

- 34 Harima Y, Yamasaki T, Hamabe S *et al.* Effect of a late evening snack using branched-chain amino acid-enriched nutrients in patients undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2010; 40: 574–84.
- 35 Suzuki K, Kagawa K, Koizumi K, Suzuki K, Katayama H, Sugawara M. Effects of late evening snack on diurnal plasma glucose profile in patients with chronic viral liver disease. *Hepatol Res* 2010; 40: 887–93.
- 36 Habu D, Nishiguchi S, Nakatani S *et al.* Comparison of the effect of BCAA granules on between decompensated and compensated cirrhosis. *Hepato-Gastroenterology* 2009; 56: 1719–23.
- 37 Kawamura E, Habu D, Morikawa H *et al.* A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early cirrhosis: validation using prognostic markers for pre-liver transplant status. *Liver Transpl* 2009; 15: 790–97.
- 38 Iwasa J, Shimizu M, Shiraki M *et al.* Dietary supplementation with branched-chain amino acids suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-db/db mice. *Cancer Sci* 2010; 101: 460–7.
- 39 Moriwaki H, Aoyagi S, Ishizuka Y *et al.* *Japanese Anthropometric Reference Data 2001*. Osaka: Medical Review, 2002.
- 40 Kawano Y, Ando K, Matsuura H, Tsuchihashi T, Fujita T, Ueshima H. Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension. Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (1) Rationale for salt restriction and salt-restriction target level for the management of hypertension. *Hypertens Res* 2007; 30: 879–86.

## 研究論文紹介

## 非環式レチノイドによる肥満関連肝腫瘍形成の抑制

岐阜大学大学院医学系研究科腫瘍制御学講座消化器病態学分野\*

清水 雅仁, 森脇 久隆

Vitamins (Japan), 86 (5・6), 309-312 (2012)

Acyclic retinoid inhibits diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BLKS/J- +Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup> mice

Masahito Shimizu, Hisataka Moriwaki

Department of Gastroenterology, Gifu University Graduate School of Medicine

[Cancer Prev. Res. 4, 128-136 (2011)]

肝細胞がんの予後の改善のためには、積極的な介入による発がん化学予防 (cancer chemoprevention) が重要である。近年、従来の危険因子である肝炎ウイルス感染やアルコールの大量摂取に加え、インスリン抵抗性、Insulin like growth factor (IGF) /IGF-1 受容体の過剰活性、アディポサイトカインの不均衡、内臓脂肪の増加に伴う慢性炎症、酸化ストレスの亢進等、肥満や糖尿病によって惹起される様々な分子異常が、肝細胞がんの発がん・進展に深く関与していることが明らかになってきている<sup>1)</sup>。また、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: Non-alcoholic steatohepatitis) も、肝発がんを考える上で注意すべき病態であるが (図1)、これらの報告は、栄養学的介入や薬剤投与によって肥満に関連した分子異常を改善・制御することが、肝発がん予防に繋がる可能性を示唆するものである。これを裏付けるエビデンスとして、慢性肝疾患に伴うタンパク栄養障害を改善する分岐鎖アミノ酸の補充療法が、肥満を合併する非代償性肝硬変患者の肝発がんを有意に抑制した臨床試験 (LOTUS 試験) と<sup>2)</sup>、その作用機序としてインスリン抵抗性の改善作用が重要であることを示した我々の基礎実験の結果がある<sup>3)</sup>。

一方、我々は今までに、細胞の基本的活動を制御す

るレチノイド核内受容体 RXR $\alpha$  が、Ras/MAPK/ERK により恒常的にリン酸化修飾を受け機能不全に陥ることで、肝細胞の分化・増殖・死 (アポトーシス) に異常を生じることが、肝発がんの主要なメカニズムの一つであることを報告してきた<sup>4)5)</sup>。RXR $\alpha$  のアゴニストである非環式レチノイド (興和創薬株式会社) は、RXR $\alpha$  依存性の様々な遺伝子の発現を調節し、アポトーシスの誘導や細胞周期の制御等を介して、肝がん細胞に増殖抑制効果を発揮する。さらに非環式レチノイドは、RXR $\alpha$  のリガンドとしての作用のみならず、RXR $\alpha$  のリン酸化修飾そのものを解除し、その機能を回復する作用を有することが、最近の研究で明らかになってきている (図2)<sup>6)7)</sup>。また臨床介入試験において、非環式レチノイドは初発肝がん根治治療後の二次肝発がんを有意に抑制するとともに生存率も改善することが確認されたため<sup>8)9)</sup>、世界初の「肝発がん抑制薬」としての臨床応用が期待されている。

今回我々は、非環式レチノイドが肥満に関連した肝腫瘍形成を抑制するか、以下の検討を行った。レプチン受容体の mutant で高度の肥満・糖尿病をきたす db/db マウスに、肝化学発がん物質である diethylnitrosamine (DEN) を2週間飲水投与して肝腫瘍を誘発したのち、

\*〒 501-1194 岐阜市柳戸 1-1 岐阜大学医学部消化器病態学 清水 雅仁 E-Mail : shimim-gif@umin.ac.jp

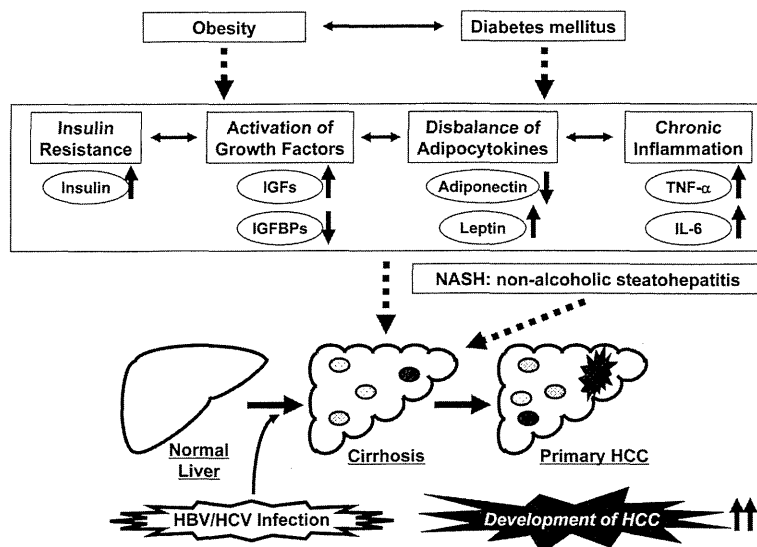


図1 「肥満関連分子異常と肝発がん」

肥満や糖尿病によって惹起される様々な分子異常(インスリン抵抗性, IGF/IGF-1 受容体の過剰活性, アディポサイトカインの不均衡, 慢性炎症等)や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は, 肝細胞がんの発がん・進展に深く関与している。HBV: hepatitis B virus, HCC: hepatocellular carcinoma, HCV: hepatitis C virus, IGF: insulin like growth factor, IGFBP: insulin like growth factor binding protein

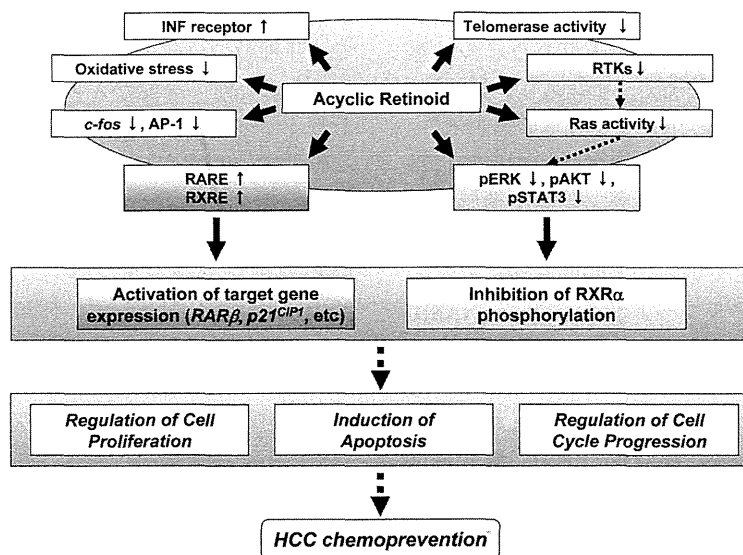


図2 「非環式レチノイドの肝発がん抑制機序」

非環式レチノイド(Acyclic retinoid)は, RXRα のリガンドとして作用し, RARβ, p21<sup>CIP1</sup>をはじめとする様々な標的遺伝子の発現を調節するとともに, RXRα のリン酸化修飾を解除しその機能を回復することで, 肝がん細胞の増殖を抑制する。

AP-1: activator protein-1, INF: interferon, pAkt, phosphorylated Akt, pERK, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, pSTAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription-3, RARβ, retinoic acid receptor β; RARE, retinoic acid receptor responsive element; RTK, receptor tyrosine kinase; RXRα, retinoid X receptor-α; RXRE, retinoid X response element

0.03%および0.06%非環式レチノイド添加食を34週間混餌投与したところ、非環式レチノイド投与群では、基礎食対照群と比較し、肝腫瘍(腺腫)と肝前がん病変の発生が有意に抑制された。非環式レチノイド投与群の肝臓を解析したところ、活性化Rasは低下し、ERKおよびStat3タンパクのリン酸化は抑制されるとともに、リン酸化RXR $\alpha$ タンパクの発現は低下していた。非環式レチノイド投与群の肝臓において、同剤の標的遺伝子であるRXR $\beta$ 、p-21 mRNAの発現上昇と、cyclin D1、c-Fos、c-Jun mRNAの発現低下が認められた。また非環式レチノイド投与群において、肝脂肪化の改善と肝臓におけるAMPKタンパクの活性化、および血清TNF- $\alpha$ 値の低下と肝臓におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  mRNAの発現低下が認められた。これらの結果は、非環式レチノイドが、肥満によって惹起されたインスリン抵抗性と全身および肝臓における慢性炎症状態の改善をするとともに、Ras/MAPK/ERKによって誘導されたRXR $\alpha$ のリン酸化を抑制することで、肥満に関連した肝腫瘍形成を抑制した可能性を示唆するものである(図3)。

肥満や糖尿病、メタボリックシンドロームが大きな社会問題である今日の状況を考えれば、これらの病態を合併した慢性肝疾患患者、あるいはNASH由来の肝硬変、肝細胞がん患者の更なる増加が危惧される。肝発がん予防薬として臨床応用が期待されている非環式レチノイドが、肥満に伴った様々な分子異常を改善し、肥満関連肝発がんを抑制したことは、今後の肝がん診療を考える上で大変興味深い結果と考えられた。今後、

