博士論文

論文題目　　糖尿病教育入院患者を対象にしたフィブロスキャン

による肝線維化・肝脂肪化の定量的検討

氏　　名　　近藤　真由子

目次

第一章　要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3

第二章　序文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

第三章　対象と方法

3-a) 倫理規定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8

3-b) 対象患者・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8

3-c) 検討した臨床的・身体的因子・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9

3-d) 超音波による脂肪肝の判定と非アルコール性脂肪性肝疾患の診断・10

3-e) FibroScan®による肝線維化、肝脂肪化の測定・・・・・・・・・10

3-f) 組織学的評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11

3-g) 統計学的手法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

第四章　結果

4-a) 患者背景 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

4-b) 肝脂肪化に関する解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18

4-c) 肝脂肪蓄積度高値にかかわる因子・・・・・・・・・・・・・・・・21

4-d) 肝弾性度高値にかかわる因子・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

4-e) 肝細胞癌発癌例と経皮的肝生検例の検討・・・・・・・・・・・・・31

4-f) 肝酵素正常範囲内の症例における検討・・・・・・・・・・・・・・33

第五章　考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42

第一章　要旨

糖尿病は肝細胞癌の危険因子と言われている。糖尿病には脂肪肝が合併することが多く、その一部は肝線維化をきたし、肝硬変へと進展する。本研究の目的は、糖尿病患者における肝脂肪化、肝線維化の頻度およびそれらに関連する因子を調べることである。289 人の糖尿病教育入院患者における肝脂肪化と肝線維化を、FibroScan®を用いて定量化し、ロジスティック回帰分析を用いて、各々の背景因子が与える影響を検討した。肝脂肪化には肥満（BMI や中性脂肪）が関連しており、肝線維化には HOMA-IR、GGT と血小板数が関与していた。これらの結果は 2 型糖尿病における肝線維化の背景にインスリン抵抗性があることを示唆している。

第二章　序文

肝臓関連死は、糖尿病患者の重要な死因である。1991 年から 2000 年までの 10 年間の本邦の糖尿病患者の死因において、死因の第 1 位は悪性新生物（34.1%）であったが、悪性新生物の中では肝臓癌が 8.6%と最も高率であり、その他に肝硬変による死亡が 4.7%であった[1]。また、本邦の大規模コホート研究のプール解析において、糖尿病は全癌罹患のハザード比が 1.2 であり、癌種毎の解析では肝臓癌（ハザード比 1.97）や膵臓癌（ハザード比 1.85）、結腸癌（ハザード比 1.40）のリスク増加と関連していた[2]。海外においても、糖尿病患者では非糖尿病患者に比べて肝細胞癌発症のリスクが 2 倍程度に上がると言われている[3-6]。

糖尿病患者には、脂肪肝が多く合併することが知られている[7-9]。そのうちの一部では、脂肪肝から脂肪性肝炎を経て、肝硬変や肝細胞癌へと進展することがある[10-12]。

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD）とは、飲酒歴がないが病理学的にアルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害を認める疾患である[11]。NAFLD は、肝細胞の脂肪沈着のみを認める単純性脂肪肝から、脂肪性肝炎や肝硬変まで、幅広く含む概念である[11, 13, 14]。NAFLD にお

いて、肝臓の線維化ステージが進むほど、予後が悪いことが報告されている[15, 16]。

肝臓の線維化の診断の gold standard は肝生検であるが、欠点として、出血や疼痛などの合併症の可能性を伴う侵襲的な検査であること[17]や、サンプリングエラーの可能性があること[18]、病理医による診断結果にばらつきが生じうること[19]などがあげられる。

そこで、肝臓の線維化を非侵襲的に測定する方法が開発されてきた。そのうちの 1 つである FibroScan®を用いた肝弾性度測定は、肝線維化を非侵襲的に評価する方法である[20-23]。FibroScan®は、専用プローブによって発生された剪断波が肝臓を伝搬する速度を計測することによって、肝臓の弾性度を評価する[20]。これまでの研究において、肝臓の線維化ステージが進むほど、肝弾性度が上昇することが知られている[21]。また、慢性 C 型肝炎の患者では、肝弾性度が高いほど、その後の肝細胞癌の発症率が高いと報告されている[24]。

これまでに糖尿病における肝線維化のスクリーニングにおいても、肝弾性度の測定が有用である可能性が報告されている[25]。肝生検による線維化ステージは、Brunt の分類[26]により、ステージ 0（線維化なし）からステージ 4（肝硬変）までの 5 段階に分類されるが、NAFLD において線維化ステージ 2 以上

に相当する肝弾性度のカットオフ値は 7.0 kPa[27]と報告されている。

近年、肝弾性度測定と同時に、肝臓の脂肪量を測定することが可能になった[28-32]。FibroScan®に、CAP（controlled attenuation parameter）というソフトウェアが組み込まれ、肝弾性度と同時に、肝脂肪蓄積度を測定することが可能になった。脂肪肝では超音波が深部に進むほど減衰するが、CAP は減衰の程度を測定することにより、肝の脂肪化の程度を評価するものである。これまで、肝脂肪化に関して、肝脂肪蓄積度による評価が有用であることが報告されている[29, 33]。

糖尿病患者における肝脂肪蓄積度・肝弾性度測定による肝脂肪化・肝線維化のリスクファクターの検討に関しては数本の報告がある[34-36]。De Ledinghen らの報告[34]では、肝弾性度高値が、年齢 50 歳以上、2 型糖尿病、網膜症なし、糖尿病足病変の既往と関連していたとされる。また Kwok らの報告[35]では、肝脂肪蓄積度高値が、女性、body mass index (BMI) 高値、中性脂肪高値、空腹時血糖高値、alanine aminotransferase (ALT) 高値、インスリン未使用に関連していたとされ、肝弾性度高値が、長い糖尿病罹病期間、BMI 高値、ALT 高値、尿アルブミン／クレアチニン比高値、high-density lipoprotein (HDL) コレステロール低値と関連していたとされる。しかし、糖尿病患者における肝脂肪

化と肝線維化のリスクファクターに関しては報告例が少なく、未だに十分な検討がなされたとは言えない。

　そこで今回我々は糖尿病教育入院患者を対象に肝脂肪化と肝線維化を測定し、有意な肝脂肪化と肝線維化の頻度およびそれらのリスクファクターについて検討した。

第三章　対象と方法

3-a) 倫理規定

本研究は文部科学省、および厚生労働省によって公表されている疫学研究に関する倫理ガイドラインに則り執り行われている。また東京大学医学部倫理委員会に承認されている（承認番号 10396）。

3-b) 対象患者

2014 年 4 月から 2015 年 3 月までに東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科において教育入院を行い、肝線維化・肝脂肪化の定量的測定に同意した 346 症例のうち、以下に挙げる除外基準を満たす症例を除いた 289 例を対象とした。①糖尿病の合併のない肥満症の患者、②NAFLD やアルコール性肝障害以外の、ウイルス性肝炎などの肝疾患（B 型肝炎、C 型肝炎、肝移植後）の患者、③膵疾患（膵癌、慢性膵炎、膵切除後）の合併した患者、④ステロイド内服中

3-c) 検討した臨床的・身体的因子

本研究では下記に列挙する臨床的・身体的因子について検討した。年齢、性別、BMI、腹囲、糖尿病治療（インスリン治療中、もしくは、血糖降下薬の

み)、糖尿病罹患年数、高血圧の有無、脂質異常症の有無、一日飲酒量、血小板数、aspartate aminotransferase (AST) 値、ALT 値、gamma-glutamyltransferase (GGT) 値、フェリチン値、HDL コレステロール値、low-density lipoprotein (LDL) コレステロール値、中性脂肪、クレアチニン値、尿アルブミン／クレアチニン比、空腹時血糖、空腹時インスリン値、glycated hemoglobin (HbA1c)。慢性肝疾患の有無のスクリーニングとして、HBs 抗原、HCV 抗体、抗核抗体、IgG、IgM に関して検討した。

また、インスリン抵抗性とインスリン分泌能の指標として、HOMA IR（homeostasis model assessment for insulin resistance）と HOMA β（homeostatic model assessment of β-cell function）を用いた。既報に基づき、下記の計算式で算出した[37]。

HOMA IR = (空腹時インスリン値) × (空腹時血糖) / 405

HOMA β = (空腹時インスリン値) × 360 / (空腹時血糖－63)

肝酵素に関しては、施設基準値に基づき、男性において AST ≤30 U/L および ALT ≤42 U/L を、女性において AST ≤30 U/L および ALT ≤23 U/L を正常範囲内と定義した。

3-d) 超音波による脂肪肝の判定と、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の診断

超音波は空腹時に行い、①肝実質エコーが高輝度、もしくは②肝腎コントラスト上昇のいずれかを満たすものを脂肪肝と判定した。また NAFLD の定義は、超音波上の脂肪肝の症例のうち、20 g/日以上の飲酒歴がある症例[38]を除いた。

3-e) FibroScan®による肝線維化、肝脂肪化の測定

FibroScan®は、専用プローブから発する剪断波が肝を伝搬する速度を計測することによって､肝弾性度 LSM（liver stiffness measurement）を求める[20, 21]。本研究では､FibroScan® 502（EchoSens, Paris, France）の M プローブを用いて、仰臥位にて右上肢を挙上した状態で、右肋間より肝弾性度（kPa）を測定した。なお､少なくとも 10 回の有効な測定を行い、中央値と四分位範囲を得た。肝弾性度の中央値が 7.1 kPa 以上で、四分位範囲（interquartile range, IQR）が中央値の 30％を超える場合は、測定値の信頼性が低いと考えて除外した[39]。既報では、NAFLD において、線維化ステージ 2 以上に相当する肝弾性度のカットオフ値が 7.0 kPa であったことから、本研究でも肝弾性度 ≥7.0 kPa を肝弾性度高

