

子牛における末梢血食細胞のNitroblue tetrazolium (NBT) 還元能の二, 三の検討

誌名	農林水産省家畜衛生試験場研究報告
ISSN	03882403
巻/号	88
掲載ページ	p. 17-24
発行年月	1985年5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



子牛における末梢血食細胞の Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能の二、三の検討

村田 英雄¹ 高橋 秀之¹ 松本 英人²

(昭和59年4月18日受付)

ホルスタイン種子牛を用いて、無処置の場合と去勢、輸送およびデキサメサゾン(DM)を投与した場合の末梢血食細胞の Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能(波長 565 nm で測定した吸光度で示す)について検討した。

無処置牛 8 頭を用いて時刻を決めて数日間繰り返し測定した NBT 還元能は、食作用時および非食作用時でそれぞれ 0.360 ± 0.084 および 0.180 ± 0.089 であった。この両者の差、すなわち食作用による上昇量は 0.180 ± 0.055 であった。いっぽう、個体ごとの還元能の変動範囲を変動係数で示すと、昼間のみの日内変動は 8~17%，また約 2 か月間の経日変動は 9~46% であった。

同一牛について、去勢あるいは 3 時間のトラック輸送を投与した場合、還元能は上昇した。また、7 日間連続して DM を投与した牛では、逆に還元能の低下がみられた。これらの変化は、処置による生体への負荷が解消されるに伴い、処置前の水準に回復する傾向を示した。

Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元試験は、食細胞の代謝活性を評価するための臨床検査法として、Baehner & Nathan¹⁾ により報告され、医学領域では既に臨床的に応用されている。この方法は、食作用時の代謝系の活性化に伴い、細胞内に産生される活性酸素が NBT を還元してフォルマザンに変える²⁾ ことを利用し、生成されたフォルマザンの吸光度を指標として、細胞の代謝活性を定量的に測定する方法である。この検査法を牛に適用する試みは、最近 Roth & Kaeberle によって報告されており、測定法³⁾ およびデキサメサゾン(DM)投与による変化⁴⁾ が検討された。しかし、これらの研究はまだ緒についたばかりで、この方法を牛に適用するには、通常の飼育条件下での正常値の範囲や環境変化に伴う変動の有無など、基礎的に検討すべき点が多く残されている。

本研究は、これらの検討を行なう第一歩として、無処置牛について末梢血食細胞の NBT 還元能の水準や変動範囲を観察するとともに、応用性を調べる目的で去勢、輸送および DM 投与の各処置時の還元能の変

化を検討したので、その概要を報告する。

材料と方法

1. 還元能の水準、日内変動および経日変動の検討

1) 実験牛

通常の方法で飼養された、6 か月から 12 か月齢のホルスタイン種の子牛 8 頭を用いた。被検血液は鼻環を用いて保定した牛から真空採血管により頸静脈血を採取した。

2) 経日変動と還元能の水準

5 月から 6 月にかけて 3~7 日間隔で給餌前(午前 9 時)各個体について 6~7 回ずつ、計 50 例の採取血液について、経日変動のパターンおよび個体ごとの変動係数を算出した。また、午前 9 時に採取して測定した値から個体ごとおよび全体の平均値を求め、還元能の水準とした。

3) 日内変動

午前 9 時から午後 5 時までの間、2~3 時間間隔で各個体について 5 回、計 40 回採取した血液について還元能を測定し、日内変動を調べた。給餌は午前 9 時の採血後に行なった。日内変動については、変動のパターンを検討するとともに個体ごとおよび全体の変動係

