

Table 1. Tf internalized by TRVb-TfR2 α cells via TfR2 α

Procedure	Molecules/cell
[1] Total Tf associated with TRVb-TfR2 α cells after incubation for 1 h at 37 °C	47,800
[2] Cell-associated Tf after acid washing	26,500
[3] Tf removed by acid washing	21,300
[4] Tf initially bound to TfR2 α at the cell surface (10/9 \times [3])	23,700
[5] Tf initially bound to TfR2 α at the cell surface but resistant to acid washing	2370
[6] Tf internalized by all pathways ([2]–[5]), also non-specifically bound and resistant to acid washing	24,100
[7] Tf in mock cells (non-specifically bound and resistant to acid wash)	6600
[8] Tf internalized via TfR2 α in TRVb-TfR2 α cells ([6] and [7])	17,500

sents both internalized Tf and nonspecific cell-surface-bound Tf that are resistant to acid washing. Tf in TRVb-TfR2 α cells was 26,500 molecules/cell, much higher than the 6600 molecules/cell seen in TRVb mock cells (Table 1). Although the effectiveness of the acid wash method is only about 90%, the difference in cell-associated Tf between transfected cells and mock cells is too great to be attributed to residual cell-surface-bound Tf and therefore represents Tf internalized via TfR2 α . We calculate that about 17,500 Tf molecules/cell are internalized by TfR2 α (Table 1).

Iron uptake

Iron uptake by TRVb-TfR2 α cells after 1 h of incubation at 37 °C was not clearly different from that by TRVb mock cells, even though there were small differences at high concentrations of Tf (Fig. 2a). To investigate whether or not induced TfR2 α protein actually can donate iron to the cells, we determined the time course of ^{59}Fe uptake. Only after 1 h did a difference between TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells become clear (Fig. 2b). Thus, TfR2 α -associated Tf could donate iron to cells, although its rate of donation is much less than that provided by Tf associated with TfR1. The data also indicate that CHO cells exhibit receptor-independent iron uptake from Tf, as described earlier.¹⁶

Efflux of Tf

To investigate the fate of Tf taken up through TfR2 α , we incubated TRVb-TfR2 α cells with ^{125}I -labeled Tf and acid-washed them before the time course of efflux was determined (Fig. 3). At time 0, Tf internalization by TRVb-TfR2 α cells was higher than

Efficiency of the acid wash method

Our acid wash method removed approximately 90% of the cell surface membrane-bound Tf in TRVb-TfR2 α cells compared to normal phosphate-buffered saline (PBS) washing (data not shown). In addition to acid washing, washing with F-12 medium was necessary to remove bound Tf, suggesting that, like TfR1, TfR2 α binds apotransferrin at acidic pH but not at neutral pH.¹⁴ Addition of cold Tf into F-12 medium at pH 7.4 did not enhance the effectiveness of washing, verifying that washing at pH 7.4 is sufficient for removing cell-surface-bound apotransferrin.

Evidence for Tf internalization mediated by TfR2 α

After 1 h of incubation at 37 °C, cell-associated Tf in TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells repre-

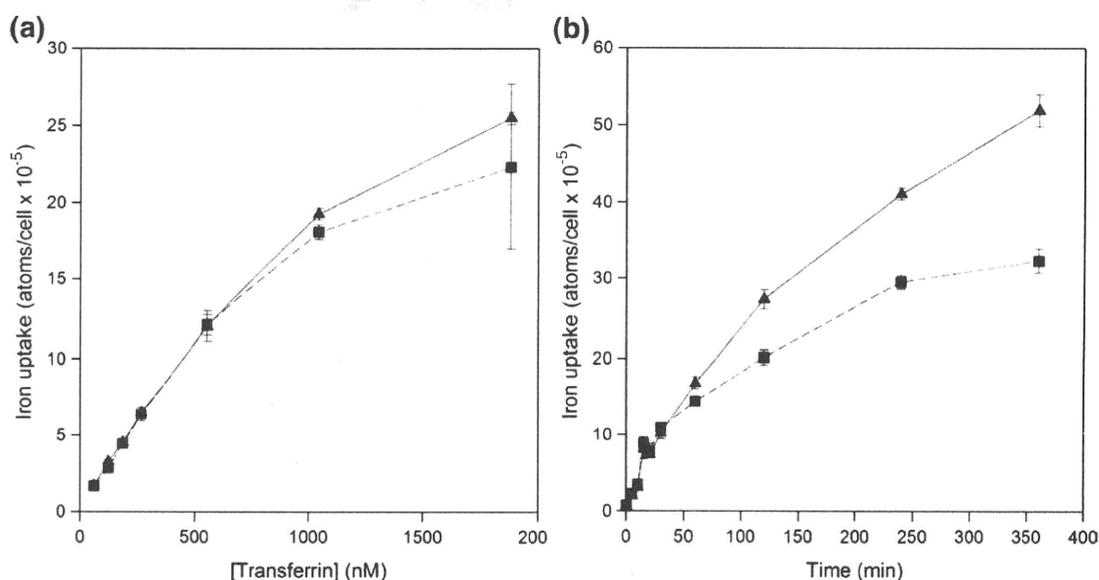


Fig. 2. Iron uptake at 37 °C as a function of Tf concentration (a). TRVb-TfR2 α cells (\blacktriangle) and TRVb mock cells (\blacksquare) were incubated with [^{59}Fe]Tf at 37 °C for 1 h, washed to remove unbound Tf, and then solubilized for counting. This experiment was performed in triplicate. Iron uptake at 37 °C with time was also investigated (b). TRVb-TfR2 α cells (\blacktriangle) and TRVb mock cells (\blacksquare) were incubated with 8.1×10^{-7} M [^{59}Fe]Tf at 37 °C for the indicated time, washed to remove unbound Tf, and then solubilized for counting. This experiment was also performed in triplicate.

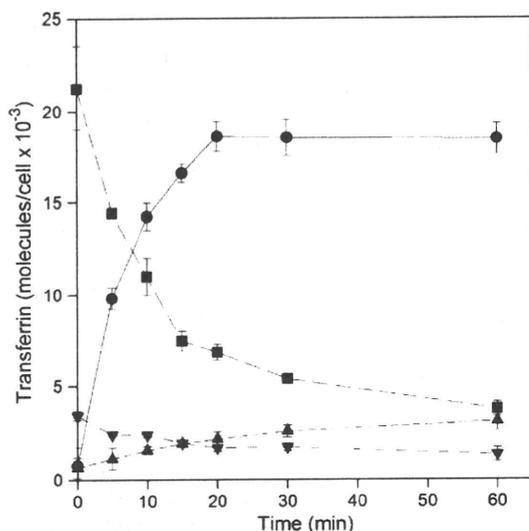


Fig. 3. Time course of Tf efflux. TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells were incubated with 3.5×10^{-7} M [125 I]Tf at 37 °C for 1 h, washed to remove unbound Tf, and then acid-washed to remove Tf bound to cell surface receptors. Cells were then incubated at 37 °C for the indicated times, the medium was collected, and solubilized cells were taken for counting. Tf exocytosed into the medium from TRVb-TfR2 α cells (●) and TRVb mock cells (▲), and Tf retained in TRVb-TfR2 α cells (■) and TRVb mock cells (▼), are shown. Experiments were performed in triplicate.

208 Tf internalization by TRVb mock cells, in keeping
209 with Tf internalization by TfR2 α , as discussed above.
210 Internalized Tf mediated by TfR2 α was exocytosed
211 from TRVb-TfR2 α cells; approximately 80% of Tf
212 taken up via TfR2 α was released by 30 min. The
213 indication is that an effective efflux route exists for Tf
214 taken up by TfR2 α , suggesting that TfR2 α , like TfR1,
215 is recycled by the cells.

216 In a further investigation of the TfR2 α pathway,
217 the degradation of Tf internalized by TfR2 α was
218 determined. After 60 min, approximately 90% of Tf
219 exocytosed from TRVb-TfR2 α cells was precipitable
220 by trichloroacetic acid (TCA)/phosphotungstic acid
221 (PTA), indicating that Tf bound to TfR2 α has
222 recycled without substantial degradation in cells.

223 Pulse-chase study

224 To determine the fraction of cell-membrane-
225 bound Tf that is internalized and the recycling
226 time, we performed a pulse-chase experiment
227 (Supplementary Fig. 2). Almost all Tf initially
228 bound to TfR2 α at 4 °C was released into the culture
229 medium after 10 min of incubation at 37 °C, and
230 there was no significant internalization of cell-
231 surface-bound Tf in the single cycle of this pulse-
232 chase study.

233 Absence of TfR1-TfR2 heterodimers

234 The effectiveness of anti-FLAG M2 antibody and
235 anti-TfR1 antibody in immunoprecipitation had

been confirmed before these experiments were 236
undertaken (data not shown). HuH-7 cells, which 237
express detectable TfR1 by Western blot analysis, 238
were transiently transfected with the TfR2 α expres- 239
sion vector, and cell lysates were taken for 240
immunoprecipitation and Western blot analysis 241
(Supplementary Fig. 3). Western blot analysis by 242
anti-TfR1 antibody for the samples without immu- 243
noprecipitation showed that HuH-7 cells and 244
HuH-7 cells transfected with TfR2 α express almost 245
identical amounts of TfR1. Furthermore, Western 246
blot analysis by anti-TfR1 antibody for the samples 247
not subjected to immunoprecipitation showed that 248
HuH-7 cells transfected with TfR2 α express more 249
TfR2 α proteins than nontransfected HuH-7 cells. 250
These data indicated that the transiently transfected 251
cells overexpressed TfR2 α protein and that 252
the antibodies were highly effective for Western 253
blot analysis. When immunoprecipitation was 254
performed with anti-TfR1 antibody, a band was 255
clearly detected in transfected and nontransfected 256
cells, but no band was found with the anti-TfR2 257
antibody. If a TfR1-TfR2 heterodimer were present, 258
anti-TfR1 antibody would precipitate that 259
protein, and Western blot analysis with anti-TfR2 260
antibody would show the band. When immuno- 261
precipitation was performed with anti-FLAG M2 262
antibody, a 100-kDa band was detected only in 263
transfected cells when the anti-TfR2 antibody was 264
used as the primary antibody in Western blot 265
analysis, indicating that transient transfection 266
resulted in expression of immunoprecipitable 267
TfR2 α protein. No band was detected when anti- 268
TfR1 was used as the primary antibody. Prolonged 269
exposure of the blotted membrane to the develop- 270
ing solution did not make a difference. The 271
possibility that the N-terminal FLAG tag in 272
TfR2 α interferes with dimer formation is unlikely, 273
since the recombinant TfR1 lacking the first 120 N- 274
terminal intracellular residues spontaneously 275
dimerizes.¹⁷ These results indicate that no detect- 276
able heterodimer of TfR1 and TfR2 α was formed 277
by the TfR2 α -transfected HuH-7 cells. Therefore, 278
our experiments detect TfR2, not the heterodimer 279
of TfR1 and TfR2. 280

281 Specificity of detection by AFM

282 HLF cells (human hepatoma) were transiently 283
cotransfected with TfR2 α and green fluorescent 284
protein (GFP) for identification, and tested with a 285
Tf-coated tip. Retraction force curves were recorded 286
with a Tf-coated tip and showed specific unbinding 287
events between Tf on the tip and TfR2 α at the cell 288
surface (in Tris-buffered saline, pH 7.4) (Fig. 4a). 289
The probability of binding between the Tf-coated 290
tip and the TfR2 at the cell surface reached 26% 291
($n=7$ cells). In contrast, when nontransfected cells 292
were tested with a Tf-coated tip, this probability 293
was only 6% ($n=12$ cells, $p<0.001$, t test). This 294
indicated that transient transfection of the TfR2 α 295
expression vector was adequate for the investiga- 296
tion using AFM (Fig. 4b).

