

# 非アルコール性脂肪肝炎モデルラットにおける NAFLD activity scoreとFLIPアルゴリズムによる 組織学的評価の比較検討

福田歩美<sup>1)</sup>・駿河和仁<sup>1)</sup>・古場一哲<sup>1)</sup>・清水真祐子<sup>2)</sup>・常山幸一<sup>2)</sup>・大曲勝久<sup>1)</sup>

Comparison of the Histopathological Evaluation by NAFLD Activity  
Score and FLIP Algorithm in Rat Model for Nonalcoholic Steatohepatitis

Ayumi FUKUDA<sup>1)</sup>, Kazuhito SURUGA<sup>1)</sup>, Kazunori KOBAYASHI<sup>1)</sup>,  
Mayuko ICHIMURA-SHIMIZU<sup>2)</sup>, Koichi TSUNEYAMA<sup>2)</sup>,  
and Katsuhisa OMAGARI<sup>1)</sup>

## 要 約

2013年度から2018年度に長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科臨床栄養学研究室で行った雄性Sprague-Dawleyラットを用いた飼育実験のうち、高脂肪・高コレステロール食を9週間あるいは18週間摂取させ、肝臓の組織学的検討を行った70匹を対象として、NAFLD activity score (NAS) およびFLIP (fatty liver inhibition of progression) アルゴリズムにより非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の判定を行った。その結果、両基準によるNASHの割合に有意な差は認められなかった (87.1% vs. 80.0%)。両基準ともにNASHと判定されたラットは52匹 (74.3%)、NASHでないと判定されたラットは1匹 (1.4%)であった。一方、約25%のラットは両基準でのNASHの判定結果が異なっており、その主な要因は肝臓に沈着する脂肪滴の大きさや肝細胞の風船様腫大の判定結果の違いであった。未だ完璧なNASHの病理診断基準がない現状においては、それぞれの判定基準の特徴をよく理解した上で検討を続けていくことが重要であるとのおもわれる。

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎、ラットモデル、肝組織像、NASスコア、FLIPアルゴリズム

---

所 属：

1) 長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻

2) 徳島大学大学院医歯薬学研究部疾患病理学分野

1) Division of Nutritional Sciences, Graduate School of Human Health Sciences, University of Nagasaki

2) Department of Pathology and Laboratory Medicine, Tokushima University Graduate School

## 緒言

これまで慢性肝疾患の主な原因であったB型やC型肝炎ウイルスは近年の抗ウイルス薬の進歩により克服されつつあり、一方で、全世界的な肥満や生活習慣病患者の増加に伴って、メタボリック症候群の肝臓での表現型と考えられる非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) の患者数が増加している。NAFLDは飲酒歴がなく(エタノール換算で男性30g/日、女性20g/日未満)、ウイルス性肝炎などの原因が明らかなものを除外した脂肪沈着を伴う肝疾患の総称であり、病理組織学的に大滴性の肝脂肪変性に加えて、炎症や肝細胞障害(風船様腫大)、肝線維化がみられ、肝硬変や肝臓に進行し得る非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis : NASH)と、病態の進行がみられない非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver : NAFL)に大別される<sup>1,2)</sup>。

NAFLおよびNASHを診断するには、非侵襲的なFIB-4インデックス(年齢や血清AST、ALT値、末梢血血小板数を基に計算する)などの簡易スコアや、超音波検査やMRIによる肝弾性度測定などが開発されつつあるが、その確定診断は上記の肝組織所見によってなされ、他の肝疾患の除外や肝病変の重症度の把握ができるため治療方針の決定に有効な手段である<sup>1,3)</sup>。しかし、肝生検による肝組織の採取は侵襲的であり、また、採取される組織の体積は肝臓全体の約1/500,000のみであり、肝臓は均一に傷害がみられるわけではないため組織の採取部位によっては評価にばらつきが生じる可能性がある。さらに、診断経験の異なるさまざまな病理学者によって評価が行われることにより再現性が確保できない場合もあるため、診断の標準化が重要である<sup>4)</sup>。これまでに次のような代表的な病理診断基準が提唱され世界的に活用されている。Matteoniらは、Type 1(脂肪沈着のみ)、Type 2(脂肪沈着+小葉内炎症)、Type 3(脂肪沈着+風船様腫大)、Type 4(Type 3+マロリー・デンク体または線維化)の4つのTypeに分け、Type 1とType 2をNAFL、Type 3とType 4をNASHとした。この分類は定義が比較的明確で理解しやすく予後(肝疾患関連死)との関連も認められるが、NAFLかNASHに分類する