値と定義した[27]。

肝弾性度を測定すると同時に、肝脂肪蓄積度を測定して、肝脂肪の定量的測定も行った。既報において有意な脂肪化（肝細胞の 10%より多くに脂肪を認める）に相当する肝脂肪蓄積度のカットオフ値が 222 dB/m であった[29]ことから、本研究でも肝脂肪蓄積度 ≥222 dB/m を肝脂肪蓄積度高値と定義した。肝弾性度・肝脂肪蓄積度の測定は、術者は熟練した技師 8 名もしくは肝臓内科医 1 名のいずれかが行った。

3-f) 組織学的評価

経皮的肝生検は、15G の肝生検専用針(Hakko, Nagano, Japan)を用いて、超音波ガイド下に行った。肝生検のサンプルは、少なくとも 10 ㎜以上得られた。線維化ステージは、Brunt の分類[26]を用いて評価した。すなわち、ステージ 0 が線維化なし、ステージ 1 が中心静脈周囲性線維化、ステージ 2 が中心静脈周囲性線維化と門脈域の線維化、ステージ 3 が中心静脈周囲性線維化と架橋形成を伴う門脈域の線維化、ステージ 4 が肝硬変であった。また、Kleiner らによって提唱された NAFLD activity score (NAS) を用いて[40]､肝脂肪化(スコア 0～3)、肝細胞風船様腫大(スコア 0～2)、実質炎症(スコア 0～3)の程度を評価した。

3-g) 統計学的手法

量的変数に関しては、中央値、および四分位範囲（IQR）で表記した。質的変数については個数、および割合（%）で表記した。群間比較は連続変数に関してはWilcoxon検定を用いた。カテゴリー変数に関してはPearsonのχ^2検定、またはFisherの直接確率検定を用いて行った。

肝弾性度、肝脂肪蓄積度のそれぞれに関して、Spearmanの順位相関係数を用いて各種臨床パラメータとの相関を検討した。また、肝弾性度高値、肝脂肪蓄積度高値に関連する因子に関して検討するため、ロジスティック回帰分析を用いて単変量解析を行い、その後*P*値が0.05未満になった因子で多変量解析を行った。この際に、量的変数を質的変数に変換するために、それぞれの変数のカットオフ値を ROC 曲線から求めて採用した。単変量解析・多変量解析の結果はオッズ比（odds ratio, OR）、および95%信頼区間（confidence interval, CI）で表記した。なお、多変量解析を行う際に、多重共線性を避けるため、強い相関（r >0.8）を認める変数に関しては、一方のみを採用した。すなわち、①BMI・腹囲、②AST・ALTに関しては、それぞれ①BMI、②ALTのみを使用して、多変量解析を行った。

統計解析はR software (version 3.1.1; http://www.R-project.org)を用いて行っ

た。すべての解析は両側検定で行い、P 値 0.05 未満を統計学的有意水準とした。

第四章　結果

4-a)　患者背景

糖尿病教育入院患者 346 症例の肝線維化・肝脂肪化を定量的に測定した。除外基準を満たす 57 症例を除き、最終的に、1 型糖尿病 31 症例、2 型糖尿病 258 症例を解析対象とした (図 1)。なお、慢性肝疾患のスクリーニングとして、HBs 抗原や HCV 抗体、抗核抗体、IgG、IgM を調べた。B 型肝炎 3 例、C 型肝炎 12 例、生体肝移植後 1 例を認めたが、自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変と診断された症例はなかった。

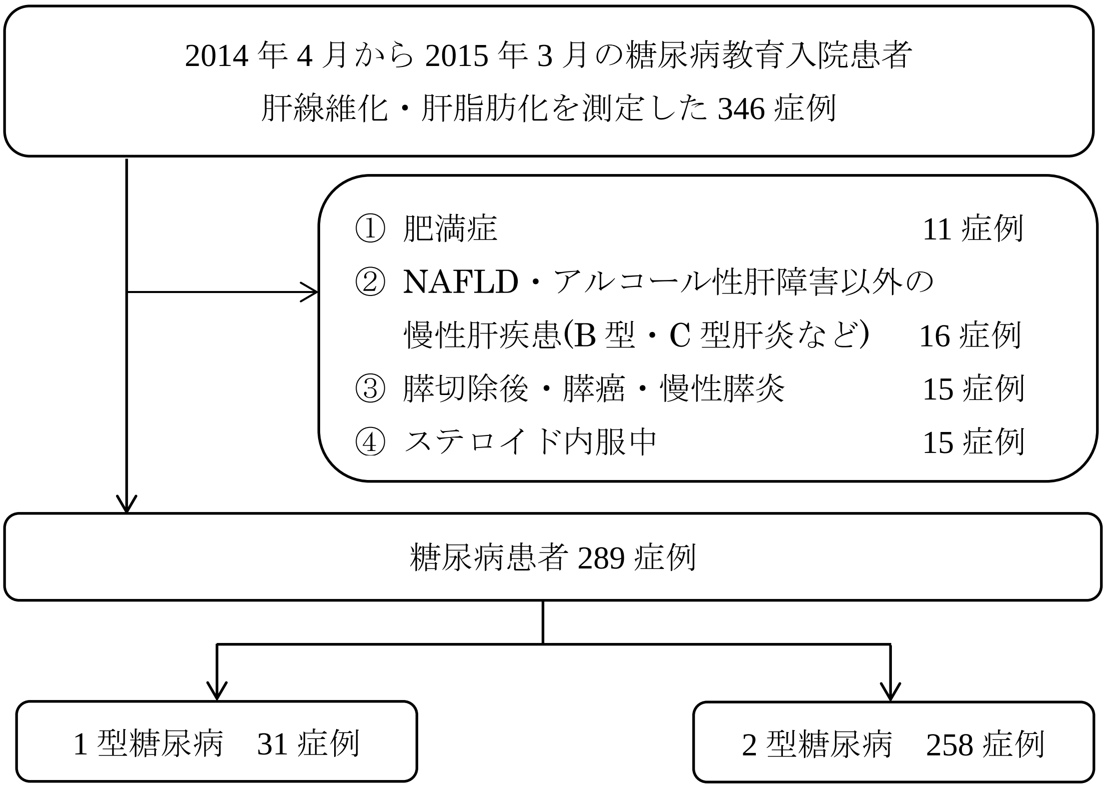


図 1. 対象患者の詳細

患者背景を表 1 に示す。年齢の中央値は、1 型糖尿病で 58.2 歳、2 型糖尿病で 66.9 歳であった。BMI の中央値はそれぞれ 21.6 kg/m^2 と 26.3 kg/m^2 であった。また、HbA1c の中央値はそれぞれ 9.1％と 8.7％であった。

表１．患者背景

	1 型糖尿病 *N = 31*	2 型糖尿病 *N = 258*	*P* 値
年齢, 年	58.2 (43.1–74.0)	66.9 (57.8-75.4)	0.03
性別　男性, n (%)	14 (45.2)	150 (58.1)	0.18
BMI (kg/m^2)	21.6 (19.9-23.5)	26.3 (23.6-30.4)	<0.001
腹囲 (cm)	80.0 (73.5-86.5)	94.0 (87.0-102.9)	<0.001
高血圧, n (%)	15 (48.4)	166 (64.3)	0.12
降圧薬の種類, n (%)			
ARB	12 (38.7)	126 (48.8)	0.34
ACE 阻害薬	2 (6.5)	12 (4.7)	0.65
カルシウム拮抗薬	10 (32.3)	102 (39.5)	0.56
利尿薬	3 (9.7)	44 (17.1)	0.44
β遮断薬	1 (3.3)	45 (17.4)	0.04
その他	1 (3.3)	6 (2.3)	0.55
糖尿病治療, n (%)			
インスリンあり	30 (96.8)	99 (38.3)	<0.001
内服のみ	1 (3.2)†	159 (61.6)	
糖尿病薬物療法の種類, n (%)			
スルホニル尿素薬	0 (0.0)	97 (37.6)	<0.001
速効性インスリン分泌促進薬	0 (0.0)	19 (7.4)	0.24
α-グルコシダーゼ阻害薬	9 (29.0)	62 (24.0)	0.52
ビグアナイド薬	2 (6.5)	112 (43.4)	<0.001
チアゾリジン薬	2 (6.5)	46 (17.8)	0.13
DPP-4 阻害薬	6 (19.4)	168 (65.1)	<0.001
SGLT2 阻害薬	0 (0.0)	2 (0.8)	1.00
GLP-1 受容体作動薬	0 (0.0)	13 (5.0)	0.37
糖尿病罹患年数, 年	11.0 (3.0-21.5)	13.0 (6.0-21.0)	0.47
脂質異常症, n (%)	10 (32.3)	179 (69.4)	<0.001
アルコール摂取量, n (%)			
20g/日未満	27 (87.1)	199 (77.1)	0.32
20g/日以上 80g/日未満	2 (7.4)	44 (17.1)	
80g/日以上	2 (7.4)	15 (5.8)	
血小板数 (× 1000/μL)	225 (189-280)	220 (186-259)	0.45

表１．患者背景 (続き)

	1 型糖尿病 *N = 31*	2 型糖尿病 *N = 258*	*P* 値
AST (U/L)	20.0 (15.5-24.5)	23.0 (17.0-32.8)	0.03
ALT (U/L)	17.0 (13.0-22.5)	22.0 (15.0-37.0)	0.01
GGT (U/L)	18.0 (14.5-28.0)	30.0 (20.0-63.8)	<0.001
フェリチン (ng/mL)	50.0 (25.0-109.0)	84.0 (41.5-183.3)	0.054
HDL (mg/dL)	62.4 (53.7-88.7)	46.7 (40.1-56.0)	<0.001
LDL (mg/dL)	93.0 (86.5-121.5)	100.0 (80.0-121.8)	1.00
TG (mg/dL)	74.0 (59.0-96.5)	117.5 (87.3-158.0)	<0.001
Cre (mg/dL)	0.64 (0.55-0.80)	0.79 (0.62-0.99)	0.005
尿 Alb/Cre 比 (mg/g Cre)	28.0 (9.5-94.5)	30.0 (12.0-128.0)	0.61
空腹時血糖 (mg/dL)	185.0 (123.5-225.5)	139.0 (114.0-178.0)	0.006
HbA1c (%)	9.1 (7.9-9.8)	8.7 (7.6-9.8)	0.64