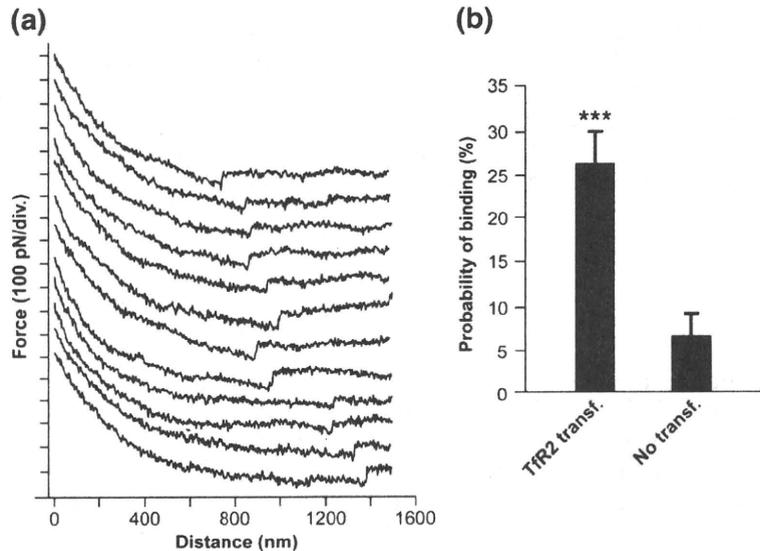


Fig. 4. (a) Retraction force curves on living HLF cells, transfected with TfR2 α . The curves show specific unbinding events between Tf on the probe tip and TfR2 α at the cell surface [in Tris-buffered saline (pH 7.4)]. (b) Specificity of detection by AFM. HLF cells (human hepatoma) were transiently cotransfected with TfR2 α and GFP, and tested with a Tf-coated tip. The probability of binding was 26% ($n=7$ cells). In contrast, on nontransfected cells, the probability was only 6% ($n=12$ cells, $p<0.001$, *** t test).

297 Force histogram for specific interaction between 298 Tf and TfR2 α

299 We recorded 1500 force curves with a Tf-coated
300 tip on TfR2-transfected cells, allowing us to collect a
301 total of 573 specific unbinding events in an
302 experiment performed with a single tip using two
303 cells. Events were analyzed and plotted in a force
304 histogram (Fig. 5). A clear peak was visible on the
305 histogram, showing that the mean unbinding force
306 between Tf on the tip and TfR2 at the cell surface
307 was 63 ± 8 pN (at a mean loading rate of 2.8 nN/s).
308 The experiment was repeated several days later
309 using a new tip with cells independently cultured
310 and gave similar results.

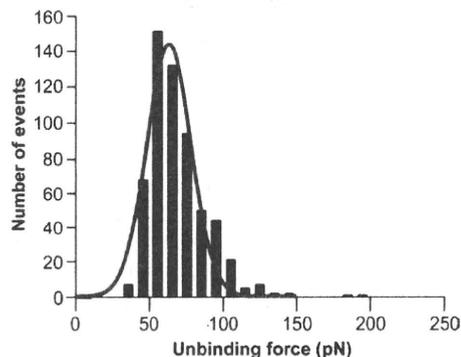


Fig. 5. Force histogram for the specific interaction between Tf and TfR2 α on HLF cells. The histogram was obtained from an analysis of 573 unbinding events collected over 1500 force curves. The mean unbinding force is 63 ± 8 pN for a mean loading rate of 2.8 nN/s. The gray line represents a Gaussian fit.

Dynamic force spectroscopy

311

Dynamic force spectroscopy, which consists of
measuring the mean unbinding force at different
loading rates, was performed with a Tf-coated tip on
TfR2-transfected cells. As expected, the force was
logarithmically dependent on the loading rate (Fig.
6). However, this dependence was small, as the force
varied from 59 ± 9 pN at a rate of 1.7 nN/s to
 62 ± 10 pN at a rate of 20 nN/s. In striking contrast,
the unbinding force between TfR1 and Tf was
reported at 39 ± 5 pN at a rate of 1 nN/s and

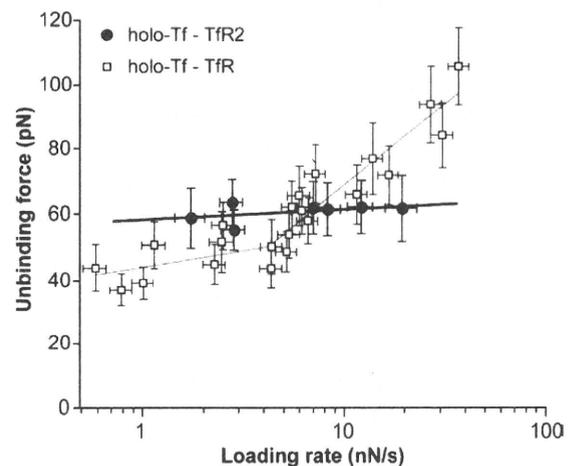
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321

Fig. 6. Dynamic force spectroscopy of Tf-TfR2 α (black dots). The unbinding force is plotted as a function of the loading rate logarithm. For comparison, the force spectrum of Tf-TfR1 is also shown. Only one regime is evident for TfR2, but two can be seen for TfR1, clearly revealing the different interactions of the two proteins with Tf.

322 increased up to 94 ± 12 pN at a rate of 27 nN/s,¹⁵
323 indicating that the binding of Tfr2 α and Tf differs
324 from the binding of Tfr1 and Tf. Furthermore, the
325 force spectrum of Tfr2-transfected cells displayed
326 only one regime (slope), while two regimes were
327 clearly visible for Tfr1-expressing cells (Fig. 6),
328 implying different interactions of Tf with Tfr1 and
329 Tfr2.

330 Discussion

331 In their original publication, Kawabata *et al.*
332 reported that Tfr2 α can bind Tf and donate iron
333 to CHO cells,¹³ therefore supporting cell
334 growth.¹⁴ Fleming *et al.* found that Tfr2 expres-
335 sion is not regulated by intracellular iron status
336 and thus might be involved in the pathogenesis of
337 hemochromatosis.¹⁸ Although Tfr2 is thus shown
338 to function in iron metabolism, its precise
339 physiological role is still unknown.

340 To avoid confusion by Tfr1, our first studies used
341 HuH-7 cells with anti-sense suppressed Tfr1
342 expression.^{19,20} The amount of residual Tfr1,
343 however, was still high, so that it was not possible
344 to differentiate between Tf binding to Tfr1 and Tf
345 binding to Tfr2 α because of the low affinity of
346 Tfr2 α for Tf.¹⁴ We therefore turned to Tfr1-
347 deficient CHO cells for expressing Tfr2 α .^{13,21}

348 In the present study, the affinity of Tfr2 α for Tf
349 was measured in living cells for the first time
350 using [¹²⁵I]Tf to display the binding isotherm at
351 4 °C. The K_a for the binding of Tf by Tfr2 α was
352 calculated to be 5.6×10^6 M⁻¹, about 35-fold less
353 than that for the binding of Tf by Tfr1 (2×10^8 M⁻¹
354 to 3×10^8 M⁻¹ in HuH-7 cells). The lower affinity
355 of Tfr2 α in transfected CHO cells is in accordance
356 with a previous report based on a qualitative
357 study by flow cytometry.¹⁴ Quantification by
358 surface plasmon resonance using a recombinant
359 soluble extracellular portion of the receptor gave a
360 binding constant of 37×10^6 M⁻¹, consistent with
361 the present result, considering the difference in
362 methodology.²² The deduced amino acid sequence
363 of the extracellular domain of Tfr2 α protein is 45%
364 identical and 66% similar to that of Tfr1. Tfr2 α
365 also possesses the RGD triad (amino acids 678–
366 680),¹³ which is thought to be critical for binding
367 Tf to Tfr1.²³ The lower affinity of Tfr2 α for Tf is
368 now, therefore, not explicable.

369 Although the affinity of Tfr2 α for Tf is much
370 less than that of Tfr1, the concentration of iron-
371 bearing Tf in the circulation (about 3×10^{-5} M) is
372 sufficient to saturate Tfr2 α . Tfr2 α expression has
373 been found in cells with active roles in iron
374 metabolism. Liver, the principal organ of iron
375 storage, expresses a high level of Tfr2 α mRNA, as
376 do human hepatoma-derived HepG2 cells¹³ and
377 HuH-7 cells (unpublished observation). K562 cells,
378 of human myelogenous erythroleukemic origin,
379 also express Tfr2 α mRNA.¹³ Studies of iron
380 uptake from Tf prior to the discovery of Tfr2
381 did not discriminate between the roles of the two

receptors. In future studies, therefore, both recep- 382
tors require consideration. 383

384 Binding of Tf to TRVb-Tfr2 α and TRVb mock
385 cells at 4 °C was only 25–50% inhibited by a 100-fold
386 excess of unlabeled Tf, possibly because of large,
387 essentially nonsaturable binding. We therefore
388 resorted to the use of a binding isotherm with
389 terms for specific (saturable) and nonspecific (non-
390 saturable) binding to estimate the binding constants
391 for each type of binding.²⁴ Curve-fitted parameters
392 for specific binding attributable to transfected Tfr2 α
393 were as follows: K_{av} , 5.6×10^6 M⁻¹; total number of
394 sites, 2.8×10^4 cell⁻¹. These contrast with binding
395 constants near 10^8 M⁻¹ and site numbers in the
396 range of 2×10^5 cell⁻¹ to 5×10^5 cell⁻¹ for Tf binding
397 in K562 cells when Tfr1 predominates and curve-
398 fitting to a single class of sites adequately accounts
399 for binding. An apparent binding constant of
400 6.5×10^9 M⁻¹ is obtained for the nonsaturable
401 binding of Tf to TRVb-Tfr2 α cells, substantially
402 weaker than that derived for specific binding. At Tf
403 concentrations of 10^{-6} M, for example, saturable
404 binding would account for about 24,000 Tf mole-
405 cules/cell, while nonsaturable binding would ac-
406 count for 6500 molecules/cell. Nevertheless, both
407 Tfr2 α -dependent binding and nonspecific binding
408 contribute to the association of Tf with the cells.

409 In the present study, CHO cells showed a
410 receptor-independent association with Tf that
411 should be considered when investigating the func-
412 tion of Tfr2 α expressed in CHO cells. We find a
413 clear increase in cell-associated Tf after Tfr2 α
414 expression. Since cell-associated Tf represents both
415 cell-surface-bound Tf and Tf internalized via Tfr2 α ,
416 a proof of Tf internalization mediated by Tfr2 α was
417 required. Cell-associated Tf persisting after acid
418 washing confirmed the existence of Tf internaliza-
419 tion via Tfr2 α .

420 After internalization, an efflux of Tf, without
421 substantial degradation, is found. Thus, Tf inter-
422 nalized by Tfr2 α , like Tf internalized by Tfr1,
423 recycles. An important difference between the two
424 receptors was observed in a pulse-chase study. Less
425 than 12% of Tf bound to the cell surface of TRVb-
426 Tfr2 α cells is internalized, with most of the Tf
427 dissociated and released to the medium at 37 °C. In
428 contrast, approximately 30–50% of membrane-
429 bound Tf was internalized by human-hepatoblas-
430 toma-derived HepG2 cells¹² and human-hepatoma-
431 derived HLF cells.²⁵ The lower affinity of Tfr2 α for
432 Tf may help account for the difference between
433 previous studies and the present work, since
434 HepG2 and HLF cells express Tfr1, but TRVb-
435 Tfr2 α cells do not. In our pulse-chase study, no
436 detectable internalization of membrane-bound Tf in
437 a single cycle was found when the occupancy of
438 Tfr2 α by transferrin was about 75%. In normal
439 circulation, however, the concentration of iron-
440 bearing Tf is close to 3×10^{-5} M, so that cell surface
441 receptors are always saturated with Tf and replen-
442 ished as Tf is internalized. Tfr2 α might therefore
443 normally function in iron uptake from Tf, but this
444 has yet to be experimentally confirmed.

Q1

445 Overexpressed TfR2 α protein was also shown to
 446 mediate iron uptake, although its rate of iron
 447 donation was slow. We estimate, from the differ-
 448 ence between iron uptake by TRVb-TfR2 α cells and
 449 iron uptake by TRVb mock cells in Fig. 2b, that the
 450 rate of iron uptake was approximately 0.2 atom/
 451 receptor/min when cells were incubated with
 452 8.1×10^{-7} M Tf. For comparison, the rate of iron
 453 uptake via TfR1 was about 0.5–1 atom/receptor/
 454 min in K562 cells. Thus, TfR2 α may function in iron
 455 uptake from Tf, albeit with less efficiency than
 456 TfR1.

