

図5 Changes of Blood Ammonia Concentrations and Results of Number Connection Test Before and After Infusion of Argimate®

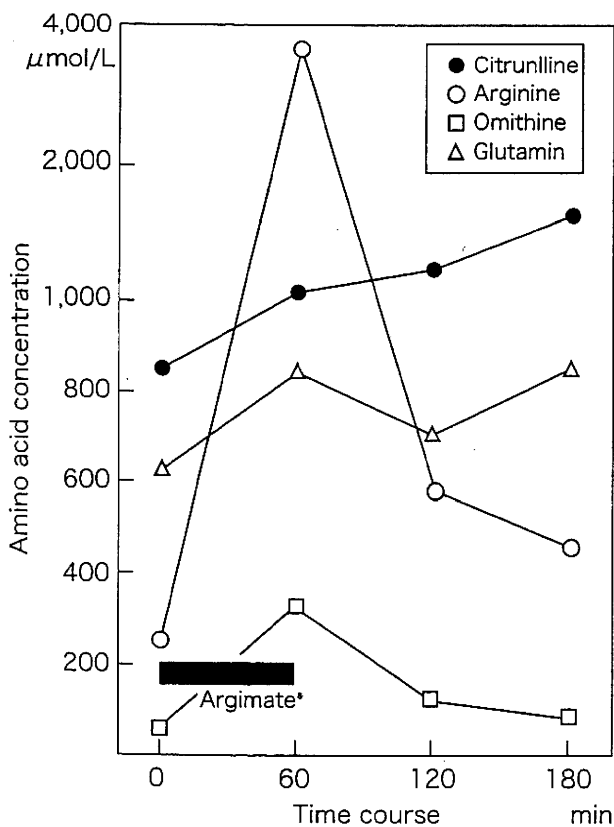


図6 Changes of Plasma Amino Acids Before and After Infusion of Argimate®

可能性もあり推奨されない²¹⁾。

症例(29歳, 男性)は成人型(II型)高シトルリン血症による肝性脳症例であるが, アルギメート®投与による精神神経症状(ナンバーコネクションテスト)および血中アミノ酸動態を詳細に観察したこともありここに提示する。なお, 成人型高シトルリン血症は, シトルリン欠損のためアルギノコハク酸合成酵素の活性が二次的に低下し, 高シトルリン血症と高アンモニア血症をきたす疾患であり, 現在は治療法として低蛋白食および脳浮腫対策としてのグリセロールは禁忌とされ, 肝移植を前提とした治療を行うことが提唱されている²²⁾。症例を経験した当時(平成2年)はいまだその責任遺伝子²³⁾の同定過程途上であり, 確立した治療法はなく(唯一の根治的な治療法は肝移植), 肝性脳症としての基本的な治療法である低蛋白食の食事療法, 合成二糖類の投与などと共にアルギニン高含有特殊組成ミルクの併用を行った例である。本例では, 末梢静脈血中の血液アンモニア濃度は早朝空腹時に低く, 夕方より夜間にかけて上昇する

という日内変動を示していた²⁴⁾。アルギメート®の投与による血液アンモニア濃度およびナンバーコネクションテストの経時的な推移を図5に示す。アルギメート®200 mlを60分かけて点滴静注すると点滴終了時には著明な血液アンモニア濃度の低下が観察されたが、その効果は一過性であった。しかし、ナンバーコネクションテストによる完遂時間は180分まで改善が認められた。同時に観察した血中アミノ酸濃度ことに尿素サイクルに関連するアミノ酸およびグルタミンの経時的な推移をみると、オルニチン、シトルリンとともにグルタミンの増加も同時に観察され、アンモニアを一時的にグルタミンとしてトラップし緩衝作用として効果を発揮しているもの考えられた。しかし、シトルリンは持続的に増加しており、アミノ酸インバランスの助長をきたす可能性が示された(図6)。

前述したように肝硬変による高アンモニア血症、とくに門脈大循環短絡路の形成によるシャント型で本製剤は有効と考えているが、脳症改善効果ならびに血液アンモニア濃度の改善効果などについてBCAA高含有輸液製剤との比較試験が行われていないため再検討が必要と考えている。

4 おわりに

アルギメート®の開発からこれまでの経緯とその薬効、同薬剤の高アンモニア血症治療における位置づけについて概説した。欧米ではL-ornithine L-aspartate (Hepa-Merz)^{25~27)}が高アンモニア血症の治療薬として使用されているが、最近、急性肝不全における新たなアミノ酸製剤としてのL-ornithine phenylacetate (OPA)が精力的に検討されており^{28,29)}、臨床的トライアルも行われつつある³⁰⁾。今後、わが国でもアンモニア代謝異常

の是正を機軸とした新たなアミノ酸療法の開発なども検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Prakash R and Mullen KD : Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Gastroentrol Hepatol* doi:10:1038/nrgastro 116, 2010
- 2) 鈴木一幸：肝性脳症. 肝臓病学Clinical science (戸田剛太郎, 他編). 医学書院, 1998, pp108-113
- 3) 森脇久隆：肝性脳症の治療体系. *日消誌* 104 : 352-356, 2007
- 4) 作野 忠, 橋本昌平, 高月 清, 他：肝性昏睡におけるグルタミン酸アルギニンの使用経験. *内科宝函* 6 : 794-797, 1959
- 5) Suzuki K, Kato A, Iwai M : Branched-chain amino acid treatment in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 30S : S25-29, 2004
- 6) 鈴木一幸：肝性脳症治療のupdate. *日消誌* 107 : 14-21, 2010
- 7) 渡辺明治：臨床アンモニア代謝学. 医科アンモニア学 (渡辺明治, 佐伯武頼編), メディカルレビュー社, 東京, 1995, pp92-102
- 8) Muto Y, Sato S, Watanabe A et al : Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3 : 705-713, 2005
- 9) Najarian JS, Harper HA : A clinical study of the effect of arginine on blood ammonia. *Am J Med Sic* 21 : 832-842, 1956
- 10) Pearl DC, McDermott WV : A vulnerable and rate-limiting step in urea synthesis in patients with hyperammoniaemia. *Proc Soc Exptl Med* 97 : 440-443, 1958
- 11) 阿部達夫, 本間光夫：グルタミン酸アルギニンを使用した肝性昏睡の1例. *新薬と臨床* 9 : 469-472, 1960
- 12) 吉葉昌彦, 大石孟男, 小島昭三, 他：外科領域におけるグルタミン酸アルギニンの使用経験. *臨床外科* 15 : 1031-1034, 1960
- 13) 玉尾博康：肝性昏睡に対するアルギニングルタメートの使用経験. *新薬と臨床* 9 : 699-703, 1960
- 14) 木谷威男, 吉田秀雄：肝性昏睡. *総合臨床* 8 : 365-375, 1959
- 15) 佐藤俊一：慢性肝不全. *臨床肝臓病学* (岡 博, 杉浦光男編), 朝倉書店, 東京, 1989, pp180-

Indirect Calorimetry and Anthropometry to Estimate Energy Metabolism in Patients with Liver Cirrhosis

Yoichi TERAOKA¹, Makoto SHIRAKI^{1,*}, Kayoko NISHIMURA², Junpei IWASA¹,
Masahito NAGAKI¹ and Hisataka MORIWAKI¹

¹The First Department of Internal Medicine, Gifu University School of Medicine,
1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan

²Center of Nutrition Support and Infection Control, Gifu University Hospital,
1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan

(Received March 10, 2010)

Summary Energy malnutrition worsens survival in patients with liver cirrhosis, and is currently defined as non-protein respiratory quotient (npRQ) <0.85, as measured by indirect calorimetry. However, measurement of this npRQ is limited because of the high cost of indirect calorimetry. Therefore, we sought an alternative marker that can be used in the routine clinical setting. Forty-four inpatients with cirrhosis were recruited in this study. The last meal was served at 18:00 h on the previous day, and indirect calorimetry was performed between 07:00 and 09:00 h while the patients were still in bed. Fasting blood samples were collected in the early morning on the day of the test. Anthropometry was performed by an expert dietician. The correlations among npRQ, Child-Pugh score of disease severity, laboratory parameters, %AC (arm circumference), %TSF (triceps skinfold thickness), and %AMC (arm muscle circumference) were studied using simple linear regression analysis. ROC (Receiver operating characteristic) analysis was used to identify the cut-off values that would best predict npRQ=0.85. npRQ correlated significantly with %AC ($r^2=0.204$, $p=0.0021$) and %AMC ($r^2=0.178$, $p=0.0043$) but not with %TSF. npRQ was not significantly correlated with other laboratory or anthropometric measurements. The cut-off value for %AC that showed the largest AUC (area under the curve) by ROC analysis was 95, while that for %AMC was 92. Multiple regression analysis yielded an equation: $\text{npRQ}=0.0019 \times (\%AC) - 0.0134 \times (\text{Child-Pugh score}) + 0.7791$. Patient stratification by %AC=95 or by regression equation-based npRQ=0.85, but not by %AMC=92, produced significant difference in survival curves. %AC and regression equation could represent npRQ to some extent as parameters of energy nutrition in cirrhosis.

Key Words indirect calorimetry, protein-energy malnutrition, non-protein respiratory quotient, arm circumference, arm muscle circumference

Protein-energy malnutrition (PEM) is common in patients with liver cirrhosis (1, 2), and leads to poor prognosis in this cohort (3–5). Indirect calorimetry is an established method to diagnose energy malnutrition (6) as it gives substrate oxidation rates and non-protein respiratory quotient (npRQ) as useful markers to estimate energy metabolism. In particular, npRQ<0.85, obtained in patients with liver cirrhosis after overnight bed-rest and fasting, predicted significantly lower survival than in patients with higher scores (5). Such patients with energy malnutrition are good candidates to receive nutrition support as recommended in US, European, and Japanese guidelines (7–9). However, measurement of npRQ is limited in daily practice because of the high cost of indirect calorimetry. Thus, it is important to find an alternative marker to npRQ that can be used in the routine clinical setting. We conducted the present study to investigate which anthropo-

metric or biochemical parameters could best represent npRQ in cirrhosis.

PATIENTS AND METHODS

Patients. Forty-four inpatients with cirrhosis were enrolled in this study. Cirrhosis was diagnosed from clinical and laboratory profiles and by histologic examination of liver biopsy specimens. The clinical and biochemical characteristics of the subjects are shown in Table 1. The etiology of cirrhosis was hepatitis B virus in one patient, hepatitis C virus in 33, alcohol in six, and others in four. The Child-Pugh classification (10) was used to assess the severity of cirrhosis: 16 patients were grade A, 19 were grade B, and 9 were grade C. Patients receiving treatment with interferon or antivirals and patients fasting for over a day within 2 wk before calorimetry were excluded.

