

導体は、内臓脂肪細胞による TNF (腫瘍壊死因子)- $\alpha$  やレプチンの発現を低下させ、アディポネクチンの産生を回復することでインスリン抵抗性を改善し、コントロールスタディで肝機能、肝組織所見ともに改善がみられた。これは、NASH への有効性が証明された数少ない薬剤<sup>5)</sup> であるが、副作用として体重増加がある。

ビグアナイド薬のメトホルミンは、肝臓で糖新生を抑制して肝臓における糖の取り込みを促進すること、ナテグリニドはインスリン初期分泌を促進することにより、それぞれ有効であるとの報告があるが、それを否定する報告もある。そのほか、降圧薬の ARB (アンジオテンシン受容体拮抗薬) と ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害薬が、NASH の線維化改善薬として注目されている。

#### 4 予後

burn-out NASH など進行した肝硬変になると腹水や食道胃静脈瘤を認めるため、腹部画像検査や内視鏡検査を施行する。肝硬変やその合併症の加療を行い、肝発癌に留意する必要がある。また、糖尿病患者は悪性腫瘍発生率が高く、なかでも肝癌の発生率が高い。米国では、糖尿病患者は非糖尿病患者に比して累積肝癌発生率が3倍以上高いこと<sup>6)</sup>、わが国では、橋本らが糖尿病患者で NASH からの肝発癌が多いこと<sup>7)</sup> を報告している。NASH 肝癌患者の 70~80% に糖尿病が合併しているとの報告もある。

#### ● おわりに

糖尿病患者は NAFLD (単純性脂肪肝, NASH) を高率に合併し、その一部は肝硬変や肝癌に進展すること、特に肝癌での死亡率が高いことに注意が必要である。また、進行した NASH 肝硬

変患者では脂肪蓄積のない、いわゆる burn-out NASH の像を呈するため、NASH が見逃されることが多く、その予後は不良である。したがって、糖尿病患者に脂肪肝や肝障害を認めた場合には、糖尿病専門医と肝臓病専門医が密に連携し、早期に肝生検などにより正しい診断、病態把握に努め、適切な治療と合併症の予防に留意することが大切である。現在、われわれは糖尿病患者の肝障害の実態について厚生労働省研究班として大規模な研究を行っており、1~2 年後に詳細な実態を報告できると思う<sup>8)</sup>。

#### 文献

- 1) Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212-8.
- 2) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis; Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.
- 3) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-5.
- 4) Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44: 865-73.
- 5) Belfort R, Harrison SA, Brown K, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 2297-307.
- 6) El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-8.
- 7) Hashimoto E, Yatsuji S, Tobar M, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009; 44 (Suppl 19): 89-95.
- 8) 厚生労働科学研究費補助金、肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野)。非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究 (研究代表者 岡上 武)。平成 20 年度総括・分担研究報告書 (平成 21 年 3 月)

# NASH/NAFLDの診断— 血液検査, 画像診断, 病理

Diagnosis of NASH/NAFLD—blood tests, imaging, pathology

岡上 武

大阪府済生会吹田病院



岡上 武 (おかのうえ たけし)  
1969年京都府立医科大学卒業。2002年  
京都府立医科大学第3内科教授。'03年  
京都府立医科大学消化器病態制御学教  
授。'07年大阪府済生会吹田病院院長。  
研究テーマ：ウイルス性肝炎, NASH,  
肝癌

## Key Words:

oxidative stress, iron overload, insulin  
resistance, NASH

## ■ Abstract ■

NAFLDには単純性脂肪肝(FL)と炎症・線維化を伴うNASHがあるが、生化学的に両者を鑑別するのは困難であるが、線維化の進展したNASHとFLとの鑑別は容易である。造影剤の進歩により、クッパー細胞機能の差を利用してのFL, NASHの鑑別の試みもあり、今後の進展が期待される。現時点では確定診断は肝生検に頼らざるを得ないが、典型例でないFLやNASH例(Matteoniのtype 2, 3)では診断医の主観が入る余地が有り、今後検討すべき問題点である。

## ■ 血液検査所見

NAFLDには単純性脂肪肝と炎症を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)があるが、両者とも肝障害が存在するため血清トランスアミナーゼ値が上昇する。その程度は軽度から中等度で(多くはAST<150IU/L, ALT<200IU/L), かつAST<ALTであるが、肝硬変に進展したNASHではAST>ALTのことが多い。脂肪肝, NASHともに大半の症例でγGTP値が軽度上昇し, NASHでは線維化の程度に比例して血小板数は減少し, 線維化マーカー(ヒアルロン酸, p-III-p, IV型コラーゲン7S)は高値を示す。

単純性脂肪肝, NASHともにインスリン抵抗性, 酸化ストレスが病態形成に大きな役割を果たしており, インスリン抵抗性のマーカーであるHOMA-

IR (空腹時血糖値×空腹時IRI÷405) 高値, 酸化ストレスマーカーの血清チオレドキシニン値(保険適応外)高値を示し, これらはNASHで有意に高値である。また, 単純性脂肪肝, NASHともに肝細胞への鉄蓄積がみられ, 頻度は前者で約20%, 後者では60%前後で, 鉄過剰蓄積の程度はNASHの方が高度で, 血清フェリチン高値を示す。

背景に糖尿病, 高脂血症を有する例では空腹時高血糖, コレステロール・中性脂肪の高値のことが多く, NASHでは炎症のために高感度CRP高値, アディポネクチン, レプチン低値を示す。

筆者が京都府立医科大学消化器内科で解析した単純性脂肪肝とNASHの血液生化学検査成績を示す(表1)。血液生化学検査で単純性脂肪肝とNASHの鑑別は困難であるが, AST, ALT高値で, 腹部エコーやCTで脂肪肝の所見がみられ, 血小板数が正常下限あるいは低下し, 血清フェリチン高値であれば, NASHの可能性が高い<sup>1, 2)</sup>。

なお, NASH症例の20%前後で抗核抗体(ANA)陽性であるが, 殆どが160倍未満陽性で, 単純性脂肪肝では陽性例は稀である。

■ Takeshi Okanoue  
Saiseikai Suita Hospital

表1 単純性脂肪肝とNASHの一般生化学検査の比較

	Fatty Liver (n=53)		NASH (n=75)		P value
AST (12-35 IU/l)	41	(12-179)	75	(22-242)	<0.001
ALT (6-33 IU/l)	80	(13-347)	107	(19-316)	0.019
GGT (3-54 IU/l)	90	(19-568)	87	(30-810)	0.777
T-Chol (125-220 mg/dl)	216	(79-313)	205	(149-293)	0.071
TG (31-160 mg/dl)	165	(49-413)	132	(37-879)	0.217
FPG (65-126 mg/dl)	101	(77-280)	102	(83-270)	0.640
HOMA-IR	2.34	(0.91-6.22)	4.42	(0.53-27.6)	0.018
Serum Ferritin (75-247 [M], 21-75 [F] ng/ml)	124	(13-499)	270	(35-1010)	<0.001
Hyperferritinemia	16/45 (35.6%)		54/72 (75.0%)		<0.001
PLT (10.4-34.8 × 10 <sup>4</sup> /μl)	23.6	(9.7-38.2)	18.6	(6.5-41.0)	0.001

