
V. おわりに

脂肪肝形成の過程には、内臓脂肪のみならず皮下脂肪蓄積も関与することが示唆された。脂肪肝の病態や治療を考えるうえでは重要な知見と考えられるので報告した。

参考文献

- 1) Kojima S, Watanabe N, Numata M, et al: Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol.* 2003 ; 38 : 954-961.
- 2) Imamura Y, Uto H, Oketani M, et al: Association between changes in body composition and the increasing prevalence of fatty liver in Japanese men. *Hepatol Res.* 2008 ; 38 : 1083-1086.
- 3) Eguchi Y, Eguchi T, Mizuta T, et al: Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2006 ; 41 : 462-469.

13. 肝疾患の血清プロテオミクスを用いた診断

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学講師 宇都浩文

同 消化器疾患・生活習慣病学 上村修司

同 教授 坪内博仁

key words hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, proteomics, 2-DE, ProteinChip SELDI system, MALDI-TOF MS

動 向

現在、肝細胞癌 hepatocellular carcinoma (HCC) の血液腫瘍マーカーとして alpha-fetoprotein (以下AFP), protein induced by Vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II), AFPレクチン分画L3 (AFP-L3) が臨床で用いられ、その有用性が広く知られている。しかし、早期HCCにおけるAFPやPIVKA-IIの感度は約30~60%と、決して高感度ではない¹⁻⁴⁾。AFPとPIVKA-IIの同時測定でHCC診断能は上昇するものの、2cm以下の早期HCCでは診断能は低く、早期発見には、新たな診断法の開発、新規の腫瘍マーカーの同定が必要と考えられる⁵⁻⁷⁾。また、肝硬変診断のための血清マーカーとしては、ヒアルロン酸、IV型コラーゲンなどの肝線維化マーカーが用いられているが、必ずしも肝臓の線維化を反映しない^{8,9)}。さらに、欧米諸国をはじめ本邦でも増加傾向にある非アルコール性脂肪肝疾患 nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)、とくに非アルコール性脂肪肝炎 nonalcoholic steatohepatitis (NASH) の確定診断には侵襲的な肝生検が必須で、特異性のある血清マーカーはない^{10,11)}。したがって、HCCの早期診断あるいは肝硬変からの発癌予測、肝硬変と慢性肝炎の鑑

別、さらにはNASHの診断などに有用な、かつ特異的な血清マーカーの同定が必要である。

プロテオミクス (Proteomics), またはプロテオーム解析 (Proteomic analysis) とは、生物のタンパク質の構造や機能を網羅的に研究することである。遺伝子発現量とタンパク質濃度は、生体において必ずしも比例せず、さらに、タンパク質のもつ生理活性はリン酸化などの翻訳後修飾において制御されていることが多い^{12,13)}。そのため、肝疾患だけでなく様々な疾患の病態解明やバイオマーカー探索においてプロテオミクスは有用と考えられる。また、血清や血漿などは、生体から低侵襲、かつ容易に得ることができ、臨床サンプルとして利用しやすい。患者血清を用いて高感度かつ特異度の高い診断や病態と関連するバイオマーカーを見出せば、臨床的な有用性が高い。肝疾患においては、以前から二次元電気泳動法 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) を中心としたプロテオミクスが行われてきたが、その大部分がHCCを含む肝組織を用いた解析である¹⁴⁻¹⁶⁾。近年、質量分析を中心とした解析装置だけでなく、タンパク標識法やアミノ酸解析法などのプロテオミクス技術の進歩により、患者血清などに含まれるタンパク質

を網羅的に比較的容易、かつ感度よく解析できるようになってきている^{17,18)}。このようなプロテオミクス技術の進歩により、HCCだけでなく、肝硬変やNAFLDなどを対象としたバイオマーカー探索も進んでいる^{8,9,11,19-40)}。

最近の肝疾患における血清マーカー探索を目的としたプロテオミクスは、2DEで分離し、発現量の変化のあるスポット(タンパク質)を質量分析計により同定する方法¹⁹⁻²¹⁾とProteinChip SELDIシステム(バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)により低分子領域のタンパク質発現をピーク値として数値化し、比較する方法²²⁻³²⁾が主に用いられている。しかし、このシステムによるタンパクのピーク強度には解析装置間や施設間でばらつきがある可能性があり、現時点ではピーク強度の比較のみで臨床応用するのは困難と考えられる。なお、ProteinChip SELDIシステムで得られたピークタンパクの一部は同定が可能となってきた^{22,23,26-30)}。

A. 肝細胞癌の血清プロテオミクス

1. 二次元電気泳動による血清解析

従来から用いられてきた2DEによるタンパク質分離法は、低分子領域のタンパク質解析には不向きであるが、扱いやすさや再現性の面では最も確立している手法であり、現在も広く用いられている。Yangらは、2-DEとnano-HPLC-ESI-MS/MSを用いて、5例(HBs抗原陽性2例、HCV抗体陽性2例、いずれも陰性1例)のHCC患者血清と健常者血清を比較し、発現に差のある317のタンパク質を分離・同定し、そのうち、6個のタンパク質(Annexin VI isoform 1, Complement component 9, Ceruloplasmin, Serum amyloid A4, A2, A1 isoform 2)はHCCのマーカーとなる可能性があることを報告している¹⁹⁾。また、Angらは、HCCと慢性肝疾患 chronic liver

disease (CLD) 患者血清を用いて糖化ハプトグロビンの発現量を比較検討し、特異的糖化ハプトグロビンはHCC群で発現上昇し、早期HCCより進行期HCCで高発現していることから、糖化ハプトグロビンはHCCの診断や病期判定に有用であると報告している²⁰⁾。FengらはHBV-HCCの患者血清を2DEで比較検討し、有意差のある8個のタンパク質〔Transferrin, Transthyretin, α 1-antitrypsin, Clusterin, Haptoglobin α 2chain, Ceruloplasmin, Heat-shock protein 27 (HSP27), AFP〕を同定した。HSP27はHCCの90%で陽性であり、HCCのスクリーニング検査に有用である可能性を示した²¹⁾。このように、2DEを用いた血清解析では、ゲルから抽出したタンパク質スポットをpeptide-mass fingerprinting (PMF) 解析やMS/MS解析することにより直接タンパク質を同定でき、有用な診断マーカーを発見できる可能性がある。今後、AFP, PIVKA-IIといった既存のマーカーとの比較や前向き研究によりその臨床的有用性を検証することが必要である。

2. ProteinChip SELDIシステムによる血清解析(表1)

ProteinChip SELDIシステムは、プロテインチップ、飛行時間型質量分析計 time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) およびデータ解析用コンピューターから構成されており、化学的性質を表面にもつ特殊なチップに試料中のタンパク質を結合させ、結合したタンパク質を質量分析装置で解析する方法である。また、このシステムは、少量のサンプルを迅速かつ網羅的に解析できるため、近年の血清プロテオミクスに頻用されている²²⁻³¹⁾。さらに、2DEでは低分子領域(6kDa以下)のタンパク質・ペプチドや等電点(pI)が3以下もしくは11以上のタンパク質の解析が困難であるが、ProteinChip SELDIシステムでは、

