

B. 他の肝疾患除外のための血液検査

まず、ウイルス性肝炎の除外のために HBs 抗原と HCV 抗体を測定し、自己免疫性肝疾患の可能性を否定するために、抗ミトコンドリア抗体と抗核抗体を測定する。ただし、NAFLD では抗核抗体陽性者が存在することから、検査結果の解釈には注意が必要である。特徴的な臨床経過や症状などから、先天的肝代謝異常が疑われる場合には、セルロプラスミン、尿中銅、 α_1 アンチトリプシン、トランスフェリン飽和度などそれらに特異的な検査を行う (図 5-1)。

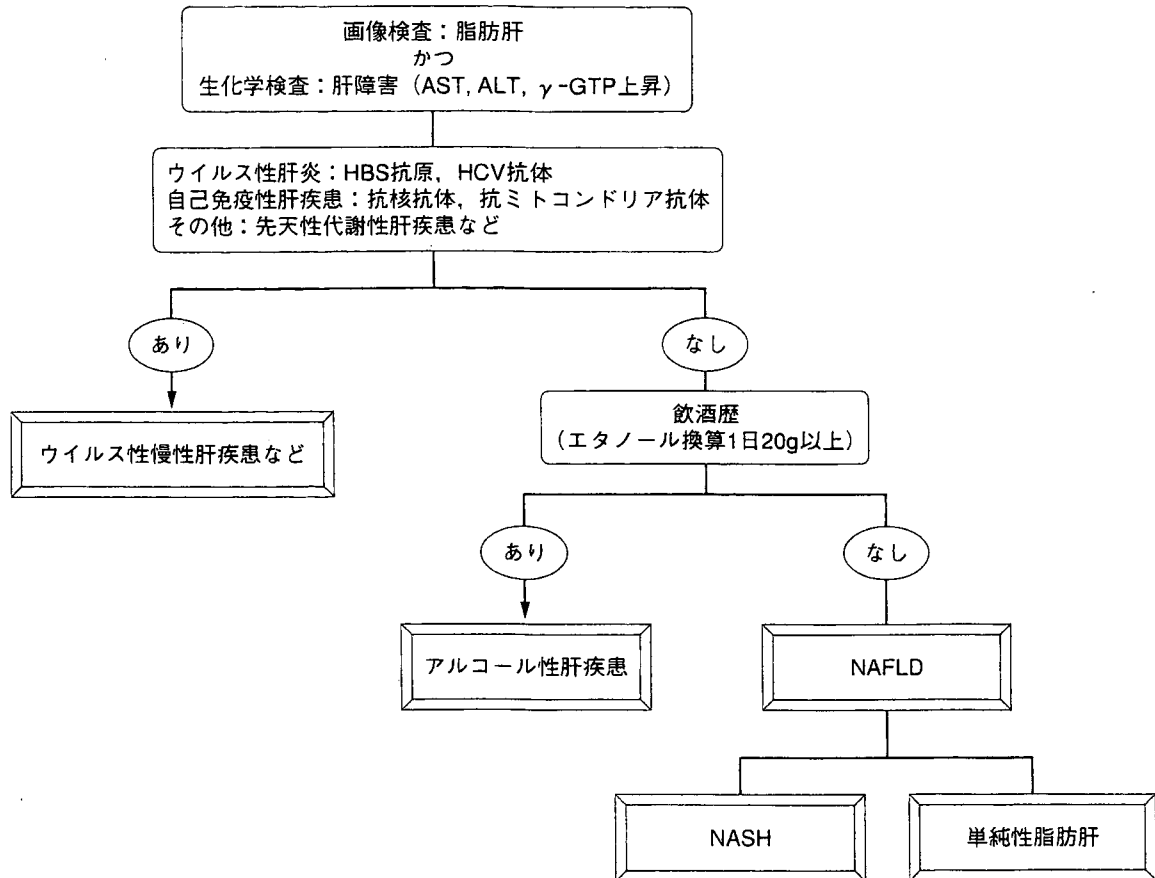


図 5-1 NASH/NAFLD の診断

C. NAFLD および NASH の病態に関連する血液検査

1. インスリン抵抗性

内臓脂肪蓄積は NAFLD の基盤として重要であり、それに伴うインスリン抵抗性は NASH の基盤となる病態である。インスリン抵抗性の評価法はいくつかあるが、現在最も応用されているのは、HOMA-IR (homeostasis model assessment insulin resistance index) で、1 回の採血で評価できることから汎用されている。HOMA-IR は空腹時血糖 (mg/dl) × 空腹時インスリン (μ U/ml) ÷ 405 の計算式で求められる。一般に、HOMA-IR が 2 未満の場合は正常、2 以上はイ

インスリン抵抗性、5 以上の場合は高度のインスリン抵抗性と考えられる。脂肪肝の程度が進行するほど HOMA-IR が高値となり、血清 ALT 値は BMI、HOMA-IR と有意に正の相関を示し、ALT が 40U/l 以上の例の大半が BMI が 25 以上、あるいは HOMA-IR が 2 以上である⁵⁾。また、NASH の肝線維化の進行はインスリン抵抗性と関連があるといわれている³⁾。このようなことから、インスリン抵抗性の存在は NASH を疑う所見の一つである。

2. 高感度 CRP (high-sensitivity C-reactive protein: hsCRP)

高感度 CRP 測定法の開発により、従来の CRP では検出されない慢性的で微小な炎症を評価できるようになった。hsCRP レベルの上昇は、心血管疾患、2 型糖尿病、メタボリックシンドローム発症の予測因子であることが証明されている⁶⁾。また、メタボリックシンドロームの一表現形といわれる NAFLD では hsCRP の上昇が脂肪肝に伴う炎症を反映していると考えられている。さらに NASH において hsCRP の上昇と肝線維化の程度には相関があるといわれ¹⁾、メタボリックシンドロームを有しない NAFLD の血清 ALT 高値群と正常群の比較では、有意に ALT 高値群の hsCRP が高値であるという報告⁵⁾もあり、今後 NASH の新しいマーカーとなることが期待される (図 5-2)。

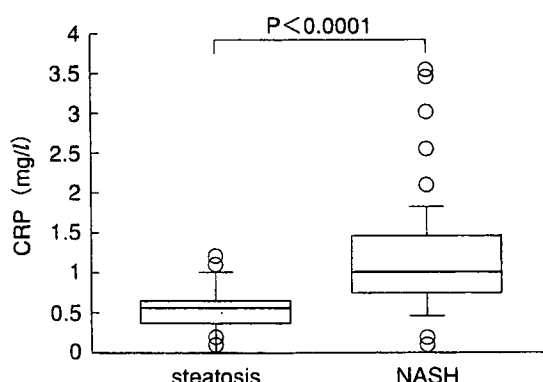


図 5-2 NASH と単純性脂肪肝における hsCRP 濃度 (文献 1 を改変)

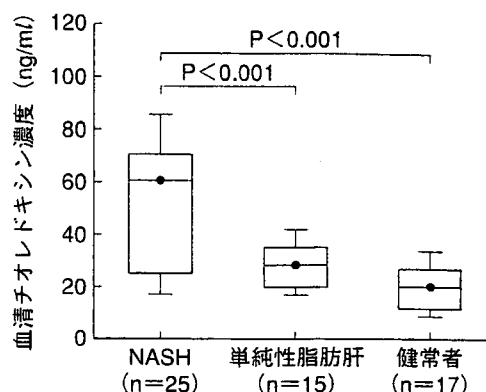
3. 酸化ストレスマーカー

ミトコンドリアの呼吸鎖複合体は ROS を産生し、通常は速やかに消去されるが、NASH ではミトコンドリア異常により ROS 過剰になると考えられている。また、肝細胞の過剰な脂肪酸はミトコンドリアの β 酸化を亢進させ、CYP2E1 の過剰発現を誘導する。さらに、NASH 患者の肝組織中の鉄沈着レベルは単純性脂肪肝より高値である。このような病態は NASH において酸化ストレスを誘導すると考えられる。

