

Japanese Association for Cerebro-cardiovascular Disease Control, a Research Grant for Cardiovascular Diseases (7A-2) from the Ministry of Health, Labor and a Welfare and Health and Labor Sciences Research Grant, Japan (Comprehensive Research on Aging and Health: H11-Chouju-046, H14-Chouju-003, H17-Chouju-012; Comprehensive Research on Cardiovascular Diseases: H19-Seishu-008), and by the Japan Society for the Promotion of Science invitation fellowship programs for research in Japan. The authors thank all the members of the Japanese Association of Public Health Center Directors and all the staff of the public health centers that cooperated with our study. Investigators and members of the research group are listed in the appendix of Okamura et al., 2003.

References

- Ajani, U. A., Gaziano, J. M., Lotufo, P. A., Liu, S., Hennekens, C. H., Buring, J. E., et al. (2000). Alcohol consumption and risk of coronary heart disease by diabetes status. *Circulation* 102, 500–505.
- Bittner, D., and McCleary, M. (1963). The cupric-phenanthroline chelate in the determination of monosaccharides in whole blood. *Am. J. Clin. Pathol.* 40, 423–424.
- Bongers, I. M., van de Goor, I. A., Garretsen, H. F., and van Oers, H. A. (1999). Aggregate comparisons of self-reported versus nonself-reported drinking in a general population survey. *Subst. Use Misuse* 34, 421–441.
- Calles-Escandon, J., Garcia-Rubi, E., Mirza, S., and Mortensen, A. (1999). Type 2 diabetes: one disease, multiple cardiovascular risk factors. *Coron. Artery Dis.* 10, 23–30.
- Chalmers, K. H. (2005). Medical nutrition therapy. In C. R. Kahn, et al. (Ed.), *Joslin's Diabetes Mellitus* (14th ed.) (pp. 611–631) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Choudhury, S. R., Ueshima, H., Kita, Y., Kobayashi, K. M., Okayama, A., Yamakawa, M., et al. (1994). Alcohol intake and serum lipids in a Japanese population. *Int. J. Epidemiol.* 23, 940–947.
- De Oliveira, E., Silva, E. R., Foster, D., Harper, M. M., Seidman, C. E., Smith, J. D., et al. (2000). Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 102, 2347–2352.
- Diem, P., Deplazes, M., Fajfr, R., Bearth, A., Muller, B., Christ, E. R., et al. (2003). Effects of alcohol consumption on mortality in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 46, 1581–1585.
- Gaziano, J. M., Buring, J. E., Breslow, J. L., Goldhaber, S. Z., Rosner, B., VanDenburgh, M., et al. (1993). Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 329, 1829–1834.
- Hart, C. L., Smith, G. D., Hole, D. J., and Hawthorne, V. M. (1999). Alcohol consumption and mortality from all causes, coronary heart disease, and stroke: results from a prospective cohort study of Scottish men with 21 years of follow-up. *Br. Med. J.* 318, 1725–1729.
- Hines, L. M., Stampfer, M. J., Ma, J., Gaziano, J. M., Ridker, P. M., Hankinson, S. E., et al. (2001). Genetic variation in alcohol dehydrogenase and the beneficial effect of moderate alcohol consumption on myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 344, 549–555.
- Imhof, A., Froehlich, M., Brenner, H., Boeing, H., Pepys, M. B., and Koenig, W. (2001). Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 357, 763–767.
- Iso, H., Baba, S., Mannami, T., Sasaki, S., Okada, K., Konishi, M., et al. (2004a). Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I. *Stroke* 35, 1124–1129.
- Iso, H., Imano, H., Kitamura, A., Sato, S., Naito, Y., Tanigawa, T., et al. (2004b). Type 2 diabetes and risk of non-embolic ischaemic stroke in Japanese men and women. *Diabetologia* 47, 2137–2144.
- Koppes, L. L., Dekker, J. M., Hendriks, H. F., Bouter, L. M., and Heine, R. J. (2006). Meta-analysis of the relationship between alcohol consumption and coronary heart disease and mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 49, 648–652.
- MacKay, J., and Mensah, G. (2004). The Atlas of Heart Disease and Stroke. World Health Organization. Available at: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_29_world_data_table.pdf. pp. 84–90. Accessed October 28, 2009.
- Nakamura, M., Sato, S., and Shimamoto, T. (2003). Improvement in Japanese clinical laboratory measurements of total cholesterol and HDL-cholesterol by the US cholesterol reference method laboratory network. *J. Atheroscler. Thromb.* 10, 145–153.
- Nakamura, Y., Kita, Y., Iso, H., Ueshima, H., Okada, K., Konishi, M., et al. (2007). Alcohol consumption, alcohol-induced flushing and incidence of acute myocardial infarction among middle-aged men in Japan-Japan Public Health Center-based prospective study. *Atherosclerosis* 194, 512–516.
- Nakamura, Y., Ueshima, H., Okamura, T., Kadowaki, T., Hayakawa, T., Kita, Y., et al. (2005). Nippon Data80 Research Group. Association between fish consumption and all-cause and cause-specific mortality in Japan: NIPPON DATA80, 1980–99. *Am. J. Med.* 118, 239–245.
- Okamura, T., Kadowaki, T., Hayakawa, T., Kita, Y., Okayama, A., and Ueshima, H. (2003). Nippon Data80 Research Group. What cause of mortality can we predict by cholesterol screening in the Japanese general population? *J. Intern. Med.* 253, 169–180.
- Rimm, E. B., Williams, P., Fosher, K., Criqui, M., and Stampfer, M. J. (1999). Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Br. Med. J.* 319(7224), 1523–1528.
- Ron, E., Carter, R., Jablon, S., and Mabuchi, K. (1994). Agreement between death certificate and autopsy diagnoses among atomic bomb survivors. *Epidemiology* 5, 48–56.
- Saito, I., Folsom, A. R., Aono, H., Ozawa, H., Ikebe, T., and Yamashita, T. (2000). Comparison of fatal coronary heart disease occurrence based on population surveys in Japan and the USA. *Int. J. Epidemiol.* 29, 837–844.
- Thun, M. J., Peto, R., Lopez, A. D., Monaco, J. H., Henley, S. J., Heath, C. W. Jr., et al. (1997). Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 337, 1705–1714.
- Tsugane, S., Fahey, M. T., Sasaki, S., and Baba, S. (1999). Alcohol consumption and all-cause and cancer mortality among middle-aged Japanese men: seven-year follow-up of the JPHC study Cohort I. Japan Public Health Center. *Am. J. Epidemiol.* 150, 1201–1207.
- de Vegt, F., Dekker, J. M., Groeneveld, W. J., Nijpels, G., Stehouwer, C. D., Bouter, L. M., et al. (2002). Moderate alcohol consumption is associated with lower risk for incident diabetes and mortality: the Hoorn Study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 57, 53–60.
- Waki, K., Noda, M., Sasaki, S., Matsumura, Y., Takahashi, Y., and Isogawa, A., JPHC Study Group (2005). Alcohol consumption and other risk factors for self-reported diabetes among middle-aged Japanese: a population-based prospective study in the JPHC study cohort I. *Diabet. Med.* 22, 323–331.
- WHO Consultation Group (1999). Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus WHO/NCD/NCS/99. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications, 2nd ed., Geneva: World Health Organisation. pp. 1–59.