457 Because of the sequence similarities between TfR1
 458 and TfR2 α , the possibility that the protein mono-
 459 mers combine to form heterodimers was investi-
 460 gated. However, no detectable expression of
 461 heterodimers was found in the present studies.
 462 The possibility that our transfection procedure in
 463 HuH-7 cells yielded two different cell populations
 464 (one expressing TfR2 α and the other failing to do
 465 so) must be considered, so that expression of
 466 heterodimers was too low for detection. We cannot
 467 exclude the possibility of heterodimer formation
 468 that might be detected by more sensitive methods
 469 or in other cells.

470 AFM was used to characterize the interactions
 471 between Tf and TfR2 α protein at the single-
 472 molecule level. We found that the unbinding force
 473 needed to detach Tf from TfR2 α (63 ± 8 pN) was
 474 different from the unbinding force needed to
 475 detach Tf from TfR1, previously reported as $56 \pm$
 476 7 pN.¹⁵ However, dynamic force measurements
 477 revealed striking differences between Tf-TfR1 and
 478 Tf-TfR2 α interactions, which reflected clearly
 479 distinct energy landscapes.¹⁵ While Tf-TfR1 un-
 480 binding is characterized by two energy barriers,
 481 only one is present for Tf-TfR2. This obvious
 482 difference might arise from different binding
 483 points for Tf-TfR1 and Tf-TfR2 α interactions. In
 484 addition, this possibility provides a structural
 485 interpretation for the energy barriers postulated
 486 here. We speculate that the two barriers of the Tf-
 487 TfR1 interaction stem from the binding of both
 488 lobes of Tf (C-lobe and N-lobe), whereas the
 489 single barrier of Tf-TfR2 α interaction originates
 490 from the binding of a single lobe, but we
 491 recognize that this speculation requires further
 492 investigation.

493 In conclusion, the present study shows that
 494 TfR2 α protein functions in binding Tf and taking
 495 up iron, and that there must be a difference
 496 between TfR1 and TfR2 in their interactions with
 497 Tf, as revealed by AFM. TfR2 α mRNA lacks an
 498 IRE, so that expression is not regulated by
 499 intracellular iron status¹⁸ but possibly by cell
 500 cycle.¹⁴ Furthermore, TfR2 cannot compensate for
 501 TfR1 in TfR1 knockout mice, which lack a
 502 functional Tf cycle and do not survive gestation.²⁶
 503 A nonsense mutation of the human TfR2 gene
 504 causes a hemochromatosis-like disorder.^{27,28} The
 505 physiological functions of TfR2 are therefore still
 506 unclear, although it likely contributes to the
 507 regulation of cellular iron status.

Q2

Materials and Methods

508

Cells and cell culture

509

TfR1-deficient CHO TRVb cells²¹ were grown in F-12
 Nutrients Mixture (Invitrogen, Grand Island, NY) supple-
 mented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum
 (Gemini Bio-Products, Woodland, CA), 100 U/ml penicil-
 lin, and 100 μ g/ml streptomycin. All cultures were
 maintained at 37 °C in 5% CO₂.

514

515

TfR2 α expression vector

516

Total RNA was extracted from K562 cells using the
 RNAgent Total RNA Isolation System (Promega, Mad-
 ison, WI) following the manufacturer's instructions.
 Complementary DNA was reverse-transcribed from
 1 μ g of RNA using an oligo-dT primer (Promega) and
 MMLV reverse transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA),
 and human TfR2 α cDNA was amplified by hot-start
 PCR. A FLAG sequence was added to the 5'-terminus of
 the cDNA to enable detection of expressed protein by
 anti-FLAG antibodies. The oligonucleotides used as PCR
 primers were 5'-ACCTTAAGGCCACCATGGATTA-
 CAAGGATGACGACGATAAGATGGAGCGGCTTTG-3'
 and 5'-GGTTCGAAGCAATGAGAGGTGGAC-3'. The
 conditions for amplification were as follows: 40 cycles
 of 99 °C for 1 min, 65 °C for 2 min, and 72 °C for 5 min.
 The amplified DNA fragment was digested with AflII
 and BstBI, and then inserted into the bicistronic
 mammalian expression vector pIRESpuo2 (Clontech,
 Palo Alto, CA). The orientation and sequence of the
 inserted TfR2 α cDNA fragment were confirmed by
 sequencing.

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

Transfection

538

TRVb cells were grown in 35-mm six-well plates until
 they had reached 70–80% confluence, then they were
 transfected with the TfR2 α expression vector using
 Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA). Selection
 was performed with 10 μ g/ml puromycin (Clontech) for
 2 weeks, and then the concentration of the antibiotic was
 raised to 30 μ g/ml in order to isolate a clone with high-
 level expression of TfR2 α . After another 2 weeks, one
 viable colony (TRVb-TfR2 α) was obtained and then
 subcultured using a cloning cylinder. As mock-trans-
 fected controls, TRVb cells were transfected with the
 pIRESpuo2 vector without a cDNA insert, and one clone
 was isolated after 4 weeks of selection (TRVb mock cells).
 These transfectants were maintained at 30 μ g/ml
 puromycin after isolation. Expression of TfR2 α mRNA
 was confirmed by reverse transcriptase PCR, and the
 expression of TfR2 α protein was confirmed by immuno-
 precipitation–Western blot analysis using anti-FLAG
 antibodies (data not shown).

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

Total protein content

558

The total protein contents of TRVb, TRVb-TfR2 α , and
 TRVb mock cells were determined with the Bio-Rad
 Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) using bovine
 serum albumin (BSA) as standard. Cells were counted
 with a hemocytometer.

559

560

561

562

563

564 **Iodination of Tf**

565 Human Tf (Boehringer-Mannheim, Germany) was
566 labeled with ^{125}I (Amersham Pharmacia Biotech, Piscat-
567 away, NJ) by the iodine monochloride method of
568 McFarlane.²⁹ To remove unbound ^{125}I , we passed labeled
569 Tf through a 10-DG desalting column (Bio-Rad) two times.
570 Specific activities were observed in the range of 100–
571 200 cpm/ng Tf, and more than 95% of ^{125}I was protein-
572 bound as determined by precipitation with 20% TCA/4%
573 PTA.

574 **^{59}Fe labeling of Tf**

575 Iron was removed from Tf, and labeling with ^{59}Fe was
576 carried out by previously described methods.³⁰ Specific
577 activities were in the range of 2000–3500 cpm/ng Fe. In
578 some experiments, apotransferrin was labeled with ^{125}I , as
579 described above, and then loaded with ^{59}Fe .

580 **Binding assay**

581 Tf binding assays were performed as previously
582 reported.³¹ Cell numbers were calculated from protein
583 concentrations determined with the Bio-Rad Protein
584 Assay Kit. Each experiment was performed in triplicate.
585 The total number of specific binding sites per cell and the
586 K_a for the binding of Tf to these sites were estimated from
587 nonlinear least-squares curve fitting to a saturable binding
588 isotherm:³²

$$\text{occupied sites} = \frac{\text{total sites} \times K_a[\text{Tf}]}{1 + K_a[\text{Tf}]}$$

589 from which it is also possible to calculate the fraction of
591 sites occupied by Tf at any concentration of free Tf.

592 **Tf and iron uptake**

593 Cells were plated at a density of 1×10^6 cells/well in 35-
594 mm six-well plates 24 h before the experiments. Cells were
595 preincubated with F-12 three times for 10 min at 37 °C,
596 chilled on ice for 30 min, and then incubated at 37 °C with
597 F-12 containing 2% BSA and labeled Tf at indicated
598 concentrations and times. Cells were then washed with
599 ice-cold PBS five times and solubilized by 0.1% Triton X-
600 100 for counting.

601 **Acid washing of cells**

602 To remove cell-surface-receptor-bound Tf, we washed
603 cells with ice-cold PBS five times and then incubated them
604 with ice-cold acid wash buffer [0.025 M citric acid, 0.025 M
605 sodium citrate, 200 μM deferoxamine mesylate, and
606 0.15 M sucrose (pH 4.0)] for 3 min, followed by two 2-
607 min incubations with ice-cold F-12 medium to remove
608 cell-surface-bound apotransferrin. Finally, the cells were
609 washed once more with ice-cold PBS. This method
610 removed approximately 90% of surface-bound Tf in
611 TRVb-TfR2 α cells.

612 **Efflux of Tf from cells**

613 Cells, plated at a density of 1×10^6 cells/well in 35-mm
614 six-well-plates 24 h before the experiments, were

preincubated with F-12 three times for 10 min at 37 °C, 615
chilled on ice for 30 min, and then incubated with F-12 616
containing 2% BSA and 3.5×10^{-7} M ^{125}I -labeled Tf for 617
60 min at 37 °C. After acid washing, fresh F-12 medium 618
was added, and cells were again incubated at 37 °C. At 619
indicated times, F-12 media were collected, and cells were 620
washed with ice-cold PBS and solubilized by 0.1% Triton 621
X-100. Media and cell lysates were then taken for γ - 622
counting. After counting, media were incubated with 10% 623
TCA/2% PTA for 30 min on ice, and then centrifuged at 624
14,000 rpm in an Eppendorf centrifuge for 20 min. Tf 625
degradations were calculated from the radioactivities of 626
supernatants and precipitates. 627

589 **Pulse-chase study** 628

TRVb-TfR2 α cells were incubated with 5.1×10^{-7} M 629
[^{125}I]Tf, as previously described, for 1 h at 4 °C. Cells were 630
then washed with ice-cold PBS five times. Fresh F-12 631
medium was added, and cells were incubated at 37 °C. At 632
indicated times, cells were chilled on ice, and media were 633
immediately collected. Cells were again washed with ice- 634
cold PBS, and media were collected. Cells were then acid 635
washed to quantify surface-bound Tf and solubilized for 636
the measurement of intracellular Tf. 637

589 **Immunoprecipitation–Western blot analysis** 638

Human-hepatoma-derived HuH-7 cells were transiently 639
transfected with the TfR2 α expression vector, as 640
described above. At 48 h after transfection, 5×10^6 cells 641
were washed with PBS five times and collected with a cell 642
scraper. Harvested cells were dissolved in 40 μl of the cell 643
extraction buffer of the Mammalian Cell Extraction Kit 644
(BioVision Incorporated, Mountain View, CA) following 645
the manufacturer's instructions for Western blot analysis 646
without immunoprecipitation, or in 1.5 ml of lysis buffer 647
[10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM 648
ethylenediaminetetraacetic acid, and 1 mM PMSF con- 649
taining 1:2000 Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer- 650
Mannheim; pH 7.4)] for immunoprecipitation–Western 651
blot analysis. Freezing and thawing were performed 652
three times, following which samples were centrifuged at 653
2700g. Protein G Sepharose (Amersham Biosciences, 654
Uppsala, Sweden) was added, and preparations were 655
incubated at 4 °C for 8 h, then centrifuged at 1500g for 656
5 min. Supernatants were then collected for incubation 657
with anti-FLAG M2 antibody (Sigma), which recognizes 658
FLAG at any location in the target protein, or with anti- 659
TfR1 antibody (Zymed Laboratory, South San Francisco, 660
CA) for 8 h at 4 °C. Protein G Sepharose was added, and 661
incubation continued for an additional 8 h at 4 °C. 662
Samples were centrifuged at 1500g for 5 min, and pellets 663
were washed with PBS five times. Concentrated dye 664
buffer was added, and final concentrations were adjusted 665
to 10 mM Tris–HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic 666
acid, 2.5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, and 0.01% 667
bromophenol blue (pH 8.0). Samples were then immersed 668
in boiling water for 5 min and centrifuged at 20,000g for 669
5 min to remove precipitated material. Electrophoresis 670
using a 12% gradient polyacrylamide gel and transfer to a 671
nitrocellulose membrane were carried out. The transfer 672
membrane was incubated with anti-TfR2 antibody (9F8 673
1C11) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 674
diluted 1:200 or with anti-TfR1 antibody diluted 1:1000, 675
and then with horseradish-peroxidase-conjugated goat 676
anti-mouse IgG antibody (R&D Systems, Minneapolis, 677

678 MN) diluted 1:2000. SuperSignal West Pico Chemilumi-
679 nescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL) was
680 used as development substrate.