量的変数に関しては中央値と四分位範囲､質的変数に関しては数と割合(%)で表記した。

略号 BMI; body mass index, ARB; angiotensinⅡ receptor blocker, ACE; angiotensin converting enzyme inhibitor, DPP-4; dipeptidyl-peptidase 4, SGLT2; sodium-dependent glucose transporter 2, GLP-1; glucagon-like peptide-1, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine transaminase, GGT; gamma-glutamyl transferase, HDL; high-density lipoprotein, LDL; low-density lipoprotein , TG; triglyceride, Cre; creatinine, Alb; albumin, HbA1c; glycated hemoglobin

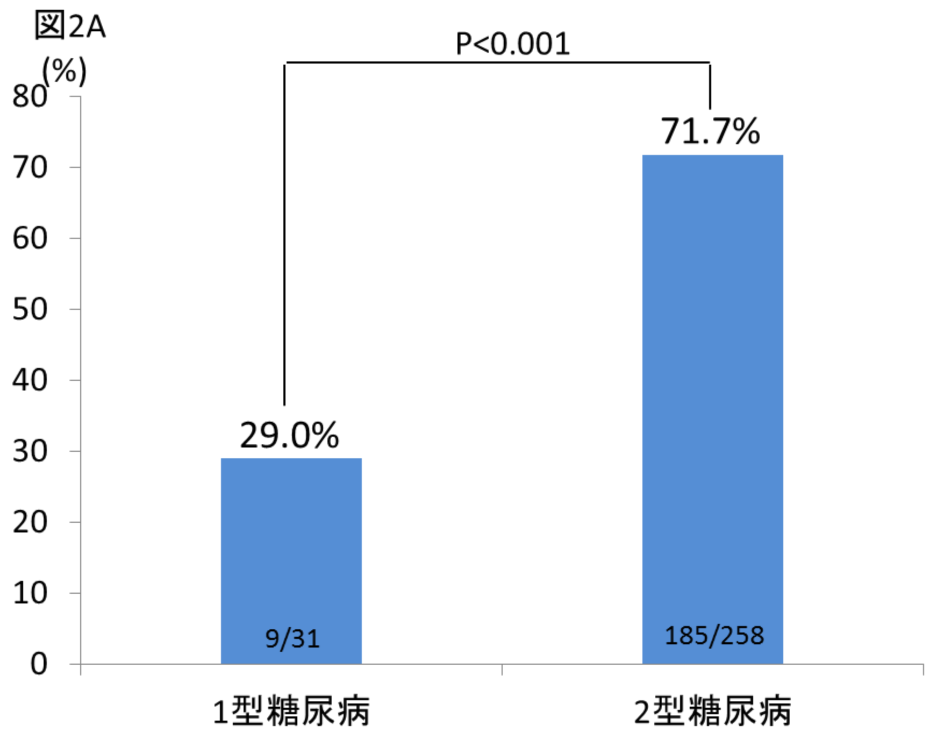
† 臨床的に緩徐進行 1 型糖尿病と診断した症例

4-b)　肝脂肪化に関する解析

超音波上、脂肪肝を認めた症例は、1 型糖尿病では 29.0%（31 症例中 9 症例）、2 型糖尿病では 71.7%（258 症例中 185 症例）であった(P <0.001) (図 2A)。また、NAFLD に関しては、1 型糖尿病では 19.4%（31 症例中 6 症例）、2 型糖尿病では 54.3%（258 症例中 140 症例）であった(P <0.001) (図 2B)。

肝脂肪蓄積度（CAP）は 1 型糖尿病では全症例において、2 型糖尿病では 90.3%（233 症例）において測定可能であった。測定不能症例における BMI の中央値は、32.9 kg/m^2 であり、高度肥満症例（BMI ≥35 kg/m^2）の症例では 61.1% が測定不能であった。高度肥満例では体表から肝臓までの距離が長くなるため測定困難になると考えられた。

1 型糖尿病、2 型糖尿病での肝脂肪蓄積度のヒストグラムをそれぞれ図 3A, 3B に示した。肝脂肪蓄積度のカットオフ値として 222 dB/m を用いたところ、1 型糖尿病での肝脂肪蓄積度 ≥222 dB/m での割合は 32.3%（31 症例中 10 症例）であった。2 型糖尿病の中で肝脂肪蓄積度を測定可能であった 233 症例において、肝脂肪蓄積度 ≥222 dB/m の割合は 71.2%（166 症例）、超音波上の脂肪肝の割合は 72.5%（169 症例）であった。



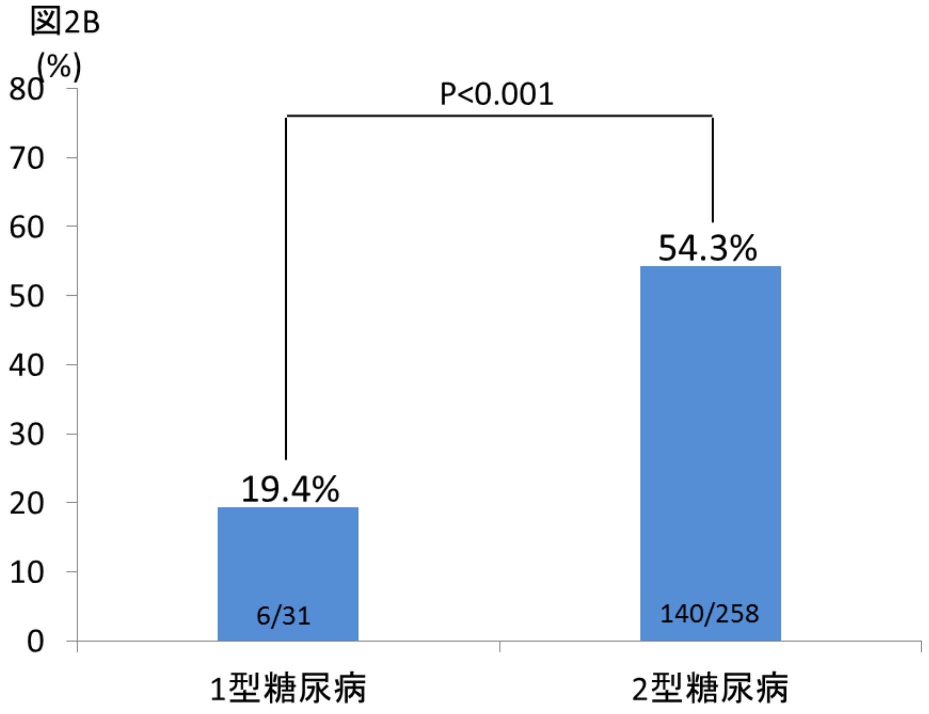


図 2.　超音波上の脂肪肝の頻度**(A)**と、非アルコール性脂肪性肝疾患の頻度**(B)**

図3A

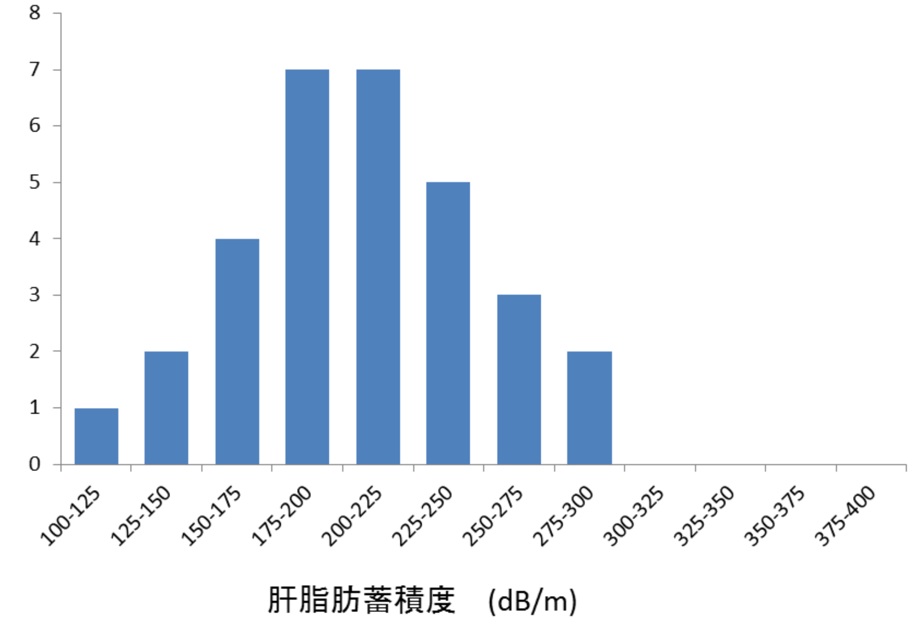


図3B

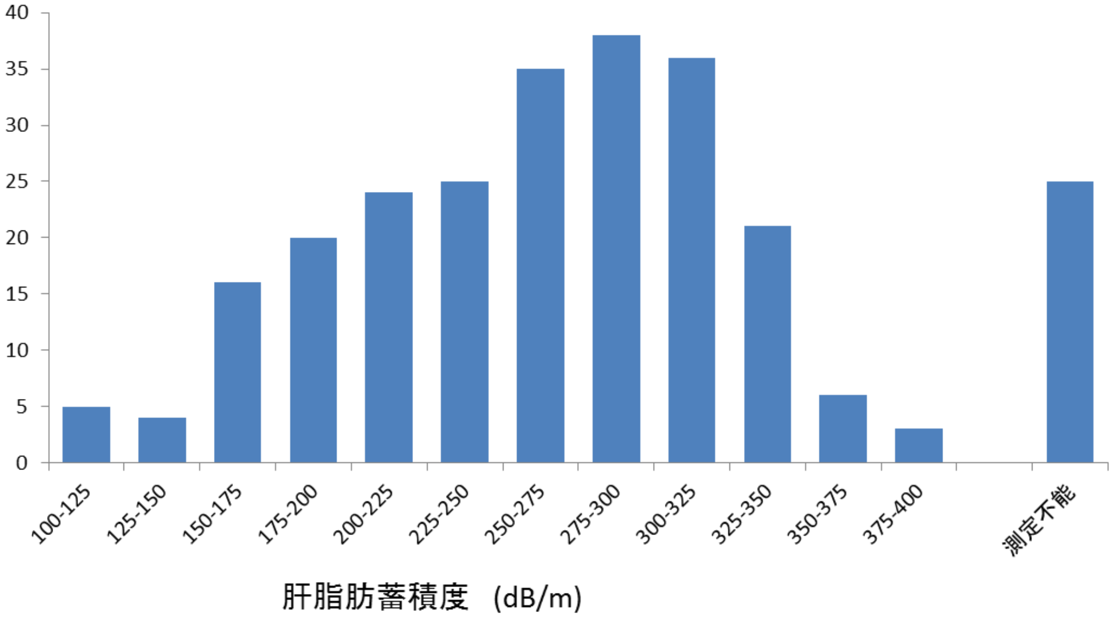


図 3. 肝脂肪蓄積度のヒストグラム(A,B)

