

NASH に対しても積極的な治療が必要である。

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

●術後 NASH

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

おわりに

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

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

文献

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

NASH の診断 1

バイオマーカー

宇都浩文 吳 建 坪内博仁

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

● はじめに

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

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

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

● NAFLD のスクリーニング

NAFLD は, 予後良好な単純性脂肪肝と進行

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

a 肝機能障害

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

b 画像検査 (超音波, CT 等) による脂肪肝の存在

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

c 他の肝疾患 (ウイルス性, 自己免疫性, 代謝性疾患等) の除外

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

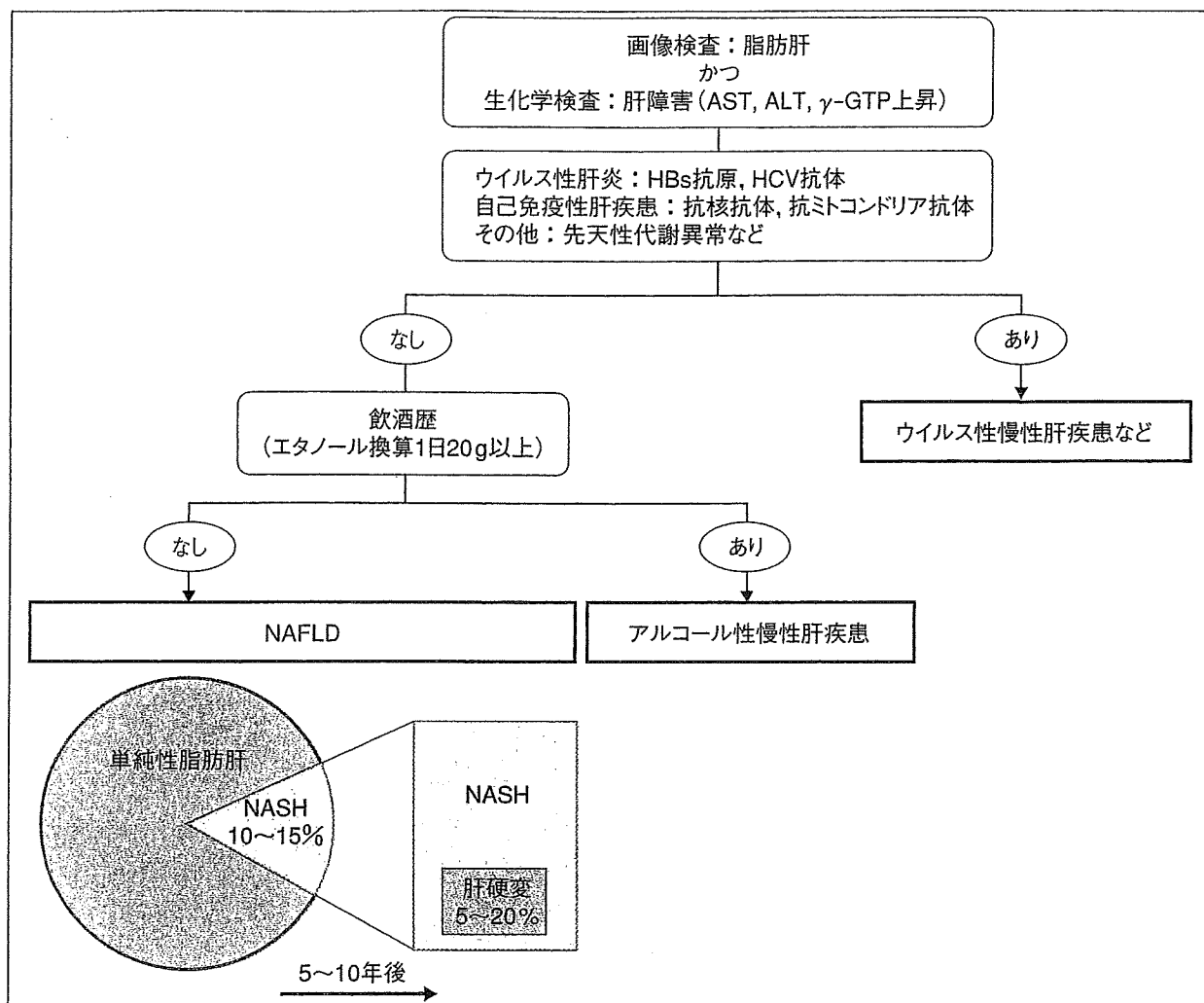


図 1 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) のスクリーニング法

d 多飲歴の否定

エタノール換算で 20 g/日を超える飲酒歴を認めないことを確認する。

e 合併症

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

● **NASH のバイオマーカー**

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

1 NASH の一般生化学検査所見

a トランスアミナーゼの上昇

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

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

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

b 肝線維化マーカーの上昇

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

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

c 血小板数の低下

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

d 血清鉄とフェリチンの上昇

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

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

2 NASH の病態に関連した検査所見

a インスリン抵抗性

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

b 酸化ストレスマーカー

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

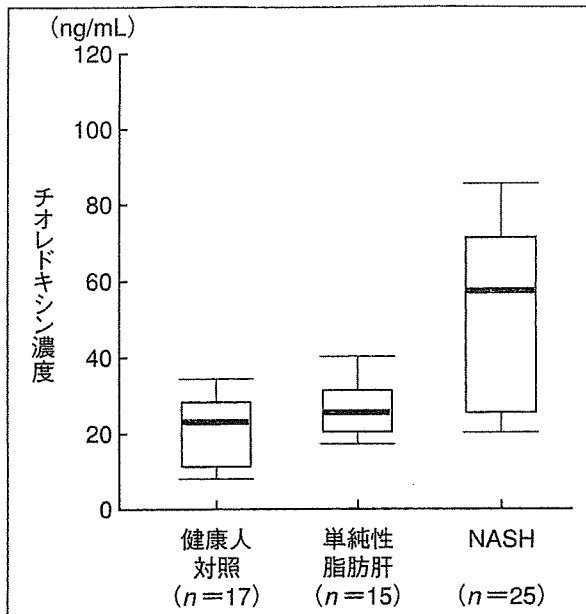


図 2 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血清チオレドキシニン濃度 (文献 9 から引用, 改変)

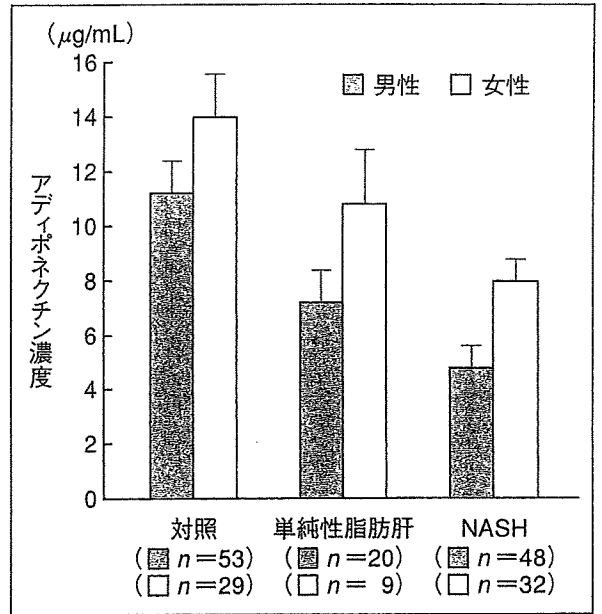


図 3 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における血清アディポネクチン濃度 (文献 5 から引用, 改変)