1 Hideo MURATA & Hideyuki TAKAHASHI: 農林水産省家畜衛生試験場研究第 4 部, 〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 3-1-1

2 Hideto MATSUMOTO: 同上(現在、農林水産省農林水産技術会議事務局, 〒100 東京都千代田区霞が関 1-2-1)

数の大きさを求めた。

2. 去勢、輸送およびDM投与

1) 実験牛

無処置の実験に供試した同一牛群から数頭ずつを選抜し、同じ方法で採血して以下の処置を施したときの還元能、白血球数および好酸球数の変化を調べた。な

お、同一個体について無処置時の還元能、白血球数および好酸球数の推移を調べ、処置時の対照とした。

2) 去勢

6か月齢の子牛4頭について精索結紮による無血去勢を実施した。採血は去勢直前、去勢後1, 3, 6時間および10日後に行なった。

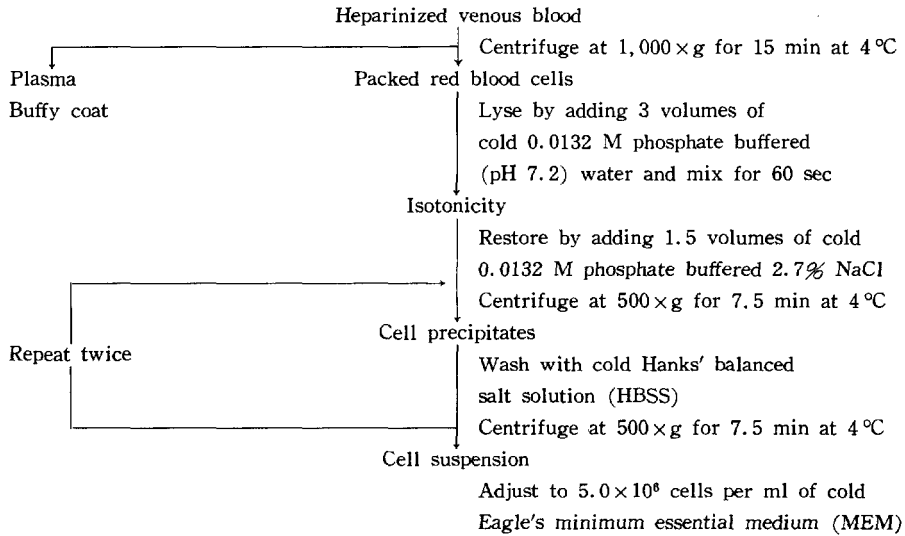
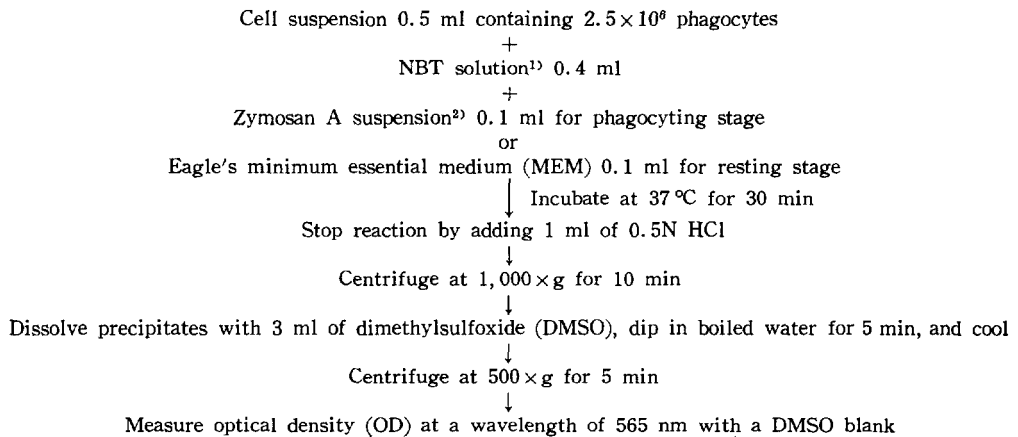


Fig. 1. Collection and preparation of peripheral blood phagocytes



1) Containing 1 mg of NBT (Sigma, Grade III) per ml of Hanks' balanced salt solution. Store in the refrigerator until use.

2) Containing 10 mg of Zymosan A (Sigma) per ml of Eagle's MEM. Store in the refrigerator until use.