表2 NASHのgrade, stage分類

Grade	所見	Stage	所見
Mild (grade 1)	大滴性脂肪沈着 ≤66% 中心静脈周囲肝細胞風船様変性 (軽度) 小葉内好中球、リンパ球浸潤 (無し or 軽度) 門脈域の炎症 (無し or 軽度)	Stage 1	中心静脈周囲性線維化 (類洞周囲、肝細胞周囲)
Moderate (grade 2)	脂肪沈着 中心静脈周囲肝細胞風船様変性 好中球浸潤を伴う中心静脈周囲性線維化 門脈域、小葉内炎症性細胞浸潤 (軽度~中等度)	Stage 2	中心静脈周囲性線維化 門脈域線維化
Severe (grade 3)	小葉全体の脂肪沈着 肝細胞索の乱れを伴う肝細胞様変性 小葉内好中球浸潤を伴う肝細胞様変性 門脈域炎症 (軽度~中等度)	Stage 3	中心静脈周囲性線維化 門脈域線維からのbridging fibrosis
		Stage 4	肝硬変

■画像診断

肝細胞の10%以上に脂肪蓄積があれば、腹部エコー、CT、MRIで脂肪肝の診断は可能である。しかし、進展したNASHでは脂肪滴が消失するため (burn-out NASH) 画像検査での診断は困難となる。

従来、画像検査では単純性脂肪肝かNASHかの鑑別は困難といわれていたが、NASHではKupffer細胞の貪食能が低下していることを利用し、最近のLevovist造影超音波検査では両者の鑑別診断が可能との報告がある。すなわち、Levovist造影超音波

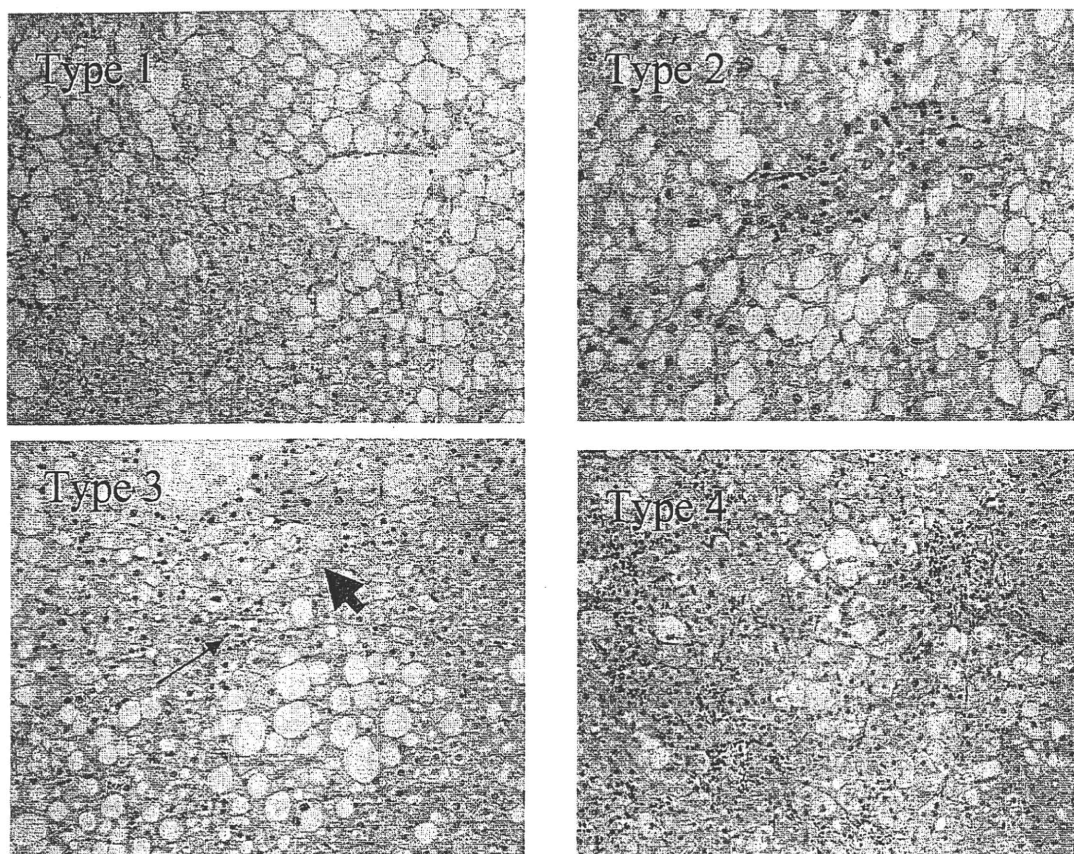


図 Matteoniらの分類のtype1, 2,3,4の組織所見を示す。type 1 は単純性脂肪肝, type 2は炎症を伴う脂肪肝であるが肝細胞風船様変性や線維化はなく, type 3はtype 2に肝細胞風船様変性を伴い, type 4は線維化を伴う典型的なNASH症例である。

検査でのKupffer phaseを観察するとNASHでは輝度の有意な低下が見られる。

#### ■病理診断

Ludwigらは非飲酒者で, 大滴性脂肪肝, 肝細胞風船様変性, 炎症性細胞浸潤(中心静脈域: zone 3が主), 中心静脈周囲の肝細胞周囲性線維化, とときにマロリー体(Mallory body)を有する例をNASHと命名した<sup>3)</sup>。NASHの一部は肝硬変に進展し, 肝硬変など線維化の進んだ状態では多くの例で脂肪滴が減少・消失するため(burn-out NASH), 診断に苦慮する。

Bruntらは<sup>4)</sup> NASHの病理所見を脂肪肝や炎症の程度(grading)と線維化の程度(staging)で評価・分類することを提案し, 現在NASHの病理分類として広く用いられている。対象症例は飲酒量(エタノール換算)20g/日未満, 抗核抗体160倍未満の症例

で, 脂肪肝(大滴性脂肪肝), 肝細胞風船様変性, 小葉内と門脈域の炎症と線維化の場所とその程度が評価の対象で, grading, stagingを表2に示す。

Matteoniら<sup>5)</sup>はNAFLDを4つのタイプに分類し, 予後との関係からtype 1,2を単純性脂肪肝, type 3,4をNASHと分類した。type 1は脂肪肝のみ, type 2は脂肪肝プラス小葉内の炎症(lobular inflammation), type 3は脂肪肝プラス肝細胞風船様変性(ballooning degeneration), type 4は脂肪肝, 肝細胞風船様変性プラス肝線維化あるいはマロリー体形成である。長期フォローの結果, type 3とtype 4からは肝硬変への進展や肝疾患関連死が見られたが, type 1, 2には肝硬変への進展例はなく, type 3, 4をNASHと診断することを提唱した。予後を加味した分類であるがtype 2と3の鑑別に苦慮することが多い。Matteoniらの分類に合致するtype1,2,3,4の組織所見を図に示した。