のみでNASHの重症度は反映されていない。また、肝細胞の風船様腫大の評価に明確な基準がないため、診断医の主観が入り込む余地が大きい問題がある<sup>5)</sup>。Bruntらは、脂肪化、肝細胞の風船様腫大、肝小葉内および門脈域の炎症細胞浸潤の重症度からGradingし、Grade 1(mild)、Grade 2(moderate)、Grade 3(severe)に分類し、さらに、線維化の局在とその程度からStagingし、Stage 0からStage 4に分類した。しかし、線維化の評価基準は成人を対象としており、線維化が門脈域から始まることが報告されている小児や超肥満成人の場合は評価が困難であること、NASHの重症度のみでの分類であること、また、Gradingに脂肪変性と風船様変性、炎症細胞浸潤が合わせて判断されるため、これら個々の所見が反映しづらいことなどの問題点がある<sup>6)</sup>。KleinerらはBruntらの分類を基本として、NAFLDのすべての病態に対応する分類をスコアリングシステムとして提唱した。このシステムではGradingをNAFLD activity score(NAS)とし、NASは脂肪化、肝細胞の風船様腫大および小葉内炎症をそれぞれスコア化し、3項目の合計点が8点中5点以上をNASHとした。線維化のstagingはBruntらの分類とほとんど同様であるが、stage 1がさらに細分化されている。しかし、NASHにおける線維化は肝硬変への進行を予測するのに重要な因子であるとされているのに、NASの評価項目に線維化は含まれていない。また、NASHと非NASHの診断のあいだにNASの合計3~4点の境界域(判定保留: borderline)が設けられている<sup>7)</sup>。2012年、Bedossaらは非NAFLD、NAFL、NASHの3つを区別(診断)するFLIP(fatty liver inhibition of progression)アルゴリズムを提唱した。さらに、脂肪化(steatosis)、肝細胞の風船様腫大と小葉内炎症からなる活動性(activity)、線維化(fibrosis)のそれぞれの所見を評価し、病理診断に付記するSAFスコアを提唱した。FLIPアルゴリズムはSAFスコアで得られた脂肪化と活動性の評価からNAFLDとNASHに分類するものであり、脂肪化(大滴性あるいは中滴性)が認められることがNAFLDの必須条件となり、そのうち肝細胞の風船様腫大と小葉内炎症の両方の存在が認められるとNASHと判定される。病理学者によって評価結果にばらつきが生じやすい肝細胞の風船様腫大や小葉内炎症に関して

定義が具体的にされているため高い再現性が期待できるものの、その後の少数例での検討では (n=139, 平均観察期間:25.3年)、SAFスコアはNAFLD患者の予後と相関しないことが報告されている<sup>8-10)</sup>。このように、完璧なNASHの病理診断基準は未だないのが現状である。

長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科臨床栄養学研究室（以下、本研究室）では、9週齢雄性Sprague-Dawley (SD) ラットにコール酸を添加した高脂肪・高コレステロール (high-fat, high-cholesterol; HFC) 食を9週間あるいは18週間与えることにより、肝線維化をとまなうNASHの動物モデルを確立した<sup>11-13)</sup>。このモデルにおいては65匹中56匹 (86.2%) が組織学的にNASHと診断されたことを報告しているが、その際KleinerらのNASを診断根拠とした<sup>7,14)</sup>。本研究では、このNASHモデルをFLIPアルゴリズムで再評価し、NASと比較することでこれらのスコアリングシステムの有効性や問題点を検討した<sup>7-9)</sup>。

## 対象と方法

### 1. 対象

本研究室において2013年度から2018年度に行ったSDラットを用いた飼育実験のうち、HFC食を摂取させ、肝臓の組織学的検討を行った70匹 (全て雄性) を対象とした。なお、全ての実験は「長崎県立大学動物実験規程」および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成18年4月28日環境省告示第88号)」に則して長崎県立大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号: 24-39,25-29,26-26,27-14,28-13,29-14)。

### 2. 動物モデル

8週齢雄性SDラットを日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入した。飼育開始より1週間は順化のため全てのラットに脂肪エネルギー比12.8%の普通食 (MF飼料、オリエンタル酵母工業、東京) を与えた。順化後、全てのラットにコレステロール1.25%あるいは2.5%を含むHFC食 (オリエンタル酵母工業) を自由摂食させ、9週間または18週間飼育した。70匹中、5匹はコレステロール1.25%、コール酸0%を含む餌 (HFC1.25-0飼料) を9週間、5匹はコレステロー