表1 ProteinChip SELDIシステムを用いた肝細胞癌、肝硬変患者の血清プロテオミクスの最近の報告例

著者	発表年	症例	比較対象	感度/特異度	その他の特徴	文献
Göbelら	2006	HCV-HCC 34例	HCV-LC 44例 (HCV-CH 39例)	HCC vs LC: 68%/80% (LC vs CH: 80%/ 67%)	肝硬変で減少する6646Da のピークタンパクを apolipoprotein C-Iと同定.	26
Wardら	2006	HCV-HCC 77例	HCV-CLD 105例	94%/86%	ピークタンパク (23/23.5 kDa) をκ/λimmunoglobulin light chains と同定.	27
Kanmuraら	2007	HCV-HCC 64例	HCV-LC 77例	83%/76%	AFP, PIVKA-IIより, 早期診 断に有用.	24
Cuiら	2007	HBV-HCC 81例 HBV-LC 54例 HBV-CH 75例	健常者87例	HCC vs 健常者: 90.5%/89.4% LC vs 健常者: 100%/86.5% CH vs 健常者: 85.3%/84.2%	HBV-HCCもしくはHBV-CLD を健常者と判別可能.	25
Gengら	2007	HBV-HCC 25例 (未加療)	健常者50例	92%/100%	HBV-HCC加療, 未加療と健常 者とと有意差のあった7ピーク タンパクを同定.	29
Zinkinら	2008	HCC 41例	HCV-LC 51例	79%/86%	最大径2cm以内の小肝細胞癌 の診断では, 既存マーカーより も, 高率に診断可能. 既存マー カーと組み合わせることによ り診断率はさらに向上.	22
Heら	2008	HBV-HCC 50例	HBV-非HCC 45例	100%/87%	11615 Daのピークタンパクを Serum Amyloid A (SAA) と 同定.	23
Heら	2008	HBV-HCC 81例	健常者33例	95.92%/100%	6個のピークタンパク (157.33, 4177.02, 4284.79, 4300.80, 7789.87, 7984.14 m/z) を検 出, 7984 m/zのピークタンパ クを Neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2) と同定し, 肝癌組織で発現を証明.	30
Poonら	2005	HBV-LC 46例	なし	89%/89%	肝線維化スコア (Ishakスコア) と相関あり.	32
Morraら	2007	HCV-LC 191例	なし	81%/80% (fibrosis scoreが 0.5の時)	8個のピークタンパクを用いた 判別法が, FibroTest (γ-GTP などを用いて肝線維化を評価 する方法) より肝線維化の評価 に有用.	8

HCC; 肝細胞癌, LC; 肝硬変, CH; 慢性肝炎, HCV; C型肝炎ウイルス (関連), HBV; B型肝炎ウイルス (関連)

再現性良く解析できる。しかし、解析で得られたピークタンパクは直接同定できないため、タンパク質同定にはSDS-PAGEや2-DEを用いたゲル泳動およびPMF法などによる解析が必要である^{22,23,26,28,30}。

ProteinChip SELDI システムを用いた血清学的診断には、シングルマーカーを同定し、その機能解析を行って診断に用いる手法と、データマイニングによりクラス分類を行い診断に用いる手法がある。ProteinChip SELDI システムでは、一般に目的ピークタンパクの同定が困難であり、個々のピークタンパクを同定せず、複数個のピーク強度により、疾患群と対象群を判別していくクラス分類による診断法（マルチマーカー解析法）が用いられることが多い。我々は、HCV-HCCとHCV-CLD間で判別能が高かった7個のピークを用いて、クラス分類法を確立した²⁴。この方法では、腹部超音波検査により腫瘍性病変が検出される以前にHCCの存在を予想することが可能であり、AFPやPIVKA-IIといった既存の腫瘍マーカーより、HCCの早期診断に有用であった²⁴。Zinkinらは、ProteinChip SELDI システムにより検出した11個のピークを用いた診断法を開発し、この方法を用いるとHCV-HCCを感度79%、特異度86%で診断可能であった報告している²²。この診断法では感度、特異度ともAFP、AFP-L3分画やPIVKA-IIと診断率に大きな差は無かったが、最大径2cm以内のHCCの診断では、既存マーカーよりも、高率に診断可能であった。また、Heらは、HBV-HCC患者の血清解析で、3個の有意差のあるピーク(5890, 11615, 11724 Da)を選別し、HBV-HCCをほぼ100%診断できたと報告した²³。さらに、2DEと組み合わせて11615 Daのピークタンパクを、Serum Amyloid A (SAA) と同定している。しかし、この解析ではHBV-CLD患者でもこのピークが高率に陽性であり、HCC特異的な診断法ではないと考えられ

る。また、Cuiらは、HBV-HCCもしくはHBV-CLDの患者血清を用い、マルチマーカー解析法により、感度、特異度90%以上でHBV-HCCもしくはHBV-CLDを健常者と判別可能であったと報告しているが²⁵、HBV-HCCとHBV-CLDとの鑑別における有用性については疑問が残る。同じように、HBV-HCCの診断の感度は100%、特異度は92%もしくは97%であったとする報告もあるが^{29,30}、対照群が健常者であり、肝硬変患者におけるHCCの早期診断に有用であるかは疑問である。一方、Göbelらは、7486, 12843, 44293および53598 Daの4つのピークを用いたHCV-HCCと肝硬変群の判別法（マルチマーカー解析法）を作成し、早期のHCCの診断に有用であると報告した²⁶。同じように、Wardらも、感度94%、特異度86%、AUROC 0.92のマルチマーカー解析法を報告している²⁷。このように、マルチマーカー解析法は診断に有用であるものの、解析にProteinChip SELDIシステムが必要であり、簡便かつ迅速にどこでも行えるものではない。また、このシステムによるピーク強度には解析装置間や施設間でばらつきがある可能性があり、大きな意味で再現性が問題であり、我々の経験ではマルチマーカーによるHCCの早期診断法を臨床応用するのは現時点では困難であると考えられる。

一般に、AFPやPIVKA-IIのように腫瘍が発現しているタンパク質は、局所治療や腫瘍切除後に血中濃度が低下し、治療効果判定や再発の指標になる。しかし、HCV-HCC治療前後の血清タンパク質発現をProteinChip SELDI システムにより解析した結果では、治療後に血中濃度が正常化するピークは見出されていない³¹。この結果は、腫瘍から直接産生されているタンパク質をProteinChip SELDIシステムにより解析することの限界を示しているかもしれない。さらに、慢性肝炎・肝硬変の進展に伴い変化するタンパク質も

存在することから、HCC患者血清のプロテオーム解析結果の解釈には留意すべきである。

B. 肝硬変, 肝線維化の血清プロテオミクス

肝硬変の診断マーカーや、肝線維化マーカー探索を目的として肝硬変を対象としたプロテオミクスも行われている。Poonらは、ProteinChip SELDIシステムから得た肝硬変患者血清中の7個のピークとALT, 総タンパク, およびビリルビン値を組み合わせ、肝線維化診断スコアを作成している。このスコアを用いることにより感度94%, 特異度91%で肝硬変の診断が可能である³²⁾。Morraらも8個のピークを用いた判別法が、FibroTest (α 2-macroglobulin, haptoglobin, apolipoprotein A1, total bilirubin, γ -GTPを用いて肝線維化を評価する方法)より肝線維化の評価に有用であることを報告している⁸⁾(表1)。さらに、Göbelらも血清中の5個のピークを選び、肝硬変と非肝硬変(F1およびF2)を判別するマルチマーカー解析法を作成し、感度80%, 特異度67%で肝硬変の診断が可能であることを明らかにした²⁶⁾。彼らは、肝硬変で減少しているタンパクの一つがapolipoprotein C-Iであることも報告している。しかし、多くの研究者により報告されたこれらのピークタンパクは、同じ手法にもかかわらず、必ずしも同一でない。このことは、先に述べたように検査法としてのProteinChip SELDIシステムそのものの限界を示している。

HCV-CLD患者血清を2DEにより解析した成績では、肝硬変群でinter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITI4) fragments, α 1-antichymotrypsin, apolipoprotein L1, prealbumin, albumin, paraoxonase/arylesterase 1, zinc- α 2-glycoproteinが減少し、CD5 antigen-like protein (CD5L)と β 2 glycoprotein I (β 2GPI)が上昇している⁹⁾。こ

のように肝硬変で変動する血清タンパクを同定し、肝硬変診断における有用性を検証することにより新しい診断マーカーを見出せる可能性がある。

C. 非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の血清プロテオミクス

最近、患者数の増加やHCCの原因となることから、NASHを含むNAFLDに関心が集まっている。NASHはアルコール性肝疾患と類似の病態を呈し、炎症・線維化を伴って肝硬変やHCCに進展する。NASHの病態には、過剰な栄養、肥満、それを基盤としたインスリン抵抗性、酸化ストレスなどが関与すると考えられているが、その病態は十分明らかにされていない。また、NAFLDの診断には組織学的な診断が必須で、特異的な血清マーカーがない。検診受診者の約30%が血液生化学検査異常を呈し、そのほとんどがNAFLDと推測されていることから、NAFLDやNASHの血清マーカーの同定は極めて重要である¹⁰⁾。