A. 肝脂肪蓄積度のヒストグラム (1 型糖尿病 31 症例)

B. 肝脂肪蓄積度のヒストグラム (2 型糖尿病 258 症例)

4-c)　肝脂肪蓄積度高値にかかわる因子

2 型糖尿病において、肝脂肪蓄積度と各因子との相関を Spearman の相関係数を用いて解析した（表 2）。BMI や腹囲と中程度の相関を認め、ALT や GGT、中性脂肪と有意な相関を認めた。年齢や糖尿病罹患年数とは負の有意な相関を認めた。またインスリン未使用の 142 症例では、空腹時インスリンや HOMA-IR と有意な相関を認めた。

次に、肝脂肪蓄積度高値と関連する因子を調べるために、ロジスティック解析を用いて解析を行ったところ、単変量解析では、BMI や腹囲、肝酵素（ALT や GGT）、フェリチン、中性脂肪、血小板数、空腹時血糖が関連していた。年齢、糖尿病罹患年数、HDL コレステロールとは負の関連を認めた。

多変量解析を行う際には、多重共線性を避けるため、強い相関（r >0.8）を認める変数に関して、一方のみを採用した。すなわち、①BMI・腹囲、②AST・ALT に関しては、それぞれ①BMI、②ALT のみを使用して、多変量解析を行ったところ、BMI ≥26.0 kg/m^2、TG ≥137 mg/dL と関連を認めた（表 3）。また、インスリン未使用 142 症例において同様に多変量解析を行ったところ、同様に BMI と中性脂肪が有意な因子として抽出された（表 4）。

表 2. 肝脂肪蓄積度と相関する因子

	全 233 症例		インスリン未使用 142 症例	
変数	rho	*P* 値	rho	*P* 値
年齢 (年)	-0.37	<0.001	-0.25	0.003
BMI (kg/m2)	0.49	<0.001	0.38	<0.001
腹囲 (cm)	0.50	<0.001	0.42	<0.001
糖尿病罹患年数(年)	-0.28	0.001	-0.19	0.02
血小板 (× 1000/μL)	0.16	0.01	0.13	0.12
AST (U/L)	0.19	0.004	0.21	0.01
ALT (U/L)	0.33	<0.001	0.32	<0.001
GGT (U/L)	0.30	<0.001	0.28	<0.001
フェリチン (ng/mL)	0.16	0.02	0.14	0.11
HDL (mg/dL)	-0.23	<0.001	-0.17	0.04
LDL (mg/dL)	-0.001	0.99	-0.007	0.94
TG (mg/dL)	0.32	<0.001	0.25	0.003
Cre (mg/dL)	-0.10	0.14	-0.04	0.67
尿 Alb/Cre 比 (mg/g Cre)	0.02	0.70	0.04	0.62
空腹時血糖 (mg/dL)	0.13	0.05	0.11	0.18
HbA1c (%)	0.04	0.58	0.08	0.34
空腹時インスリン			0.38	<0.001
HOMA IR			0.36	<0.001
HOMA β			0.21	0.01

略号 HOMA IR; homeostasis model assessment as an index of insulin resistance, HOMA β; homeostatic model assessment beta cell function

表 3. 肝脂肪蓄積度高値と関連する因子

	単変量解析			多変量解析		
変数	OR	95% CI	*P*	odds	95% CI	*P*
年齢(/10 年)	0.63	0.48-0.82	<0.001	0.97	0.69-1.38	0.88
性別						
男性	0.75	0.42-1.36	0.35			
女性	1.00	(referent)				
高血圧合併有	1.19	0.67-2.13	0.55			
インスリン使用有	0.61	0.34-1.09	0.10			
飲酒量						
20g/日未満	1.00	(referent)				
20g/日以上 80g/日未満	1.17	0.54-2.50	0.69			
80g/日以上	1.71	0.46-6.31	0.42			
BMI (kg/m^2) ≥26.0	8.64	4.12-18.10	<0.001	7.79	3.38-17.90	<0.001
腹囲(cm) ≥91.0	6.98	3.63-13.40	<0.001			
糖尿病罹患年数(年) ≥14	0.70	0.49-0.99	0.04	0.69	0.31-1.53	0.36
血小板数(× 1000/μL) ≥258	2.40	1.10-5.23	0.03	1.94	0.74-5.07	0.18
AST (U/L)≥ 24	2.41	1.31-4.41	0.004			
ALT (U/L) ≥18	3.27	1.81-5.89	<0.001	1.80	0.82-3.94	0.14
GGT (U/L) ≥22	3.95	2.16-7.23	<0.001	1.87	0.83-4.18	0.13
フェリチン(ng/mL) ≥79	2.46	1.38-4.41	0.002	1.82	0.85-3.90	0.13
HDL (mg/dL)≥56	1.52	0.20-0.68	<0.001	0.82	0.36-1.86	0.64
TG (mg/dL) ≥137	7.03	3.16-15.60	<0.001	4.37	1.71-11.10	0.002
Cre (mg/dL) ≥0.85	0.60	0.33-1.06	0.08			
尿 Alb/Cre ≥70	1.41	0.76-2.61	0.28			
空腹時血糖 (mg/dL) ≥153	2.22	1.18-4.17	0.01	1.96	0.89-4.32	0.10
HbA1c (%) ≥9.0	1.33	0.74-2.40	0.35			

略号 OR; odds ratio

表 **4.** 肝脂肪蓄積度高値と関連する因子**(**インスリン未使用症例**)**

変数	単変量解析			多変量解析		
	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*
年齢(/10 年)	0.70	0.50-0.99	0.04	1.10	0.70-1.72	0.69
性別						
男性	1.07	0.49-2.37	0.86			
女性	1.00	(referent)				
高血圧合併有	0.95	0.43-2.09	0.90			
飲酒量						
20g/日未満	1.00	(referent)				
20g/日以上 80g/日未満	1.91	0.60-6.05	0.27			
80g/日以上	1.09	0.28-4.32	0.90			
BMI (kg/m^2) ≥26.5	5.73	2.30-14.30	<0.001	7.49	2.50-22.50	<0.001
腹囲(cm) ≥90.0	7.38	3.12-17.50	<0.001			
糖尿病罹患年数(年) ≥14	0.37	0.17-0.81	0.01	0.55	0.19-1.57	0.27
血小板数(× 1000/μL) ≥213	1.58	0.73-3.41	0.25			
AST (U/L)≥ 24	3.01	1.34-6.76	0.008			
ALT (U/L) ≥19	5.27	2.33-11.90	<0.001	3.07	0.99-9.54	0.053
GGT (U/L) ≥31	5.25	2.23-12.30	<0.001	1.57	0.49-5.04	0.45
フェリチン(ng/mL) ≥81	2.31	1.06-5.02	0.03	2.38	0.87-6.54	0.09
HDL (mg/dL)≥45.2	0.55	0.25-1.22	0.14			
TG (mg/dL) ≥134	4.39	1.77-10.90	0.001	3.53	1.08-11.60	0.04
Cre (mg/dL) ≥0.80	0.57	0.26-1.22	0.15			
尿 Alb/Cre ≥92	1.71	0.68-4.31	0.26			
空腹時血糖 (mg/dL) ≥153	2.45	1.02-5.89	0.04	1.61	0.45-5.76	0.46
HbA1c (%) ≥9.0	2.58	1.04-6.45	0.04	1.52	0.43-5.31	0.49
HOMA IR ≥2.6	4.65	1.93-11.20	<0.001	0.84	0.24-2.94	0.79

4-d) 肝弾性度高値にかかわる因子

肝弾性度は、1 型糖尿病では全症例、2 型糖尿病では 88.8%（229 症例）で測定可能であった。肝弾性度は、肝脂肪蓄積度同様、高度肥満症例で測定不能であった。

1 型糖尿病、2 型糖尿病での肝弾性度のヒストグラムをそれぞれ図 4A, 4B に示した。肝弾性度のカットオフ値として 7.0 kPa を用いたところ、1 型糖尿病での肝弾性度 ≥7.0 kPa での割合は 6.5%（31 症例中 2 症例）、2 型糖尿病での割合は 22.1%（258 症例中 57 症例）であった(P = 0.06)。

2 型糖尿病において、肝弾性度と各因子との相関を Spearman の相関係数を用いて調べたところ、BMI や腹囲と有意な相関を認め、肝酵素と中等度の相関を認めた。また、インスリン未使用群（141 症例）においては、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR や空腹時インスリンと中程度の相関を認めた（表 5）。

2 型糖尿病において、肝弾性度 ≥7.0 kPa に関連する因子を調べるために、ロジスティック回帰分析を用いて単変量解析を行ったところ、BMI や腹囲、肝酵素、フェリチン、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1c と関連を認めた。また血小

板数、糖尿病罹病期間、HDL コレステロールとは負の関連を認めた。多変量解析では、BMI ≥28.2 kg/m^2、GGT ≥36 U/L、血小板数 <164 ×1000/μL が有意な因子として抽出された（表 6)。