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

c アディポサイトカイン

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

①アディポネクチン：脂肪組織に特異的に高

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

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

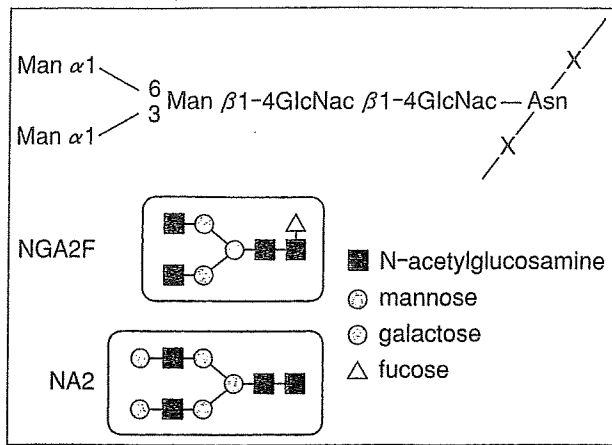


図 4 N 型糖鎖の基本構造と其の一部

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.

日本肝臓学会コンセンサス神戸 2009 : NASH の診断と治療

岡上 武 西原 利治 小野 正文 角田 圭雄 橋本 悦子
田村 信司 山田剛太郎 河田 純男 工藤 正俊

「肝臓」第50巻 第12号 (2009) 別刷

<特別寄稿>

日本肝臓学会コンセンサス神戸 2009 : NASH の診断と治療

岡上 武¹⁾ 西原 利治^{2)*} 小野 正文²⁾ 角田 圭雄³⁾ 橋本 悦子⁴⁾
 田村 信司⁵⁾ 山田剛太郎⁶⁾ 河田 純男⁷⁾ 工藤 正俊⁸⁾

索引用語： 酸化ストレス インスリン抵抗性 メタボリックシンドローム
 肝硬変 肝細胞癌

はじめに

1980 年 Mayo Clinic の病理学者であった Ludwig はアルコール性肝炎に類似する肝組織所見を呈した飲酒歴に乏しい症例について、既知の疾患を可能な限り除外し得た 20 症例を呈示し、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) として報告した¹⁾ (Table 1). 本症は単なる糖尿病の合併症ではなく、主として肥満などの生活習慣病を誘因として発症する慢性進行性肝疾患で、肝硬変から肝不全や肝細胞癌にまで進展する生活習慣病の肝臓における表現形と認識されている。しかし、肥満を誘因とする NASH 以外にも消化管手術後、睡眠時無呼吸症候群、神経性食思不振症やある種の薬剤服用などでも発症する症例が存在するため、誘因により各々を区別し、診断名に付記することが提案された (Table 1). Schaffner らも 1986 年に、飲酒量がエタノール換算で 20 g/日以下にもかかわらずアルコール性肝障害に類似した組織像を示す疾患について、既知の疾患を可能な限り除外した症例を非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) として報告した²⁾. その後、1990 年には Wanless らが同様の組織学的変化を示す剖検例を多数解析して、fatty liver hepatitis として報告した³⁾. 病理学的視点に立ったこれらの論文を通じて、肝硬変や肝細胞癌

の温床となる NASH の存在が明確となり、1998 年の NIH Conference で NASH という病理学的に診断に基づく新しい疾患概念が確立された。

本邦で最初に NASH が主題として取り上げられたのは 2001 年の日本肝臓学会西部会であり、2004 年には欧米およびアジアの専門家が一同に会して日本肝臓学会 Single Topic Conference が開かれた。その後、2006 年に日本肝臓学会の編集による NASH・NAFLD の診療ガイド⁴⁾が上梓されるや、国内、国外で NASH/NAFLD に関する多くの報告⁵⁾がなされるようになった。NASH がこのように日常診療で広く取り扱われるようになるにつれ、診療の根拠となる共通認識形成やエビデンスに基づく推奨事項の文書化を求める声が高まった。しかし、わが国では NASH の臨床・研究が本格的に幅広く行われだして 10 年程しか経過しておらず、また NASH 患者の大部分が生活習慣病を背景にしているとはいえ、世界的にも evidence level の高い臨床研究は多くはない。

そこで、第 45 回日本肝臓学会総会 (工藤正俊会長) において、NASH (病態・診断・予後・治療) をテーマとしたコンセンサス パネルディスカッションが日本肝臓学会として初めて催された。比較的エビデンスレベルが高く、発表者と座長のコンセンサスが得られた事項で有益な情報を Informative statement とし、推奨すべき指針を Recommendation として取り上げた。エビデンスレベルが低い欧米のガイドラインでは採用されていないか、発表者と座長の予備検討において全員の賛同が得られなかった事項については、アンサーパッドで学会参加者に意見を求めた。その際、回答者の 2/3 以上の承認が得られれば Consensus Statement として採用した (Table 2). アンサーパッドの参加者は 200 人であり、内訳は内科医が 88%、肝炎診療の経験年数が 10 年以上の医師が 83%、肝臓学会専門医も 83% を占めた。本稿ではその内容の大略を紹介する。

1) 大阪府済生会吹田病院肝臓センター

2) 高知大学消化器内科学

3) 市立奈良病院消化器肝臓病センター

4) 東京女子医科大学消化器内科学

5) 箕面市立病院内科

6) 川崎病院肝臓消化器病センター

7) 山形大学消化器内科学

8) 近畿大学消化器内科

*Corresponding author: saibarar@kochi-u.ac.jp

<受付日2009年11月9日><採択日2009年11月18日>

NASH の診断アルゴリズム

NASH の診断アルゴリズムを Fig.1 に示す. 上述のように, NASH の診断は肝生検を用いて病理学的に行われる⁶⁾(Table 2 Consensus statement 4, C-4). 小葉中心性に中~大滴性の脂肪滴を伴う肝細胞が出現し, 小葉内の炎症細胞浸潤(好中球, リンパ球), 肝細胞の風船様変性 hepatocyte ballooning, Mallory-Denk 体, 肝細胞周囲性の線維化 pericellular fibrosis や類洞に沿った線維化 perisinusoidal fibrosis, 巨大ミトコンドリア, 好酸性壊死や鉄沈着などを伴うことが知られている. しかし, これらの病理所見がすべて観察される NASH 症例は多くない. そこで今日では組織学的に確定診断がなされた NASH に加えて, 臨床的に NASH を疑ったが病理学的に単純性脂肪肝と診断された症例, さらに NASH を基盤に発症した肝硬変や肝細胞癌をも包括する広い概念としてしばしば NAFLD という用語が用いられる.