ル1.25%、コール酸0.1%を含む餌 (HFC1.25-0.1飼料) を9週間、24匹はコレステロール1.25%、コール酸0.5%を含む餌 (HFC1.25-0.5飼料) を9週間、10匹はコレステロール1.25%、コール酸2%を含む餌 (HFC1.25-2飼料) を9週間、6匹はHFC1.25-2飼料を18週間、14匹はコレステロール2.5%、コール酸2%を含む餌 (HFC2.5-2飼料) を9週間、6匹はHFC2.5-2飼料を18週間与えた。それぞれの飼料の組成およびエネルギーを表1に示す。全てのラットは温度22~24℃、湿度50~60%、8時~20時は明期、20時~8時は暗期サイクルに設定された室内で飼育し、餌と水は自由摂食とした。

表1. 飼料の組成 (100gあたり)

成分 \ 飼料	HFC1.25-0	HFC1.25-0.1	HFC1.25-0.5	HFC1.25-2	HFC2.5-2
水分 (g)	5.53	5.52	5.49	5.37	5.37
粗タンパク質 (g)	16.17	16.15	16.05	15.71	15.71
粗脂肪 (g)	3.57	3.56	3.54	3.47	3.47
粗灰分 (g)	4.06	4.05	4.03	3.94	3.94
粗繊維 (g)	1.96	1.96	1.95	1.90	1.90
可溶性無窒素物 (g)	38.71	38.65	38.43	37.60	37.60
バーム油 (g)	28.75	28.75	28.75	28.75	27.50
コレステロール (g)	1.25	1.25	1.25	1.25	2.50
コール酸 (g)	0.00	0.10	0.50	2.00	2.00
計 (g)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
タンパク質エネルギー比 (%)	12.67	12.66	12.63	12.49	12.77
脂質エネルギー比 (%)	56.99	57.02	57.15	57.62	56.65
炭水化物エネルギー比 (%)	30.34	30.32	30.23	29.89	30.57
エネルギー (kcal)	510.40	510.04	508.60	503.21	491.96

HFC: high-fat, high-cholesterol diet (高脂肪・高コレステロール食)

### 3. 肝病理組織学的検討

18週齢 (68匹) あるいは27週齢ラット (12匹) を屠殺前に6時間以上絶食させた後、ソムノペンチルを腹腔内に投与し、体動消失を確認後開腹処理を行い、肝臓を摘出し、組織の一部 (約5g) を10%ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋後、パラフィンブロックをマイクロトームで4μmの厚さに薄切し、脱パラフィン処理後ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびAzan染色をおこない、顕微鏡下で病理組織学的評価をおこなった。肝臓の組織学的評価は、Kleinerらが提唱したNASH Clinical Research Network Scoring SystemおよびBedossaらが提唱したFLIPアルゴリズムの基準に従ってスコア化した<sup>7-9)</sup>。Kleinerらの基準では、NASHに特徴的な組織所見であるsteatosis (脂肪化: 0~3の4段階)、lobular inflammation (小葉内炎症: 0~3の4段階)、hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大: 0~2の3段階) を表2に示す分



類に従ってスコア化し、これら3項目の合計を NAFLD activity score (NAS) とし、合計点数 8 点中、0～2 点は「NASHでない」、3～4 点は「判定保留」、5 点以上は「NASH」と判定した。また、今回の検討においては、fibrosis (線維化: 0～4) の評価の際、スコア 0 と 1 のあいだにあると判断したものをスコア 0.5、2 と 3 のあいだにあると判断したものをスコア 2.5、3 と 4 のあいだにあると判断したものをスコア 3.5 と判定した。FLIP アルゴリズムにおいては、steatosis (脂肪化: 0～3 の 4 段階)、lobular inflammation (小葉内炎症: 0～2 の 3 段階)、hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大: 0～2 の 3 段階)、fibrosis (線維化: 0～4) を表 3 に示す SAF スコアに従って評価した。今回の検討においては、肝細胞の風船様腫大の評価の際、スコア 1 と 2 のあいだにあると判断したものをスコア 1.5 と判定した。この結果を基に表 4 のアルゴリズムを用いて「no-steatosis (NAFLD でない)」、「steatosis (NAFL)」、「NASH」に分類した。

