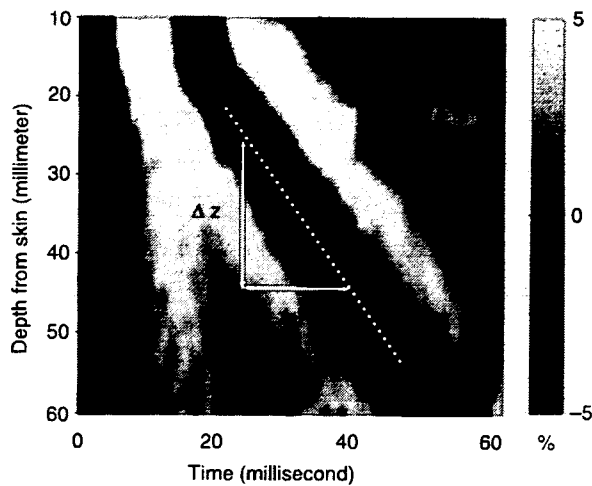


Figure 1 Amplitude of the strains induced in a healthy patient's liver as a function of depth and time. The elastic wave velocity is the slope of the wave pattern.

with the right arm in maximal position. The tip of the probe transducer was covered with coupling gel and placed on the skin, between the ribs at the level of the right lobe of the liver. The operator, assisted by an ultrasonic time-motion image, located a liver portion at least 6-cm thick and free of large vascular structures. Once the measurement area had been located, the operator pressed the probe button to start acquisition. Patients with ascites were excluded from the study because the measurement depth of liver stiffness is between 25 mm and 45 mm below the skin surface and elastic waves do not accurately propagate through liquids. The elasticity was automatically calculated in the apparatus and the data were shown as kilopascal (kPa). The elastic wave velocity ( $V_s$ ) is the slope of the wave pattern.  $V_s$  is the shear velocity and  $\rho$  is the mass density (Fig. 1).<sup>13,14</sup>

$$V_s = \Delta z / \Delta t$$

The elasticity is expressed as the following.

$$\text{Elasticity} = 3\rho V_s^2$$

The elasticity of each patient was measured 10 times and the median value of the successful measurements was kept as representative of liver stiffness. The whole examination lasted less than 5 min. Only liver stiffness measurements obtained with at least six successful acquisitions and a success rate of at least 60% were considered reliable.

Table 2 Stage and grade of liver biopsy by chronic hepatitis subtype

Characteristic	Chronic HBV infection (n = 20)	Chronic HCV infection (n = 83)
Stage of fibrosis		
F0 (%)	1 (5.0)	14 (16.9)
F1 (%)	8 (40.0)	38 (45.8)
F2 (%)	6 (30.0)	14 (16.9)
F3 (%)	3 (15.0)	5 (6.0)
F4 (%)	2 (10.0)	12 (14.5)
Grade of activity		
A0 (%)	0-	0-
A1 (%)	5 (25.0)	29 (34.9)
A2 (%)	13 (65.0)	47 (56.6)
A3 (%)	2 (10.0)	7 (8.4)

HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus.

### Liver histology and quantification of liver fibrosis

Liver biopsy was done for 20 (29.4%) of the 68 chronic HBV-infected patients and 83 (51.6%) of the 161 chronic HCV-infected patients. Liver biopsy was not available for the remaining 126 patients who declined to have a biopsy. Characteristics of the patients who received liver biopsy are shown in Table 2. There were only two chronically HBV-infected patients with cirrhosis (F4). Moreover, no patient with an activity grading of A0 was found either in patients with chronic HBV or HCV infection, because the present study included outpatients who regularly visited our hospital for the treatment of liver damage. Liver biopsy specimens were fixed in formalin and paraffin and embedded. Liver stiffness measurements were performed within the 3 months before liver biopsy examination. All biopsy specimens were analyzed by two experienced pathologists who were blinded to the clinical data. For each specimen, the stage of fibrosis and the grade of activity were established according to the following criteria.<sup>10</sup> Fibrosis was staged on a 0-4 scale as follows: F0, no fibrosis; F1, portal fibrosis without septa; F2, few septa; F3, numerous septa without cirrhosis; F4, cirrhosis. The grading of activity, including the intensity of the necroinflammation, was scored as follows: A0, no histological activity; A1, mild activity; A2, moderate activity; A3, severe activity.