非環式レチノイドを用いた、積極的介入に基づく肝細胞がん化学発がん予防に関する研究が進展し臨床応用が展開され、慢性肝疾患患者の予後が改善されることが期待される。

## 文 献

- 1) El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557-2576
- 2) Muto Y, Sato S, Watanabe A, Moriwaki H, Suzuki K, Kato A, Kato M, Nakamura T, Higuchi K, Nishiguchi S, Kumada H, Ohashi Y (2006) 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 Res* **35**, 204-214
- 3) Iwasa J, Shimizu M, Shiraki M, Shirakami Y, Sakai H, Terakura Y, Takai K, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H (2010) Dietary supplementation with branched-chain amino acids suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-db/db mice. *Cancer Sci* **101**, 460-467
- 4) Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Adachi S, Sano T, Akita K, Moriwaki H, Friedman SL, Kojima S (2001) Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **61**:7675-7682
- 5) Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y (2002) Phosphoryla-

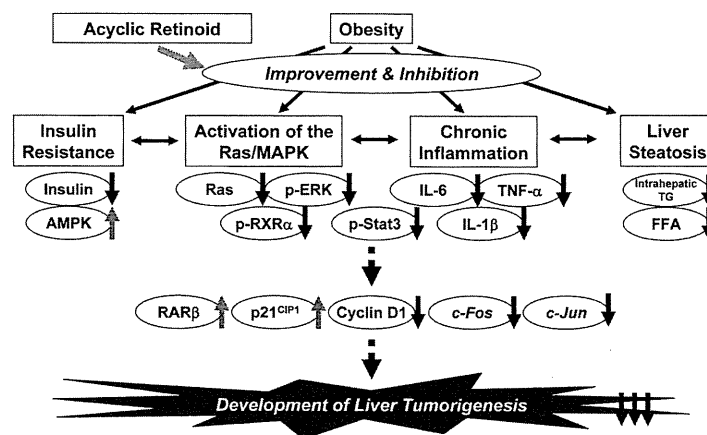


図3 「非環式レチノイドによる肥満関連肝腫瘍形成の抑制機序」

非環式レチノイドは、インスリン抵抗性や脂肪肝、慢性炎症状態を改善するとともに、Ras/MAPKの活性を阻害しRXR $\alpha$ のリン酸化を抑制することで、マウスの肥満関連肝腫瘍形成を抑制する。

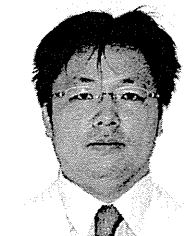
FFA: free fatty acid, IL: interleukin, MAPK: mitogen-activated protein kinase, TG: triglyceride, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$

- tion of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **35**, 332-340
- 6) Shimizu M, Takai K, Moriwaki H (2009) Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma: phosphorylated retinoid X receptor alpha is a critical target for hepatocellular carcinoma chemoprevention. *Cancer Sci* **100**, 369-374
- 7) Shimizu M, Sakai H, Moriwaki H (2011) Chemoprevention of hepatocellular carcinoma by acyclic retinoid. *Front Biosci* **16**, 759-769
- 8) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, Tanaka T, Tsurumi K, Okuno M, Tomita E, Nakamura T, Kojima T (1996) Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* **334**, 1561-1567
- 9) Muto Y, Moriwaki H, Saito A (1999) Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **340**, 1046-1047

# 分岐鎖アミノ酸による予後改善と肝発癌予防

——肥満を合併した肝硬変

Improvement of prognosis and prevention of liver carcinogenesis by branched-chain amino acids in cirrhotic patients



清水雅仁(写真) 白木 亮 森脇久隆

Masahito SHIMIZU, Makoto SHIRAKI and Hisataka MORIWAKI

岐阜大学大学院医学系研究科腫瘍制御学講座消化器病態学分野

◎肝は栄養代謝の中心であり、慢性肝疾患の終末像である肝硬変ではさまざまな栄養代謝障害が生じている。分岐鎖アミノ酸(BCAA)製剤は慢性肝疾患に伴う蛋白質・エネルギー低栄養状態を改善するが、2005年に報告された大規模臨床試験(LOTUS試験)において、同剤の補充療法が非代償性肝硬変患者の予後やQOLを改善することが明らかになった。また、肥満や糖尿病、インスリン抵抗性は肝発癌の危険因子であるが、BCAA製剤は肥満を合併した非代償性肝硬変患者の肝発癌を有意に抑制した。BCAAによる肥満関連肝発癌抑制機序のひとつとして、インスリン抵抗性の改善作用が考えられる。肝硬変患者の栄養状態や肝不全に伴う諸症状を改善するのみならず、近年増加傾向にある肥満や糖尿病を合併した肝硬変患者の発癌を抑制するBCAAは、慢性肝疾患患者の予後改善を目指す上で重要な薬剤である。



肝硬変, 分岐鎖アミノ酸(BCAA), LOTUS試験, 肝発癌予防, 肥満

肝は脂質, 糖質, 蛋白質・アミノ酸などの栄養素を代謝制御する中心的臓器であり, 慢性肝疾患の終末像で肝細胞が減少する肝硬変では, しばしば蛋白質・エネルギー低栄養状態(protein-energy malnutrition: PEM)を認める。とくに肝硬変患者では, 血漿遊離アミノ酸のインバランスとして分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acids: BCAA)が低下することが知られている<sup>1,2)</sup>。BCAAは側鎖に分岐をもつ3種類のアミノ酸(バリン, ロイシン, イソロイシン)であり, 経口BCAA製剤は低アルブミン血症を伴った肝硬変患者に用いられる。

2005年に報告された多施設無作為化比較試験(LOTUS試験)で, BCAA製剤の補充療法が非代償性肝硬変患者の有害イベントを予防し, 同患者の予後とQOLを改善することが明らかになった<sup>3)</sup>。また, 糖尿病やインスリン抵抗性などの肥満に関連したさまざまな病態は, 慢性肝疾患患者の主要死因である肝発癌の重要な危険因子であ

る<sup>4)</sup>が, LOTUS試験の層別解析において, BCAA製剤の補充療法が肥満(BMI 25以上)を合併する非代償性肝硬変患者の肝発癌を有意に抑制することが明らかになった<sup>5)</sup>。本稿では, 経口BCAA製剤の投与が肝硬変患者の肝不全状態の悪化と肝発癌を抑制したLOTUS試験の結果について述べるとともに, BCAAによる肥満関連肝発癌抑制機序に関する基礎研究の結果について, 著者らの教室の知見を踏まえ概説する。

## 肝硬変患者の栄養代謝異常とBCAA製剤による予後改善

肝硬変患者ではPEMの頻度が高く, 入院肝硬変患者の70%に蛋白低栄養状態, 60%にエネルギー低栄養状態, 50%にその両者を認める<sup>6)</sup>。また, 肝硬変患者に高率に合併する栄養代謝異常として, 糖尿病や食後高血糖・高インスリン血症といった耐糖能異常がある。その原因として, 肝硬変では肝実質細胞が減少するため, 肝への糖の取

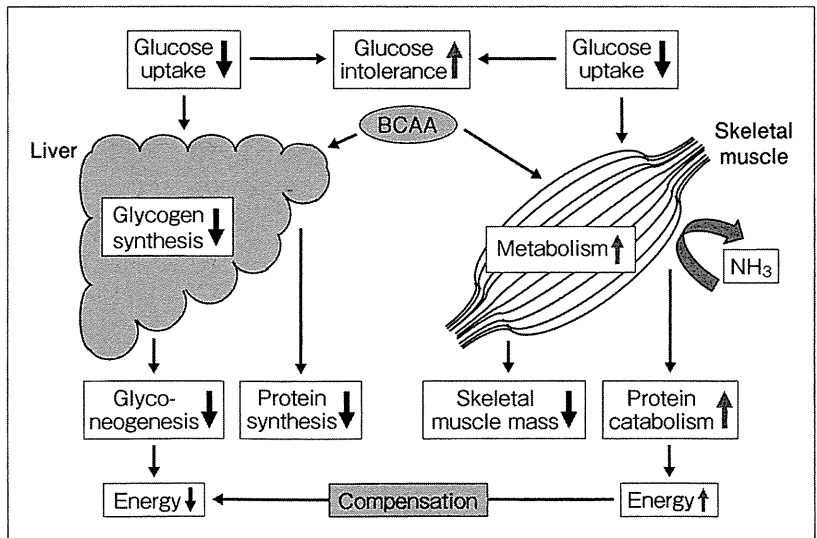


図 1 肝硬変にみられるPEMとアミノ酸インバランスおよび耐糖能異常

込みと、肝におけるグリコーゲンの合成・貯蔵能が低下し、生理的なエネルギー基質としての糖質の利用効果が低下することがあげられる。とくにグリコーゲン合成の低下はエネルギー不足を補うために蛋白質の異化を亢進させるため、全身の筋肉量の減少や、骨格筋における糖の取込み減少とさらなる利用低下を引き起こす。肝硬変ではBCAAのほうがブドウ糖よりエネルギー効率がよく、骨格筋でエネルギー源として燃焼される基質はBCAAが主体となるため、肝硬変によるPEMと、BCAAの低下、耐糖能異常の合併は、一連の病態として考えられる。また、肝の解毒機能が低下し処理しきれなくなったアンモニアも、BCAAを基質として骨格筋で代償的に代謝されるため、肝硬変患者ではBCAAの低下と骨格筋の減少がさらに亢進する(図1)<sup>1,2)</sup>。

近年、肝硬変に合併するこのような病態に対する経口BCAA製剤の有用性が臨床研究において明らかになってきている。Marchesiniら<sup>7)</sup>は、進行肝硬変患者に経口BCAA製剤を1年間補充投与することで、lactoalbuminやmaltodextrinを投与された対照群と比較し、有害事象の発生率の低下とQOLの改善が認められたことを報告している。

さらに、わが国においてはLOTUS試験(646症例対象、多施設ランダム化対照臨床試験)において、経口BCAA製剤の投与が非代償性肝硬変患者の血清アルブミン濃度を維持・上昇させるとも

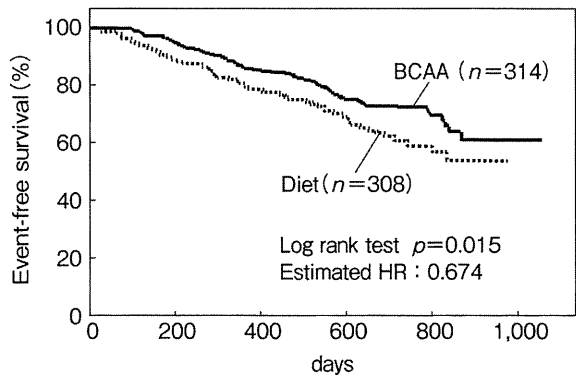


図 2 BCAA製剤長期投与によるイベントフリー生存率<sup>3)</sup>

に、肝硬変の進行に伴って出現する有害事象(肝不全状態の悪化、静脈瘤破裂、肝癌の発生、死亡)の発症を遅らせ、生命予後とQOLを改善することが明らかになっている(図2)<sup>3)</sup>。とくに本試験において、経口BCAA製剤の投与という栄養的アプローチが、生存期間のみならず肝硬変患者の“生活の質”まで改善したことは注目すべき結果と考えられる。