Fig. 2. Procedure of NBT reduction test

3) 輸送

6か月齢の子牛4頭を用いて、3時間のトラック輸送を行なった。採血は輸送開始直前、終了直後、終了後1、3、6および20時間に行なった。

4) DM 投与

12か月齢の子牛3頭について、DM を 0.1 mg/kg 体重で皮下あるいは静脈内に1日1回7日間連続投与した。採血は投与開始直前、投与開始後3、7（投与終了日）、10、および14日に行なった。

3. 食細胞の収集と NBT 還元能の測定

1) 食細胞の収集

採取血液から採血後1時間以内に、Carlson & Kaneko の溶血法²⁾に準拠する方法で、食細胞を収集した(図1)。収集細胞のうち、平均約90%が食細胞(顆粒球, 単球)であった。

2) 還元能の測定

NBT 還元能は Roth & Kaeberle の方法³⁾を若干修正した方法(図2)で測定した。この還元能は、Baehner & Nathan¹⁾と同様に、食作用賦活物質(Zymosan A)の存在の有無、すなわち食作用時および非食作用時における食細胞の還元能を調べた。測定された吸光度は、便宜上食作用時および非食作用時の値をそれぞれP値およびR値とし、また食作用の活性

化による吸光度の変化をΔ値(Δ=P-R)として、それぞれの値を検討した。また、P値およびR値は、細胞懸濁液の代わりに MEM 培養液を使用した場合の吸光度を減じた補正值を用いた。

4. 白血球数および好酸球数の測定

白血球数は自動血球計数器(コールターカウンター)、また、好酸球数は田多井式計算盤による直接法を用いて測定した。

結 果

1. 無処置子牛における NBT 還元能

1) 還元能の水準

午前9時における還元能の個体別の平均値の範囲および全測定例の平均値と標準偏差を表1に示した。P、RおよびΔ値とも測定値のばらつきは大きかったが、同一試料についてはP値とRおよびΔ値との水準の高さ是对応する傾向がみられた。本方法で測定した子牛の還元能の水準は、全測定例の平均値でそれぞれ、0.360、0.180、および0.180であった。

2) 日内変動

還元能の昼間の推移は、個体または全体的にみて一定の傾向は認められず、採食などによる影響も観察されなかった。P、RおよびΔ値の変動係数は表2に示

Table 1. Levels of NBT reduction activity in untreated calves

Stage of phagocytes	Number of calves	Activity (optical density at 565 nm)	
		Range of individual means ¹⁾	Mean ± S.D. ²⁾
Phagocytting (P)	8	0.285 - 0.468	0.360 ± 0.084
Resting (R)	8	0.101 - 0.304	0.180 ± 0.089
Δ (P-R) ³⁾	8	0.135 - 0.276	0.180 ± 0.055

- 1) Individual mean was obtained from 6 or 7 samples from each calf.
- 2) Mean ± S.D. (standard deviation) was obtained from a total of 50 samples.
- 3) Increase in activity due to phagocytosis.

Table 2. Coefficient of variation of NBT reduction activity in untreated calves

Stage of phagocytes	Number of calves	Coefficient of variation (%)			
		Diurnal fluctuation		Day-to-day fluctuation	
		Range among individuals ¹⁾	Mean ²⁾	Range among individuals ³⁾	Mean ⁴⁾
Phagocytting (P)	8	8 - 12	22.5	9 - 31	23.3
Resting (R)	8	9 - 17	24.7	12 - 46	49.4
Δ (P-R) ⁵⁾	8	9 - 14	26.9	10 - 32	30.6

- 1) Range of 8 individual means obtained from 5 samples from each calf.
- 2) Obtained from a total of 40 samples.
- 3) Range of individual means obtained from 6 or 7 samples from each calf.
- 4) Obtained from a total of 50 samples.
- 5) Increase in activity due to phagocytosis.