681 Atomic force microscopy

682 The details of the methods for investigation using AFM
683 were previously reported.¹⁵ In brief, the probe of AFM is a
684 sharp tip placed at the end of a soft cantilever. A
685 piezoelectric scanner allows the precise positioning of
686 the tip relative to the sample. A laser beam reflected on the
687 cantilever backside and detected by photodiodes is used
688 to measure cantilever deflection. This signal is either used
689 as feedback to control the scanner (imaging mode) or
690 measured and converted into force (force spectroscopy
691 mode). Since the cantilever is mounted under the scanner,
692 the optical path is free, and AFM can be coupled to an
693 optical microscope. Tf was linked to the AFM tip by a
694 three-step functionalizing protocol. First, SiN tips are
695 aminosilanized by exposure to APTES vapors. Second, a
696 heterobifunctional polyethylene glycol linker is anchored
697 to amino-group-bearing tips through its NHS end. Third,
698 Tf is attached to the polyethylene glycol linker free end via
699 a maleimide–cysteine bond.

700 Measuring the interaction force between Tf and 701 TfR2 α by AFM

702 HLF cells (human hepatoma) were cotransfected with
703 TfR2 α and GFP for identification, as previously
704 described.³³ A Tf-coated tip was brought in contact with
705 the cell surface, allowing the proteins to bind. The tip was
706 then retracted, resulting first in protein stretching, then
707 unbinding. Cantilever deflections during one cycle are
708 recorded in a force curve. A binding–unbinding event
709 between Tf and TfR2 α is represented by a sawtooth
710 pattern on the curve. It allows calculation of the force
711 necessary to unbind the two proteins, using the cantilever
712 spring constant (Hooke's law). The mean unbinding force
713 is obtained by fitting a Gaussian curve to the force
714 histogram. The error on the mean unbinding force is
715 calculated by adding the standard deviation of the sample
716 and the error resulting from the spring constant calibra-
717 tion (10%). Moreover, the unbinding force is related to the
718 pulling rate by:

$$F^* = \frac{k_B T}{x} \ln\left(\frac{x}{k_0 k_B T}\right) + \frac{k_B T}{x} \ln(r_f)$$

720 where F^* is the most probable unbinding force, k_0 is the
721 dissociation rate constant, r_f is the loading rate applied, x
722 is the width of the energy barrier along the direction of the
723 applied force, k_B is the Boltzmann constant, and T is
724 temperature.

725 Acknowledgements

726 We are grateful to Dr. Timothy E. McGraw for
727 providing the CHO TRVb cells used in this study.
728 This work was supported, in part, by grants 1
729 PO1 DK55495 and 5 RO1 DK015056 from the
730 National Institutes of Health, US Public Health
731 Service, USA.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article
can be found, in the online version, at doi:10.1016/
j.jmb.2010.01.026

References

1. Kühn, L. C., McClelland, A. & Ruddle, F. H. (1984). Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell*, **37**, 95–103.
2. Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A. *et al.* (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* **13**, 399–408.
3. Feder, J. N., Penny, D. M., Irrinki, A., Lee, V. K., Lebrón, J. A., Watson, N. *et al.* (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1472–1477.
4. Lebrón, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., Chirino, A. J., Snow, P. M., Mintier, G. A. *et al.* (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*, **93**, 111–123.
5. Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Tsuchihashi, Z., Feder, J. N. *et al.* (1997). Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 12384–12389.
6. Roy, C. N., Penny, D. M., Feder, J. N. & Enns, C. A. (1999). The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 9022–9028.
7. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F. *et al.* (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482–488.
8. Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D. & Andrews, N. C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1148–1153.
9. Gruenheid, S., Canonne-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D. J., Grinstein, S. & Gros, P. (1999). The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* **189**, 831–841.
10. Klausner, R. D., Van Renswoude, J., Ashwell, G., Kempf, C., Schechter, A. N., Dean, A. & Bridges, K. R. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 4715–4724.
11. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. F. (1983). pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **80**, 2258–2262.
12. Ciechanover, A., Schwartz, A. L., Dautry-Varsat, A. & Lodish, H. F. (1983). Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J. Biol. Chem.* **258**, 9681–9689.
13. Kawabata, H., Yang, S., Hirama, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F. & Koeffler, H. P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* **274**, 20826–20832.

- 797 14. Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. T., Nakamaki, 837
 798 T., Said, J. W. & Koeffler, H. P. (2000). Transferrin 838
 799 receptor 2- α supports cell growth both in iron- 839
 800 chelated cultured cells and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **275**, 840
 801 16618–16625.
- 802 15. Yersin, A., Osada, T. & Ikai, A. (2008). Exploring 841
 803 transferrin–receptor interactions at the single-mole- 842
 804 cule level. *Biophys. J.* **94**, 230–240.
- 805 16. Chan, R. Y. Y., Ponka, P. & Schulman, H. M. (1992). 843
 806 Transferrin-receptor-independent but iron-dependent 844
 807 proliferation of variant Chinese hamster ovary cells. 845
 808 *Exp. Cell Res.* **202**, 326–336.
- 809 17. Lawrence, C. M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, 846
 810 R., Borhani, D. W. & Harrison, S. C. (1999). Crystal 847
 811 structure of the ectodomain of human transferrin 848
 812 receptor. *Science*, **286**, 779–782.
- 813 18. Fleming, R. E., Migas, M. C., Holden, C. C., Waheed, 849
 814 A., Britton, R. S., Tomatsu, S. *et al.* (2000). Transferrin 850
 815 receptor 2: continued expression in mouse liver in the 851
 816 face of iron overload and in hereditary hemochroma- 852
 817 tosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 2214–2219.
- 818 19. Trinder, D., Zak, O. & Aisen, P. (1996). Transferrin 853
 819 receptor-independent uptake of diferric transferrin by 854
 820 human hepatoma cells with antisense inhibition of 855
 821 receptor expression. *Hepatology*, **23**, 1512–1520.
- 822 20. Sasaki, K., Zak, O. & Aisen, P. (1993). Antisense 856
 823 suppression of transferrin receptor gene expression in 857
 824 a human hepatoma cell (HuH-7) line. *Am. J. Hematol.* 858
 825 **42**, 74–80.
- 826 21. McGraw, T. E., Greenfield, L. & Maxfield, F. R. (1987). 859
 827 Functional expression of the human transferrin receptor 860
 828 cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in 861
 829 endogenous transferrin receptor. *J. Cell Biol.* **105**, 862
 830 207–214.
- 831 22. West, A. P., Jr., Bennett, M. J., Sellers, V. M., Andrews, 863
 832 N. C., Enns, C. A. & Bjorkman, P. J. (2000). 864
 833 Comparison of the interactions of transferrin receptor 865
 834 and transferrin receptor 2 with transferrin and the 866
 835 hereditary hemochromatosis protein HFE. *J. Biol.* 867
 836 *Chem.* **275**, 38135–38138.
- 837 23. Dubljevic, V., Sali, A. & Goding, J. W. (1999). A 838
 839 conserved RGD (Arg–Gly–Asp) motif in the transferrin 840
 841 receptor is required for binding to transferrin. *Biochem.* 842
 843 *J.* **341**, 11–14.
- 844 24. Osterloh, K. & Aisen, P. (1989). Pathways in the 845
 846 binding and uptake of ferritin by hepatocytes. *Biochim.* 847
 848 *Biophys. Acta*, **1011**, 40–45.
- 849 25. Ikuta, K., Fujimoto, Y., Suzuki, Y., Tanaka, K., Saito, 849
 850 H., Ohhira, M. *et al.* (2000). Overexpression of 851
 852 hemochromatosis protein, HFE, alters transferrin 853
 853 recycling process in human hepatoma cells. *Biochim.* 854
 854 *Biophys. Acta*, **1496**, 221–231.
- 855 26. Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F. & Andrews, 855
 856 N. C. (1999). Transferrin receptor is necessary for 857
 857 development of erythrocytes and the nervous system. 858
 858 *Nat. Genet.* **21**, 396–399.
- 859 27. Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., 859
 860 Garozzo, G., Carella, M. *et al.* (2000). The gene TFR2 is 860
 861 mutated in a new type of haemochromatosis mapping 861
 862 to 7q22. *Nat. Genet.* **25**, 14–15.
- 863 28. Roetto, A., Totaro, A., Piperno, A., Piga, A., Longo, F., 862
 864 Garozzo, G. *et al.* (2001). New mutations inactivating 863
 865 transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. 864
 866 *Blood*, **97**, 2555–2560.
- 867 29. McFarlane, A. S. (1963). *In vivo* behavior of I- 865
 868 fibrinogen. *J. Clin. Invest.* **42**, 346–361.
- 869 30. Young, S. P. & Aisen, P. (1980). The interaction of 866
 870 transferrin with isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys.* 867
 871 *Acta*, **633**, 145–153.
- 872 31. Zak, O., Trinder, D. & Aisen, P. (1994). Primary 868
 873 receptor-recognition site of human transferrin is in the 869
 874 C-terminal lobe. *J. Biol. Chem.* **269**, 7110–7114.
- 875 32. Klotz, I. M. & Hunston, D. L. (1971). Properties of 870
 876 graphical representations of multiple classes of 871
 877 binding sites. *Biochemistry*, **10**, 3065–3069.
- 878 33. Yersin, A., Hirling, H., Kasas, S., Roduit, C., Kulan- 872
 879 gara, K., Dietler, G. *et al.* (2007). Elastic properties of 873
 880 the cell surface and trafficking of single AMPA 874
 881 receptors in living hippocampal neurons. *Biophys. J.* 875
 882 **92**, 4482–4489.

NAFLDにおける非トランスフェリン結合鉄 (NTBI)

測定意義に関する検討

旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野
 大竹 孝明 生田 克哉 澤田 康司 阿部 真美
 三好 茂樹 鈴木 康秋 高後 裕
 旭川医科大学 消化管再生修復医学講座
 佐々木勝則

1. はじめに

鉄は生体にとって必須の金属栄養素であるが、過剰状態になると反応性に富む自由鉄が増え、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生することによって細胞毒性を呈し、肝障害、心不全、糖尿病、甲状腺、副腎などの内分泌機能障害、神経障害などの種々の臓器不全を引き起こす。もともと生体鉄代謝における鉄供給はごく微量が消化管から吸収されるが、そのほとんどがマクロファージにおける老廃赤血球のヘモグロビン鉄の再利用による半閉鎖的な代謝系からなり、絶妙な調節のもとにその恒常性が保たれている¹⁾。そして血中の鉄のほとんどがトランスフェリン (Tf) に結合した Tf 結合鉄として存在し輸送されている。通常、Tf は 30% 程度しか飽和されておらず、血中に細胞毒性の強い非トランスフェリン結合鉄 (non-transferrin-bound iron: NTBI) はほとんど存在しない。しかし、大量輸血、鉄剤の過剰投与、慢性炎症、慢性肝疾患などの病態で鉄過剰症になると Tf の鉄結合能を超えて、血中に NTBI が出現してくる。NTBI の細胞内への取り込みは制御機構がなく、非選択的に全身の実質臓器の各種細

胞内に取り込まれ、Fenton 反応・Haber-Weiss 反応を介してラジカルを産生し、臓器障害をもたらす²⁾。

血中の NTBI の測定は困難で実用化されておらず、測定結果に対する臨床的意義に関しても確立していない。非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) でも軽度から中等度の肝内鉄過剰蓄積が認められ、肝細胞内の過剰な不安定自由鉄が酸化ストレスを増強し、炎症、線維化、肝発癌に関与することが知られている³⁾。今回、我々は NAFLD 患者の血清 NTBI 濃度の測定し、その臨床的意義を検討した。

2. 対象と方法

対象患者：1999 年から 2008 年までに旭川医科大学病院で診断された NAFLD 患者 37 名と健常ボランティア 40 名で、血清 ALT 値が男性 30IU/L 以下 (19 名)、女性 20IU/L 以下 (14 名) をコントロールとした。

血清 NTBI 測定法：Metal free HPLC system を用いた⁴⁾。概要を以下に述べる。

- ① 血清にコバルト溶液を添加し、コバルトイオンで Apo-Tf をブロックする。

Clinical importance of serum NTBI in patients with NAFLD.