### Testing for viral markers

The presence of HBsAg and HBeAg was determined by radioimmunoassay (RIA) (HBeAg RIA; Abbott

Laboratories, North Chicago, IL, USA).<sup>17</sup> Quantification of serum HBV-DNA was carried out using a commercial quantitative polymerase chain reaction assay (PCR) (Amplicor HBV Monitor; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), over a detection range from 2.6 (corresponding to 400 copies/mL) to 7.5 log copies/mL.<sup>18</sup>

Anti-HCV was determined by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit. HCV-RNA was determined by PCR. The serum HCV-RNA level was examined with an Amplicor HCV monitor assay (version 2.0; Roche, Tokyo, Japan), with a lower limit of quantitation of 5000 IU (1350 copies/mL) and an outer limit of quantitation of 5 100 000 IU/mL (5100 kIU/mL). HCV genotype was determined by type-specific primer from the core region of the HCV genome. The protocol for genotyping was carried out as described earlier.<sup>19–21</sup>

### Measurement of serum hyaluronic acid and type IV collagen

Because of a lack of preserved sera, serum hyaluronic acid level was measured in only 46 (67.6%) of the 68 chronic HBV-infected patients and 120 (74.5%) of the 161 chronic HCV-infected patients. Serum type IV collagen level was also measured in only 49 (72.1%) of the 68 chronic HBV-infected patients and 130 (80.7%) of the 161 chronic HCV-infected patients. Serum levels of hyaluronic acid and type IV collagen as hepatic fibrogenesis makers were measured with a commercial sandwich enzyme binding assay (Hyaluronic Acid Chugai; Chugai Diagnostics Science, Osaka, Japan) and a commercial one-step sandwich radioimmunoassay (Pannassy IV·C; Daiichi Pure Chemical, Tokyo, Japan). The normal range of serum hyaluronic acid was  $30 \pm 16$  (mean  $\pm$  SD) ng/mL, the upper limit being 50 ng/mL. The normal range of serum type IV collagen was  $99.3 \pm 22.8$  (mean  $\pm$  SD) ng/mL, the upper limit being 140 ng/mL.<sup>22</sup>

### Statistical analysis

Statistical analysis was done with BMDP statistical software for the IBM 3090 system computer (BMBD Statistical Software, Los Angeles, CA, USA) for the IBM 3090 computer system (Yorktown Heights, NY, USA). Continuous data were expressed as mean values, mean  $\pm$  standard deviation (SD), or values  $\pm$  standard error (SE) of the mean. The paired *t*-test, unpaired *t*-test, Mann-Whitney *U*-test or Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance was used to compare liver stiffness. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC) analysis was done to

evaluate the relationship between histological findings by liver biopsy and measurements by FibroScan. A *P*-value less than 0.05 was regarded as statistically significant.

## RESULTS

### Variables correlated with FibroScan values

THE VALUES MEASURED by FibroScan ranged from 2.5 to 54.5 kPa (median 9.4). Table 3 shows variables correlated with the FibroScan values of patients with chronic HBV or HCV infection. For chronic HBV infection, the variables significantly positively associated with the FibroScan values were AST ( $r = 0.369$ ) and  $\gamma$ -GTP ( $r = 0.653$ ) activity, AST-to-platelet ratio index ( $r = 0.659$ ), serum hyaluronic acid ( $r = 0.663$ ), and type IV collagen ( $r = 0.352$ ) level (all  $P < 0.05$ ). The variables significantly, negatively associated with the FibroScan values were platelet count ( $r = -0.553$ ), prothrombin time ( $r = -0.364$ ), and serum albumin ( $r = -0.372$ ) level (all  $P < 0.05$ ). No significant correlation related to the FibroScan values was found in age, serum total bilirubin level, or HBV-DNA level. For chronic HCV infection, the variables significantly positively associated with the FibroScan values were AST ( $r = 0.443$ ), ALT ( $r = 0.164$ ), and  $\gamma$ -GTP ( $r = 0.287$ ) activity, AST-to-platelet ratio index ( $r = 0.507$ ), serum total bilirubin level ( $r = 0.501$ ), hyaluronic acid ( $r = 0.601$ ), and type IV collagen ( $r = 0.663$ ) (all  $P < 0.05$ ). The variables significantly negatively associated with the FibroScan values were platelet count ( $r = -0.424$ ), prothrombin time ( $r = -0.511$ ), and serum albumin ( $r = -0.554$ ) level (all  $P < 0.05$ ). No significant correlation related to the FibroScan values was found in age or serum HCV-RNA level. These findings suggest that liver stiffness by FibroScan reflects activity and progression of the disease.

The ALT level increased as the fibrosis stage progressed in patients with chronic HCV infection. Moreover, both for chronic HBV and HCV infection, the values of AST and  $\gamma$ -GTP significantly increased with the progress of fibrosis stage (data not shown).