高脂血症と脂肪肝を呈するHcB19マウスの肝組織を用いたプロテオミクスでは、プロピオニルCoAからメチルマロニルCoAへの反応に関わっているpropionyl CoA carboxylaseの α chain (PCCA)が低下し³³⁾、確かに、PCCAノックアウトマウスではケトアシドーシスと脂肪肝の発症が見られる⁴¹⁾。一方、NAFLD患者血清を対象としたProteinChip SELDIシステムによる解析では、NAFLDのない肥満患者と比較してNASH患者で有意に変動する4個のピークが見出されている¹¹⁾。これらのピークタンパクはNASHの診断に有用である可能性はあるものの、残念ながら、タンパク質の同定ができていない。また、この研究では、同じ対象の肝組織中のmRNA発現がマイクロアレイを用いて網羅的に解析されており、NAFLDの病態進展や機序解明の研究には非常に

興味ある解析であるが、血清中のタンパク質発現と肝組織の遺伝子発現との関連は述べられていない。我々も、NAFLD患者血清を対象にProteinChip SELDIシステムを用いて解析し、健康者と比較してNAFLD患者で高値を示すピークを見出している³⁴⁾。真に、NAFLDに特異的か、NASHの診断に有用であるタンパク質かどうかなど今後の研究課題である。

D. 肝疾患におけるプロテオミクスの展望

ProteinChip SELDIシステムではタンパク同定ができないため、最近ではMALDI-TOF MSシステムを用いたHCCマーカー探索も行われるようになってきている³⁵⁻³⁸⁾。このシステムでは、検出したピークのうち低分子領域、特に3000m/z以下では直接タンパク質・ペプチドの同定が可能であり、それによりdes-Ala-fibrinopeptide A³⁵⁾、補体C3³⁶⁾、補体C4a³⁷⁾などがHCCで上昇することが明らかにされている。また、このシステムで得られたピーク強度を用いた肝硬変診断法も報告されている³⁸⁾。さらに、タンパク質の糖鎖修飾の違いに着目したプロテオミクスも行われるようになってきている³⁷⁻³⁹⁾。Comunaleらは、HBV-HCCの血清を解析し、AFPなどがHBV-HCCで高値であることを確認しただけでなく、総 α -1 acid glycoprotein (AGP)濃度はHCCと対照群で差がないにもかかわらず、フコシル化AGPがHCCで増加していることを明らかにしている³⁹⁾。今後、低分子領域のペプチドをターゲットとしたPeptidomics³⁵⁾や糖鎖修飾をターゲットとしたGlycoproteomics^{20,37-39)}も肝疾患のマーカー探索に有用であると考えられる。

また、Paradisらはインターフェロンとリバビリン治療を行った96名のC型慢性肝炎患者血清をProteinChip SELDIシステムで解析し、治療経過中に変化したピーク数が、著効患者では無

効患者よりも有意に多いことを報告した⁴⁰⁾。さらに、2つのピークと線維化ステージ、ウイルスGenotypeを組み合わせた判別法で、AUROC 0.75の治療効果予測が可能であったと述べている。このように、プロテオミクスで得られた結果は、肝疾患の診断だけでなく、治療効果予測やその効果に関連するタンパク質の同定も期待できる。

むすび

固体や細胞レベルでのプロセスは、大部分がタンパク質で制御されており、病態や生体の反応を解析するには、タンパク質発現の変化を解析することが必須である。アルブミンや免疫グロブリンなど約20種類のタンパク質が血清中総タンパクの99%を占め、残り1%の微量タンパク質の中に、バイオマーカーとなりうるタンパク質が存在している。今後、プロテオミクス技術がさらに向上し、微量なバイオマーカー探索に有用で、より感度の高い検出系が開発され、あらゆる肝疾患における有用な血清マーカーの発見が期待される。また、本稿では血清プロテオミクスを中心に述べたが、最近、HCC組織を2-DEで解析し、HCC組織中のclathrin heavy chainの増加とformiminotransferase cyclodeaminaseの低下が早期HCCの診断に非常に有用であること⁴²⁾、切除HCCのAPC-binding protein EB1発現は、HCC切除後の生存率と再発率に関係することが報告されている⁴³⁾。HCCにおける有用な組織マーカーの報告も今後さらに増加すると考えられ、用いる試料や解析手法の利点・欠点を十分吟味した解析が必要と考えられる。

文献

- 1) Oka H, Tamori A, Kuroki T, et al. Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1994; 19(1): 61-6.

- 2) Ishii M, Gama H, Chida N, et al. Simultaneous measurements of serum alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma. South Tohoku District Study Group. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95(4): 1036-40.
- 3) Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, et al. Serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin measured using the revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity in relation to clinicopathologic features of solitary hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2000; 88(3): 544-9.
- 4) Marrero JA, Su GL, Wei W, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology.* 2003; 37(5): 1114-21.
- 5) Ikoma J, Kaito M, Ishihara T, et al. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des-gamma-carboxy prothrombin: a prospective study. *Hepato-gastroenterology.* 2002; 49(43): 235-8.
- 6) Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, et al. Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4(1): 111-7.
- 7) Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101(9): 2038-43.
- 8) Morra R, Munteanu M, Bedossa P, et al. Diagnostic value of serum protein profiling by SELDI-TOF ProteinChip compared with a biochemical marker, FibroTest, for the diagnosis of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 26(6): 847-58.
- 9) Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, et al. Serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem.* 2007; 53(10): 1792-9.
- 10) Nugent C, Younossi ZM. Evaluation and management of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007; 4(8): 432-41.
- 11) Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 42(3): 665-74.
- 12) Espina VA, Edmiston KH, Heiby M, et al. A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(10): 1998-2018.
- 13) Kriegsheim A, Preisinger C, Kolch W. Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics. *Methods Mol Biol.* 2008; 484: 177-92.
- 14) Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics.* 2006; 6(20): 5650-61.
- 15) Lee IN, Chen CH, Sheu JC, et al. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2005; 4(6): 2062-9.
- 16) Melle C, Ernst G, Scheibner O, et al. Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 2007; 6(1): 306-15.
- 17) Tiss A, Smith C, Camuzeaux S, et al. Serum peptide profiling using MALDI mass spectrometry: avoiding the pitfalls of coated magnetic beads using well-established ZipTip technology. *Proteomics.* 2007; 7 Suppl 1: 77-89.
- 18) Shoshan SH, Admon A. Novel technologies for cancer biomarker discovery: humoral proteomics. *Cancer Biomark.* 2007; 3(3): 141-52.
- 19) Yang MH, Tyan YC, Jong SB, et al. Identification of human hepatocellular carcinoma-related proteins by proteomic approaches. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 388(3): 637-43.
- 20) Ang IL, Poon TC, Lai PB, et al. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res.* 2006; 5(10): 2691-700.
- 21) Feng JT, Liu YK, Song HY, et al. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics.* 2005; 5(17):

