牛末梢血食細胞のNitroblue tetrazolium (NBT)還元能に対する保存の影響

誌名	農林水産省家畜衛生試験場研究報告
ISSN	03882403
著者名	村田,英雄
発行元	農林水産省家畜衛生試験場
巻/号	88号
掲載ページ	p. 25-27
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

短　報

牛末梢血食細胞の Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能に対する保存の影響

村　田　英　雄[1]

(昭和59年4月18日受付)

食細胞の代謝活性を評価する細胞機能検査法の一つである Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元試験[1]は，最近牛についても応用されつつある。

しかし，この方法は生細胞を扱うため，現状では採血後短時間の新鮮血に限定して測定が可能である。もし，試料の適当な保存方法が確立されれば，野外で採血した試料を検査室に持ち帰って測定することが可能となり，この試験法を用いた研究とその実用化が大いに進展するものと考えられる。

本研究は，血液の適切な保存に必要な知見を得るために，牛末梢血食細胞の NBT 還元能に対する影響を血液の冷蔵保存の場合について検討した。

実験は，12か月齢のホルスタイン種去勢子牛4頭の頸静脈から採血したヘパリン処理血液を用いて行なった。末梢血食細胞の収集および NBT 還元能の測定は，さきに報告した術式[3]によって行なった。この術式では，食細胞収集の操作が全血，赤血球層および細胞懸濁液の3過程を経ることになるので，それぞれの過程で冷蔵保存した場合の細胞回収量および NBT 還元能について検討した。また保存時間は野外試料の搬送状況を考慮し，6時間に設定した。すなわち，同一試料を4分してそれぞれ次の処置による差異について比較検討した。(1)通常処理：採血後直ちに細胞を分離した。(2)全血保存：全血の状態で氷水中に6時間保存後，細胞を分離した。(3)赤血球層保存：全血を遠心後血漿および buffy coat を除去し，赤血球層だけにした状態で氷水中に6時間保存した後，細胞を分離した。(4)細胞分離保存：通常処理による分離細胞を氷水中に6時間保存した。

なお，NBT 還元能は細胞 2.5×10^6 個当たりの NBT 還元量を波長 565 nm の吸光度で示した。また，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還元能をそれぞれPおよびR値とし，あわせて食作用による吸光度の変化量である Δ 値 (Δ=P−R) についても検討した。

食細胞の回収量について得られた結果を図1に示した。この図は，通常処理時の細胞回収量に対する冷蔵保存時の回収量を百分率で示したものである。すなわち，通常処理では赤血球層 1 mℓ 当たり $3\sim9\times10^6$ 個の細胞が回収されたが，全血および赤血球層の保存では通常処理に対してそれぞれ 85〜129%，および 66〜144% の範囲で変動した。赤血球層保存では特にばらつきが大きかったが，いずれも一定の変化を示す傾向は認められなかった。

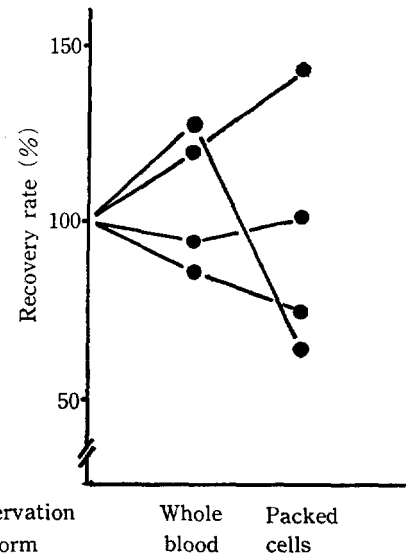

Fig. 1 Changes in recovery rate of phagocytes due to preservation in iced water for 6 hours. Each dot and dash represent each sample (n=4). The dot represents the percentage of the numbers of recovered cells per ml of packed cells in each preservation form, as compared with the results obtained by the normal procedure (100%).