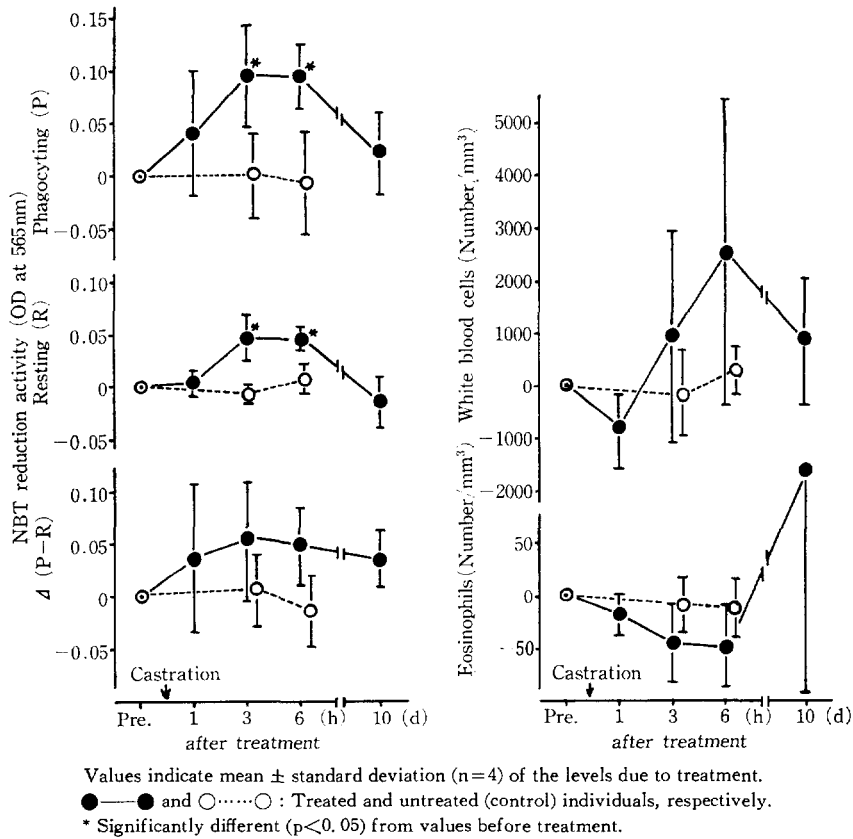


Fig. 3. Changes in NBT reduction activity, total white blood cell number and eosinophil number in calves due to castration

したように、いずれも個体間に大きな差異がみられた。

3) 経日変動

還元能の経日的な推移にも一定傾向は認められなかった。この場合P、Rおよび Δ 値の変動係数は、日内変動と比べて個体間の差異がさらに大きく、全測定例では特にR値が約2倍の変動係数を示した(表2)。

2. 処置子牛におけるNBT還元能

1) 去勢による変化

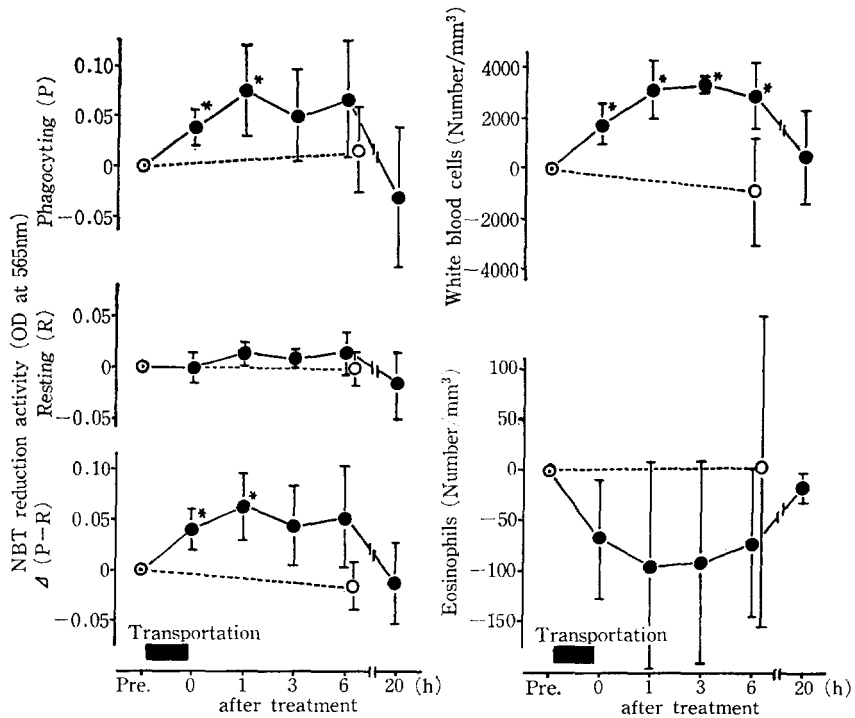
去勢による還元能、白血球数および好酸球数の変化を去勢前を基準として変化量で示した(図3)。また、同一牛について、対照として去勢前の無処置時における2点の測定値を图中に点線で示した。還元能は対照時には大きな変化を示さなかったが、去勢時には処置後3および6時間にP値とR値に有意な上昇(P<0.05)が、また Δ 値にも上昇の傾向がみられた。これらの変化は10日後には、 Δ 値を除いてほぼ処置前値に