Takaaki Ohtake, Katsuya Ikuta, Koji Sawada, Masami Abe, Shigeki Miyoshi, Yasuaki Suzuki, Yutaka Kohgo, Katsunori Sasaki, Asahikawa Medical College.

- ② NTA (Nitrilotriacetic acid) 溶液を添加し, Tfに結合していない不安定鉄 (NTBI) を捕捉する.
- ③ NTBIを捕捉したNTAを限外濾過で, Tf, フェリチンなどから分離する.
- ④ 分離したNTBIをNTAからさらに高親和性鉄キレート剤CP-22に置換する.
- ⑤ Metal free HPLC systemで測定し, 標準試料から作成した標準曲線から鉄イオン濃度を算出する.

3. 結果

NAFLD症例の血清ALT(中央値)は男性49IU/L, 女性64IU/Lで, 健常ボランティアの男

性18IU/L, 女性11.5IU/Lに比べて有意に上昇していた($p < 0.0001$) (図1A). 鉄代謝に関連して赤血球ヘモグロビンは両性ともNAFLDと健常者とでは差を認めなかった(図1B). 貯蔵鉄のマーカである血清フェリチン(中央値)はNAFLD症例の男性316.3ng/mL, 女性90.3ng/mLで, 健常者の男性136ng/mL, 女性15.3ng/mLに比べて有意に上昇していた($p = 0.001$) (図1C). 血清トランスフェリン飽和度(%Tf)は上昇傾向を認めるが有意ではなかった(図1D). NAFLD症例では軽度から中等度の高トランスアミナーゼ血症と軽度の鉄過剰症があることが確認された.

これらの対象に対して血清非トランスフェリン

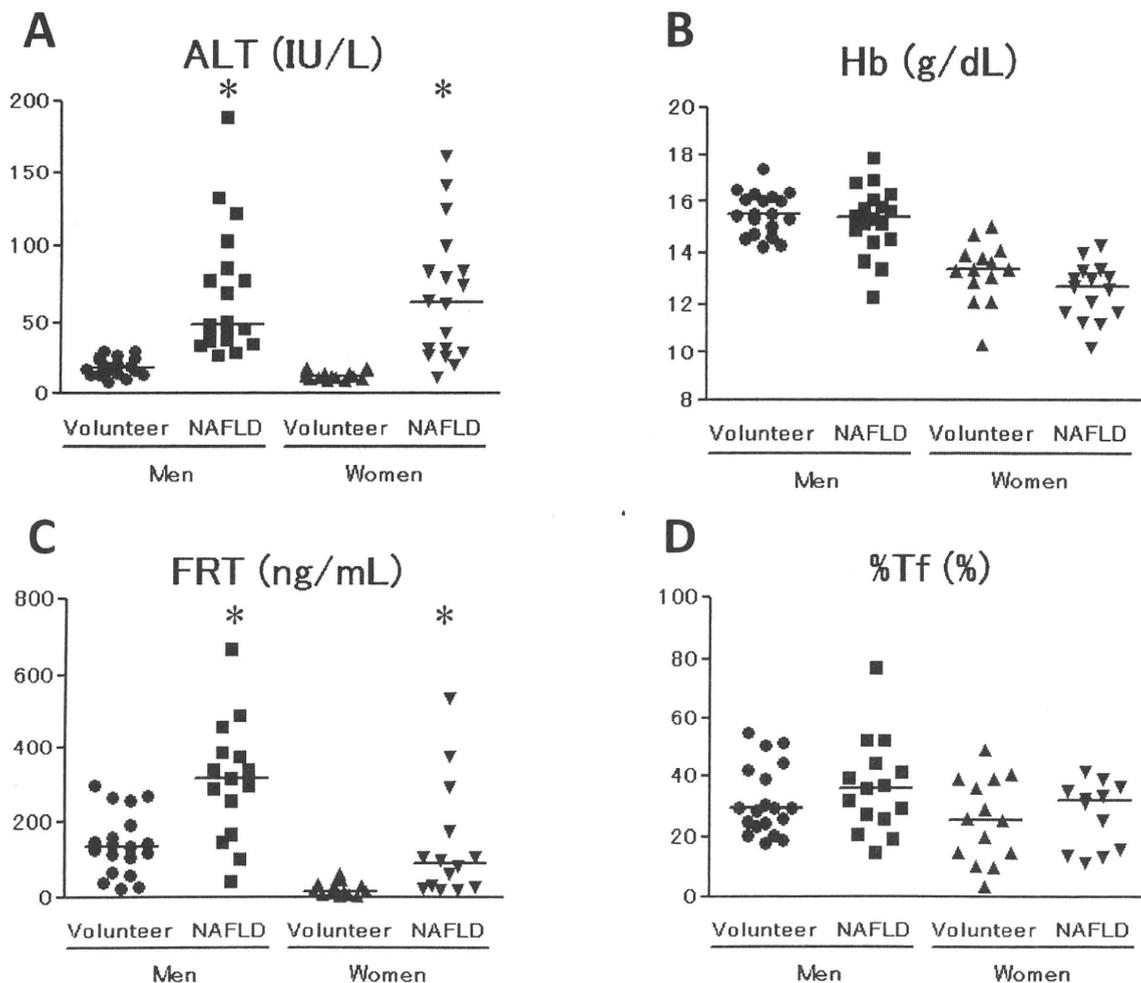


図1 健常ボランティアとNAFLD症例の血液生化学検査および鉄関連マーカー。(A)血清ALT値, $*p < 0.0001$ (Mann-Whitney). (B)ヘモグロビン値(Hb). (C)血清フェリチン値(FRT), $*p = 0.001$ (Mann-Whitney). (D)血清トランスフェリン飽和度(%Tf).

結合鉄濃度 (NTBI) を測定した. 健常者が $0.20 \pm 0.14 \mu\text{M}$, NAFLD 症例が $0.27 \pm 0.24 \mu\text{M}$, 男性が健常者 $0.22 \pm 0.15 \mu\text{M}$, NAFLD 症例 $0.31 \pm 0.26 \mu\text{M}$, 女性が健常者 $0.18 \pm 0.12 \mu\text{M}$, NAFLD 症例 $0.22 \pm 0.22 \mu\text{M}$ であった (図 2A). NAFLD 男性例では健常ボランティアの 75% パーセンタイル以上 ($0.31 \mu\text{M}$) を示す症例が 47% 存在し, NTBI が高い傾向があった (図 2C).

健常ボランティア, NAFLD 症例に関して血清フェリチンまたは % Tf と NTBI との相関を見ると健常者, NAFLD 症例ともに血清フェリチンと NTBI とに相関関係はない. 一方, 健常者では明らかではないが, NAFLD 症例においては % Tf と NTBI が正の相関を認めた ($r^2 = 0.3381$, $p = 0.0015$) (図 3D).

【症例提示】

60 歳, 女性, 糖尿病, 高血圧症, 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) でフォローされている. 降圧剤の投薬をされているが, 糖尿病は食事療法のみで血糖コントロールは良好である. 1993 年頃初めて肝機能異常を指摘され, 2003 年, 当院に受診する. 身長 152.7cm, 体重 54.6kg, Body Mass Index 23.4 で明らかな肥満はない. 肝生検で肝細胞の脂肪沈着, 風船様変性, 架橋形成所見, 鉄沈着を認め NASH と診断した (図 5A, C). その後, 食事療法, 運動療法を開始し, 体重の減少とともに血清 ALT 値は改善し 30 IU/L 以下で経過しているが, 血清フェリチン高値は持続している (図 4A, B, C). 2008 年の 2 回目の肝生検では脂肪沈着は改善しているが, 風船様変性, 鉄

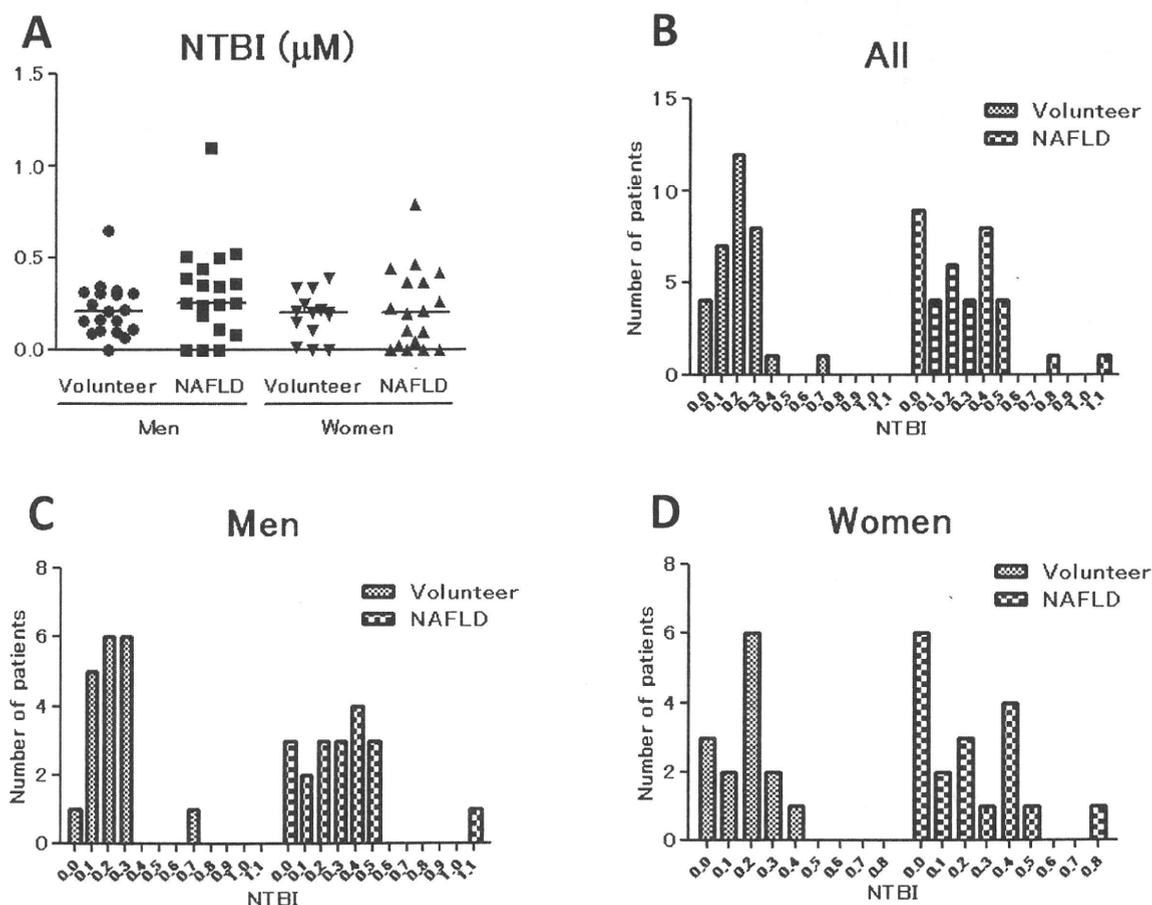


図 2 血清 NTBI 濃度. (A) 散布図. (B) ヒストグラム (全例). (C) ヒストグラム (男性). (D) ヒストグラム (女性). NAFLD 男性例では健常ボランティアの 75% パーセンタイル以上 ($0.31 \mu\text{M}$) を示す症例が 47% 存在し, NTBI が高い傾向があった.