Indirect calorimetry. Indirect calorimetry was performed using a Deltatrac Metabolic Monitor (Datax Division Inst. Corp., Helsinki, Finland) in a similar manner to that explained in our previous report (11). Before

*To whom correspondence should be addressed.
E-mail: mshiraki-gil@umin.ac.jp

Table 1. Clinical and biochemical profiles of patients with liver cirrhosis.¹

	Cirrhosis (n=44)	Child A (n=16)	Child B (n=19)	Child C (n=9)	p ²
Age (y)	66 (38-83)	63 (56-77)	69 (52-83)	64 (38-82)	0.1117
Gender (M/F)	28/16	10/6	12/7	6/3	0.9774
Height (cm)	159 (143-173)	161 (145-170)	158 (143-172)	159 (144-173)	0.4457
Weight (kg)	59 (39-87)	62 (48-74)	56 (39-67)	61 (47-87)	0.1784
Body mass index (kg/m ²)	23.4 (16.0-30.5)	23.9 (19.7-29.1)	22.7 (16.0-27.4)	24.0 (18.4-30.5)	0.4464
Etiology (HBV/HCV/alcohol/others)	1/33/6/4	0/13/2/1	1/14/2/2	0/6/2/1	0.7450
Hepatocellular carcinoma (+/-)	27/17	13/3	12/7	2/7	0.0142
Supplementation with branched-chain amino acid (+/-)	16/28	5/11	4/15	7/2	0.0176
Non-protein respiratory quotient	0.87 (0.70-0.99)	0.90 (0.84-0.97)	0.87 (0.77-0.99)	0.81 (0.70-0.94)	0.0092
Resting energy expenditure (kcal/d)	1,218 (910-2,103)	1,274 (930-1,664)	1,132 (918-1,660)	1,297 (910-2,103)	0.1431
Basal metabolic rate (kcal/d)	1,238 (875-1,762)	1,306 (1,073-1,540)	1,164 (875-1,378)	1,276 (990-1,762)	0.0337
Albumin (g/dL)	3.1 (2.0-4.4)	3.3 (2.4-4.4)	3.0 (2.5-3.5)	2.6 (2.0-3.4)	0.0005
Total bilirubin (mg/dL)	1.6 (0.4-6.6)	1.3 (0.7-3.4)	1.3 (0.4-2.5)	2.9 (0.6-6.6)	0.0002
Alanine aminotransferase (IU/L)	62 (8-449)	77 (22-248)	39 (11-106)	85 (8-449)	0.1708
Prothrombin time (%)	70 (37-100)	77 (46-100)	69 (50-94)	60 (37-76)	0.0095
Free fatty acid (μEq/L)	661 (200-1,291)	532 (200-1,072)	649 (329-990)	848 (524-1,291)	0.0377
Branched-chain amino acid and tyrosine ratio	3.13 (0.88-6.34)	3.57 (1.98-6.34)	3.15 (1.97-4.91)	2.47 (0.88-4.96)	0.2266
%Arm circumference	99.7 (72.5-125.1)	107.2 (93.3-125.1)	96.0 (72.5-114.9)	94.1 (76.3-106.9)	0.0055
%Triceps skinfold thickness	101.0 (33.3-185.7)	119.9 (55.6-185.7)	95.6 (46-140)	78.5 (33.3-168.4)	0.0214
%Arm muscle circumference	100.3 (71.6-119.5)	104.2 (87.2-118.2)	97.8 (71.6-119.5)	98.7 (78.3-110.7)	0.2224

¹Data are presented as number of patients or median (range).²Compared among Child's grade A, grade B, and grade C by one-way ANOVA or, for gender, etiology, hepatocellular carcinoma, and supplementation with branched-chain amino acid, by contingency table analysis.

Table 2. Correlation coefficients among non-protein respiratory quotient and other variables.¹

	Non-protein respiratory quotient	Child-Pugh score	%Arm circumference
Child-Pugh score	0.201 (0.0023)		
%Arm circumference	0.204 (0.0021)	0.121 (0.0205)	
%Arm muscle circumference	0.178 (0.0043)	0.041 (0.1873)	0.703 (<0.0001)

¹Data are presented as r^2 (p -value).

calorimetry, all subjects ate a full standard hospital diet of habitual Japanese dietary composition providing a total energy intake of 33 kcal/kg/d. Energy composition was 14% protein (1.3 g/kg/d), 20% fat (0.6 g/kg/d), and 66% carbohydrate (6.4 g/kg/d). Three meals were served at 08:00, 12:00, and 18:00 h. The subjects' compliance with the diet was confirmed by the ward dietician. Written informed consent was obtained from all patients before participation in this study.

Parameters measured by indirect calorimetry were oxygen consumption per minute (VO_2) and carbon dioxide production per minute (VCO_2). Total urinary excretion of nitrogen (UN) was measured as described previously (5). Resting energy expenditure (REE), npRQ, and substrate oxidation rates of carbohydrate (%CHO), fat (%FAT), and protein (%PRO) were then estimated using the following equations (11, 12).

$$\begin{aligned} \text{REE (kcal/d)} &= 5.50\text{VO}_2 + 1.76\text{VCO}_2 - 1.99\text{UN} \\ \text{npRQ} &= (1.44\text{VCO}_2 - 4.890\text{UN}) / (1.44\text{VO}_2 - 6.04\text{UN}) \\ \text{CHO (g/24 h)} &= 5.926\text{VO}_2 + 4.189\text{VCO}_2 - 2.539\text{UN} \\ \text{FAT (g/24 h)} &= 2.432\text{VO}_2 + 2.432\text{VCO}_2 - 1.943\text{UN} \\ \text{PRO (g/24 h)} &= 6.250\text{UN} \\ \% \text{CHO} &= 4.18\text{CHO} / \text{REE} \times 100 \\ \% \text{FAT} &= 9.46\text{FAT} / \text{REE} \times 100 \\ \% \text{PRO} &= 4.32\text{PRO} / \text{REE} \times 100 \end{aligned}$$

Measurements were performed between 07:00 and 09:00 h while the patients were still in bed. The last meal was served at 18:00 h on the previous day. Basal metabolic rate (BMR) was calculated by the formula of Harris and Benedict (13).

Anthropometry. We measured height and body weight, and calculated body mass index (BMI). Anthropometry including measurements of arm circumference (AC) and triceps skinfold thickness (TSF), and estimated arm muscular circumference (AMC) was carried out using standard American Society for Parenteral and Enteral Nutrition procedures by an expert dietician. AC, TSF, and AMC were expressed as percentages of normal values according to Japanese anthropometry reference data (JARD) 2001 (14), which provides gender- and age-adjusted anthropometric values from a total of 5,492 healthy subjects (2,738 males and 2,754 females) ranging from 18 to 85 y old.

Biochemistry. Fasting blood samples were collected from antecubital veins in the early morning on the day of the test, and were analyzed for serum levels of total bilirubin, albumin, alanine aminotransferase, free fatty

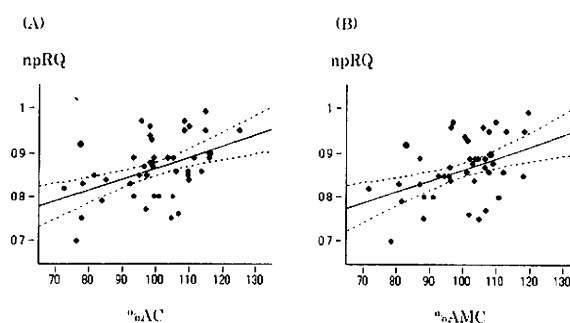


Fig. 1. Correlations between non-protein respiratory quotient (npRQ) and %arm circumference (%AC) ($r^2=0.204$, $p=0.0021$) or %arm muscle circumference (%AMC) ($r^2=0.178$, $p=0.0043$). Dotted lines indicate the 90% confidence range of the regression line.

acid, and branched-chain amino acid and tyrosine ratio (BTR). Prothrombin time was also assessed.

Statistical analyses. Values were expressed as median and range. Comparisons of measured values among Child-Pugh grade A, grade B, and grade C were performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Comparisons of gender, etiology, hepatocellular carcinoma, and supplementation with branched-chain amino acids (BCAA) among Child-Pugh grades were performed using contingency table analysis. The correlations among npRQ, Child-Pugh score, laboratory parameters, %AC, %TSF, and %AMC were evaluated by Spearman's correlation coefficient. ROC (Receiver operating characteristic) analysis was used to identify the cut-off values that would best predict $\text{npRQ}=0.85$. Multiple regression analysis was also performed to draw equations to estimate npRQ. Survival curves were constructed by the Kaplan-Meier method, and the statistical difference between curves was evaluated by log-rank test. All analyses were performed using JMP 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and $p<0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

%AC and %TSF of patients with cirrhosis fell in parallel with increasing grade of disease severity as defined by the Child-Pugh classification ($p\leq 0.05$) (Table 1), suggesting the presence of PEM in these subjects. npRQ also correlated significantly with increasing Child-Pugh grade ($p<0.05$) (Table 1). In addition, free fatty acid

Table 3. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy to predict npRQ by patient stratification with %AC=95, %AMC=92, or regression equation-based npRQ=0.85.

	%AC=95	%AMC=92	Regression equation-based npRQ=0.85
Sensitivity	53.3% (35.0–65.4)*	53.3% (35.7–62.6)*	66.7% (46.5–82.2)*
Specificity	89.7% (80.2–95.9)*	93.1% (84.0–97.9)*	75.9% (65.4–83.9)*
Positive predictive value	72.7% (47.8–89.2)*	80.0% (53.5–94.0)*	58.8% (41.0–72.5)*
Negative predictive value	78.8% (70.5–84.3)*	79.4% (71.6–83.5)*	81.5% (70.3–90.1)*
Accuracy	77.3% (64.8–85.5)*	79.5% (67.5–85.9)*	72.7% (59.0–83.3)*

*95% confidence interval.

Table 4. Clinical and biochemical profiles of patients with %arm circumference below or above 95.¹

	%Arm circumference<95 (n=11)	%Arm circumference≥95 (n=33)	p ²
Age (y)	65 (52–76)	66 (38–83)	0.7361
Gender (M/F)	7/4	21/12	0.8681
Height (cm)	157 (143–172)	160 (143–173)	0.2297
Weight (kg)	52 (39–67)	62 (47–87)	0.0014
Body mass index (kg/m ²)	21.1 (16.0–25.2)	24.2 (18.4–30.5)	0.0041
Etiology (HBV/HCV/alcohol/other)	0/8/2/1	1/25/4/3	0.2201
Hepatocellular carcinoma (+/-)	5/6	22/11	0.1292
Child's classification score	8.3 (6–11)	7.7 (5–12)	0.3397
Non-protein respiratory quotient	0.82 (0.70–0.92)	0.88 (0.75–0.99)	0.0084
Resting energy expenditure (kcal/d)	1,084 (918–1,420)	1,262 (910–2,103)	0.0400
Basal metabolic rate (kcal/d)	1,123 (875–1,349)	1,277 (990–1,762)	0.0078
Albumin (g/dL)	2.9 (2.0–3.5)	3.1 (2.2–4.4)	0.4199
Total bilirubin (mg/dL)	1.3 (0.4–3.5)	1.8 (0.7–6.6)	0.3101
Alanine aminotransferase (IU/L)	34 (8–69)	71 (11–449)	0.1473
Prothrombin time (%)	73 (58–94)	69 (37–100)	0.4399
Free fatty acid (μEq/L)	698 (329–1,010)	649 (200–1,291)	0.6613
Branched-chain amino acid and tyrosine ratio	3.13 (1.09–4.96)	3.13 (0.88–6.34)	0.9912
%Arm circumference	82.9 (72.5–93.5)	105.3 (95.1–125.1)	<0.0001
%Triceps skinfold thickness	76.4 (33.3–110.0)	109.1 (33.3–185.7)	0.0125
%Arm muscle circumference	85.2 (71.6–96.4)	105.4 (91.2–119.5)	<0.0001

¹Data are presented as number of patients or median (range).²Compared between %AC<95 and %AC≥95 by one-way ANOVA or, for gender, etiology, and hepatocellular carcinoma, by contingency table analysis.

levels increased in parallel with increasing Child-Pugh grade (Table 1). BTR tended to be lower in advanced disease, but this correlation did not reach statistical significance.