酸化ストレスマーカーには、活性酸素による修飾化合物と活性酸素消去系酵素や抗酸化物質がある⁷⁾。heat shock protein (HSP) やチオレドキシシン thioredoxin (TRX) などは酸化ストレスによって誘導される蛋白質であり、チオレドキシシンは抗酸化物質としても知られている。NAFLD では健常者と比較して、肝組織中の malondialdehyde (MDA) など酸化ストレスマーカーは発現が高く、NAFLD の中でも単純性脂肪肝より NASH のほうが、肝組織中 MDA や血

清中チオレドキシンが高い (図 5-3)⁸⁾。このように、NASH の病態形成に酸化ストレスが強く関与すると考えられ、酸化ストレスマーカーは NASH の診断や病態進展予測に役立つ。特に、チオレドキシンは血清中の濃度を測定できることから、診断マーカーとしての有用性が期待できる。

図 5-3 NASH, 単純性脂肪肝と健常者における血清チオレドキシン濃度 (文献 8 を改変)



4. アディポサイトカイン

脂肪組織は単なる余剰エネルギーの蓄積臓器であるだけでなく、非常に多くの生理活性物質を分泌する組織である。このような脂肪組織由来生理活性物質は総称してアディポサイトカインとよばれる。代表的なアディポサイトカインとして、TNF- α 、レプチン、アディポネクチン、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type1)、レジスチンなどがあげられるが、NAFLDの中でも特にNASHではこれらの分泌異常があるといわれる。

TNF- α は炎症性サイトカインの一つであるが、脂肪組織においても発現している。肥満により血中TNF- α は上昇し、脂肪組織におけるTNF- α の発現は肥満度と相関し、NASHでは血中TNF- α の上昇や肝でのTNF- α 受容体の増加が認められる^{9,10)}。

アディポネクチンはメタボリックシンドローム発症に抑制的に働き、肥満によりその血中濃度は低下し、内臓脂肪量と強い逆相関を示す。骨格筋や肝臓においてAMP kinaseやPPAR α を活性化し、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームを改善する作用をもつ。NAFLD患者では血中アディポネクチン濃度は低下している¹¹⁾。また、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンには、PPAR γ を介して脂肪細胞を小型化し、アディポネクチン産生低下を回復することで

MEMO

プロテオミクス

プロテオーム (proteome = protein + ome) とは1個の生物がもつすべての遺伝情報であるゲノム (gene + ome) に相応した用語であり、その生物や細胞に発現しているすべての蛋白質の集合体のことである。また、網羅的に蛋白質の発現や性質を研究することを、プロテオーム解析もしくはプロテオミクス proteomics と表現する。プロテオーム解析は(1)蛋白質の分離、(2)蛋白質の同定の2つの作業からなる。最も広く行われているのは、二次元電気泳動によって蛋白質を分離し、質量分析で目的の蛋白質を同定する方法である。質量分析には液体クロマトグラフィーと一体となったLC-MSと蛋白質の質量と飛行時間の関係を利用したTOF-MSがある。

NASH 患者に有効であると考えられている。このようなことから、アディポネクチンは診断だけでなく、アディポネクチンを用いた治療やピオグリタゾンなどの治療薬の効果のモニタリングにも応用できる可能性がある。

レプチンは中枢神経系に作用して強力な食欲抑制作用を示すほか、インスリン効果増強作用、エネルギー消費亢進、血圧上昇作用などさまざまな生理作用を示す。体脂肪量が増加するとレプチン濃度が上昇し、食欲を低下させるとともにエネルギーの消費を高めるが、肥満患者ではレプチン抵抗性の状態と考えられ、その機構が破綻した状況となっている。また、レプチンは肝線維化と関連する肝星細胞の活性化を促進することが報告されている^{9,12)}。このように、血中レプチン濃度は NASH では上昇し、診断に有用である可能性がある。

D. 血液検査の next approach

NAFLD や NASH のスクリーニングのための血液検査は簡便に測定できる。しかし、NASH を疑う根拠となるような検査は保険外診療で測定しなければならない検査項目も多く、必ずしも NAFLD もしくは NASH に特異的なものではなく、NASH の確定診断には肝生検が必要である。すなわち、簡便に測定でき、臨床の場で有用な NASH の特異的な血清診断マーカーはない。

血清 cytokeratin-18 (CK-18) 断片濃度は NAFLD における肝細胞のアポトーシスと関連して増加し¹³⁾、男性ホルモンの中間代謝産物であるデヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEA-S) は NAFLD の肝線維化の進行とともに低下する¹⁴⁾。さらに、いくつかのマーカーを組み合わせた早期 NASH の診断法も報告されるようになってきている (表 5-3)¹⁵⁾。また、プロ

表 5-3 アディポネクチン, HOMA-IR, IV型コラーゲン 7S, およびマーカーの組み合わせを用いた線維化軽度 (Stage1-2) NASH の診断率

parameter	cut-off Value	AUC	感度	特異度
adiponectin	≤4.0 (μg/ml)	0.765	68	79
HOMA-IR	≥3.0	0.757	51	95
Type IV Col.7S	≤5.0 (ng/ml)	0.758	41	95
combination of markers			94	74

(文献 15 を改変)

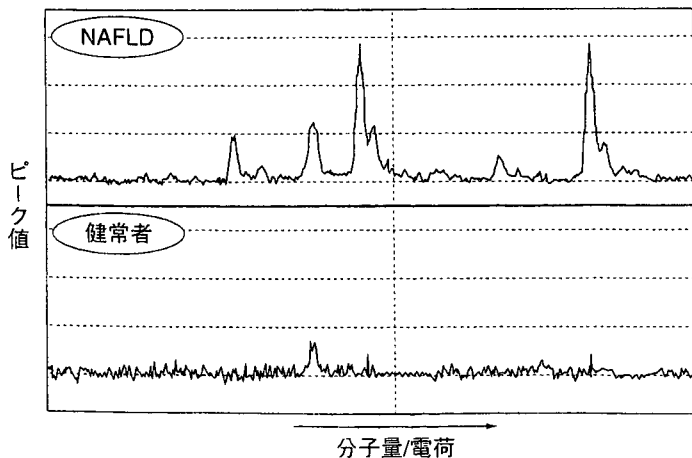


図 5-4 SELDI TOF/MS プロテインチップシステムを用いた NAFLD 患者血清の蛋白発現パターン

テオミクスなどを用いたバイオマーカー探索が悪性疾患を中心に広く行われるようになってきているが、NAFLDやNASHにも応用可能あると考えられ^{16,17)}、今後新しいバイオマーカーの発見が期待されている。我々も、プロテオミクスを用いて、健常者に比較してNAFLDで高値を示し、NAFLDのバイオマーカーとなる可能性がある蛋白ピークをみいだしており(図5-4)、今後の研究の発展が期待できる。

◆文献

- 1) Yoneda M, et al. A high-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol.* 2007; 42: 573-82.
- 2) Mafrad P, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology.* 2002; 123: 1705-25.
- 3) Ekstedt M, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 2006; 44: 865-73.
- 4) George DK, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology.* 1998; 114: 311-8.
- 5) 古賀正史. 健診からみたNAFLD. *医学のあゆみ.* 2006; 別冊: 26-31.
- 6) Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation.* 2001; 103: 1813-8.
- 7) 宇都浩文, 他. NASHと酸化ストレス. *臨床消化器内科.* 2007; 22: 1445-50.
- 8) Sumida Y, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2000; 33: 616-22.
- 9) 日本肝臓学会, 編. NAFLDの病因・病態. NASH・NAFLDの診療ガイド. 東京: 文光堂; 2006. p.14-23.
- 10) Manco M, et al. Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127: 954-60.
- 11) Yalniz M, et al. Serum adipokine and ghrelin levels in nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm.* 2006; 1-5.
- 12) Ikejima K, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1399-410.
- 13) Wieckowska A, et al. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2006; 44: 27-33.
- 14) Charlton M, et al. Low circulating levels of dehydroepiandrosterone in histologically advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2008; 47: 484-92.
- 15) Shimada M, et al. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102: 1931-8.
- 16) Calvert VS, et al. A systems biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis. *Hepatology.* 2007; 46: 166-72.
- 17) Younossi ZM, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 42: 665-74.