次に、インスリン未使用症例において、同様の解析を行ったところ、HOMA-IR ≥2.9、GGT ≥36 U/L、血小板数 <164 ×1000/μL が有意な因子であった（表 7)。

図4A

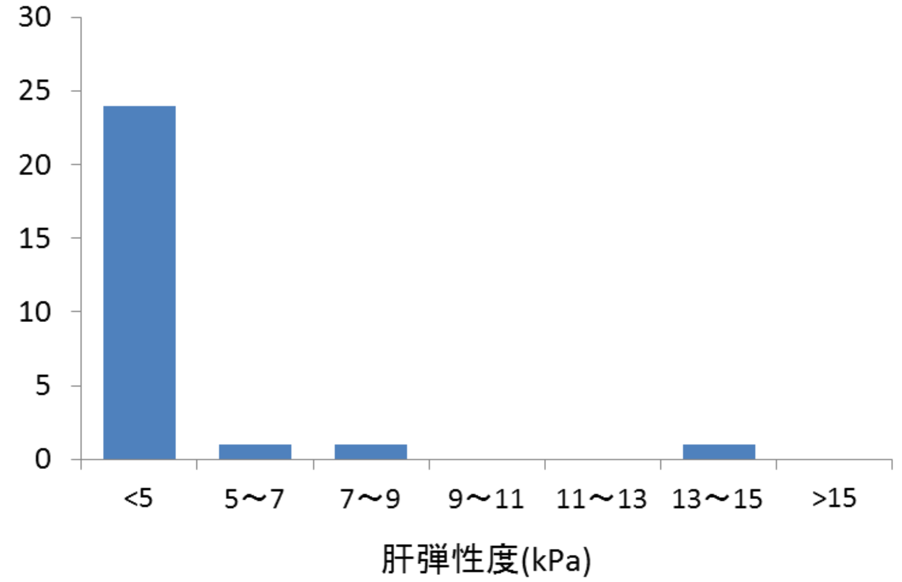


図4B

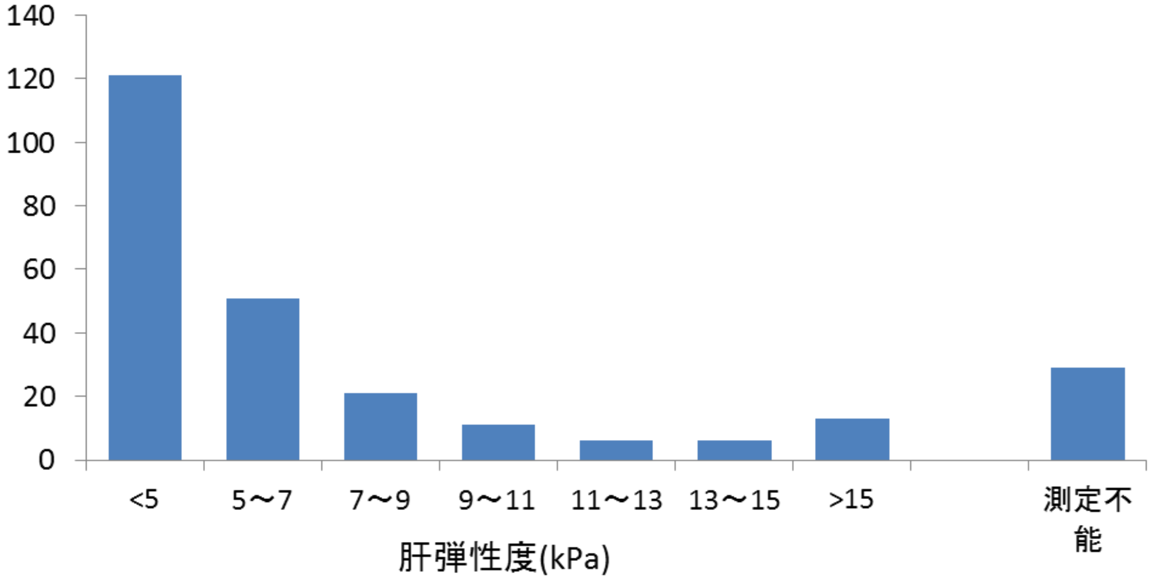


図 4 肝弾性度のヒストグラム

A. 1 型糖尿病　肝弾性度≥7.0kPa の割合は 6.5%であった。

B. 2 型糖尿病　肝弾性度≥7.0kPa の割合は 22.1%であった。

表 5. 肝弾性度と相関する因子

	全 229 症例		インスリン未使用 141 症例	
変数	rho	*P* 値	rho	*P* 値
年齢(年)	-0.13	0.047	-0.007	0.93
BMI (kg/m2)	0.36	<0.001	0.26	0.002
腹囲 (cm)	0.35	<0.001	0.26	0.002
糖尿病罹患年数 (年)	-0.21	0.001	-0.08	0.35
血小板 (× 1000/μL)	-0.15	0.02	-0.23	0.007
AST (U/L)	0.44	<0.001	0.47	<0.001
ALT (U/L)	0.49	<0.001	0.45	<0.001
GGT (U/L)	0.44	<0.001	0.46	<0.001
フェリチン (ng/mL)	0.18	0.004	0.18	0.03
HDL (mg/dL)	-0.16	0.02	-0.04	0.60
LDL (mg/dL)	-0.06	0.33	-0.09	0.27
TG (mg/dL)	0.20	0.002	0.14	0.09
Cre (mg/dL)	-0.09	0.19	-0.06	0.47
尿 Alb/Cre 比 (mg/g Cre)	0.04	0.52	0.11	0.19
空腹時血糖 (mg/dL)	0.19	0.005	0.22	0.01
HbA1c (%)	0.13	0.052	0.22	0.009
空腹時インスリン			0.51	<0.001
HOMA IR			0.54	<0.001
HOMA *β*			0.23	0.007

表 6. 肝弾性度高値に関連する因子

	単変量解析			多変量解析		
変数	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*
年齢(/10 年)	0.81	0.63-1.03	0.08			
性別						
男性	0.76	0.41-1.39	0.76			
女性	1.00	(referent)				
高血圧合併有	1.54	0.81-2.93	0.19			
インスリン使用有	0.78	0.42-1.47	0.45			
飲酒量						
20g/日未満	1.00	(referent)				
20g/日以上 80g/日未満	0.74	0.32-1.72	0.48			
80g/日以上	1.48	0.48-4.56	0.50			
BMI (kg/m^2)≥28.2	5.31	2.80-10.10	<0.001	4.26	1.80-10.10	0.001
腹囲(cm) ≥ 93	3.86	2.01-7.44	<0.001			
糖尿病罹患年数(年) ≥17	0.24	0.11-0.51	<0.001	0.41	0.14-1.19	0.10
血小板数(× 1000/μL) ≥164	0.15	0.06-0.34	<0.001	0.08	0.02-0.27	<0.001
AST (U/L) ≥29	6.96	3.61-13.40	<0.001			
ALT (U/L) ≥31	6.52	3.40-12.50	<0.001	1.75	0.71-4.29	0.22
GGT (U/L) ≥36	11.50	5.38-24.50	<0.001	2.77	1.06-7.22	0.04
フェリチン(ng/mL) ≥120	3.57	0.92-6.71	<0.001	2.31	0.98-5.42	0.054
HDL (mg/dL) ≥52.4	0.48	0.24-0.97	0.04	0.59	0.23-1.48	0.26
LDL (mg/dL) ≥99	0.60	0.33-1.10	0.10			
TG (mg/dL) ≥137	4.39	1.77-10.90	0.001	2.28	0.93-5.63	0.07
Cre (mg/dL) ≥ 0.55	0.49	0.22-1.11	0.09			
空腹時血糖 (mg/dL) ≥136	2.38	1.25-4.52	0.008	1.10	0.43-2.78	0.85
HbA1c (%) ≥9.2	2.13	1.16-3.91	0.015	2.13	0.88-5.14	0.09

表 7. 肝弾性度高値に関連する因子(インスリン未使用症例)

	単変量解析			多変量解析		
変数	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*
年齢(/10 年)	1.04	0.76-1.42	0.82			
性別						
男性	0.64	0.30-1.32	0.24			
女性	1.00	(referent)				
高血圧合併有	1.43	0.65-3.16	0.37			
飲酒量						
20g/日未満	1.00	(referent)				
20g/日以上 80g/日未満	0.65	0.22-1.88	0.42			
80g/日以上	1.29	0.36-4.63	0.64			
BMI(kg/m^2) ≥ 28.2	2.74	1.28-5.88	0.01	2.17	0.70-6.67	0.18
腹囲(cm) ≥ 93.0	2.39	1.10-5.20	0.03			
糖尿病罹患期間(年) ≥16 年	0.30	0.10-0.92	0.04	0.16	0.02-1.15	0.07
血小板数 (× 1000/μL) ≥ 164	0.13	0.05-0.34	<0.001	0.03	0.005-0.193	<0.001
AST (IU/L)≥ 33	5.83	2.58-13.20	<0.001			
ALT (IU/L) ≥ 31	4.37	1.99-9.61	<0.001	0.97	0.31-3.01	0.96
GGT (IU/L) ≥36	8.99	3.59-22.50	<0.001	3.39	1.04-11.10	0.043
フェリチン(ng/mL)≥144	3.68	1.68-8.07	0.001	2.11	0.68-6.57	0.20
HDL (mg/dL) ≥61	0.43	0.12-1.57	0.02	0.63	0.11-3.68	0.61
LDL (mg/dL) ≥93	0.51	0.24-1.07	0.08			
TG (mg/dL) ≥139	1.98	0.93-4.21	0.08			
Cre (mg/dL) ≥0.52	0.37	0.13-1.11	0.08			
空腹時血糖 (mg/dL) ≥ 136	3.84	1.65-8.961	0.002	0.61	0.15-2.57	0.50
HbA1c (%) ≥9.2	2.53	1.16-5.52	0.02	1.90	0.56-6.46	0.30
HOMA IR ≥2.9	10.80	4.28-27.10	<0.001	9.14	2.20-38.00	0.002