### 肥満と慢性肝疾患および肝発癌

近年わが国においても、生活・食習慣の欧米化に伴う肥満や生活習慣病の増加が大きな健康問題になっているが、慢性肝疾患もその約30%に肥満を合併することが明らかになっている<sup>5)</sup>。肥満は栄養代謝制御の中心を担う肝に対してさまざまな

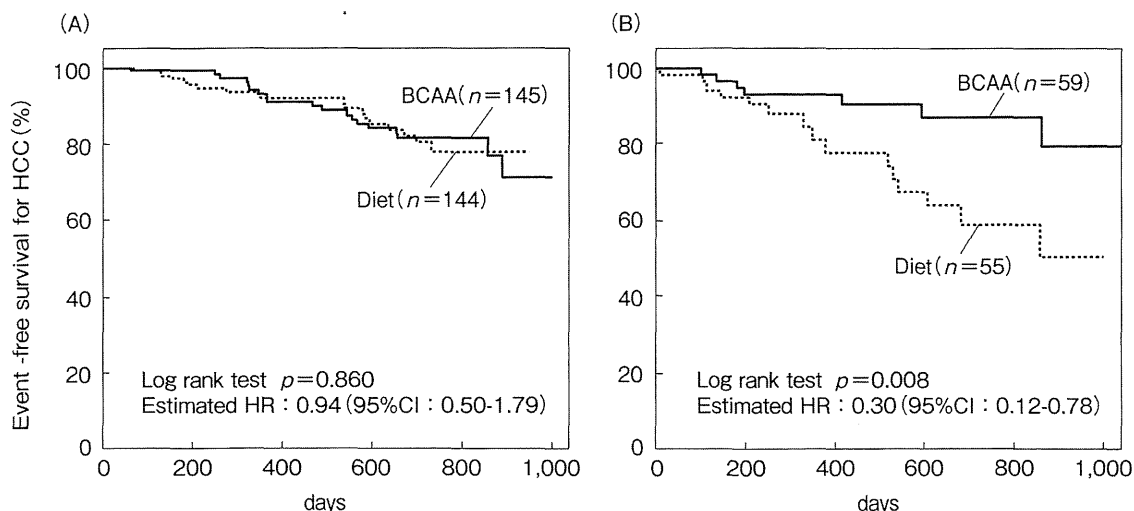


図3 BMIにより層別化したBCAA製剤の肝発癌抑制作用<sup>5)</sup>  
A: BMI<25, B: BMI≥25.

障害をもたらすが、とくに肝におけるメタボリックシンドロームの表現型とされる非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)は一定の頻度で肝硬変・肝癌へ進展することが報告されており、肝発癌を考えるうえで注目すべき病態である<sup>8)</sup>。C型肝炎ウイルスはそれ自身の感染が肝脂肪化やインスリン抵抗性を引き起こすが<sup>9)</sup>、肥満はこれらの因子を増悪させC型慢性肝炎を悪化させる。実際著者らは肝硬変患者において、内臓脂肪面積と肝組織の脂肪化および肝の炎症に強い相関関係があることを報告してきた<sup>10)</sup>。一方で、肥満を合併したC型慢性肝炎患者にダイエットを行うことで、肝機能や肝脂肪化および線維化の改善が認められたことより<sup>11)</sup>、肥満は慢性肝疾患患者の診療において重要な観察および治療対象病態であると考えられる。

慢性肝疾患における肥満や糖尿病の問題点として、これらの病態が肝発癌の危険因子であることがあげられる。肥満と肝発癌の関連性については、BMI高値の男性では肝細胞癌のリスクが約4.5倍に上昇することがアメリカでの疫学研究で報告されているが<sup>12)</sup>、わが国においても、C型肝炎患者や非代償性肝硬変患者の肥満が肝炎ウイルス感染と同様に肝発癌のリスクを有意に高めることが明らかになっている<sup>5,13)</sup>。著者らはいままで、肥満患者にしばしば合併するインスリン抵抗性(HOMA-IR 2.3以上)と高レプチン血症(5 ng/

mL以上)がStage Iの肝細胞癌根治治療後の早期再発予測因子として有用であることを報告してきた<sup>14,15)</sup>。また、糖尿病や高インスリン血症も肝発癌に深く関与していることが、わが国を含めた各国の疫学研究で報告されているが<sup>16,17)</sup>、これらの研究結果は、肥満や糖尿病が肝細胞癌の独立した危険因子として注意しなければならない病態であるとともに、インスリン抵抗性をはじめとする肥満に関連した分子異常が肝発癌抑制の重要な標的分子となりうる可能性を示唆するものである。

### BCAAによる肥満に関連した肝発癌の抑制

2006年に報告されたLOTUS試験の層別解析において、経口BCAA製剤がBMI 25以上の肥満を有するC型肝炎患者の肝発癌を有意に抑制したことが明らかになったが(肝発癌ハザード比: 0.30,  $p=0.008$ ) (図3)<sup>5)</sup>、この解析結果は、BCAA製剤の補充療法が肥満を合併した肝硬変患者の肝発癌を抑制する“肝発癌予防法”であることを臨床の間においてはじめて証明したものである。本試験の結果を踏まえ、平成22年度厚生労働省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)の報告書において、発癌予防および肝癌再発予防目的の“治療”として血清アルブミン値を考慮したうえでの経口BCAA製剤(Livact<sup>®</sup>)の使用が盛り込まれていることを特記する。

著者らは、レプチン受容体のミュータントで高



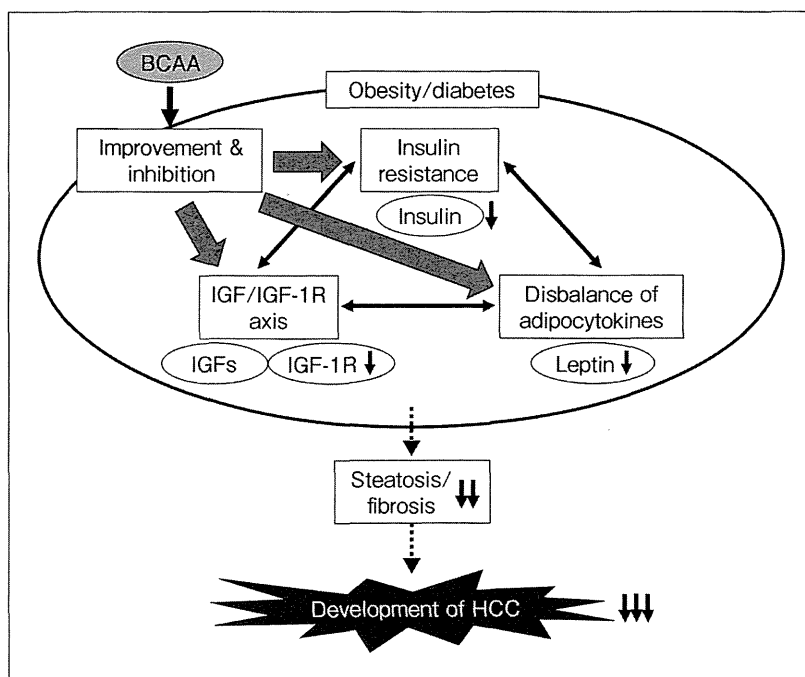


図 4 BCAAによる肥満関連肝発癌の抑制機序

度の肥満・糖尿病・高脂血症・高レプチン血症をきたす *db/db* マウスを用いて、肥満関連肝発癌に対するBCAAの抑制機序に関する検討を行った。*db/db* マウスに肝化学発癌物質である diethylnitrosamine を用いて肝細胞癌を誘発した後、BCAA を投与したところ、肝腫瘍(肝細胞癌および腺腫)の発生が有意に抑制された。その機序として、IGF/IGF-I 受容体シグナル活性の抑制、インスリン感受性の改善、肝脂肪化および線維化の抑制、血清レプチン値の低下が認められた(図4)<sup>18)</sup>。

また著者らは同マウスを用いた実験で、BCAA が血清のインスリン、IGF-I、IGF-II、レプチン値を低下させ、大腸粘膜のIGF-I受容体の活性化を抑制することで、肝発癌同様に肥満・糖尿病・インスリン抵抗性が危険因子である大腸発癌を有意に抑制することも明らかにした<sup>19)</sup>。臨床研究においても、BCAA が血清インスリン値やHOMA-IRの低下といった糖代謝改善作用を発揮すること、また還元型アルブミンを上昇させ酸化ストレスを軽減することが報告されているが<sup>20-22)</sup>、これらの研究結果は、BCAA が肥満によって惹起されたインスリン抵抗性や酸化ストレス、IGF-I受容体の活性化、高レプチン血症と

いった分子異常を標的とし改善することで、肝発癌を抑制した可能性を示唆するものである。

#### ● おわりに

BCAA 製剤は肝硬変患者の栄養状態、生命予後、QOLを改善する。また、BCAA 製剤は肥満を合併した同患者の肝発癌を有意に抑制したが、この研究結果はBCAA 製剤を用いた積極的な介入が、今後ますます増加が危惧される肥満に関連した肝発癌の予防につながる可能性を示唆するものである。肝硬変患者のフォローにおいて、肝癌の発癌抑制を念頭においた栄養療法が重要であるが、BCAAはその中心的役割を果たす薬剤である。BCAAのさらなる基礎研究および臨床応用が展開され、慢性肝疾患患者の予後が改善することが期待される。

#### 文献

- 1) Kato, M. et al.: *Intern. Med.*, **37**: 429-434, 1998.
- 2) Moriwaki, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**: 405-409, 2004.
- 3) Muto, Y. et al.: *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**: 705-713, 2005.
- 4) El-Serag, H. B. and Rudolph, K. L.: *Gastroenterology*, **132**: 2557-2576, 2007.
- 5) Muto, Y. et al.: *Hepatol. Res.*, **35**: 204-214, 2006.