回復した。白血球数は去勢後一時低下し、その後増加する傾向を示したが、10日後にはほぼ処置前値と同様になった。逆に好酸球数は3~6時間で低値を示した。

2) 輸送による変化

輸送の前後の還元能を比較すると、P、Rおよび Δ 値ともに輸送終了後6時間まで上昇する傾向が認められた(図4)。特に輸送直後と終了後1時間のPおよび Δ 値は輸送前に比べて有意の上昇(P<0.05)を示した。しかし、輸送終了後20時間では、すべての指標値がほぼ輸送前値にまで低下した。白血球数はNBT還元能の変化と同様な傾向を、また、好酸球数は逆の傾向を示した。これらの数値に変化がみられたのは輸送終了後6時間までで、20時間後にはほとんど輸送前値に復元した。

いっぽう、同一牛について、輸送前と輸送終了後6時間に相当する時点での無処置時の各測定値は、好酸



Values indicate mean \pm standard deviation ($n=4$) of the levels due to treatment.
 ●—● and ○—○ : Treated and untreated (control) individuals, respectively.
 * Significantly different ($p < 0.05$) from values before treatment.

Fig. 4. Changes in NBT reduction activity, total white blood cell number and eosinophil number in calves due to transportation by a truck for 3 hours

球の数値に多少のばらつきがみられたものの、いずれの値も平均値では処置前と大差がなかった。

3) DM 投与による変化

DM を 7 日間連続投与すると、還元能は P, R および Δ 値とも有意に低下 ($P < 0.05$) した (図 5)。これらの数値は投与終了後に上昇する傾向を示したが、実験期間中には投与前の水準に回復しなかった。白血球数および好酸球数は、去勢や輸送の場合と同様に、DM 投与期間中からそれぞれ増加および減少したが、変化の程度はこれらの処置の結果より顕著であった。白血球数は投与中止後 3 日目から低下の傾向がみられ、7 日後には投与前の値にまで回復した。好酸球数は 10 日目で降増加する傾向がみられたものの、実験終了時まで低い値を保った。

DM 投与に先立って、同一牛を無処置で 2 週間観察したが、還元能、白血球数および好酸球数には著明な変化は観察されなかった。

考 察

1. 無処置牛における NBT 還元能について

食細胞の機能検査法の一つである NBT 還元試験は生細胞を用いて測定される関係上、無処置動物から採取した試料でも測定値にかなりの偏差が生ずることになる。したがって、この方法を家畜に应用する場合には、家畜に適合した測定方法の検討が必要であると同時に、通常の状態で得られる値の範囲がどの程度であるかをあらかじめ調べておく必要がある。

そこで本研究は、まず測定法について若干の検討を行ない、Carlson & Kaneko²⁾ および Roth & Kaeberle³⁾ の方法を一部修正した術式 (図 1 および 2) を用いて子牛の還元能を測定した結果、P 値が 0.369 ± 0.084 というほぼ満足できる値が得られた。健康人についても、 0.319 ± 0.056 という同じような数値が報告されている。¹⁾ Roth & Kaeberle³⁾ は、opsonized zymosan を添加しないと高い還元能が得られないとしているが、本研究では食細胞に zymosan を加

