健康な犬における好中球 Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験の成績

伊藤直之 伊藤さや子

かもめ獣医科医院 (八戸市大字大久保字大塚 17-396, 〒031)

(平成 2 年 9 月 27 日受付・平成 3 年 2 月 22 日受理)

Results of Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Test in Healthy Canine Neutrophils
NAOYUKI ITOH and SAYAKO ITOH (Kamome Veterinary Clinic, Ootsuka,
Ookubo, Hachinohe, Aomori 031)

SUMMARY

Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction tests of canine neutrophils were performed in 33 healthy dogs. The positive percentages of resting and endotoxin-stimulated NBT reduction tests were $46.9 \pm 6.0\%$ (mean $\pm$ S.E.) and $73.8 \pm 5.7\%$ (significant increase, $p < 0.001$), respectively.

The simplicity of the histochemical NBT reduction test used in this study indicates that it may be useful as a routine laboratory examination to measure the cellular functions of canine neutrophils.

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

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 728~730 (1991)

要 約

臨床的に健康な 33 頭の犬における好中球 Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元試験について組織化学的測定法により検索した。

その結果、resting NBT 還元試験の陽性率の平均は 46.9% であり、100 μ g/ml のエンドトキシンを添加した stimulated NBT 還元試験の陽性率の平均は有意に増加して 73.8% であった ($p < 0.001$)。

今回、著者らの実施した組織化学的測定法による NBT 還元試験は、犬好中球の細胞機能を検索するうえで、操作が簡単であること等から日常の診療におけるルーチンな検査の 1 つとして応用が可能であると考えられる。

—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伴って NBT 色素が還元されて不溶性の formazan となる^{1,6)}ことを応用し、比色法²⁾あるいは組織化学的方法^{5,9,16)}によって測定され、好中球の酸化的殺菌能を表すものと考えられている^{4,5,9,13)}。NBT 還元試験の有用性は、人においては慢性肉芽腫症^{2,10,11,15)}をはじめとする各種の疾患^{3,7,11,12,15)}で報告されている。

いっぽう、犬では顆粒球不全症候群の診断における有用性が認められているが¹⁴⁾、好中球 NBT 還元試験に関しての報告は極めて少ない^{8,14)}。

今回、日常の診療において実際に応用可能であると考えられる組織化学的測定法により、健康な犬の好中球 NBT 還元試験について検索した。

材 料 お よ び 方 法

材 料

本研究に用いた犬は年齢 3 カ月から 9 歳までの臨床的に健康な 33 頭である。採血は橈側皮静脈より行い、血液 1 ml につき 20 単位のヘパリンと十分に混合して直ちに NBT 還元試験に使用した。

方 法

NBT 還元試験は従来の報告^{9,12,16)}に一部修正を加え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

表1 犬の好中球 NBT 還元試験における還元率 (%)

	resting NBT 還元試験	stimulated NBT 還元試験
平均	46.9	73.8*
S. E. ^{a)}	±6.0	±5.7

a): 標準誤差

*: resting NBT 還元試験の値に対する有意性, $p < 0.001$

(Lipopolysaccharide from *E. coli* 0111・B4, Sigma Chemical Co.) を生理食塩水溶液で 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整して使用した。

resting NBT 還元試験では 50 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 還元試験で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°C 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 100 μl 加え混合した後, 37°C で 15 分間反応させた。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・ギムザ染色を行った。

結果は, 塗抹標本の好中球 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。

成 績

臨床的に健康な犬 33 頭における好中球 NBT 還元試験の結果は表 1 に示した。

resting NBT 還元試験の陽性率は $46.9 \pm 6.0\%$ (平均 $\pm$ S. E.) であり, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエンドトキシンを添加した stimulated NBT 還元試験の陽性率は $73.8 \pm 5.7\%$ であった。stimulated NBT 還元試験の陽性率は resting NBT 還元試験の陽性率に比べ有意に増加していた ($p < 0.001$)。

好中球の細胞質内におけるホルマザンの沈着形態は, 顆粒状のものからブロック状のものまで様々であった。

考 察

NBT 還元試験は医学領域においては好中球の機能検査の 1 つとして重要な役割を果たしており, 臨床的には慢性肉芽腫症^{2, 10, 11, 15)}や白血球 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 欠損症³⁾および全身性細菌感染症⁷⁾等のスクリーニングのための簡易検査として, また, 細菌感染症の治療経過のモニターとしても¹⁵⁾実施されている。しかしながら, 獣医学領域, 特に犬においては好中球の NBT 還元試験に関する報告は極めて少なく^{8, 14)}, 実際の臨床の場においても応用されていないの

が現状のように思われる。

NBT 還元試験には比色定量法²⁾と組織化学的測定法^{5, 9, 16)}とがあるが, 比色定量法は手技が複雑で通常の臨床検査での応用は困難である。

いっぽう, 今回著者らの実施した組織化学的測定法は全血を用い操作が簡単であり特殊な器具を必要としないこと等から, 日常の診療においても応用が可能であると考えられる。