# 肝硬変患者の就寝前軽食導入の指標についての検討

Parameters of Late evening snacks start in patients with liver cirrhosis

白木 亮／寺倉陽一／西村佳代子／村上啓雄／森脇久隆

## SUMMARY

近年呼吸商の低下した肝硬変患者への就寝前軽食が推奨されている。呼吸商の測定には間接熱量計という高価な機器を使用するため、日常臨床で一般に行えない。そのため呼吸商の代替となるパラメータについて検討を行った。呼吸商に対し%AC, %AMCに相関が認められ、予後の指標となる呼吸商0.85に対するそれぞれの予測値は、%AC95%, %AMC92%であった。%AC, %AMCは呼吸商の代替指標として用いうると考えられた。

## KEY WORDS

- 就寝前軽食 (LES)
- 間接熱量計
- 呼吸商 (RQ)
- 上腕周囲長 (AC)
- 上腕筋囲 (AMC)
- tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

## I

### 目 的

肝硬変では蛋白・エネルギー低栄養状態 (protein energy malnutrition; PEM) が高頻度に出現し、予後やQOLに影響を及ぼす<sup>1)</sup>。肝硬変患者におけるPEMの頻度を、エネルギー低栄養は間接熱量計、蛋白低栄養は血清アルブミン値によりそれぞれ評価すると、40%の患者がエネルギー低栄養状態、70%の患者が蛋白低栄養状態で、その両者を有するPEMは50%と報告されている<sup>1)</sup>。

肝硬変患者において間接熱量計によりエネルギー基質の燃焼比率をみると、糖質の燃焼低下・脂肪の燃焼亢進を認め、結果として呼吸商 (respiratory quotient; RQ) の低下に陥る。このような栄養代謝パターンは、肝硬変の重症度の進展とともにより顕著に認められ、予後に影響を与える<sup>1)</sup>。このエネルギー代謝異常は、肝臓の萎縮によるグリコーゲン貯蔵量の

低下に加え、インスリン抵抗性やグルカゴン・カテコラミン・コルチゾールなどの血中濃度の増加により、生理的なエネルギー基質としての糖質の利用効率が低下することによるとされている。

一方、RQの低下した患者への就寝前軽食 (Late evening snack; LES) 施行によって、RQ・肝機能・QOLの改善が報告<sup>2)</sup>されており、日本消化器病学会<sup>3)</sup>や厚生労働省のガイドラインでも推奨されている。しかしながら、RQの測定には間接熱量計という高価で特殊な機器が必要であるため、日常臨床で広く一般に行えない。

そのため今回、RQに代わり日常臨床において用いうる生化学的あるいは身体的パラメータについての検討を行った<sup>4)</sup>。さらに、食欲不振やエネルギー代謝に関与するサイトカインの腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF)- $\alpha$  やアディポカインのレプチン濃度についても検討した<sup>5)</sup>。

## II

### 方 法

岐阜大学医学部附属病院消化器内科入院中の肝硬変患者44例を対象とした (表1)。年齢は平均66歳 (38~83歳)、男性28例、女性16例。肝硬変の病因としては、B型肝炎 (hepatitis B virus; HBV) が1例、C型肝炎 (hepatitis C virus; HCV) が33例、アルコール性が6例、その他の病因によるものが4例であった。また肝硬変の程度は、Child-Pugh分類においてChild Aが16例、Child Bが19例、Child Cが9例であった。入院時、肝細胞癌を合併していた患者は27例 (61%)、また分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acid; BCAA) 製剤を内服していた患者は16例 (36%) であった。

検査前夜18時の夕食後より絶食とし、検査当日の午前7~9時の安静臥床時に、間接熱量計を用いてRQを測定した。また同時に、各種血液検査 (血算・アルブミン・総ビリルビン・総コレステロール・プロトロンビン時間・遊離脂肪酸・BCAA/チロシンモル比など) を行い、さらに熟練した管理栄養士により、身長・体重・体格指数 (body mass index; BMI)・上腕周囲長 (arm circumference; AC)・上腕三頭筋部皮下脂肪厚 (triceps skinfold thickness; TSF)・上腕筋囲 (arm muscle circumference; AMC) を測定した。なお、AC・TSF・AMCの各身体計測値は、『日本人の新身体計測基準値 (Japanese Anthropometric Reference Data; JARD 2001)』<sup>6)</sup>をもとに、性別・年齢別に中央値を100%と

表1. 対象

	肝硬変患者 (n=44)	Child A (n=16)	Child B (n=19)	Child C (n=9)	p**値
年齢 (歳)	66 (38~83)	63 (56~77)	69 (52~83)	64 (38~82)	0.1117
性別 (男性/女性)	28/16	10/6	12/7	6/3	0.9774
身長 (cm)	159 (143~173)	161 (145~170)	158 (143~172)	159 (144~173)	0.4457
体重 (kg)	59 (39~87)	62 (48~74)	56 (39~67)	61 (47~87)	0.1784
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	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
病因 (HBV/HCV/アルコール性/その他)	1/33/6/4	0/13/2/1	1/14/2/2	0/6/2/1	0.7450
肝細胞癌併患者 (+/-)	27/17	13/3	12/7	2/7	0.0142
BCAA製剤内服患者 (+/-)	16/28	5/11	4/15	7/2	0.0176
呼吸商	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
安静時エネルギー代謝量 (kcal/日)	1,218 (910~2,103)	1,274 (930~1,664)	1,132 (918~1,660)	1,297 (910~2,103)	0.1431
基礎代謝量 (kcal/日)	1,238 (875~1,762)	1,306 (1,073~1,540)	1,164 (875~1,378)	1,276 (990~1,762)	0.0337
アルブミン (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
総ビリルビン	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
ALT (IU/ℓ)	62 (8~449)	77 (22~248)	39 (11~106)	85 (8~449)	0.1708
プロトリン時間	70 (37~100)	77 (46~100)	69 (50~94)	60 (37~76)	0.0095
遊離脂肪酸 (μEq/ℓ)	661 (200~1,291)	532 (200~1,072)	649 (329~990)	848 (524~1,291)	0.0377
BCAA/チロシンモル比	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
%AC	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
%TSF	101.0 (33.3~185.7)	119.9 (55.6~185.7)	95.6 (46~140)	78.5 (33.3~168.4)	0.0214
%AMC	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

するパーセント表記で記録した。以上のパラメータについて単回帰分析を行い、相関性を検討した。さらに、受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic; ROC) 解析を用いて、RQが0.85となるカットオフ値を検討した。なお、肝癌のないC型肝硬変患者24例にはTNF- $\alpha$ ・レプチン濃度を測定した。

### III

#### 結果

- ①RQに対し、%AC ( $r^2=0.204$ ,  $p=0.0021$ )・%AMC ( $r^2=0.178$ ,  $p=0.0043$ )に正の相関が認められた (図1)が、血液学的パラメータやその他の身体計測値とRQの間には有意な相関が認められなかった。
- ②TNF- $\alpha$ は、健常人と比較して肝硬変患者において有意に高値であり、さらにChild指数の悪化に伴い高値であった (図2)。

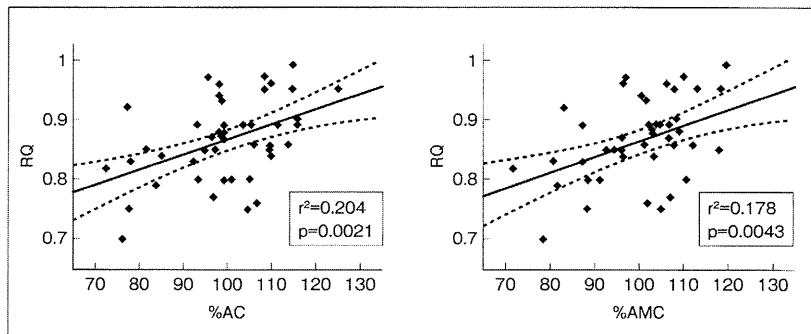


図1. RQと%AC・%AMCとの相関

- ③間接熱量計で測定した炭水化物 (%CHO)はTNF- $\alpha$ と負の相関を認め、脂質 (%FAT)・RQはTNF- $\alpha$ と正の相関を認めた (図3)。
- ④レプチン濃度は肝硬変患者と健常人の間で差は認めなかったが、BMIとの有意な相関を認めた (図2)。
- ⑤予後の指標となるRQ0.85に対するカットオフ値は%AC95・%AMC92であった。
- ⑥%AC95・%AMC92より得られたRQで患者を層別化し、累積生存率を算出したところ、%ACについて有意差が認められた (図4)。

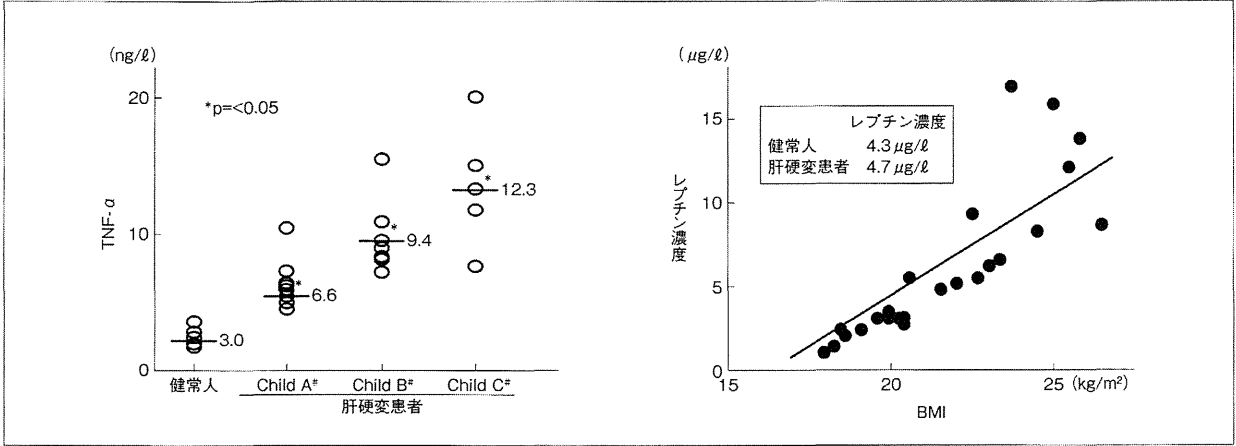


図2. 肝硬変患者でのTNF- $\alpha$ とレプチン濃度  
# : Child-Pugh分類 (Child A : 5~6点, Child B : 7~9点, Child C : 10~15点)