1 Hideo Murata：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

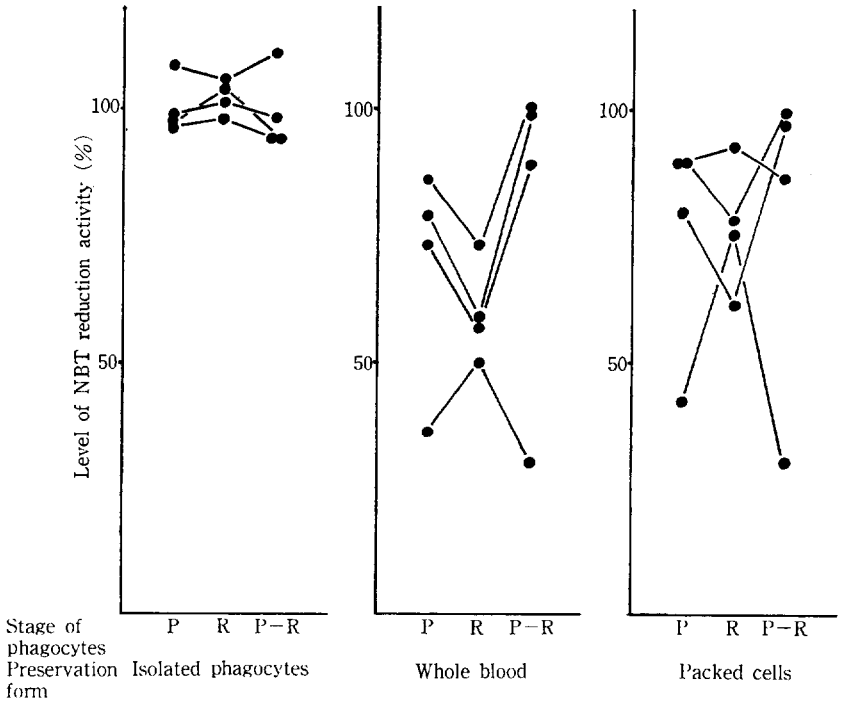

Fig. 2 Changes in levels of NBT reduction activity of phagocytes due to preservation in iced water for 6 hours. Each dot and dash represent each sample (n=4). The dot represents the percentage of the numbers of recovered cells per ml of packed cells in each preservation form, as compared with the results obtained by the normal procedure (100%). Letters P, R, and P-R stand for the phagocyting and resting stages, and an increase in activity due to phagocytosis, respectively.

次に NBT 還元能について検討した。通常処理では還元能はP，Rおよび Δ 値がそれぞれ0.377～0.481，0.100～0.246，および0.223～0.277の値を示した。この通常処理時の還元能を基準とした全血，赤血球層および分離細胞での NBT 還元能の変化を図2に示した。この図から明らかなように，分離細胞の冷蔵保存ではほぼ通常処理時と同一水準の還元能が得られたが，全血および赤血球層の保存では，PおよびR値の顕著な低下が認められた。Δ 値については，1頭が著しく低い値を示した。

以上の成績から，食細胞の NBT 還元能は採血後直ちに食細胞の分離操作を行なった後，氷水中に保存した場合は少なくとも6時間は採血直後の測定値と変らない活性を保つことが確認された。しかし，全血および赤血球層の状態で冷蔵保存した場合は，細胞の回収量が著しく変化するのみならず，還元能も顕著に低下することが認められた。いっぽう，リンパ球を全血の状態で冷蔵保存した場合には機能活性は低下するが，分離細胞で冷蔵保存した場合にはその低下は小さいという報告[2,5]があり，本実験における食細胞での成績はそれらと対応するものと考えられる。

以上の結果から，NBT 還元能測定用の野外試料は少なくとも冷却遠心設備がある場所の近辺で採取する必要があり，そこで分離した食細胞を氷水中で冷却して保存または輸送したのち，測定する方法が推奨できる。

引用文献

1) Baehner, B. & Nathan, D. G.: *New Engl. J. Med.* **278**, 971-976 (1968).
2) Hirsen, D. J., Dubin, B. A. & Malham, L. M.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **71**, 241-244 (1983).
3) 村田英雄，高橋秀之，松本英人：家畜衛試研究報告第88号，17-24(1985).
4) Roth, J. A. & Kaeberle, M. L.: *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2**, 157-174 (1981).
5) Senogles, D. R. et al.: *Am. J. Vet. Res.* **39**, 341-344 (1978).

SUMMARY

Influence of Preservation on Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Activity of Bovine Peripheral Blood Phagocytes

Hideo MURATA[1]

1 *National Institute of Animal Health*, 1-1, *Kannondai* 3-*chome*, *Yatabe-machi*, *Tsukuba-gun*, *Ibaraki-ken*, 305 *Japan*.

Influence of preservation in iced water on the NBT reduction activity of peripheral blood phagocytes were examined in Holstein steers.

The level of the activity of the phagocytes was unaffected at least for 6 hours when these cells were isolated immediately from other blood constituents and stored in iced water. By contrast, the activity showed a marked decrease when the samples were stored in iced water for 6 hours with no phagocytes isolated, or in the form of whole blood or packed cells.