犬における好中球 Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験の基礎検討

伊藤直之 伊藤さや子

かもめ獣医科病院 (八戸市大字大久保字大塚 17-396, 〒031)

(平成 3 年 2 月 16 日受付・平成 3 年 5 月 17 日受理)

A Fundamental Investigation of Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Test in Canine Neutrophils

NAOYUKI ITOH and SAYAKO ITOH (Kamome Veterinary Clinic, Ootsuka, Ookubo, Hachinohe, Aomori 031)

SUMMARY

A fundamental investigation was performed on a histochemical nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test in canine neutrophils.

The results suggest that a 15 min incubation period and a 100 $\mu\text{g/ml}$ endotoxin concentration are suitable for resting and stimulated NBT reduction tests in canine neutrophils.

—Key Words: nitroblue tetrazolium reduction test, canine, neutrophil.

-----*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 44, 1034~1036 (1991)

要 約

組織化学的方法による犬の好中球 Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験を実施する際の測定条件に関して、健康な犬 18 頭を用いて基礎的検討を行った。

その結果、反応時間は 15 分、エンドトキシンの濃度は 100 $\mu\text{g/ml}$ が犬好中球の resting および stimulated NBT 還元試験に適當であると考えられた。——キーワード: NBT 還元試験, 犬, 好中球。

Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験は、好中球の活性化による酸化的殺菌能を表すものとして^{3,5,8,12)}、比色法¹⁾あるいは組織化学的方法^{5,8,11,15)}によって測定され、人においては慢性肉芽腫症^{1,9,10,14)}をはじめとする各種の疾患^{2,6,10,11,14)}でその有用性が報告されている。また、NBT 還元試験においてはエンドトキシン等の刺激物質により好中球の機能を活性化した成績 (stimulated NBT 還元試験) を刺激物質無添加のそれ (resting NBT 還元試験) と比較することによって、なお一層明確な好中球機能を把握できることが知られている^{9,10,14)}。

いっぽう、犬における好中球 NBT 還元試験に関しての報告は少ないが^{4,7,13)}、最近、著者らは組織化学的方法による NBT 還元試験を実施し、操作の簡易さから日常の診療において、犬好中球の細胞機能を検索する方法の一つとして有用であることを報告した⁴⁾。しかし、犬の好中球 NBT 還元試験を実施する際の測定条件に関する検討は十分にはなされていない。そこで今回、組織化学的測定法による犬の好中球 NBT 還元試験における測定条件について若干の基礎的検討を行った。

材 料 お よ び 方 法

供 試 犬

今回用いた供試犬は、年齢 3 カ月から 9 歳までの臨床的に健康な犬 18 頭である。採血は橈側皮静脈より行い、血液 1 ml につき 20 単位のヘパリンを添加して十分に混合し、直ちに NBT 還元試験に使用した。

NBT 還 元 試 験

NBT 還元試験は、著者らが前に報告⁴⁾した組織化学的測定法により実施した。

NBT 溶液は NBT (関東化学) を 1 / 15 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 2 mg/ml の濃度に調整し、stimulated NBT 還元試験には E. coli エンドトキシン (Lipopolysaccharide from E. coli 0111:B4, Sigma Chemical Co.) を生理食塩水溶液で一定濃度に調整して使用した。

Resting NBT 還元試験では 25 μl の NBT 溶液に等量の生理食塩水溶液を加え、stimulated NBT 還元試験では Resting NBT 還元試験の生理食塩水溶液のかわりにエンドトキシン溶液を用いた。血液、NBT-生理食塩水溶液および NBT-エンドトキシン溶液はプラスチック試

験管に入れ、37℃で3分間予備加温した。その後、resting および stimulated NBT 還元試験用のそれぞれのプラスチック試験管内によく攪拌した血液を 50 μ l 加え混合した後、37℃で一定時間反応させた。反応終了後、試験管内容をよく混合して塗抹標本を作成し、ライト・ギムザ染色を行い、結果は好中球 100 個に対する細胞質内にホルマザンの沈着を示す陽性細胞数の割合（陽性率）を％で表した。

反 応 時 間 の 検 討

反応時間の検討は resting NBT 還元試験を用いて行い、NBT-生理食塩水溶液と血液を混合した後の 37℃での反応時間を 15, 30, 60, 90 および 120 分として実施した。

エンドトキシン濃度の検討

エンドトキシン濃度の検討は、stimulated NBT 還元試験における添加エンドトキシンの濃度を 10, 20, 50, 100 および 200 μ g/ml として実施し、反応時間の検討と同時にを行った。

成 績

反 応 時 間

Resting NBT 還元試験での反応時間の違いによる陽性率の変化を図 1 に示した。

反応時間 15, 30, 60, 90 および 120 分における陽性率は、それぞれ 43.9 ± 20.7 （平均 $\pm$ 標準偏差）、 77.3 ± 13.9 、 95.8 ± 4.9 、 98.7 ± 1.4 および $99.7 \pm 1.0\%$ であり、60 分以上の反応時間では陽性率に大きな差は認められなかった。

図 1 resting NBT 還元試験における反応時間と陽性率の関係

エンドトキシン濃度

反応時間の検討と同時にに行った stimulated NBT 還元試験における添加エンドトキシンの濃度の違いによる陽性率の変化を図 2 に示した。なお、反応時間の検討結果から、stimulated NBT 還元試験の意義があると考えられる 15 および 30 分の反応時間における成績のみを示した。また、resting NBT 還元試験の成績は反応時間の検討と同時に実施したことから同一の値である。