脂肪肝は内臓脂肪の指標になりえるか

今村也寸志¹⁾ / 桶谷 真²⁾ / 宇都浩文²⁾ / 坪内博仁²⁾

1) 鹿児島厚生連病院 内科 2) 鹿児島大学大学院 消化器疾患・生活習慣病学

I. はじめに

肥満は脂肪肝の発生に最も重要な因子である^{1,2)}。また、脂肪肝には糖尿病や高血圧、脂質異常症などの合併が多く、脂肪肝はメタボリック症候群の表現型の一つとされている³⁾。このため、日常診療や健診などで脂肪肝と診断された場合は、内臓脂肪の蓄積や内臓脂肪と関連するアディポサイトカインの異常が並存すると考えてしまいがちであり、皮下脂肪の病的意義はあまり注目されない。今回、腹部CT検査によって測定した内臓脂肪面積および皮下脂肪面積と、脂肪肝の発生率との関係を解析し、脂肪肝における内臓脂肪と皮下脂肪の臨床的意義について検討した。

II. 対象と方法

対象は鹿児島厚生連健康管理センターの2007年度人間ドック受診者のうちCTによる内臓脂肪面積測定と腹部超音波検査を行った1,793名(56.5 ± 10.8歳)である。

内臓脂肪面積(visceral fat area; VFA)、皮下脂肪面積(subcutaneous fat area; SFA)の評価にはFat scanを用いた。また、脂肪肝の診断は腹部超音波検査で行った。高血圧は治療中あるいは収縮期血圧140mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上を診断基準とした。糖尿病は治療中あるいは空腹時血糖126mg/dl以上、脂質異常症は治療中あるいは総コレステロール220mg/dl以上または中性脂肪150mg/dl以上またはHDL-コレステロール50mg/dl未満とした。統計解析にはStat View 5.0を用いた。

III. 結果

表1に脂肪肝、高血圧、糖尿病および脂質異常症の有無によるVFAおよびSFAをまとめた。男性の場合、いずれの疾患においても、VFAは各疾患(+)群が(-)群より高い値を呈し、SFAで補正後でも有意差が認められた(ANCOVA)。一方、脂肪肝を認める対象者のSFAは、脂肪肝を認めない対象者のSFAよりも高値を示し、VFAで補正後でも有意差を認めた。しかし、高血圧、糖尿病および脂質異常症のSFAには、脂肪肝の有無によるSFAの差ほどの大きな差はなく、VFAで補正後には有意差はなかった。女性においても、同様の結果であった。