Correlation coefficients among demographic, clinical, laboratory, anthropometric and calorimetric parameters were calculated, and those of significance with npRQ are presented in Table 2. npRQ correlated significantly with %AC ($r^2=0.204$, $p=0.0021$) and %AMC ($r^2=0.178$, $p=0.0043$) (Table 2, Fig. 1) but not with %TSE. npRQ did not correlate significantly with other measurements except Child-Pugh score (Table 2). The cut-off value of %AC for npRQ=0.85 that showed the largest area under the curve (AUC=0.74) was 95 by ROC analysis. The cut-off value of %AMC was 92 with AUC of 0.72. Multiple regression analysis yielded an equation:

$$\text{npRQ} = 0.0019 \times (\%AC) - 0.0134 \times (\text{Child-Pugh score}) + 0.7791 \quad (p \text{ overall} = 0.046)$$

Sensitivity, specificity, positive predictive value, nega-

tive predictive value, and accuracy to predict npRQ<0.85 by patient stratification with %AC=95, %AMC=92, or regression equation-based npRQ=0.85 are shown in Table 3. There was no significant difference in these statistical indices among 3 cut-off values (Table 3).

We then stratified the patients into subgroups with cut-off of %AC=95 (Table 4), %AMC=92 (Table 5), or regression equation-based npRQ=0.85 (Table 6), and compared their clinical and biochemical characteristics (Tables 4, 5 and 6) and also the survival outcome (Fig. 2).

Stratification by %AC or %AMC showed that patients with %AC<95 or %AMC<92 had significantly lower body weight and BMI than those with values above these thresholds, while height was similar between subgroups (Tables 4 and 5). Serum albumin level did not differ significantly between subgroups (Tables 4 and 5). Patient stratification by regression equation-based npRQ=0.85 showed that a larger number of patients

Table 5. Clinical and biochemical profiles of patients with %arm muscle circumference below or above 92.¹

	%Arm muscle circumference<92 (n=10)	%Arm muscle circumference≥92 (n=34)	p ²
Age (y)	65 (52–76)	66 (38–83)	0.7516
Gender (M/F)	8/2	20/14	0.2211
Height (cm)	159 (146–172)	159 (143–173)	0.9427
Weight (kg)	53 (39–67)	61 (47–87)	0.0228
Body mass index (kg/m ²)	21.0 (16.0–25.2)	24.1 (18.4–30.5)	0.0047
Etiology (HBV/HCV/alcohol/other)	0/8/2/0	1/25/4/4	0.8631
Hepatocellular carcinoma (+/-)	4/6	23/11	0.1199
Child's classification score	8.2 (6–11)	7.5 (5–12)	0.4568
Non-protein respiratory quotient	0.81 (0.70–0.92)	0.88 (0.75–0.99)	0.0040
Resting energy expenditure (kcal/d)	1,153 (918–1,660)	1,237 (910–2,103)	0.3575
Basal metabolic rate (kcal/d)	1,156 (875–1,378)	1,262 (990–1,762)	0.0831
Albumin (g/dL)	3.0 (2.0–3.5)	3.1 (2.2–4.4)	0.8476
Total bilirubin (mg/dL)	1.42 (0.4–3.5)	1.7 (0.6–6.6)	0.5272
Alanine aminotransferase (IU/L)	43 (17–106)	68 (8–449)	0.3397
Prothrombin time (%)	71 (58–83)	70 (37–100)	0.8468
Free fatty acid (μEq/L)	648 (329–1,010)	664 (200–1,291)	0.8907
Branched-chain amino acid and tyrosine ratio	3.05 (1.09–4.91)	3.15 (0.88–6.34)	0.8690
%Arm circumference	84.7 (72.5–101.2)	104.1 (81.7–125.1)	<0.0001
%triceps skinfold thickness	85.2 (46.0–137.5)	105.6 (33.3–185.7)	0.1404
%Arm muscle circumference	83.8 (71.6–91.2)	105.2 (92.6–119.5)	<0.0001

¹ Data are presented as number of patients or median (range).

² Compared between %AMC<92 and %AMC≥92 by one-way ANOVA or, for gender, etiology, and hepatocellular carcinoma, by contingency table analysis.

Table 6. Clinical and biochemical profiles of patients with regression equation-based nprQ below or above 0.85.¹

	Regression equation-based nprQ<0.85 (n=17)	Regression equation-based nprQ≥0.85 (n=27)	p ²
Age (y)	65 (38–82)	66 (56–83)	0.6693
Gender (M/F)	11/6	17/10	0.9068
Height (cm)	158 (143–173)	160 (145–170)	0.5840
Weight (kg)	57 (39–87)	61 (47–74)	0.1363
Body mass index (kg/m ²)	22.5 (16.0–30.5)	23.9 (19.7–29.1)	0.1561
Etiology (HBV/HCV/alcohol/other)	0/12/4/1	1/21/2/3	0.5411
Hepatocellular carcinoma (+/-)	6/11	21/6	0.0040
Child's classification score	9.4 (7–12)	6.9 (5–9)	<0.0001
Non-protein respiratory quotient (not calculated)	0.83 (0.70–0.96)	0.89 (0.77–0.99)	0.0082
Resting energy expenditure (kcal/d)	1,203 (910–2,103)	1,227 (918–1,664)	0.7691
Basal metabolic rate (kcal/d)	1,203 (910–1,762)	1,261 (996–1,540)	0.2751
Albumin (g/dL)	2.9 (2.0–3.5)	3.2 (2.4–4.4)	0.0287
Total bilirubin (mg/dL)	2.2 (0.6–6.6)	1.2 (0.4–3.4)	0.0037
Alanine aminotransferase (IU/L)	58 (8–449)	65 (22–248)	0.7758
Prothrombin time (%)	65 (37–94)	74 (46–100)	0.0465
Free fatty acid (μEq/L)	753 (329–1,291)	592 (200–1,072)	0.0936
Branched-chain amino acid and tyrosine ratio	2.74 (0.88–4.96)	3.43 (1.98–6.34)	0.1446
%Arm circumference	90.7 (72.5–106.9)	105.4 (92.4–125.1)	<0.0001
%Triceps skinfold thickness	81.3 (33.3–168.4)	113.3 (55.6–185.7)	0.0056
%Arm muscle circumference	95.0 (71.6–111.1)	103.7 (87.1–119.5)	0.0103

¹ Data are presented as number of patients or median (range).

² Compared between regression-based nprQ<0.85 and regression equation-based nprQ≥0.85 by one-way ANOVA or, for gender, etiology, and hepatocellular carcinoma, by contingency table analysis.

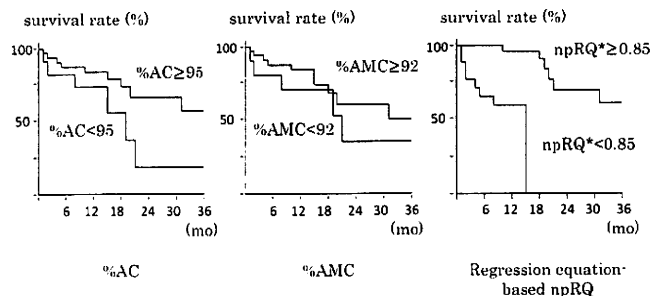


Fig. 2. Survival curves of patients with cirrhosis stratified by cut-offs of %AC=95 ($p=0.0436$), %AMC=92 ($p=0.0842$), or regression equation-based npRQ ($*$)=0.85 ($p=0.0002$).

with hepatocellular carcinoma belonged to the group of this $\text{npRQ} \geq 0.85$ ($p < 0.0040$) (Table 6). Other significant differences were observed in the parameters that related with equation variables, i.e. %AC and Child-Pugh score.

Kaplan-Meier estimation of survival outcome showed a highly significant difference between subgroups created with cut-off of %AC=95 ($p=0.0436$) or regression equation-based $\text{npRQ}=0.85$ ($p=0.0002$), but not of %AMC=92 ($p=0.0842$) (Fig. 2).

DISCUSSION

The liver plays a central role in systemic fuel and energy metabolism. Hence PEM is common in patients with severe liver diseases including cirrhosis (1, 2). In recent years, several studies have demonstrated the association between PEM and poor event-free survival in cirrhosis (3–5, 15, 16). Hence, PEM is important as a therapeutic target in these patients.

In general, REE and npRQ are the main factors considered when evaluating energy metabolism by indirect calorimetry. However, previous studies could not reach agreement on whether REE is a useful indicator of PEM (16–20). On the other hand, $\text{npRQ} < 0.85$, obtained in patients with cirrhosis after overnight bed-rest and fasting, predicted a significantly lower survival rate than in those with scores of at least 0.85 (5). Thus, in contrast to REE, npRQ is a good measure of PEM and reflects patient outcome (5); however, measurement of npRQ is limited in daily clinical practice because of the high cost of indirect calorimetry. Therefore, it is important to determine an alternative marker to npRQ that can be used in the routine clinical setting. To the best of our knowledge, the literature contains no studies of such candidate markers.

In this study, we first revealed that %AC<95 and %AMC<92 represent $\text{npRQ} < 0.85$ by ROC analysis. In addition, multiple-stepwise regression analysis yielded an equation to obtain npRQ by a combination of Child-Pugh score and %AC. These 3 cut-offs showed similar statistical power to predict $\text{npRQ} < 0.85$ as shown in Table 3. However, the most important aim to produce significant difference in survival estimates was achieved only by %AC cut-off and regression equation-based npRQ (Fig. 2). Hence, we recommend using these 2 indices in clinical application. Furthermore, AMC is a

so-called “soft number” derived from a directly measured “hard number” AC. Similarly, Child-Pugh score is also a soft number composed of multiple parameters including total bilirubin and albumin, neither of which remained in this study following multiple regression analysis. Taken together, we recommend using %AC first as a single as well as solid substitute for npRQ, being followed next by the regression equation.