反応時間 15 分における resting および 10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml の各濃度のエンドトキシン添加による stimulated NBT 還元試験の陽性率は、それぞれ 43.9 ± 20.7 、 58.1 ± 21.4 、 63.8 ± 21.6 、 68.4 ± 20.2 、 74.4 ± 19.5 および $77.8 \pm 16.4\%$ であり、エンドトキシン濃度の増加にともなって陽性率も増加した。

反応時間 30 分における resting および各濃度のエンドトキシン添加による stimulated NBT 還元試験の陽性率は、それぞれ 77.3 ± 13.9 、 87.4 ± 12.7 、 90.9 ± 7.7 、 92.2 ± 8.0 、 93.8 ± 7.1 および $95.1 \pm 5.5\%$ であり、50 μ g/ml 以上のエンドトキシン濃度では陽性率に大きな差は認められなかった。

エンドトキシン添加による陽性率増加の程度

反応時間 15 分および 30 分における resting NBT 還元試験での陽性率に対する各濃度のエンドトキシン添加による stimulated NBT 還元試験の陽性率増加の程度（各濃度のエンドトキシン添加による stimulated NBT 還元試験の陽性率－resting NBT 還元試験の陽性率）を図 3 に示した。

反応時間 15 分における 10, 20, 50, 100 および 200 μ g/ml の各濃度のエンドトキシン添加による陽性率の増加は、それぞれ 14.1 ± 10.8 、 19.8 ± 11.1 、 $24.5 \pm$

図 2 エンドトキシン濃度と陽性率の関係

図3 エンドトキシン濃度と陽性率増加の関係

10.9, 30.5 ± 13.4 および $33.9 \pm 13.9\%$ であり, エンドトキシンの濃度によっても増加した。

反応時間 30 分における各濃度のエンドトキシン添加による陽性率の増加は, それぞれ 10.1 ± 8.7 , 13.7 ± 7.8 , 14.9 ± 7.9 , 16.5 ± 8.7 および $17.8 \pm 10.3\%$ であり, 反応時間 15 分における値に比べ低い値であった。

考 察

組織化学的測定法による NBT 還元試験は, 日常の診療において犬好中球の細胞機能を検索するうえで有用であることが示唆されているが⁴⁾, 実際に NBT 還元試験を行う際の測定条件に関しては検討がなされていないことから, 今回, 犬の好中球 NBT 還元試験における反応時間と stimulated NBT 還元試験に添加するエンドトキシン濃度について検討を加えた。

Resting NBT 還元試験を用いての反応時間の検討では, 反応時間の延長によっても陽性率の上昇が認められた。しかしながら, 60 分以上の反応時間では陽性率に大きな差は認められず, しかも resting NBT 還元試験であるにもかかわらず陽性率が 95.0% 以上を示していることから, これらの反応時間ではエンドトキシンを用いて好中球を刺激する stimulated NBT 還元試験を実施する意味がないものと考えられる。また, 60 分以上の反応時間になると塗抹標本上での好中球細胞の破壊が頻繁に観察されるようになり, 陽性細胞の判別に支障を来す可能性のあることが示唆された。以上のことから, 反応時間に関しては 15 分ないしは 30 分が適当であると考えられた。

次に 15 分および 30 分の反応時間で同時に実施した stimulated NBT 還元試験で添加するエンドトキシン濃度の検討では, 15 分の反応時間ではエンドトキシン濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ まではエンドトキシン濃度の増加にともない陽性率も上昇し, また resting NBT 還元試験の陽性率との間にも明確な差が認められたことからエンドトキシン添加による好中球の活性化をよく反映しているものと考えられた。いっぽう, 30 分の反応時間においては resting NBT 還元試験の陽性率がすでに高いことから, エンドトキシン添加による陽性率の上昇はいずれの濃度においても明確でなく, 好中球の活性化を表すのには十分ではないものと考えられた。

以上の結果から, 総合的に判断して犬の好中球 NBT 還元試験の測定条件における反応時間は 15 分, stimulated NBT 還元試験に使用するエンドトキシンの濃度は $100 \mu\text{g/ml}$ が適当であると考えられる。

引用文献

- 1) BAEHNER R. L. and NATHAN D. G.: *New Engl. J. Med.* 278, 971~976 (1968).
- 2) COOPER M. R., DECHATELET L. R., LAVIA M. F., et al.: *J. Clin. Invest.* 49, 21 (1970).
- 3) GIFFORD R. H. and MALAWISTA S. E.: *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 511~519 (1970).
- 4) 伊藤直之, 伊藤さや子: 日獣会誌, 44 (7), 728~730 (1991)
- 5) JABS A. D. and REGAN M.: *Lab. Manage.* 18, 37~41 (1980).
- 6) MATULA G. and PATERSON P. Y.: *New Engl. J. Med.* 285, 311~317 (1971).
- 7) 中瀬安博, 土屋 亮, 山田隆紹, 小林好作: 日獣会誌, 42, 391~394 (1989).
- 8) NATHAN D. G., BAEHNER R. L. and WEAVER D. K.: *J. Clin. Invest.*, 48, 1895~1904 (1969).
- 9) OCHS H. D. and IGO R. P.: *J. Pediatr.* 83, 77 (1973).
- 10) PARK B. H.: *J. Pediatr.*, 78, 376~378 (1971).
- 11) PARK B. H., FIKRIG S. M. and SMITHWICK E. M.: *Lancet*, 2, 532~534 (1968).
- 12) PRESIG E. and HIZIG W. H.: *Eur. J. Clin. Invest.* 1, 409~412 (1971).
- 13) RENSCHAW H. W. and DAVIS W. C.: *Am. J. Pathol.*, 95, 731~744 (1979).
- 14) 朝長万左男: 臨床血液, 21, 363~374 (1980).
- 15) VALINOTI J. M., ZINKL J. G. and JAIN N. C.: *Vet. Clin. Pathol.* 17, 99~104 (1988).