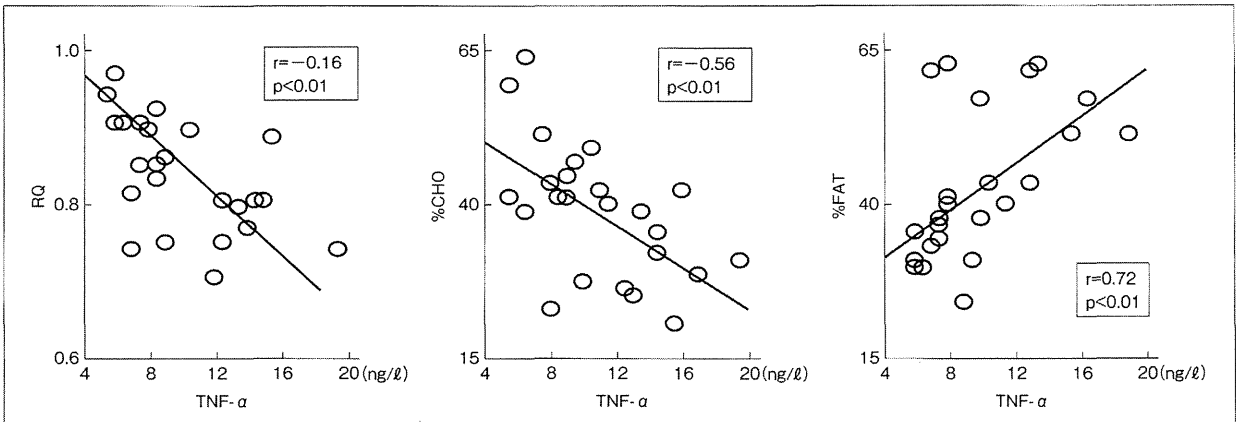


図3. TNF- $\alpha$ とRQ・%CHO・%FATの関係

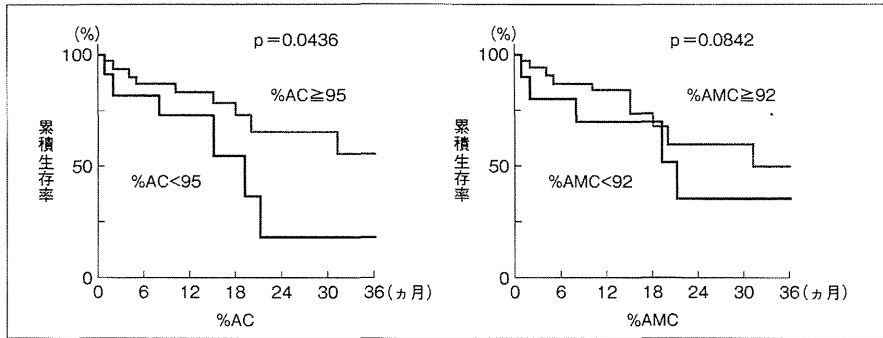


図4. %AC・%AMCの各カットオフ値に対する累積生存率

#### IV

#### 考察

肝臓は、栄養素・エネルギーの代謝の中心臓器であるため、肝硬変患者ではPEMが高頻度で出現する。近年、肝硬変患者においてPEMと予後との関係が報告<sup>1)</sup>され、さらに栄養治療介入による予後の改善<sup>2) 7)</sup>が得られるため、栄養治療がさまざまなガイドラインにおいて推奨されている<sup>3)</sup>。

間接熱量計で測定されるRQは、肝硬変患者のエネルギー・栄養状態を評価可能であり、LES導入の指標として有用なパラメータである。しかし、間接熱量計という特殊で高価な機器を用いる必要があり、代替マーカーが必要とされており、本研究が計画された<sup>4)</sup>。

RQとの相関は、身体計測値では%AC・%AMCで認められたが、%TSFとの相関は認められなかった。%ACおよび%AMCは全身の骨格筋量を反映し、%TSFは全身の脂肪量を反映しているとされており、肝硬変患者においてはエネルギー代謝の点で、脂肪量の低下より筋肉量の低下のほうがより重要であることが示唆された。またACは、身体計測方法の標準化により、検査者間での誤差を最小とされることが報告されており、その点においてもACは客観性の高い指標と考えられた。なお、今回の研究では各種血液検査とRQの相関が認められず、血液検査における有用なマーカーは認められなかった。

一方、TNF- $\alpha$ は多彩な生理活性を有するマクロファージ由来の炎症性サイトカインの1つであり、エネルギー代謝にも関与している<sup>8)</sup>。TNF- $\alpha$ は、肝硬変患者では健常人と比較して有意に高値であり、Child-Pugh分類での肝硬変の程度

の悪化に伴い、より高値であった。肝硬変患者では、慢性のウイルス感染・肝での網内系機能の低下・門脈—大循環シャントの存在・門脈圧亢進による腸管粘膜の防御力の破綻などにより、TNF- $\alpha$ システムは活性化されていると考えられる。

また、本研究では%CHOとTNF- $\alpha$ に負の相関を認め、%FATとTNF- $\alpha$ に正の相関を認めた。TNF- $\alpha$ は、ブドウ糖の酸化よりも遊離脂肪酸の酸化を効率的に促進する作用がある。また、TNF- $\alpha$ は、BCAA代謝の律速酵素である分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素 (branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase) を活性化し、BCAA酸化を促進すると報告されている<sup>9)</sup>。相対的に遊離脂肪酸の $\beta$ -酸化によるアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate; ATP) の産生は、ブドウ糖酸化による産生よりも非常に大きい。それゆえ肝硬変患者では、TNF- $\alpha$ により直接%FATが上昇することでRQの低下がもたらされると考えられた。

#### V

#### 結論

TNF- $\alpha$ は、肝硬変患者でエネルギー代謝との関連が示唆され、PEMの一因と考えられた。

またACやAMCは、間接熱量計で測定したRQと有意な相関を認め、RQの代替としてLES導入の指標として有用であると考えられた。

今後、さらに症例数を増加した前向き試験の施行や、LES導入の効果判定として短期間で評価できる指標の検討が課題と考えられた。

#### REFERENCES

- 1) Tajika M, Kato M, Mohri H, et al : Prognostic value of energy metabolism in patients with viral liver cirrhosis. *Nutrition* 18 : 229-234, 2002
- 2) Nakaya Y, Okita K, Suzuki K, et al : BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* 23 : 113-120, 2007.
- 3) 日本消化器病学会 編 : 肝硬変診療ガイドライン. 南江堂, 東京, 2010
- 4) Terakura Y, Shiraki M, Nishimura K, et al : Indirect calorimetry and anthropometry to estimate energy metabolism in patients with liver cirrhosis. *J Nutr Sci Vitaminol* 56 : 372-379, 2010
- 5) Shiraki M, Terakura Y, Iwasa J, et al : Elevated serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and soluble tumor necrosis factor receptors correlate with aberrant energy metabolism in liver cirrhosis. *Nutrition* 26 : 269-275, 2010
- 6) 日本栄養アセスメント研究会身体計測基準値検討委員会 : 日本人の新身体計測基準値 (JARD2001). *栄養治療* 19 (suppl.), 2002
- 7) 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
- 8) 白木 亮, 森脇久隆 : TNF- $\alpha$ /カケクテン. *栄養治療* 26 : 73-75, 2010
- 9) Shiraki M, Shimomura Y, Miwa Y, et al : Activation of hepatic branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex by tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 328 : 973-978, 2005

しらき・まこと  
岐阜大学医学部附属病院消化器内科臨床講師  
てらくら・よういち  
岐阜大学医学部附属病院消化器内科医員  
にしむら・かなこ  
岐阜大学医学部附属病院生体支援センター  
管理栄養士  
むらかみ・のぶお  
岐阜大学医学部附属病院生体支援センター  
教授  
もりわき・ひさたか  
岐阜大学医学部附属病院消化器内科教授

# Lect-Hepa, a Glyco-Marker Derived from Multiple Lectins, as a Predictor of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients

Kiyoaki Ito,<sup>1</sup> Atsushi Kuno,<sup>2</sup> Yuzuru Ikehara,<sup>2</sup> Masaya Sugiyama,<sup>1</sup> Hiroaki Saito,<sup>1</sup> Yoshihiko Aoki,<sup>1</sup> Teppei Matsui,<sup>1</sup> Masatoshi Imamura,<sup>1</sup> Masaaki Korenaga,<sup>1</sup> Kazumoto Murata,<sup>1</sup> Naohiko Masaki,<sup>1</sup> Yasuhito Tanaka,<sup>3</sup> Shuhei Hige,<sup>4</sup> Namiki Izumi,<sup>5</sup> Masayuki Kurosaki,<sup>5</sup> Shuhei Nishiguchi,<sup>6</sup> Michiie Sakamoto,<sup>7</sup> Masayoshi Kage,<sup>8</sup> Hisashi Narimatsu,<sup>2</sup> and Masashi Mizokami<sup>1</sup>

Assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C (CHC) is critical for predicting disease progression and determining future antiviral therapy. Lect-Hepa, a new glyco-marker derived from fibrosis-related glyco-alteration of serum alpha 1-acid glycoprotein, was used to differentiate cirrhosis from chronic hepatitis in a single-center study. Herein, we aimed to validate this new glyco-marker for estimating liver fibrosis in a multicenter study. Overall, 183 CHC patients were recruited from 5 liver centers. The parameters *Aspergillus oryzae* lectin (AOL) / *Datura stramonium* lectin (DSA) and *Maackia amurensis* lectin (MAL)/DSA were measured using a bedside clinical chemistry analyzer in order to calculate Lect-Hepa levels. The data were compared with those of seven other noninvasive biochemical markers and tests (hyaluronic acid, tissue inhibitor of metalloproteases-1, platelet count, aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index [APRI], Forns index, Fib-4 index, and Zeng's score) for assessing liver fibrosis using the receiver-operating characteristic curve. Lect-Hepa correlated well with the fibrosis stage as determined by liver biopsy. The area under the curve (AUC), sensitivity, and specificity of Lect-Hepa were 0.802, 59.6%, and 89.9%, respectively, for significant fibrosis; 0.882, 83.3%, and 80.0%, respectively, for severe fibrosis; and 0.929, 84.6%, and 88.5%, respectively, for cirrhosis. AUC scores of Lect-Hepa at each fibrosis stage were greater than those of the seven aforementioned noninvasive tests and markers. **Conclusion:** The efficacy of Lect-Hepa, a glyco-marker developed using glycoproteomics, for estimating liver fibrosis was demonstrated in a multicenter study. Lect-Hepa given by a combination of the two glyco-parameters is a reliable method for determining the fibrosis stage and is a potential substitute for liver biopsy. (HEPATOLOGY 2012;56:1448-1456)

Accurate staging of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C (CHC) is most important for predicting disease progression and determining the need for initiating antiviral therapy, such as interferon (IFN) therapy.<sup>1,2</sup> Liver biopsy has been considered the gold standard for fibrosis staging

for many years.<sup>3</sup> However, liver biopsy is invasive and painful,<sup>4,5</sup> with rare but potentially life-threatening complications.<sup>6</sup> In addition, this method may suffer from sampling errors since only 1/50,000 of the organ is examined.<sup>7</sup> Furthermore, inter- and intraobserver discrepancies reaching levels of 10% to 20% have been

Abbreviations:  $\alpha$ 2-MG,  $\alpha$ 2-macroglobulin; AFP, alpha-fetoprotein; AGP, alpha-1 acid glycoprotein; ALT, alanine aminotransferase; AOL, *Aspergillus oryzae* lectin; CHC, chronic hepatitis C; DSA, *Datura stramonium* lectin; GGT, gamma-glutamyltransferase; HA, hyaluronic acid; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; IFN, interferon; MAL, *Maackia amurensis* lectin; TIMP1, tissue inhibitors of metalloproteinases 1.

From the <sup>1</sup>Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Japan; <sup>2</sup>Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan; <sup>3</sup>Department of Virology & Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan; <sup>5</sup>Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan; <sup>7</sup>Pathology, School of Medicine, Keio University, Japan; <sup>8</sup>Department of Pathology, Kurume University School of Medicine, Japan.

Received February 6, 2012; accepted April 22, 2012.

Supported by a grant (22-108) from the National Center for Global Health and Medicine in Japan and a grant from New Energy and Industrial Technology Development Organization of Japan.

reported using this method, leading to misdiagnosis of cirrhosis.<sup>8</sup> Therefore, finding a noninvasive method for diagnosing liver fibrosis is an emerging issue in the care of patients with CHC.

