脂肪肝牛における血清中ビタミンA濃度と肝臓星細胞の関連性

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	小川,美希 今井,克幸 及川,伸 保坂,善真 植田,弘美 竹花,一成
発行元	日本獣医師会
巻/号	57巻10号
巻号補足	
掲載ページ	p. 639-643
発行年月	2004年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

日本産業動物獣医学会

原　著

脂肪肝牛における血清中ビタミンA濃度と肝臓星細胞の関連性

小川美希[1)]　今井克幸[2)]　及川　伸[1)]　保坂善真[1)]
植田弘美[1)]　竹花一成[1)†]

1）酪農学園大学獣医学部（〒069-8501　江別市文京台緑町582）
2）秋田大学医学部（〒010-8543　秋田市本道1-1-1）

（2003年11月4日受付・2004年6月17日受理）

要　約

ビタミンA（VA）は，生体内ではおもに肝臓の星細胞内に脂質滴として貯蔵されており，VA欠乏下で星細胞中の脂質滴は減少または消失し肝機能障害を引き起こすとされているが，星細胞の大動物における形態的変化を検討した報告は少ない．本研究は病理学的に脂肪肝と診断されたホルスタイン種雌牛の実験群（n＝15）と臨床的に健康な対照群（n＝5）の血清中VA濃度と肝臓の星細胞の形態について比較検討したものである．実験群の肝臓の単位面積あたりの星細胞数，脂質滴の体積は有意に減少し，類洞内皮細胞下の基底膜も肥厚し，コラーゲン細線維が類洞周囲腔内に多数蓄積していた．これらの細胞の核は円型で細胞質突起も長く伸び，星細胞活性は亢進していた．いっぽう，対照群の星細胞は扁平な核で，細胞体内には大型の脂質滴を1個有していた．さらに血清中VA濃度は実験群に比べ有意に高く，星細胞活性が抑制されていることが示唆された．すなわち血清中VA濃度と肝臓星細胞の形態との間には関連があることが明らかになった．――キーワード：牛，脂肪肝，肝臓星細胞，ビタミンA．

日獣会誌　57，639～643（2004）

肝臓の構成細胞は70％程度の肝実質細胞（肝細胞と略す），25％程度の類洞内皮細胞，6％程度のKupffer細胞，4％程度の星細胞である［6］．ビタミンA（VA）の主要源であるレチニンエステル，β-カロチンは経口的に摂取される．レチニンエステルは小腸内で加水分解酵素により分解されレチノールとなり，小腸上皮細胞に吸収される．いっぽう，β-カロチンは小腸上皮に取り込まれ細胞内でジオキシゲナーゼによりレチノールが生成される．その後レチノールはレチノール結合タンパク質と結合したままレシチン－レチノールアシルトランスフェラーゼによりレチニルエステルが生成される．これらのレチニルエステルは絨毛内毛細リンパ管に運ばれ，その後血行を介して肝細胞に直接取り込まれる．取り込まれたレチニルエステルは肝細胞内で加水分解されレチノールとなりレチニルエステル結合タンパク質と結合して細胞外に分泌され，類洞内の星細胞内に取り込まれ脂質滴として保存される［5, 9］．星細胞はすべての哺乳動物に存在することが知られており，肝小葉内の類洞内皮細胞の外側面に沿って細長く複雑な樹枝状の細胞質突起を3次元的に伸展させ，牛では細胞質内には大型の脂質滴ひとつを持つことが報告されている［3, 7］．生体内VA総量の75～90％は，この星細胞の細胞質内脂質滴内にエステルの型で貯蔵されており［3, 5］，血液中のVAが欠乏すると星細胞脂質滴内のVAは血液中に放出され，星細胞の脂質滴の大きさは減少しやがて消失する［11］．このVAの減少あるいは欠乏は星細胞の核内受容体（retinoic acid receptor, RAR）を介して，星細胞自身の活性を促し，基底膜を形成するラミニンやⅣ型コラーゲン，線維性コラーゲンであるⅠ，Ⅲ，Ⅴ型コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を亢進させている［5, 6］．

牛では生体内のVA欠乏に起因する疾病として，肥育肉牛のビタミンA欠乏症が知られているが，いっぽう，出荷前の肥育肉牛に脂肪交雑の向上をはかるためにVAの制限給餌が推奨されてきた［8］．その結果，牛は重度のVA欠乏に陥るために筋肉水腫，尿石症，脂肪壊死症，急性肝炎等を発症し発育障害が引き起こされ枝肉量の低下と商品価値の低下が起き，経済的損失の原因ともなっ