- 4581-8.
- 22) Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, et al. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(2): 470-7.
- 23) He QY, Zhu R, Lei T, et al. Toward the proteomic identification of biomarkers for the prediction of HBV related hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem.* 2008; 103(3): 740-52.
- 24) Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, et al. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip System. *Hepatology.* 2007; 45(4): 948-56.
- 25) Cui J, Kang X, Dai Z, et al. Prediction of chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by SELDI-based serum decision tree classification. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007; 133(11): 825-34.
- 26) Göbel T, Vorderwülbecke S, Hauck K, et al. New multi protein patterns differentiate liver fibrosis stages and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C serum samples. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(47): 7604-12.
- 27) Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, et al. Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Can.* 2006; 94(2): 287-93.
- 28) Lee IN, Chen CH, Sheu JC, et al. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics.* 2006; 6(9): 2865-73.
- 29) Geng X, Wang F, Li YG, et al. SELDI-TOF MS proteinchip technology for screening of serum markers of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007; 26(4): 505-8.
- 30) He M, Qin J, Ahai R, et al. Detection and identification of NAP-2 as biomarker in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma by proteomic approach. *Proteome Science.* 2008; 6: 10.
- 31) Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, et al. Preclinical and post-treatment changes in the HCC-associated serum proteome. *Br J Cancer.* 2006; 95(10): 1379-83.
- 32) Poon TCW, Hui A, Chan HLY, et al. Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting: A pilot study. *Clinical Chemistry.* 2005; 51(2): 328-35.
- 33) Van Greevenbroek MM, Vermeulen VM, De Bruin TW. Identification of novel molecular candidates for fatty liver in the hyperlipidemic mouse model, HcB19. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1148-54.
- 34) Uto H, Sato Y, Ishida Y, et al. Proteomic analysis of serum biomarkers in patients with nonalcoholic steatohepatitis using SELDI-TOF/MS or MALDI-TOF/MS. *Hepatology.* 2007; 46 (Supple): 735A.
- 35) Orvisky E, Drake SK, Martin BM, et al. Enrichment of low molecular weight fraction of serum for MS analysis of peptides associated with hepatocellular carcinoma. *Proteomics.* 2006; 6(9): 2895-902.
- 36) Goldmann R, Resson HW, Abdel-Hamid M, et al. Candidate markers for the detection of hepatocellular carcinoma in low-molecular weight fraction of serum. *Carcinogenesis.* 2007; 28(10): 2149-53.
- 37) Kam RKT, Poon TCW, Chan HLY, et al. High-throughput quantitative profiling of serum N-glycome by MALDI-TOF mass spectrometry and N-glycomic fingerprint of liver fibrosis. *Clinical Chemistry.* 2007; 53(7): 1254-63.
- 38) Resson HW, Varghese RS, Goldman L, et al. Analysis of MALDI-TOF mass spectrometry data for discovery of peptide and glycan biomarkers of hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 2008; 7(2): 603-10.
- 39) Comunale MA, Lowman M, Long RE, et al. Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 2006; 5(2): 308-15.
- 40) Paradis V, Asselah T, Dargere D, et al. Serum proteome to predict virologic response in patients with hepatitis C treated by pegylated interferon plus ribavirin. *Gastroenterology.* 2006; 130(7): 2189-97.
- 41) Miyazaki T, Ohura T, Kobayashi M, et al. Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal,

liver-specific supplementation via a transgene. J Biol Chem. 2001; 276: 35995-9.

- 42) Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, et al. Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and

formiminotransferase cyclodeaminase. Hepatology. 2008; 48(2): 519-30.

- 43) Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, et al. Proteomic profiling reveals the prognostic value of APC-binding protein EB1 in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008(in press).
-



非アルコール性脂肪肝炎： NASH

宇都浩文 田ノ上史郎 坪内博仁

Uto, Hirofumi

Tanoue, Shiro

Tsubouchi, Hirohito

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学

KEY WORD

NAFLD, NASH, 栄養療法,
メタボリックシンドローム

はじめに

食事の欧米化などにより、肥満やメタボリックシンドロームの頻度は増加しており、脂肪肝をとともなう患者も増加してきている。ウイルス性慢性肝疾患などの原因がなく、飲酒歴がない、もしくは少ない（エタノール換算で20g/日以下）患者の脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease：NAFLD）と考えられる。NAFLDのなかにはアルコール性肝障害と類似した病理組織学的変化を呈する非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：NASH）が含まれ、肝硬変や肝癌に進展する可能性があることから、NAFLDの病態は必ずしも予後良好ではない。NAFLDおよびNASHは生活習慣病やメタボリックシンドロームと密接に関連することから、生活習慣病やメタボリックシンドロームに対する栄養療法が、NAFLDおよびNASHの栄養療法の基本である。

NASHの概念

NASHの病態は、1979年Alderらがはじめて報告し、1980年にはLudwigらが肝炎ウイルス、自己免疫、先天性代謝異常、薬物などの原因が除外された肝障害の患者で、飲酒歴がほとんどない（エタノール換算で20g/日以下）にもかかわらずアルコール性肝障害に類似した病態を呈する疾患

群をNASHと定義した（図1）。また、NAFLDのなかにはNASHと異なり、活動性肝炎の所見や肝線維化のない例が多く含まれ、単純性脂肪肝（simple steatosis）と定義されるが、単純性脂肪肝は経過中にNASHの病態に移行する可能性があり、注意が必要である。

NASHはNAFLDの約10～15%を占め、約50%は不変であるが、30～50%は進行性で、5～20%は10年で肝硬変に進展するともいわれている。また、NASHを背景とした肝細胞癌の発癌率は5年間で15%と報告されている¹⁾。

NASHの発症メカニズム

NASHの発症メカニズムとしてtwo-hits theoryが提唱されている。すなわち、肝細胞に中性脂肪が蓄積し（first hit）、次に酸化ストレス、サイトカイン、エンドトキシンなどの障害因子（second hit）が加わり、脂肪肝炎（steatohepatitis）を発症するという機序である。また、NASHの病因はさまざまであるが（表1）、肝臓に中性脂肪が過剰に蓄積することが基本病態であり、インスリン抵抗性や糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などとも関連することが報告され、NASHを含むNAFLDはメタボリックシンドロームの一病型であると考えられるようになった。

「メタボリックシンドローム」は平成17年4月に日本内科学会などの8学会合同でその診断基準が示され（表2）、内臓脂肪蓄積を共通の要因とした高血糖、脂質異常、高血圧を呈する病態であり、これらの病態はNASHの発症や病態進展に促進的に作用する。

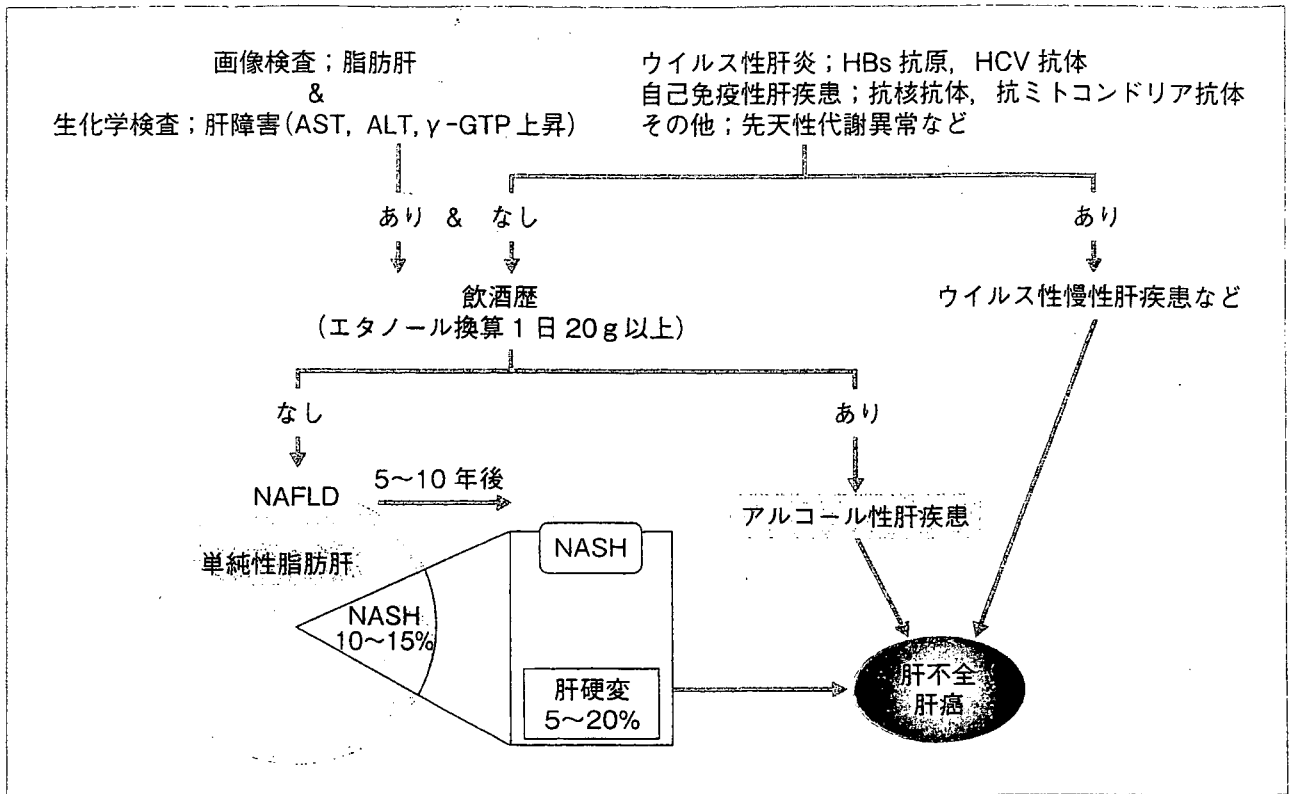


図 1 NAFLD/NASH の概念

表 1 NAFLD/NASH の病因

たばく質不足	グルココルチコイド	肥満	炎症性腸疾患
飢餓	合成女性ホルモン	糖尿病	細菌過剰増殖性小腸憩室症
完全非経口栄養	アスピリン	高脂血症	HIV
急速な体重減少	Ca チャンネル阻害薬	メタボリックシンドローム	肝中毒物質
肥満のための腸管手術	塩酸アミオダロン	脂肪ジストロフィー症	リン
	タモキシフェン	β リポ蛋白欠損症	石油化学製品
	テトラサイクリン	Weber-Christian 病	毒キノコ
	メトトレキサート	Wolman 病	有機溶剤
	コカイン	妊娠性急性脂肪肝	セレウス菌毒素
	ジドブジン	Wilson 病	