Several methods have been studied for the noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis, including clinical<sup>9</sup> or blood markers,<sup>10,11</sup> and signal analysis (ultrasonography, magnetic resonance imaging, and elastography).<sup>12,13</sup> Although each method can play a substantial role in the diagnosis of cirrhosis, it is evident that the best way of monitoring hepatitis progression employs an accurate serological method for the quantitative evaluation of fibrosis. We developed a new glyco-marker using multiple lectins that performed well in estimating liver fibrosis in a single-center study.<sup>14,15</sup>

Recent progress in glycoproteomics has had a great influence on work toward ideal, disease-specific biomarkers for a number of conditions. Glycoproteins that exhibit disease-associated glyco-alteration and are present in serum or other fluids have the potential to act as biomarkers for the diagnosis of a target disease,<sup>16</sup> because the features of glycosylation depend on the extent of cell differentiation and the stage of the cell. Detecting hepatic disease-associated glyco-markers for clinical applications has been a continuous challenge since the early 1990s, because increased fucosylation on complex-type *N*-glycans has been frequently detected in glycoproteins from patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and cirrhosis.<sup>17,18</sup> Of all the alpha-fetoprotein (AFP) glycoforms, more than 30% have been found to react to a fucose-binding lectin, *Lens culinaris* agglutinin. This fraction, designated AFP-L3, was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2005 for the diagnosis and prognosis of HCC.<sup>19</sup> We have found that two fibrosis-indicator lectins (*Aspergillus oryzae* lectin [AOL] and *Maackia amurensis* lectin [MAL]) together with an internal, standard lectin (*Datura stramonium* lectin [DSA]) on an alpha 1-acid glycoprotein (AGP) could, using lectin microarray, clearly distinguish between cirrhosis and chronic hepatitis patients.<sup>14</sup> We have further simplified this quantitative method so that it could be performed using bedside, clinical chemistry analyzers.<sup>15</sup>

The aim of the current study was to evaluate this new glyco-marker (LecT-Hepa) using multiple lectins and bedside clinical chemistry analyzers for use in the assessment of liver fibrosis. In this multicenter study we compared the method's efficiency in estimating liver fibrosis with other noninvasive fibrosis markers and tests.

## Materials and Methods

**Study Population.** This study included 183 consecutive adult patients with CHC who had undergone percutaneous liver biopsy at one of the following institutions: Hokkaido University Hospital, Musashino Red Cross Hospital, National Center for Global Health and Medicine, Hyogo College of Medicine Hospital, or Nagoya City University Hospital in Japan. A diagnosis of CHC was defined as detectable serum anti-hepatitis C virus (HCV) antibody and HCV-RNA, found using polymerase chain reaction assays, of at least 2 points. Exclusion criteria were coinfection with hepatitis B virus or human immunodeficiency virus (HIV), and other disorders that commonly cause liver diseases. Informed consent was obtained from each patient who participated in the study. This study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki and was approved by our Institutional Review Board.

**Histological Staging.** Ultrasonography-guided liver biopsy was performed according to a standardized protocol. Specimens were fixed, paraffin-embedded, and stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. A minimum of six portal tracts in the specimen were required for diagnosis. All liver biopsy samples were independently evaluated by two senior pathologists who were blinded to the clinical data. Liver fibrosis stages were assessed using METAVIR fibrosis (F) staging.<sup>20</sup> Significant fibrosis was defined as METAVIR F  $\geq 2$ , severe fibrosis as METAVIR F  $\geq 3$ , and cirrhosis as METAVIR F4. Two patients were excluded from the study because of inadequate histological samples.

**Clinical and Biological Data.** The age and sex of the patients were recorded. Serum samples were collected immediately before or no more than 2 months

Address reprint requests to: Masashi Mizokami, M.D., Ph.D., Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, 1-7-1, Konodai, Ichikawa 272-8516, Japan. E-mail: mmizokami@hospk.ncgm.go.jp; fax: +81-(0)47-375-4766.

Copyright © 2012 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.25815

Potential conflict of interest: Nothing to report.

after liver biopsy and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The concentrations of the following variables were obtained by analyzing the serum samples: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), total bilirubin, albumin, cholinesterase, total cholesterol, platelet count (platelets), prothrombin time, haptoglobin, hyaluronic acid (HA),  $\alpha 2$ -macroglobulin ( $\alpha 2$ -MG), tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP1). The aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI), Fib-4 index, Forns index, and Zeng's score were calculated according to published formulae appropriate to each measure.<sup>2,7,21,22</sup>

**Rapid Lectin-Antibody Sandwich Immunoassay Using HISCL.** Fibrosis-specific glyco-alteration of AGP was qualified from simultaneous measurements of the lectin-antibody sandwich immunoassays using three lectins (DSA, MAL, and AOL). In principle, the glycan part of the AGP was captured by the lectin immobilized on the magnetic beads, and the captured AGP was then quantified by an antihuman AGP mouse monoclonal antibody probe that was cross-linked to an alkaline phosphatase (ALP- $\alpha$ AGP). The assay manipulation was fully automated using a chemiluminescence enzyme immunoassay machine (HISCL-2000i; Sysmex, Kobe, Japan). We used the following criterion formula, named the "LecT-Hepa Test," to enhance the diagnostic accuracy by combining two glyco-parameters (AOL/DSA and MAL/DSA) as described before:  $F = \text{Log}_{10}[\text{AOL/DSA}] * 8.6 - [\text{MAL/DSA}]$ .<sup>15</sup>

**Statistical Analyses.** Quantitative variables were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) unless otherwise specified. Categorical variables were compared using a chi-squared test or Fisher's exact test, as appropriate, and continuous variables were compared using the Mann-Whitney  $U$  test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. A multivariate forward stepwise logistic regression analysis was performed to determine the independent predictors of the absence or presence of significant fibrosis, severe fibrosis, and cirrhosis, respectively. Pearson's correlation coefficient was used as necessary. To assess the classification efficiencies of various markers for detecting significant fibrosis, severe fibrosis, and cirrhosis,<sup>23</sup> and to determine area under the curve (AUC) values, receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis was also carried out. Diagnostic accuracy was expressed as the diagnostic specificity (specificity), diagnostic sensitivity (sensitivity), positive predictive values (PPV), negative predictive values (NPV), positive likelihood ratio (LR [+]), negative likelihood ratio (LR [-]), and

**Table 1. Baseline Characteristics of the 183 Patients with Chronic Hepatitis C at the Time of Liver Biopsy**

Features	Total (n = 183)
Age (years)	57.6 $\pm$ 11.4
Male sex	75 (41.0)
AST (IU/L)	57.4 $\pm$ 43.9
ALT (IU/L)	62.8 $\pm$ 56.8
GGT (IU/L)	51.1 $\pm$ 62.6
Bilirubin (mg/dL)	0.7 $\pm$ 0.4
Albumin (g/L)	4.1 $\pm$ 0.4
Cholinesterase (IU/L)	283.5 $\pm$ 97.0
Cholesterol (mg/dL)	174.1 $\pm$ 35.5
Platelets ( $10^9$ /L)	163 $\pm$ 57
Prothrombin time (%)	87.2 $\pm$ 33.4
$\alpha 2$ -MG (g/L)	356.8 $\pm$ 133.1
HA ( $\mu\text{g/L}$ )	205.3 $\pm$ 428.0
TIMP1 (pg/ml)	210.6 $\pm$ 87.7
AOL/DSA	6.3 $\pm$ 12.3
MAL/DSA	9.0 $\pm$ 3.1
Fibrosis stage (%):	
F0-1	89 (48.6)
F2	46 (25.1)
F3	22 (12.0)
F4	26 (14.2)

AUC (95% confidence interval [95% CI]). We performed statistical analyses using STATA v. 11.0 (Stata-Corp, College Station, TX).

## Results

**Baseline Characteristics of the 183 Patients with Chronic Hepatitis C at the Time of Liver Biopsy.** Patient characteristics at the time of liver biopsy are shown in Table 1. The mean age of the 183 patients was  $57.6 \pm 11.4$  years, and 75 (41%) of them were men. F0-F1 was diagnosed in 89 cases (48.6%), F2 in 46 (25.1%), F3 in 22 (12.0%), and F4 (cirrhosis) in 26 (14.2%).

**Comparison of Variables Associated with the Presence of Significant Fibrosis by Univariate and Multivariate Analysis.** Variables associated with the presence of significant fibrosis were assessed by univariate and multivariate analysis (Table 2). The variables of age ( $P = 0.001$ ), AST ( $P < 0.0001$ ), ALT ( $P < 0.0001$ ), GGT ( $P < 0.0001$ ), bilirubin ( $P = 0.014$ ),  $\alpha 2$ -MG ( $P = 0.002$ ), HA ( $P < 0.0001$ ), TIMP1 ( $P < 0.0001$ ), and AOL/DSA ( $P < 0.0001$ ) were significantly higher in the significant fibrosis group than in the not significant fibrosis group. The variables albumin ( $P < 0.001$ ), cholinesterase ( $P < 0.0001$ ), cholesterol ( $P = 0.005$ ), platelets ( $P < 0.0001$ ), prothrombin time ( $P = 0.0001$ ), and MAL/DSA ( $P < 0.0001$ ) were significantly lower in the significant fibrosis group than in the not significant fibrosis group. Multivariate analysis showed that platelets (odds ratio [OR]: 0.87,



**Table 2. Variables Associated with the Presence of Significant Fibrosis (F2-4) and Severe Fibrosis (F3-4) by Univariate and Multivariate Analysis**