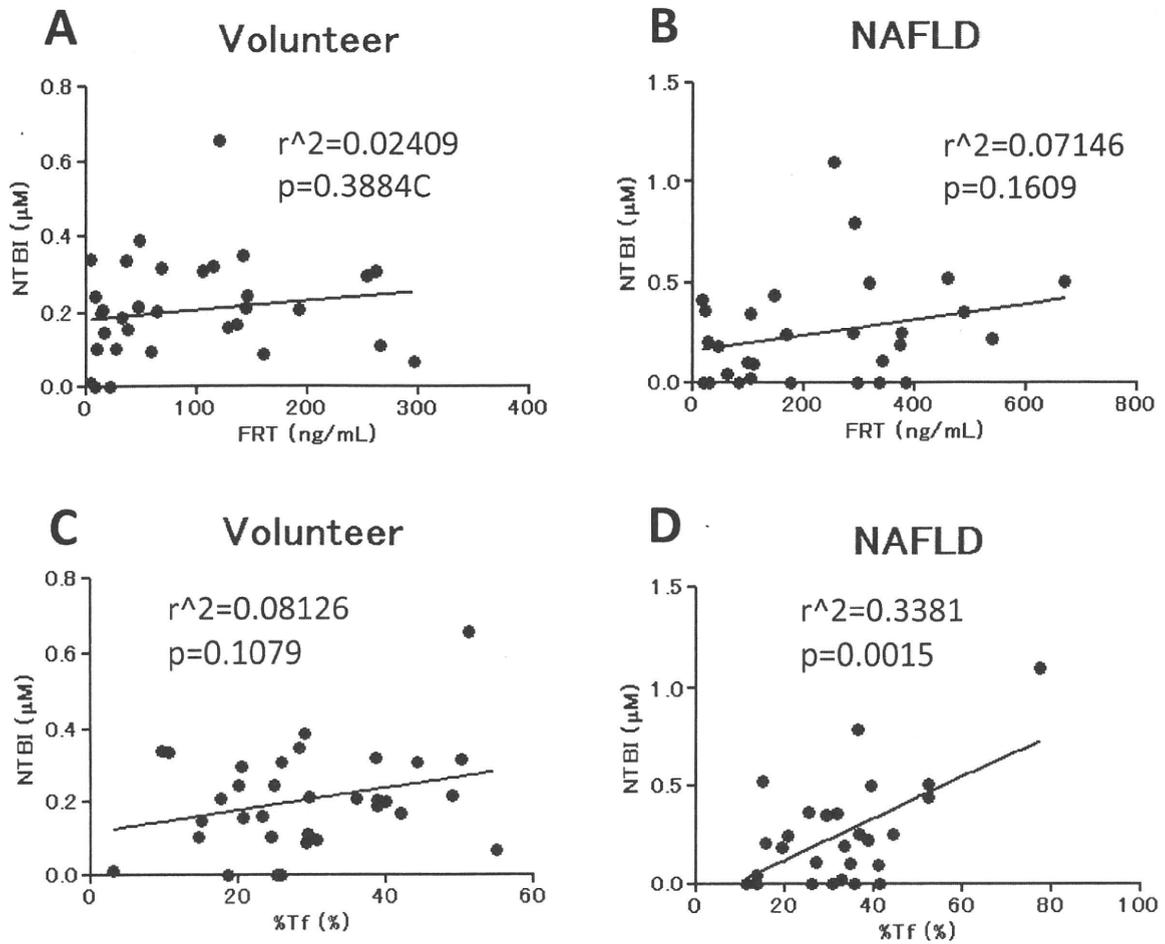


図3 血清フェリチンまたは% Tf と NTBI との関連。(A) 健常者の血清フェリチンと NTBI。(B) NAFLD 症例の血清フェリチンと NTBI。(C) 健常者の% Tf と NTBI。(D) NAFLD 症例の% Tf と NTBI。NAFLD 症例において% Tf と NTBI は正の相関を認める ($r^2=0.3381$, $p=0.0015$)。

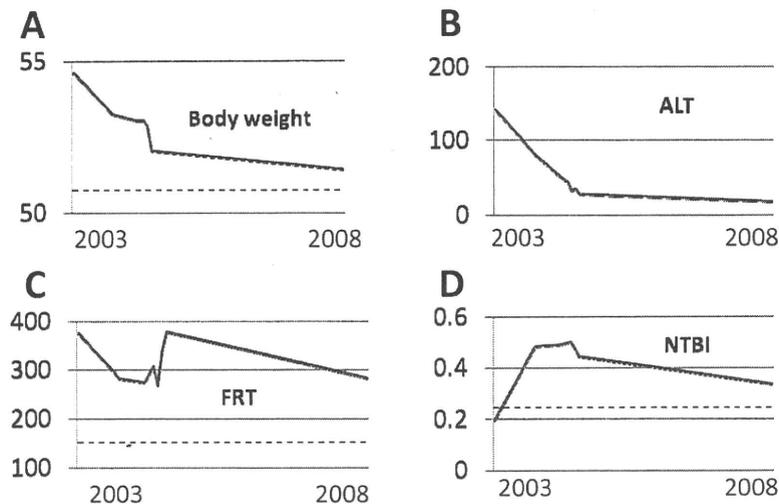


図4 提示症例の臨床経過。(A) 体重 (kg)。(B) 血清 ALT 値 (IU/L)。(C) 血清フェリチン値 (ng/mL)。(D) 血清 NTBI 濃度 (μM)。

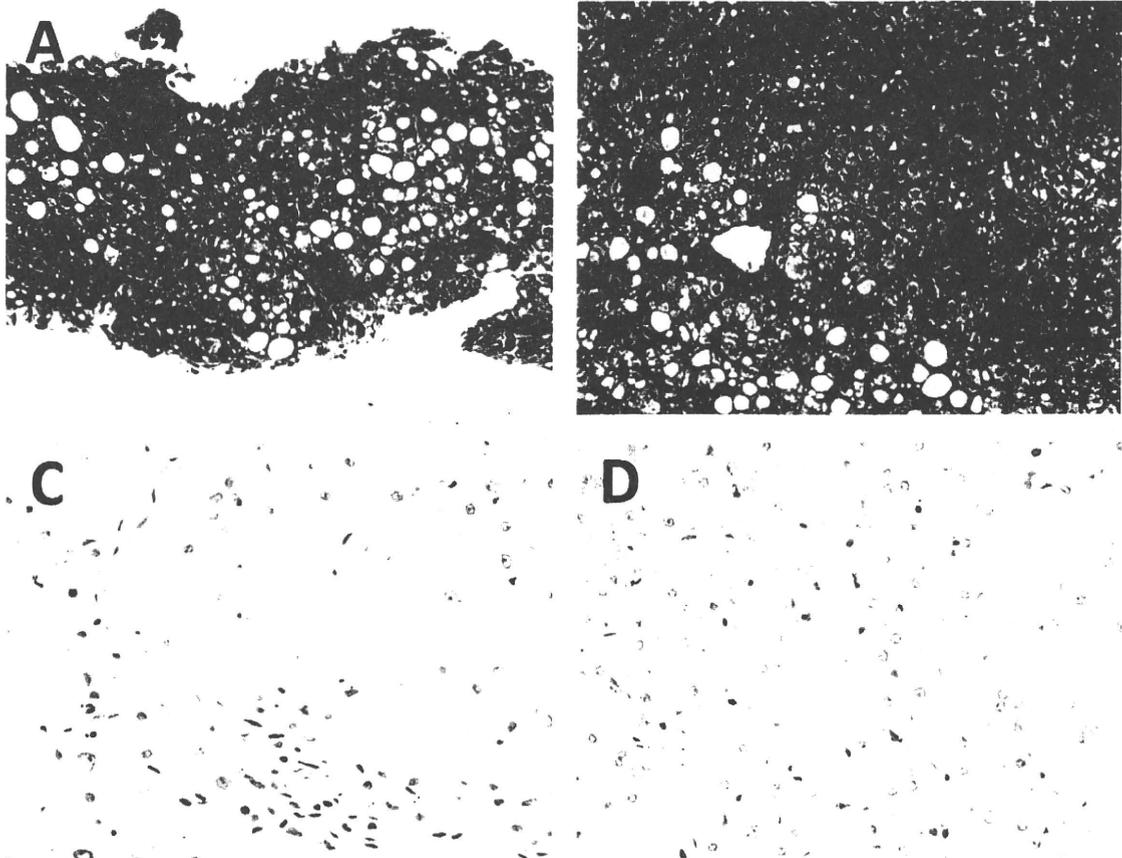


図5 (A) 2003年初診時肝生検 (Azan 染色), (B) 2008年2回目の肝生検 (Azan 染色), (C) 初回肝生検 (鉄染色), (D) 2回目肝生検 (鉄染色), 倍率: 100倍 (A, B), 400倍 (C, D).

沈着の改善はない (図5B, D). 血清 NTBI は $0.4 \mu\text{M}$ 前後の軽度高値を持続している (図4D).

4. 考 察

NAFLDの病理は肥満に伴う肝細胞への中性脂肪の沈着から始まり, 脂肪酸による脂肪毒性, インスリン抵抗性が病態の基盤をなしている. 病態を進展させる因子としてサイトカイン, エンドトキシン, 酸化ストレスが提唱されている. そして, C型慢性肝炎⁵⁾, アルコール性肝障害^{6), 7)}と同様にNAFLDにおいても二次性の肝内鉄沈着が高頻度に認められ, 肝細胞障害, 肝線維化, 肝発癌に寄与する可能性が指摘されている³⁾. 鉄沈着による肝細胞障害は自由鉄の増加によるラジカル産生増加を介した酸化ストレスである. NAFLD症例では有意に血清フェリチンが上昇し, 鉄過剰症であることが確認された.

血清 NTBI 測定の検討はもっぱら遺伝性ヘモクロマトーシス⁸⁾や鎌状赤血球, サラセミアなど⁹⁾の輸血依存性の難治性貧血患者における長期大量輸血後の高度鉄過剰症に関して報告されている. それに対してNAFLDを含めた慢性肝疾患の鉄過剰は軽度から中等度のものであり, その測定は検査系の感度の問題から不可能であった. 今回我々が構築した測定系はNAFLD患者だけでなく, 健常者の血清 NTBI 濃度を測定することが可能であった. その結果, NAFLD症例において細胞毒性の高い血清 NTBI が正常の群と高値群が存在し, 特に男性症例において高値症例が多く存在していることが示された.

血清 NTBI と他の鉄関連マーカーとの関係では, 健常者においては血清フェリチン, % Tf とともに相関を認めなかった. しかし, 軽度から中等度の鉄過剰のみられるNAFLD症例において血清

NTBI 値は血清フェリチンとは相関を認めなかったが、% Tf とは正の相関を示していた。血清フェリチンは肝内貯蔵鉄のよいマーカーではあるが、肝細胞障害の強い場合に Apo-ferritin が血中に逸脱するため、実際の貯蔵鉄量と解離することがある。今回、NAFLD 症例において % Tf と NTBI が相関していたことは、その測定値の信頼性の高さを示すものと考えられる。そして、% Tf 高値 NAFLD 症例においては全身的な鉄毒性に暴露されていることが確認され、このような病態が NAFLD の肝外病変である心血管系疾患にも関与している可能性があると考えられる。

提示症例は NAFLD の鉄代謝異常を考察するうえで興味深い症例である。食事療法、運動療法によって体重減少がみられ、肝機能も改善しており、実際にフォローアップの肝生検では脂肪沈着が改善していた。しかし、血清フェリチン高値が持続しており、肝組織像も脂肪沈着以外の炎症、線維化および鉄沈着も改善していなかった。現在、NAFLD に対する除鉄治療の有効性は報告されているが¹⁰⁾、本例のように血清 ALT 値が正常である肝内鉄過剰症例における除鉄治療の適応についてはその血清フェリチンのカットオフ値を含め議論が必要と考えられる。本例では血清 NTBI の高値も持続していたことから、潜在的な全身的鉄毒性が持続していると考え、NAFLD の肝外病変である心血管系疾患のリスク軽減も考慮し、瀉血療法を試みている。今後、NAFLD 症例が増えるとともに本例のようなケースも多く経験されることが考えられるので、その除鉄治療の適応に関しては検討が必要である。

5. 結 語

NAFLD 症例において血清 NTBI が高い群、つまり、全身的に鉄細胞毒性の強い群が存在し、特に男性で多い傾向があった。NAFLD において血清 NTBI は鉄毒性の評価に有用な血清マーカーと考えられた。

文 献

- 1) 高後 裕, 生田克哉. Iron Overload と鉄キレート療法. 総論-生体鉄代謝の分子機構. 25-35. メディカルレビュー社
- 2) Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, et al. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005 Jun; 18(2): 277-87.
- 3) Angulo P, Keach JC, Batts KP, et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62
- 4) Gosriwatana I, Loreal O, Lu S, Brissot P, et al. Quantification of non-transferrin-bound iron in the presence of unsaturated transferrin. *Anal Biochem.* 1999 Sep 10; 273(2): 212-20.
- 5) Kato J, Miyanishi K, Kobune M, et al. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2007 Oct; 42(10): 830-6.
- 6) Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem.* 281(32): 22974-82. 2006.
- 7) Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, et al. Hepsidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res.* 31(1 Suppl): S2-8. 2007.
- 8) Le Lan C, Loréal O, Cohen T, et al. Redox active plasma iron in C282Y/C282Y hemochromatosis. *Blood.* 2005 Jun 1; 105(11): 4527-31.
- 9) Piga A, Longo F, Duca L, Roggero S, et al. High nontransferrin bound iron levels and heart disease in thalassemia major. *Am J Hematol.* 2009 Jan; 84(1): 29-33.
- 10) Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1251-8