It has been reported that supplementation with BCAA improves prognosis, quality of life, and also nutrient metabolism measured by indirect calorimetry in patients with liver cirrhosis (11, 15, 21–23). In this study, 36% of the patients actually took BCAA (Table 1). However, the presence or absence of BCAA supplementation was not shown to be significant by multivariate analysis, presumably because a high population of patients received BCAA. Similarly, there was no effect by hepatocellular carcinoma on npRQ by multivariate analysis, because of the high incidence of complication with hepatocellular carcinoma in this study (Table 1).

It is well accepted that increased fat oxidation and decreased glucose oxidation contribute to reduce npRQ in patients with liver cirrhosis (5, 17–19). Decrease in glucose oxidation in cirrhosis is explained by the lower production rate of glucose from glycogen (24), decrease in peripheral glucose use (24), and decrease in hepatic glycogen stores (25). In the present study, npRQ correlated significantly with %AC and %AMC. AC and AMC reflect the systemic skeletal muscle mass, and systemic muscle is the main peripheral tissue using glucose. Hence decreased muscle mass indicates the onset and progression of malnutrition in patients with cirrhosis (26).

Increased fat oxidation suggests pronounced lipolysis or a loss of substantial amounts of body fat mass. However, the exact mechanism to explain increased fat oxidation is not clear. In this regard, we recently elucidated that circulating tumor necrosis factor (TNF) α level is elevated in cirrhosis, and correlates significantly with fat oxidation (25).

Energy metabolism and nutritional status can reportedly be estimated by anthropometric measures, such as AMC and TSF (27). These are the most reliable bedside techniques to assess nutrition status in patients with cirrhosis (28, 29). In addition, intraobserver and interobserver errors in anthropometry can be minimized by

standardizing measurement methods (27). AMC and TSF are measured in the upper extremities and thus give reasonably accurate estimates of nutrition status even in patients with decompensated cirrhosis, because fluid retention or edema accumulates in the lower extremities (27).

Alberino et al. reported that 37% of patients with cirrhosis had severe or moderate protein malnutrition as determined by AMC below the 10th percentile, and that 15% had severe energy malnutrition as determined by TSF below the 5th percentile (27). Moreover, such malnourished cirrhotics had a lower survival rate (27). These data were also interesting in that the prognostic power of AMC was higher than that of TSF (27). In addition, several other nutrition parameters, such as creatinine-height index and hand-grip strength, have been reported as good outcome markers in patients with alcoholic hepatitis (30). Since those parameters also indicate muscle mass, decrease in skeletal muscle seems more important than decrease in fat mass in patients with cirrhosis. npRQ, which is another independent predictor of prognosis of patients with cirrhosis as described earlier (5), correlated significantly with %AMC but not with %TSF in the present study. This observation further supports the importance of muscle mass as a nutritional parameter. We believe that the results for AC largely reflect those of AMC.

npRQ<0.85 is a precisely defined value at which the substrate oxidation rate changes from glucose-dominant to fat-dominant, as can be understood from the calculation equation. npRQ<0.85 predicted significantly lower survival rate in cirrhotic patients than in those with higher scores (5). Thus, such patients with energy malnutrition are good candidates to receive nutrition support as recommended in several guidelines (7–9). It was reported that, after overnight fasting, patients with cirrhosis demonstrate a marked decrease in glucose oxidation, with enhanced fat and protein catabolism similar to that observed in healthy subjects after 2 to 3 d of starvation (31). In order to avoid such nocturnal starvation, a late evening snack (LES) is recommended as one of the most useful nutrition interventions (7–9, 32). It would be reasonable to start such snacks at npRQ<0.85, or from the present results, at %AC<95 or regression equation-based npRQ<0.85 as substitute measures of calorimetric npRQ<0.85. This %AC value also corresponds approximately to the lower 25th percentile of AC among patients with cirrhosis, as can be seen in Fig. 1. The clinical significance of this percentile cut-off point agrees well with previous reports (27).

An interesting observation in the present study is that the patients with %AC<95 or with %AMC<92 showed significantly lower body weight and BMI when compared with those with higher scores, while their height was similar. Furthermore, serum albumin level was also similar between the subgroups. Thus, %AC<95 and %AMC<92 appear to indicate only the presence of energy malnutrition, independently of protein nutritional status. Furthermore, stratification by

%AC produced a highly significant difference in the survival rate of patients with cirrhotics, as clearly shown in Fig. 2. Thus, the thresholds of %AC as proposed in this study could substitute for npRQ=0.85 as prognostic indices in cirrhosis.

There are several study limitations in this study. The first is low sensitivity and its wide confidence interval of 3 cut-offs as given in Table 3. A small number of patients might be most responsible for this problem. Additional studies in a larger cohort and, moreover, a confirmation study in another cohort are essential to address this concern.

The other concern is how to standardize the anthropometric measurement. For this aim, we used JARD 2001, because this is the only currently available reference with a relatively recent and large-scale Japanese population. The limitation of JARD 2001 is the lack of height- or BMI-adjusted reference, and for this task another population-based survey is required to prepare such reference data. A totally different approach is to use raw anthropometric values. This is effective in a single cohort study but if the study aim exists in application of data to another cohort, as the case of the present study, confirmation of the patient homogeneity among cohorts is essential and would be a difficult practice.

In conclusion, %AC and regression equation-based npRQ could represent calorimetry-measured npRQ to some extent as parameters of energy nutrition in liver cirrhosis.

REFERENCES

- 1) Lautz HU, Selberg O, Körber J, Bürger M, Müller MJ. 1992. Protein-calorie malnutrition in liver cirrhosis. *Clin Invest* **70**: 478–486.
- 2) Müller MJ. 1995. Malnutrition in cirrhosis. *J Hepatol* **23**: 31–35.
- 3) Mendenhall CL, Tosch T, Weesner RE, Garcia-Pont P, Goldberg SJ, Kiernan T, Seeff LB, Sorell M, Tamburro C, Zetterman R, Chedid A, Chen T, Rabin L. 1986. VA cooperative study on alcoholic hepatitis. II: Prognostic significance of protein-calorie malnutrition. *Am J Clin Nutr* **43**: 213–218.
- 4) McCullough AJ, Raguso C. 1999. Effect of cirrhosis on energy expenditure. *Am J Clin Nutr* **69**: 1066–1068.
- 5) Tajika M, Kato M, Mohri H, Miwa Y, Kato T, Ohnishi H, Moriwaki H. 2002. Prognostic value of energy metabolism in patients with viral liver cirrhosis. *Nutrition* **18**: 229–234.
- 6) Ziegler TR. 2009. Parenteral nutrition in the critically ill patient. *N Engl J Med* **361**: 1088–1097.
- 7) ASPEN Board of Directors and the Clinical Guidelines Task Force. 2002. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **26**: 1SA–138SA.
- 8) Plauth M, Cabré E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, Ferenci P, Holm E, Vom Dahl S, Müller MJ, Nolte W. 2006. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Liver disease. *Clin Nutr* **25**: 285–294.
- 9) Japanese Society for Parenteral and Enteral Nutrition. 2006. Practical Guidelines for Parenteral and Enteral Nutrition. Nankodo Co. Ltd, Tokyo.
- 10) Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC.

- Williams R. 1973. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* **60**: 646–649.
- 11) Kato M, Miwa Y, Tajika M, Hiraoka T, Muto Y, Moriwaki H. 1998. Preferential use of branched-chain amino acids as an energy substrate in patients with liver cirrhosis. *Intern Med* **37**: 429–434.
 - 12) Takala J, Merilainen P. 1987. Handbook of Gas Exchange and Indirect Calorimetry. Datex Division Instrumentarium Corp. Helsinki.
 - 13) Harris R, Benedict F. 1919. A Biometric Study of Human Basal Metabolism in Man. p 297. Carnegie Institution of Washington. Washington DC.
 - 14) Moriwaki H, Aoyagi S, Ishizuka Y, Sasaki M, Santou K, Sugiyama M, Hayashi Y, Yamamori H. 2002. Japanese Anthropometric Reference Data 2001. Medical Review. Osaka.
 - 15) Onji M, Kanazawa H, Tsubouchi H, Kato S, Kaito M, Watanabe A, Habu D, Ito S, Ishikawa T, Kawamura N, Arakawa Y: Hepatic Nutritional Therapy (HNT) Study Group. 2007. BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* **23**: 113–120.
 - 16) Mathur S, Peng S, Gane EJ, McCall JL, Plank LD. 2007. Hypermetabolism predicts reduced transplant-free survival independent of MELD and Child-Pugh scores in liver cirrhosis. *Nutrition* **23**: 398–403.
 - 17) Merli M, Riggio O, Romiti A, Ariosto E, Mango L, Pinto G, Savioli M, Capocaccia L. 1990. Basal energy production rate and substrate use in stable cirrhotic patients. *Hepatology* **12**: 106–112.
 - 18) Müller MJ, Böker KH, Selberg O. 1994. Are patients with liver cirrhosis hypermetabolic? *Clin Nutr* **13**: 131–144.
 - 19) Schneeweiss B, Graninger W, Stockenhuber F, Druml W, Ferenci P, Eichinger S, Grimm G, Laggner AN, Lenz K. 1990. Energy metabolism in acute and chronic renal failure. *Am J Clin Nutr* **52**: 596–601.
 - 20) Jhangiani SS, Agarwal N, Holmes R, Cayten CG, Pitchumoni CS. 1986. Energy expenditure in chronic alcoholics with and without liver disease. *Am J Clin Nutr* **44**: 323–329.
 - 21) Muto Y, Sato S, Watanabe A, Moriwaki H, Suzuki K, Kato A, Kato M, Nakamura T, Higuchi K, Nishiguchi S, Kumada H: Long-Term Survival Study Group. 2005. Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**: 705–713.
 - 22) Marchesini G, Bianchi G, Merli M, Amodio P, Panella C, Loguercio C, Rossi Fanelli F, Abbiati R: Italian BCAA Study Group. 2003. Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology* **124**: 1792–1801.
 - 23) Urata Y, Okita K, Korenaga K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. 2007. The effect of supplementation with branched-chain amino acids in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* **37**: 510–516.
 - 24) Proietto J, Alford FP, Dudley EJ. 1980. The mechanism of the carbohydrate intolerance of cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* **51**: 1030–1036.
 - 25) Shiraki M, Terakura Y, Iwasa J, Shimizu M, Miwa Y, Murakami N, Nagaki M, Moriwaki H. 2010. Elevated serum tumor necrosis factor- α and soluble tumor necrosis factor receptors correlate with aberrant energy metabolism in liver cirrhosis. *Nutrition* **26**: 269–275.
 - 26) Kabadi UM, Eisenstein AB, Tucci J, Pellicone J. 1984. Hyperglucagonemia in hepatic cirrhosis: its relation to hepatocellular dysfunction and normalization on recovery. *Am J Gastroenterol* **79**: 143–149.
 - 27) Alberino F, Gatta A, Amodio P, Merkel C, Di Pascoli L, Boffo G, Caregaro L. 2001. Nutrition and survival in patients with liver cirrhosis. *Nutrition* **17**: 445–450.
 - 28) Morgan MY, Madden AM. 1996. The assessment of body composition in patients with cirrhosis. *Eur J Nucl Med* **23**: 213–225.
 - 29) Madden AM, Morgan MY. 1994. A comparison of skin-fold anthropometry and bioelectrical impedance analysis for measuring percentage body fat in patients with cirrhosis. *J Hepatol* **21**: 878–883.
 - 30) Mendenhall CL, Moritz TE, Roselle GA, Morgan TR, Nemchausky BA, Tamburro CH, Schiff ER, McClain CJ, Marsano LS, Allen JI, Samanta A, Weesner RE, Henderson WG, Chen TS, French SW, Chedid A. 1995. Protein energy malnutrition in severe alcoholic hepatitis: diagnosis and response to treatment. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **19**: 258–265.
 - 31) Owen OE, Trapp VE, Reichard GA Jr, Mozzoli MA, Moctezuma J, Paul P, Skutches CL, Boden G. 1983. Nature and quantity of fuels consumed in patients with alcoholic cirrhosis. *J Clin Invest* **72**: 1821–1832.
 - 32) Miwa Y, Shiraki M, Kato M, Tajika M, Mohri H, Murakami N, Kato T, Ohnishi H, Morioku T, Muto Y, Moriwaki H. 2000. Improvement of fuel metabolism by nocturnal energy supplementation in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* **18**: 184–189.