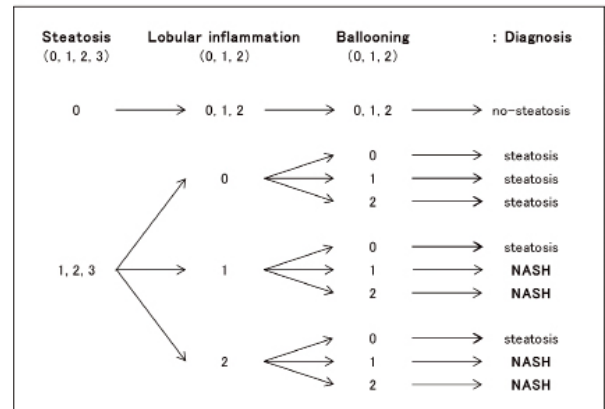
表 2. NASH Clinical Research Network Scoring System<sup>7)</sup>

Item	Definition	Score/Code	
NAFLD activity score (NAS)	Steatosis	Low-to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
		<5%	0
		5%-33%	1
		>33%-66%	2
	>66%	3	
	Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci	
		No foci	0
		>2 foci per 200x field	1
		2-4 foci per 200x field	2
>4 foci per 200x field	3		
Hepatocytes ballooning	None	0	
	Few balloon cells	1	
	Many cells/prominent ballooning	2	
		Full Score: 8	
Fibrosis	None	0	
	Perisinusoidal or periportal	1	
	Mild, zone3, perisinusoidal	1A	
	Moderate, zone3, perisinusoidal	1B	
	Portal/periportal	1C	
	Perisinusoidal and portal/periportal	2	
	Bridging fibrosis	3	
Cirrhosis	4		

表 3. SAF スコア<sup>8)</sup>

Item	Definition	Score	
Steatosis	Quantities of large or medium-sized lipid droplets	0	
	<5%	1	
	>33%-66%	2	
	>66%	3	
Activity	Lobular inflammation	None	0
		≤2 foci per 20x field	1
	>2 foci per 20x field	2	
	Hepatocytes ballooning	Normal hepatocytes with cuboidal shape and pink eosinophilic cytoplasm	0
Presence of clusters of hepatocytes with a rounded shape and pale cytoplasm, usually reticulated, size is similar to that of normal hepatocytes		1	
	Same as for grade 1 with some enlarged hepatocytes, at least 2-fold that of normal cells	2	
Fibrosis	None	0	
	Perisinusoidal or periportal	1	
	Mild, zone3, perisinusoidal	1A	
	Moderate, zone3, perisinusoidal	1B	
	Portal/periportal	1C	
	Perisinusoidal and portal/periportal	2	
	Bridging fibrosis	3	
Cirrhosis	4		

表 4. FLIP アルゴリズム<sup>9)</sup>



#### 4. 統計処理

統計学的検討は統計解析ソフト IBM SPSS statistical package version 25 (IBM, Chicago, IL, USA) を用いてカイ二乗検定を行い、危険率 5% 未満 (p<0.05) をもって統計学的に有意差があるとみなした。

### 結果

#### 1. 肝病理組織学的評価

HE 染色および Azan 染色による組織像の代表例を図 1 に示す。Kleiner らの基準<sup>7)</sup> では、脂肪化スコア 0 のラットはみられず、スコア 1 は 1 匹 (1.4%)、スコア 2 は 8 匹 (11.4%)、スコア 3 は 61 匹 (87.1%) にみられた。小葉内炎症はスコア 0 のラットはみられず、スコア 1 は 8 匹 (11.4%)、スコア 2 は 34 匹 (48.6%)、スコア 3 は 28 匹 (40.0%) にみられた。肝細胞の風船様腫大ではスコア 0 は 32 匹 (45.7%)、スコア 1 は 17 匹 (24.3%)、スコア 2 は 21 匹 (30.0%) にみられた。これら 3 項目を合計した NAS は、スコア 0～1 のラットはみられず、スコア 2 は 1 匹 (1.4%)、スコア 3 は 4 匹 (5.7%)、スコア 4 は 4 匹 (5.7%)、スコア 5 は 18 匹 (25.7%)、スコア 6 は 15 匹 (21.4%)、スコア 7 は 15 匹 (21.4%)、スコア 8 は 13 匹 (18.6%) にみられた。また、線維化は、スコア 0 は 9 匹 (12.9%)、スコア 0.5 は 9 匹 (12.9%)、