肝疾患にみられる味覚・食欲異常

Disorder of appetite and taste in patients with liver disease

鈴木孝知／香川景政／玉野正也

SUMMARY

味覚は「食べる」という人間にとって最も重要な活動の基本になる知覚であり、味覚異常がみられることにより摂食状況は悪化することが知られている。したがって、栄養治療がきわめて重要な治療である肝疾患、特に肝硬変において味覚異常は重要な問題である。そのため肝硬変の患者で十分な栄養を摂取できないような場合には味覚異常の合併を考えることが必要である。

KEY WORDS

- 低亜鉛血症
- 低アルブミン血症
- 薬剤
- 味覚異常

I

はじめに

味覚とは動物の五感の1つであり、口にする物の化学的特性に応じて認識される感覚である。生理学的には、甘味、酸味、塩味、苦味、うま味の5つが基本的な味質である。味覚と食との関わりは、甘味、うま味、塩味はそれぞれ、エネルギー、たんぱく質、ミネラルのシグナルとして摂食を促進することが知られている。すなわち体内のなんらかの栄養素が不足すると、生体はその物質の味覚を手掛かりとして欠乏物質を認識し摂取することにより栄養障害を改善しようとする。したがって、タンパク・エネルギー栄養障害(protein energy malnutrition: PEM)を高率に合併する肝疾患において、味覚障害を合併することにより栄養摂取状況がさらに悪化し、その結果PEMをさらに増悪させる。そのことから、肝硬変の診療において味覚異常は栄養治療上きわめて重要な問題である。

II

味覚異常の原因

味覚異常の原因は多岐にわたり、その合併頻度は諸家により多少の違いはあるが、濱田ら¹⁾によれば表1に示すごとくである。頻度の高いものとしては、薬剤性、亜鉛欠乏性、特発性(原因不明)、心因性などがある。肝疾患などの全身疾患に合併する味覚障害としては、味覚障害全体の7.4%と必ずしも多くはない。しかし肝疾患の治療において味覚異常を惹起しうる薬剤が投与されることが少なくないことや、肝疾患、特に肝硬変においては味覚異常の原因の1つである低亜鉛血症が高率に合併することから、肝疾患に関連する味覚異常の合併頻度はさらに高率と考えられる。

III

肝疾患における味覚異常の成因

肝疾患における味覚異常は、PEMの合併による低アルブミン血症に起因する低

亜鉛血症と投与薬剤の亜鉛キレート作用による低亜鉛血症が主な原因と考えられる。そのほかに、機序は不明ではあるが薬剤の副作用としての味覚異常も知られている。いずれにせよ、肝疾患における味覚異常は、低亜鉛血症が深く関わっていることから肝疾患における亜鉛代謝異常を十分に理解しておくことが重要である。

IV

肝疾患における低亜鉛血症

肝疾患、特に慢性肝疾患において病態の進行に伴い血清亜鉛値は有意に低下する(図1)が、慢性肝疾患における低亜鉛血症の原因として、①食事からの摂取不足、②腸管での吸収障害、③尿中への排泄増加などがある。われわれは、肝硬変における味覚異常を亜鉛代謝異常が主因と捉え図2のように考えている。すなわち肝疾患、特に肝硬変においては腸管の絨毛の短縮などの形態学的変化²⁾がみられる。その結果、腸管レベルにおける亜鉛の吸収障害を起こし、低亜鉛血症がみられる。また、吸収された亜鉛は約66%がアルブミン、約32%は α 2-マクログロブリンなどのmacromolecular ligandsと結合しており、残りは尿中へ排泄されるアミノ酸などのmicromolecular ligandsと結合している³⁾。肝硬変で低アルブミン血症がみられると亜鉛の結合がmacromolecular ligandsからmicromolecular ligandsへ変化し、尿中への亜鉛の排泄の増加がみられ、低亜鉛血症が増悪する。さらに、低アルブミン血症による浮腫や腹水の治療に利尿剤を投与した

場合にはその傾向が顕著となり、低亜鉛血症がさらに悪化する。その結果、味蕾のturnover timeが延長し味覚異常がみられると考えられている。

V

味覚異常を起こす肝疾患治療薬

富田⁴⁾は味覚障害を起こす薬剤を詳細に報告しており、そのなかで肝疾患治療

に用いられることが多い薬剤を表2に示す。薬剤による亜鉛低下の機序は必ずしも明らかではないが、亜鉛キレート作用のある薬剤も少なくないため肝疾患の治療に際して、服薬中の患者は味覚異常の出現に注意が必要である。

VI

味覚異常の診断

味覚異常の診断は、味覚異常の原因を想定して問診および診断を進めることが重要である。肝疾患においては、低アルブミン血症の原因である食事摂取状況の確認や腹水・浮腫の有無、服用薬剤に注目することも重要である。血液生化学検査としては、血清亜鉛値を測定するだけでなく血清アルブミン値も測定し、低亜鉛血症の合併がみられなくても低アルブミン血症がみられるような場合には低亜鉛血症を合併する可能性がある。そのため、今後味覚異常が出現する可能性を念頭に置く必要がある。問診や血液生化学

表1. 味覚障害の原因

原因	頻度 (%)
• 薬剤性	21.7
• 亜鉛欠乏性	15.0
• 特発性	14.5
• 心因性	10.7
• 風味障害	7.5
• 全身疾患	7.4
• 口腔・唾液腺疾患	6.4
• 末梢神経障害	2.6
• 中枢神経障害	1.7
• その他	9.9

(文献1)より引用・改変)

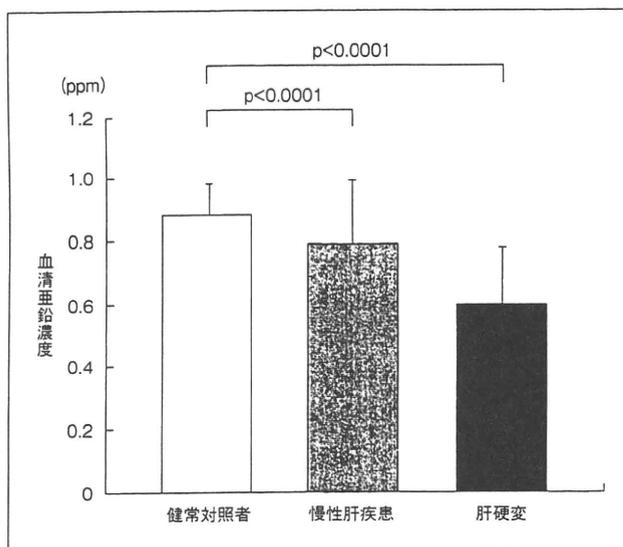


図1. 慢性肝疾患における血清亜鉛濃度

Mean ± SD

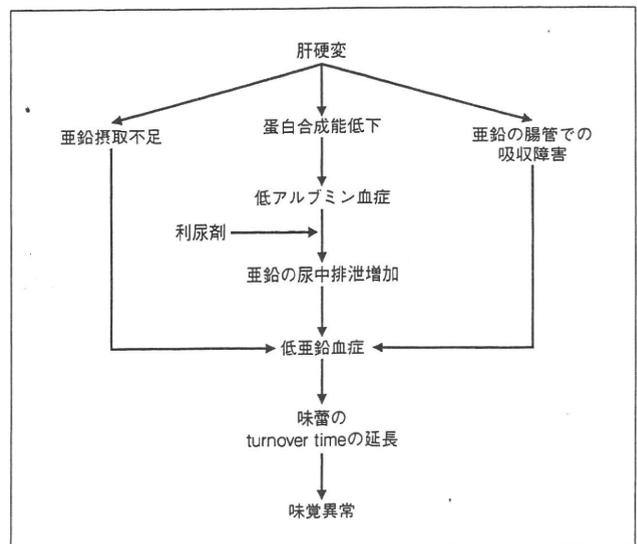


図2. 肝硬変における味覚異常の成因 (仮説)

表2. 味覚障害を起こしうる肝疾患治療薬

利尿剤	サイアザイド系*, フロセミド*, スピロラクトン, エタクリン酸, アセタゾラミド
抗ウイルス薬	インターフェロン α , インターフェロン $\alpha 2a$
肝疾患用薬	チオプロニン*, グルタチオン*, プロトボルフィリンナトリウム, ゲルクロン酸, D-ベンシラミン*

*: 亜鉛キレート作用の報告のある薬剤 (文献4) より引用・改変

学検査で味覚異常が疑われた場合には、味覚機能検査を行い、味覚異常の合併の有無を判断する。

味覚機能検査としては、電気味覚検査と濾紙ディスク法がある。電気味覚検査は短時間で行うことが可能であるが、耳鼻咽喉科の協力がなければ行うことができないが、濾紙ディスク法は検査に時間はかかるが内科医でも行うことが可能である(詳細は他誌を参照)。

川島らは⁵⁾肝疾患患者を対象に濾紙ディスク法による味覚機能検査を行い、甘味、塩味の味覚閾値は対照群と比較して有意に高値であり、酸味、苦味もほぼ同様の傾向がみられると報告した。

VII

味覚異常の治療

肝疾患における味覚異常の原因が低亜鉛血症による味覚異常と推測される場合には、亜鉛代謝異常の改善が重要である。肝疾患における味覚障害の原因が薬剤によると考えられる場合には、原因薬剤を中止し変更することが基本ではあるが臨床的には不可能である場合が少なくない。一方、低亜鉛血症が原因と考えられ

る味覚異常の場合には低亜鉛血症の背景にある①低アルブミン血症に対する治療(原因療法)と②低亜鉛血症に対する治療(対症療法)の2つの面から治療を行うことが肝要である。

1. 低アルブミン血症に対する治療

慢性肝疾患に合併した低アルブミン血症の治療としては、適切なエネルギー量とたんぱく質の摂取⁶⁾が基本である。食事療法で低アルブミン血症が改善されない場合には、分岐鎖アミノ酸を併用した栄養治療を行うことが重要である。

2. 低亜鉛血症に対する治療

味覚異常に対する健康保険適応のある亜鉛製剤はないため、サプリメントを含めた各種亜鉛製剤を用いる。用いられる製剤としては硫酸亜鉛(100mg中22.5mgのZn²⁺を含有)やポラプレジンク(150mg中33.9mgの亜鉛を含有)を用い、亜鉛投与量として50mg/日程度投与する⁷⁾。

VIII

肝疾患に合併した味覚異常の臨床的問題

肝疾患に合併した味覚異常は低アルブミン血症による低亜鉛血症が主因と考えられるため、肝硬変に味覚異常が合併すると、エネルギー、たんぱく質、ミネラルの摂取が低下すると考えられる。特に、たんぱく質の摂取量が低下するとさらに低アルブミン血症が進行し低亜鉛血症が悪化し、味覚異常が悪化する。したがって、肝疾患患者において栄養治療は予後改善の観点から重要であるが、味覚異常の予防、治療も栄養治療と同様に重要で

あり、いわば車の両輪と考えてもいいのかもしれない。

IX

おわりに

肝疾患、特に肝硬変において栄養治療の重要性は認識されているが、味覚は食においてきわめて需要である。味覚異常を伴えば摂食状況は悪化することから、肝疾患の診療に関わる医師をはじめとした医療スタッフは味覚異常に対しても十分な知識が要求されるのではないのでしょうか。