肝硬変に対する経口分岐鎖アミノ酸製剤の 使い分けと投与のタイミング

盛岡市立病院院長
加藤 章信

1. 経口 BCAA 製剤の種類と適応

現在、経口分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 製剤には、BCAA のみで構成されている BCAA 顆粒製剤 (リーバクト®顆粒) と肝不全用経腸栄養剤 (アミノレバン®EN, ヘパン ED®) との2種類がある。BCAA 顆粒製剤は BCAA であるバリン・ロイシン・イソロイシンの3種類のアミノ酸からなる製剤で、1包約 16 kcal で、BCAA を 4g 含有している。十分な食事摂取をしているにもかかわらず、低蛋白、低アルブミン血症がみられる肝硬変を対象としてその改善のために使用する。

一方、肝不全用経腸栄養剤については肝性脳症から覚醒した後の症例に対して、再び脳症を引き起こすことなく安全に蛋白源であるアミノ酸を摂取するための薬剤として開発された。アミノレバン®EN は BCAA とペプチドをおもな窒素源としており、ヘパン ED®は、窒素源が結晶アミノ酸だけのいわゆる成分栄養剤のカテゴリーに入る製剤という特徴がある。

BCAA 顆粒製剤と肝不全用経腸栄養剤の対象は原則的には違うことから、使い分けが必要であるが、実践的な使い分けとしては食事の摂取状況より、十分な食事摂取が可能な場合には経口 BCAA 顆粒製剤、食事が十分でない場合には肝不全用経腸栄養剤を用いるのが実際に即している。

なお、糖尿病合併によるカロリー制限が必要な例や、水分制限が必要な例には顆粒製剤が選択されることがあり、顆粒製剤を投与中に脳症が出現するような例では、蛋白制限とともに経腸栄養剤を投与するほうが望ましい。いずれの製剤を用いる場合にも肝硬変の栄養代謝障害に対する治療の基本は食事療法であり、症例ごとに食事摂取状況を把握して、食事摂取に対する指導を試みること

が、経口 BCAA 療法の効果を得るためのポイントとなる。

最近、薬品扱いの肝不全用経腸栄養剤、BCAA 顆粒製剤のほかに、食品としての経口 BCAA 製剤も発売されているが、このような製剤をどのような症例にサプリメントとして投与するかについてはさらに検討する必要があるかと考える。

2. 投与のタイミング

経口 BCAA 製剤の適応は非代償性肝硬変となっているが、非代償性肝硬変とは、浮腫・腹水・黄疸 静脈瘤を含めた消化管からの出血や肝性脳症といった臨床徴候を示すものである。われわれの検討では軽度の浮腫を生じたときの血液生化学検査の成績は、総ビリルビン 2.0 mg/dl 以上、血清アルブミン 3.5 g/dl 以下、プロトロンビン時間 60% 以下という特徴が見られた。軽度の浮腫を非代償性肝硬変ととらえた場合に、すでに血清アルブミン濃度は低下している状況であり、その時期を逃さないで、栄養的介入を行う必要があると考えられる。血清アルブミンがかなり低下してから経口 BCAA 製剤を使用した場合に症例によっては効果に限界があることがあり、非代償性肝硬変の早期から経口 BCAA 製剤を投与することが、効果を確実にするポイントと考えられる。

処方.

脳症を繰り返す場合や、高アンモニア血症をともなう場合は、低蛋白食 (0.4~0.6 g/kg 標準体重) を基本にし、経口 BCAA 製剤を投与する。

- 1) アミノレバン® EN 散 (50 g) 2~3 包 分 2~3
- 2) ヘパン ED® 散 (80 g) 1~2 包 分 1~2
- 3) リーバクト® 顆粒 (4 g) 3 包 分 3

知っておきたい 潜在性の肝性脳症とその診断

加藤 章信

盛岡市立病院院長

通常の診察では肝性脳症はないと判断される肝硬変で、運転中に自動車事故を起こしたり、職場の工場で労災事故を起こすといったことなど日常のQOLが低下している肝硬変例があることが欧米を中心に報告され、このような病態を潜在性肝性脳症と称している。

1. 潜在性肝性脳症の概念

肝性脳症の重症度は昏睡度分類で判定されI度～V度までに分類される。潜在性肝性脳症はI度以下のレベルに存在する概念である。顕性の肝性脳症を氷山の海の上に出ている部分にたとえると、潜在性肝性脳症は海の中に沈んでいる氷山の部分にたとえられ、顕性肝性脳症の陰に多くの潜在性肝性脳症が存在することが想定されている。

Gitlinによれば「精神神経症状が明らかでなく臨床的には肝性脳症は認められない肝硬変に鋭敏で定量的な精神神経機能検査を行うことで異常が指摘されることがあり」このような病態を潜在性肝性脳症と呼んでいる。

2. 潜在性肝性脳症の診断意義とその問題点

診断意義は精神神経学的な認知機能障害を早期に診断しQOLの低下を防ぐことにある。また顕性肝性脳症の前段階の症例が含まれこのような症例を早期に診断することも重要である。

われわれの検討でも、潜在性肝性脳症例は潜在性肝性脳症のない例に比べQOLの低下が明らかで早期診断が必要であると考えられる。

一方で潜在性肝性脳症と診断されてから6ヵ月目までに約20%にII度以上の顕性脳症を発症しており顕性脳症の前段階の症例が確実に存在すると考えられる。

3. 潜在性肝性脳症の診断

診断には、統一された診断基準や検査方法はないが、知能検査を応用した精神神経機能検査や脳波、大脳誘発電位などの神経生理学検査により診断が試みられている。

① 定量的精神神経機能検査

定量的精神神経機能検査の一つに知能検査がある。WAIS成人型知能検査の項目である積木模様検査、数字符号検査と米国の新兵の採用試験として開発された数字追跡試験の3項目を施行し1項目以上に異常を示す場合に診断されることが多い。積木模様検査は白と赤で塗り分けられた「さいころ」を4個または9個使って一定時間内に見本図柄を作成するものである。数字符号検査は1～9までの数字に対応する符号をあらかじめ提示し、数字がランダムに記入されている表に対応する符号を一定時間内に記入してゆく検査である。数字追跡試験は1～20の数字が紙の上にランダムに配置され一定時間内に順番につなぐ検査である。

これらの検査は特別な装置がなくても実施できる簡便性があるが訓練を受けた技師が一定の環境条件で行うことで再現性が担保されることから臨床での実施がやや難しい面もある。そこで最近新しいコンピュータシステムによる診断方法が開発されている。

② コンピュータを用いた定量的精神神経機能検査

多施設共同研究によりわれわれは新しいPCソフトを開発した。検査は8つのテストから成り、実施時間は約15～20分で特定の検査場所を選ぶ必要はなく簡便に実施できる。本ソフトは「NP tests」として肝臓学会のホームページからダウンロードが可能である。この検査を用いて潜在性肝性脳症の診断、病態について検討され、共通の診断方法として利用されることを期待している。

おわりに

潜在性肝性脳症の診断方法は必ずしも統一されたものではないが、肝硬変の生存期間中のQOLを高め、顕性の肝性脳症の発症を予防する意味から、積極的な診断が今後必要である。

分岐鎖アミノ酸*

keywords: 蛋白・アミノ酸代謝異常、経口分岐鎖アミノ酸製剤

加藤章信¹⁾²⁾ Akinobu KATO

鈴木一幸²⁾ Kazuyuki SUZUKI

◆盛岡市立病院¹⁾

岩手医科大学内科学講座消化器肝臓内科部門²⁾

Morioka Municipal Hospital¹⁾

Internal Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology²⁾

肝硬変の栄養代謝異常として蛋白質・エネルギー栄養不良が特徴的である。このうち蛋白アミノ酸代謝異常には経口分岐鎖アミノ酸製剤が用いられ、栄養学的効果とともに有害事象の減少を含めた予後に対する有用性が明らかになっている。

はじめに

肝臓は栄養代謝の中心であり、肝硬変では様々な栄養代謝障害が生じていることが知られている。本稿では肝硬変の栄養病態とBCAAによる栄養学的介入法について解説する。

肝硬変の栄養病態

栄養代謝異常は糖質、脂質、蛋白質・アミノ酸のみならずビタミン、ミネラル、微量元素等にも及び、蛋白質・エネルギー栄養不良(protein-energy malnutrition: PEM)が特徴的である。

このうち血漿遊離アミノ酸のインバランスには分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid: BCAA)の減少と芳香族アミノ酸(aromatic amino acid: AAA)の増加によるFischer比あるいはBCAA/チロシン比(branched-chain amino acids tyrosine ratio: BTR)の低下やメチオニン(Met)の増加がある。AAAやMetは肝臓で代謝されるアミノ酸であり、肝硬変の重症度が進行すると、血中で増加する。一方、BCAAは筋肉や脂肪組織などの末梢組織で代謝されるアミノ酸であ

るが、肝硬変ではエネルギー源やアンモニア代謝に利用されることから血中で低下する。

肝の重症度を評価するChild-Pugh分類と内臓蛋白の栄養状態の指標に用いられる急性相蛋白(プレアルブミン、レチノール結合蛋白、トランスフェリン)濃度の関連を検討すると、急性相蛋白濃度は重症度の進行に伴い低下する¹⁾。さらに血漿遊離アミノ酸濃度との関連を検討¹⁾すると、BCAA濃度は重症度の比較的軽いgrade Aですでに低下しており、代償性肝硬変と考えられる病態でもBCAA濃度は欠乏状態であることを示している。一方、チロシン濃度は肝硬変の重症度の進行に伴い増加し、結果としてBTRは重症度とともに低下する¹⁾。これらの結果から、肝硬変では蛋白代謝異常とアミノ酸代謝異常とは同時に期的に進展増悪すると考えられ、アミノ酸代謝異常の改善が低タンパク血症を含めた蛋白代謝異常の改善につながると考えられている。