では, どのような症例を今日的な意味で NASH と診

断すべきであろうか. 1999 年に Matteoni らは多数の NAFLD 症例を集めて肝組織像と肝疾患関連死との関係を検討し, すでに肝臓に線維化を有する症例や Mallory-Denk 体を有する症例, また, 肝細胞に風船様変性が認められる症例では, 単純性脂肪肝に比して肝疾患関連死が多いと報告し⁷⁾, その成績は Rafiq らによって再確認された⁸⁾. これを受けて今回のミーティングでは, 生命予後に悪影響を及ぼす病変を持った脂肪肝症例であることが NASH の診断に重要だと考えに基づき, NASH の診断に際しては 1) 肝細胞の大滴性脂肪化, 2) 炎症性細胞浸潤, 3) 肝細胞の風船様腫大の 3 つの病理学所見が揃うことを必須とする共通認識が成立した(C-5).

NAFLD はすでに NASH・NAFLD の診療ガイド⁴⁾において, 「明らかな飲酒歴がないにもかかわらず, 肝組織所見はアルコール性肝障害に類似した主に大滴性の脂肪沈着を特徴とする肝障害」と定義されている. これらの症例の中から, 上記の病理学的所見を指標に典型的な NASH 症例を選び出すことは比較的容易である. しかし, 肝生検の部位による肝組織像の差異は避けられないし⁹⁾¹⁰⁾, 当然のことながら十分量の肝生検組織片が必要であり, かつ一部の症例では診断が NASH と単純性脂肪肝とに病理医の間でも分かれることもある. これは NASH と診断する際にどのような病理学的所見を最も重視するか, 専門医の間でも共通認識の形成が

Table 1 Ludwig による脂肪肝炎の分類

アルコール性	NASH	
	原発性	二次性
	肥満関連	薬剤性・術後性等

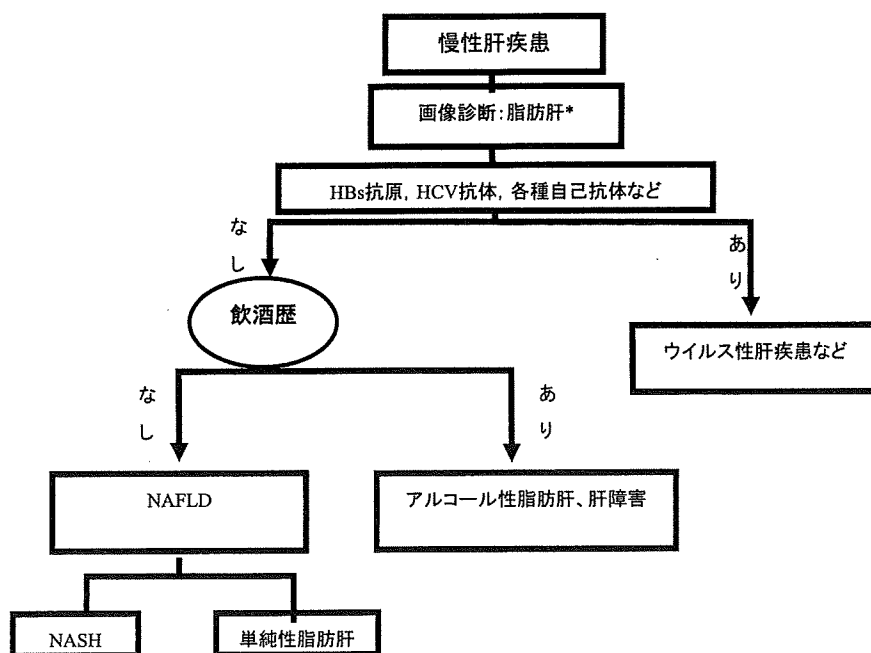


Fig. 1 NASH 診断のアルゴリズム

Table 2 NASH・NAFLD に関して、今回のミーティングで合意が得られた事項

Consensus statement	Evidence grade & level
1 NASH は肥満を誘因とする非飲酒者の慢性肝疾患である。	Level 1a/Grade A
2 非飲酒者のアルコールの摂取基準は男女ともにエタノール換算で 20g/日 (140g/週) 未満とする。	Level 3/Grade C
3 NASH・NAFLD と診断するためには他の慢性肝疾患を除外する必要がある。	Level 1a/Grade A
4 NASH 診断の Gold Standard は肝生検である。	Level 1a/Grade A
5 NASH の組織学的診断には下記 3 項目を必須とする。 1) 肝細胞の大滴性脂肪化 2) 炎症性細胞浸潤 3) 肝細胞の風船様腫大	Level 2b, Grade B
6 肝生検の適応となる症例を選択する基準は存在しない。	Level 3, Grade C
7 NASH を確定診断できる画像診断や臨床検査値は確立されていない。	Level 3/Grade C
8 NASH には肥満以外にも多様な誘因が存在する。 例：消化管手術に伴う NASH 等の二次性 NASH	Level 1a/Grade A
9 NASH・NAFLD の発症に肥満、特に内臓脂肪型肥満が重要である。	Level 1a/Grade A
10 NASH・NAFLD の発症に 2 型糖尿病、特にインスリン抵抗性が重要である。	Level 1a/Grade A
11 NASH・NAFLD の発症に人種差、遺伝子多型などの遺伝的背景が重要である。	Level 2b/Grade B
12 NASH・NAFLD の発症にアディポカイン、サイトカインが重要である。	Level 4/Grade B
13 NASH・NAFLD の発症に酸化ストレス (ROS) が重要である。	Level 2b/Grade B
14 NASH を放置すれば、肝臓の線維化が進展する。	Level 3/Grade C
15 NASH の予後は一般住民の予後より不良である。	Level 2a/Grade B
16 NASH による肝硬変は肝細胞癌の高危険群である。	Level 2a/Grade A
17 NASH における肝発癌の危険因子には肥満・糖尿病・肝の線維化・高齢がある。	Level 2a/Grade A
18 NASH・NAFLD の治療を行った場合には、治療効果の評価が必要である。	Level 1a/Grade A
19 NASH・NAFLD の治療の有効性の証明にはエビデンスレベルの高い検証が必要である。	Level 1a/Grade A
20 NASH・NAFLD の治療効果の評価には血清 ALT 値と共に肝組織像による評価が望ましい。	Level 3/Grade C
21 肥満をともなう NASH・NAFLD 症例では、継続した食事・運動併用療法が有用である。	Level 3/Grade C
22 NASH・NAFLD では肥満治療薬による治療が検討されている。	Level 4/Grade C
23 インスリン抵抗性の強い NASH・NAFLD 症例の治療にはインスリン抵抗性改善薬が有用である。	Level 2a/Grade A
24 NASH・NAFLD では抗酸化剤や瀉血による肝病態の改善が報告されている。	Level 4/Grade C
25 NASH・NAFLD では脂質異常改善剤による肝機能の改善が報告されている。	Level 4/Grade C
26 NASH・NAFLD では肝臓用薬による肝機能の改善が報告されている。	Level 4/Grade C
27 NASH ではアンジオテンシン II 1 型受容体拮抗薬の肝機能改善・線維化抑制効果が報告されている。	Level 4/Grade C
28 NASH・NAFLD では治療標的分子の候補が明らかになりつつある。	Level 4/Grade C
29 NASH・NAFLD では QOL を損なわない臨床応用可能な治療法・治療薬の開発が望ましい。	Level 4/Grade C
Recommendation	Evidence grade & level
1 NAFLD を疑った時、血小板低下や線維化マーカーの上昇、高齢等があれば、肝生検を考慮する。	Level 2b/Grade B
2 二次性 NASH では誘因を付記することが望ましい。 例：消化管手術に伴う NASH	Level 1a/Grade A
3 NAFLD では発症に重要な役割を果たす肥満、特に内臓脂肪型肥満についての評価を行うことが必要である。	Level 1a/Grade A
4 NAFLD では発症に重要な役割を果たす 2 型糖尿病、特にインスリン抵抗性についての評価を行うことが必要である。	Level 1a/Grade A
5 NAFLD では QOL や生命予後を低下させる要因に対する介入が必要である。	Level 2b/Grade B
6 NAFLD では肝硬変や発癌を念頭においた治療介入と、定期検査が必要である。	Level 2b/Grade B
7 肥満をともなう症例では、継続した食事・運動併用療法を勧める。	Level 2a/Grade B
8 食事・運動併用療法による治療効果が得られない場合には、病態に応じた治療を考慮する。	Level 4/Grade C