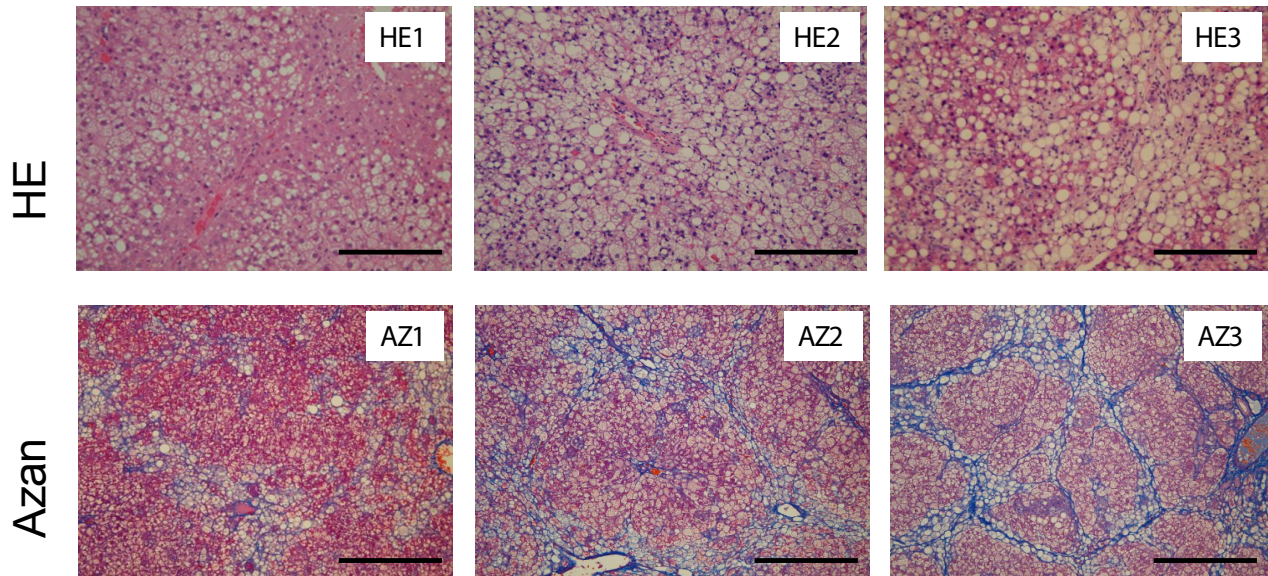
スコア 1 は 13 匹 (18.6%)、スコア 2 は 14 匹 (20.0%)、スコア 2.5 は 1 匹 (1.4%)、スコア 3 は 7 匹 (10.0%)、スコア 3.5 は 4 匹 (5.7%)、スコア 4 は 13 匹 (18.6%) にみられた。一方、SAF スコア<sup>8,9)</sup> による評価では、脂肪化スコア 0 は 11 匹 (15.7%)、スコア 1 は 27 匹 (38.6%)、スコア



2は17匹(24.3%)、スコア3は15匹(21.4%)にみられた。小葉内炎症はスコア0のラットはみられず、スコア1は11匹(15.7%)、スコア2は59匹(84.3%)にみられた。肝細胞の風船様腫大ではスコア0は7匹(10.0%)、スコア1は39匹(55.7%)、スコア1.5は1匹(1.4%)、スコア2は23匹(32.9%)にみられた。線維化はKleinerらの分類と同じであるため同様の結果であった。

## 2. NASとFLIPアルゴリズムによるNASHの判定

NASによりNASHであると判定されたラットは61匹(87.1%)、FLIPアルゴリズムによりNASHであると判定されたラットは56匹(80.0%)であり、両判定基準によるNASHの割合に有意な差は認められなかった( $p=0.254$ )。どちらの基準においてもNASHと判定されたラットは52匹(74.3%)、「NASHでない」ある



1

図1：代表的な肝臓の病理組織像

HE1: Kleinerらの分類では脂肪化スコア=2、小葉内炎症スコア=1、肝細胞の風船様腫大スコア=0でNAS=3点(境界域)、線維化スコア=0。FLIPアルゴリズムでは脂肪化スコア=0(中滴性~大滴性脂肪沈着がみられない)、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=1でno-steatosisと判定される。

HE2: Kleinerらの分類では脂肪化スコア=3、小葉内炎症スコア=3、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNAS=8点(NASHと判定)、線維化スコア=3。FLIPアルゴリズムでは脂肪化スコア=1、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNASHと判定される。

HE3: Kleinerらの分類では脂肪化スコア=3、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNAS=7点(NASHと判定)、線維化スコア=4(肝硬変)。FLIPアルゴリズムでは脂肪化スコア=3、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=1でNASHと判定される。