4-e)　肝細胞癌発癌例と経皮的肝生検例の検討

全 346 症例中 2 例に、初発の非 B 非 C 肝細胞癌の合併を認めた。2 症例とも手術を希望されず、ラジオ波焼灼療法で治療を行った。ラジオ波焼灼療法の際に、背景肝生検を施行した。結果を表 8 に示す（症例 1 と症例 2）。症例 1 に関しては、非アルコール性脂肪性肝炎（Nonalcoholic fatty steatohepatitis; NASH）が疑われた。症例 2 に関しては、病理結果からは NASH を示唆する要素はなかったが、線維化の進行を認めた。肥満歴があり、血液検査からは他の慢性肝疾患を示唆する所見は得られず、臨床的には burned-out NASH の可能性も考えられた。

また、肝線維化が疑われた症例のうち、患者の同意が得られた 8 症例に対して経皮的肝生検を行った（症例 3〜症例 10）。肝弾性度≥ 7.0kPa を満たす 8 症例のうち 6 症例が、肝線維化ステージ 2 以上であった。

表 8. 経皮的肝生検例

症例	性別	年齢	BMI	飲酒量	発癌有無	肝弾性度	肝脂肪蓄積度	病理所見				
								Fibrosis Stage	Steatosis	LI	Ballooning	NAS
1	F	71	38.0	<20 g/日	有	測定不能	測定不能	3	1	2	1	4
2	F	74	30.2	<20 g/日	有	12.6	283	3	0	1	0	1
3	M	50	30.5	≥80 g/日	無	42.2	362	4	2	2	1	5
4	F	59	38.4	<20 g/日	無	21.8	314	2	2	2	1	5
5	F	65	30.8	<20 g/日	無	14.4	258	2	1	2	1	4
6	M	69	25.9	≥80 g/日	無	13.9	348	3	1	2	1	4
7	M	57	28.3	<20 g/日	無	13.8	299	2	1	1	1	3
8	M	61	17.4	≥80 g/日	無	9.2	264	1	2	1	0	3
9	M	66	32.1	<20 g/日	無	7.3	264	1	1	1	1	3
10	M	63	26.7	<20 g/日	無	6.8	333	1	2	2	1	5

略号 LI ; Lobular inflammation, NAS ; NAFLD Activity Score

4-f)　肝酵素正常範囲内の症例における検討

肝酵素の正常範囲内を、施設基準値に基づき、男性において AST ≤30 U/L かつ ALT ≤42 U/L、女性において AST ≤30 U/L かつ ALT ≤23 U/L と定義した。

2 型糖尿病において、肝酵素が正常範囲内である症例は、159 症例（61.6%）であった。この 159 例において、103 症例（64.8%）で、超音波上の脂肪肝を認めた。また、肝弾性度高値を 22 症例（13.8%）に認めた。

第五章　考察

本研究では、2 型糖尿病患者における肝脂肪蓄積度高値に、BMI ≥26.0 kg/m^2、TG ≥137 mg/dL が関連していた。また、2 型糖尿病患者における肝弾性度高値には、BMI ≥28.2 kg/m^2、GGT ≥36 U/L、血小板数 <164 ×1000/μL が関連しており、インスリン未使用群においては HOMA-IR ≥2.9、GGT ≥36 U/L、血小板数 <164 ×1000/μL が関連していた。この研究の主要な結果は、2 型糖尿病の患者における肝弾性度とインスリン抵抗性（HOMA-IR）との関連を疫学的に示したことである。

まず、肝脂肪蓄積度に関しては、2 型糖尿病において超音波検査で脂肪肝を 71.7％に認め、20 g/日以上の飲酒歴のある人を除いた NAFLD の割合は 54.3％であった。既報では 2 型糖尿病において超音波で脂肪肝と診断される割合は 55-85％、NAFLD の割合は 40-70％とされ[7, 8]、本研究の結果と合致している。なお、肝酵素正常範囲内の症例に限定しても、超音波上の脂肪肝を 64.8％に認めており、糖尿病患者において肝酵素上昇は脂肪肝の拾い上げには有用ではない可能性が示された。一方、1 型糖尿病患者においては、超音波上の脂肪肝が 29.0％、NAFLD が 19.4％であり、2 型糖尿病患者に比べて、有意に罹患率が低かった。

2 型糖尿病の中で肝脂肪蓄積度を測定可能であった 233 症例において、肝脂

肪蓄積度 ≥222 dB/m の割合は 71.2%、超音波上の脂肪肝の割合は 72.5%であった。超音波上の脂肪肝に関しては肝脂肪量が中等度以上でないと診断が困難な場合がある[41]が、本研究では肝脂肪蓄積度高値による脂肪肝と、超音波上の脂肪肝の割合にはあまり差を認めなかった。

肝脂肪蓄積度は、Spearman の相関係数にて糖尿病罹患年数や年齢と負の相関を認めた。これは一部の既報と一致する点であり、糖尿病罹患年数の短い症例や若年者ではインスリン分泌能が比較的保たれており、高インスリン血症により肝細胞による遊離脂肪酸の取り込みが促進される可能性が推測されている[7]。

また、既報では肝脂肪蓄積度高値に関連する因子として、女性、BMI 高値、中性脂肪高値、空腹時血糖高値、ALT 高値、インスリン未使用が示されている[35]。本研究でも肝脂肪蓄積度高値は、BMI 高値、中性脂肪高値に関連しており、肥満に強く関連することが示唆された。

次に、肝線維化に関しては、2 型糖尿病全例においては BMI、GGT、血小板数が関連していた。また、インスリン未使用例に限定すると HOMA-IR、GGT、血小板数が関連していた。

NASH の病態進展には、Day ら[42]に提唱された two-hit theory が広く支持さ

れている。Two-hit theory とは、肝臓内に脂肪が蓄積して脂肪肝を発症し（first hit）、さらに、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどによる肝細胞障害（second hit）が加わって炎症や線維化が起こるという説である。GGT に関しては、抗酸化物質であるグルタチオンの代謝にかかわり、以前より酸化ストレスマーカーと考えられている[43, 44]。また、GGT は、冠動脈疾患の致死的イベント発生の予後[45, 46]や、メタボリックシンドローム[47, 48]と関係するとされている。

興味深いことに、インスリン未使用例では、多変量解析において BMI ではなく HOMA-IR が関連していた。このことから、2 型糖尿病患者において、肥満よりも、肥満やメタボリックシンドロームにより引き起こされるインスリン抵抗性が、肝線維化に関与している可能性が推測された。

しかし、インスリン抵抗性と肝線維化のメカニズムに関しては本研究では評価できず、今後の基礎的な研究が必要である。すなわち、インスリン抵抗性自体が肝線維化を惹起するのか、もしくは、インスリン抵抗性が何らかの代謝経路やアディポカインなどの surrogate marker であるのかということは明らかにはなっていない。また、肝線維化がインスリン抵抗性を惹起するという側面もあるため、肝線維化とインスリン抵抗性のメカニズムは非常に複雑である。

本研究では、肝弾性度は、糖尿病罹病年数や糖尿病合併症（尿アルブミン

／クレアチニン比）と明らかな関連を認めなかった。実際に、糖尿病罹病年数が短い症例の中でも肝線維化の進んだ症例が見られた。例えば、肝生検症例の中において、肝細胞癌発症例（表 8 症例 1）では、糖尿病罹病期間は 1 年に満たないにもかかわらず、線維化ステージは 3 と進行していた。一般的に糖尿病発症前よりインスリン抵抗性を認めることが多いため、インスリン抵抗性発症時点から肝線維化が徐々に始まり、糖尿病発症時点では既に肝線維化が進行していた可能性が推測された。なお、糖尿病罹患期間や糖尿病合併症に関しては、De Ledinghen ら[34]の報告では、肝弾性度高値が、網膜症のないことと、糖尿病足病変の既往と関連していたとされる一方で、Kwok ら[35]の報告では、長い糖尿病罹病期間、尿アルブミン／クレアチニン比高値と関連していたとされ、未だにコンセンサスが得られておらず、今後も引き続き検討が必要であろう。

経皮的肝生検症例においては、肝弾性度は肝線維化をやや overestimate する傾向にあった。これは、肝弾性度は線維化だけで規定されているとは言えず、壊死や炎症反応にも影響を受けうる[49]ことが関係しているかもしれない。

肝線維化を評価するための他の非侵襲的な方法として、APRI（aspartate to platelet ratio index）や FIB4（Fibrosis-4 Score）等の計算式から算出する方法が挙げられる。肝弾性度測定、APRI、FIB4 の中で肝線維化を最も正確に予測するの

がどの方法であるかに関しては、結論は出ていない[50]が、いずれも肝線維化を評価する代表的な方法であり、本研究では FibroScan®による肝弾性度測定を用いた。

肝弾性度に関して、既報では、線維化ステージ 2 以上に相当するカットオフ値が海外では 7.0 kPa[27]、日本では 6.8 kPa[51]と報告されており、本研究では 7.0 kPa を用いた。このカットオフ値は、進行した線維化のみを拾い上げるものではないが、有意な線維化を予測する指標となりうる。本研究の対象患者においては、2 型糖尿病患者の 22.1％が、有意な線維化を示唆する 7.0 kPa 以上の肝弾性度を示した。肝線維化を有する糖尿病患者の予後は未だ解明されていない点が多く、本研究の患者を継続してフォローすることにより、予後の解明が期待される。

これまでにチアゾリジン誘導体が NASH の組織学的所見を改善したり[52]、メトホルミンの継続が肝硬変患者の予後を改善したりする[53]という報告があり、このようなインスリン抵抗性改善薬の有効性が検討されている[52-54]。しかし、NAFLD 患者における薬物治療の介入研究は限られており、実臨床において NAFLD を有する糖尿病患者の予後を改善するためにいかに介入していくべきかが今後の検討課題となる。