Table 3 NASH と単純性脂肪肝の鑑別に有用性が期待されているマーカー

インスリン抵抗性
HOMA-IR
Leptin
Adiponectin
線維化
Hyaluronic acid
typeIV collagen 7S
TGFβ
酸化ストレス
TBARS
Oxidized-LDL
Total antioxidant response
Total lipid peroxide levels
Thioredoxin
炎症
TNFα
hsCRP
Ferritin
アポトーシス
CK-18 fragments
TNF-α/adiponectin ratio
Interleukin-6
CCL2
内分泌
DHEA-S

HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance, TGFβ: transforming growth factor β, TBARS: thiobarbituric acid-reacting substance, LDL: low-density lipoprotein, TNF: tumor necrosis factor, hsCRP: high sensitivity C-reactive protein

CK: cytokeratin, CCL2: CC-chemokine ligand-2, DHEA-S: dehydroepiandrosterone-sulphate

未だ充分でないからである¹¹⁾。また、どのような NAFLD 症例を肝生検の適応とすれば効率よく NASH を発見できるかについても未だ結論が得られていない⁶⁾¹²⁾¹³⁾ (C-6)。このため、NAFLD を NASH と単純性脂肪肝と判別するための非観血的検査法や指標作りが試みられた^{14)~16)} (Table 3)。しかし、NASH との診断に至らない症例が単純性脂肪肝であり、微少な病理学的差異を鑑別する方法は未だ確立されていない (C-7)。

このミーティングでは、肥満・糖尿病・インスリン抵抗性・高齢などを伴い NAFLD が疑われる症例では、血小板数の低下や肝線維化マーカーの上昇など肝臓の線維化を疑わせる所見があれば肝生検を考慮することが推奨された¹⁷⁾ (Table 2 Recommendation 1, R-1)。

NASH の発症機序

NAFLD は病理学的所見から集約された症候群であり、その誘因は多様である (Table 1) (C-8)。しかし、その中心となる肥満を背景とする NAFLD はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型であり、人種差¹⁸⁾や遺伝子多型¹⁹⁾²⁰⁾などの遺伝的背景に加えて (C-11)、肥満 (特に内臓脂肪型肥満) を背景とする 2 型糖尿病 (特にインスリン抵抗性) などの環境因子が重積して (C-9, 10)、酸化ストレス (ROS)²¹⁾²²⁾ やアディポカイン、サイトカインを介した肝障害²³⁾²⁴⁾ が惹起され、発症に結びつくと考えられている (C-12, 13)。このため、NAFLD の存在を疑った場合には、背景因子である内臓脂肪型肥満やインスリン抵抗性に着目した 2 型糖尿病の存在について評価を行うことが推奨された (R-3, 4)。

NASH の自然経過と予後・肝発癌のリスク

NAFLD では QOL や生命予後を低下させる要因として、メタボリックシンドロームの合併や NASH への進展が想定される。従って、その予後を改善するためには、生活習慣病や NASH に対する治療が必要との共通認識が得られた (C-14, 15)。また、本邦では多数の NASH 症例を長期に観察した報告はないが、今回のミーティングでは欧米で肝疾患関連死の増加につながると報告された肝組織像を呈する症例を NASH と規定することにより⁷⁾⁸⁾ (C-5)、NASH の予後は一般住民より不良との共通認識を得ることが可能であった (C-15)。

NAFLD は明らかな飲酒歴がないにもかかわらず、肝組織所見はアルコール性肝障害に類似した主に大滴性の脂肪が主として中心静脈周囲に沈着することを特徴とする慢性肝障害である。約 1 割の NASH 症例に加えて、今後 NASH に進展する症例を含む集団であることから、放置すれば肝臓の線維化が進展すると容易に推定される。欧米の多くの論文でも NAFLD を放置すれば肝臓の線維化が進展し、肝疾患関連死の増加に繋がると報告されている^{25)~28)}。しかし、意外なことに、今回のミーティングでは NAFLD を放置すれば肝臓の線維化が進展するとの共通認識を得ることはできなかった。

NASH は肝硬変に進展するのみならず、肝細胞癌の温床となる²⁹⁾ (C-16)。NASH における肝発癌のピークは 70 歳代にあり、進展した肝の線維化、肥満や糖尿病が肝発癌の危険因子である (C-17)。肝生検が行われる症例は NASH が疑われる症例であり、例え採取された肝組織に NASH との診断に足る所見が得られなくとも、