(文献 2 より引用改変)

NASH に対する栄養療法

単純性脂肪肝や NASH に対する治療は、メタボリックシンドロームの基盤となる肥満、とくに内臓脂肪蓄積の改善が基本であり、食事療法や運動療法などの日常生活の是正を中心とする。また、糖尿病、高脂血症、高血圧などをともなうことが多く、これらの合併症が存在する場合には、そ

の治療を行う。とくに NASH は肝硬変に進展し、肝発癌の可能性もあることから、積極的な薬物療法も考慮すべきである。また、NASH では背景疾患である糖尿病、高脂血症、高血圧などに対する薬物療法だけでなく、酸化ストレスやインスリン抵抗性などの NASH の基盤となる病態の改善を目指した治療が行われることもある。

表2 メタボリックシンドロームの診断基準

ウエスト周囲径（腹囲） （内臓脂肪面積 男女とも $\geq 100 \text{ cm}^2$ に相当）	男性 $\geq 85 \text{ cm}$ 女性 $\geq 90 \text{ cm}$
高トリグリセライド（TG）血症 かつ/または 低HDLコレステロール（HDL-C）血症	$\geq 150 \text{ mg/dl}$ $< 40 \text{ mg/dl}$
（男女とも）収縮期血圧 かつ/または 拡張期血圧	$\geq 130 \text{ mmHg}$ $\geq 85 \text{ mmHg}$
空腹時血糖	$\geq 110 \text{ mg/dl}$

* ウエスト径は立位，軽呼吸時，臍レベルで測定。臍が下方に偏位している場合は肋骨下縁と前上腸骨棘の midpoint の高さで測定。

* 高TG血症，低HDL-C血症，高血圧，糖尿病に対する薬物治療を受けている場合は，それぞれの項目に含める。

（文献3より引用）

表3 NASH患者の体重減少前後の比較

糖尿病（%）	39	8	0.005
高血圧（%）	50	19	0.006
メタボリックシンドローム（%）	64	19	<0.001
BMI	47 \pm 10.6	34 \pm 5.5	<0.001
体重（kg）	134.8 \pm 26	99.8 \pm 17.2	<0.001
AST（IU/l）	27.0 \pm 33.0	17.0 \pm 8.0	<0.001
ALT（IU/l）	43.0 \pm 33.0	21.0 \pm 15.0	<0.001
γ -GTP（IU/l）	38.0 \pm 33.6	18.0 \pm 9.0	<0.001

（文献5より引用改変）

●栄養調査

NAFLDに対する栄養療法を検討する際にもっとも重要なことは，まず栄養調査を行い，個々の食習慣の問題点を抽出し，それを改善することである。NAFLD患者においては菓子類，果物，揚げ物などの過剰摂取，夜食習慣，朝食抜きなどのライフスタイルの問題点などが多いといわれている⁴⁾。とくに高シヨ糖食は膵 β 細胞からのインスリン分泌を刺激し，食後の高インスリン血症を増悪させる。長期の高シヨ糖食は脂肪酸の新規合成（de novo 合成）を亢進させる。さらに，シヨ糖の分解で生じるフルクトース（fructose）は中性脂肪（トリグリセリド；TG）となり，肝への脂肪蓄積を助長するので，高シヨ糖食は控えるよう

に指導する。

●肥満に対する減量効果

DixonらはBMI 35 kg/m²以上（平均体重135 kg）のNAFLD患者36人を対象に，胃にバンドを装着する外科手術を行い，体重減少とともにメタボリックシンドロームの病態は改善し，肝障害も軽減したと報告している（表3）。少なくとも肥満患者での減量はNAFLDの病態改善にきわめて有効であると考えられ，減量を目的とした栄養療法はNAFLDの治療の基本である。

●栄養管理

非代償性肝硬変でない場合は1日の必要エネ

表4 NASHの栄養管理

総エネルギー (kcal/kg)	25~35	30~35
糖質/エネルギー比 (%)	55~60	55~60
たんぱく質 (g/kg)	1.0~1.5	0.5~0.7
分岐鎖アミノ酸 (g)	なし	13~39
脂質/エネルギー比 (%)	20~25	20~25

(文献6より引用改変)

ルギー量は標準体重あたり25~35 kcal/kgとし、たんぱく質量としては1.0~1.5 g/kg、脂質エネルギー比は20~25%を基本とする(表4)。また、飽和脂肪酸の摂取過多は血中コレステロールを上昇させるため制限する。多価不飽和脂肪酸のうちn-6系多価不飽和脂肪酸はLDL-Cを低下させ、n-3系多価不飽和脂肪酸は中性脂肪を低下させる。

NASHと単純性脂肪肝を対象とした栄養調査では⁴⁾、総エネルギー摂取量、糖質摂取量は両者ともに平均的な日本人の摂取量と比較し過剰であると報告されている。とくにNASHにおいては、穀類(米、小麦、とうもろこし、いもなど)ではなく嗜好品からの単純糖質(グルコースやフルクトースの単糖類、スクロースなどの二糖類)摂取が過剰である。穀類摂取の減少によりたんぱく質摂取の減少、亜鉛などの微量元素摂取減少につながり、肝での抗酸化ストレス作用の低下、細胞膜あるいはミトコンドリア膜安定作用の低下により、肝障害が誘導されると考えられる⁶⁾。また、HuangらはNASH 23例に1年間にわたって糖質/エネルギー比を40~45%に設定した食事療法を行ったところ、AST、ALTの低下、HOMA-IRを指標としたインスリン抵抗性の改善、肝組織所見の改善が得られたと報告した⁸⁾。Okitaらは、標準体重換算で総カロリーを25 kcal/kgとし、糖質/エネルギー比を54%に設定した食事療法をNAFLD 14例に6カ月間施行し、AST、ALTが改善したと報告している⁹⁾。さらに、たんぱく質摂取量については、たんぱく/エネルギー比はNASHと単純性脂肪肝いずれも平均的な日本人

と比較し低く、とくにNASH例では10~15%と低く、脂質摂取量はNASHと単純性脂肪肝いずれも平均的な日本人と比し高く、多価不飽和脂肪酸摂取は低値であった。このようなことから、NAFLDとくにNASHでは単純糖類を中心とした糖質の制限、糖質/エネルギー比の抑制とたんぱくエネルギー比の改善、多価不飽和脂肪酸摂取を勧めながらも脂質摂取量は制限することが重要であると考えられる。すなわち、総エネルギーは肥満患者では25 kcal/kg、非肥満患者では30~35 kcal/kg、糖質/エネルギー比55%、脂質/エネルギー比25%を目安とすることが勧められる⁶⁾。

● NASH 肝硬変に対する栄養管理

NASHの5~20%の症例が10年で肝硬変に進行すると考えられている。NASHは自覚症状がなく、肝疾患にともなう症状の出現後に診断された場合は、すでに肝硬変に進展している症例も少なくない。また、原因不明の肝硬変にはburned-out NASH(memo参照)が多く含まれている可能性がある。NAFLDを含む慢性肝疾患のなかで肝硬変を疑う所見としては、AST/ALT 1以上、血小板数低値、ヒアルロン酸高値などである¹¹⁾。

食事摂取が十分で、血中アンモニアが正常範囲内であっても、低アルブミン血症(3.5 g/dl以下)やBTR低値(4.0以下)を示す非代償性肝硬変症例には、BCAA(分岐鎖アミノ酸)顆粒製剤を投与する。1日あたりの総エネルギーは30~35 kcal/kg必要であるが、耐糖能異常がある場合は標準体重あたり30 kcal/kgを目安とする。1日