REFERENCES

- 1) 濱田敬永, 遠藤壮平, 富田 寛, 他: 味覚外来10年間2278例に関する臨床的解析. 日大医誌 54: 529-535, 1995
- 2) 田川博之: 慢性肝障害における小腸絨毛の形態学的並びに酵素学的検討. 日大医誌 35: 929-943, 1975
- 3) Giroux EL, Henkin RI: Competition for zinc among serum albumin and amino acids. Biochim Biophys Acta 273: 64-72, 1972
- 4) 富田 寛: 味覚の病態. 感覚器 CLIENT21 No.10, 野村恭也, 本庄 巖, 小松崎篤 編. 東京, 中山書店, p422-434, 2000
- 5) 川島由紀子, 中村丁次, 宮下 実, 他: アルコール性肝疾患患者における味覚異常の解析. アルコール代謝と肝 9: 110-115, 1990
- 6) Plaugh M, Merli M, Kondrup J, et al: ESPEN guidelines for nutrition in liver disease and transplantation. Clin Nutr 16: 43-55, 1997
- 7) 富田 寛: 味覚障害の現状. JOHNS 18: 871-877, 2002

すずき・かずとも
獨協医科大学越谷病院消化器内科准教授
かがわ・かげまさ
獨協医科大学越谷病院消化器内科助教
たまの・まさや
獨協医科大学越谷病院消化器内科教授

肝硬変の栄養評価*

keywords: タンパクエネルギー栄養障害、予後、肝硬変

鈴木孝知 Kazutomo SUZUKI

玉野正也 Masaya TAMANO

◆獨協医科大学越谷病院 消化器内科

Dokkyo Medical University Department Gastroenterology & Hepatology

肝硬変患者の多くはタンパク・エネルギー栄養障害(Protein-energy malnutrition: PEM)を合併しているため栄養評価はきわめて重要である。しかし栄養指標の多くは肝硬変の病態により修飾をうけるためいくつかの栄養指標を組み合わせる必要がある。肝硬変患者の栄養指標の多くは肝硬変患者の予後を予測できる因子であることから肝硬変患者の栄養評価は単に栄養状態の評価としてだけでなく、予後の評価としても重要である。また、肝硬変患者に対して栄養評価を行い、栄養治療を行うに際して肝硬変患者に見られる種々の代謝異常に考慮して栄養治療を行う必要がある。

1. はじめに

肝硬変においては高率にタンパクエネルギー栄養障害を合併している¹⁾ことから栄養治療は予後改善や発癌防止の観点からきわめて重要である。肝硬変患者に対して病態に即した栄養治療を実践するためには、まず適切な栄養評価を行うことが重要であるが栄養状態の評価だけではなく、どのような栄養治療を行うべきかが推測できるような栄養評価を行うことも重要である。そこで本稿では肝硬変のタンパクエネルギー栄養状態にと肝硬変患者に対する栄養評価について述べる。

2. 肝硬変患者のエネルギー代謝状態

肝硬変のエネルギー代謝状態は間接カロリーメーターを用いて詳細に検討されている。REE (resting energy expenditure) /BMR (predicted basal metabolic rate) と npRQ (non-protein respiratory quotient) で健常者の平均値 \pm 2SD (standard deviation) 以内を

エネルギー代謝状態が正常、タンパク栄養状態を血清アルブミン値が 3.5g/dL 超を正常として肝硬変患者のタンパクエネルギー栄養状態を検討すると肝硬変患者の 50%はタンパク栄養障害とエネルギー栄養障害双方を合併、12%がエネルギー栄養障害単独、25%はタンパク栄養障害単独と報告¹⁾がされている。したがって肝硬変患者の栄養状態を評価するにはエネルギー栄養状態とタンパク栄養状態の両方を的確に評価することが重要である。

3. 栄養評価

すべての患者に対して栄養アセスメントを行うことは困難であるため主観的包括的栄養評価法(SGA: Subjective global assessment)などを用いて栄養スクリーニングを行い、栄養障害のリスクのある患者に対して詳細な栄養評価を行う。栄養評価は栄養障害に対する治療の第一歩であることから栄養評価は極めて重要であるが現在の栄養評価項目の基本は Blackburn²⁾らにより提唱された図 1 に示すような栄養評価項目が基本である。すなわ

*Nutritional assessment in cirrhosis

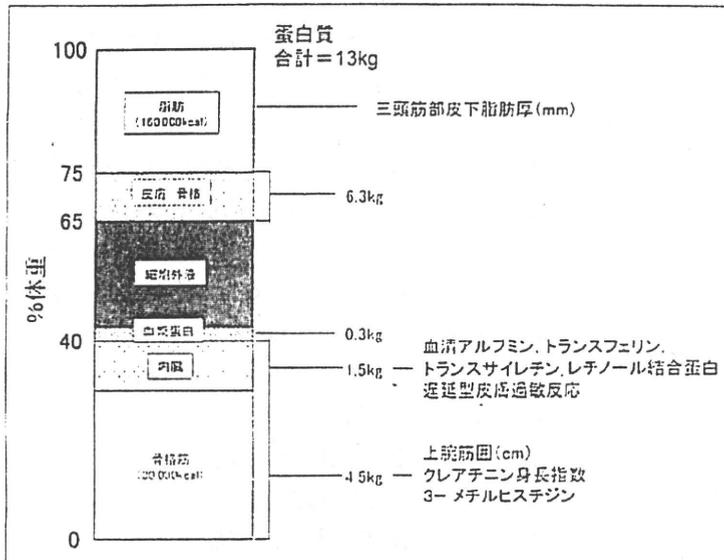


図1

表1 栄養アセスメント

1. 身体計測指標 体重減少、%標準体重、TSF(上腕三頭筋部皮下脂肪厚) AMC(上腕筋圍) BIA(Bioelectrical impedance analysis)
2. 生理学的指標 呼吸ガス分析、呼吸筋力、握力、創傷治癒能
3. 生化学的指標 (ア) アルブミン、トランスフェリン、トランスサイレチン、 レチノール結合蛋白 (イ) 尿中クレアチニン、尿中尿素窒素、 尿中3-メチルヒスチジン (ウ) アミノ酸分析 (エ) ビタミンA、葉酸、亜鉛 (オ) 血中ホルモン インスリン、甲状腺ホルモン
4. 免疫学的指標 末梢血リンパ球総数、T・B細胞数、T・B細胞機能、 遅延型皮膚過敏反応
5. その他

ち人体構成成分を体脂肪、筋肉および内臓蛋白などに区分して、おのおのに特有な栄養パラメータが設定され、それらを総合的に評価することにより患者の栄養障害のパターンとその程度を評価する。また、栄養指標の目的別分類として栄養障害の合併の有無判定のための静的栄養指標と栄養障害の経過判定や栄養治療後の評価判定のため

めの動的栄養指標や予後予測のための予後予測栄養指標がある。現在では表1に示すように身体計測指標、生理学的指標、血液生化学的指標、免疫学的指標を組み合わせることで栄養評価を行う。

臨床の現場においてはこれらの全ての栄養指標を実施することは困難であるため、各施設に行うことができる栄養指標を組み合わせることで栄養評価を行うことが重要である。

① 肝疾患の栄養評価

肝疾患に対する栄養評価として①標準体重、②上腕三頭筋部皮下脂肪厚、③上腕筋圍、④クレアチニン身長指数、⑤血清アルブミン値、⑥血清トランスフェリン、⑦

末梢血リンパ球総数、⑧遅延型皮膚過敏反応がMendenhallら³⁾により提唱(表2)され、これらの栄養指標もエネルギー栄養障害、タンパク栄養障害の評価を目的とした栄養評価法である。すなわち標準体重と上腕三頭筋部皮下脂肪厚の指標はエネルギー栄養状態を推定することが可能であり、血清アルブミン値や上腕筋圍、クレアチニン身長指数でタンパク栄養状態を評価することができる。エネルギー栄養状態を評価する指標とタンパク栄養状態を評価する指標を組み合わせることでエネルギーを中心とした栄養治療を行うのか、またはタンパクを中心とした栄養治療を行うべきかが判断できる。したがって栄養評価では単に栄養状態を評価するだけではなく、今後いかなる栄養治療を行うべきかをも判断することが栄養治療上重要である。

表2 肝疾患時の栄養評価

Mendenhall CL: Am J Clin Nutr, 213 ~ 218, 1986

1) 標準体重	(%)
2) 上腕三頭筋部皮下脂肪厚	(≥ 12.5mm)
3) 上腕筋圍	(≥ 25.3cm)
4) クレアチニン身長指数	(CHI %)
5) 血清アルブミン	(≥ 3.5g/dl)
6) 血清トランスフェリン	(≥ 180mg/dl)
7) 末梢血総リンパ球数	(≥ 1500/μl)
8) 遅延型皮膚過敏反応	(≥ 5mm)

表3 肝疾患時の栄養評価

1) 身長, 体重
2) %上腕三頭筋部皮下脂肪厚(% TSF)
3) %上腕筋囲(% AMC)
4) 握力
5) 血清アルブミン濃度
6) 血清コリンエステラーゼ値
7) 血清BTR(BCAA/Tyr比)
8) 血清遊離脂肪酸
9) その他

②当院における肝疾患栄養評価

われわれの施設では肝硬変の蛋白エネルギー栄養状態を評価するだけでなく、食事療法単独か分岐鎖アミノ酸を併用した栄養治療を考慮すべきかを判断できるように表3に示すような栄養指標を用いて肝硬変患者の栄養評価を行っている。

(1) 身長, 体重

身長, 体重より標準体重を算出し, %標準体重やBMI (Body mass index) を求め栄養状態の評価を行う。ただし, 肝硬変では浮腫や腹水を伴うことが少なくないため評価には注意を要する。身長と体重の測定は肝硬変患者の栄養処方決定にも必要であることから必ず測定を行うことが重要である。しかし, 肝硬変では栄養障害の合併により浮腫や腹水がみられることも少なくないため特に体重の評価には注意が必要である。

(2) 上腕三頭筋部皮下脂肪厚

(TSF: triceps skinfold thickness)

非優位側で上腕の肩峰と尺骨肘頭の中点から1cm離れたところで測定する。日本人の新身体計測基準値(JARD2001: Japanese Anthropometric reference data2001)⁴⁾を用いて評価する。TSFの5パーセントイル未満を高度栄養障害と判定する。TSFは身体構成成分の脂肪を反映している。Alberinoら⁵⁾によるとTSFが5パーセントイル未満は肝硬変患者の15%の患者にみられ, 肝硬変患者ではMAMCが5パーセントイル未満では予後が不良であることを報告している。TSFの測定では測定誤差が少なくないため測定に際しては熟練することが必要である。

(3)上腕筋囲 (MAMC:midarm muscle circumference)
非優位側で肩峰と尺骨肘頭の中点で上腕周囲長(MAC: midupper arm circumference)を測定し

$$MAMC(\text{cm}) = MAC(\text{cm}) - 0.314 \times \text{TSF}$$

より算出する。MAMCは身体構成成分の骨格筋を反映している。日本人の新身体計測基準値(JARD2001: Japanese Anthropometric reference data2001)⁴⁾を用いて評価する。MAMCの5パーセントイル未満を高度栄養障害と判定する。Alberinoら⁵⁾によるとMAMCが5パーセントイル未満は肝硬変患者の25%の患者にみられ, 肝硬変患者ではMAMCが5パーセントイル未満では予後が不良であることを報告している。TSFと同様MAMCの測定も測定誤差が少なくないため測定に際しては熟練することが必要である。

(4) 握力 (HG: handgrip strength)

握力は骨格筋機能の評価法として特殊な器具を必要としないことやベッドサイドで簡便に測定可能な筋力の評価法として用いられる。非優位側手で10回連続測定し, その平均値を佐藤ら⁶⁾の健常人の値と比較して評価するのが一般的である。栄養不良患者において短時間の瞬発的な運動に適しているタイプIIの筋線維が減少する⁷⁾ことが指摘されている。

(5) 血清アルブミン値

アルブミンは肝臓で合成される蛋白であり, 血漿蛋白の約60%を占めている。アルブミンは栄養状態の指標であると共に肝細胞機能の指標であることから血清アルブミン値は必ずしも良い栄養指標とはいえない。しかし, アルブミンは肝硬変患者の予後予測因子として極めて重要かつ簡便な指標⁸⁾であることや分岐鎖アミノ酸を併用した栄養治療の開始の基準として血清アルブミン値が一般的であることから肝硬変患者においては栄養指標として検討すべき指標であると考えられる。

(6) 血清コリンエステラーゼ値

コリンエステラーゼは, コリンエステルを加水分解する酵素であるが肝臓で合成され血中に分泌されるので, その活性低下は肝細胞の機能障害を反映し, 肝の蛋白代謝としての指標として有用である。