本研究では、2 型糖尿病における肝線維化にインスリン抵抗性が関与していることが示唆された。しかしながら、以下に述べるような Limitation が存在する。第一に、生検例が少なく、肝弾性度のみの評価を行っている症例が大多数である。第二に、Population based study ではなく、肝弾性度・肝脂肪蓄積度測定に同意した糖尿病コントロール不良例を対象にしており、選択バイアスが生じている可能性がある。第三に、本研究ではインスリン抵抗性の評価として HOMA-IR を使用している。インスリン抵抗性の正確な評価のためにはグルコースクランプ法が用いられる。HOMA-IR はグルコースクランプ検査の結果とよく相関する [55, 56]が、インスリン使用例では信頼性が低い。また、空腹時血糖 140 mg/dL 以上の症例においてグルコースクランプ法との相関が低下すると考えられている。しかし、本研究ではグルコースクランプ法をルーティーンに測定することは不可能であったため、インスリン未使用例においては、空腹時血糖 140 mg/dL 以上の症例においても HOMA-IR を用いた。第四に、本研究では肝脂肪蓄積度と肝弾性度は約 10%程度の症例で測定不能であった。本研究では FibroScan®の M プローブのみを用いたが、肥満例での測定により適しているとされる XL プローブ[57]を用いれば、測定不能症例の割合が減少した可能性がある。

結論として、血糖コントロール不良例の中には、肝線維化の進行した症例

が含まれていることが示唆された。インスリン抵抗性が高い症例、血小板低値や GGT 高値を満たす症例では、肝線維化が進行している可能性があり、肝線維化のスクリーニングの対象となりうる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学消化器内科小池和彦教授に謹んで御礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたり以下の先生方に特に多大なるご協力を賜りましたことを以下に記し、深く感謝申し上げます。

東京大学　糖尿病・代謝内科

笹子　敬洋先生、門脇　孝教授、植木　浩二郎先生、山内　敏正先生

東京大学　病理学教室

深山　正久教授、柴原　純二先生

最後に本研究は東京大学消化器内科の皆様のご支援とご協力の賜物であります。皆様に深く御礼を申し上げたく存じます。本当に有難うございました。

参考文献

[1] 堀田饒，中村二郎，岩本安彦，大野良之，春日雅人，吉川隆一，and 豊田隆謙，“アンケート調査による日本人糖尿病の死因 —1991～2000 年の 10 年間，18.385 名での検討—,” *糖尿病,* vol. 50(1), pp. 47～61, 2006.

[2] 春日雅人，植木浩二郎，田嶼尚子，野田光彦，大橋健，能登洋，後藤温，小川渉，堺隆一，津金昌一郎，浜島信之，中釜斉，田島和雄，宮園浩平，and 今井浩三，“糖尿病と癌に関する委員会報告,” *糖尿病,* vol. 56(6), pp. 374～390, 2013.

[3] H. B. El-Serag, T. Tran, and J. E. Everhart, “Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma,” *Gastroenterology,* vol. 126, no. 2, pp. 460-8, Feb, 2004.

[4] E. Giovannucci, D. M. Harlan, M. C. Archer, R. M. Bergenstal, S. M. Gapstur, L. A. Habel, M. Pollak, J. G. Regensteiner, and D. Yee, “Diabetes and cancer: a consensus report,” *Diabetes Care,* vol. 33, no. 7, pp. 1674-85, Jul, 2010.

[5] V. W. Setiawan, B. Y. Hernandez, S. C. Lu, D. O. Stram, L. R. Wilkens, L. Le Marchand, and B. E. Henderson, “Diabetes and racial/ethnic differences in hepatocellular carcinoma risk: the multiethnic cohort,” *J Natl Cancer Inst,* vol. 106, no. 12, Dec, 2014.

[6] C. Wang, X. Wang, G. Gong, Q. Ben, W. Qiu, Y. Chen, G. Li, and L. Wang, “Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies,” *Int J Cancer,* vol. 130, no. 7, pp. 1639-48, Apr 1, 2012.

[7] R. M. Williamson, J. F. Price, S. Glancy, E. Perry, L. D. Nee, P. C. Hayes, B. M. Frier, L. A. Van Look, G. I. Johnston, R. M. Reynolds, M. W. Strachan, and I. Edinburgh Type 2 Diabetes Study, “Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study,” *Diabetes Care,* vol. 34, no. 5, pp. 1139-44, May, 2011.

[8] G. Targher, L. Bertolini, R. Padovani, S. Rodella, R. Tessari, L. Zenari, C. Day, and G. Arcaro, “Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic

patients," *Diabetes Care,* vol. 30, no. 5, pp. 1212-8, May, 2007.

[9] M. Lazo, R. Hernaez, M. S. Eberhardt, S. Bonekamp, I. Kamel, E. Guallar, A. Koteish, F. L. Brancati, and J. M. Clark, "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994," *Am J Epidemiol,* vol. 178, no. 1, pp. 38-45, Jul 1, 2013.

[10] P. Angulo, J. C. Keach, K. P. Batts, and K. D. Lindor, "Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis," *Hepatology,* vol. 30, no. 6, pp. 1356-62, Dec, 1999.

[11] P. Angulo, "Nonalcoholic fatty liver disease," *N Engl J Med,* vol. 346, no. 16, pp. 1221-31, Apr 18, 2002.

[12] E. M. Koehler, E. P. Plompen, J. N. Schouten, B. E. Hansen, S. Darwish Murad, P. Taimr, F. W. Leebeek, A. Hofman, B. H. Stricker, L. Castera, and H. L. Janssen, "Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study," *Hepatology*, Jul 14, 2015.

[13] Q. M. Anstee, G. Targher, and C. P. Day, "Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis," *Nat Rev Gastroenterol Hepatol,* vol. 10, no. 6, pp. 330-44, Jun, 2013.

[14] G. Marchesini, E. Bugianesi, G. Forlani, F. Cerrelli, M. Lenzi, R. Manini, S. Natale, E. Vanni, N. Villanova, N. Melchionda, and M. Rizzetto, "Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome," *Hepatology,* vol. 37, no. 4, pp. 917-23, Apr, 2003.

[15] P. Angulo, D. E. Kleiner, S. Dam-Larsen, L. A. Adams, E. S. Bjornsson, P. Charatcharoenwitthaya, P. R. Mills, J. C. Keach, H. D. Lafferty, A. Stahler, S. Haflidadottir, and F. Bendtsen, "Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *Gastroenterology,* vol. 149, no. 2, pp. 389-97 e10, Aug, 2015.

[16] Z. M. Younossi, M. Stepanova, N. Rafiq, H. Makhlouf, Z. Younoszai, R. Agrawal, and Z. Goodman, "Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality," *Hepatology,* vol. 53, no. 6, pp. 1874-82, Jun,

2011.

[17] A. A. Bravo, S. G. Sheth, and S. Chopra, "Liver biopsy," *N Engl J Med,* vol. 344, no. 7, pp. 495-500, Feb 15, 2001.

[18] V. Ratziu, F. Charlotte, A. Heurtier, S. Gombert, P. Giral, E. Bruckert, A. Grimaldi, F. Capron, T. Poynard, and L. S. Group, "Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease," *Gastroenterology,* vol. 128, no. 7, pp. 1898-906, Jun, 2005.

[19] A. Regev, M. Berho, L. J. Jeffers, C. Milikowski, E. G. Molina, N. T. Pyrsopoulos, Z. Z. Feng, K. R. Reddy, and E. R. Schiff, "Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection," *Am J Gastroenterol,* vol. 97, no. 10, pp. 2614-8, Oct, 2002.

[20] L. Sandrin, B. Fourquet, J. M. Hasquenoph, S. Yon, C. Fournier, F. Mal, C. Christidis, M. Ziol, B. Poulet, F. Kazemi, M. Beaugrand, and R. Palau, "Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis," *Ultrasound Med Biol,* vol. 29, no. 12, pp. 1705-13, Dec, 2003.

[21] M. Ziol, A. Handra-Luca, A. Kettaneh, C. Christidis, F. Mal, F. Kazemi, V. de Ledinghen, P. Marcellin, D. Dhumeaux, J. C. Trinchet, and M. Beaugrand, "Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C," *Hepatology,* vol. 41, no. 1, pp. 48-54, Jan, 2005.

[22] L. Castera, J. Vergniol, J. Foucher, B. Le Bail, E. Chanteloup, M. Haaser, M. Darriet, P. Couzigou, and V. De Ledinghen, "Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C," *Gastroenterology,* vol. 128, no. 2, pp. 343-50, Feb, 2005.

[23] L. Castera, X. Forns, and A. Alberti, "Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography," *J Hepatol,* vol. 48, no. 5, pp. 835-47, May, 2008.

[24] R. Masuzaki, R. Tateishi, H. Yoshida, E. Goto, T. Sato, T. Ohki, J. Imamura, T. Goto, F. Kanai, N. Kato, H. Ikeda, S. Shiina, T. Kawabe, and M. Omata, "Prospective risk assessment for hepatocellular

carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography," *Hepatology,* vol. 49, no. 6, pp. 1954-61, Jun, 2009.

[25] S. P. Casey, W. W. Kemp, C. A. McLean, D. J. Topliss, L. A. Adams, and S. K. Roberts, "A prospective evaluation of the role of transient elastography for the detection of hepatic fibrosis in type 2 diabetes without overt liver disease," *Scand J Gastroenterol,* vol. 47, no. 7, pp. 836-41, Jul, 2012.

[26] E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, and B. R. Bacon, "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions," *Am J Gastroenterol,* vol. 94, no. 9, pp. 2467-74, Sep, 1999.

[27] V. W. Wong, J. Vergniol, G. L. Wong, J. Foucher, H. L. Chan, B. Le Bail, P. C. Choi, M. Kowo, A. W. Chan, W. Merrouche, J. J. Sung, and V. de Ledinghen, "Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease," *Hepatology,* vol. 51, no. 2, pp. 454-62, Feb, 2010.