Features	No Significant Fibrosis (n = 89)	Significant Fibrosis (n = 94)	P Value (Univariate)	Odds Ratio (95% CI) (Multivariate)	No Severe Fibrosis (n = 135)	Severe Fibrosis (n = 48)	P Value	Odds Ratio (95% CI) (Multivariate)
Age (years)	54.7 ± 11.8	60.5 ± 10.4	0.001		55.8 ± 11.9	62.9 ± 7.8	0.001	1.15 (1.02-1.31)
Male sex (%)	30 (33.7)	45 (47.9)	0.051		52 (38.5)	23 (47.9)	0.255	
AST (IU/L)	45.7 ± 41.6	68.3 ± 43.5	<0.0001		49.7 ± 40.1	79.1 ± 47.4	<0.0001	
ALT (IU/L)	51.0 ± 56.6	74.0 ± 54.9	<0.0001		55.9 ± 54.9	82.5 ± 57.9	<0.0001	
GGT (IU/L)	40.6 ± 61.7	62.1 ± 63.1	<0.0001		45.5 ± 67.1	65.8 ± 46.7	<0.0001	
Bilirubin (mg/dL)	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.4	0.014		0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.4	0.005	
Albumin (g/L)	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.5	<0.001		4.2 ± 0.3	3.8 ± 0.5	<0.0001	
Cholinesterase (IU/L)	329.2 ± 76.0	247.2 ± 96.9	<0.0001		312.4 ± 84.4	217 ± 91.9	<0.0001	
Cholesterol (mg/dL)	181.0 ± 31.5	167.5 ± 36.2	0.005		178.1 ± 34.1	162.4 ± 33.5	0.016	
Platelets (10 <sup>9</sup> /L)	186 ± 53	142 ± 52	<0.0001	0.87 (0.77-0.99)	180 ± 52	119 ± 46	<0.0001	0.74 (0.58-0.94)
Prothrombin time (%)	94.7 ± 33.4	80.1 ± 32.1	0.0001		89.5 ± 36.2	80.8 ± 23.2	<0.001	
α2-MG (g/L)	326 ± 117.7	389.2 ± 141.1	0.002		331.1 ± 122.5	423.9 ± 137.5	<0.0001	
HA (μg/L)	85.6 ± 154.3	318.7 ± 556.1	<0.0001	1.01 (1.01-1.02)	115.4 ± 201.1	458.2 ± 711.0	<0.0001	
TIMP1 (pg/ml)	183.5 ± 53.3	238.6 ± 106.1	<0.0001		189.7 ± 64.5	263.9 ± 113.8	<0.0001	
AOL/DSA	1.4 ± 1.2	10.9 ± 15.9	<0.0001	1.51 (1.07-2.15)	2.0 ± 2.6	18.3 ± 19.3	<0.0001	
MAL/DSA	10.6 ± 1.7	7.5 ± 3.4	<0.0001		10.2 ± 2.0	5.6 ± 3.4	<0.0001	0.52 (0.37-0.76)

95% CI: 0.77-0.99), HA (OR: 1.01, 95% CI: 1.01-1.02), and AOL/DSA (OR: 1.51, 95% CI: 1.07-2.15) were independently associated with the presence of significant fibrosis.

**Comparison of Variables Associated with the Presence of Severe Fibrosis by Univariate and Multivariate Analysis.** Variables associated with the presence of severe fibrosis were assessed by univariate and multivariate analysis (Table 2). The variables of age ( $P = 0.001$ ), AST ( $P < 0.0001$ ), ALT ( $P < 0.0001$ ), GGT ( $P < 0.0001$ ), bilirubin ( $P = 0.005$ ), α2-MG ( $P <$

$0.0001$ ), HA ( $P < 0.0001$ ), TIMP1 ( $P < 0.0001$ ), and AOL/DSA ( $P < 0.0001$ ) were significantly higher in the severe fibrosis group than in the no severe fibrosis group. The variables albumin ( $P < 0.0001$ ), cholinesterase ( $P < 0.0001$ ), cholesterol ( $P = 0.016$ ), platelets ( $P < 0.0001$ ), prothrombin time ( $P < 0.001$ ), and MAL/DSA ( $P < 0.0001$ ) were significantly lower in the severe fibrosis group than in the no severe fibrosis group. Multivariate analysis showed that age (OR: 1.15, 95% CI: 1.02-1.31), platelets (OR: 0.74, 95% CI: 0.58-0.94), and MAL/DSA (OR: 0.52, 95% CI:

**Table 3. Variables Associated with the Presence of Cirrhosis (F4) by Univariate and Multivariate Analysis**

Features	No Cirrhosis (n=157)	Cirrhosis (n = 26)	P Value	Odds Ratio (95% CI) (Multivariate)
Age (years)	56.6 ± 11.7	63.8 ± 7.3	0.0016	
Male sex (%)	60 (38.2)	15 (57.7)	0.061	
AST (IU/L)	54.6 ± 41.7	74.9 ± 53.7	0.016	
ALT (IU/L)	62.1 ± 58.1	67.2 ± 48.2	0.446	
GGT (IU/L)	48.5 ± 63.9	64.9 ± 53.8	0.0031	
Bilirubin (mg/dL)	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.5	<0.0001	
Albumin (g/L)	4.2 ± 0.4	3.6 ± 0.5	<0.0001	
Cholinesterase (IU/L)	305.3 ± 83.9	181.7 ± 90.1	<0.0001	
Cholesterol (mg/dL)	178.4 ± 33.3	146.9 ± 29.8	<0.0001	
Platelets (10 <sup>9</sup> /L)	172 ± 54	106 ± 36	<0.0001	0.76 (0.58-0.99)
Prothrombin time (%)	88.7 ± 35.5	79.2 ± 16.1	0.0004	
α2-MG (g/L)	346.2 ± 131.6	416.9 ± 127.8	0.019	
HA (μg/L)	137.1 ± 215.7	617.4 ± 915.1	<0.0001	
TIMP1 (pg/ml)	196.4 ± 70.4	287.3 ± 126.6	<0.0001	
AOL/DSA	3.4 ± 7.1	24.0 ± 20.4	<0.0001	
MAL/DSA	9.8 ± 2.4	4.2 ± 2.8	<0.0001	0.67 (0.49-0.90)

0.37-0.76) were independently associated with the presence of severe fibrosis.

**Comparison of Variables Associated with the Presence of Cirrhosis by Univariate and Multivariate Analysis.** Variables associated with the presence of cirrhosis were assessed by univariate and multivariate analysis (Table 3). Age ( $P = 0.0016$ ), AST ( $P = 0.016$ ), GGT ( $P = 0.0031$ ), bilirubin ( $P < 0.0001$ ),  $\alpha$ 2-MG ( $P = 0.019$ ), HA ( $P < 0.0001$ ), TIMP1 ( $P < 0.0001$ ), and AOL/DSA ( $P < 0.0001$ ) were significantly higher in the cirrhosis group than in the no cirrhosis group. Albumin ( $P < 0.0001$ ), cholinesterase ( $P < 0.0001$ ), cholesterol ( $P < 0.0001$ ), platelets ( $P < 0.0001$ ), prothrombin time ( $P = 0.0004$ ), and MAL/DSA ( $P < 0.0001$ ) were significantly lower in the cirrhosis group than in the no cirrhosis group. Multivariate analysis showed that platelets (OR: 0.76, 95% CI: 0.58-0.99) and MAL/DSA (OR: 0.67, 95% CI: 0.49-0.90) were independently associated with the presence of cirrhosis.

**Evaluation of the Two Glyco-Parameters AOL/DSA and MAL/DSA for Estimating the Progression of Liver Fibrosis.** To assess the correlation of the two obtained glyco-parameters with the progression of fibrosis, we analyzed the data of triple lectins from HISCL measurements on the 183 CHC patients. The boxplots of AOL/DSA and MAL/DSA in relation to the fibrosis staging are shown in Fig. 1A,B, respectively. The AOL/DSA values gradually increased with the progression of fibrosis and Pearson's correlation coefficient was  $R = 0.61$ . On the other hand, the MAL/DSA values gradually decreased with the progression of fibrosis and Pearson's correlation coefficient was  $R = -0.69$ . Both parameters fitted the quantification of the progression of fibrosis from F2 to F4.

**LecT-Hepa, Combined with Two Glyco-Parameters, Was Evaluated in the Diagnosis of Significant Fibrosis, Severe Fibrosis, and Cirrhosis.** LecT-Hepa was calculated using two glyco-parameters (AOL/DSA and MAL/DSA). The boxplots of LecT-Hepa in relation to the fibrosis staging are shown in Fig. 2. The LecT-Hepa values gradually increased with the progression of fibrosis. Pearson's correlation coefficient between LecT-Hepa and liver fibrosis was very high ( $R = 0.72$ ), and was superior to those for AOL/DSA ( $R = 0.61$ ) and MAL/DSA ( $R = -0.69$ ). We next examined AUC to characterize the diagnostic accuracy of LecT-Hepa at each stage of fibrosis, i.e., significant fibrosis (F2/F3/F4), severe fibrosis (F3/F4), and cirrhosis (F4). For the prediction of significant fibrosis, AUC (95% CI), sensitivity, specificity, PPV, NPV, LR (+), and LR (-) of the test were 0.802 (0.738-0.865), 59.6%, 89.9%, 85.7%, 66.7%, 5.89, and 0.45,

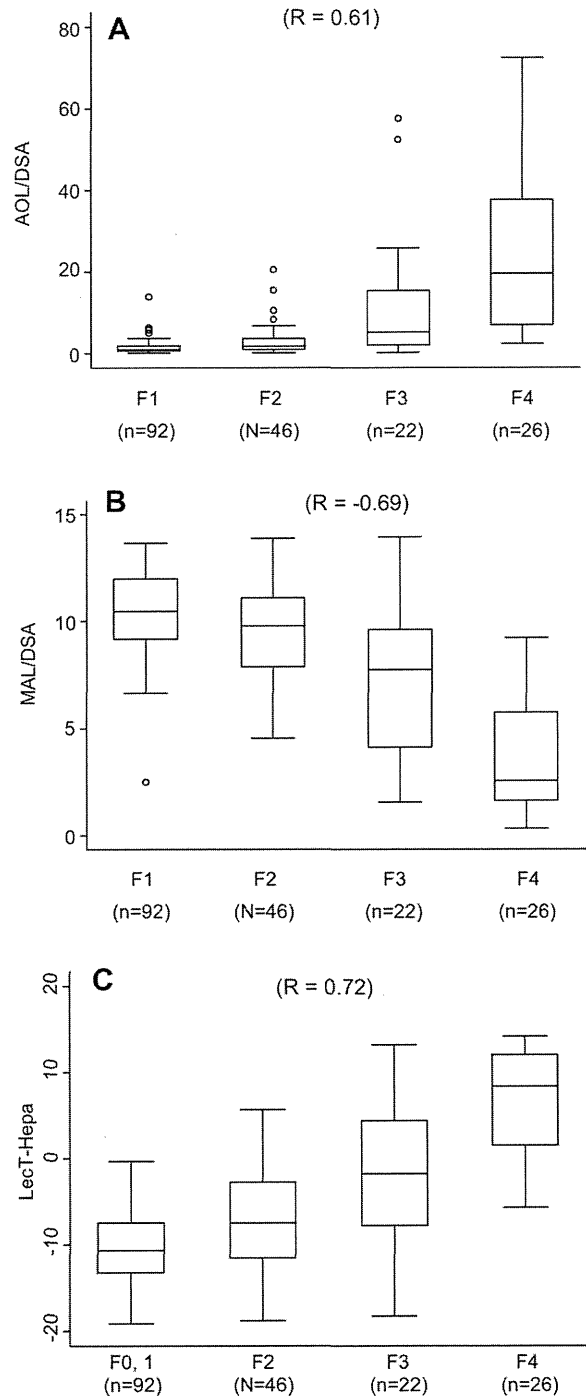


Fig. 1. Boxplot of (A) AOL/DSA, (B) MAL/DSA, and (C) LecT-Hepa in relation to the fibrosis score. The box represents the interquartile range. The whiskers indicate the highest and lowest values, and the dots represent outliers. The line across the box indicates the median value. Correlation of AOL/DSA, MAL/DSA, and LecT-Hepa was measured by HISCL with the progression of liver fibrosis. R: Pearson's correlation coefficient.