次にVFAとSFAの関連を検討すると、VFAとSFAの間には男女共に正の相関関係が認められた(図1)。回帰直線上では、VFAが100cm²のときのSFAは、男性は132cm²、女性ではSFAは207cm²であった。そこで、これらを基準に対象者を4群に分けた(I群: VFA < 100cm², SFA < 132cm²(男性)または < 207cm²(女性)、II群: VFA < 100cm², SFA ≥ 132cm²(男性)または ≥ 207cm²(女性)、III群: VFA ≥ 100cm², SFA < 132cm²(男性)または < 207cm²(女性)、IV群: VFA ≥ 100cm², SFA ≥ 132cm²(男性)または ≥ 207cm²(女性))。表2に示すように、II群は皮下脂肪優位、III群は内臓脂肪優位の身体組成であった。これらの4群における、疾患の発生率を表3にまとめた。脂肪肝の発生率はI群に比してII群、III群が高い値であり、IV群はさらに高い値であった。II群とIII群の脂肪肝合併率は、男性で45.1%と37.0%($p=0.1157$)、女性では36.8%と53.9%($p=0.0263$)であり、同等か、ややIII群が高い結果であった。ま

表 1 疾患の有無による内臓脂肪および皮下脂肪面積の比較

	疾患の有無	(n)	内臓脂肪面積 (cm ²)	皮下脂肪面積 (cm ²)	
男性	脂肪肝	(+)	(488)	140±51	167±55
		(-)	(657)	102±51	121±44
	高血圧	(+)	(442)	134±59	143±51
		(-)	(723)	108±50	139±56
	糖尿病	(+)	(140)	143±53	147±57
		(-)	(1005)	114±54	140±54
	脂質異常症	(+)	(694)	124±53	146±54
		(-)	(451)	108±56	133±54
女性	脂肪肝	(+)	(199)	108±44	231±67
		(-)	(449)	60±34	170±60
	高血圧	(+)	(201)	95±49	203±71
		(-)	(447)	67±37	183±66
	糖尿病	(+)	(44)	114±53	218±74
		(-)	(604)	73±54	187±67
	脂質異常症	(+)	(382)	86±42	198±64
		(-)	(266)	63±42	176±72

p 値は皮下脂肪面積*または内臓脂肪面積**で補正した(共分散分析).

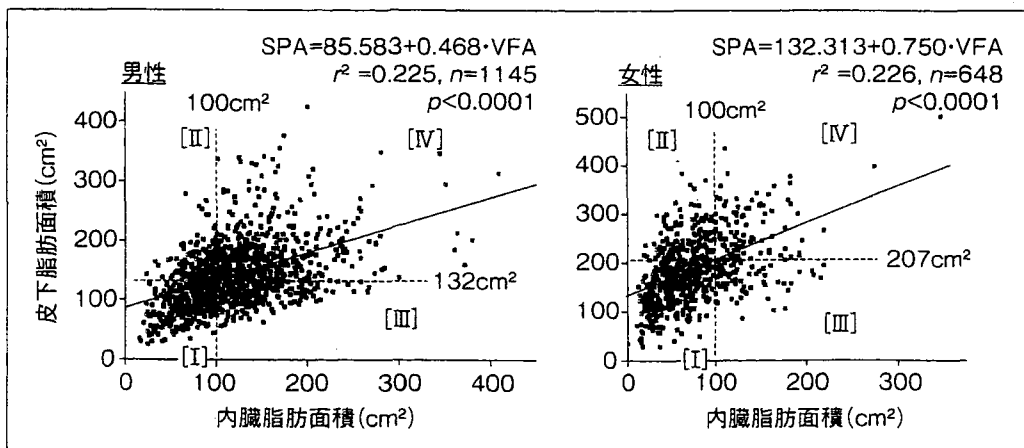


図 1 内臓脂肪面積と皮下脂肪面積の相関関係

表 2 内臓脂肪, 皮下脂肪面積によって分類した 4 群の比較

		I	II	III	IV	p 値
男性	人数(人)	331	162	216	436	
	年齢(歳)	55±11	50±11	60±10	56±11	<0.0001
	BMI(kg/m ²)	22±1.8	24.7±1.9	23.7±1.7	26.6±2.9	<0.0001
	内臓脂肪面積 (cm ²)	67±20.7	79.7±15.6	142.4±34.1	158.2±49.4	<0.0001
	皮下脂肪面積 (cm ²)	93±24.8	163.6±28.4	108.7±16.0	184.3±49.4	<0.0001
女性	人数(人)	348	144	68	88	
	年齢(歳)	56±11	58±9	64±7	61±9	<0.0001
	BMI(kg/m ²)	21.9±2.1	25.2±2.5	25±2.2	28±3.0	<0.0001
	内臓脂肪面積 (cm ²)	51.7±22.0	66.3±19.5	132.5±30.2	140.1±37.8	<0.0001
	皮下脂肪面積 (cm ²)	144.9±39.4	250.5±36.4	168.1±26.5	277.8±56.9	<0.0001

BMI: Body Mass Index. 4 群間の比較は一元配置分散分析で行った.