抗凝固剤としてのヘパリンの使用について朝長¹⁵⁾は, ヘパリンが NBT と複合体を形成し, ホルマザン沈着の判定の妨げとなることを報告しているが, 今回の血液 1 ml につき 20 単位のヘパリン添加では判定の妨げとなるような複合体の形成は認められなかった。

今回得られた resting および stimulated NBT 還元試験の結果は, 中瀬ら⁸⁾の Gifford 改良法での成績に比べやや低い値であった。この相違には彼らが述べているごとく, Gifford 改良法においては好中球がガラスへの付着の際に活性化されている可能性のあること等から測定方法の違いによるものと考えられる。

エンドトキシン添加の stimulated NBT 還元試験の陽性率は resting NBT 還元試験のそれに比べて有意に増加しており, 好中球のエンドトキシンに対する反応性を表現しているものと考えられる。人の慢性肉芽腫症において朝長¹⁵⁾は, resting NBT 還元試験では正常人と差が認められないものの, stimulated NBT 還元試験には大きな差のあることを認めており, これら両者は常に同時に実施すべきものであると考えられる。また, stimulated NBT 還元試験の刺激物質としてはエンドトキシン以外にもラテックス粒子²⁾やチモーザン¹⁶⁾等が利用されているが, 取り扱いや調整法の容易さを考慮するとエンドトキシンが最適であるように思われる。

今回は, 健康な犬の NBT 還元試験についての基礎データを提供したに過ぎないが, 今後は各種の疾患と好中球機能との関連を明かにすることを目的として NBT 還元試験を臨床応用することが必要であると考えられる。

引 用 文 献

- 1) BAEHNER R. L., BOXER L. A. and DAVIS J.: *Blood*, 48, 309~313 (1976).
- 2) BAEHNER R. L. and NATHAN D. G.: *New Engl. J. Med.*, 278, 971~976 (1968).
- 3) COOPER M. R., DECHATELET L. R., LAVIA M. F. et al.: *J. Clin. Invest.*, 49, 21 (1970).
- 4) GIFFORD R. H. and MALAWISTA S. E.: *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 511~519 (1970).
- 5) JABS A. D. and REGAN M.: *Lab. Manage.*, 18, 37~41 (1980).
- 6) JOHNSTON R. B., KELLE B. B., MISRA H. P. et al.: *J. Clin. Invest.*, 55, 1357~1372 (1975).
- 7) MATULA G. and PATERSON P. Y.: *New Engl. J.*

- Med.*, 285, 311~317 (1971).
- 8) 中瀬安博, 土屋 亮, 山田隆紹, 小林好作: 日獣会誌, 42, 391~394 (1989).
 - 9) NATHAN D. G. and BAEHNER R. L.: *J. Clin. Invest.*, 48, 1895~1904 (1969).
 - 10) OCHS H. D. and IGO R. P.: *J. Pediatr.*, 83, 77 (1973).
 - 11) PARK B. H.: *J. Pediatr.*, 78, 376~378 (1971).
 - 12) PARK B. H., FIKRIG S. M. and SMITHWICK E. M.: *Lancet*, 2, 532~534 (1968).
 - 13) PRESIG E. and HIZIG W. H.: *Eur. J. Clin. Invest.*, 1, 409~412 (1971).
 - 14) RENSCHAW H. W. and DAVIS W. C.: *Am. J. Pathol.*, 95, 731~734 (1979).
 - 15) 朝長万左男: 臨床血液, 21, 363~374 (1980).
 - 16) VALINOTI J. M., ZINKL J. G. and JAIN N. C.: *Vet. Clin. Pathol.*, 17, 99~104 (1988).

KITASATO
動物用医薬品

豚Hpn2型ワクチン「北研」
要指示医薬品

豚Hpn5型ワクチン「北研」
要指示医薬品

豚Hpn2価ワクチン「北研」
要指示医薬品

豚Hpn2型CF抗原「北研」
要指示医薬品

豚Hpn5型CF抗原「北研」
要指示医薬品

発売元

製造元

第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋三丁目4番10号

北 里 研 究 所 (社団法人)
東京都港区白金五丁目9番1号

高性能新世代 スーパーアイSSD 500

- ・高品位画像, 多彩な計測・計算・表示機能
- ・小型・軽量(約10kg)で移動, 設定が容易
- ・リニア走査, コンベックス走査・B,M,B/B,B/M4モード
- ・操作は見やすいキーボードで容易
- ・撮影装置を始めとする豊富なオプション類
- ・直検用専用探触子付

計 測 距離 面積・周囲長
消費電力 AC100V 約90VA
寸 法 290×250×320mm (W・D・H)

FHK 富士平工業株式会社 東京都文京区本郷6丁目11番6号 〒113
電話 東京(03)3812-2271 ファクシミリ(03)3812-3663