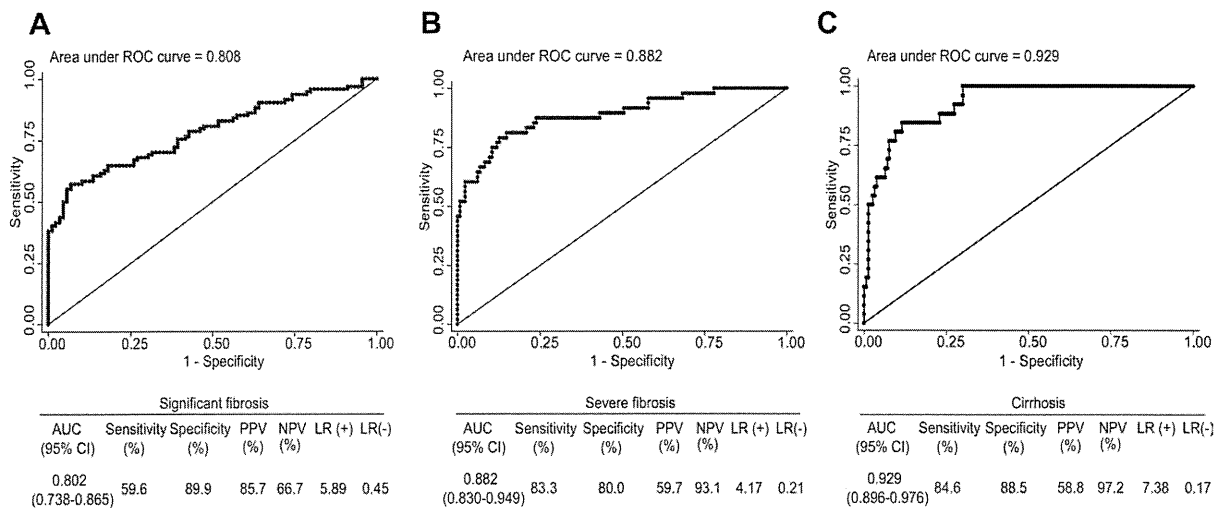


Fig. 2. ROC curves of LecT-Hepa to distinguish between significant fibrosis and no significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C (A); severe fibrosis and no severe fibrosis (B); cirrhosis and no cirrhosis (C). AUC: area under the receiver operating characteristic curve; PPV: positive predictive values; NPV: negative predictive values; LR (+): positive likelihood ratio; LR (-): negative likelihood ratio.

respectively (Fig. 3A). For the prediction of severe fibrosis, AUC (95% CI), sensitivity, specificity, PPV, NPV, LR (+), and LR (-) were 0.882, 83.3%, 80.0%, 59.7%, 93.1%, 4.17, and 0.21, respectively (Fig. 3B). For the prediction of cirrhosis, AUC (95% CI), sensitivity, specificity, PPV, NPV, LR (+), and LR (-) were 0.929 (0.896-0.976), 84.6%, 88.5%, 58.8%, 97.2%, 7.38, and 0.17, respectively (Fig. 3C).

**Comparison of AUC, Sensitivity, Specificity, PPV, and NPV for Predicting the Diagnosis of Significant Fibrosis, Severe Fibrosis, and Cirrhosis.** ROC curves of LecT-Hepa, HA, TIMP1, platelets, APRI, Forns index, Fib-4 index, and Zeng's score for predicting significant fibrosis, severe fibrosis, and cirrhosis were plotted, as shown in Fig. 3A-C. The AUC of LecT-Hepa for predicting significant fibrosis (0.802) was superior to HA (0.756), TIMP1 (0.697), platelets (0.729), APRI (0.777), Fib-4 index (0.747), Forns index (0.783), and Zeng's score (0.791). For predicting severe fibrosis, AUC of LecT-Hepa (0.882) was superior to HA (0.839), TIMP1 (0.753), platelet count (0.821), APRI (0.840), Fib-4 index (0.811), Forns index (0.861), and Zeng's score (0.863). For predicting cirrhosis, AUC of LecT-Hepa (0.929) was superior to HA (0.866), TIMP1 (0.783), platelets (0.851), APRI (0.787), Fib-4 index (0.856), Forns index (0.887), and Zeng's score (0.853). Sensitivity, specificity, PPV, and NPV by eight noninvasive tests and markers are shown in Table 4. In general, indicators of LecT-Hepa were superior to other noninvasive tests and markers. Specificity and PPV used to distinguish significant fibrosis in LecT-Hepa were superior to those in other tests and

markers, although sensitivity and NPV by LecT-Hepa (59.6% and 66.7%, respectively) to distinguish significant fibrosis were inferior to those in other tests and markers. When distinguishing severe fibrosis, the categories of sensitivity (83.3%), specificity (80.0%), PPV (59.7%), and NPV (93.1%) for LecT-Hepa were superior to those in other tests and markers, except for specificity (82.2%) and PPV (61.0%) in HA. When distinguishing cirrhosis, the categories of sensitivity (84.6%), specificity (88.5%), PPV (58.8%), and NPV (97.2%) in LecT-Hepa were superior to those in other tests and markers, except for sensitivity by HA (88.5%), Forns index (84.6%), and Zeng's score (92.3%) and NPV by Zeng's score (98.3%).

## Discussion

Our results showed that the LecT-Hepa test, calculated by combining two glyco-parameters (AOL/DSA and MAL/DSA), had higher sensitivity and specificity for diagnosing severe fibrosis and cirrhosis compared to other noninvasive tests and markers for these conditions. The new glyco-marker we have developed is based on the glyco-alteration on the AGP, which is mainly synthesized in the liver. AGP has been considered one of the best candidates for glyco-markers in liver fibrosis or HCC. This is because it is a well-characterized glycoprotein with five highly branched, complex-type *N*-glycans, whose alteration (e.g., desialylation, increased branching, and increased fucosylation) occurs during the progression of liver fibrosis and carcinogenesis.<sup>24</sup> It has already been reported that an

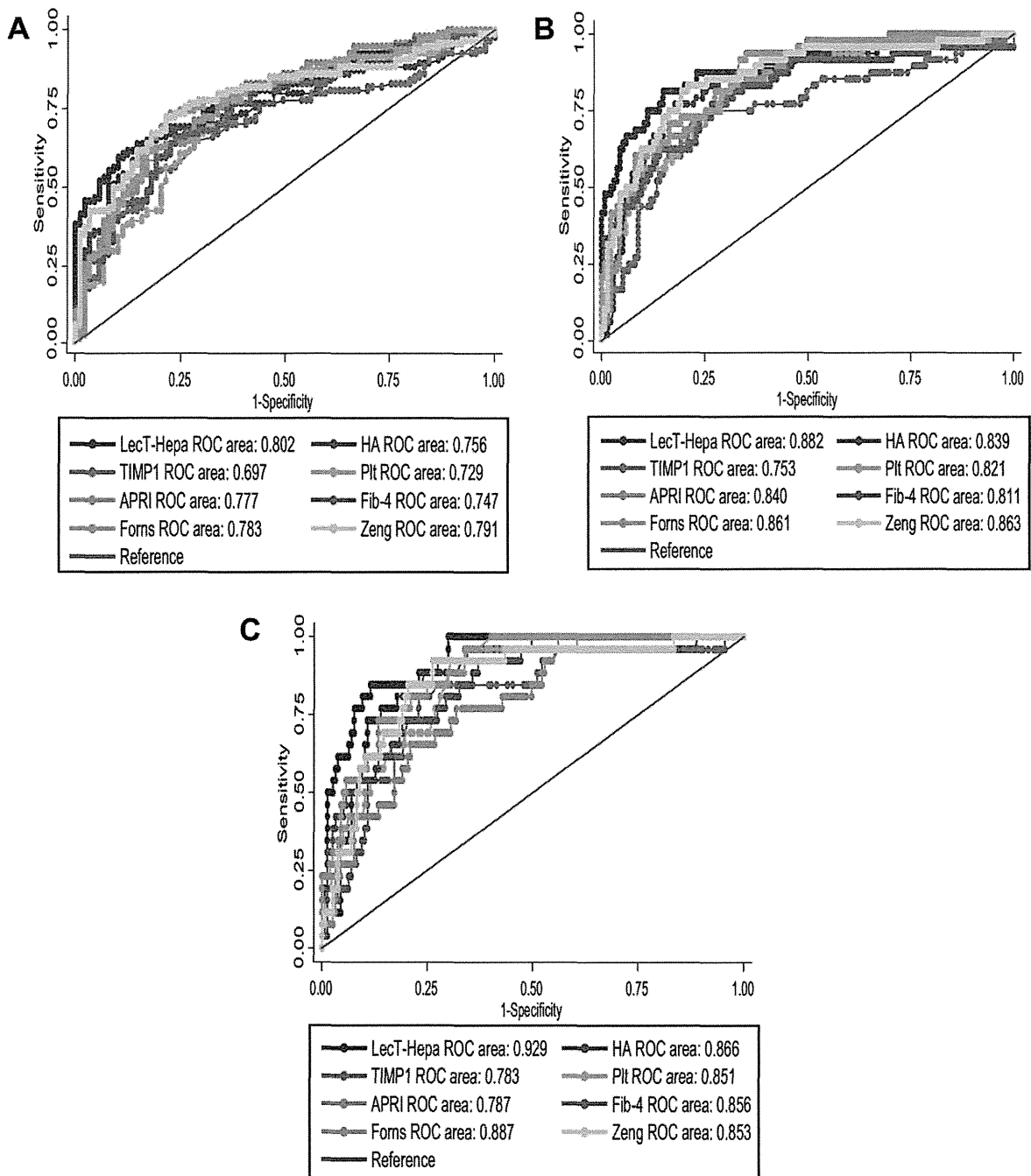


Fig. 3. Comparison of ROC curves in the performance of Lect-Hepa, HA, TIMP1, Plt, APRI, Fib-4 Index, Forns index, Zeng's score for the diagnosis of significant fibrosis (A), severe fibrosis (B), and cirrhosis (C). ROC: receiver operating characteristic curve; TIMP1: tissue inhibitors of metalloproteinases 1; Plt: platelet count; HA: hyaluronic acid.

increased degree of fucosylation was detected in cirrhosis patients using a fucose-binding lectin (AAL)-antibody sandwich ELISA and an automated analyzer.<sup>24</sup> The detection of asialo-AGP using lactosamine-recognition lectin RCA120 has also been reported as an alternative method for finding cirrhosis.<sup>25</sup> Meanwhile,

we detected many other aspects of glyco-alteration of AGP using a multiplex sandwich immunoassay with a 43-lectin microarray,<sup>26</sup> resulting in the selection of three lectins—MAL, AOL, and DSA—to serve, collectively, as a fibrosis indicator and a signal normalizer.<sup>14</sup> Since two glyco-parameters (AOL/DSA and MAL/