† 連絡責任者：竹花一成（酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医解剖学教室）
〒069-8501　江別市文京台緑町582　☎011-388-4744　FAX 011-388-4852

ている［8, 16］．VAの欠乏と脂肪肝，そして生体におけるVA貯蔵場所である星細胞内脂質滴の形態変化の関連性について十分には明らかにされていない［11, 14］．そこで今回われわれが遭遇した脂肪肝を示した症例において星細胞の形態変化と血中VA濃度の関連性について検討したところ興味深い知見を得た．

材料および方法

実験群として本学大動物臨床センターにおいて病理組織学的検索により脂肪肝と診断された成牛（ホルスタイン種，雌）15例を用いた．また，これらの個体はいずれも臨床的にVA欠乏を示していた．また実験牛群の個体は分娩後に食欲および乳量の低下を示し，糖質（25％ブドウ糖500m*l*，一回投与）による治療が施されていた．いっぽう，対照群として臨床的に健康な成牛（ホルスタイン種，雌）5例を用いた．肝臓の試料（肝臓右葉）はバイオプシー法により得た．また，血液は頸静脈より採取後，血清分離し－20℃で保存し，血清中VA濃度測定は高速液体クロマトグラフィーで測定した．

脂質滴を有する星細胞の検出法として塩化金法［13］を用いた．液体窒素で凍結させた肝臓組織片をさらに，20×15×5mm程度の大きさに切り出し，遮光下室温で0.05％クロム酸に約2時間浸漬固定し，凍結ミクロトームで厚さ30～50μmの凍結切片を作製した．0.05％クロム酸に10分間浸漬した切片をガラス棒ですくい上げ，反応液（1％塩化金1m*l*，1％塩酸1m*l*，蒸留水98m*l*）中に浸漬し，暗所，恒温槽中（18～20℃）で17～20時間反応させた．その後アルコール系列で脱水し，キシロールで透徹後，カナダバルサムで封入した．単位面積（50,000μm^2）あたりの直径1μm以上の大きさの脂質滴を有する星細胞数を算出した．

透過型電子顕微鏡用試料として，肝臓を約1mm^{3}の大きさに細切し，3.0％グルタールアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）と1.0％四酸化オスミウム溶液で二重固定を行い，常法に従い樹脂包埋した．超薄切片には酢酸ウラニウムとクエン酸鉛の二重染色を施し，星細胞を観察した．細胞質に核が見られるもの10個につき脂質滴の半径を測定し体積を計測した．さらに一部の肝臓組織は細切した後3.0％グルタールアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液にて単固定を施し，水溶性樹脂[a]に包埋した．超薄切片には過ヨウ素酸－チオカルボヒドラジド－タンパク銀－物理現像（PA-TCH-SP-PD）法を施し，類洞内皮細胞下の基底膜を観察し，その厚さを計測した．得られた成績はStudent-*t*検定（$P<0.05$）により処理した．なお，データは平均±標準誤差で示した．

a) LR-White, London Resin Company, Ltd, England.