AZ1: Kleinerらの分類では脂肪化スコア=3、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNAS=7点(NASHと判定)、線維化スコア=2。FLIPアルゴリズムでは脂肪化スコア=2、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNASHと判定される。

AZ2: Kleinerらの分類では脂肪化スコア=3、小葉内炎症スコア=3、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNAS=8点(NASHと判定)、線維化スコア=3。FLIPアルゴリズムでは脂肪化スコア=1、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNASHと判定される。

AZ3: Kleinerらの分類では脂肪化スコア=3、小葉内炎症スコア=3、肝細胞の風船様腫大スコア=2でNAS=8点(NASHと判定)、線維化スコア=4(肝硬変)。FLIPアルゴリズムでは脂肪化スコア=2、小葉内炎症スコア=2、肝細胞の風船様腫大スコア=1でNASHと判定される。

HE染色像の倍率は200倍、目盛り尺は200  $\mu$ m。Azan染色像の倍率は100倍、目盛り尺は400  $\mu$ m。

いは「NAFLDでない」と判定されたラットは1匹(1.4%)であった。一方、NASで「判定保留」とされた8匹のラットのうち4匹はFLIPアルゴリズムで「NAFLDでない」、残りの4匹は「NASH」と判定された。また、NASでNASHとされた8匹のラットのうち6匹はFLIPアルゴリズムで「NAFLDでない」、残りの4匹は「steatosis (NAFL)」と判定された(表5)。

表5. NAFLD activity score (NAS) と FLIPアルゴリズムによる NASHの判定

NASによる評価結果	FLIPアルゴリズムによる評価結果	該当するラット数
NASHでない	no-steatosis	1 (1.4%)
判定保留	no-steatosis	4 (5.7%)
判定保留	NASH	4 (5.7%)
NASH	no-steatosis	6 (8.6%)
NASH	steatosis	3 (4.3%)
NASH	NASH	52 (74.3%)

### 3. NASとFLIPアルゴリズムによる判定の不一致例の検討

NASでは「判定保留」とされFLIPアルゴリズムでは「NAFLDでない」と判定された4匹は、いずれもNASでの脂肪化スコアは2であったがSAFスコアでの脂肪化スコアは0であった。また、線維化は4匹すべてのラットでみられなかった。NASでは「判定保留」とされFLIPアルゴリズムでは「NASH」と判定された4匹は、SAFスコアでの肝細胞の風船様腫大スコアは1あるいは2であったが、NASでは4匹すべてスコア0であった。NASではNASHと判定されたがFLIPアルゴリズムでは「NAFLDでない」と判定された6匹は、いずれもNASでの脂肪化スコアは3であったがSAFスコアでの脂肪化スコアは0であった。NASではNASHと判定されたがFLIPアルゴリズムでは「NASHではなくsteatosis (NAFL)である」と判定された3匹は、NASでもSAFスコアでも肝細胞の風船様腫大スコアは0であった(表6)。

### 考察

従来、予後良好なNAFLと肝硬変や肝癌に進行し予後不良なNASHの区別には肝細胞の風船様腫大の存在が重要であり、予後不良の病態であると考えられてきた<sup>5)</sup>。しかしながら、近年ではこの風船様腫大の有無はNAFLDの予後との関連は少なく、肝線維化の程度が予後を左右する最も重要な因子であることが分かっている<sup>15,16)</sup>。2005年にKleinerらが提唱したNASは、

組織学的所見をスコア化するので分かりやすく、評価者の判断差異や施設間差異が低減され高い再現性を示す。また、門脈域の線維化が1cに独立し、小児や超肥満者成人への適応が可能である。さらに、診断に特殊染色を必要としない点も利点の1つであり、現在多くの論文で評価法として採用されている。しかし、NASには異なる病態を示す病理所見である脂肪変性と炎症が含まれており、この和で活動性を示すことには違和感がある。また、NASHと非NASH (NAFLを含む)のあいだに、境界域(borderline)が設けられており、NAS = 4点以下にも25%ものNASHを認め、5点以上でも75%のNASHしか診断できず感度が低い。さらに、NAS = 5点以上では肝疾患関連死との相関が低く、NASの構成項目に線維化が含まれていないという問題点が指摘されている<sup>4,7)</sup>。一方、2012年にBedossaらが提唱したFLIPアルゴリズムは脂肪化(小滴性は除く)が認められることがNAFLDの必須条件であり、そのうち肝細胞の風船様腫大と小葉内炎症の両方の存在が認められるとNASHと判定される。当初は高度肥満者を対象として報告されたが、その後の報告で高度肥満でないメタボリック症候群を伴うNAFLD患者でも有用であることが示された。評価者によってばらつきが生じやすい肝細胞の風船様腫大や小葉内炎症に関して定義が具体的にされているため一般の病理医も専門の病理医と同等の診断率を得ることが示されている<sup>4,8-10)</sup>。