■肝組織診断基準と問題点

Matteoniらのtype 3は脂肪肝に炎症性細胞浸潤と肝細胞風船様変性 (ballooning degeneration) が加わった例で、炎症性細胞浸潤は別として、どの程度肝細胞風船様変性があれば陽性所見とするのか、診断医の主観に左右される。このような点を考慮し、最近NAFLDの肝組織所見の中から脂肪肝 (steatosis)、肝細胞風船様変性 (hepatocellular ballooning)、炎症 (lobular inflammation) の程度をスコア化し (NAFLD activity score: NAS)、NASHと単純性脂肪肝を鑑別することが提案されている<sup>6)</sup>。しかし、肝細胞風船様変性がなく肝線維化を伴っている脂肪肝をNASHとするか否か、意見の一致をみていない。

なお、最近、肝生検なしに年齢、BMI、血小板数、血清アルブミン、AST/ALTをスコア化し、肝線維化の有無を判断することが提唱されているが<sup>7)</sup>、血液生化学検査から、単純性脂肪肝とNASHの鑑

別が可能な方法の開発がより重要である。

参考論文

- 1) Yamauchi N, Itoh Y, Tanaka Y *et al.* Clinical characteristics and prevalence of GB virus C, SEN virus and HFE gene mutation in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 39: 654-660, 2004.
- 2) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T *et al.* Serum thioredoxine elucidates the significance of serum ferritin as a marker of oxidative stress in chronic liver disease. *Liver* 21: 295-299, 2001.
- 3) Ludwig J, Viggiano TR, Mc Gill DB *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438.
- 4) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-2474.
- 5) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419.
- 6) Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321.
- 7) Angulo P, Hui JM, Marchesini G *et al.* The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846-854.

News (学会情報)

5月22日から第51回日本糖尿病学会が開かれます

会 期：2008年5月22日 (木) ~24日 (土)

会 場：東京・東京国際フォーラム

会 長：門脇 孝 (東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科)

特別講演：1.内科医60余年—糖尿病学を学ぶ 特に2型糖尿病診療のあゆみについて

小坂 樹徳先生 (東京大学名誉教授/虎の門病院名誉院長)

2.タイトル未定 Bruce M. Spiegelman (Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA.)

3.iPS細胞の展望と課題 山中 伸弥先生 (京都大学iPS細胞研究センター センター長)

特別シンポジウム：1.世界の糖尿病対策

2.Controversies in Diabetes

3.解明されつつある糖尿病遺伝子

4.療養指導システムからエンパワーメントの実際まで-国際的動向-

シンポジウム：1.内外の大規模臨床研究

2.膵β細胞量の調節からみた2型糖尿病の発症機構

3.糖尿病腎症-研究の最前線

4.糖尿病患者の高血圧をいかにコントロールするか

5.インスリン作用はどこまで解明されたのか

6.脂肪組織における炎症とストレス応答

7.1型糖尿病の発症機構

8.治療に向けた膵β細胞の再生医学の展望

9.糖尿病足病変の治療の進歩と予防的フットケア

10.糖尿病患者に対する運動療法の理論と実際

など

連絡先：東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科：TEL (03) 3508-1226/FAX (03) 3508-1302

# 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

「アルコールと医学生物学」Vol.29 (2010) 別刷

東洋書店

# 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。

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つい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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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 と健常者とは差を認めなかった (図 1B). しかし, 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

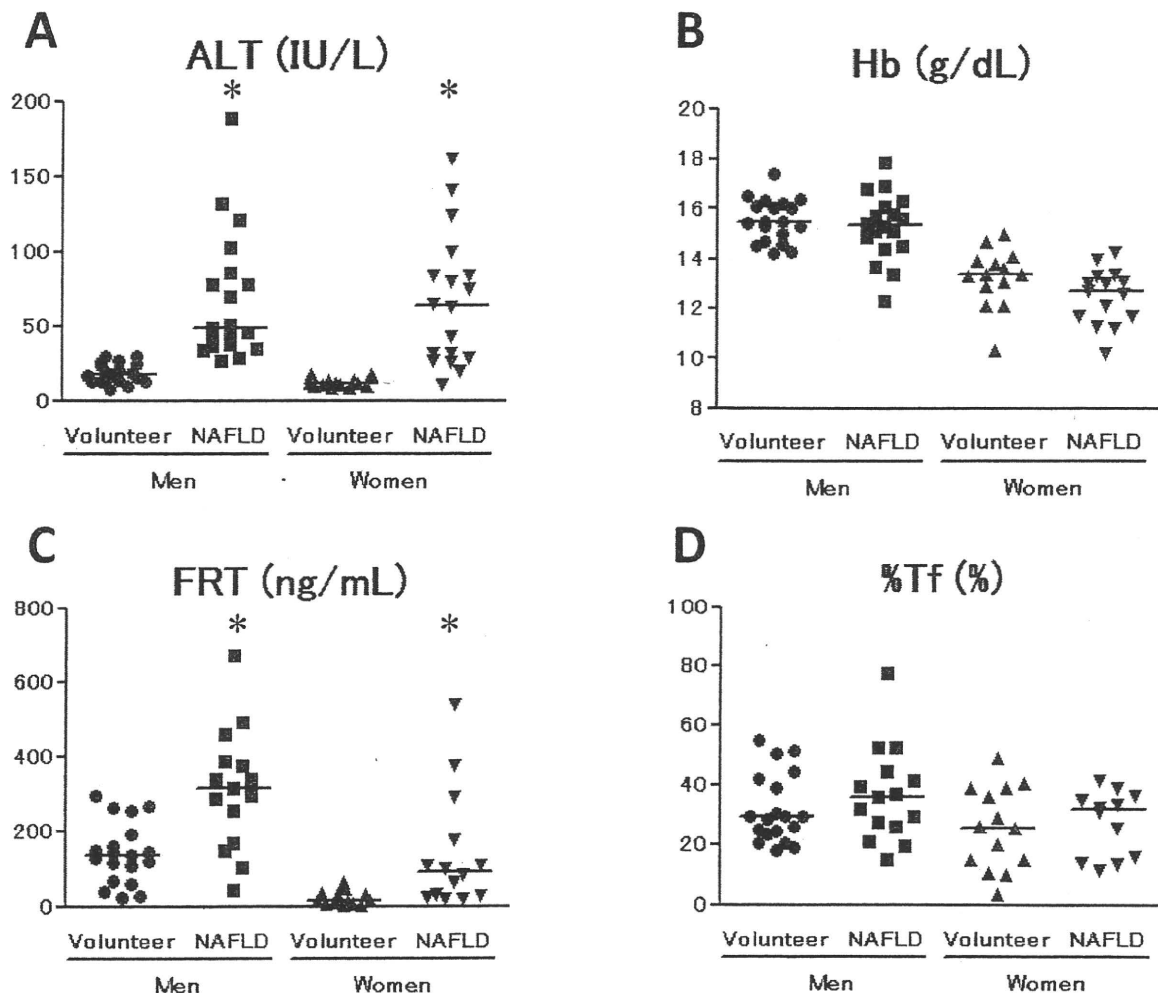


図 1 健常ボランティアと NAFLD 症例の血液生化学検査および鉄関連マーカー. (A) 血清 ALT 値,  $*p < 0.0001$  (Mann-Whitney). (B) ヘモグロビン値 (Hb). (C) 血清フェリチン値 (FRT),  $*p = 0.001$  (Mann-Whitney). (D) 血清トランスフェリン飽和度 (% Tf).