Table 4 NAFLD/NASH の治療標的

肥満 (内臓肥満)	酸化ストレス・炎症・アポトーシス
インスリン抵抗性	標的細胞
遊離脂肪酸	Kupffer 細胞, マクロファージ, NKT 細胞, etc
サイトカイン, アディポサイトカイン	遊離脂肪酸
TNF- α , IL-6, アディポネクチン, etc.	ミトコンドリアストレス, ER ストレス
インスリンシグナル阻害因子	鉄過剰蓄積
PKCs, JNK1, FOXO1, etc.	腸内細菌, エンドトキシン
酸化ストレス	サイトカイン, ケモカイン, アディポサイトカイン
ER ストレス, ミトコンドリアストレス	TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, アディポネクチン
脂肪酸代謝制御因子	炎症, アポトーシス関連因子
脂質代謝異常	Toll-like receptor
脂肪分解 (遊離脂肪酸の産生)	JNK, IKK, AP-1, NF κ B, etc.
インスリン抵抗性, ホルモン感受性リパーゼ, MCP-1, TNF- α , etc.	COX-2, Liopoxigenese, etc.
脂肪酸合成関連酵素	Fas/FasL, caspase, etc.
acetyl-CoA carboxylase1, 2, etc.	抗肝線維化
脂肪酸酸化関連酵素	標的細胞
carnitine palmitoyltransferase1, etc.	肝星細胞, Kupffer 細胞, 類洞内皮細胞, etc.
脂肪酸代謝制御因子	サイトカイン, ケモカイン, アディポサイトカイン, 増殖因子
AMPK, SREBP1, ChREBP, PPAR α , γ , LXR, etc	TGF- β , MCP-1, レプチン, アディポネクチン, TNF- α ,
中性脂肪分泌関連因子	アンジオテンシン, FGF, CTGF, etc.
Microsomal triglyceride transfer protein, apoB, etc.	線維化蛋白/分解因子
脂肪滴関連因子	ECM, TIMP, MMP, etc.
perilipinA, adipophilin, TIP47, etc.	シグナル
サイトカイン, アディポサイトカイン	Smad 系, MAPK 系,
ホルモン	炎症, 酸化ストレス
甲状腺ホルモン, 女性ホルモン, 成長ホルモン	転写因子, 核内受容体
その他	PPAR γ , LXR, FXR etc.
アディポニュートリン, etc	

肝生検の部位による肝組織像の差や今後 NASH に進展する可能性を考慮して、慎重な経過観察が必要であることは言うまでもない。

NASH に対する治療

NASH の最大の誘因は肥満である。従って、肥満を伴う症例では、継続した食事・運動療法による減量が有用である (C-21, R-7)。すでに胃の banding などの外科的治療による減量の導入が始まっており、その有用性を示す報告が認められる³⁰⁾。また、肥満治療薬による治療も検討されている (C-22)。しかし、非肥満の NASH や減量が困難な症例や治療効果が充分でない症例では、病態に応じた治療を考慮する必要がある (C-23, 24, 25, 26, R-8) (Table 4)。NASH に対して効能を有する薬物は現時点ではない⁴⁾が、NASH 研究の進歩により、治療

標的分子の候補が明らかになりつつある (C-27, 28)。例えば、NAFLD の発症には酸化ストレス (C-13) の関与が示唆されており、酸化ストレスの軽減を目指した抗酸化薬の投与や瀉血による肝病態の改善が報告されている (C-24)。また、インスリン抵抗性の強い症例ではインスリン抵抗性改善薬の有用性が示され (C-23)、脂質異常改善剤 (C-25) や肝臓用薬 (C-26) による肝機能の改善、アンジオテンシン II 1 型受容体拮抗薬の肝機能改善・線維化抑制効果が報告されている (C-27)。しかし、NAFLD/NASH の原因、病態は均一ではなく、各々の病因や病態に対応した治療法の開発が必要と考えられる。NASH は肝硬変、肝細胞癌へ進展し得る病態なので、NAFLD では肝硬変や肝発癌を念頭においた治療介入と定期検査が必要である (R-5, 6)。また NASH 発症・進展の分子機構解明の研究の進歩により、種々

の治療標的が示されている³¹⁾(Table 4) ので, QOL を損なわない臨床応用可能な治療法・治療薬の開発が望まれる(C-29). さらに, 何らかの治療を行った場合には治療効果の評価が必要であり(C-18), 有効性の証明には信頼性の高い検証が必要である(C-19). 従って, NASH に対する治療効果の評価は血清 ALT 値とともに, 肝組織像による評価が望ましい(C-20).

文 献

- 1) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proceedings* 1980; 55: 434—488
- 2) Schaffner F, Thaler H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Progress in Liver Disease* 1986; 8: 283—298
- 3) Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106—1110
- 4) 日本肝臓学会編. 「NASH・NAFLD の診療ガイド」, 文光堂, 東京, 2006, p30—31
- 5) Ono M, Saibara T. Clinical features of nonalcoholic steatohepatitis in Japan: Evidence from the literature. *Journal of Gastroenterology* 2006; 41: 725—732
- 6) Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705—1725
- 7) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413—1419
- 8) Rafiq N, Bai C, Fang Y, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clinical Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 234—238
- 9) Murata Y, Ogawa Y, Saibara T, et al. Tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis in patients with breast cancer: determination of a suitable biopsy site for diagnosis. *Oncol Rep* 2003; 10: 97—100
- 10) Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, et al. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 874—880
- 11) 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—1321
- 12) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202—1219
- 13) Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, et al; Asia-Pacific Working Party on NAFLD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 775—777
- 14) Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846—854
- 15) Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, et al. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* 2008; 57: 1441—1447
- 16) 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—460
- 17) Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49: 306—317
- 18) Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387—1395
- 19) Dong H, Wang J, Li C, et al. The phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *J Hepatol* 2007; 46: 915—920
- 20) Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461—1465
- 21) 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—38
- 22) Ikura Y, Ohsawa M, Suekane T, et al. Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: impact on disease progression. *Hepatology* 2006; 43: 506—514

- 23) Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, et al. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 303—306
- 24) Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46—54
- 25) Teli MR, James OF, Burt AD, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714—1719
- 26) Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, et al. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004; 40: 820—826
- 27) Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, et al. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42: 132—138
- 28) Ekstedt M, Franz L E, Mathiesen U L, et al. Long-Term Follow-up of Patients With NAFLD and Elevated Liver Enzymes. *Hepatology* 2006; 44: 865—873
- 29) Shimada M, Hashimoto E, Taniai M, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2002; 37: 154—160
- 30) Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, et al. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1396—1402
- 31) Anderson N, Borlak J. Molecular Mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 311—357

JSH Consensus Kobe 2009; Diagnosis and Treatment of NASH

Takeshi Okanoue¹⁾, Toshiji Saibara^{2)*}, Masafumi Ono²⁾,
Yoshio Sumida³⁾, Etsuko Hashimoto⁴⁾, Shinji Tamura⁵⁾,
Gotaro Yamada⁶⁾, Sumio Kawada⁷⁾, Masatoshi Kudo⁸⁾

Key words: oxidative stress insulin resistance metabolic syndrome liver cirrhosis
hepatocellular carcinoma

Kanzo 2009; 50: 741—747

-
- 1) Saiseikai Suita Hospital
2) Kochi University
3) Nara City Hospital
4) Tokyo Women's Medical School
5) Mino City Hospital
6) Kawasaki Hospital
7) Yamagata University
8) Kinki University

*Corresponding author: saibarat@kochi-u.ac.jp

Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus

Kohichiroh Yasui · Yuichi Harano · Hironori Mitsuyoshi · Kazuhiro Tsuji · Mio Endo · Tomoaki Nakajima · Masahito Minami · Yoshito Itoh · Yoh Zen · Yasuni Nakanuma · Toshikazu Yoshikawa · Takeshi Okanoue

Received: 27 June 2009 / Accepted: 20 August 2009 / Published online: 30 September 2009
© Springer 2009

Abstract

Purpose Steatosis is a histological finding associated with the progression of chronic hepatitis C. The aims of this study were to elucidate risk factors associated with steatosis and to evaluate the association between steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism.