表3 内臓脂肪、皮下脂肪面積によって分類した4群における疾患発生率(%)の比較(分割表分析)

		I	II	III	IV	p 値
男性	脂肪肝	14.2	45.1	37.0	66.1	<0.0001
	高血圧	29.0	21.6	43.0	45.4	<0.0001
	糖尿病	8.2	6.8	18.5	14.2	<0.0001
	脂質異常症	48.3	57.4	64.8	69.0	<0.0001
女性	脂肪肝	12.6	36.8	53.9	75.0	<0.0001
	高血圧	23.3	28.5	51.5	50.0	<0.0001
	糖尿病	4.3	4.2	11.8	17.0	<0.0001
	脂質異常症	49.7	62.5	79.4	73.4	<0.0001

た、II群とIII群の脂肪肝を実数で見ると、男性で73名と80名、女性では53名と36名であった。高血圧と糖尿病では、I群とII群が同程度であり、III群とIV群が高い値を呈した。脂質異常症ではI群からIV群まで段階的に増加傾向であったが、各群での差は顕著ではなかった。

IV. 考察

本研究では、CTで測定された内臓脂肪面積VFAおよび皮下脂肪面積SFAと、脂肪肝や生活習慣病との関係を検討した。脂肪肝の診断では腹部超音波を用いている(エコー輝度の上昇など)ため、主に肝臓への脂肪蓄積を見ていると考えるべきだが、その病態形成における内臓脂肪や皮下脂肪の関与を明らかにするのが目的である。

表1に示すように、脂肪肝、高血圧、糖尿病および脂質異常症の有無でVFAには有意差を認めたことは、内臓脂肪はこれらの4疾患の病態に寄与する重要な因子である可能性を示唆している。一方、SFAは、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常症において、VFAで補正後には有意差を認めなかったことから、SFAは高血圧、糖尿病、脂質代謝異常症の病態に寄与する可能性は低いと考えられた。一方、脂肪肝においては、SFAはVFA補正後でも有意差を示したことから、脂肪肝の発症にはVFAだけでなく、SFAも独立して関与することが示唆された。

さらに、表3の結果から、高血圧と糖尿病ではVFAの増加は疾患の発生率増加に関連する(I群とIII群、II群とIV群の比較から)が、SFAの増加はほとんど影響しない(I群とII群、III群とIV群の比較から)と考えられた。ところが、脂肪肝においては、SFAの増加もVFAの増加も、それぞ

れ脂肪肝の発生率増加に繋がる可能性が示唆された。しかも、SFV高値かつVFA高値(IV群)はII群やIII群よりも脂肪肝の合併頻度がより顕著であった。

メタボリック症候群である高血圧、糖尿病、脂質代謝異常症の病態には、内臓脂肪やそれに由来するアディポサイトカインなどが中心的な役割を演じ、皮下脂肪の関与は少ないと言われるが、本研究でも同様の結果であった。一方、肝臓への脂肪蓄積には、内臓脂肪だけでなく皮下脂肪蓄積による因子が関与すると考えられた。脂肪肝の病態や治療を考えるうえでは重要な知見であると考えられる。

脂肪肝の発生率は、II群とIII群では同程度か、III群がやや高い結果であった。この発生率は、皮下脂肪と内臓脂肪の病態への寄与の程度を表す可能性も考えられるが、臍部で測定されたVFAやSFAが、全身の内臓脂肪や皮下脂肪をどのように反映しているのかなど方法上の問題点が残されている。また、脂肪肝と判断されたものの中には、内臓脂肪が関与するとされるNASH(nonalcoholic steatohepatitis)症例が含まれる可能性が考えられるが、人間ドックのデータからNASHを診断することは困難であり、その影響を検証することはできなかった。

II群とIII群の脂肪肝の実数を見ると、男性で73名と80名、女性では53名と36名であった。特に女性では、もともと皮下脂肪優位の身体組成であるII群が多いため、脂肪肝症例でもII群の割合が多い結果になった。脂肪肝の存在は内臓肥満(100cm²以上)の存在を必ずしも反映しないことが示唆された。

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/λ immunoglobulin 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 者とで有意差のあった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施設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 (ITIH4) 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 α_3 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 EBI in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008(in press).

Original Article

Association between changes in body composition and the increasing prevalence of fatty liver in Japanese men

Yasushi Imamura,¹ Hirofumi Uto,² Makoto Oketani,² Yasunari Hiramine,¹ Kaori Hosoyamada,¹ Yukihiko Sho,¹ Takuya Hiwaki,¹ Yoshirou Baba,¹ Kenji Tahara,¹ Osamu Kubozono,¹ Ken Kusano³ and Hirohito Tsubouchi²

¹Department of Internal Medicine, Kagoshima Kouseiren Hospital, ²Digestive Disease and Life-style Related Disease, Health Research Human and Environmental Sciences, Kagoshima University, ³Kagoshima Kouseiren Medical Health Care Center, Kagoshima, Japan

Aim: Prevalence of fatty liver is increasing. In this study, to elucidate the factor that contributes most to recent increases in prevalence of fatty liver, we determined the independent predictors for the onset of fatty liver and compared these predictors between 2000 and 2005.

Methods: Japanese persons, aged 30–74 years, who participated in regular health checks at Kagoshima Kouseiren Medical Health Care Center (10 336 persons in 2000 and 11 011 persons in 2005) were enrolled in the study. Diagnosis of fatty liver was performed by ultrasonography. Body fat percentage (BFP) was determined using a bipedal bioimpedance instrument.