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

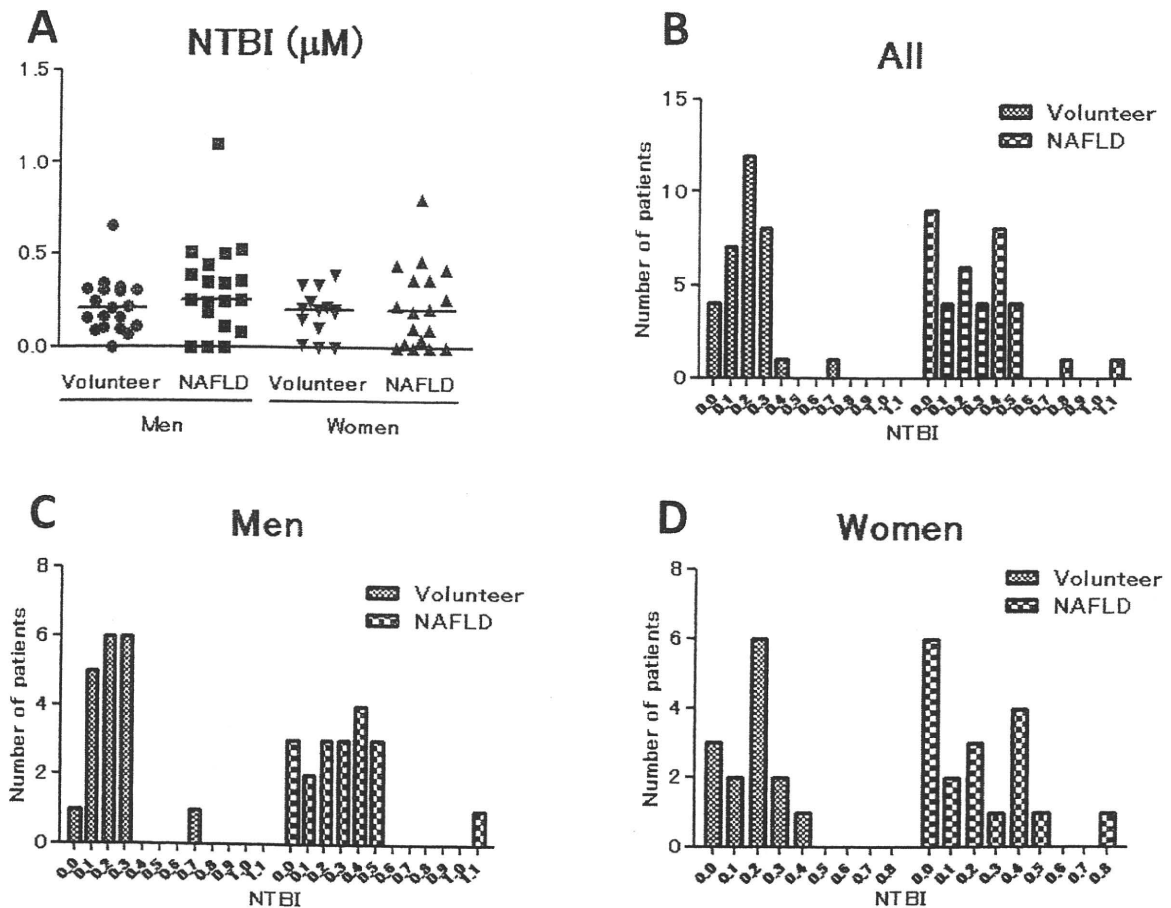


図 2 血清 NTBI 濃度. (A) 散布図. (B) ヒストグラム (全例). (C) ヒストグラム (男性). (D) ヒストグラム (女性). NAFLD 男性例では健常ボランティアの 75% パーセンタイル以上 ( $0.31 \mu\text{M}$ ) を示す症例が 47% 存在し, NTBI が高い傾向があった.

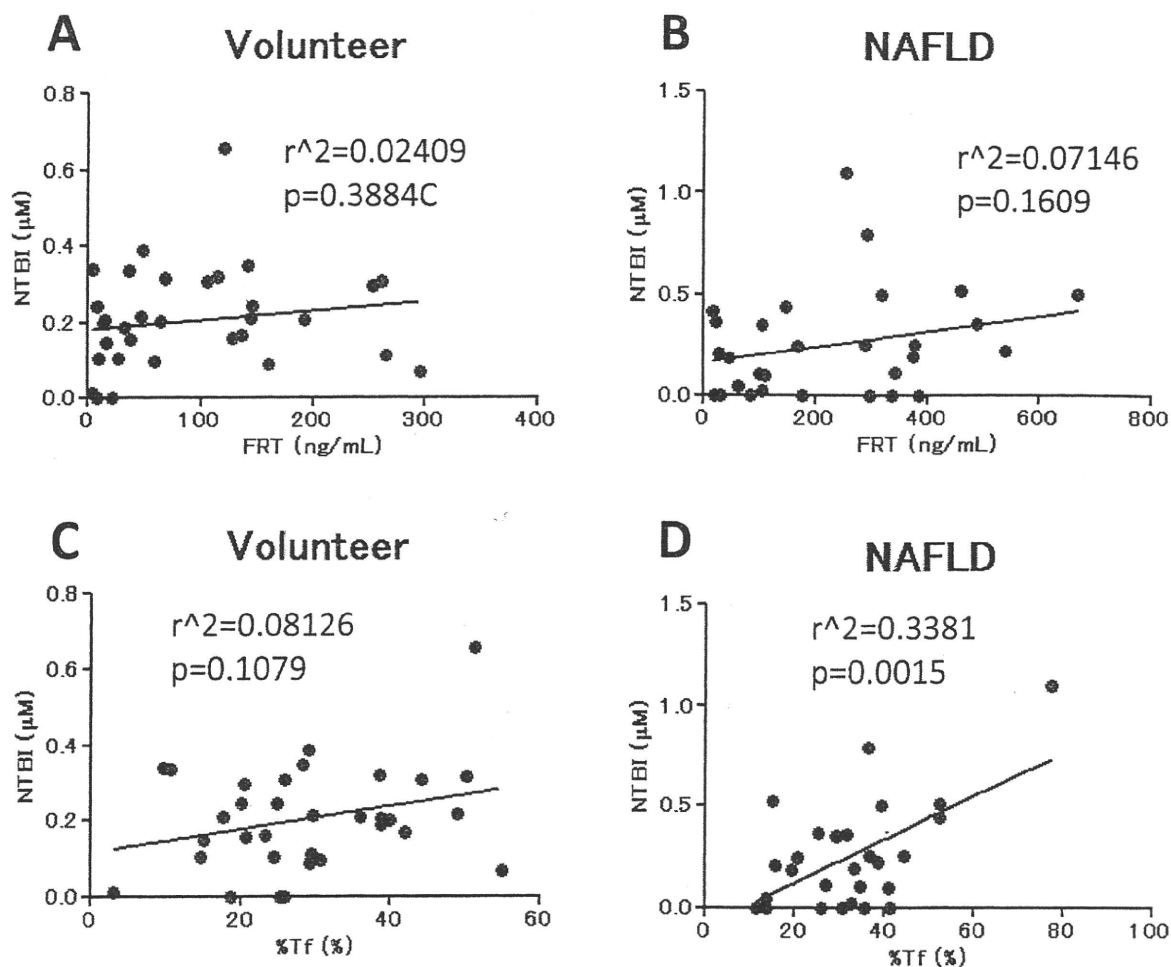


図3 血清フェリチンまたは% TfとNTBIとの関連。(A)健常者の血清フェリチンとNTBI。(B)NAFLD症例の血清フェリチンとNTBI。(C)健常者の% TfとNTBI。(D)NAFLD症例の% TfとNTBI。NAFLD症例において% TfとNTBIは正の相関を認める ( $r^2=0.3381$ ,  $p=0.0015$ )。