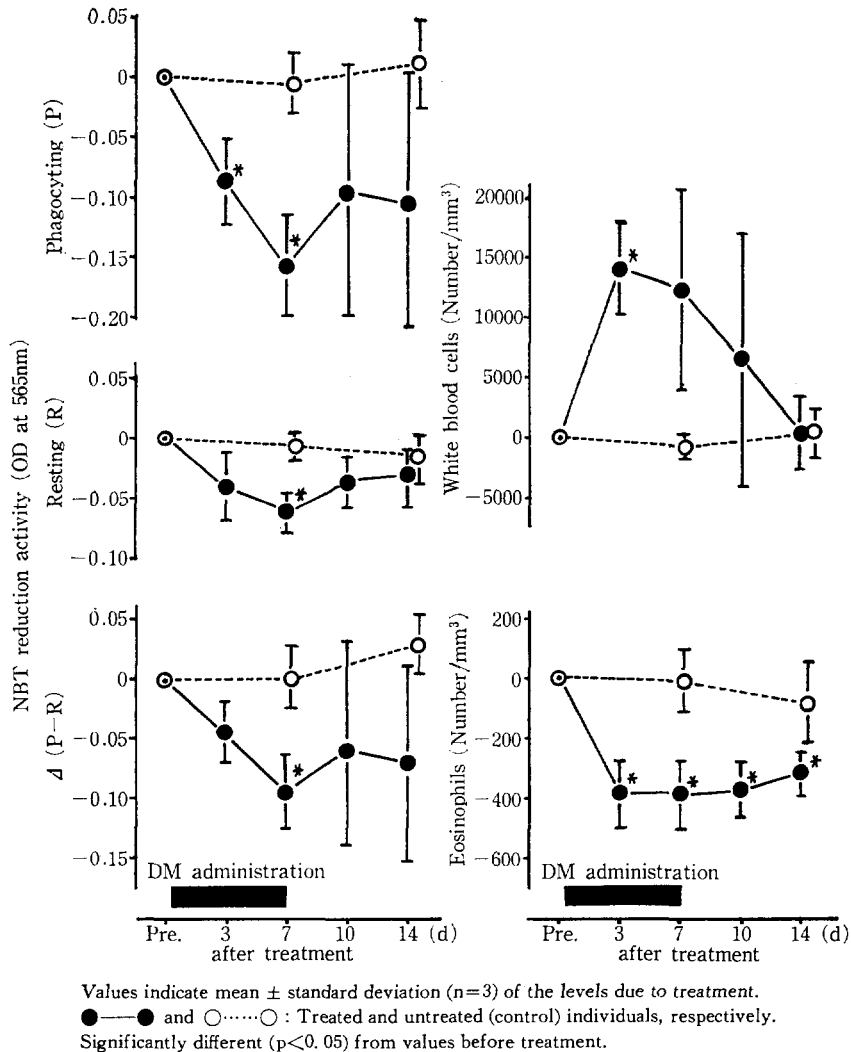


Fig. 5 Changes in NBT reduction activity, total white blood cell number and eosinophil number in calves due to dexamethasone (DM) administration

えたのみで高い還元能が得られた。この差異については、子牛と成牛の相違、測定に用いた反応液の細胞濃度、NBTの反応時間等が関係しているものと考えられたが、詳細な検討は実施しなかった。Rおよび Δ 値についても、健康人の 0.088 ± 0.020 、および 0.233 ± 0.052 ¹⁾と比較した場合、R値は若干高かったものの、 Δ 値はほぼ同一の水準であった。

次に、ほぼ健康と思われた子牛のNBT還元能が、通常の飼養条件でどの程度の変動を示すかを変動係数によって検討した(表2)。まず、昼間8時間の間の変動は比較的小さく、採食による還元能の変化も認め

られなかった。変動係数は、どの指標についても個体ごとには17%以下、全例をまとめた場合でも27%以下であった。いっぽう、午前9時における測定値の1~2か月間にわたる経日的変動は、個体間で変動の大きさが著しく異なり、変動の小さかった個体では日内変動の変動係数と大差なかったが、大きく変動した個体では50%に近い変動係数を示した。したがって、なんらかの生体負荷に対するNBT還元能の変化を調べる場合には、上述の変動の小さい個体を選別して試験を行わない限り、日中に限った試験では上述の日内変動の変動係数程度を、また、経日的な変化を調べる場

合には指標によっては25～50%程度の変動が存在することを十分考慮する必要がある。

なお、本研究では昼間に限定して日内変動を調べたが、マウスやヒトではリンパ球数の昼夜における周期性⁴⁾ (生体リズム) のあることが知られており、牛でもこれに相当する現象が夜間に認められる可能性はある。また、経日変動についても、さらに長期間の検討を続けることによって季節変動の調査が可能になると考えられるが、今後の興味ある研究対象として残されている。