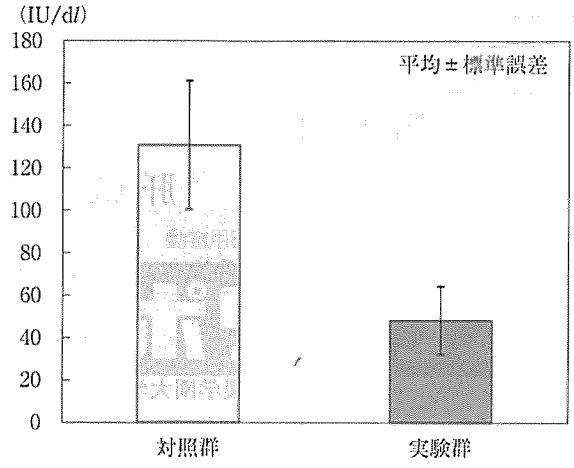

図1　血清中VA濃度．
脂肪肝を呈した実験群は臨床上健康であると思われる対照群の40％程度である．（$P<0.05$）

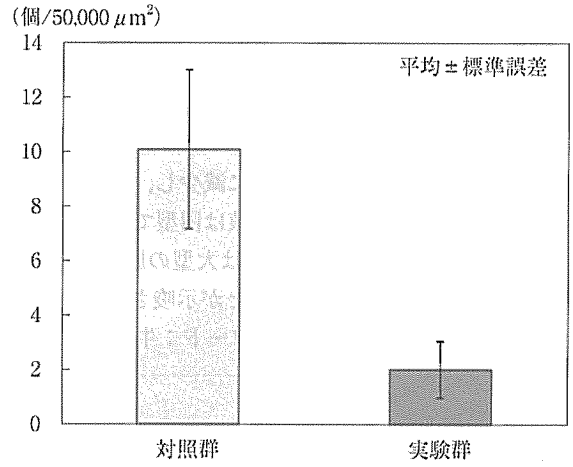

図2　単位面積あたりの星細胞数．
脂肪肝を呈した実験群は臨床上健康であると思われる対照群の20％程度である．（$P<0.05$）

成　　績

血清中VA濃度は，対照群129.7±31.0IU/d*l*に対し，実験群47.6±15.7IU/d*l*で有意差がみられた（図1）．

星細胞数は対照群10±3個/50,000μm^{2}であったのに対し，実験群2±1個/50,000μm^{2}で有意差がみられた（図2）．脂質滴は，対照群では肝細胞板に沿って黒染され大型であったが，実験群では，少数の小型の脂質滴が黒染された（図3）．星細胞の脂質滴の体積は対照群が99.8±25.4μm^3，実験群が27.5±4.1μm^{3}で有意差がみられた（図4）．星細胞の形態学的特徴として，対照群では，大型の脂質滴を1個有し核は扁平であったが，実験群では1個の小型の脂質滴と円型で辺縁がいびつな核を有していた．また肝細胞には対照群で，豊富なグリコーゲン顆粒が認められたが，実験群ではグリコーゲン顆粒は見られず多数の脂肪滴が認められた（図5）．星細胞

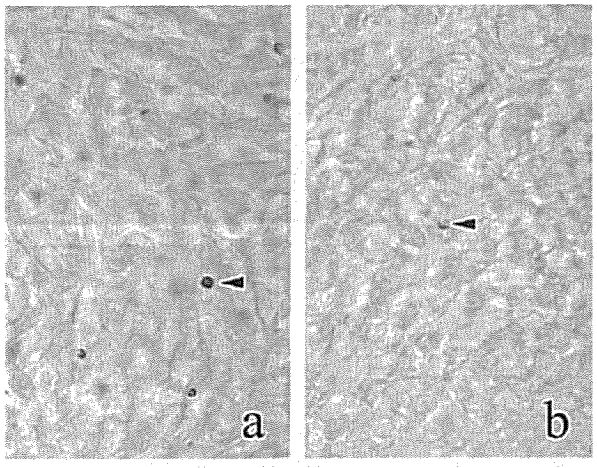

図3　星細胞の光学顕微鏡像.
a）対照群では，肝細胞板構造は明瞭で，類洞内に黒染された大きな脂質滴（矢頭）を持つ星細胞が多数見られる．（×40）
b）実験群では，変形した肝細胞により構成された肝細胞板構造は不明瞭で，類洞内に少数の黒染された小さな脂質滴(矢頭)を持つ星細胞が見られる.(×40)

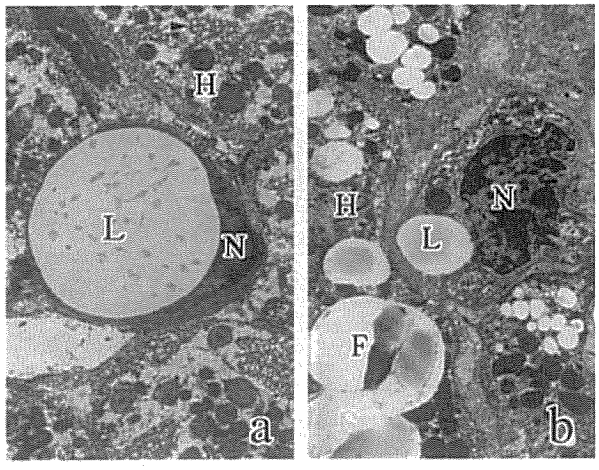

図5　星細胞の透過型電子顕微鏡像.
a）対照群．大型の脂質滴（L）に圧迫された扁平な核（N）が存在する．肝細胞（H）には豊富なグリコーゲン顆粒（矢頭）が見られる．（×2,800）
b）実験群．小さな脂質滴（L）が1個見られ，核（N）は円型で細胞質突起を広く伸ばしている．肝細胞（H）には多くの脂肪滴（F）が見られる．（×2,800）