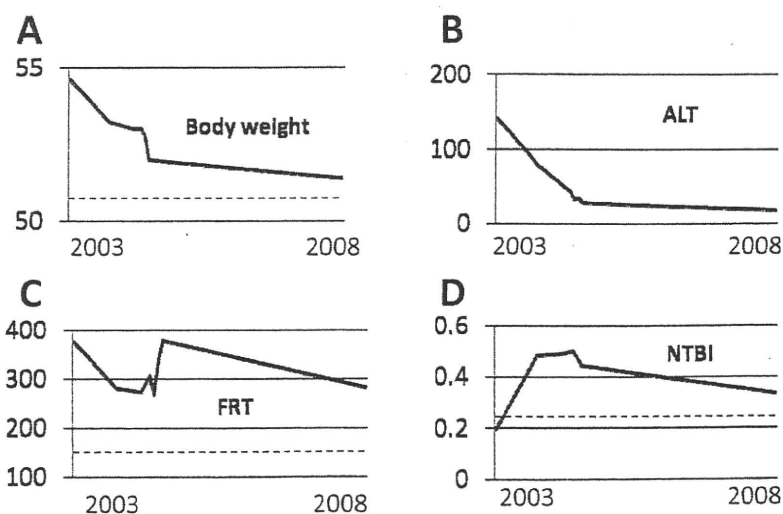


図4 提示症例の臨床経過。(A)体重(kg)。(B)血清ALT値(IU/L)。(C)血清フェリチン値(ng/mL)。(D)血清NTBI濃度(μM)。

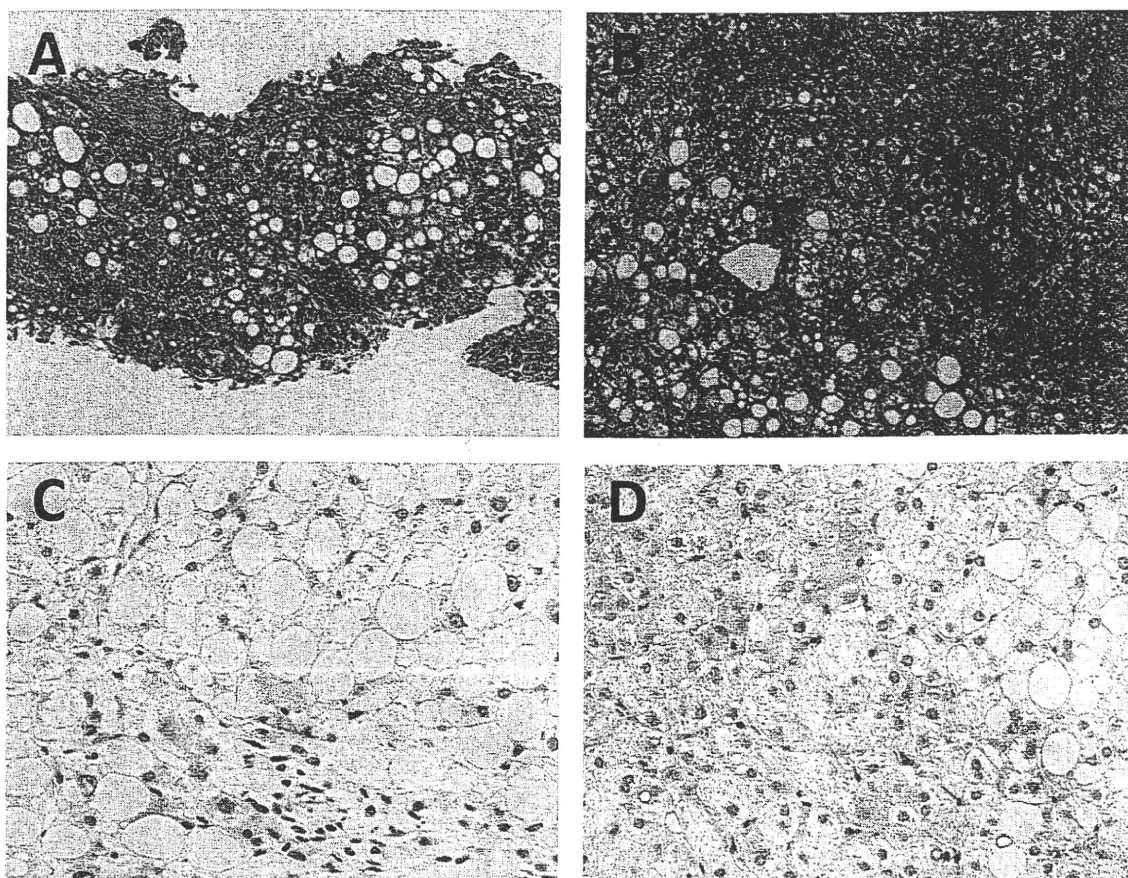


図5 (A) 2003年初診時肝生検 (Azan 染色). (B) 2008年2回目の肝生検 (Azan 染色). (C) 初回肝生検 (鉄染色). (D) 2回目肝生検 (鉄染色). 倍率: 100倍 (A, B), 400倍 (C, D).

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<sup>5)</sup>, アルコール性肝障害<sup>6), 7)</sup>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<sup>3)</sup>. 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<sup>8)</sup>や鎌状赤血球, サラセミアなど<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>、本例ように血清 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. Hepcidin 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

## 鉄関連分子動態と病態進展

大竹孝明\* 鈴木康秋\* 高後裕\*

索引用語：ヘモクロマトーシス，原因遺伝子，HFE，hepcidin，femoportin，hemojuvelin

## 1 はじめに

軽度から中等度の鉄過剰症の原因として種々の慢性肝疾患があるが，その病態に関しては不明な点が多い．本邦に多いC型慢性肝炎やアルコール性肝障害で肝内鉄過剰が高頻度にみられ，鉄による肝実質細胞の酸化ストレスが肝障害の原因となり，肝発癌にも寄与している．最近，増加しているNASH/NAFLDにおいても鉄過剰が高頻度であり，やはり病態進展の重要な因子として注目されている．本稿ではNASH/NAFLDの鉄関連分子動態と病態進展に関する最近の知見を述べる．