[28] M. Sasso, M. Beaugrand, V. de Ledinghen, C. Douvin, P. Marcellin, R. Poupon, L. Sandrin, and V. Miette, "Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes," *Ultrasound Med Biol,* vol. 36, no. 11, pp. 1825-35, Nov, 2010.

[29] M. Sasso, I. Tengher-Barna, M. Ziol, V. Miette, C. Fournier, L. Sandrin, R. Poupon, A. C. Cardoso, P. Marcellin, C. Douvin, V. de Ledinghen, J. C. Trinchet, and M. Beaugrand, "Novel controlled attenuation parameter for noninvasive assessment of steatosis using Fibroscan((R)): validation in chronic hepatitis C," *J Viral Hepat,* vol. 19, no. 4, pp. 244-53, Apr, 2012.

[30] V. de Ledinghen, J. Vergniol, J. Foucher, W. Merrouche, and B. le Bail, "Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography," *Liver Int,* vol. 32, no. 6, pp. 911-8, Jul, 2012.

[31] R. P. Myers, A. Pollett, R. Kirsch, G. Pomier-Layrargues, M. Beaton, M. Levstik, A. Duarte-Rojo, D. Wong, P. Crotty, and M. Elkashab, "Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography," *Liver Int,* vol. 32, no. 6, pp. 902-10, Jul, 2012.

[32] V. de Ledinghen, J. Vergniol, M. Capdepont, F. Chermak, J. B. Hiriart, C. Cassinotto, W. Merrouche, J. Foucher, and B. Brigitte le, "Controlled attenuation parameter (CAP) for the diagnosis of steatosis: a prospective study of 5323 examinations," *J Hepatol,* vol. 60, no. 5, pp. 1026-31, May, 2014.

[33] K. Masaki, S. Takaki, H. Hyogo, T. Kobayashi, T. Fukuhara, N. Naeshiro, Y. Honda, T. Nakahara, A. Ohno, D. Miyaki, E. Murakami, Y. Nagaoki, T. Kawaoka, M. Tsuge, N. Hiraga, A. Hiramatsu, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, H. Ochi, S. Takahashi, K. Arihiro, and K. Chayama, "Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases," *Hepatol Res,* vol. 43, no. 11, pp. 1182-9, Nov, 2013.

[34] V. de Ledinghen, J. Vergniol, C. Gonzalez, J. Foucher, E. Maury, L. Chemineau, S. Villars, H. Gin, and V. Rigalleau, "Screening for liver fibrosis by using FibroScan((R)) and FibroTest in patients with diabetes," *Dig Liver Dis,* vol. 44, no. 5, pp. 413-8, May, 2012.

[35] R. Kwok, K. C. Choi, G. L. Wong, Y. Zhang, H. L. Chan, A. O. Luk, S. S. Shu, A. W. Chan, M. W. Yeung, J. C. Chan, A. P. Kong, and V. W. Wong, "Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study," *Gut*, Apr 14, 2015.

[36] A. Sobhonslidsuk, A. Pulsombat, P. Kaewdoung, and S. Petraksa, "Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and significant hepatic fibrosis defined by non-invasive assessment in patients with type 2 diabetes," *Asian Pac J Cancer Prev,* vol. 16, no. 5, pp. 1789-94, 2015.

[37] D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner, "Homeostasis model assessment: insulin

resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man," *Diabetologia,* vol. 28, no. 7, pp. 412-9, Jul, 1985.

[38] B. A. Neuschwander-Tetri, and S. H. Caldwell, "Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference," *Hepatology,* vol. 37, no. 5, pp. 1202-19, May, 2003.

[39] J. Boursier, J. P. Zarski, V. de Ledinghen, M. C. Rousselet, N. Sturm, B. Lebail, I. Fouchard-Hubert, Y. Gallois, F. Oberti, S. Bertrais, P. Cales, and A. H. C. E. P. F. S. Multicentric Group from, "Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography," *Hepatology,* vol. 57, no. 3, pp. 1182-91, Mar, 2013.

[40] D. E. Kleiner, E. M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M. J. Contos, O. W. Cummings, L. D. Ferrell, Y. C. Liu, M. S. Torbenson, A. Unalp-Arida, M. Yeh, A. J. McCullough, A. J. Sanyal, and N. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease," *Hepatology,* vol. 41, no. 6, pp. 1313-21, Jun, 2005.

[41] S. Saadeh, Z. M. Younossi, E. M. Remer, T. Gramlich, J. P. Ong, M. Hurley, K. D. Mullen, J. N. Cooper, and M. J. Sheridan, "The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease," *Gastroenterology,* vol. 123, no. 3, pp. 745-50, Sep, 2002.

[42] C. P. Day, and O. F. James, "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?," *Gastroenterology,* vol. 114, no. 4, pp. 842-5, Apr, 1998.

[43] D. H. Lee, R. Blomhoff, and D. R. Jacobs, Jr., "Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress?," *Free Radic Res,* vol. 38, no. 6, pp. 535-9, Jun, 2004.

[44] M. Irie, T. Sohda, K. Iwata, H. Kunimoto, A. Fukunaga, S. Kuno, K. Yotsumoto, K. Sakurai, H. Iwashita, G. Hirano, S. I. Ueda, K. Yokoyama, D. Morihara, S. Nishizawa, A. Anan, Y. Takeyama, M. Sakamoto, S. Shakado, and S. Sakisaka, "Levels of the oxidative stress marker gamma-glutamyltranspeptidase at different stages of nonalcoholic fatty liver disease," *J Int Med Res,* vol. 40, no. 3, pp. 924-33, 2012.

[45] E. Ruttmann, L. J. Brant, H. Concin, G. Diem, K. Rapp, H. Ulmer, M. Vorarlberg Health, and G. Promotion Program Study, "Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults," *Circulation,* vol. 112, no. 14, pp. 2130-7, Oct 4, 2005.

[46] J. R. Morling, J. A. Fallowfield, R. M. Williamson, C. M. Robertson, S. Glancy, I. N. Guha, M. W. Strachan, and J. F. Price, "gamma-Glutamyltransferase, but not markers of hepatic fibrosis, is associated with cardiovascular disease in older people with type 2 diabetes mellitus: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study," *Diabetologia,* vol. 58, no. 7, pp. 1484-93, Jul, 2015.

[47] P. Andre, B. Balkau, S. Vol, M. A. Charles, E. Eschwege, and D. S. Group, "Gamma-glutamyltransferase activity and development of the metabolic syndrome (International Diabetes Federation Definition) in middle-aged men and women: Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) cohort," *Diabetes Care,* vol. 30, no. 9, pp. 2355-61, Sep, 2007.

[48] N. Nakanishi, K. Suzuki, and K. Tatara, "Serum gamma-glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men," *Diabetes Care,* vol. 27, no. 6, pp. 1427-32, Jun, 2004.

[49] A. Sagir, A. Erhardt, M. Schmitt, and D. Haussinger, "Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage," *Hepatology,* vol. 47, no. 2, pp. 592-5, Feb, 2008.

[50] J. R. Morling, J. A. Fallowfield, I. N. Guha, L. D. Nee, S. Glancy, R. M. Williamson, C. M. Robertson, M. W. Strachan, J. F. Price, and i. Edinburgh Type 2 Diabetes Study, "Using non-invasive biomarkers to identify hepatic fibrosis in people with type 2 diabetes mellitus: the Edinburgh type 2 diabetes study," *J Hepatol,* vol. 60, no. 2, pp. 384-91, Feb, 2014.

[51] M. Yoneda, M. Yoneda, H. Mawatari, K. Fujita, H. Endo, H. Iida, Y. Nozaki, K. Yonemitsu, T. Higurashi, H. Takahashi, N. Kobayashi, H.

Kirikoshi, Y. Abe, M. Inamori, K. Kubota, S. Saito, M. Tamano, H. Hiraishi, S. Maeyama, N. Yamaguchi, S. Togo, and A. Nakajima, "Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)," *Dig Liver Dis,* vol. 40, no. 5, pp. 371-8, May, 2008.

[52] A. J. Sanyal, N. Chalasani, K. V. Kowdley, A. McCullough, A. M. Diehl, N. M. Bass, B. A. Neuschwander-Tetri, J. E. Lavine, J. Tonascia, A. Unalp, M. Van Natta, J. Clark, E. M. Brunt, D. E. Kleiner, J. H. Hoofnagle, P. R. Robuck, and C. R. N. Nash, "Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis," *N Engl J Med,* vol. 362, no. 18, pp. 1675-85, May 6, 2010.

[53] X. Zhang, W. S. Harmsen, T. A. Mettler, W. R. Kim, R. O. Roberts, T. M. Therneau, L. R. Roberts, and R. Chaiteerakij, "Continuation of metformin use after a diagnosis of cirrhosis significantly improves survival of patients with diabetes," *Hepatology,* vol. 60, no. 6, pp. 2008-16, Dec, 2014.

[54] S. Singh, R. Khera, A. M. Allen, M. H. Murad, and R. Loomba, "Comparative effectiveness of pharmacological interventions for nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and network meta-analysis," *Hepatology,* vol. 62, no. 5, pp. 1417-32, Nov, 2015.

[55] E. Bonora, G. Targher, M. Alberiche, R. C. Bonadonna, F. Saggiani, M. B. Zenere, T. Monauni, and M. Muggeo, "Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity," *Diabetes Care,* vol. 23, no. 1, pp. 57-63, Jan, 2000.

[56] M. Emoto, Y. Nishizawa, K. Maekawa, Y. Hiura, H. Kanda, T. Kawagishi, T. Shoji, Y. Okuno, and H. Morii, "Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas," *Diabetes Care,* vol. 22, no. 5, pp. 818-22, May, 1999.

[57] V. de Ledinghen, V. W. Wong, J. Vergniol, G. L. Wong, J. Foucher, S. H. Chu, B. Le Bail, P. C. Choi, F. Chermak, K. K. Yiu, W. Merrouche, and

H. L. Chan, "Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: comparison between M and XL probe of FibroScan(R)," *J Hepatol,* vol. 56, no. 4, pp. 833-9, Apr, 2012.