Results: The prevalence of fatty liver has increased between 2000 and 2005 in men (33.3 vs 38.5% in 2000 vs 2005, respectively, $P < 0.0001$), but not in women (21.3 vs 21.0%, $P = 0.8101$). Logistic regression analysis revealed that both

body mass index (BMI) and BFP are independent predictors of fatty liver in both men and women. BMI did not change in either men (23.4 ± 2.9 vs 23.8 ± 3.0 kg/m², $P = 0.0528$) or women (22.8 ± 3.1 vs 22.8 ± 3.3 kg/m², $P = 0.9862$) during the survey period. In contrast, BFP increased in men (20.6 ± 4.7 vs 22.3 ± 5.0 kg/m², $P = 0.0003$), but not in women (27.4 ± 5.5 vs 28.4 ± 5.9 kg/m², $P = 0.3993$). There was no significant change in triglycerides and glucose levels.

Conclusion: These results suggest that altered body composition, particularly increased BFP without an increase in BMI, has developed in men and is strongly associated with the increasing prevalence of fatty liver amongst Japanese men.

Key words: fatty liver, body fat percentage, body mass index, body composition, life-style, metabolic syndrome

1. INTRODUCTION

FATTY LIVER HAS become a significant problem on a worldwide scale, including in Japan, because the prevalence of fatty liver is increasing.^{1–3} Although body mass index (BMI) is considered to be a major risk factor for fatty liver, BMI is only slightly increased amongst Japanese men, and is slightly decreased in women according to national surveys.⁴ Although the increase in the prevalence of fatty liver cannot be explained simply

by the increase in the prevalence of obesity, the underlying factors have yet to be fully clarified.

In this study, to elucidate the factors that contribute to the recent increase in the prevalence of fatty liver, we determined the predictors of fatty liver in participants who underwent health checks and compared these predictors between the participants in 2000 and 2005.

2. METHODS AND MATERIALS

THE SUBJECTS IN this study were Japanese persons aged 30–74 years, who participated in regular health checks at Kagoshima Kouseiren Medical Health Care Center: 10336 persons (6484 men, 3852 women) from April 2000 to March 2001 (2000 group) and 11011

Correspondence: Dr Yasushi Imamura, Department of Internal Medicine, Kagoshima Kouseiren Hospital, 22-25 Tenpozan-cho, Kagoshima 890-0064, Japan. Email: kou.hsp.imamura@ks-ja.or.jp
Received 21 January 2008; revision 18 April 2008; accepted 19 April 2008.

Table 1 Comparison of variables between participants with and without fatty liver

Fatty liver	Men			Women		
	With	Without	<i>P</i> value	With	Without	<i>P</i> value
Age (years)	51 ± 9	54 ± 10	<0.0001	56 ± 9	54 ± 10	0.0015
BMI (kg/m ²)	25.6 ± 2.8	22.6 ± 2.5	<0.0001*	25.9 ± 3.4	21.9 ± 2.7	<0.0001*
BFP (%)	25.4 ± 4.4	20.3 ± 4.3	<0.0001*	33.9 ± 5.5	26.9 ± 5.0	<0.0001*
ALT (IU/L)	38 ± 24	24 ± 29	<0.0001*	28 ± 19	18 ± 8	<0.0001*
γ-GTP (IU/L)	58 ± 60	40 ± 49	0.0012*	24 ± 21	16 ± 14	<0.0001*
TC (mg/dL)	218 ± 36	206 ± 33	<0.0001*	224 ± 35	215 ± 33	<0.0001*
TG (mg/dL)	179 ± 148	118 ± 106	<0.0001*	221 ± 62	81 ± 41	<0.0001*
HDL-C (mg/dL)	51 ± 12	59 ± 15	<0.0001*	57 ± 12	67 ± 14	<0.0001*
BG (mg/dL)	113 ± 26	105 ± 19	0.0002*	108 ± 27	97 ± 11	0.0004*
S-BP (mmHg)	125 ± 17	121 ± 17	0.0003*	122 ± 17	114 ± 18	<0.0001*
D-BP (mmHg)	82 ± 11	77 ± 11	<0.0001*	77 ± 10	72 ± 10	<0.0001*

Data are expressed as mean ± SD. ALT, alanine aminotransferase; BFP, body fat percentage; BG, blood glucose; BMI, body mass index; D-BP, diastolic blood pressure; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; S-BP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase. **P* value after adjusting for age (ANCOVA).

persons (6829 men and 4182 women) from April 2005 to March 2006 (2005 group).

Diagnosis of fatty liver was carried out using ultrasonography (SSA-250A and SSA-750A, Toshiba, Japan; Logic 400, GE Yokogawa, Japan), which was based on the findings of bright liver (increased echogenicity) with liver-kidney contrast (increased echo level of the liver compared with the right kidney). BMI was calculated as follows: body weight (kg)/height² (m²). Body fat percentage (BFP) was determined using a bipedal bio-impedance instrument (Model TBF-220; Tanita, Japan). Venous blood samples were taken from all subjects before 09.00 hours after overnight fasting and analyzed immediately. Alanine aminotransferase, γ-glutamyl transpeptidase, total cholesterol, triglycerides and glucose were measured by standard laboratory procedures. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol level was determined by direct homogeneous assay of the serum using detergents (Daiichi Chemicals, Japan). History of alcohol intake was determined by questionnaire in which subjects reported a rough approximation of their daily intake.