〈宇都浩文, 田ノ上史郎, 坪内博仁〉

NASH/NAFLDと メタボリックシンドローム

NASH and NAFLD in Metabolic Syndrome

宇都 浩文・橋元 慎一・坪内 博仁

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



宇都 浩文 (うと ひろふみ)

1991年鳥取大学医学部卒業。2002年宮崎医科大学医学部第2内科助手。'04年宮崎医科大学医学部第2内科講師。'06年鹿児島大学大学院消化器疾患・生活習慣病学講師・専門医。研究領域：C型肝炎の疫学研究、消化器疾患・生活習慣病のプロテオーム解析

Key Words:

NAFLD, NASH, metabolic syndrome, Life-style related Disease

Abstract

食習慣の欧米化や運動不足から、生活習慣病とその複合病態であるメタボリックシンドロームの増加が危惧されている。非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は生活習慣病の肝病変と考えられ、肝機能異常や脂肪肝を指摘される健診受診者も増加していることから、NAFLDが注目されている。NAFLDは単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に大別され、後者は肝硬変や肝癌のリスクがある。NASHを予測する簡便なバイオマーカーはなく、その診断には肝の組織診断が必須であるが、脂肪肝の頻度が高いこと、肝生検が侵襲的であることから、簡便かつ迅速に測定できる診断マーカーの同定が急務である。NASHはインスリン抵抗性を基盤とし、アディポネクチン低下やTNF- α の上昇がみられ、NASHの病態進展には内臓脂肪型肥満や生活習慣病が密接に関係している。NASHの治療薬としてインスリン抵抗性改善薬などが試みられており、NAFLD/NASHの治療には生活習慣病の改善が極めて肝要である。

はじめに

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) とは、飲酒量が1日エタノール換算で20g以下で脂肪肝を呈するものであり、アルコール性脂肪肝や各種ウイルス性肝炎及び自己免疫性肝疾患は除外される。NAFLDは単純性脂肪

肝 (simple steatosis) と非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) の2つに分けられるが、臨床的に重要な疾患は肝硬変や肝癌に進行するNASHである。しかし、単純性脂肪肝はNASHに進展する可能性もあり、単純性脂肪肝でも定期的な経過観察が必要である。臨床的には生化学検査や画像所見でNAFLDと診断されることが多いが、NAFLDやNASHの確定診断には肝組織所見が不可欠である。また、進行したNASHでは画像所見や組織所見で典型的な脂肪肝を認めないこともあり、注意が必要である。

NASHの発症機序としてDayらが提唱したtwo hit theoryが広く知られている。すなわち、遺伝、肥満、高脂血症、糖尿病などの原因 (first hit) で脂肪肝となり、インスリン抵抗性や酸化ストレス、エンドトキシン等の原因 (second hit) が重なりNASHとなる。このtwo hit theoryで提唱されている原因の多くはメタボリックシンドロームに大きく関わっていることからNASH/NAFLDはメタボリックシンドロームの肝病変と考えられている。本稿ではNASH/NAFLDとメタボリックシンドロームの関連について最近の知見を紹介する。

■ Hirofumi Uto, Shinichi Hashimoto, Hirohito Tsubouchi

Department of Digestive and Life-style related Disease, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

表1 肥満の診断基準

BMI値	日本肥満学会基準	WHO基準
BMI<18.5	低体重	Underweight
18.5≤BMI<25.0	普通体重	Normal range
25.0≤BMI<30.0	肥満(1度)	Preobese
30.0≤BMI<35.0	肥満(2度)	Obese I
35.0≤BMI<40.0	肥満(3度)	Obese II
40.0≤BMI	肥満(4度)	Obese III

(文献1から引用改変)

表2 肥満に起因ないしは関連して発症する健康障害のうち脂肪細胞の質的異常による疾患

1. 耐糖能障害・2型糖尿病
2. 脂質代謝異常
 - 高コレステロール血症
 - 低HDLコレステロール血症
 - 高トリグリセリド血症
3. 高血圧
4. 高尿酸血症・痛風
5. 脂肪肝
 - 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)
 - (非アルコール性脂肪肝炎; NASHを含む)
6. 冠動脈疾患
 - 心筋梗塞
 - 狭心症
7. 脳梗塞
 - 脳血栓症
 - 一過性脳虚血発作

(文献1から引用改変)

■肥満とNASH/NAFLD

肥満の評価はBMI [(体重kg)/(身長m)²] が用いられており、BMIが22で有病率が最小になることから、これを基準に理想体重が算出される。日本肥満学会基準(肥満症治療ガイドライン2006)では18.5以上25未満が標準、25以上30未満が肥満(1度)、30以上が肥満2~4度となる(表1)¹⁾。日本成人15万人を対象とした研究ではBMIが25~28の1度の肥満でも耐糖能異常、2型糖尿病、高血圧、高中性脂肪血症、高コレステロール血症、低HDLコレステロール血症などを発症する危険率が標準体重群の2倍に増加すると報告されている。また、肥満は内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満の2種類に分けられるが、腹腔内に存在する脂肪の蓄積が皮下脂肪の蓄積よりも動脈硬化性疾患のリスクとなり、日本人の肥満は前者が多いことが指摘されている。

NASHを含む脂肪肝は肥満に起因ないし関連して発症する健康障害の一つである(表2)¹⁾。平成17年国民健康・栄養調査では成人の肥満人口(BMI≥25)の比率は、男性では40歳代、女性では閉経後の60歳代が最も高く、それぞれ34.1%、29.0%であった。また、非アルコール性かつ非ウイルス性肝障害の約80%に肥満が合併している。さらに、脂肪肝は、肥満1度では50%、肥満2度以上であれば75%にみられる。NASHの頻度はNAFLDの約10%、成人の0.5~1%程度と言われているが、今後

肥満の増加とともに、NAFLDやNASHの頻度もさらに増加すると考えられる²⁾。

■インスリン抵抗性とNASH/NAFLD

NASH/NAFLDは内臓脂肪蓄積に伴うインスリン抵抗性を基盤とする病態である。内臓脂肪からはTNF-α、アディポネクチン、レプチン、アンジオテンシノーゲンなどのアディポサイトカインと総称される生理活性物質が分泌され、門脈血流を介してインスリン抵抗性に影響する。アディポネクチンは内臓脂肪増加と逆相関して血中濃度が低下し、肝臓および骨格筋のインスリン感受性を低下させ、TNF-α、レプチン、アンジオテンシノーゲンはインスリン抵抗性を亢進させる。NASH症例の77%がアディポネクチン10μg/ml以下、かつインスリン抵抗性を表わすHOMA-IRが3以上と高値であるのに対し、単純性脂肪肝症例では33%のみであることから、アディポネクチン減少はNASHの指標となる³⁾。内臓脂肪量もNASHの予測因子とされ、TNF-αは内臓脂肪量に相関し、脂肪組織に浸潤した炎症細胞からも分泌され、TNF-αはNASHの繊維化を促進させる因子の一つである⁴⁾。このようにアディポサイトカインはNASHの発症や進展に関与し、それに伴い誘導されるインスリン抵抗性はNASH/NAFLDの基本病態と考えられる。さらに、PPAR(peroxisome proliferators-activated

receptor) γ agonistであるチアゾリジン誘導体やピグリアノイド薬はインスリン抵抗性を改善させることでNASHの肝障害を改善させる。

■脂質代謝異常とNASH/NAFLD

血清中性脂肪が200mg/dl以上の高値もしくはHDLコレステロールが35mg/dl未満の低値であれば、NAFLDの危険性が上昇することが報告されている。内臓脂肪蓄積に伴いインスリン抵抗性が惹起された結果、中性脂肪分泌が亢進する。脂肪細胞で中性脂肪が分解され、遊離脂肪酸が増加し肝臓へ流入する。また高インスリン血症に伴う肝での脂肪酸合成の促進、あるいは肝臓内での β 酸化の低下などにより肝に脂肪が蓄積し脂肪肝が進行していく⁵⁾。