## 2 鉄代謝ホメオスターシス

健常状態において鉄は粘膜・皮膚上皮の脱落によってわずかに喪失するだけで，能動的に体外に排泄されない．生命活動維持に必要な鉄の供給源は，ほとんどが網内皮系細胞（脾臓，骨髄の組織マクロファージ，肝臓のKupffer細胞）による老廃赤血球のヘモグロビ

ン鉄の再利用によって得られている．1日にわずか1～2 mgの鉄が十二指腸，上部小腸から吸収されるだけで鉄出納のバランスがとれている．吸収された食餌鉄は主にTf結合鉄の形で血中を輸送された後，主に骨髄での赤血球造血で利用されるとともに，残りは肝臓や網内皮系細胞に蓄積される．中でも鉄の貯蔵臓器として重要な役割をしているのが肝臓である．貯蔵鉄は肝実質細胞内ではフェリチンにKupffer細胞内では主にヘモジデリンに隔離貯蔵されており，必要に応じて血清中の再利用プールに汲み出される．このように生体の鉄代謝は半閉鎖系システムであり，正常状態では鉄の過剰や欠乏が起きないように厳密に調節されている(図1)．

## 3 鉄関連分子

欧米に多い遺伝性ヘモクロマトーシスの研究から鉄代謝関連遺伝子がクローニングされ，それらの病的生理的機能が明らかになってきている．表1に主な遺伝子群を示す．これらのいくつかの遺伝子の発現異常が

Takaaki OHTAKE *et al* : Regulation of iron-related molecules in pathogenesis and progression of NASH/NAFLD

\*旭川医科大学大学院医学系研究科消化器・血液腫瘍制御内科学 [〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1-1]

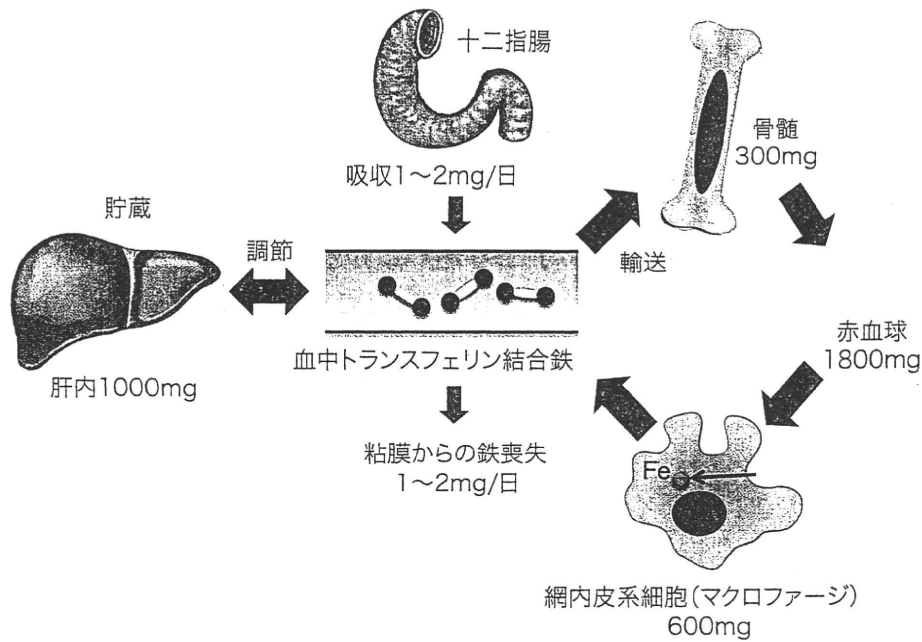


図1 鉄代謝ホメオスターシス

生体に必要な鉄は老廃赤血球のヘモグロビン鉄の再利用によってまかなわれる半閉鎖的な代謝系で恒常性が保たれている。積極的に排泄する系がないことから鉄過剰になると不安定鉄が相対的に増加し、酸化ストレスによる細胞毒性が出現する。特に肝臓は鉄貯蔵臓器であることから鉄過剰症による酸化ストレスで肝障害が出現しやすい。

表1 主な遺伝子群

蛋白	略語	遺伝子表記	機能
鉄取り込み			
Transferrin	Tf	<i>TF</i>	血清鉄の輸送
Transferrin receptor 1	TfR1	<i>TFRC</i>	トランスフェリン結合鉄の細胞内取り込み
Divalent metal-ion transporter 1	DMT1	<i>SLC11A2</i>	非トランスフェリン結合鉄の細胞内輸送
鉄放出			
Ferroportin	FPN	<i>SLC40A1</i>	鉄の細胞外放出
Ceruloplasmin	Cp	<i>CP</i>	鉄酸化
調節			
Hepcidin	HEPC	<i>HAMP</i>	鉄放出調節因子, FPNの分解調節
Hemochromatosis protein	HFE	<i>HFE</i>	HEPCの調節因子
Transferrin receptor 2	TfR2	<i>TFR2</i>	HEPCの調節因子
Hemojuvelin	HJV	<i>HFE2</i>	HEPCの調節因子

NASH/NAFLDで報告されていて、NASH/NAFLDの病態における鉄代謝異常の重要性が注目されている(図2)。鉄の血中運搬を担うトランスフェリン、肝細胞にトランスフェリン結合鉄を取り込むTransferrin receptor 1(TfR1)、腸管細胞に食餌鉄を取り込む

Divalent metal transporter 1(DMT1)、腸管細胞、マクロファージから鉄を血中へ放出するFerroportin(FPN)が重要な役割を持つ。またこれら鉄の動態調節を行っているのが肝臓で産生されるHepcidin(HEPC)である。HEPCは鉄負荷、感染、炎症などでその発現

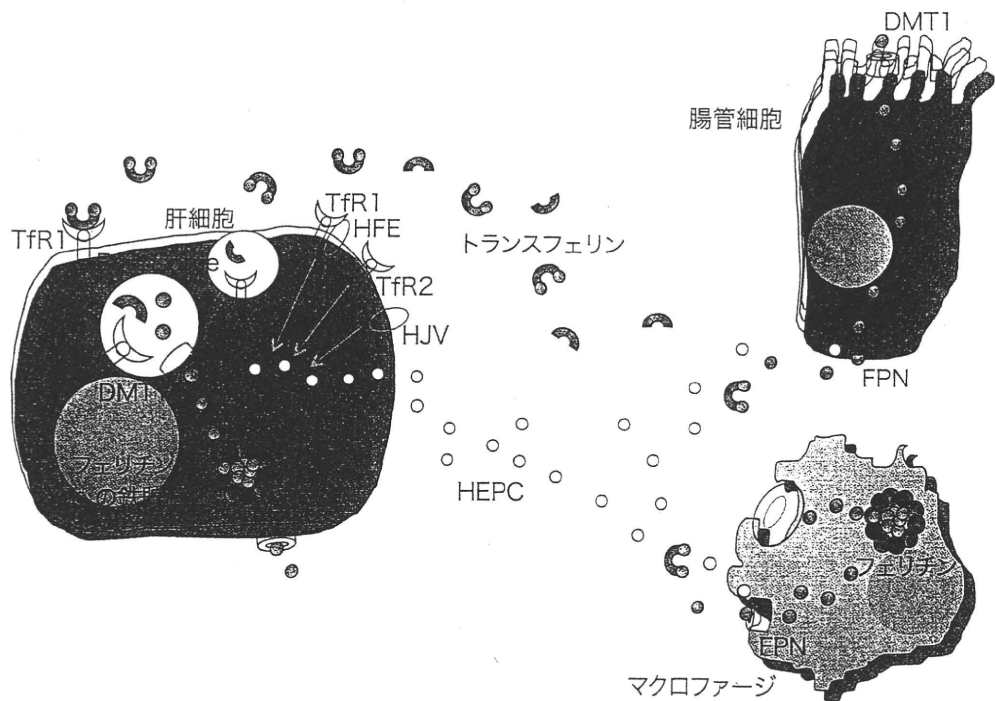


図2 鉄関連分子

肝細胞, 腸管細胞, 網内皮系細胞(マクロファージ)に発現する主な鉄関連分子

Tfr1: Transferrin receptor 1, DMT1: Divalent metal transporter 1, FPN: Ferroportin, HEPC: Hepsidin, Tfr2: Transferrin receptor 2, HJV: Hemojuvelin