Differences between groups were examined for statistical significance using the χ^2 test, unpaired *t*-test and analysis of covariance (ANCOVA). Multivariate analysis was performed using logistic regression analysis. Correlations were examined by linear regression analysis using the coefficient of correlation. All data analyses were performed using Statview software version J-5.0 (Abacus Concepts, CA, USA). A *P*-value less than 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Independent predictors of fatty liver in the 2005 group

TO IDENTIFY FACTORS that associated with the pathogenesis of fatty liver, we compared the clinical and laboratory features between persons with and without fatty liver (Table 1) and performed logistic regression analysis (Table 2).

In both men and women, there was a significant difference in age between the fatty liver and non-fatty liver groups. In men, the age of the fatty liver group was lower than that of the non-fatty liver group; in contrast, the age of women in the fatty liver group was higher. This may reflect the gender difference in incidence of fatty liver, which has been reported elsewhere.³ Only in men was age found to be an independent predictor.

Markers of obesity, BMI and BFP, were significantly higher in the fatty liver group. In addition, both BMI and BFP were found to be independent predictors of fatty liver in both men and women.

Triglycerides, HDL-cholesterol, glucose and ALT were also independent predictors in both sexes. Total cholesterol and diastolic blood pressure were independent predictors only in men.

As for alcohol, we compared the proportion of persons who drink more than 20 g/day between those with and without fatty liver, and found no difference between the groups (37.4 vs. 39.8%, *P* = 0.0569 in men; 1.1 vs. 1.8%, *P* = 0.1463 in women).

Table 2 Independent predictors of fatty liver by logistic regression analysis

	Regression Coefficient	Standard Error	P value	Odds ratio	95% CI	
Men	Age	-0.011	0.003	<0.0001	0.989	0.983–0.995
	BMI	0.207	0.019	<0.0001	1.227	1.183–1.273
	BFP	0.126	0.011	<0.0001	1.135	1.110–1.160
	ALT	0.017	0.002	<0.0001	1.017	1.017–1.021
	TC	0.006	0.001	<0.0001	1.006	1.004–1.008
	TG	0.001	0.000	0.0035	1.001	1.000–1.008
	HDL-C	-0.026	0.003	<0.0001	0.974	0.968–0.999
	FBS	0.011	0.001	<0.0001	1.011	1.008–1.014
	D-BP	0.009	0.003	0.0015	1.009	1.003–1.015
Women	BMI	0.161	0.034	<0.0001	1.175	1.098–1.256
	BFP	0.136	0.020	<0.0001	1.146	1.102–1.191
	ALT	0.049	0.005	<0.0001	1.051	1.041–1.061
	TG	0.009	0.001	<0.0001	1.009	1.007–1.011
	HDL-C	-0.022	0.004	<0.0001	0.978	0.971–0.987
	FBS	0.025	0.003	<0.0001	1.025	1.019–1.031

ALT, alanine aminotransferase; BFP, body fat percentage; BG, blood glucose; BMI, body mass index; CI, confidence interval; D-BP, diastolic blood pressure; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides.

3.2. Comparison between 2000 and 2005 groups (Table 3)

The prevalence of fatty liver increased between 2000 and 2005 in men (from 33.3 to 38.5%), but not in women (from 21.3 to 21.0%).

Age was significantly higher in the male 2005 group. Age might not be involved in the higher prevalence of fatty liver in 2005 group, because the age of men was lower in the fatty liver group (Table 1).

There was no significant difference in BMI of both sexes. BFP increased significantly in men, but not in women.

Total cholesterol level was significantly elevated in both men and women. HDL-cholesterol levels decreased significantly in men. There was no significant difference in triglycerides and glucose levels. There was a significant difference in men's diastolic blood pressure.

4. DISCUSSION

FATTY LIVER IS an increasingly recognized condition, linked to the metabolic syndrome associated with obesity and insulin resistance. BMI has been considered to be the most important risk factor for fatty liver.^{3,5}

Table 3 Comparison between the 2000 and 2005 groups

	Men			Women		
	2000	2005	P value	2000	2005	P value
Fatty liver (%)	33.3	38.5	<0.0001*	21.3	21.0	NS*
Age (years)	52 ± 10	53 ± 10	<0.0001**	54 ± 10	55 ± 10	0.0243**
BMI (kg/m ²)	23.4 ± 2.9	23.8 ± 3.0	NS***	22.8 ± 3.1	22.8 ± 3.3	NS***
BFP (%)	20.6 ± 4.7	22.3 ± 5.0	0.0003***	27.4 ± 5.5	28.4 ± 5.9	NS***
ALT (IU/L)	28 ± 28	29 ± 28	NS***	19 ± 13	20 ± 12	NS***
TC (mg/dl)	204 ± 33	211 ± 35	0.0058***	209 ± 34	217 ± 34	<0.0001***
TG (mg/dl)	151 ± 126	142 ± 127	NS***	100 ± 57	89 ± 42	NS***
HDL-C (mg/dl)	60 ± 16	56 ± 14	0.0230***	69 ± 16	65 ± 14	NS***
BG (mg/dl)	109 ± 21	108 ± 23	NS***	102 ± 16	97 ± 17	NS***
D-BP (mmHg)	78 ± 11	79 ± 23	<0.0001***	73 ± 16	73 ± 16	NS***

Data except fatty liver prevalence were expressed as mean ± SD. ALT, alanine aminotransferase; BFP, body fat percentage; BG, blood glucose; BMI, body mass index; D-BP, diastolic blood pressure; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides. * χ^2 test; **unpaired *t*-test; ***analysis of covariance (ANCOVA, adjusted for age).

