

貪食細胞機能と環境要因

—イタイ・イタイ病患者および要観察者に
おけるNylon Column Dye Testの検討—

富山医科薬科大学医学部保健医学 鏡 森 定 信
富山医科薬科大学医学部研究生 Williams R.W.
富山県衛生研究所環境保健部 新 村 哲 夫
富山医科薬科大学医学部保健医学 渡 辺 正 男

結 言

ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)テストは化膿性の感染症を他の病気から鑑別する方法として1968年にPark¹⁾らによって提案された。このテストは貪食能を有する好中球が細胞内の細菌などの取り込み場所である食胞に黄色の色素のNBTを摂取し、これを還元して非溶解性の結晶性の青い物質(formazan結晶)に変えることを利用したものである。その後単球もまたこのNBTを貪食することが明らかになった²⁾。一方、貪食能のない細胞ではこの色素の取り込みおよびその細胞内還元のないことが確認されている。

ところでこのテストは細胞の代謝機能についても情報を提供する。すなわちこの色素の細胞内還元は細胞が正常な殺菌力を発揮するのに必要であるhexose monophosphate shuntの賦活に依存しており、取り込まれたNBTの還元物質であるformazan結晶の量から細胞の殺菌力に関連した代謝機能も推測できるのである³⁾。

本研究ではこのテストを使用してイタイ・イタイ病患者および要観察者(イ病患者等)の貪食細胞の機能を検討した。イ病患者の血中カドミウム(Cd)濃度は対照にくらべて高く⁴⁾、このようなCdに暴された貪食細胞がいかなる影響を受けるかをNBTテストから推測しようというわけである。微量のCdが β_2 マイ

クログロブリン産生などの白血球の機能を亢進するとの説、あるいは過剰のCdが白血球系細胞の関連する免疫機能を障害することなどが報告されているが、イ病患者等の貪食細胞の機能について検討することはこれら白血球機能に対する環境要因の影響の理解に資するものと考ええる。

対 象 と 方 法

A病院に入院しているイ病患者等とこれに性、年齢(10才間隔)を対応させた患者を同じくA病院の入院患者より選び検査の対象とした。但し対照として選出された入院患者の出生地および居住地はイ病発生地区外とした。なお実際このようにして選出された対象に男性の患者は含まれなかった。

NBTテストはSegalとPetersの方法⁵⁾にしたがって実施したがその概要を簡単に記す。末梢血を採取してヘパリン処理(20i.u./ml)をした後に、まず総白血球数をコールターカウンターにより求めた。また白血球分画像もこの血液を使用しておこない、これと総白血球数から好中球と単球数を算出しこの合計を貪食細胞数とした。これらの検査に必要な血液を取りよけたあと、ただちに血液1.5ml(2本)に15 μ gのEscherichia coliのエンドトキシン(タイプ0127:B8, Difco;1.0mg/ml)を貪食細胞によるNBTの還元力を増強させる

ために加えた。これを37°Cで10分間培養したあとショ糖(340m mol/l)を含むNB T液(4m mol/ml)とNaCl水溶液(150m mol/l)を当量ませたもの0.3mlを加え混合した。この血液とNB Tの混合液を短いパスツールピペットに100mgのナイロンウールを充填した15cmカラムに移した。このカラムによるろ過後2.0mlのNaCl水溶液(150m mol/l)で2回、ついで残留した赤血球の溶解のために2.0mlの蒸留水で1回洗浄をおこなった。このあと細胞による色素の還元反応を中止させるため2滴のHCl水溶液(100m mol/l)を加え、最後にもう1回蒸留水で洗浄をおこなった。

還元作用の結果できたformazanを抽出するためにカラムの中央近くのナイロンウールを回収し、これを70°Cに加熱した5.0mlのデオキサンで20分間洗浄した。この抽出をよりよくおこなうためにナイロンウールとデオキサンの入った容器を洗浄の前後と途中の3回手ではげしく振とうした。このあと抽出液を1,000gで10分間遠心し、分光光度計(520nm)によりその吸光度を測定した。なお吸光度による血液1mlあたりのformazanの産生量(nmol formazan/ml of blood)の表示は同じくSegalとPetersの方法により標準液を作成しておこなった。また貪食細胞1個あたりの産生量