### FibroScan values by subgroup

Table 4 shows the correlation between liver stiffness and various parameters of the patients classified into subgroups. In patients with chronic HBV infection, the FibroScan values were significantly higher in the subgroups with higher levels of AST, ALT,  $\gamma$ -GTP, AST-to-platelet ratio index, hyaluronic acid, and type IV

**Table 3** Correlation between clinical variables and the FibroScan® values of patients with chronic HBV and HCV infection

Variable	Chronic HBV infection		Chronic HCV infection	
	<i>r</i>	<i>P</i> -value	<i>r</i>	<i>P</i> -value
Age (years)	0.161	0.191	0.171	0.309
Alanine aminotransferase (IU/L)	0.369	0.002	0.443	<0.0001
Aspartate aminotransferase (AST; IU/L)	0.309	0.087	0.164	0.036
γ-Glutamyltranspeptidase (IU/L)	0.653	<0.0001	0.287	0.0002
Total bilirubin (mg/dL)	0.236	0.052	0.501	<0.0001
Platelet count (10 <sup>9</sup> /L)	-0.553	<0.0001	-0.424	<0.0001
AST-to-platelet count ratio index†	0.659	<0.0001	0.507	<0.0001
Prothrombin time (%)	-0.364	0.006	-0.511	<0.0001
Albumin (g/dL)	-0.372	0.002	-0.554	<0.0001
Serum hyaluronic acid (ng/mL)	0.663	<0.0001	0.601	<0.0001
Serum type IV collagen (ng/mL)	0.352	0.013	0.633	<0.0001
Serum HBV-DNA level (log copies/mL)‡	0.124	0.312		
Serum HCV-RNA level (kIU/mL)			0.007	0.933

†Calculated as AST (/upper limit of normal range) × 100/PLT (10<sup>9</sup>/L).

‡Logarithmic transformed copies/mL.

FibroScan® value unit is kPa.

HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; PLT, platelet count.

collagen than in those with lower levels. The FibroScan values were significantly lower in patients with higher platelet count, prothrombin time, and albumin than in those with lower levels. Others factors such as age, total bilirubin and HBV-DNA level were not significantly associated with the FibroScan values. In patients with chronic HCV infection, the FibroScan values were significantly higher in the subgroups with older age and higher levels of AST, ALT, γ-GTP, total bilirubin, AST-to-platelet ratio index, hyaluronic acid, and type IV collagen than in those with lower levels. The FibroScan values were significantly lower in patients with higher platelet count, prothrombin time, and albumin than in those with lower levels. The HCV-RNA level was not significantly associated with the FibroScan values. These findings suggest that liver stiffness by FibroScan well reflects the activity and progression of liver disease.

### Relationship between liver stiffness and histological parameters

The distribution of FibroScan values according to fibrosis stage is shown in Figure 2. The median values (range) of patients with chronic HBV infection were 3.5 kPa for F0, 6.4 kPa (3.5–10.6) for F1, 9.5 kPa (5.1–17.3) for F2, 11.4 kPa (7.9–17.1) for F3, and 15.4 kPa (5.1–25.7) for F4 (Fig. 2a). The median values (range) of patients with

chronic HCV infection were 6.3 kPa (2.5–16.8) for F0, 6.7 kPa (2.7–19.5) for F1, 9.1 kPa (2.8–13.4) for F2, 13.7 kPa (10.1–18.8) for F3, and 26.4 kPa (7.8–54.3) for F4 (Fig. 2b). The FibroScan values were significantly correlated with fibrosis stage for both (HBV,  $r = 0.559$ ,  $P = 0.0093$ , and HCV,  $r = 0.686$ ,  $P < 0.0001$ ). Chronically HBV-infected patients with F0 had higher FibroScan values than chronically HCV-infected patients with F0, but there was no significant difference between these patients.

The FibroScan values (mean ± SE) significantly increased in accordance with increased severity of the activity grading of chronic HCV patients (6.7 ± 0.5 kPa, 10.8 ± 1.4 kPa, and 22.6 ± 4.1 kPa for patients with A1, A2, and A3, respectively) ( $r = 0.420$ ,  $P < 0.0001$ ), but not significantly for chronic HBV patients (1.5 ± 0.4 kPa, 10.8 ± 1.7 kPa, and 5.3 ± 1.8 kPa for patients with A1, A2, and A3, respectively) ( $r = 0.189$ ,  $P = 0.429$ ).

Figure 3 shows the diagnostic value (ROC curves) of the FibroScan values for different degrees of fibrosis which was done for all patients with chronic HBV or HCV infection: mild fibrosis,  $F \geq F1$ ; moderate fibrosis,  $F \geq F2$ ; severe fibrosis,  $F \geq F3$ ; and cirrhosis,  $F = F4$ . The corresponding areas under the ROC curves were 0.74 for  $F \geq F1$ , 0.84 for  $F \geq F2$ , 0.90 for  $F \geq F3$  and 0.89 for  $F = F4$ .