Methods We analyzed 297 Japanese patients infected with hepatitis C virus and a subgroup of 100 patients who lack metabolic factors for steatosis. We determined intra-hepatic mRNA levels of 18 genes regulating lipid metabolism in these 100 patients using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Levels of peroxisome proliferator-activated receptor α and sterol regulatory element-binding protein 1 proteins were assessed by immunohistochemistry.

Results Steatosis was present in 171 (57%) of 297 patients. The presence of steatosis was independently associated with a higher body mass index, higher levels of γ -glutamyl transpeptidase and triglyceride, and a higher fibrosis stage. Steatosis was present in 43 (43%) of 100 patients lacking metabolic factors. Levels of mRNA and protein of peroxisome proliferator-activated receptor α , which regulates β -oxidation of fatty acid, were lower in patients with steatosis than in patients without steatosis.

Conclusions These findings indicate that impaired degradation of lipid may contribute to the development of hepatitis C virus-related steatosis.

Keywords Steatosis · Hepatitis C virus · Fibrosis · Gene expression · Peroxisome proliferator-activated receptor α

K. Yasui (✉) · Y. Harano · H. Mitsuyoshi · K. Tsuji · M. Endo · T. Nakajima · M. Minami · Y. Itoh · T. Yoshikawa · T. Okanoue
Department of Molecular Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan
e-mail: yasui@koto.kpu-m.ac.jp

Y. Zen
Institute of Liver Studies, King's College Hospital, London, UK

Y. Nakanuma
Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8640, Japan

T. Okanoue
Center of Gastroenterology and Hepatology, Saiseikai Suita Hospital, 1-2 Kawazono-cho, Suita 564-0013, Japan

Introduction

The prevalence of hepatic steatosis ranges from 40 to 86% (mean \sim 55%) in patients infected with hepatitis C virus (HCV) [1]. This range is higher than in the general population of adults in the Western world (20–30%) [2]. Steatosis appears to be associated with a more rapid progression of liver fibrosis and a lower response to interferon- α -based therapy [3–5].

Patients with HCV infection may have metabolic cofactors, such as obesity, diabetes, and alcohol abuse that contribute to the development of fatty liver. It is likely that two types of steatosis, viral and metabolic, coexist in patients with chronic hepatitis C [1, 3]. Known risk factors associated with steatosis include HCV genotype 3, a higher body mass index (BMI), diabetes, hyperlipidemia, ongoing alcohol abuse, older age, the presence of fibrosis, and

hepatic inflammation [1, 5]. However, different populations may have different risk factors for steatosis, and the distribution of HCV genotype differs from region to region. For example, HCV genotype 3, which is thought to be directly responsible for steatosis [6–8], is far less frequent in Japan than in Europe [7] or the United States [9].

Although the mechanisms of HCV-related steatosis are not well known, several viral and host factors appear to be involved [3]. *In vitro* studies [10] and a transgenic mouse models [11] have shown that HCV core protein can induce steatosis. HCV core protein, in turn, inhibits the activity of microsomal triglyceride transfer protein, which is essential for the assembly and secretion of very low density lipoproteins [12]. The intrahepatic levels of microsomal triglyceride transfer protein mRNA show an inverse correlation with the degree of steatosis in patients with chronic hepatitis C [13]. HCV infection and HCV core protein up-regulates the expression of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), a key transcriptional factor that activates the expression of genes involved in lipid synthesis [14, 15]. In addition, HCV core protein binds to retinoid X receptor α , a transcriptional regulator that controls many cellular functions including lipid metabolism [16]. HCV core protein also down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) [17, 18], and the mRNA levels of PPAR α and CPT1 are found to be reduced in patients with chronic HCV infection [19].

In the present study, we investigated the risk factors associated with steatosis in Japanese patients with chronic HCV infection. To elucidate the molecular mechanisms underlying HCV-related (i.e., viral) steatosis, we also systematically measured the intrahepatic expression levels of genes that regulate lipid degradation, secretion, synthesis, and uptake in patients who lack metabolic factors for steatosis.

Methods

Patients

The study included a total of 297 Japanese patients with chronic HCV infection who underwent liver biopsy between April 2004 and June 2006 at the Hospital of Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan. To eliminate selection biases, the patients were recruited consecutively. Inclusion criteria were as follows: patients older than 18 years, positive for anti-HCV (third-generation enzyme immunoassay; Chiron, Emeryville, CA), and positive for serum HCV-RNA (Amplicor HCV assay; Roche Diagnostic Systems, Tokyo, Japan). Exclusion criteria were as follows: positive for hepatitis B virus surface

antigen (radioimmunoassay; Dainabot, Tokyo, Japan); other types of liver diseases, including primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, alcoholic liver disease, Wilson's disease, or hemochromatosis; coinfection with human immunodeficiency virus; treated with antiviral or immunosuppressive agents within 6 months of enrollment; treated with drugs known to produce hepatic steatosis, including corticosteroids, high dose estrogen, methotrexate, or amiodarone within 6 months of enrollment; a history of gastrointestinal bypass surgery.

BMI was calculated using the following formula: weight in kilograms/(height in meters)². Obesity was defined as a BMI ≥ 25 , according to the criteria of the Japan Society for the Study of Obesity [20]. Diabetes was defined as a fasting glucose level ≥ 126 mg/dl or by the use of insulin or oral hypoglycemic agents to control blood glucose. The ongoing alcohol intake per week recorded and converted to average grams per day. Significant alcohol intake was defined as consumption of >20 g/day.

The Ethics Committee of the Kyoto Prefectural University of Medicine approved this study. Informed consent was obtained from each patient in accordance with the Helsinki declaration.

Laboratory tests

Venous blood samples were taken in the morning after a 12-h overnight fast. The laboratory evaluation included a blood cell count and the measurement of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), total cholesterol, triglyceride, and fasting plasma glucose. These parameters were measured using the standard clinical chemistry techniques. The HCV genotype was determined according to the classification of Simmonds et al. [21]. The serum HCV-RNA level was quantified by Amplicor HCV monitor assay (version 2.0; Roche). These clinical and laboratory data were collected at the time of liver biopsy.

Histopathological examination

Liver biopsy specimens were obtained percutaneously from all patients for diagnostic purposes and divided into two parts. One part was fixed in formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, and silver impregnation. The sections were analyzed by an experienced hepatologist (T.O.) who was blinded to the laboratory parameters and clinical data. The degrees of inflammation and fibrosis were evaluated according to the criteria proposed by Desmet et al. [22]. Steatosis was graded based on percent of hepatocytes in the biopsy involved: none (0%), mild ($<33\%$), moderate (33–66%), or severe ($>66\%$) [23, 24]. The other part of the liver

biopsy was frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C for mRNA analysis.

Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

We quantified mRNA by real-time fluorescence detection. Total RNA was obtained using an RNeasy Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). Residual genomic DNA was removed and single-stranded complementary DNA was generated using a Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s protocol. Real-time quantitative RT-PCR experiments were performed with the LightCycler system using Faststart DNA Master Plus SYBR Green I (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) according to the manufacturer’s protocol. The 18 genes chosen for the current study, their protein products, and the primer sequences for amplifying them are listed in Table 1. The primers were designed using Primer3 version 0.4 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) on the basis of sequence data obtained from the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *ACTB* (β -actin gene) was used as an endogenous control.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for PPAR α and SREBP1 was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections from 100 liver biopsy specimens using rabbit polyclonal antibodies against human PPAR α (clone H-98; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and SREBP1 (clone K-10; Santa Cruz Biotechnology), respectively. Deparaffinized sections were microwaved in a citrate buffer (pH 6.0) for 20 min. After blocking the endogenous peroxidase, the sections were incubated for 90 min at room temperature with 1:100 anti-PPAR α or anti-SREBP1 antibodies. The sections were then incubated for 30 min at room temperature with peroxidase-labeled polymer-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Histofine Simple Stain Max-Po (Multi); Nichirei, Tokyo, Japan), followed by 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. The sections were then lightly counterstained with hematoxylin. Negative controls were evaluated by substituting the primary antibody with nonimmunized rabbit serum. Immunoreactivity was scored according to the intensity of staining as follows: 1+, weak or absent; 2+, moderate; 3+, strong.

Table 1 Genes and primer sequences used for reverse transcription-polymerase chain reaction assays

Function/gene symbol	Alternate symbol	Protein product	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Nuclear receptor				
<i>PPARA</i>	PPAR α	Peroxisome proliferator-activative receptor α	ggaaagcccactctgcccct	agtcaccgaggagggtcga
<i>PPARG</i>	PPAR γ	Peroxisome proliferator-activative receptor γ	cattctggcccaccaacttgg	tggagatgcaggctccacttg
<i>NR1H3</i>	LXR α	Liver X receptor α	cgggcttccactacaatgtt	tcaggcggatctgttcttct
<i>RXRA</i>	RXR α	Retinoid X receptor α	tccttctcccaccgctccatc	cagctccgtctgtccatctg
Fatty acid oxidation				
<i>CPT1A</i>	CPT1	Carnitine palmitoyltransferase 1	catcatcactggcgtgtacc	tggcgtacatcgtgtgat
<i>ACADS</i>	SCAD	Short chain acyl-CoA dehydrogenase	ctcacgttggggaagaaga	tgcacagtcctcaaagatg
<i>ACADM</i>	MCAD	Medium chain acyl-CoA dehydrogenase	ttgagttcaccgaacagcag	agggggactggatattcacc
<i>ACADL</i>	LCAD	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase	ttggcaaaacagttgctcac	ctcccacatgatccccaac
<i>ACADVL</i>	VLCAD	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase	agccgtgaaggagaagatca	tgtgtttgaagccttgatgc
<i>EHHADH</i>	LBP	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	cttcagccctggatgttgat	aaaagaagtgggtgccaatg
<i>HADHA</i>	LCHAD	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, alpha subunit	cacctctctgcctgttctct	ggcaaaagatgctgacacaga
<i>ACOX1</i>	AOX	Acyl-CoA oxidase	tgatgcgaatgagtttctgc	agtgccacagctgagaggtt
<i>CYP2E1</i>	CYP2E	Cytochrome P450 CYP2E	cccaaaggatategacctca	agggtgtctccacacactc
Intake of fatty acid				
<i>SLC27A5</i>	FATP5	Fatty acid transporor protein 5	acacactcgggtgccctttc	ctacagggccactgtcatt
Transfer of triglyceride				
<i>MTP</i>	MTP	Microsomal triglyceride transfer protein	catctggcgaccctatcagt	ggccagctttcacaagag
Biosynthesis of fatty acid				
<i>SREBF1</i>	SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein 1	tgcatttttgacacgettc	ccaagctgtacaggtctcc
<i>ACACA</i>	ACC	Acetyl CoA carboxylase	gagaactgcccttctgcac	ccaagctccaggtctcatg
<i>FASN</i>	FAS	Fatty acid synthase	ttccgagattccatcctacg	tgtcatcaaaggtgctctcg

Table 2 Patient characteristics

Characteristic	
<i>n</i>	297
Age ^a	58 (20–78)
Male gender (%)	131 (44.9%)
BMI ^a	22.7 (15.6–35.1)
Obesity (%)	76 (25.6%)
Alcohol intake (%)	67 (22.6%)
Diabetes (%)	9 (3.0%)
HCV genotype (%)	
1	212 (71.4%)
2	76 (25.6%)
3	2 (0.7%)
Unknown	7 (2.3%)
HCV-RNA level (KIU/ml) ^a	1100 (5–9400)
Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{L}$) ^a	17.6 (5.3–37.4)
AST (IU/L) ^a	47 (14–413)
ALT (IU/L) ^a	59 (9–537)
γ -GTP (IU/L) ^a	39 (10–490)
Fasting glucose (mg/dL) ^a	96 (68–223)
Total cholesterol (mg/dL) ^a	173 (19–318)
Triglyceride (mg/dL) ^a	91 (26–930)
Histological activity (%)	
0	3 (1.0%)
1	127 (42.8%)
2	120 (40.4%)
3	47 (15.8%)
Fibrosis (%)	
0	4 (1.3%)
1	100 (33.7%)
2	120 (40.4%)
3	62 (20.9%)
4	11 (3.7%)
Steatosis (%)	
None	126 (42.4%)
Mild (<33%)	163 (54.9%)
Moderate (33–66%)	7 (2.4%)
Severe (>66%)	1 (0.3%)

^a Median (range)

Statistical analysis

Results are presented as numbers with percentages in parenthesis for qualitative data or as the medians and ranges for quantitative data. Univariate comparisons were made using a chi-square test for qualitative factors or a Mann–Whitney *U* test on ranks for quantitative factors with non-equal variance. Logistic regression analysis was used for multivariate analysis. *P* values below 0.05 by two-sided test were considered to be significant. Variables that achieved statistical significance on univariate analysis were