表5 慢性肝疾患に対する栄養治療（肝疾患ガイドライン-ESPEN）

非代償性肝硬変	25~35	1.0~1.2
栄養障害あり	35~40	1.5
合併症		一時的に 0.5, その後 1.0~1.5
脳症（Ⅰ～Ⅱ）	25~35	たんぱく不耐症であれば、植物たんぱく質やBCAAを補充
脳症（Ⅲ～Ⅳ）	25~35	0.5~1.2 BCAA輸液製剤投与

原則的には経口または経腸栄養を優先すべきである。経静脈栄養は、経腸栄養が不可能か実際的でない場合に限り用いられるべきである。経静脈栄養ではエネルギー量は、グルコースと脂肪で供給され、非窒素カロリーの35~50%を脂肪で補う。窒素は特別の場合を除いて、通常のアミノ酸輸液剤を用いるべきである。上記計算は理想体重を用いる。

（文献13より引用改変）

あたりのたんぱく質は1.2~1.3 g/kg, 脂肪35 g(脂肪エネルギー比25%), 食塩5~7 gを基本とする。不足の栄養素はBCAAを高含有する肝不全経腸栄養剤で補う。硬変肝では食後のグリコーゲン貯蔵量が十分でなく、とくに夕食から翌朝までのエネルギー供給が十分でないため、200 kcal程度の夜食（夕食からの振り替え）やBCAA製剤の就寝前投与（経腸栄養剤1包）が勧められている¹²⁾。BCAA製剤は血清アルブミン値を増加させる効果もある。欧州静脈経腸栄養学会(ESPEN)における慢性肝疾患に対する栄養治療によれば(表5)、非代償性肝硬変における1日あたりのたんぱく質は1.0~1.2 g/kgを基本とし、栄養障害や肝性脳症の程度によりたんぱく質量は変更する。肝性脳症の予防には、高たんぱく質食を避け、便秘異常、消化管出血、利尿薬による急速な腹水の除去などに注意し、血中アンモニア濃度の増加が認められる例や肝性脳症が疑われる例では、低たんぱく食(40 g/日)以下とする。腹水をとも

なう場合は、安静、塩分制限、薬物療法を行う。塩分制限は2~5g/日とするが、きびしい塩分制限による食欲や栄養状態の低下には注意が必要である。血清アルブミンが2.5g/dl以下の場合には、血清膠質浸透圧を上げるためにアルブミン製剤の静脈投与も考慮される¹²⁾。

●小児におけるNASH

近年の小児肥満の増加がNAFLDを増加させる要因となり、小児期においてもNAFLDはまれな疾患ではなくなってきている。診断の際、すべての小児例で肝生検を行うことは困難であり、生化学検査でALT、AST上昇や超音波検査所見による脂肪肝の存在と、その他の肝疾患の除外によりNAFLDと臨床診断されることが多い。ALTやASTを指標とすると、わが国の肥満小児のうち12~35%にこれらの異常を認めるといわれている。また、小児期にすでに肝線維化の進んだNASH症例も存在することから、小児期

Memo burned-out NASH

burned-out NASHとは、NASHによる肝硬変の肝組織所見において、NASHの経過中に特徴的な脂肪沈着や炎症細胞浸潤などの所見が消失してくる病態をいう。原因不明の肝硬変では、ウイルス性など他の原因による肝硬変に比較して、肥満や糖尿病の合併頻度が有意に高いこと、そして原因不明の肝硬変で肝移植した症例では、移植後、脂肪肝やNASHの発症率が高いことから、原因不明の肝硬変ではburned-outしたNASHが多く含まれていると考えられている。

（文献10より引用改変）

NASHに対しても積極的な治療が必要である。

成人と同様に、小児期のNAFLDは肥満とくに内臓肥満が関与していることが多く、肥満対策としての栄養療法や運動療法はとくに重要である。しかし、小児本人の病識がないことが多く、周囲家族の協力が必要であり、食事制限が必要であるものの、必要な栄養素は摂取する必要があることなどの理由で、実際の治療は容易でなく、治療が有効な例は50%前後といわれている。成人同様、ウルソデオキシコール酸、ビタミンE、Cなどの抗酸化剤などの薬物療法の併用も行われることがある¹⁴⁾。

●術後NASH

小腸広範囲切除術による消化吸収障害を主体とする短腸症候群は、吸収障害による低栄養状態、微量元素(亜鉛、セレンなど)やビタミン吸収障害による抗酸化物質の低下に加え、小腸細菌叢異常、消化管ホルモン異常などがNAFLD/NASHの発症に関与する。また、膵疾患に対しては膵全摘、膵頭十二指腸切除などが行われるが、膵疾患では、術前よりすでに糖尿病などの代謝異常をとまなっていることが多い。さらに、膵内分泌および外分泌低下による糖、蛋白、脂質代謝障害もNAFLD/NASHの病態に関与する。このように、肥満に伴うNAFLDとは異なり、消化器外科手術後の低栄養や代謝異常でもNAFLD/NASHを呈することがあり、術後の中心静脈栄養、TPN(total parenteral nutrition)の長期投与もNAFLD/NASHの誘引となるため、術後のNAFLD/NASHの病態はより複雑であり、病態に応じた対応が必要である¹⁵⁾。

おわりに

NAFLD/NASHの治療の基本はメタボリックシンドロームの基盤となる病態の改善であり、肥

満、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧の是正を中心とした栄養療法、運動療法がきわめて重要である。また、NAFLD/NASHの病態は複雑であり、個々の症例の病態に応じた対応が必要である。最近では、職種の壁を越え、栄養サポートを実施する多職種の集団である栄養サポートチーム(NST: Nutrition Support Team)の重要性が認識されてきており、NASHにおいても、今後その役割が期待される。

文献

- 1) Hashimoto E, et al. The characteristics and natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 72-6.
- 2) Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *New Engl J Med* 2002; 346: 1221-31.
- 3) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会. メタボリックシンドロームの定義と診断基準. *日本内科学会誌* 2005; 94: 794-809.
- 4) 鈴木吉知, ほか. 脂肪肝. In: 肝と栄養の会: 実践肝疾患の栄養療法~疾患別の治療~; 南江堂; 2006. p14-23.
- 5) Dixon JB, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004; 39: 1647-1654.
- 6) 松浦文三, 恩地森一. 食事療法. In: 西原利治, 編. NASH診療のbest approach: 中外医学社; 2008. p249-252.
- 7) Toshimitsu K, et al. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition* 2007; 23: 46-52.
- 8) Huang MA, et al. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2007; 100: 1072-81.
- 9) Okita M, et al. Effect of a moderately energy-restricted diet on obese patients with fatty liver. *Nutrition* 2001; 17: 542-7.
- 10) 日本肝臓学会編. NASH肝硬変. NASH・NAFLDの診療ガイド: 文光堂; 2008. p26-28.
- 11) 日本肝臓学会編. NAFLDの血液検査所見. NASH・NAFLDの診療ガイド: 文光堂; 2006. p30-33.
- 12) 日本肝臓学会編. 非代償性肝硬変の管理. 慢性肝炎の治療ガイド2008: 文光堂; 2008. p48-61.
- 13) Plauth M, et al. ESPEN guidelines for nutrition in liver disease and transplantation. *Clin Nutr* 1997; 16: 43-55.
- 14) 大関武彦. 小児とNAFLD. In: 西原利治, 編. NAFLDのすべて. 別冊医学のあゆみ: 医歯薬出版; 2006. p32-37.
- 15) 田中真二, 有井滋樹. 術後NAFLD/NASH. In: 西原利治, 編. NASH診療のbest approach: 中外医学社; 2008. P110-114.