表2 イ病患者等のNB Tテストの対照との比較

イ病患者等	年令	formazan 産生量		対照者	年令	formazan 産生量	
		n mol / ml of blood	f mol formazan / phagocyte			n mol / ml of blood	f mol formazan / phagocyte
S. K.	58	23.5	11.3	N. F.	53	20.5	8.0
U. K.	82	29.0	7.3	H. K.	85	17.3	4.2
T. S.	67	17.9	10.4	Y. S.	71	18.2	8.4
M. F.	55	16.7	5.7	I. T.	53	15.4	9.0
K. Y.	60	4.8	3.7	M. K.	59	18.5	10.1
N. K.	66	16.4	9.9	O. S.	68	30.4	6.1
M. K.	71	18.8	6.9	B. Y.	80	27.7	9.0
F. H.	68	14.0	5.4	N. K.	62	24.0	15.0
I. T.	69	3.1	4.4	T. N.	73	17.8	7.4
S. T.	75	11.3	7.1	M. N.	81	25.7	7.9
S. M.	69	15.4	7.7	T. Y.	74	22.6	5.3
K. K.	75	14.1	11.5	N. S.	81	18.5	6.2
平均 (M±S.E.)	68±7	15.4 ± 2	7.6 ± 0.75		70±3	21.4 ± 1.4	8.0 ± 0.8

*paired t-testにより対照に比較して有意に減少 (0.01<P<0.05)

(fmol formazan/phagocyte)の算出もおこなった。

このNB Tテストの患者一対照研究の結果、単位血液量あたりのformazan産生量がイ病患者等において有意に減少していたので、この検査をした年の入院患者の熱発回数についてNB Tテストの場合と同じく患者一対照研究を実施した。A病院では熱発を呈した患者以外は通常1日に2回検温を実施しているので、この検温の記録をふり返って調査し37°C以上ある場合を熱発として1,000回検温あたりの熱発回数で熱発頻度を表示した。なお熱発のある場合はこの定期検温以外に測定が実施されるが定期以外のものは回数の算出に加えなかった。

成 績

末梢血液中の血球成分を赤血球、総白血球、および貪食細胞においてイ病患者等と対照について表1に示した。従来からも報告されてい

表1 イ病患者等の血球成分の対照との比較

	年令	赤血球数 (×10 ⁴ /mm ³)	総白血球数 (mm ³ 当り)	貪食細胞数 (mm ³ 当り)
イ病患者等 (n=12)	68±2	303 ± 16	4,850±410	2,042±258
対 照 (n=12)	70±3	356 ± 13	4,875±316	2,503±344

(M±S.E.)

* paired t-testにより対照に比較して有意に減少 (P<0.01)

る通りイ病患者等の赤血球数は対照にくらべて有意に減少していたが、総白血球数および貪食細胞数でもイ病患者等の平均値がいずれも対照に比較して小さかった。特に貪食細胞数では総白血球数の場合にくらべてイ病患者等と対照の平均値の差異は大きかったが、個人の数値の変動が大きかったのでその差異は有意とはいえなかった。

血液 1 ml 当りの formazan 産生量および貪食細胞 1 個あたりの formazan 産生量の成績をイ病患者等と対照について表 2 に示した。単位血液量当りの formazan 産生量の平均値はイ病患者等で 15.4 n mol, 対照で 21.4 n mol であり、前者が後者に比較してその産生量は有意に減少していた (paired t-test; 0.01 < P < 0.05)。また貪食細胞 1 個当りの formazan の産生量にして比較したところイ病患者等のその平均値は 7.6 f mol formazan, 対照のそれは 8.0 f mol formazan であり、イ病患者等の貪食細胞では対照にくらべてその値が小さかった。しかしこの差異は統計的に有意とはいえなかった。

単位血液量当りの formazan 産生量はその血液に含まれる貪食細胞数に依存していると考えられるので、貪食細胞数と単位血液量当りの formazan 産生量の関連を図 1 に示した。イ病患者等、対照いずれの群においても貪食細胞