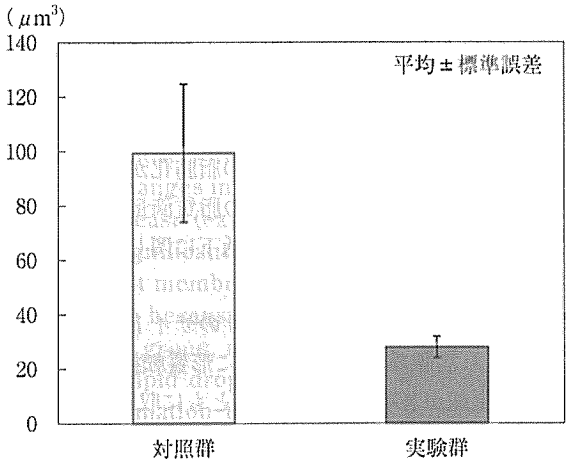

図4　星細胞脂質滴の体積.
脂肪肝を呈した実験群は臨床上健康であると思われる対照群の30％程度である．($P < 0.05$)

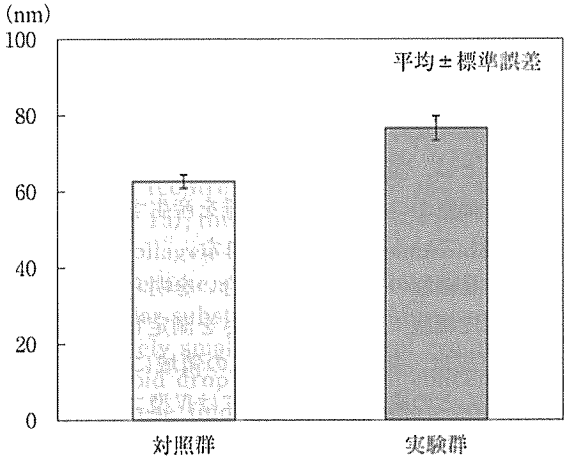

図6　類洞内皮細胞下の基底膜の厚さ.
脂肪肝を呈した個体群（実験群）は臨床上健康であると思われる個体群（対照群）の120％程度である．($P < 0.05$)

数，脂質滴数と体積すべてにおいて両群間に有意差が認められた.

類洞内皮細胞下の基底膜の厚さにも有意差がみられた．基底膜は対照群では不明瞭で62 ± 1.5nmであったのに対し，実験群では明瞭で76 ± 3.2nmであった（図6，7）．加えて，実験群の類洞周囲腔には多数のコラーゲン細線維が認められた（図8）.

考　　察

星細胞内に存在する脂質滴の大きさの減少は血液中のVAの減少に相関することが知られている［2］．また血液中VA量の減少時には星細胞が活性化し，それに伴い細胞外マトリックス生成が亢進することもすでに報告されている［6］.

今回，実験群の血清中VA濃度は有意に低下しており，脂質滴を指標とした星細胞の減少，すなわち脂質滴の大きさの減少や消失に加え，類洞周囲腔でのコラーゲン細線維の増加や基底膜の肥厚が認められた．この形態学的な変化から以下のような仮説が得られた．VA欠乏によって，星細胞が含有しているVAが血中に放出され，次いで星細胞が活性化しコラーゲン細線維産生が活発になり，結果として線維性コラーゲンであるⅠ型，Ⅲ型コラーゲン［15］の類洞周囲腔内への過剰な蓄積が生じる．加えて星細胞は基底膜を形成する細胞外マトリックスの産生も亢進し，結果として類洞内皮細胞下の基底膜の肥