フィブラート系薬剤はPPAR- α agonistであり、脂肪酸の燃焼を促し組織内の中性脂肪量を減少させることで脂肪肝を改善させる可能性がある²⁾。また、スタチン系薬剤はHMG-CoA還元酵素阻害によるコレステロール合成抑制作用の他、レニン・アンジオテンシン系抑制作用、TNF- α などのサイトカイン発現抑制作用などを介してNASHにおける肝機能改善及び肝脂肪化改善作用が期待されている。

■高血圧とNASH/NAFLD

NASH/NAFLDの病態の基盤であるインスリン抵抗性は、高血圧の増悪因子でもある。インスリン抵抗性が血圧上昇に関与する機序として、腎におけるNa貯留作用、交感神経亢進作用、レニン・アンジオテンシン系活性亢進作用、血管抵抗増加作用などが考えられる。また、NASH/NAFLDの病態形成には酸化ストレスが関与しているが、酸化ストレス亢進により血管内皮細胞から産生される一酸化窒素(NO)が減少し、NOが血管収縮あるいは交感神経刺激を誘導することで血圧を上昇させる⁶⁾。一方、高血圧患者とくに肥満合併例ではレニン・アンジオテンシン系が亢進し、その中でもアンジオテンシンIIはインスリン抵抗性を惹起し、鉄の

表3 日本の8学会合同の診断基準準備委員会によるメタボリックシンドロームの診断基準(文献⁷⁾を引用)

腹腔内脂肪蓄積 ・ウエスト周囲径	(内臓脂肪面積 男性 $\geq 85\text{cm}$ 女性 $\geq 90\text{cm}$)	男女とも $\geq 100\text{cm}^2$ に相当)
上記に加え以下のうち2項目以上		
1) 高トリグリセライド血症 かつ/または 低HDLコレステロール血症		$\geq 150\text{mg/dl}$ $< 40\text{mg/dl}$
2) 収縮期血圧 かつ/または 拡張期血圧		$\geq 130\text{mm/Hg}$ $\geq 85\text{mm/Hg}$
3) 空腹時高血糖		$\geq 110\text{mg/dl}$

・CTスキャンなどで内臓脂肪量測定を行うことが望ましい。
 ・ウエスト径は立位、軽呼吸時、臍レベルで測定する。脂肪蓄積が著名で、臍が下方に変異している場合は肋骨下縁と前腸骨きょくの中点の高さで測定する。
 ・メタボリックシンドロームと診断された場合、糖負荷試験が薦められるが診断には必須ではない。
 ・高TG血症、低HDL-C血症、高血圧、糖尿病に対する薬物療法を受けている場合は、それぞれの項目に含める。
 ・糖尿病、高コレステロール血症の存在はメタボリックシンドロームの診断から除外されない。

過剰沈着、酸化ストレス増強などを引き起こす。このようにNASH/NAFLDと高血圧は密接に関連している。

さらに、降圧剤であるアンジオテンシン変換酵素阻害剤やアンジオテンシンII 1型受容体拮抗薬は肝星細胞の活性化を抑制し、NASHの肝線維化を改善する可能性がある。このように、NASH/NAFLDに対しては降圧効果を介した心・血管イベントの抑制に加えて、直接もしくは間接的にNASHの進行も抑制することが期待出来る。

■NASH/NAFLDとメタボリックシンドローム

過食、運動不足を背景に心筋梗塞や脳卒中等の動脈硬化性疾患の罹患数が増加傾向であったことから、シンドロームX、死の四重奏、内臓脂肪症候群などの様々な症候群が報告され、1999年WHOよりメタボリックシンドロームの概念が提唱された。さらに2005年4月、8学会合同で本邦でのメタボリックシンドローム診断基準が示された(表3)⁷⁾。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満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、動脈硬化を促進させる重要な複合生活習慣病である。CTスキャンなどで内臓脂肪量を定量することが勧められているが、診断基準

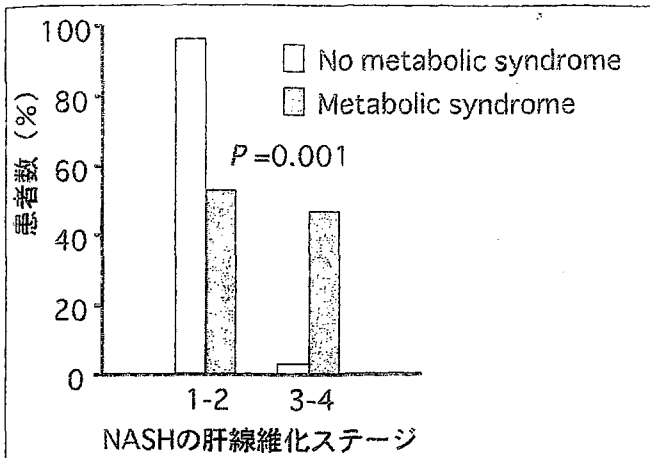


図 NASHの肝線維化の程度とメタボリックシンドロームの有無 (文献¹⁰⁾を引用改変)

では内臓脂肪評価の項目として計測が簡単な腹囲を用いている点が特徴である。また脂質異常の項目では、動脈硬化の指標として用いられるLDLコレステロールではなくトリグリセライドとHDLコレステロールを用いている点も特徴として挙げられる。

本邦のメタボリックシンドロームの頻度は男性ではおよそ8%~25%、女性は2%~22%程度で、対象年齢と調査時期により頻度は異なる。平成17年国民健康・栄養調査の報告では、40歳~74歳人口のうち、メタボリックシンドロームの該当者数は約920万人、予備軍数は約980万人、合わせて約1900万人と推計している。男性の2人に1人、女性の5人に1人はメタボリックシンドロームが強く疑われる者もしくはその予備軍と考えられており、メタボリックシンドロームは非常に頻度が高い。

日本成人4401人の調査では、男性25%、女性10%がNAFLDで、そのうち男性40%、女性26%がメタボリックシンドロームの診断基準を満たしている⁸⁾。

さらに、平均414日後に再度腹部超音波検査を施行され、男性14%、女性5%が新たにNAFLDと診断され、メタボリックシンドロームの存在がNAFLDの発症に強く関与していると報告されている。また、NAFLDとNASHにおけるメタボリックシンドロームの頻度はそれぞれ34~79%、24~

88%と報告されており⁹⁾、NASH/NAFLDとメタボリックシンドロームの関連性は極めて高く、メタボリックシンドロームの存在はNASHの肝線維化に促進的に作用すると考えられる(図)¹⁰⁾。NASH/NAFLDに対する治療法は確立していないが、NASH/NAFLDの治療の基本は生活習慣病をコントロールしていくことである。また単純性脂肪肝であっても将来NASHとなる可能性があり定期的な経過観察が必要である。

■おわりに

NAFLD/NASHと生活習慣病およびその複合病態であるメタボリックシンドロームとの関連について概略を説明した。NAFLD/NASHの病態は十分解明されておらず、NAFLD/NASHと内臓脂肪蓄積、インスリン抵抗性やアディポサイトカインなどとの相互関係を解明していくことが、NASHの病態解明や治療につながる。さらに、メタボリックシンドロームを形成する各病態を総合的に治療していくことは、NASHにおける肝硬変・肝癌への進展を抑制でき、NASHの生命予後の改善につながると考えられる。

参考文献

- 1) 白井厚治：我が国における肥満の判定と肥満症の診断基準。日本臨床59, 578-585, 2001.
- 2) 日本肝臓学会 編：NASH・NAFLDの診療ガイド。文光堂, 2006.
- 3) Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al: Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or Adiponectin? Hepatology 40, 46-54, 2004.
- 4) Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, et al: Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. Alimet Pharmacol Ther 27, 412-421, 2007.
- 5) 田村信司, 鎌田佳宏, 林紀夫：メタボリックシンドロームとNASH. BIO Clinica 22, 693-698, 2007.
- 6) 安東 克之, 藤田 敏郎：メタボリックシンドロームと高血圧. 日本医師会雑誌 136, 120-122, 2007.
- 7) 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. 日誌 94;794-809:2005.
- 8) Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. Ann Intern Med 2005, 143, 722-728.
- 9) 坪内博仁, 宇都浩文：NASHとメタボリックシンドローム. NASH診療ハンドブック. 西原利治 編. 中外医学社, 58-71, 2007.
- 10) Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Manesis EK, et al. Metabolic syndrome is associated with severe fibrosis in chronic viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. Alimet Pharmacol Ther 27, 80-89, 2008.