蛋白・アミノ酸代謝異常に対する対策：BCAA療法

肝硬変に対する食事療法のコンセンサスとして、ヨーロッパ静脈経腸栄養学会(ESPEN)のガイドライン²⁾(表1)がある。このガイドラインは日本人の体格等から考えて、推奨

*Nutritional management with branched chain amino acids for liver cirrhosis

表1 ESPEN: 肝疾患ガイドライン(2006) 文献²⁾

<p>●一般的事項:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ベットサイドで実施可能な SGA や身体計測により患者が低栄養状態のリスクが無いか確認する。(Grade C) ・ 生体電気抵抗分析法(BIA)により位相角や BCM(body cell mass)を測定して、定量的に低栄養状態を評価する。但し、腹水症例での BIA 測定は限界がある。(Grade B) ・ 推奨される摂取熱量は35-40kcal/kgBW/日(Grade C) ・ 推奨される摂取蛋白質量は 1.2-1.5g/kgBW/日(Grade C) <p>●経腸栄養の適応:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 適切な栄養指導を行っても患者が経口的に必要な量の食事を摂取できない場合。(Grade A) <p>●経路:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 至適量の食事が摂取できない場合は、経口的に経腸栄養剤を投与するか (Grade C)、(食道静脈瘤がある場合にも) チューブによる投与を行う (Grade A)。 ・ PEG は合併症の頻度が高く推奨されない (Grade C)。 <p>●経腸栄養剤の組成:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 一般的な蛋白組成が推奨される。(Grade C) ・ 腹水症例では高蛋白・高カロリーの組成を考慮すべきである。(Grade C) ・ 経腸栄養剤施行中に肝性脳症を発症した症例では BCAA を高含有組成の製剤を投与する。(Grade A) ・ 経口の BCAA 補充は進行した肝硬変の予後を改善できる。(Grade B) <p>●予後:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 経腸栄養療法は栄養状態、肝機能を改善し合併症を減らし、生存期間を延長することから推奨される。(Grade A)

されている摂取エネルギー量や蛋白投与量がやや多い点に注意を要する。

我が国における食事療法については第7回日本病態栄養学会のコンセンサス³⁾があり日本人の体格等を考慮し、臨床的に使用しやすい内容となっている。また、総カロリーより200kcal程度を分割し、軽食として就寝前に摂ることを推奨している。いずれのガイドラインでも後述する経口BCAA製剤の使用を推奨している。

蛋白・アミノ酸代謝異常は、その頻度は高く前述のごとく肝硬変の重症度が進行するにつれて顕著となる。本邦では窒素平衡の是正や低栄養の改善を目的に経口BCAA製剤が頻用される。

食事によりBCAAを多く含有し、蛋白不耐症に適する食品の検討もなされたが、種々の食品中に含まれるBCAA量に大きな違いはない。従って、食品から充分な

BCAAを補充し蛋白・アミノ酸代謝異常を是正することには限界があり、経口BCAA製剤が開発された。

(1) BCAA 製剤の種類

本邦では肝硬変にみられる蛋白・アミノ酸代謝異常の是正に対する栄養療法に経口BCAA製剤が用いられている。経口BCAA製剤には肝不全用経腸栄養剤(または肝不全用成分栄養剤)と経口BCAA顆粒剤の2つの剤形がある。

肝不全用経腸栄養剤は、いずれの製剤もBCAAであるバリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)を多く含有し、常用投与量(2~3包/日)により11~17g/日のBCAAの摂取が可能である。これらの製剤は非代償性肝硬変の肝性脳症治療に適応があるが、蛋白質、糖質、脂肪の三大栄養素とビタミン、ミネラルなどを含むため、肝性脳症の改善だけでなく栄養状態の改善効果も期待して投与される¹⁾。

経口BCAA顆粒剤はBCAAのみの組成で、Val、Leu、Ileが1:2:1.2の比率で配合されている。肝性脳症の見られない非代償性肝硬変で低アルブミン血症を伴う低栄養状態の改善に適応がある。なお、この場合充分な食事摂取が可能な症例が対象である。

BCAA顆粒剤の服用により約8週間で血清のアルブミン濃度の増加改善効果⁵⁾があり、その結果、四肢の浮腫、全身倦怠感、易疲労感、筋肉のけいれんなどの症状の改善がみられることから、肝硬変症のQOLの向上をもたらす肝性脳症の発現頻度の低下や生命予後の延長にも好影響をあたえたと考えられている。

(2) BCAAの効果を左右する因子

経口BCAA製剤の効果については効果のみ見られない症例も存在することから、投与に際しては効果を左右する因子を認識し、それに対する対策も必要である。臨床効果を左右する因子として服薬コンプライアンスは基本であるが、その他に肝の重症度、肝炎の程度などが上げられる。重症度の進行した症例では経口BCAA製剤による充分な臨床効果を得るには限界がある。

さらに、肝炎の程度も経口BCAA製剤の効果を左右する因子と考えられ血清トランスアミナーゼが100IU/L以上で変動している症例では血清アルブミン濃度の増加

が明らかでなく投与にあたっては血清トランスアミナーゼの安定化も必要と考えられる¹⁾⁶⁾。

(3) 非代償性肝硬変の早期診断

BCAA製剤の適応は非代償性肝硬変であるが、重症度の進行した例ではBCAA製剤の効果に限界があることから、非代償期の病態を早期に診断する必要がある。

非代償性肝硬変の血液生化学検査成績を検討すると、血清アルブミン値3.5g/dL以下、BTR(BCAA/Tyr:チロシン)3.5以下、プロトロンビン活性60%以下または血小板数10万/ μ L以下といった特徴がある¹⁾。従って肝硬変症例でこれらの値を示す場合には早晩、浮腫・腹水、肝性脳症、食道・胃静脈瘤などからの消化管出血といった非代償性肝硬変の臨床徴候を示すと考えられ、経口BCAA製剤の投与の開始を考慮する時期と考えられる。

(4) BCAA製剤の使い分け

経口BCAA顆粒剤と肝不全用経腸栄養剤の対象は原則的には違うことから、使い分けが必要である¹⁾⁶⁾。

肝不全用経腸栄養剤は肝性脳症の覚醒後や既往があり、蛋白不耐症を伴う慢性肝不全例に、経口BCAA顆粒剤は食事摂取が充分にもかかわらず、低アルブミン血症を呈する例に投与されている(図1)が、食事の摂取状況より、充分な食事摂取が可能な場合には経口BCAA顆粒剤、食事が充分でない場合には肝不全用経口栄養剤を用いるのが実際に即している。

なお、糖尿病合併によるカロリー制限が必要な例や、水分制限が必要な例には顆粒製剤が選択される場合があ

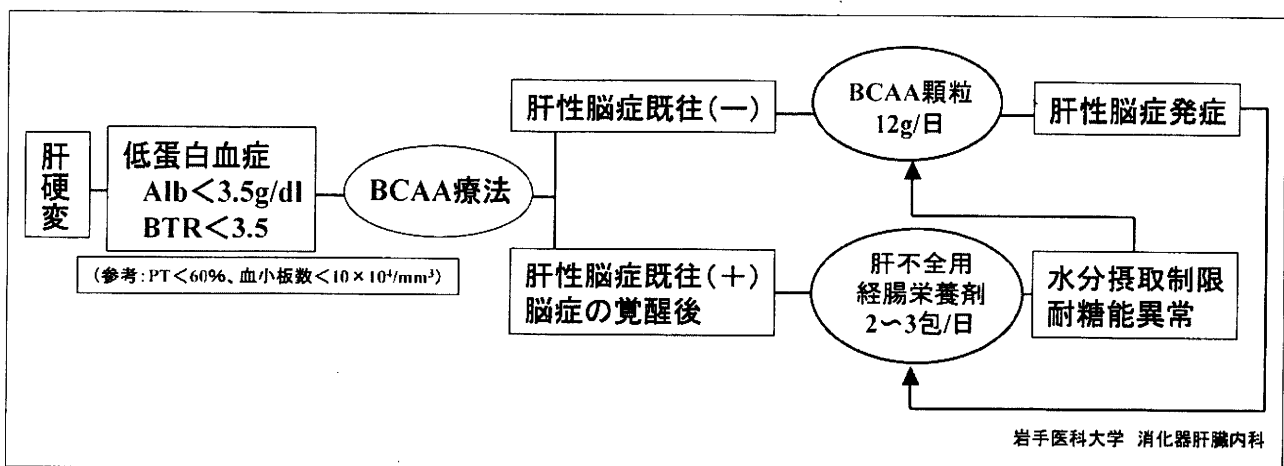
る。逆に、顆粒製剤を投与中に脳症が出現するような例では、蛋白制限とともに経腸栄養剤を投与することが病態に見合う。いずれにせよ肝硬変の栄養代謝障害に対する治療の基本は食事療法であり、症例ごとに食事摂取状況を把握して、食事摂取に対する指導を試みるのが、経口BCAA療法の効果を得るためのキーポイントとなる。

(5) BCAA製剤の効果

本邦では、全国集計の結果⁷⁾⁸⁾、肝不全用経腸栄養剤により、窒素平衡の改善、低アルブミン血症の改善、筋蛋白量の増加など、アミノ酸、蛋白代謝異常に基づく低栄養状態の改善や、血漿蛋白製剤の節約効果が認められている。また、長期投与によりperformance statusの改善だけでなく生存率の延長⁹⁾も報告されている。

経口BCAA顆粒剤は、血清アルブミン値をふくむ栄養学的改善効果とともに累積生存率の延長¹⁰⁾が観察されている。

Marchesiniら¹¹⁾の検討でも経口BCAA製剤を1年間にわたり補充することによりラクトアルブミンやマルトースデキストリンによる対照群に比べ、有害事象の発生率が低下し、生活の質(QOL)が改善されると報告されている。さらに本邦での多施設共同ランダム化比較試験による経口BCAA顆粒剤の長期の予後のおよぼす影響について検討¹²⁾され、有害事象の減少を含めたBCAAの予後に対する有用性が明らかとなりこれら結果よりESPENのガイドラインでもBCAA製剤の積極的な使用推奨の記載がある²⁾。



岩手医科大学 消化器肝臓内科

図1 BCAA製剤の使い分け

(6) 肝性脳症合併例での栄養療法

肝性脳症を合併する場合は食事蛋白の制限(0.4-0.6g/kg標準体重)と誘因の除去が基本である。

経口摂取の可能な肝性脳症(I~II度)や高アンモニア血症を認めるような、いわゆる蛋白不耐症の場合は、蛋白制限食(0.4-0.6g/kg標準体重)とし、肝不全用経腸栄養剤を併用した食事とする。昏睡度がIII~VI度では、経口摂取は困難で、BCAA輸液を投与する。