NASとFLIPアルゴリズムの判断基準となるSAFスコアを比較すると、線維化の分類は同じだが、脂肪化や肝細胞の風船様腫大、小葉内炎症の基準は両者でやや異なる。脂肪化については、SAFの基準では大滴性あるいは中滴性としており小滴性の脂肪沈着を除いている。小葉内炎症では、鏡検の際の視野の拡大倍率(200倍と20倍)と炎症細胞の病巣(focus)の数の基準が両者で異なっている。肝細胞の風船様腫大では、NASでは鏡検視野内の細胞数で分類されているが、SAFスコアでは肝細胞の細胞質の性状や大きさ、肝細胞の集簇などが判定基準とされている。これらの相違により、両者でのNASHの判定結果は必ずしも一致しないことが推測される。たとえば大滴性脂肪沈着や小葉内炎症、肝線維化はみられるが肝細胞の風船様腫大がみられない場合は、臨床的にはNASHと考えられる場



合でも FLIP アルゴリズムの基準で判定すれば NASH と診断できないことになる<sup>17)</sup>。

今回の検討では、NASH であると判定されたラットの割合は NAS と FLIP アルゴリズムで有意な差は認められなかった (87.1% vs. 80.0%, p=0.254)。また、両基準で判定が一致した (どちらの基準においても NASH と判定されたラット、あるいはどちらの基準においても NASH でない判定されたラット) は 75.7% (70 匹中 53 匹) であった。一方、NAS と FLIP アルゴリズムで判定が一致しなかったラットは 24.3% (70 匹中 17 匹) みられた。このうち、NAS では「判定保留」とされ FLIP アルゴリズムでは「NAFLD でない」と判定された 4 匹、および NAS では NASH と判定されたが FLIP アルゴリズムでは「NAFLD でない」と判定された 6 匹は、いずれも NAS での脂肪化スコアは 2 あるいは 3 と明らかかな脂肪沈着があると判断されたが、SAF スコアでの脂肪化スコアは小滴性脂肪沈着であったために 0 と判定された。すなわち、NASH の判定結果が異なった要因は脂肪滴の大きさであると考えられた。また、NAS で「判定保留」とされ FLIP アルゴリズムで「NASH」と判定された 4 匹においては、脂肪化および小葉内炎症は両基準ともにスコア 1 以上と判定されたが、肝細胞の風船様腫大は SAF スコアでは 1 あるいは 2 であったのに対して、NAS ではスコア 0 と判定された。すなわち、NASH の判定結果が異なった要因は肝細胞の風船様腫大のスコアであると考えられた。残る 3 匹は NAS では NASH と判定されたが FLIP アルゴリズムでは「NASH ではなく steatosis (NAFL) である」と判定されたが、両基準とも肝細胞の風船様腫大はみられないと判定されたものの、脂肪化スコアは NAS ではスコア 3 であったのに対して、SAF スコアではスコア 1 であった。すなわち、NASH の判定結果が異なった要因は脂肪化のスコアの違いと肝細胞の風船様腫大がみられなかったことであると考えられた。なお、NAS で「判定保留」とされた 8 匹が、FLIP アルゴリズムで「NAFLD でない」と「NASH」に 4 匹ずつに分かれたのは、「borderline」という意味から考えて妥当な結果であったとおもわれる (表 6)。

以上より、NAS と FLIP アルゴリズムによる NASH の病理組織学的判定結果は約 75% で一致したが、残りの約 25% では脂肪滴の大きさ

や肝細胞の風船様腫大の判定結果が両基準での NASH の判定結果が異なる要因であるとおもわれた。未だ完璧な NASH の病理診断基準がない現状においては、それぞれの判定基準の特徴をよく理解した上で、肝硬変や肝臓への進行との関連を含めて検討を続けていくことが重要であるとおもわれる。