NASH の診断 1

バイオマーカー

宇都浩文 吳 建 坪内博仁

うと ひろふみ、くれ たけし、つぼうち ひろひと：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学

● はじめに

肝細胞に中性脂肪が過剰に蓄積した状態の肝障害を脂肪性肝疾患と総称し、飲酒量がエタノール換算で 20 g/日以下の場合には NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease: 非アルコール性脂肪性肝疾患) が考えられる。NAFLD の約 10% は肝線維化が進展し、肝硬変や肝癌を発症する可能性があるといわれ、そのような予後不良な疾患は、NASH (nonalcoholic steatohepatitis: 非アルコール性脂肪肝炎) と考えられる。

NAFLD は脂肪肝を基本とすることから、多飲歴がないことと画像診断による脂肪肝の存在などから診断できる。一方、NASH は肝細胞の風船様腫大、炎症細胞浸潤、肝細胞周囲線維化などの病理学的所見から診断することから、NASH の確定診断には肝生検による組織診断が不可欠である。しかし、肝生検は侵襲的な検査であり、すべての NAFLD 患者に肝生検を施行することは現実的ではない。このため、NAFLD のなかで肝生検の必要な症例のスクリーニングが重要となる。

本稿では、NASH と単純性脂肪肝との鑑別に有用な非侵襲的検査、特に簡便に得られる血液を用いたバイオマーカーについて述べる。

● NAFLD のスクリーニング

NAFLD は、予後良好な単純性脂肪肝と進行

性の NASH を含むことを念頭に置きながら、NASH の診断のためにまず NAFLD のスクリーニング (図 1) が必要である。

a 肝機能障害

トランスアミナーゼ (AST<ALT) の軽度上昇 (正常値上限の 2~4 倍)、胆道系酵素 (ALP, γ -GTP) の軽度上昇を認めるが、基準値内にとどまる症例がある。

b 画像検査(超音波, CT 等)による脂肪肝の存在

腹部超音波検査は簡便で脂肪肝のスクリーニングに有用であるが、肝・脾 CT 値を用いた CT 検査は定量性に優れ、診断能も高い。ただし、肝硬変に進行した NASH では、脂肪肝を認めないことがあることに留意する。

c 他の肝疾患(ウイルス性, 自己免疫性, 代謝性疾患等) の除外

HBs 抗原, HCV 抗体などのウイルス性肝炎の診断に必要な検査, 抗核抗体, 抗ミトコンドリア抗体, 免疫グロブリンなどの自己免疫性肝疾患に関連する項目, セルロプラスミン, トランスフェリン飽和度, α_1 -アンチトリプシンなど代謝性肝疾患に関連する項目を測定し, 他の肝疾患を否定する。なお, NASH の約 10% で抗核抗体が陽性(160 倍以下)であり, 自己免疫性肝炎のスコアリングシステムなどを用いて総合的に鑑別する必要がある。また, 代謝性肝疾患は家族歴なども考慮し, 必要な場合のみ検討する。

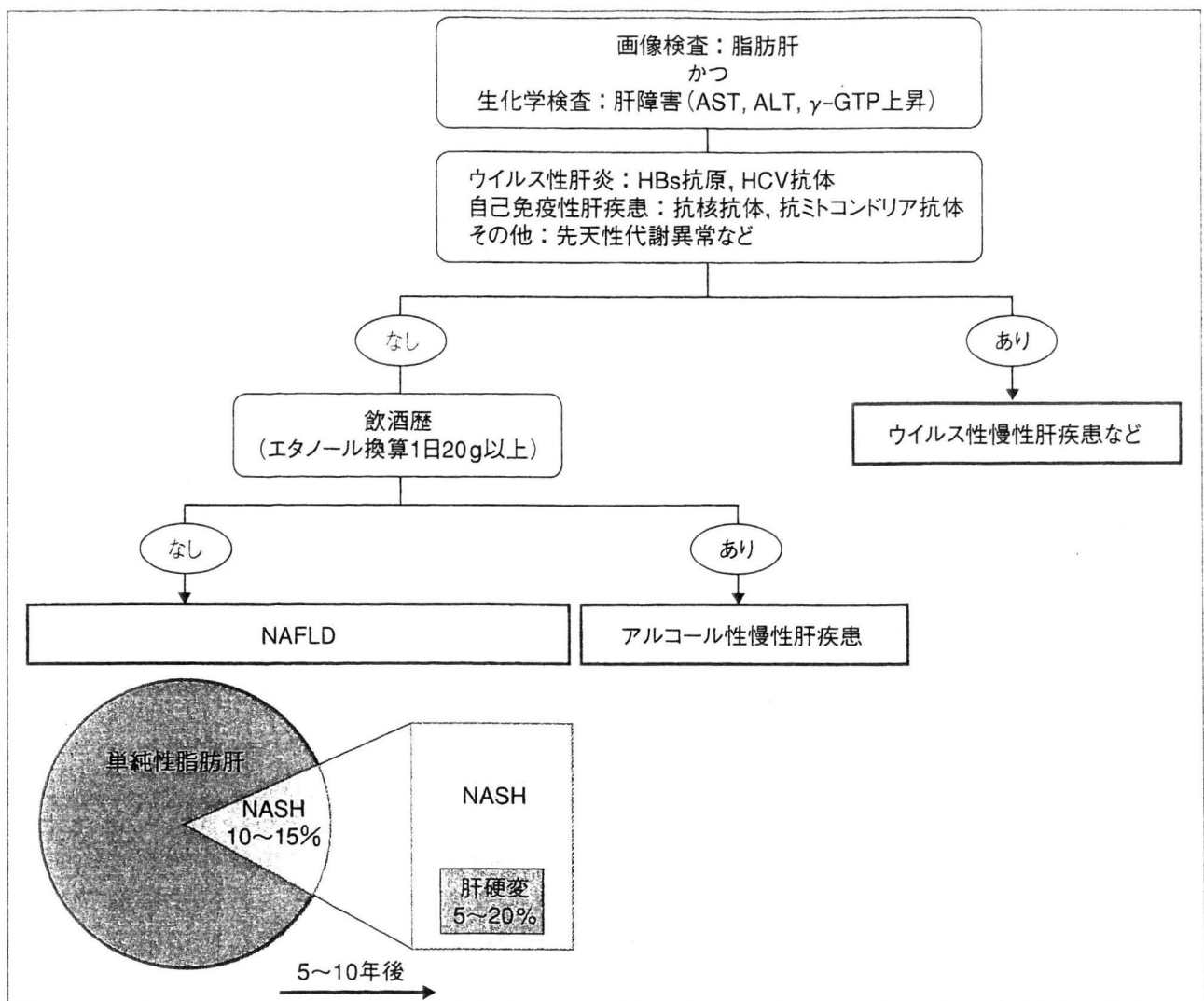


図 1 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) のスクリーニング法

d 多飲歴の否定

エタノール換算で 20 g/日を超える飲酒歴を認めないことを確認する。

e 合併症

メタボリックシンドローム、肥満、脂質異常症、高血圧、高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群などが NAFLD のリスクファクターとしてあげられる。複数のリスクファクターを有するものは NASH の可能性が高い。

● NASH のバイオマーカー

NAFLD と考えられる症例のうち、単純性脂肪肝よりも NASH が疑われる場合には肝生検による組織診断が必要となる。

1 NASH の一般生化学検査所見

a トランスアミナーゼの上昇

NASH は基本的には ALT 優位のトランスアミナーゼ上昇が特徴的であるが、その値は軽度 (100 IU/L 以下) のことが多く、基準値内で推移する症例もある。トランスアミナーゼの値自体は NASH の重症度とは比例しないとされている¹⁾。なお、AST/ALT 比は肝線維化の進行に伴って上昇し、肝硬変となった場合には ALT 優位が AST 優位となり、AST/ALT 比は 1 以上となるが、アルコール性肝疾患と異なり 2 以上となることは少ない。NAFLD 患者で AST/ALT 比が経時的に上昇傾向を示すものは、NASH の進行が疑われる。

表 1 単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血液・生化学検査の比較 (自験例)

	単純性脂肪肝 (n=15)	NASH (n=35)	p value
ヘモグロビン (g/dL)	15.1±1.8	14.4±1.5	0.07
血小板数 (×10 ⁴ /μL)	23.8±7.5	18.8±7.0	<0.05
AST (IU/L)	41.6±20.2	69.4±46.5	<0.05
ALT (IU/L)	83.1±53.1	94.6±96.0	0.89
γ-GTP (IU/L)	75.3±52.4	155.6±303.1	0.40
総コレステロール (mg/dL)	209.2±45.8	204.8±52.1	0.97
空腹時血糖 (mg/dL)	119.1±48.5	112.3±34.3	0.61

b 肝線維化マーカーの上昇

単純性脂肪肝では肝線維化を認めないため、線維化マーカーは有用な指標になると考えられている。そのなかでも、慢性肝炎の組織学的線維化の程度との相関が高い IV 型コラーゲンとヒアルロン酸は指標となり、進行例ではヒアルロン酸、IV 型コラーゲン、P-III-P (プロコラーゲン-III-ペプチド) などの高値を認める。ただし、感度が十分でないためカットオフ値の設定が難しく、スクリーニング検査には必ずしも適していない。