肝硬変ではミネラル、微量元素の異常も認めるが、代表的なものには血中亜鉛濃度の低下がある。適切な補充量については、十分なコンセンサスが得られてはいないが、亜鉛製剤投与により血中アンモニアの低下や尿素窒素合成能の改善が報告されている。

(7) 肝細胞癌合併肝硬変での栄養療法

肝細胞癌(肝癌)についての栄養病態、栄養評価については肝硬変と基本的に同じであり、栄養治療も肝硬変の介入方法と原則的に同様である。

肝硬変では従来から低栄養状態が予後を悪化させる要因として、その改善が強調されてきた。その一方で、近年、ウイルス肝炎やアルコール性肝障害の症例で、肥満が病態の悪化を進展させる因子のひとつであることが注目されている。

最近、多施設共同比較試験の検討¹³⁾における、肝癌の発癌解析より、ハザード比が有意に高くなる因子には、男性、AFPの高値(20ng/mL以上)、糖尿病の合併、血清アルブミン低値とともに、BMI高値であることが報告され

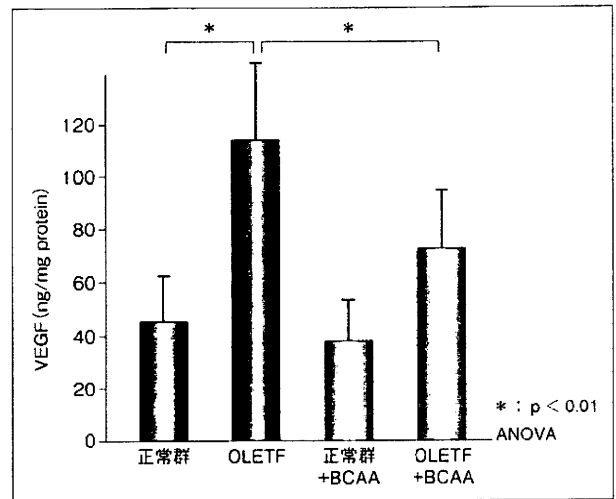


図3 BCAAのVEGF抑制効果(ラット)¹⁵⁾
 OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat: 2型糖尿病モデルラットに肝細胞癌を誘発
 VEGF: 血管内皮細胞増殖因子(非癌部の肝臓の濃度)
 (J Gastroenterol 44:483-491,2009)

ている。

従来から、男性やAFP値が肝癌発症に関与することは知られているが、肥満も肝癌発症に関与することが明らかとなり、肝癌に対する栄養療法として単に十分な栄養を与えるという考えではなく、バランスのとれた過不足のない栄養療法が重要となると考えられる。さらに経口BCAA製剤の影響についても検討され¹³⁾(図2)、BMI>25の肥満例に対して経口BCAA製剤の発癌抑制効果が明らかであった。

BCAAの発癌抑制効果の機序については、BCAAの高インスリン血症改善作用との関連などが推察され、最近いくつかの検討がなされている。

Ohnoら¹⁴⁾はBCAA製剤の効果を酸化ストレスとの関連より検討している。C型肝炎ウイルスコア蛋白の存在が酸化ストレスを増強し肝細胞癌の発症に関与することが推測されているが、Ohnoら¹⁴⁾は低アルブミン血症を有するC型肝炎ウイルス陽性の代償性肝硬変にBCAA製剤を6ヶ月間投与した。その結果対照群に比較してBCAA投与群では尿中の8-hydroxy-2'-deoxyguanosineや8-isoprostaneなどのいわゆる酸化ストレスマーカーが有意に低下したことを認めている。

肥満がインスリン抵抗性と密接に関連し

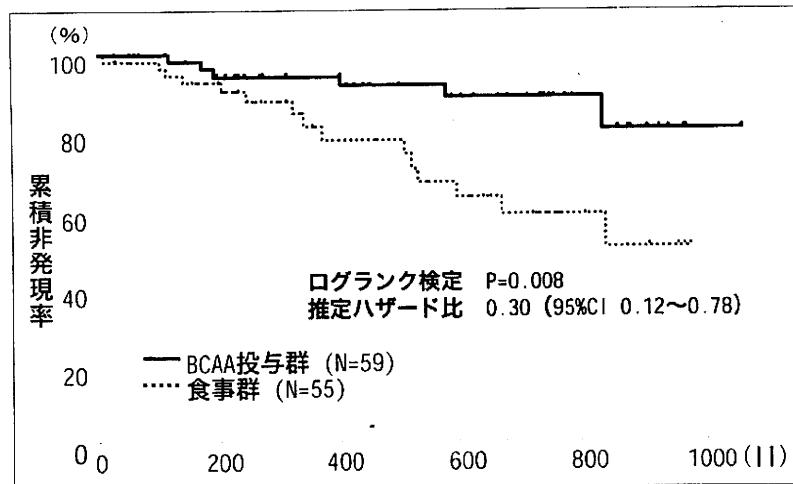


図2 試験開始前BMI25以上の肝硬変症例における肝癌非発症生存曲線(Kaplan-Meier)¹³⁾

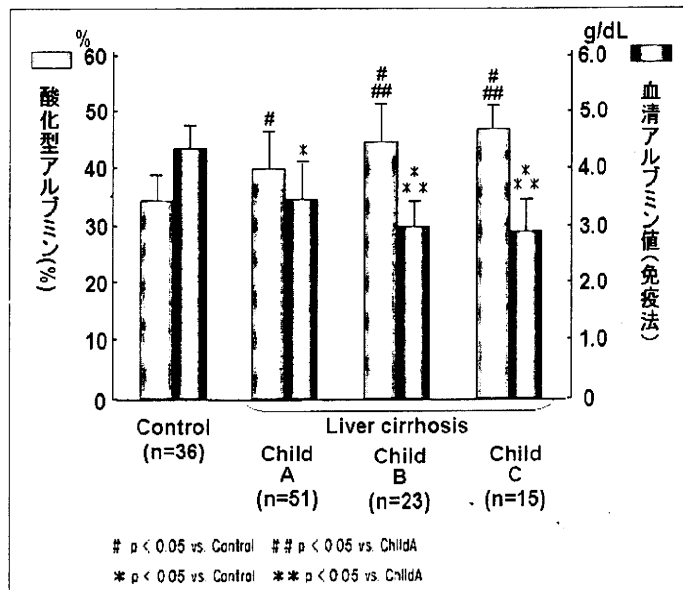


図4 硬変における重傷度別の血清アルブミン濃度と酸化型アルブミンの割合¹⁶⁾
Watanabe A, et al. Nutrition 20:351-357,2004

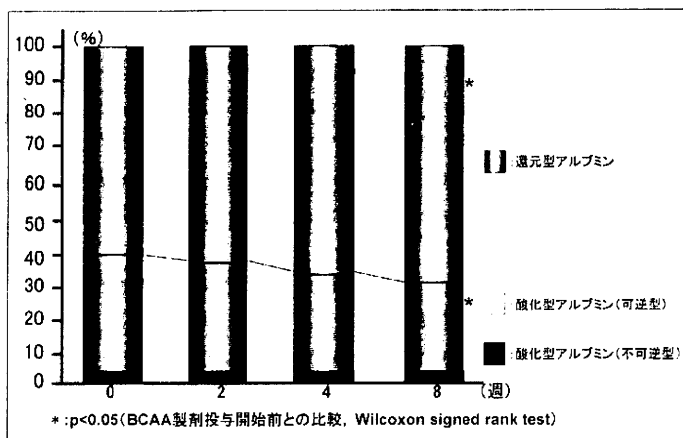


図5 還元型・酸化型(可逆型・不可逆型)アルブミン非の変化¹⁷⁾
(Hepatol Res 37 : 765-770, 2007 より改変)

ていることに注目し、Yoshijiら¹⁵⁾ は実験的に2型糖尿病モデルラットを用いてBCAAの肝発癌に関する作用について検討した(図3)。2型糖尿病モデルにBCAAを投与することにより、肝臓で亢進していた血管内皮細胞増殖因子(VEGF) 蛋白の発現と血管新生は抑制され、前癌病変が有意に縮小されていた結果を認めている。BCAAが血管新生を抑制することで、肝発癌を抑制する可能性があることを示唆した成績であるが、どのような機序によりVEGFの発現を抑制したのかさらなる検討が望まれる。

さらにヒト血清アルブミンのマイクロヘテロジェニティーに注目した検討がある。ヒト血清アルブミンには還元型アルブミン、酸化型アルブミンなどのマイクロヘテロジェニティーがあることが知られている。酸化ストレスとの関係から検

討すると還元型アルブミンの方が酸化型アルブミンに比してラジカル消去能が高いことが報告されている。肝硬変では酸化型のアルブミンの割合が高く、ことに重症度の進行に伴いその程度は明らかとなる¹⁶⁾ (図4)。Moriwakiらは肝硬変患者にBCAAを投与し8週間の観察により酸化型アルブミンの割合が減少し還元型のアルブミンの割合が増加することを認めている¹⁷⁾ (図5)。さらに同時に測定した酸化ストレスマーカーの過酸化脂質の低下傾向も認めている。還元型アルブミンの抗酸化作用は肝硬変患者の酸化ストレスを除去し肝癌発症に抑制的に作用する可能性があることから、今後血清アルブミンのマイクロヘテロジェニティーの面からみたBCAA製剤の長期効果の検討が必要である。