表 6. NAFLD activity score (NAS) と FLIP アルゴリズムによる判定の不一致例

NAS-CRNSS					FLIP アルゴリズム				
脂肪化	炎症	風船	NAS	判定	脂肪化	炎症	風船	判定	肝線維化
2	1	0	3	判定保留	0	1	2	no-steatosis	0
2	1	0	3	判定保留	0	2	1	no-steatosis	0
2	2	0	4	判定保留	0	2	0	no-steatosis	0
2	2	0	4	判定保留	0	2	0	no-steatosis	0
2	1	0	3	判定保留	1	1	2	NASH	0
2	1	0	3	判定保留	1	2	1	NASH	0
3	1	0	4	判定保留	2	2	1	NASH	0.5
3	1	0	4	判定保留	2	2	2	NASH	2
3	2	0	5	NASH	0	2	0	no-steatosis	1
3	2	0	5	NASH	0	2	1	no-steatosis	1
3	2	0	5	NASH	0	2	1	no-steatosis	1
3	2	0	5	NASH	0	1	1	no-steatosis	2
3	2	1	6	NASH	0	2	1	no-steatosis	1
3	3	0	6	NASH	0	2	0	no-steatosis	1
3	2	0	5	NASH	1	2	0	steatosis	0.5
3	2	0	5	NASH	1	2	0	steatosis	0.5
3	2	0	5	NASH	1	2	0	steatosis	1

NASH-CRNSS: NASH Clinical Research Network Scoring System、炎症: 小葉内炎症、  
風船: 肝細胞の風船様腫大

## 利益相反の開示

本研究における利益相反は存在しない。

## 引用文献

- 1) 坂本直哉: 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD/NASH) の最新知見, 日内会誌, 109 (1), 9-10, 2020.
- 2) Sheka AC, Adehi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA and Ikramuddin S: Nonalcoholic steatohepatitis. A review. JAMA, 323 (12), 1175-1183, 2020.
- 3) Muthiah MD and Sanyal AJ: Current management of non-alcoholic steatohepatitis, Liver Int, 40 (Suppl. 1), 89-95, 2020.
- 4) 橋本悦子, 谷合麻紀子: NAFLD/NASH の疾患概念の変遷 問われる NASH 診断の意義, 肝臓, 59 (2), 83-91, 2018.
- 5) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC and McCullough AJ: Nonalcoholic



- fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity, *Gastroenterology*, 116 (6), 1413-1419, 1999.
- 6) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA and Bacon BR: Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions, *Am JGastroenterol*, 94 (9), 2467-2474, 1999.
  - 7) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu Y-C, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ and Sanyal AJ: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* ,41 (6), 1313-1321, 2005.
  - 8) Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot J-L, Basdevant A, Paradis V, Tordjman J and Clement K: Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients., *Hepatology*, 56 (5), 1751-1759, 2012.
  - 9) Bedossa P and the FLIP Pathology Consortium: Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease., *Hepatology*, 60 (2), 565-575, 2014.
  - 10) Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, Kechagias S, Stal P, Bedossa P and Hultcrantz R: SAF score and mortality in NAFLD after up to 41 years of follow-up., *Scand J Gastroenterol*, 52 (1), 87-91, 2017.
  - 11) Ichimura M, Kawase M, Masuzumi M, Sakaki M, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, Tamaru S, Kato S, Tsuneyama K and Omagari K: High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces nonalcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats, *Hepatol Res*, 45 (4), 458-469, 2015.
  - 12) Ichimura M, Masuzumi M, Kawase M, Sakaki M, Tamaru S, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, Tsuneyama K, Matsuda S and Omagari K: A diet-induced Sprague-Dawley rat model of nonalcoholic steatohepatitis-related cirrhosis, *J Nutr Biochem*, 40, 62-69, 2016.
  - 13) 常山幸一.: 少ない介入で作製するメタボリックシンドローム関連肝疾患モデル動物のヒト病態解析への有用性, *肝臓*, 59 (2), 92-101, 2018.
  - 14) Fukuda A, Sasao M, Asakawa E, Narita S, Hisano M, Suruga K, Ichimura M, Tsuneyama K, Tanaka K and Omagari K: Dietary fat, cholesterol, and cholic acid affect the histopathologic severity of nonalcoholic steatohepatitis in Sprague-Dawley rats, *Pathol Res Pract*, 215 (11), 152599, 2019.
  - 15) Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Keach JC, Lafferty HD, Stahler A, Haflidadottir S and Bendtsen F: Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, 149 (2), 389-397, 2015.
  - 16) 玉城信治, 黒崎雅之: NAFLD 診断における線維化・脂肪化評価, *日内会誌*, 109 (1), 34-41, 2020.
  - 17) 岡上 武: NAFLD/NASH 診断: 現在のコンセンサスを知る 病理診断の変遷と今後の展望, *内科*, 121 (6), 1289-1294, 2018.