However, the recent increase in prevalence has not necessarily involved increasing BMI;³ factors other than an increase in BMI are concerned. In the present study, as shown in Table 3, the increasing prevalence of fatty liver amongst men was associated with changes in BFP, and total cholesterol and HDL-cholesterol levels. It is significant that the prevalence of fatty liver increased with increasing BFP, even without an increase in BMI.

The increase in BFP without a corresponding increase in BMI may indicate changes in body composition; that is, an increase in body fat deposits and corresponding decrease in the fat-free component. As for fat deposits, Eguchi *et al.* report that the severity of fatty liver is positively correlated with visceral fat accumulation regardless of BMI.⁶ It is possible that the increase in BFP corresponds to an increased accumulation of visceral fat. On the other hand, Caprosto *et al.* report that the resting metabolic rate (RMR) is lower in patients with non-alcoholic steatohepatitis than in controls.⁷ Because of the correlation between RMR and muscle mass, lower RMR possibly reflects a decrease in muscle mass. Thus, the decrease in the fat-free component may correspond to a decrease in muscle mass. The literature suggests that Asian populations have a high level of abdominal fat at a lower BMI relative to Caucasians.^{8,9} Therefore, Asians are at a higher risk for obesity-associated disorders even without obesity, and this is the rationale behind the World Health Organization's Regional Office for the Western Pacific criteria (overweight at risk) for Asians.⁹ It is considered that the characteristic body composition of the Asian population has been further impacted upon by the present-day lifestyle in Japan, resulting in an increased prevalence of fatty liver without an increase in BMI. Since visceral fat obesity strongly associates with the metabolic syndrome, our study underscores the importance of monitoring visceral fat accumulation using representative indicators such as waist circumference or waist/hip ratio, or monitoring visceral fat volume by CT scan, during regular health checks. Table 3 shows that the prevalence of fatty liver has increased with increases in total cholesterol and decreases in HDL-cholesterol, possibly suggesting an association with insulin resistance.¹⁰ Additional studies are required to further clarify these associations.

The changes in body composition in the present study should be distinguished from obesity. Obesity may bring about increases in both BFP and BMI. We consider

that inadequate dieting (and rebound), irregular eating habits (e.g. fasting at breakfast) and a lack of exercise are the probable causes of the reported changes in body composition. As described above, it seems difficult to prevent the increasing prevalence of fatty liver only by weight (BMI) control. Thus, we must emphasize the need for a new strategy to reduce risk of fatty liver, in which relevant nutritional support and exercise are employed to reduce body fat deposits and develop muscle mass.

REFERENCES

- 1 Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL *et al.* Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004; 53: 2087–94.
- 2 Lonardo A, Bellini M, Tartoni P, Tondell E. The bright liver syndrome. Prevalence and determinants of a "bright" liver echopattern. *Tal J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 351–6.
- 3 Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol* 2003; 38: 954–61.
- 4 The Examination Committee of Criteria for "Obesity Disease" in Japan, Japan Society for the Study of Obesity. New criteria for "obesity disease" in Japan. *Circ J* 2002; 66: 987–92.
- 5 Omagari K, Kadokawa K, Masuda J *et al.* Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1098–105.
- 6 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: 462–9.
- 7 Capristo E, Miele L, Forgione A *et al.* Nutritional aspects in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 265–8.
- 8 Wang J, Thornton JC, Russel M, Burastero S, Heymsfield S, Pierson RN Jr. Asians have lower body mass index (BMI) but higher percent body fat than do whites: comparisons of anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 23–8.
- 9 WHO/IASO/IOTF. *The Asia-Pacific Perspective: Redefining Obesity and its Treatment*. Sydney: Health Communications Australia, 2000.
- 10 Jeppesen J, Facchini FS, Reaven GM. Individuals with high total cholesterol ratios are insulin resistant. *J Intern Med* 1998; 243: 293–8.