数が増加するにともない単位血液量当りの formazan 産生量も増加する傾向を示し、その相関係数は前者で 0.79 (P < 0.01)、後者で 0.63 (0.01 < P < 0.05) であった。しかしイ病患者等ではその分布が対照に比較して貪食細胞数が少ない方に偏っており、また単位血液量当りの formazan 産生量も対照に比較して少ない方に偏っていた。

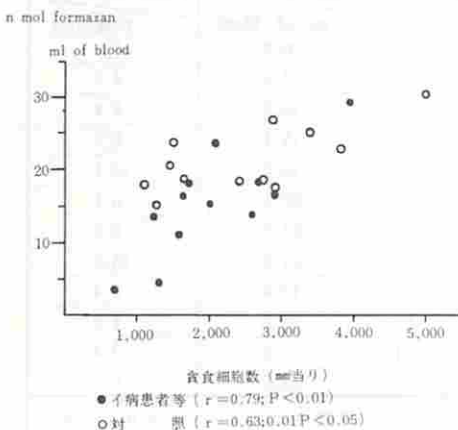
イ病患者等の熱発の頻度を対照と比較して表 3 に示した。この熱発回数の調査は NBT テスト実施の時期とずれていたため、対象の一部のみしか NBT テストと同一人で検討することができなかった。観察した 12 人のイ病患者等の平均年齢は 73 才 (標準誤差 S.E.; 2)、平均入院期間は 288 日 (S.E.; 27)、そして熱発回数は 1,000 回検温当り 92 回 (S.E.; 28) であった。一方、対照の平均年齢は 73 才 (S.E.; 32)、平均入院期間は 272 日 (S.E.; 27)、そして熱発回数は 1,000 回検温当り 53 回 (S.E.; 21) であった。両群の平均年齢および平均入院期間はほとんど同じであったが、熱発回数ではイ病患者等が対照に比較して有意に多い傾向を示していた (paired t-test; 0.05 < P < 0.1)。

表 3 イ病患者等の熱発回数の対照との比較

イ病患者等	年 令	熱発回数 (検温 1,000回 当り)	対 照	年 令	熱発回数 (検温 1,000回 当り)
T. S.	65	3	O. S.	67	85
K. Y.	60	213	N. F.	53	20
I. T.	69	63	T. N.	72	22
T. S.	65	18	Y. S.	71	18
N. K.	75	211	T. Y.	74	169
K. T.	84	43	B. Y.	80	13
N. S.	76	297	M. M.	73	235
S. T.	76	44	Y. K.	77	9
Y. K.	77	75	H. S.	74	4
S. M.	85	26	M. M.	81	7
S. Y.	79	111	F. T.	79	17
N. F.	70	3	F. K.	74	34
平均 (M ± S.E.)	73 ± 2	92 ± 28*		73 ± 2	53 ± 21

* Paired t-test により対照に比較して 0.05 < P < 0.1 の危険率で熱発回数が多い。

図 1 イ病患者等と対照の貪食細胞数と NBT テストの関連



考 察

このNBTテストでは貪食細胞の数、貪食作用、ナイロンファイバーへの吸着作用、そしてNBT色素の還元作用などが総合的に評価される。また本研究ではエンドトキシンでこの細胞を刺激しているの、エンドトキシンに対する感受性という要素も考慮する必要がある。イ病患者等では単位血液量当りのformazan産生量は対照に比較して有意に減少していたが、貪食細胞1個当たりのformazan産生量では対照とくらべてその平均値は小さかったものの、有意な差とはいえなかった。すなわちナイロンファイバーに吸着した個々の貪食細胞ではイ病患者等、対照ともにその機能に著しい差異はみられなかったわけである。したがって単位血液量当りのformazanの産生量のイ病患者等と対照の差異は両群の貪食細胞の数があるいはナイロンファイバーへの吸着作用の相違のいずれかによるものと推測される。イ病患者等が対照にくらべて貪食細胞数の平均値が小さかったが、この差異が単位血液量当りのformazan産生量の比較ではより著しくなったということがまず考えられる。貪食細胞のナイロンファイバーへの吸着能の減退は慢性的顆粒球異常症や全身性エリテマトーデスなどNBTテストで機能低下を示す代表的な疾患でもこれまで観察されておらず⁵⁾⁶⁾、また貪食細胞1個当たりのformazan産生量の成績からみればさらにエンドトキシンでも対照と同様にイ病患者等の貪食細胞の機能が刺激されていると考えられることから、ナイロンファイバーへの吸着能のみが障害されているとする根拠はない。しかしこの点については今後さらに検討を加える必要がある。