が亢進し, 腸管細胞, マクロファージの FPN の発現を抑制することにより鉄の血中への放出を低下させる. 肝細胞において鉄の動態を感知して HEPC の発現を調節している分子群として HFE, Transferrin receptor 2 (Tfr2), Hemojuvelin (HJV) があり, HEPC, FPN とともに遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子となっている.

#### 4 NASH/NAFLDと鉄代謝異常

NASH/NAFLD においても C 型慢性肝炎やアルコール性肝障害と同様に軽度から中等度の肝内鉄過剰蓄積が認められ, 酸化ストレスを増強する因子と考えられている. 当初, NASH/NAFLD においてもヘモクロマトーシス原因遺伝子 HFE の変異が高頻度に認められ関連性が示唆された<sup>1)</sup>. その後, HFE に変異がない症例にも肝内鉄過剰蓄積がみられる

ことから NASH/NAFLD の鉄過剰症の原因が遺伝子変異以外にもあると考えられるようになった<sup>2)</sup>. ほとんどの NASH/NAFLD がインスリン抵抗性や代謝異常を合併し, 逆に明らかな遺伝子変異のない高フェリチン血症例のほとんどが体重オーバーの中年男性であり, Body mass index (BMI) 高値, 拡張期血圧上昇, 空腹時 C-ペプチド高値などのメタボリック因子を合併し, 肝生検を行うと 65% 以上で脂肪肝, 核糖原などの NAFLD に矛盾しない所見が認められた. これらの症例ではフェリチンレベルと C-ペプチドレベルは相関し, 高フェリチン血症とインスリン抵抗性の関連が示唆された<sup>3)</sup>. このように NASH/NAFLD で鉄過剰症を合併しているタイプは insulin resistance-associated iron overload や Dysmetabolic hepatic iron overload と呼ばれる病態と同義と考えられるようになった.

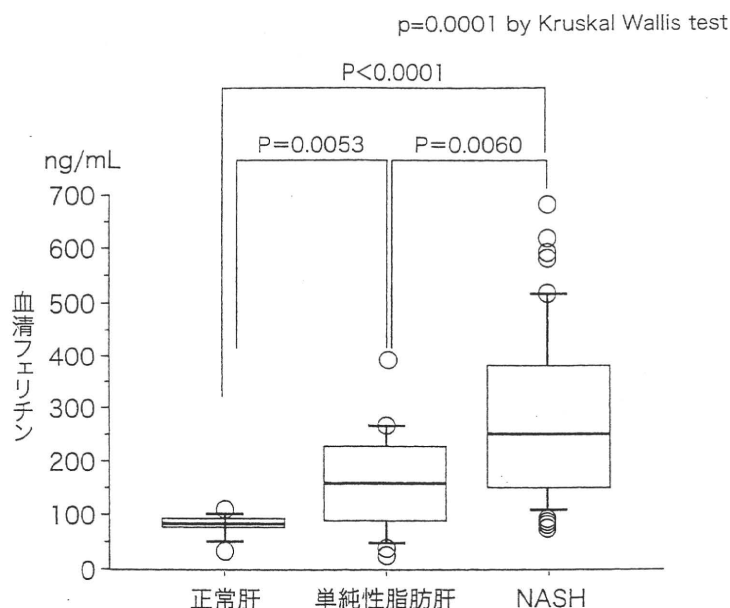


図3 NASH/NAFLDにおける貯蔵鉄マーカー血清フェリチン値 (文献7から引用)

NASH/NAFLDにおいて年齢、肥満、糖尿病の合併の有無は肝線維化の進展の独立した予測因子であるが、トランスフェリン飽和度の値もNASH/NAFLDの線維化の進展度と正の相関があると報告されている<sup>4)</sup>。さらに、肝内過剰鉄とともに酸化ストレスマーカーの上昇が認められていることも報告され<sup>5)</sup>、肝内の鉄の過剰蓄積によってROS産生が増加し、肝細胞障害の増強、肝線維化の亢進の重要な因子の一つと考えられている。最近では、高フェリチン血症と複数の代謝異常の合併がNASH/NAFLD診断の重要な因子といわれており<sup>6)</sup>、Yonedaらの報告ではNASHでは単純性脂肪肝に比べ有意に血清フェリチンが高値であり、本邦の単純性脂肪肝とNASHの鑑別診断に有用であることが示されている<sup>7)</sup> (図3)。

治療においてもNASH/NAFLDに対し瀉血療法が有効であることが報告され<sup>8)</sup>、さらに、瀉血とカロリー・脂肪制限食による減量はそれぞれが鉄代謝、糖・脂質代謝、肝機能を改善すると報告された<sup>9)</sup>。このことから肝

内の鉄過剰蓄積とインスリン抵抗性との関連と両者の肝細胞障害への関与が示唆されている。いまだNASH/NAFLDにおけるinsulin resistance-associated iron overloadの機序は不明である。しかし、最近NASH/NAFLDの鉄代謝異常のメカニズムにも言及する報告が散見されるようになってきた。

## 5 NASH/NAFLDとHFE遺伝子変異

NASH/NAFLDと鉄関連分子の関連では初めにヘモクロマトーシス原因遺伝子HFEとの関連が欧米から出た。Bonkovskyらは白人のNASH/NAFLDと健常コントロールにおいてHFE遺伝子のC282YとH63D変異の頻度を検討し、どちらかの遺伝子変異が存在する確率が健常者に対しNASH/NAFLDで有意に効率であり、HFE変異のあるNASH症例で有意に血清フェリチン、鉄、トランスフェリン飽和度、肝鉄染色度が高いと報告した。また、C282Y遺伝子変異症例は有意に線維化が進展し、血清ALTも高値であった。このことから北米のNASH/NAFLDにお