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20g/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, 自己免疫性肝疾患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。

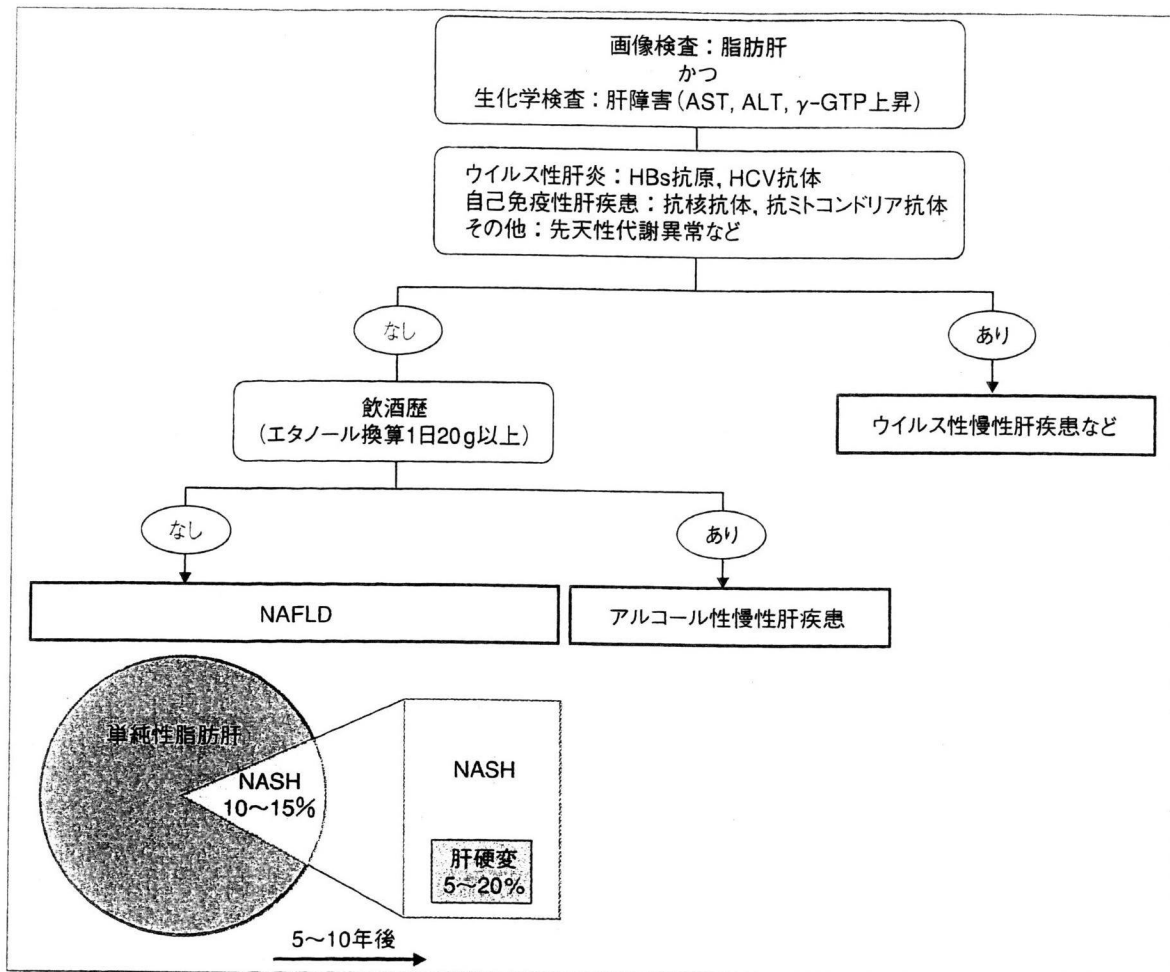


図 1 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) のスクリーニング法

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

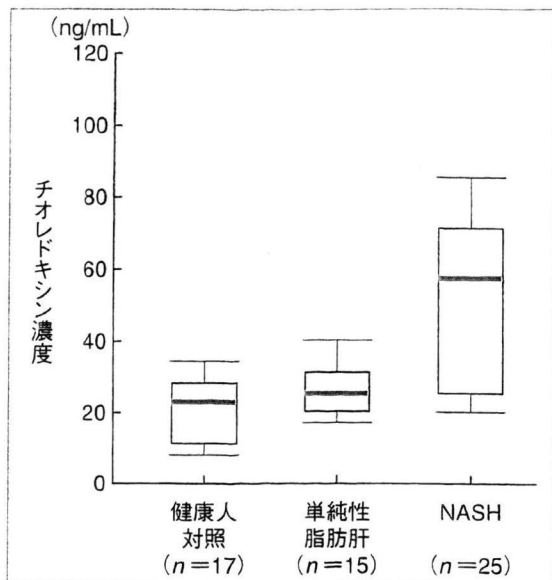


図 2 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血清チオレドキシンの濃度 (文献 9 から引用, 改変)

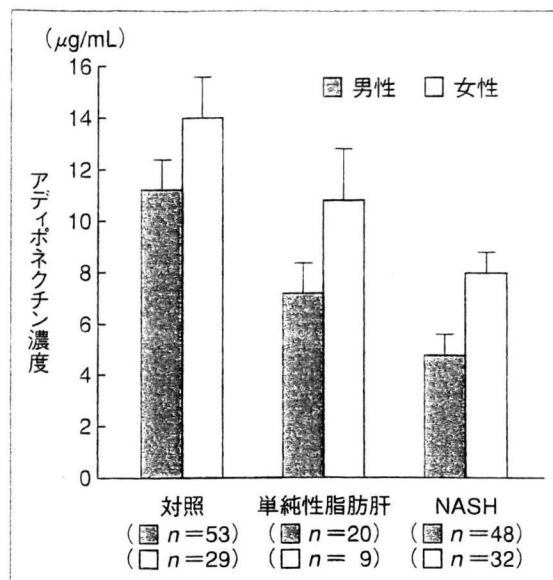


図 3 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血清アディポネクチンの濃度 (文献 5 から引用, 改変)

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 (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-863 A) 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

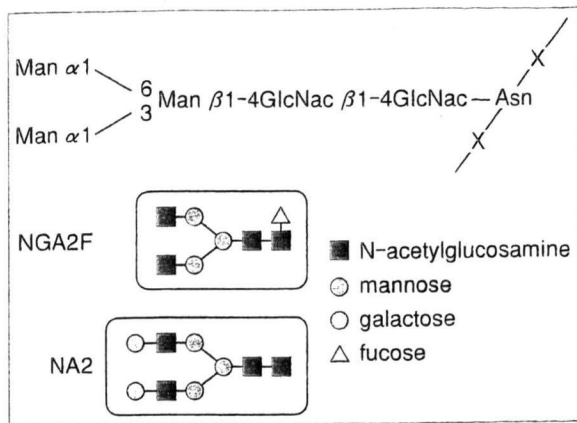


図 4 N 型糖鎖の基本構造とその一部

ら、血清 TNF- α 濃度は NASH のバイオマーカーとして有用と考えられ、その一塩基多型は NAFLD の進展予測にも有用である可能性がある。

③レプチン：脂肪細胞や肝星細胞に発現し、中枢神経に作用して強力な食欲抑制作用を示す。肥満をきたすとレプチンの血中濃度は上昇し、同時にレプチン抵抗性も生じ、もともとの糖・脂質代謝改善作用は減弱する。性と BMI をマッチさせた対照群と比較して NASH 患者では血中レプチン値が高く、血中レプチン値は肝の脂肪化と相関するが、肝炎や肝線維化とは相関しないこと¹⁵⁾から、単純性脂肪肝と NASH の鑑別には有用ではない可能性がある。