Guha らは、複数の線維化マーカー (ヒアルロン酸、P-III-P、tissue inhibitor of metalloproteinase-1) を組み合わせた ELF (Enhanced Liver Fibrosis panel) を用いた方法で、線維化を伴った NASH で高い診断能が得られたとしている²⁾。また、体外から肝の硬度を測定する方法である transient elastography (Fibroscan[®]) は、ウイルス性肝疾患だけでなく NAFLD の肝線維化の推定に有用である³⁾。

c 血小板数の低下

血小板は、間接的な肝線維化マーカーのひとつである。自験例でも、単純性脂肪肝と比べて NASH では血小板数は低値であった (表 1)。また、経時的に低下する場合は、NASH の進行が推測できる。

d 血清鉄とフェリチンの上昇

NASH は単純性脂肪肝と比較して、肝組織中の鉄沈着の頻度が高い。また、血清フェリチン値が NASH の肝組織炎症や肝線維化の程度を反映していると報告されている⁴⁾。過剰な鉄が

フェントン反応により強力な酸化作用を有する活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) を産生し、肝障害を悪化させると考えられており、後述の酸化ストレスとも関連する。

2 NASH の病態に関連した検査所見

a インスリン抵抗性

インスリン抵抗性の指標として HOMA-IR [homeostasis model assessment-insulin resistance : 空腹時血糖 (mg/dL) × IRI (μU/mL) / 405] がよく利用される。HOMA-IR は 1.6 以下であればインスリン抵抗性はないと判断するが、NASH 症例では 2 以上の高値が多い。NAFLD はインスリン抵抗性を基盤として発症することが多く、HOMA-IR は単純性脂肪肝と NASH との鑑別にも有用である^{5,6)}。また、NASH での肝脂肪化の程度と HOMA-IR は相関すると報告されている⁷⁾。しかし、カットオフ値については統一見解がないこと、HOMA-IR 自体が空腹時血糖 140 mg/dL 以上ではインスリン抵抗性の指標とはならないことに留意する。

b 酸化ストレスマーカー

酸化ストレスとは生体内の酸化還元状態を維持する機構が破綻し、空気中の酸素分子よりも非常に不安定で強い酸化力を有する ROS が過剰となった状態である。ROS はさまざまな生体分子と反応し、細胞障害を起こし多くの疾病の発症に関与する。NASH の肝組織中では肝細胞のミトコンドリア形態異常、チトクローム P450 2E1 (CYP2E1) の過剰発現、高度な鉄沈着などが原因で ROS が過剰となり、酸化ストレ

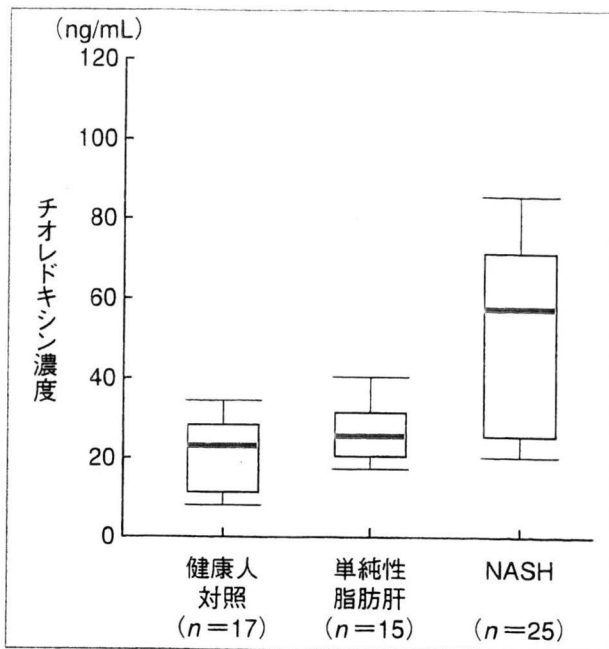


図2 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血清チオレドキシニン濃度 (文献9から引用, 改変)

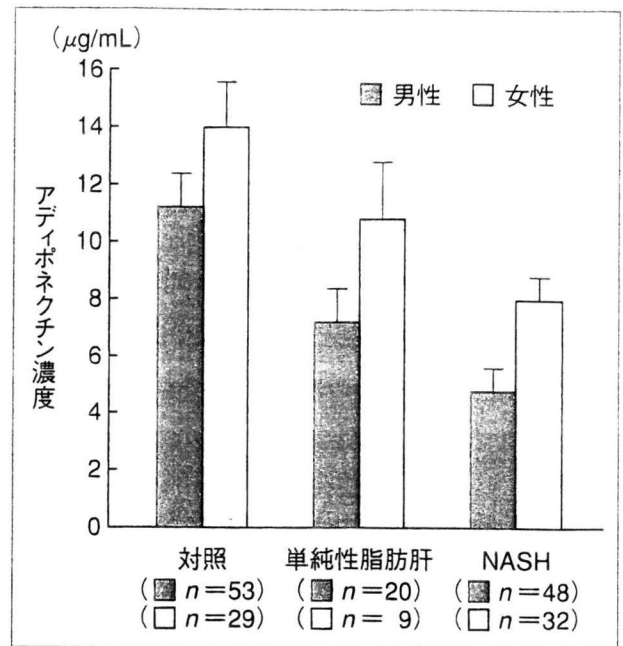


図3 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血清アディポネクチン濃度 (文献5から引用, 改変)

スは亢進している。酸化ストレスマーカーとしては、活性酸素による修飾化合物と抗酸化酵素・抗酸化物質の2つに分けられ、前者にはマロンジアルデヒド (MDA), 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE), 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG), 後者にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ, チオレドキシニン (TRX) などが知られている。NAFLDは健康人と比較し, CuZn-SOD 活性は低く, 血清MDA 活性は高い⁸⁾。また, 単純性脂肪肝とNASHとの比較では, 肝組織中MDA, 血清TRXがNASHで高値である^{9,10)}(図2)。特にTRXは血清を用いて簡便に測定できるため, 鑑別マーカーとして有用と考えられる。

c アディポサイトカイン

脂肪組織は余剰エネルギーを貯蔵するだけでなく, 生理活性物質であるさまざまなアディポサイトカインを分泌する。このアディポサイトカイン分泌異常がNAFLD, 特にNASHの病態進展に重要な役割を果たしていると考えられている。アディポサイトカインにはアディポネクチン, 腫瘍壊死因子 (TNF)- α , レプチンなどが知られている。

①アディポネクチン：脂肪組織に特異的に高

発現している分泌蛋白質であるが, 肥満をきたし内臓脂肪量が増えると, 血中濃度は低下する。アディポネクチンはインスリン抵抗性改善作用, 動脈硬化抑制作用, 抗炎症作用, 抗肝線維化作用を有する^{11,12)}。また, 性・年齢・BMIをマッチさせた対照群と比較して, NASH患者は有意に血中アディポネクチン値が低く, 血中アディポネクチン値はNASHの診断マーカーとして有用である⁵⁾(図3)。

②腫瘍壊死因子 (TNF)- α ：代表的な炎症性サイトカインであり, 肝炎を悪化させるだけでなく, インスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を低下させることでインスリン抵抗性を増悪させる。また, TNF- α はアディポネクチンの遺伝子発現を低下させる。小児NASH患者では, 単純性脂肪肝と比較して血清TNF- α 値が高値であり, NAS score (NAFLD activity score)とも有意な相関を示す¹³⁾。さらに, 可溶性TNF受容体 (sTNFR)-2濃度は, 健康人や単純性脂肪肝患者と比較してNASH患者で高く, sTNFR-2濃度が高値となるTNF- α の一塩基多型 (TNF- α position-1031CもしくはTNF- α position-863A) キャリアはNASH患者で頻度が高くなると報告されている¹⁴⁾。以上のことか