おわりに

肝硬変における分岐鎖アミノ酸の効果について解説した。蛋白アミノ酸代謝異常には経口BCAA製剤の投与を行い、肝癌の発癌抑制を念頭にした栄養療法が重要である。

参考文献

- 1) Kato A., Suzuki K. How to BCAA preparations. *Hepatology Research*, 30S : S30-S35, 2004.
- 2) Plauth M., Carbe E., Riggio O, et al. ESPEN guidelines on enteral nutrition : Liver disease. *Clinical Nutrition*, 25 : 285-294, 2006.
- 3) 渡辺明治, 森脇久隆, 加藤章信ほか. 第7回日本病態栄養学会年次総会コンセンサス (2003) 栄養-評価と治療 20 : 181-196, 2003.
- 4) 盛合 理, 鈴木一幸, 加藤章信ほか. 肝硬変に対する高分枝鎖アミノ酸製剤療法. *JJPEN* 14 : 717-719, 1992.
- 5) 吉田 貴, 加藤昌彦, 森脇久隆ほか. 栄養療法の進歩, 肝疾患-肝炎-. *肝胆膵* 19 : 33-37, 1989.
- 6) 加藤章信. 分岐鎖アミノ酸製剤の最近の動向-輸液の効果を左右する因子と経口剤における使い分けを中心に-. *肝・胆・膵疾患の最新医療*, 先端医療技術研究所 : 406-409, 2003.
- 7) 市田文弘, 佐藤俊一, 柴崎浩一ほか. 肝不全用経腸栄養剤SF1008Cの肝硬変患者における臨床評価. *肝胆膵* 12 : 653-662, 1986.
- 8) 林 茂樹, 青柳 豊, 岡 博ほか. 肝性脳症治療用成分栄養剤ED-Hの比較臨床試験. *JJREN* 12 : 1267-1285, 1990.
- 9) 市田文弘, 柴崎浩一, 武藤泰敏ほか. 肝性脳症を伴う非代償性肝硬変患者に対する特殊アミノ酸経腸栄養剤の臨床的研究-Historical Dataの比較検討-. *肝臓* 29 : 1051-1061, 1988.
- 10) 武藤泰敏, 吉田 貴, 佐藤俊一ほか. 肝硬変に対するBCAA-G投与の生命予後への影響. *JJPEN* 14 : 765-779, 1992.
- 11) Marchesini G, Bianchi G, Merli M, Amodio P, Panella C, Loguercio C, et al. Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis : a double blind, randomized trial. *Gastroenterology* 124 : 1792-1801, 2003.
- 12) Muto Y, Sato S, Watanabe A , et al. Effect of branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3 : 705-713, 2005.
- 13) Muto Y., Sato S., Watanabe A, et al. Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatology Research*, 35 : 204-214, 2006.
- 14) Ohno T, Tanaka F, Sugouchi E, et al. Suppressive effect of oral administration of branched-chain amino acid granules on oxidative stress and inflammation in HCV-positive patients with liver cirrhosis. *Hepatology Research*, 38 : 683-688, 2008.
- 15) Yoshiji H, Noguchi R, Kidate M, et al. Branched-chain amino acids suppress insulin-resistance-based hepatocarcinogenesis in obese diabetic rats. *J Gastroenterol* 44 : 483-491, 2009.
- 16) Watanabe A, Matsuzaki S, Moriwaki H, et al. Problems in serum albumin measurement and clinical significance of albumin microheterogeneity in cirrhosis. *Nutrition* 20 : 351-357, 2004.
- 17) Fukushima H, Miwa Y, Shiraki M, et al. Oral branched-chain amino acid supplementation improves the oxidative/ reduced albumin ratio in patients with liver cirrhosis. *Hepatology Research* 37 : 765-770, 2007.



Characterization of the Interaction between Diferric Transferrin and Transferrin Receptor 2 by Functional Assays and Atomic Force Microscopy

Katsuya Ikuta^{1,2*}, Alexandre Yersin³, Atsushi Ikai^{2,3}, Philip Aisen² and Yutaka Kohgo¹

¹Division of Gastroenterology and Hematology/Oncology, Department of Medicine, Asahikawa Medical College, 2-1-1-1 Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan

²Department of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA

³Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259-B8 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

Received 11 August 2009; received in revised form 29 December 2009; accepted 13 January 2010

Transferrin receptor 2 (TfR2), a homologue of the classical transferrin receptor 1 (TfR1), is found in two isoforms, α and β . Like TfR1, TfR2 α is a type II membrane protein, but the β form lacks transmembrane portions and therefore is likely to be an intracellular protein. To investigate the functional properties of TfR2 α , we expressed the protein with FLAG tagging in transferrin-receptor-deficient Chinese hamster ovary cells. The association constant for the binding of diferric transferrin (Tf) to TfR2 α is $5.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, which is about 50 times lower than that for the binding of Tf to TfR1, with correspondingly reduced rates of iron uptake. Evidence for Tf internalization and recycling via TfR2 α without degradation, as in the TfR1 pathway, was also found. The interaction of TfR2 α with Tf was further investigated using atomic force microscopy, a powerful tool used for investigating the interaction between a ligand and its receptor at the single-molecule level on the living cell surface. Dynamic force microscopy reveals a difference in the interactions of Tf with TfR2 α and TfR1, with Tf–TfR1 unbinding characterized by two energy barriers, while only one is present for Tf–TfR2. We speculate that this difference may reflect Tf binding to TfR2 α by a single lobe, whereas two lobes of Tf participate in binding to TfR1. The difference in the binding properties of Tf to TfR1 and TfR2 α may help account for the different physiological roles of the two receptors.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: iron metabolism; transferrin; transferrin receptor 2; atomic force microscopy; functional assay

Edited by W. Baumeister

*Corresponding author. 2-1-1-1 Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan. E-mail address: ikuta@asahikawa-med.ac.jp.

Present address: A. Yersin, Gymnase de Beaulieu, Rue du Maupas 50, 1004 Lausanne, Switzerland.

Present address: A. Ikai, Innovation Laboratory, Tokyo Institute of Technology (S2-8), 4259, Nagatsuta-Cho, Midori-Ku, Osaka, Japan.

Abbreviations used: TfR2, transferrin receptor 2; TfR1, transferrin receptor 1; Tf, diferric transferrin; AFM, atomic force microscopy; CHO, Chinese hamster ovary; PBS, phosphate-buffered saline; TCA, trichloroacetic acid; PTA, phosphotungstic acid; GFP, green fluorescent protein; BSA, bovine serum albumin.

Introduction

Iron is essential for all living organisms and is required for numerous metabolic processes. In vertebrates, and at least in some invertebrates with circulatory systems, almost all circulating iron is carried by diferric transferrin (Tf) to provide iron for cellular needs. The initial event in the cellular uptake of iron is the binding of Tf to transferrin receptor 1 (TfR1)¹ on the plasma membrane of cells, followed by endocytosis of the Tf–TfR1 complex. HFE²—the protein that, when mutated, is responsible for hereditary hemochromatosis—has been shown to combine with TfR1

and to reduce its affinity for Tf,³⁻⁶ but the physiological functions of HFE are still not fully understood. In the acidified Tf-bearing endosome, iron is released from Tf and carried into the cytosol by divalent metal transporter 1.⁷⁻⁹ After the release of its iron, Tf, still bound to the receptor in the acidified endosome, is recycled to the cell membrane and released from TfR1 at the cell surface where iron-free Tf is not bound by the receptor at pH 7.4. Most cells other than hepatocytes have been thought to depend chiefly or exclusively on the TfR1 cycle for securing iron from Tf.¹⁰⁻¹²

A second transferrin receptor, transferrin receptor 2 (TfR2), was cloned and identified as a new member of the transferrin receptor class.¹³ TfR2 has two isoforms: TfR2 α and TfR2 β . TfR2 α is thought to be a type II membrane protein like classical TfR1.¹⁴ TfR2 β is probably an intracellular protein because its amino acid sequence lacks transmembrane portions. Although its affinity for Tf is less than that for TfR1, TfR2 α binds Tf and therefore may participate in cellular iron uptake, while the physiological function of TfR2 β is unknown. Mutations of the TfR2 gene reduce hepcidin expression, resulting in iron overload and indicating that TfR2 may function primarily as a regulator of hepcidin production. However, the precise mechanisms of TfR2 α involvement in cellular iron metabolism have not been elucidated, largely due to lack of information about the properties of the TfR2 α protein. We therefore aimed to characterize the interactions of TfR2 α with Tf by functional assays and atomic force microscopy (AFM), a powerful tool for investigating the interaction between a ligand and its receptor at the single-molecule level on a living cell surface.¹⁵

Results

Total protein contents

TfR1-deficient Chinese hamster ovary (CHO) TRVb cells were transfected with a TfR2 α expression vector or mock vector, with no detectable change in cell morphology observed in culture wells by light microscopy. The total protein contents were 113 ± 20 pg/cell ($n=10$) for wild-type TRVb cells, 127 ± 19 pg/cell ($n=10$) for TRVb-TfR2 α cells, and 120 ± 15 pg/cell ($n=10$) for TRVb mock cells. Thus, transfection of TRVb cells with the TfR2 α expression vector did not cause any remarkable change in cellular protein concentration.

Expression of TfR2 α and its binding to Tf

Transfection of TRVb cells with the TfR2 α expression vector resulted in much higher Tf binding at 4 °C compared to wild-type TRVb cells or the mock-transfected clone (Fig. 1). Tf binding to TRVb cells and TRVb mock cells showed a nonsaturable, almost linear, behavior characteristic

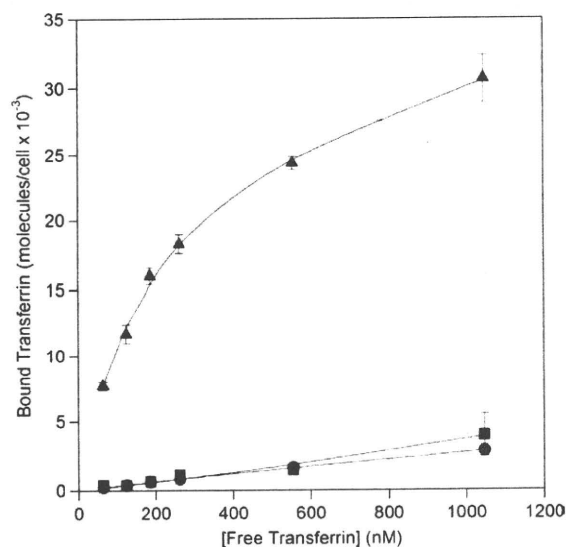


Fig. 1. Tf binding to TRVb (●), TRVb-TfR2 α (▲), and TRVb mock cells (■) at 4 °C. Cells were incubated with [¹²⁵I]Tf at 4 °C for 1 h, washed to remove unbound Tf, and then solubilized for counting. TRVb-TfR2 α cells showed a saturable binding curve, with an association constant of 5.6×10^6 M⁻¹ and 2.8×10^4 binding sites/cell. The experiment was performed in triplicate.

of nonspecific binding. In contrast, expressed cell surface Tf binding sites in TRVb-TfR2 α cells saturated at 2.8×10^4 Tf molecules/cell, with the association constant K_a calculated to be 5.6×10^6 M⁻¹. Since TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells were maintained at 30 μ g/ml puromycin, but TRVb cells were maintained without puromycin, TRVb mock cells were used as controls for further studies.

Cell-associated Tf at 37 °C

Total cell-associated Tf at 37 °C increased as a function of Tf concentration in TRVb-TfR2 α cells (Supplementary Fig. 1). The cell-associated Tf of TRVb mock cells, however, also increased as a function of Tf concentration, even though cell-associated Tf was less than that seen in TRVb-TfR2 α cells. To determine whether transfection was responsible for this increase in cell-associated Tf in mock cells, we measured cell-associated Tf in wild-type TRVb cells at 37 °C. There was no remarkable difference between wild-type TRVb and TRVb mock cells, indicating that transfection itself did not cause the Tf association in mock cells (data not shown). Since TRVb cells lack detectable TfR1, this association with Tf must be receptor-independent. The difference between cell-associated Tf in TRVb-TfR2 α cells and cell-associated Tf in TRVb mock cells as a function of Tf concentration—presumably due to Tf bound to TfR2 α and Tf internalized via TfR2 α in the former, but not in the latter—approached a constant value.