④高感度 C reactive protein (高感度 CRP)：高感度 CRP は心血管イベントの予測因子として知られている。脂肪組織での高感度 CRP 発現は血中アディポネクチン発現と負の相関があり、アディポネクチンノックアウトマウスの脂肪組織では CRP の mRNA が亢進していることから、動脈硬化の進展にはアディポネクチン低下を介した高感度 CRP 高値が関連している可能性が示されている¹⁶⁾。また、高感度 CRP は NASH と単純性脂肪肝との鑑別に有用であると報告されている¹⁷⁾。

d サイトケラチン-18 (CK-18) 断片

上皮系細胞において、アポトーシスが誘導されると Caspase-3 によりサイトケラチン 18 (CK-18) が 3 つに切断されることが知られてい

る。最近、CK-18 断片濃度が NAFLD と健康人の鑑別、NAFLD における NASH と単純性脂肪肝の鑑別に有用であり¹⁸⁾、NAFLD における肝線維化とも相関することが報告されている¹⁹⁾。

e その他

血管内皮細胞間接着分子である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) や pentraxin 3 が NASH の診断に有用であると報告されている^{20,21)}。また、N-glycan (N 型糖鎖) は糖蛋白質の糖鎖のうち、蛋白質のアスパラギン残基に結合している糖鎖の総称である (図 4) が、N-glycan のうち agalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan (NGA2F) 濃度は NAFLD における NASH の診断に有用であることが報告されている²²⁾。さらに、bigalacto biantennary glycan (NA2) と NGA2F との比 (NGA2F/NA2) は、NASH における肝線維化の重症度の予測に有用である可能性がある²²⁾。

● おわりに

NASH は進行した病態でなければ、一般的な血液検査などで単純性脂肪肝と鑑別することは容易ではない。しかし、病態に関連した種々のバイオマーカーの測定による NASH と単純性脂肪肝との鑑別が試みられており、それぞれの有用性が報告されている。また、肝組織所見を用いた NAFLD の活動性スコア (NAS score: 5 点以上は NASH と診断)²³⁾も NASH の診断に用いられてきており、今後、そのスコアとバイオマーカーとの相関も検討が必要である。NASH 患者は増加傾向にあり、決して予後良好な疾患ではない。このため、一般臨床で簡便・迅速に測定できるような NASH 診断法の確立が強く望まれる。

文献

- 1) Mofrad P, Contos M, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37: 1286-92.
- 2) Guha IN, Parkes J, Roderick P, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008;

- 47 : 455-60.
- 3) Obara N, Ueno Y, Fukushima K, et al. Transient elastography for measurement of liver stiffness measurement can detect early significant hepatic fibrosis in Japanese patients with viral and nonviral liver diseases. *J Gastroenterol* 2008 ; 43 : 720-8.
 - 4) George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998 ; 114 : 311-8.
 - 5) Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH : TNF α or adiponectin? *Hepatology* 2004 ; 40 : 46-54.
 - 6) 川中美和, 山田剛太郎. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 診断へのアプローチ-血液検査所見. *日内誌* 2006 ; 95 : 66-9.
 - 7) Sakurai M, Takamura T, Ota T, et al. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2007 ; 42 : 312-7.
 - 8) Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005 ; 100 : 850-5.
 - 9) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003 ; 38 : 32-8.
 - 10) Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, et al. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Hepatol* 2005 ; 42 : 585-91.
 - 11) Matsumoto H, Tamura S, Kamada Y, et al. Adiponectin deficiency exacerbates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2006 ; 12 : 3352-8.
 - 12) Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1796-807.
 - 13) Manco M, Marcellini M, Giannone G, Nobili V. Correlation of serum TNF- α levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007 ; 127 : 954-60.
 - 14) Tokushige K, Takakura M, Tsuchiya-Matsushita N, et al. Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis. *J Hepatol* 2007 ; 46 : 1104-10.
 - 15) Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis : a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002 ; 36 : 403-9.
 - 16) Ouchi N, Kihara S, Funatani T, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003 ; 107 : 671-4.
 - 17) Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007 ; 42 : 573-82.
 - 18) Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, et al. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis : A multicenter validation study. *Hepatology* 2009 [in press].
 - 19) Diab DL, Yerian L, Schauer P, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008 ; 6 : 1249-54.
 - 20) Ito S, Yukawa T, Uetake S, et al. Serum intercellular adhesion molecule-1 in patients with nonalcoholic steatohepatitis : comparison with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007 ; 31 : 83S-7S.
 - 21) Yoneda M, Uchiyama T, Kato S, et al. Plasma Pentraxin 3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *BMC Gastroenterol* 2008 ; 8 : 53.
 - 22) Chen C, Schmilovitz-Weiss H, Liu XE, et al. Serum protein N-glycans profiling for the discovery of potential biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *J Proteome Res* 2009 ; 8 : 463-70.
 - 23) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005 ; 41 : 1313-21.

Original Article

Value of the extracellular water ratio for assessment of cirrhotic patients with and without ascites

Nagisa Hara,¹ Motoh Iwasa,¹ Kazuko Iwata,² Hirohide Miyachi,¹ Hideaki Tanaka,¹ Masaki Takeo,¹ Naoki Fujita,¹ Yoshinao Kobayashi¹ and Yoshiyuki Takei¹

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Division of Clinical Medicine and Biomedical Sciences, Institute of Medical Science, Mie University Graduate School of Medicine, and ²Division of Dietary Service, Mie University School Hospital, Tsu, Japan

Aims: Ascites, which often complicates liver cirrhosis, is reported to be a factor that worsens the outcome. The aims of this study were to quantify body water compartment changes in cirrhotic patients, with and without ascites, and to elucidate the value of body water analysis for predicting the development of ascites.

Methods: A total of 109 cirrhotic patients, with and without ascites, and 65 controls were studied. Intra- and extracellular water (ECW) in the whole body and in the arm, leg and trunk were measured using the recently developed 8-electrodes multiple-frequency bioelectrical impedance analyzer. Furthermore, patients without ascites were followed to an episode of ascites or death.

Results: Patients with liver cirrhosis had significantly higher ECW ratios than controls. ECW ratios were increased in cirrhotic patients with moderate and severe disease. The ECW

ratio of the trunk showed highly significant changes in cirrhotic patients with ascites. The ECW ratio correlated with age, serum albumin, and prothrombin time. A relative expansion of ECW and low albumin were predictive of further episodes of ascites (log-rank 6.94, $P < 0.01$). In multivariate analysis, the ECW ratio was independently associated with the development of ascites.

Conclusion: Liver cirrhosis was characterized by a redistribution of body water. The ECW ratio is a reliable tool for quantification of redistribution of body water and can predict the development of ascites.

Key words: ascites, bioelectrical impedance analysis, extracellular water, intracellular body water, liver cirrhosis, total body water

INTRODUCTION

PATIENTS WITH CIRRHOSIS often have an abnormal body composition with clinical signs of protein-energy malnutrition and a relative increase in body weight due to ascites or edema.¹⁻³ Ascites is a condition that is becoming treatable with diuretics, albumin preparations, ascetic reperfusion, and transjugular intrahepatic portosystemic shunting, but the prognosis of patients with ascites remains poor.^{4,5} Heuman *et al.* studied 507 cirrhotic patients referred for consideration of liver transplantation and concluded

that the presence of persistent ascites is an important independent predictor of high mortality risk.⁶ On the other hand, some authors have reported an increase in body water even before ascites and edema are obvious.³ For the clinical management of these patients, it would be useful if body water measurements could be made in a simple manner.