Table 3 Univariate analysis of factors associated with steatosis

Factors	No steatosis (<i>n</i> = 126)	Steatosis (<i>n</i> = 171)	<i>P</i>
Age ^a	56 (20–78)	59 (27–75)	0.019
Male gender (%)	44 (34.9%)	87 (50.9%)	0.007
BMI ^a	21.8 (16.5–30.7)	23.9 (15.6–35.1)	<0.0001
Alcohol intake (%)	29 (23.0%)	38 (22.2%)	0.89
Diabetes (%)	4 (3.2%)	5 (2.9%)	1.00
HCV genotype (%)			
1	91 (72.2%)	121 (70.8%)	
2	31 (24.6%)	45 (26.3%)	
3	1 (0.8%)	1 (0.9%)	
Unknown	3 (2.4%)	4 (2.4%)	0.78
HCV-RNA level (KIU/ml) ^a	1257 (5–7030)	1063 (5–9400)	0.14
Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{L}$) ^a	18.4 (5.9–32.7)	17.4 (5.3–37.4)	0.19
AST (IU/L) ^a	36 (15–413)	58 (14–339)	<0.0001
ALT (IU/L) ^a	40 (9–537)	73 (12–509)	<0.0001
γ -GTP (IU/L) ^a	25 (10–298)	56 (12–490)	<0.0001
Fasting glucose (mg/dL) ^a	95 (68–207)	97 (77–223)	0.002
Total cholesterol (mg/dL) ^a	179 (109–285)	171 (104–318)	0.13
Triglyceride (mg/dL) ^a	83 (26–214)	96 (32–930)	<0.0001
Histological activity (%)			
0	2 (1.6%)	1 (0.6%)	
1	72 (57.1%)	55 (32.2%)	
2	42 (33.3%)	78 (45.6%)	
3	10 (7.9%)	37 (21.6%)	<0.0001
Fibrosis (%)			
0	3 (2.4%)	1 (0.6%)	
1	62 (49.2%)	38 (22.2%)	
2	47 (37.3%)	73 (42.7%)	
3	11 (8.7%)	51 (29.8%)	
4	3 (2.4%)	8 (4.7%)	0.001

^a Median (range)

entered into multiple logistic regression analysis to identify significant independent factors for steatosis. All statistical analyses were performed using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The characteristics of the 297 patients are summarized in Table 2. Steatosis was present in 171 (57.6%) patients. The grade of steatosis was mild in 163 (54.9%) patients, moderate in 7 (2.4%), and severe in 1 (0.3%).

Table 4 Multivariate analysis of factors independently associated with steatosis

Factors	Odds ratio	95% confidence interval	P
Age	1.02	1.00–1.05	0.05
Male gender	0.99	0.51–1.93	0.99
BMI	1.19	1.06–1.33	0.002
AST	1.00	0.98–1.02	0.54
ALT	0.99	0.98–1.00	0.37
γ-GTP	1.01	1.00–1.01	0.005
Fasting glucose	0.99	0.97–1.01	0.37
Triglyceride	1.01	1.00–1.01	0.007
Activity grade A2 or A3	1.81	0.94–3.51	0.07
Fibrosis stage F3 or F4	2.59	1.11–6.02	0.02

Data are from a total of 297 patients

Univariate correlations between variables and steatosis are shown in Table 3. Patients with steatosis, as compared to patients without steatosis, were older, more often male, had a higher BMI, higher AST, ALT, γ-GTP, fasting glucose, and triglyceride levels, a higher histological activity grade, and a higher fibrosis stage. Multivariate analysis revealed that the BMI, levels of γ-GTP and triglyceride, and fibrosis stage correlated independently with the presence of steatosis (Table 4).

To determine whether HCV has a direct effect on steatosis, we next analyzed a subgroup of patients lacking known metabolic causes of steatosis. Patients with obesity, diabetes, or ongoing alcohol intake were excluded. From the remaining 173 patients, we selected 100 patients whose liver RNA was available for gene expression analyses. There was no difference in clinicopathological characteristics between these 100 patients and the remaining 73 patients whose liver RNA was not available (data not shown). Steatosis was present in 43 (43%) of these 100 patients (Table 5). The presence of steatosis was associated with higher levels of AST, ALT, and γ-GTP, higher fasting glucose levels, and a higher fibrosis stage (Table 5).

To investigate the molecular mechanisms underlying HCV-related steatosis, we examined the expression of 18 genes regulating lipid metabolism in the liver (Table 1) using liver tissues derived from the 100 patients without obesity, diabetes, or ongoing alcohol intake. Real-time quantitative RT-PCR revealed that the expression of 10 genes (*PPARA*, *NRIH3*, *ACADS*, *ACADL*, *EHHADH*, *HADHA*, *ACOX1*, *CYP2E1*, *SLC27A5*, and *ACACA*) were significantly lower in patients with steatosis than in patients without steatosis (Fig. 1). There was no difference in the expression of the other 8 genes, including *SREBF1*, between the two groups.

To determine whether the protein levels corresponded with the mRNA levels, we performed immunohistochemistry

Table 5 Univariate analysis of factors associated with steatosis in patients without obesity, diabetes, or alcohol intake

Factors	No steatosis (n = 57)	Steatosis (n = 43)	P
Age ^a	56 (30–77)	60 (27–73)	0.12
Male gender (%)	15 (26.3%)	12 (27.9%)	0.86
BMI ^a	21.4 (17.0–24.8)	22.0 (17.8–24.9)	0.34
HCV genotype (%)			
1	39 (68.4%)	30 (69.8%)	
2	18 (31.6%)	13 (30.2%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	
Unknown	0 (0%)	0 (0%)	0.89
HCV-RNA level (KIU/mL) ^a	1510 (5–7030)	1110 (5–5100)	0.60
Platelet count (× 10 ⁴ /μL) ^a	19.8 (9.8–31.1)	17.3 (5.9–32.7)	0.06
AST (IU/L) ^a	31 (15–138)	61 (15–131)	<0.0001
ALT (IU/L) ^a	32 (12–175)	73 (14–290)	<0.0001
γ-GTP (IU/L) ^a	22 (10–137)	47 (12–151)	<0.0001
Fasting glucose (mg/dL) ^a	95 (75–112)	99 (79–121)	0.029
Total cholesterol (mg/dL) ^a	180 (120–281)	171 (119–300)	0.76
Triglyceride (mg/dL) ^a	86 (26–209)	88 (44–178)	0.23
Histological activity (%)			
0	1 (1.7%)	1 (2.3%)	
1	33 (58.0%)	14 (32.6%)	
2	19 (33.3%)	20 (46.5%)	
3	4 (7.0%)	8 (18.6%)	0.06
Fibrosis (%)			
0	1 (1.8%)	1 (2.3%)	
1	30 (52.6%)	10 (23.3%)	
2	20 (35.1%)	18 (41.9%)	
3	6 (10.5%)	13 (30.2%)	
4	0 (0%)	1 (2.3%)	0.018

^a Median (range)

for PPARα (encoded by *PPARA*) and SREBP1 (*SREBF1*) proteins in liver biopsy tissues from the same 100 patients. We chose these two proteins because they are key regulators of lipid degradation and lipid synthesis, respectively. The results are summarized in Table 6, and representative images are shown in Fig. 2a. PPARα was expressed in hepatocytes. Its expression was mainly observed in the nuclei. SREBP1 was expressed in the cytoplasm of hepatocytes. Levels of PPARα and SREBP1 proteins tended to correlate with levels of *PPARA* and *SREBF1* mRNA, respectively (Fig. 2b). As shown in Table 6, the expression of the PPARα protein was significantly lower in patients with steatosis than in patients without steatosis