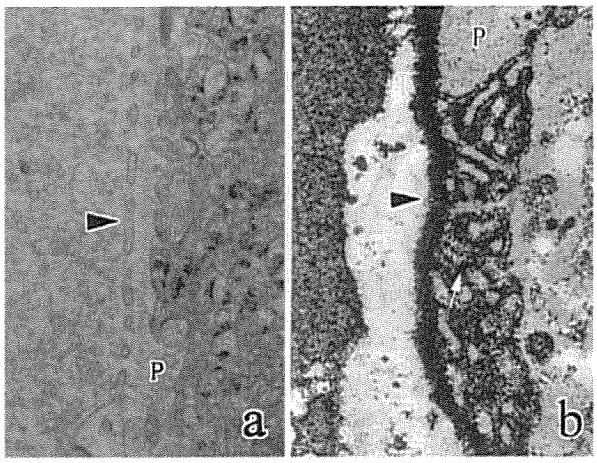

図7　類洞内皮細胞下の基底膜の透過型電子顕微鏡像.
a）対照群．基底膜（矢頭）は薄く不明瞭で，類洞周囲腔（P）の染色性は弱い．PA-TCH-SP-PD法（×15,000）
b）実験群．基底膜（矢頭）は厚く明瞭で類洞周囲腔（P）には強い染色性を示す部位が観察され（矢印）ている．PA-TCH-SP-PD法（×15,000）

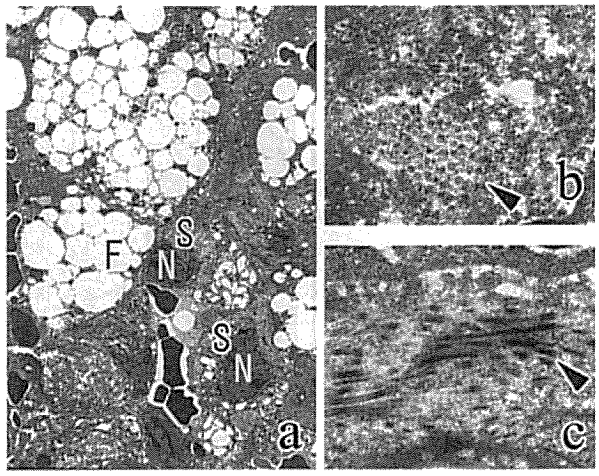

図8　機能亢進を認める星細胞の透過型電子顕微鏡像.
a）肝細胞内には多数の脂肪滴（F）があり，星細胞（S）の細胞質には大きくいびつな形の核（N）が見られるが，脂質滴は見られない．（×1,200）
b）核周辺の類洞周囲腔にはコラーゲン細線維（矢頭）が多数みられる．（×20,000）
c）縦断像ではコラーゲン細線維（矢頭）は不規則に走行している．（×20,000）

厚も誘導された．実際に十分なVA濃度を有する対照群の小葉内には，平均99.8μm^3の大きな脂質滴を有した星細胞が多数認められ，類洞周囲腔にもコラーゲン細線維も基底膜の肥厚も認められなかった．血中VAが十分であることは，星細胞に由来するVA放出の誘導が起こらず，星細胞がコラーゲン細線維を産生する機能を抑制的に制御していることが推察された．

今回，星細胞の機能亢進の度合いを明らかにするために類洞内皮細胞下の基底膜の厚さを測定した．一般に基底膜の組成は，組織や基底膜内の領域によって異なるが，ほとんどの成熟した基底膜にはⅣ型コラーゲン，ヘパラン硫酸プロテオグリカン，ラミニンなどの糖タンパク質が含まれている［1, 3, 6］．本研究では基底膜構成成分の1つであるグリコサミノグリカンに反応するPA-TCH-SP-PD法により基底膜の有意な肥厚が認められたことから，実験群において星細胞の機能が活性化していたことが示唆された．加えて実験群において星細胞周辺には，不規則に走行する過剰なコラーゲン細線維も多数認められ，同時に脂質滴量の減少が認められたことは，血中VA量の減少が星細胞の活性化を引き起こし，特に星細胞と肝細胞間の類洞周囲腔内にコラーゲン細線維を蓄積させる可能性が高いことも示唆された．いっぽう，本実験群では，フィールドでの治療歴等より推察するとおそらく分娩後に強い負のエネルギーバランスに陥り，そのため脂肪組織からの遊離脂肪酸の肝臓への流入が肝臓の処理能力を超える程過剰となったために脂肪肝に陥ったものと推察された［10］．また，このような病態により派生する長期の食欲減退の結果としてVA欠乏となったものと考えられる．したがって，このような牛では，類洞内皮下基底膜の肥厚により肝細胞と洞様毛細血管間の物質の出入りが著しく阻害されることから，肝臓の脂肪化は改善されず，むしろ肝障害が進展すると考えられる．実際，分娩後に肝臓の脂肪化が認められたケトーシス牛においても，星細胞の脂質滴量の減少と類洞内皮下基底膜の肥厚や肝機能の低下に関してすでに報告されている［4, 10］．