Recent methods for the determination of the body composition include dual-energy X-ray absorptiometry, deuterium dilution and bioelectrical impedance analysis (BIA).^{7,8} Single-frequency BIA is a safe, non-invasive, rapid, and inexpensive method of assessing total body water (TBW) in healthy individuals.⁹ However, in situations where there are clinically important changes in the intracellular and extracellular distribution of water, such as cirrhosis, the value of single-frequency BIA is limited.^{3,10,11} Previous studies have indicated an improved prediction of body water compartments by BIA if measurements are made while the frequency of

Correspondence: Dr Motoh Iwasa, Department of Gastroenterology and Hepatology, Division of Clinical Medicine and Biomedical Sciences, Institute of Medical Science, Mie University Graduate School of Medicine, Edobashi 2-174, Tsu, Mie 514 8507, Japan. Email: motoh@clm.mie-u.ac.jp

Received 5 March 2009; revision 16 April 2009; accepted 23 April 2009.

the applied current is changed.^{12–14} At low frequencies, the current passes through the extracellular fluids because of the capacitance effect of cell membranes and tissue interfaces, whereas at higher frequencies, the current is conducted through both the intra- and extracellular fluids. More recently, technological advances include increasing the number of the contact electrodes from four to eight and software development to provide accurate estimations of water distribution within the whole body and various segments.^{15–17} It is proposed that this technique may be of particular use in patients with cirrhosis because they have an altered distribution of body water even in the absence of ascites.³ Moreover, separate measurements of the trunk and limbs may improve the precision of body water estimates in patients with ascites. However, it is not certain whether this approach will improve the accuracy of body water estimation.¹⁸

Thus, the purpose of this study was to assess the accuracy of 8-electrode multiple-frequency BIA for the measurement of whole body and segmental water compartments in cirrhotic patients with and without ascites. Then, patients without ascites were followed to elucidate the significance of the evaluation of the extracellular water (ECW) ratio for predicting the onset of ascites.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

A TOTAL OF 109 consecutive patients with ($n = 48$) or without ($n = 61$) ascites were studied. The diagnosis of cirrhosis was based on histological findings and/or the evidence of portal hypertension by esophageal varices at endoscopy and/or splenomegaly at computed tomography. Clinically apparent infection, malabsorption, endocrinopathy, the presence of hepatocellular carcinoma (HCC) outside the Milan criteria,¹⁹ and renal impairment (creatinine ≥ 2 mg/dL) were exclusion criteria. The causes of cirrhosis were alcohol abuse ($n = 12$), viral hepatitis ($n = 85$), and cryptogenic factors ($n = 12$). Fifteen of the 61 patients without ascites and 24 of the 46 patients with ascites were on diuretic treatment with spironolactone alone or a combination of spironolactone and furosemide. Patients were classified according to the severity of cirrhosis using the Child-Pugh score.²⁰ Thirty-four non-obese (body mass index, BMI < 30 kg/m²), apparently healthy volunteers were enrolled as controls. All had normal alanine aminotransferase (ALT < 40 IU/L) and no evi-

dence of viral infection (antibodies to hepatitis C virus and hepatitis B surface antigen negativity). Thirty-one patients suffering from chronic hepatitis, but without cirrhosis, also were enrolled as controls. Chronic hepatitis patients were characterized by the presence of antibodies to hepatitis C virus or hepatitis B surface antigen. The distinction between chronic hepatitis and liver cirrhosis was made using histological finding or the indirect index based on four clinical variables: gamma-globulin, hyaluronate, platelet counts, and gender.²¹ When a positive result was calculated using this equation, the patient was excluded from the control group.

After 12 hours overnight fasting, venous blood samples were drawn to determine platelet counts, albumin, total bilirubin, prothrombin time, ALT, sodium and creatinine. These parameters were measured using standard techniques from clinical chemistry laboratories. Written informed consent was obtained from each patient. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Body water analysis

Height and weight were obtained with a precision of 0.1 cm and 0.1 kg, respectively. BMI was calculated as weight (kg)/height (m) squared. BIA was performed by the whole body 8-electrode approach using a multifrequency impedance analyzer applying alternating electric currents of ≤ 100 μ A at 1 kHz, and of ≤ 500 μ A at 5, 50, 250, 500, and 1000 kHz (InBody 720, Soul, Korea). In accordance with the manufacturer's guidelines, patients were instructed to stand upright and to grasp the handles of the analyzer, thereby providing contact with a total of 8 electrodes (2 for each hand and foot). Intracellular body water (ICW), ECW, TBW, and ECW ratio (ECW/TBW) were measured in the whole body and in the arm, leg and trunk. ECW and TBW were estimated from area, volume, length, impedance, and a constant proportion (specific resistivity). Segmental body water data were similar for corresponding right and left measurements and therefore are reported as mean values. All body water data were normalized for height (m).

Follow-up

For patients without ascites and diuretic treatment at entry ($n = 46$), the follow-up was maintained until an episode of ascites, death, or the end of the observation period. During follow-up, cirrhotic patients without ascites underwent clinical assessment, renal and standard liver biochemical tests every month. Ultrasonography or computed tomography was performed three times a year, or more frequently, and the presence of

Table 1 Clinical characteristics of patients with cirrhosis and controls

	Normal volunteers (n = 34)	Chronic hepatitis (n = 31)	Cirrhosis (n = 109)
Age (years)	62 ± 8	60 ± 12	67 ± 9*,****
Male/Female	15/19	12/19	61/48
HBV/HCV/Alcohol/other	-	1/30/0/0	7/78/12/12
Laboratory test			
Platelet count (× 10 ³ /μL)	208 ± 54	187 ± 61	115 ± 221*
Albumin (g/dL)	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.2	3.1 ± 0.6**,****
Total Bilirubin (mg/dL)	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.3 ± 1.5*,***
Prothrombin time (%)	85 ± 28	102 ± 14	71 ± 15*,****
ALT (IU/L)	24 ± 12	44 ± 47	67 ± 183
Sodium (mEq/L)	142 ± 2	139 ± 2*	139 ± 3**
Child-Pugh A/B/C	-	-	40/58/11
Ascites none/grade 1/grade 2	0/0/0	31/0/0	61/38/10
HCC, number (%)	-	0 (0)	28 (26)
Height (m)	1.605 ± 0.075	1.587 ± 0.108	1.586 ± 0.091
BMI (kg/m ²)	23.0 ± 0.7	23.8 ± 3.6	22.8 ± 4.2

* $P < 0.05$ vs. normal volunteers; ** $P < 0.01$ vs. normal volunteers; *** $P < 0.05$ vs. chronic hepatitis; **** $P < 0.01$ vs. chronic hepatitis. ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus.

ascites was confirmed. The grade of ascites was classified according to International Ascites Club, i.e. grade 1 (mild ascites only detectable by radiological examination), grade 2 (moderate symmetrical distension of abdomen) or grade 3 (marked abdominal distension).²²

Statistical analysis

All data are given as mean ± standard deviation or as numbers of cases. Statistical differences between groups were analyzed using the Mann-Whitney *U*-test or the Kruskal-Wallis test when applicable. To identify intergroup differences after significant differences in the Kruskal-Wallis test, multiple comparisons were performed using Scheffé's *F*-test. Correlations were analyzed using Spearman's rank correlation test. Multiple regression analysis was performed to identify independent predictors of ECW ratio as continuous dependent variables. Factors that reached statistical significance in the univariate analysis were regarded as explanatory variables. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were used to determine the optimum cut-off for the prediction of the risk of developing ascites. Kaplan-Meier analysis was used for univariate analysis and Cox regression for multivariate analysis of variables associated with development of ascites. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Study population (Table 1)

POPULATION DATA ARE shown in Table 1. The cirrhosis group consisted of 109 subjects and the majority of patients (78%) had a viral etiology. The number and percentage of patients within each Child-Pugh grade was 40 (37%), 58 (53%), and 11 (10%) in grades A, B, and C, respectively. Clinical or radiological evidence of ascites was detectable in 48 (44%) patients. Twenty-eight (26%) patients exhibited an HCC. All patients were clinically stable at the time of assessment. The control group consisted of 34 healthy volunteers and 31 patients with chronic hepatitis. Patients with liver cirrhosis were significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) older than control subjects. Platelet counts were significantly ($P < 0.05$) lower in the cirrhotic patients than the healthy volunteers. Serum albumin and prothrombin time were significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) lower in the cirrhotic patients than the control subjects. Total bilirubin values were significantly ($P < 0.05$) elevated in the cirrhotic patients than the control subjects. Serum sodium values were significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) lower in the subjects with hepatitis and cirrhosis than in the healthy volunteers. There were no differences in ALT or BMI levels among the three groups.

Table 2 Body water compartments of patients with cirrhosis and controls

	Normal volunteers (n = 34)	Chronic hepatitis (n = 31)	Cirrhosis (n = 109)
ICW (L/m)	11.94 ± 1.89	11.76 ± 2.08	11.81 ± 1.85
ECW (L/m)	7.82 ± 1.68	7.49 ± 1.28	7.85 ± 1.28
TBW (L/m)	19.54 ± 2.90	19.25 ± 3.33	19.66 ± 3.08
ECW ratio (ECW/TBW)	0.389 ± 0.009	0.389 ± 0.009	0.399 ± 0.012***

* $P < 0.01$ vs. normal volunteers; ** $P < 0.01$ vs. chronic hepatitis.