2. 各種処置による変化について

成牛に合成副腎ホルモンである DM を投与すると、好酸球数の減少とともに NBT 還元能が低下する⁶⁾ ことが知られている。また、子牛を約1時間トラック輸送した場合、好酸球数の減少や白血球数の増加が観察され、なんらかのストレス状態が誘発された³⁾ とする報告がある。本研究は、これら二つの処置に去勢を加えて、いわゆるストレス状態を想定した場合の NBT 還元能の変化を検討した。

これらの処置に対する共通の反応として、好酸球数の減少と白血球数の増加がみられ、また処置を中止すると時間差はあるが、いずれも処置前値に回復する傾向があった。いっぽう、NBT 還元能の変化は、P、R および A 値の各指標とも、どの処置の場合も上述の血球数の経時的変化とかなりよく対応した経過がみられた。このことから、これらの血球と還元能の間には密接な関係があることが推察される。

還元能の変化は、輸送および去勢時にみられたように、数時間単位の極めて速い反応であった。DM 投与の場合も投与2時間後ですでに還元能が低下したという報告⁶⁾ がある。

好酸球数および白血球数はこれらの処置に対して程度の差はあったが、共通の反応を示した。しかし、NBT 還元能は DM 投与で低下し、他の2処置で上昇

した。また、DM 投与時の好酸球数および白血球数の変化を輸送および去勢の例と比較すると、DM 投与時には変化が著しく大であった。もし、これらの血球数の変化量がストレスの程度を示しているものと仮定すれば、これらの結果から、DM 投与では比較的大きなストレス刺激が長時間にわたって作用した結果、還元能は著明に低下したものと考えられる。いっぽう、去勢や輸送ではこの刺激が還元能を低下させるほどの大きさと持続時間を持たなかったものと推定される。

いずれにしても、上述の成績は、NBT 還元能が牛のストレスと感染または発病との関係を調べるための一つの手段となり得ることを示唆している。

引用文献

- 1) Baehner, B. & Nathan, D. G.: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *New Engl. J. Med.* **278**, 971-976 (1968).
- 2) Carlson, G. P. & Kaneko, J. J.: Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **142**, 853-856 (1973).
- 3) 仮屋喜弘ほか: ホルスタイン種育成牛の血液成分、体重および直腸温に対するトラック輸送の影響。草地試研報 No. 25, 68-74 (1983).
- 4) 熊谷勝男, 片岡茂樹: 免疫における時間生物学。蛋白質・核酸・酵素 **27**, 179-195 (1982).
- 5) Roth, J. A. & Kaeberle, M. L.: Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2**, 157-174 (1981).
- 6) Roth, J. A. & Kaeberle, M. L.: Effects of *in vivo* dexamethasone administration on *in vitro* bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun.* **33**, 434-441 (1981).
- 7) Zakhrieh, B. & Root, R. K.: Development of oxidase activity by human bone marrow granulocytes. *Blood* **54**, 429-439 (1979).

SUMMARY

NBT Reduction Activity of Peripheral Blood Phagocytes
in Calves Untreated or Exposed to Some StressorsHideo MURATA¹, Hideyuki TAKAHASHI¹ and Hideto MATSUMOTO²

- 1 *National Institute of Animal Health, 1-1, Kannondai 3-chome, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, 305 Japan.*
- 2 *The same institute (Present address: Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo-to, 100 Japan.)*

Nitroblue Tetrazolium (NBT) reduction activity of peripheral blood phagocytes was examined in Holstein calves untreated or exposed to such stressors as castration, transportation and dexamethasone (DM) administration. It was expressed as an optical density measured at a wavelength of 565 nm. The levels of reduction activity were 0.360 ± 0.084 and 0.189 ± 0.089 in 8 untreated calves at phagocytosing and resting stages, respectively. The difference between the two stages was 0.180 ± 0.055 , showing an increase in activity due to phagocytosis.

Diurnal (in the daytime) and day-to-day (for about 2 months) fluctuations of the levels in individual calves ranged from 8 to 17% and from 9 to 46%, respectively, as expressed with a coefficient of variation.

The levels of reduction activity increased in calves subjected to castration or transportation. By contrast, they decreased in calves treated with DM for seven successive days. Recovery from these changes was observed after the treatment was discontinued.