近年，肝障害時に星細胞は種々のサイトカインにより活性化され筋線維芽細胞様細胞に形質転換し，増殖能，ECM産生能が著明に亢進するとともに収縮能も獲得し，門脈血流の減少や門脈圧亢進を引き起こすことが報告されている［6］．このことが不可逆的な脂肪肝を生み出す一要因である事とも考えられ，同様のメカニズムが星細胞の機能として近年注目され，肺線維化の障害とその病理発生に関しても報告されている［12］．

以上のことより牛において血清中VA濃度は肝臓星細胞のコラーゲン細線維産生機能を抑制性に制御していることが考えられ，血中VA濃度を維持することで脂肪肝を効率よく回復させることができることが示唆された．

引　用　文　献

［1］ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Rpberts K, Watson JD：細胞分子生物学，中村佳子，他監訳，第3版，692-713，教育社，東京（1995）
［2］ Blamhoff R, Green M, Berg T, Norum KR : Science, 250, 399-404 (1990)
［3］ 伊東俊夫：解剖学雑誌，53，393-422（1978）
［4］ 岸　基史，東　伸好，保坂善真，植田弘美，及川　伸，小岩政照，竹花一成：家畜診療，12，771-776（2002）

[5] 北川政幸：臨床獣医，10，41-48（1992）
[6] 小嶋聡一，奥野正隆：細胞，34，20-23（2002）
[7] Lindberg LA, Grohn Y : Acta Anat, 126, 127-131 (1986)
[8] 松本大策：臨床獣医，18，26-31（2000）
[9] 村上大蔵，本好茂一，長谷川篤彦，川村清一，内藤喜久，前出吉光：新獣医内科学，228-250，文永堂出版，東京（1997）
[10] Oikawa S, Katoh N, Kawawa F, Ono, Y : Am J Vet Res, 58, 121-125 (1997)
[11] Ramiro OB, James AO : Am Insti Nutri, 23, 874-879 (1986)
[12] 妹尾春樹：Minophagen Med Rev, 48, 199-211 (2003)
[13] Wake K, Motomatsu K, Senoo H, Masuda A, Adachi E : Stain Technol, 61, 193-200 (1986)
[14] Wake K, Sato T : Cell Tissue Res, 273, 227-237 (1993)
[15] Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS : Hum Pathol, 31, 822-828 (2000)
[16] 渡辺大作：臨床獣医，18，42-48（2000）

Relationship between Serum Vitamin-A Concentration and Hepatic Stellate Cells in Cows with Fatty-liver Disease

Miki OGAWA*, Katsuyuki IMAI, Shin OIKAWA, Yoshinao HOSAKA, Hiromi UEDA and Kazushige TAKEHANA†

** Department of Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyodai-midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan*

SUMMARY

Vitamin A (VA) is stored mainly in lipid droplets in hepatic stellate cells (HSCs) of the liver. Apparently, when the level of serum VA drops below the basic-requirement level, lipid droplets in an HSC either decrease in number or disappear altogether. Fatty-liver disease (fat-cow syndrome), which is common in periparturient cattle and makes the animals highly susceptible to ketosis, is a major cause of significant economic loss. In the past, some reports have dealt with the relationships between VA serum concentrations and pathological changes in cattle with fatty-liver disease. The present study aims to determine the correlation between morphological changes in HSCs and VA serum concentration in both normal (control) cattle (n = 5) and cattle with fatty-liver disease (experimental group). In the experimental group (n = 15), the number of HSCs per unit area decreased significantly with the disappearance of lipid droplets and collagen from the perisinusoidal space. The basement membrane of the subsinusoidal endothelium, however, became significantly thicker than in the control group because of an accumulation of both cellular and noncellular substance in situ. Moreover, in the experimental group, nuclei and lipid droplets in HSCs were comparatively small. In the control group, on the other hand, lipid droplets in HSCs were notably large. Numbers of lipid droplets, VA serum concentrations and HSC formation in the control group increased significantly. These findings clearly show correlation between VA serum concentration and HSC numbers and indicate the need to maintain blood CA concentrations in cattle with fatty-liver disease. —Key words : cow, fatty liver, hepatic stellate cell, Vitamin A.

† *Correspondence to : Kazushige TAKEHANA (Department of Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University)*
582 Bunkyodai-midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan　TEL 011-388-4744　FAX 011-388-4852

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 57, 639～643 (2004)