1 血液検査

非アルコール性脂肪肝炎 nonalcoholic steatohepatitis (NASH) の診断のための血液検査のひとつは、NASH の基盤となる非アルコール性脂肪性肝疾患 non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) の診断における血液検査である。これには、脂肪肝に特徴的な血液検査に加えて、NASH への病態の進展を評価する血液検査が含まれる。また、NASH の診断には、アルコール性脂肪肝だけでなく、各種肝炎ウイルス、自己免疫、先天性肝代謝異常など他の原因による肝疾患を除外する必要がある。したがって、除外診断のための血液検査も必要である。さらに NAFLD や NASH の確定診断には肝組織所見が不可欠であるが、NAFLD の頻度は高く、肝生検は侵襲的であるため、血液検査は、肝生検を行う患者を選択するためにも重要である。

スクリーニング検査で NAFLD が考えられる症例のうち、特に以下のような血液検査所見から、単純性脂肪肝より NASH を疑い (表 5-1)、肝生検による確定診断を行う。さらに、NASH は、Day らが提唱した two hit theory によると、肥満、高脂血症、糖尿病などの 1st hit による脂肪肝に、インスリン抵抗性や酸化ストレス、エンドトキシンなどの 2nd hit が加わって発症する。したがって、この two hit theory に関連する因子に関する血液検査は、NAFLD や NASH の診断にも有用であると考えられる。

表 5-1 肝生検を考慮すべき NAFLD 患者の血液検査所見

1. 血液・生化学検査
 - ・トランスアミナーゼの持続高値 (特に ALT100 以上が持続)
 - ・AST/ALT 比の経時的上昇
 - ・コリンエステラーゼの経時的低下
 - ・肝線維化マーカー (ヒアルロン酸, IV型コラーゲン, PⅢP) 高値
 - ・血小板数の低下
 - ・血糖コントロール不良
 - ・血清フェリチン高値
 - ・HOMA-IR の上昇 (2 以上)
2. 特殊検査
 - ・高感度 CRP 高値
 - ・血清チオレドキシシン高値
 - ・TNF- α 高値
 - ・アディポネクチン低値
 - ・レプチン高値
 - ・血清 CK18 断片高値
 - ・DHEA-S 高値

A. NAFLD および NASH 診断に有用な血液生化学検査

AST, ALT の軽度上昇が NAFLD ではみられ, さらに NASH では高い傾向にある (表 5-2)¹⁾. しかし正常の 5 倍以上になることはほとんどなく, NASH の 2/3 は正常値まで変動することがある²⁾. NASH は ALT 優位で AST/ALT 比は 1 未満であり, 1 以上となるアルコール性脂肪肝などと鑑別される. さらに, コリンエステラーゼも NAFLD や NASH で上昇する. しかし, ウイルス性慢性肝疾患と同様に NASH でも AST/ALT 比は肝線維化の進行とともに上昇し, 肝硬変では 1 以上になることから, 経過観察には有用なマーカーの一つである. コリンエステラーゼもアルブミンやプロトロンビン時間と同様に肝硬変に進展すると低下する. また, NAFLD のなかで肝線維化進展例は肝線維化非進展例と比較してトランスアミナーゼは高値であることも報告されており³⁾, トランスアミナーゼが持続高値であれば, NASH を疑う根拠となる. ALP, γ GTP は NAFLD で上昇することがあるが, 軽度であり, NASH と単純性脂肪肝の鑑別には有用ではない.

肝線維化マーカーであるヒアルロン酸, IV 型コラーゲン, procollagen III polypeptide (PⅢP) は単純性脂肪肝より NASH で高値となると考えられ, 血小板数は低値となる. また, 肝合成能の指標であるアルブミン, プロトロンビン時間は NASH の病態進展とともに低下するが, 軽度の肝線維化を呈する NASH では単純性脂肪肝とほとんど変わらない.

耐糖能異常, 脂質代謝異常, 高血圧などの生活習慣病は NASH の発症や病態進展と関連することから, 血糖, HbA_{1c}, 総コレステロール, LDL コレステロール, 中性脂肪などは高値となることが多い. また, NASH は単純性脂肪肝と比較して肝組織中の鉄沈着の程度が高度であり, 血清フェリチンは NASH では高値となる. 高フェリチン血症と肝組織炎症や線維化重症度との関連もあるといわれる⁴⁾. 細胞内で過剰となった鉄がフリー鉄となり, Fenton 反応により ROS の産生を亢進させ, 肝細胞障害や肝線維化を惹起すると考えられている.

表 5-2 NASH と単純性脂肪肝患者の生化学検査値の比較*

	steatosis patients	NASH patients	P value
AST (U/ml)	33.3 ± 12.8	53.0 ± 35.5	0.01
ALT (U/ml)	57.0 ± 32.3	80.6 ± 60.0	0.08
FBS (mg/dl)	108.4 ± 16.4	123.6 ± 36.8	0.06
IRI (μ l/ml)	11.4 ± 7.8	14.1 ± 10.6	0.28
HOMA-IR	3.10 ± 2.30	4.07 ± 3.73	0.26
HDL cholesterol (mg/dl)	49.9 ± 14.4	47.9 ± 11.5	0.50
LDL cholesterol (mg/dl)	115.1 ± 31.0	129.3 ± 38.5	0.13
triglycerides (mg/dl)	170.7 ± 82.3	172.6 ± 98.5	0.94
iron (ng/ml)	116.1 ± 46.9	110.1 ± 40.2	0.59
ferritin (ng/ml)	146.6 ± 96.1	264.2 ± 245.4	0.05
hyaluronic acid (ng/dl)	27.3 ± 26.2	51.2 ± 52.2	0.05
type IV col.7s (ng/dl)	4.21 ± 0.93	4.67 ± 1.23	0.12

(* means ± SD. 文献 1 を改変)