いてヘモクロマトーシス原因遺伝子のHFE遺伝子変異が高頻度であると注目された<sup>1)</sup>。MendlerらはHFE遺伝子C282Yホモ接合型でない肝内鉄過剰症の症例161人において検討し、鉄過剰症群で有意にC282YまたはH63Dのヘテロ接合型が高頻度に存在していたが、遺伝子変異の有無で鉄過剰の程度に差がなく、NASH/NAFLDの症例で血清フェリチン高値、肝障害、肝線維化が認められ、HFE遺伝子変異ヘテロ接合型であるよりもインスリン抵抗性との関連がより強いことを示した<sup>2)</sup>。その後、Chitturiらは多彩な民族のNASH患者において検討し、Anglo-CelticのNASH患者においてC282Yヘテロ接合型は高頻度で、血清フェリチンが上昇傾向を示すことを報告した<sup>10)</sup>。さらにNASH/NAFLDに対する北アメリカの多施設コホート研究においてもCaucasiansではC282Yヘテロ接合型に肝線維化進展例と鉄染色陽性例が多いことが示された<sup>11)</sup>。ブラジルのNASH/NAFLDの報告では人種Caucasians 72%、Mulattoes 12%、Asians 12%においてC282Y、H63Dアレル頻度はともに健常者と変わりなく、ブラジルにおけるNASH/NAFLDの鉄過剰症とHFE遺伝子変異との間に関連はなく、他の因子が関与していると報告された<sup>12)</sup>。ちなみに、インド人のNASH/NAFLDにおいては鉄過剰の頻度もHFE遺伝子変異の頻度も低く、西洋のNASH/NAFLDと病態が異なり、より生活習慣の関与が強いことが指摘された<sup>13)</sup>。そして、Yonedaらの報告では、本邦においてもやはりHFE遺伝子変異の関与は認められないことが確認された<sup>7)</sup>。

## 6

### NASH/NAFLDの鉄関連分子発現の変化

はじめにNASH/NAFLDにおいて鉄関連分

子の発現が報告されたのは鉄代謝調節因子hepcidin (HEPC)についてだった。当初、肥満者において糖尿病やNASH/NAFLDの有無は肝および脂肪のHEPCの発現に影響しないだけでなく、肥満者における炎症性貧血の原因として炎症性サイトカインによるHEPCの発現の関与が示唆され、鉄過剰症とは多少異なった観点から報告された<sup>14)</sup>。

最近になってNASH/NAFLDの鉄過剰症における鉄関連分子の発現異常に関する報告が出てきている。AignerらはNASH/NAFLDにおいて肝の鉄放出トランスポーターであるFPNと鉄センサー分子であるHJVの発現が有意に低下し、さらに鉄過剰のあるNAFLDではHEPCの発現が亢進し、十二指腸のFPNは低下し、これらの鉄関連分子の発現変化に対してアディポサイトカインであるTNF $\alpha$ 発現亢進との関連を示唆した。HEPCの発現が亢進し十二指腸のFPNの発現が低下しても、肝のFPNの発現低下が持続しているため肝内の鉄保持が持続すると考察している<sup>15)</sup>。また、別の検討ではDysmetabolic Hepatic Iron Overload (DHIO)の患者では鉄トランスポーターの発現に差を認めず、HEPCの発現は遺伝性ヘモクロマトーシスや $\beta$ サラセミアほどの低下は認められないが、鉄過剰量で補正すると健常状態に比べて有意に低下しているという結果であった<sup>16)</sup>。本邦においてもMitsuyoshiらはNASH/NAFLDの肝組織の鉄関連分子の発現を検討している。トランスフェリン結合鉄を肝細胞に取り込むTfR1の発現がステージの進展とともに亢進し、鉄センサーであるTfR2の発現は低下していた。また、貯蔵鉄マーカーである血清フェリチンで補正したHEPCの発現はNASH症例では単純性脂肪肝症例より有意に低下していた<sup>17)</sup>。

興味深い報告として、銅代謝異常と鉄代謝異常の関連性に関する報告がある。AignerらはNASH/NAFLDにおいて肝内銅濃度の低下があり、特に血清銅、肝内銅濃度が低い症例では血清フェリチンが上昇し、肝内鉄濃度が上昇することを示した。これらの症例では血清のcopper-dependent ferroxidase ceruloplasminは低下し、肝組織のFPNの発現が低下していた。ラットの実験でも銅摂取量を低下させるとFPNの発現が低下し、NAFLDにおいて銅欠乏が肝におけるFPN発現低下とceruloplasmin ferroxidase活性低下を介して肝内貯蔵鉄を増加させると考えられた<sup>18)</sup>。

このように報告によって鉄関連分子の動態に差が認められるが、少しずつNASH/NAFLDの鉄代謝異常の分子メカニズムが明らかになってきている。

## 7 まとめ

NASH/NAFLDの代謝異常の一つとして鉄過剰症が高頻度に合併して、肝細胞の酸化ストレスの関与している。近年、その分子メカニズムの研究が進んできているが、NASH/NAFLDの病態の多様性に加えて人種による違いもあり、いまだ一定の見解を得ていない。今後、本疾患の酸化ストレスに対する治療介入法を探るうえで本研究領域の進歩が必要と思われる。

## 文 献

- 1) Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K et al : Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 31 (3) : 421-429, 1999
- 2) Mendler MH, Turlin B, Moirand R et al : Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 117 (5) : 1155-1163, 1999
- 3) Brudevold R, Hole T, Hammerström J : Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. *PLoS One* 3 (10) : e3547, 2008
- 4) Angulo P, Keach JC, Batts KP et al : Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 30 : 1356-1362, 1999
- 5) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T et al : Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 38 : 32-38, 2003
- 6) Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL et al : Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 96 : 2448-2550, 2001
- 7) Yoneda M, Nozaki Y, Endo H et al : Serum ferritin is a clinical biomarker in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) independent of HFE gene mutation. *Dig Dis Sci* 55 (3) : 808-814, 2010
- 8) Guillygomarc'h A, Mendler MH, Moirand R et al : Venesection therapy of insulin resistance-associated hepatic iron overload. *J Hepatol* 35 : 344-349, 2001
- 9) Piperno A, Vergani A, Salvioni A et al : Effects of venesections and restricted diet in patients with the insulin-resistance hepatic iron overload syndrome. *Liver Int* 24 : 471-476, 2004
- 10) Chitturi S, Weltman M, Farrell GC et al : HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology* 36 (1) : 142-149, 2002
- 11) Nelson JE, Bhattacharya R, Lindor KD et al : HFE C282Y mutations are associated with advanced hepatic fibrosis in Caucasians with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 46 (3) : 723-729, 2007
- 12) Deguti MM, Sipahi AM, Gayotto LC et al : Lack of evidence for the pathogenic role of iron and HFE gene mutations in Brazilian patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Braz J Med Biol Res* 36 (6) : 739-745, 2003
- 13) Duseja A, Das A, Das R et al : The clinicopathological profile of Indian patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is different from that in the West. *Dig Dis Sci* 52 (9) : 2368-2374, 2007

- 14) Bekri S, Gual P, Anty R et al : Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131 (3) : 788–796, 2006
- 15) Aigner E, Theurl I, Theurl M et al : Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 87 (5) : 1374–1383, 2008
- 16) Barisani D, Pelucchi S, Mariani R et al : Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol* 49 (1) : 123–133, 2008
- 17) Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y et al : Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 39 (4) : 366–373, 2009
- 18) Aigner E, Theurl I, Haufe H et al : Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 135 (2) : 680–688, 2008

\*

\*

\*

# NASH/NAFLDの 診断・治療