ECW, extracellular water; ICW, intracellular water; TBW, total body water.

Body water compartments

The results of analysis of body water compartments in the cirrhosis and control groups are shown in Table 2. No significant differences in ICW, ECW, or TBW were observed among the three groups. Cirrhotic patients had significantly ($P < 0.01$) higher ECW ratios than healthy volunteers and hepatitis patients. Among the cirrhotic patients, no significant differences in ICW or TBW were observed between Child-Pugh A, B, and C (Table 3). Child-Pugh B or C cirrhotic patients trended to have higher ECW than grade A, but the difference was not statistically significant. Child-Pugh grade B or C cirrhotic patients had significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) higher ECW ratios than grade A. In addition, no signifi-

cant differences in ICW, ECW, or TBW were observed between patients without, and those with, ascites (Table 4). Cirrhotic patients with grade 2 ascites had significantly ($P < 0.01$) higher ECW ratios than those without ascites. We also studied the differences between patients with cirrhosis on diuretic treatment and those who were not (Table 5). There were no differences in body water compartments, including the ECW ratio, between the two groups.

Figure 1 shows the segmental ECW ratios of patients with and without ascites. Cirrhotic patients with grade 1 or 2 ascites had significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) higher ECW ratios of the trunk than those with no ascites. Likewise, cirrhotic patients with grade 2 ascites had significantly ($P < 0.01$) higher ECW ratios of the leg than

Table 3 Body water compartments of patients with cirrhosis grouped by Child-Pugh grade

	Child-Pugh A (n = 40)	Child-Pugh B (n = 58)	Child-Pugh C (n = 11)
ICW (L/m)	11.91 ± 1.66	11.79 ± 1.93	11.57 ± 2.20
ECW (L/m)	7.72 ± 1.04	7.94 ± 1.41	7.85 ± 1.40
TBW (L/m)	19.63 ± 2.68	19.73 ± 3.30	19.42 ± 3.46
ECW ratio (ECW/TBW)	0.393 ± 0.008	0.402 ± 0.011*	0.405 ± 0.022**

* $P < 0.01$ vs. Child-Pugh B; ** $P < 0.05$ vs. Child-Pugh A.

ECW, extracellular water; ICW, intracellular water; TBW, total body water.

Table 4 Body water compartments in cirrhotic patients with and without ascites

	No ascites (n = 61)	Grade 1 ascites (n = 38)	Grade 2 ascites (n = 10)
ICW (L/m)	11.92 ± 1.98	11.91 ± 1.74	10.85 ± 1.06
ECW (L/m)	7.81 ± 1.34	7.99 ± 1.23	7.59 ± 1.06
TBW (L/m)	19.72 ± 3.29	19.90 ± 2.92	18.45 ± 2.02
ECW ratio (ECW/TBW)	0.396 ± 0.010	0.402 ± 0.011	0.411 ± 0.018*

* $P < 0.01$ vs. no ascites.

ECW, extracellular water; ICW, intracellular water; TBW, total body water.

Table 5 Body water compartments of patients with cirrhosis on diuretic treatment and those who are not

	Not on diuretic treatment (n = 70)	On diuretic treatment (n = 39)
ICW (L/m)	12.04 ± 1.85	11.42 ± 1.82
ECW (L/m)	7.99 ± 1.32	7.59 ± 1.18
TBW (L/m)	20.03 ± 3.12	19.02 ± 2.95
ECW ratio (ECW/TBW)	0.399 ± 0.012	0.399 ± 0.012

ICW, intracellular water; ECW, extracellular water; TBW; total body water.

those with no ascites. However, no significant differences in ECW ratios of the arm were observed among the three groups.

Factors associated with the ECW ratio

Among the 109 cirrhotic patients, age ($r = 0.393$, $P < 0.001$), low albumin ($r = -0.497$, $P < 0.001$), and low prothrombin time ($r = -0.293$, $P < 0.01$), evaluated as continuous variables, were associated with higher ECW ratio. There were no significant correlations among ECW ratio and platelet count ($r = 0.109$), total bilirubin ($r = 0.102$), ALT ($r = -0.149$), sodium ($r = 0.028$), and BMI ($r = -0.185$). In the multiple regression analysis using age, albumin, prothrombin time, and BMI, age ($r = 0.299$, $P < 0.01$), albumin ($r = -0.280$, $P < 0.01$), and prothrombin time ($r = -0.302$, $P < 0.01$) remained independent variables in the model.

ECW ratio for the prediction of the risk of developing ascites

Fifteen of 61 patients without ascites were on diuretic treatment at time of initial assessment and these patients were excluded from follow-up. Time zero was that of the initial body water analysis and the end points were an episode of ascites or death. The mean follow-up period was 7.7 months. During the period of observation, two patients died due to progressive HCC. The ROC curve analysis of the ECW ratio for the prediction of developing ascites showed an area under the curve value of 0.80. With a cut-off of 0.398, the sensitivity was 85.7% and specificity was 64.9%. Among the 44 cirrhotic patients, 19 showed abnormalities in the results of ECW ratio, i.e. more than 0.398. Table 6 summarizes the results of laboratory tests for both groups. Serum albumin was significantly ($P < 0.05$) lower in cirrhotic patients with an altered distribution of body water than in those with a normal distribution. HCC was present in

3 (16%) of 19 patients with an altered distribution of body water, and a normal distribution was found in five cases (20%). There was no statistically significant difference between groups in the incidence of HCC.

In all, seven patients exhibited an episode of ascites during follow-up. Two patients developed HCC during follow-up, but no patients developed ascites as a result of advanced HCC. Six (86%) of the 7 who developed ascites showed a relative expansion of ECW, defined using the ECW ratios from the initial assessments, whereas only one (14%) patient showed normal distribution of body water according to the ECW ratio. In univariate analysis, the variables associated with a higher risk of developing ascites were relative expansion

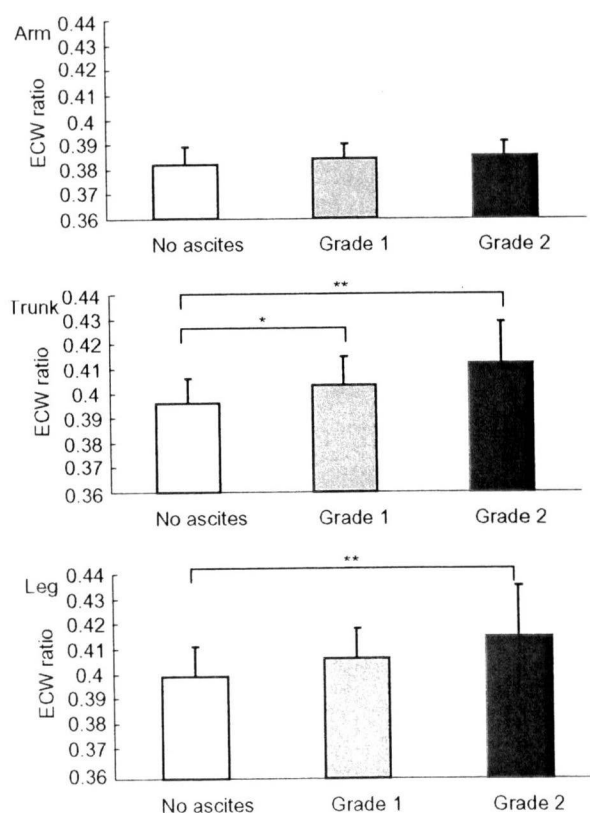


Figure 1 Segmental body water compartments in cirrhotic patients with and without ascites. No significant differences in extracellular water (ECW) ratios of the arm were observed among the three groups (upper). Cirrhotic patients with grade 1 or 2 ascites had significantly higher ECW ratios of the trunk than those with no ascites (middle). Cirrhotic patients with grade 2 ascites had significantly higher ECW ratios of the leg than those with no ascites (lower). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.