種々の疾患や薬剤がNBTテストの結果に影響することが報告されているが⁶⁾、そのうちでイ病患者等との関連では骨形成不全症とサルチル酸などの鎮痛剤の使用が問題となる。前者ではformazanの産生量がむしろ増加するので今回は検討の対象とならないが、後者は

イ病患者等の治療としてイブプロフェンやベンゾダミンハイドクロライドなどの各種鎮痛剤が使用されていたことから、これらの使用が今回のNBTテストにおける成績に関連している可能性は否定できない。しかしながら本研究の対照においてもほぼ同じ種類の鎮痛剤が頻度・使用量ともイ病患者等と同じように使用されていたことから両者の差異をこの鎮痛剤の使用に帰することはできない。

このようなイ病患者および要観察者のNBTテストの異常が何によるものであれ結果として感染症を引きおこしやすい状態にあることが推測されるので、熱発頻度を指標として対照と比較したところイ病患者等ではその回数が多い傾向を示した。今回の検討ではねたきりで褥瘡を有する患者は除外しており、イ病患者等では熱発をくり返すような特定の疾患に罹患している者はいなかった。なお対照で2人(M.M.73才 T.Y.74才)熱発回数の多い者がいたが1人は慢性関節リウマチ、他の1人は脳卒中後遺症者であった。熱発回数の多いイ病患者(K.Y.60才)ではNBTテストも実施されていたが3.7 f mol formazan/phagocyteと貪食細胞の機能は低下しており、熱発回数の多い原因として貪食細胞の機能不全も関与していることが示唆された。

結 論

イ病患者および要観察者の12人についてNBTテストによる貪食細胞機能検査を実施し対照と比較検討した。

イ病患者等の単位血液量当りのformazan産生量の平均は15.4n molであり対照の21.4n molに比較して有意(0.01 < P < 0.05)に減少していたが、貪食細胞1個当たりのformazan産生量ではイ病患者等の平均が7.6f mol、対照では8.0f molであり著しい差異はみられなかった。

熱発の頻度をイ病患者等と対照と同様に比較したところ前者は1,000回検温当たりの平均が92回、後者では73回でありその差は有意な

傾向 ($0.05 < P < 0.1$) であった。

謝 辞

本研究の実施に対して、御援助と貴重なアドバイスをいただいた荻野昇博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) Park, B.H., Fikrig, S.M. & Smithwick, E.M.: Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic acid. *Lancet*, ii, 532-534, 1968.
- 2) Humbert, J.R., Marks, M.I., Hathaway, W.E. & Thoren, C.H.: The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infections. *Pediatrics*, 48, 259-267, 1971.
- 3) Thompson, R.A. (ed.): *Techniques in clinical immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977, page 204-206.

- 4) 岩田隆, 城石和子, Tord Kjellström, 穴山道子, 西野治身, 渡辺正男: イタイイタイ病発生地域住民の血中カドミウム濃度について, *日衛誌*, 31(1), 96, 1976.
- 5) Segal, A.W. & Peters, T.J.: The nylon column dye test: A possible screening test of phagocyte function. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 49, 591-596, 1975.
- 6) Segal, A.W.: Nitroblue-tetrazolium tests. *Lancet*, ii, 1248-1252, 1974.
- 7) Humbert, J., Marks, M.I., Hathaway, W. E. & Thoren, C.H.: The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infection. *Pediatrics*, 48(2), 259-267, 1971.
- 8) Douwes, F.R.: Clinical value of NBT test. *Lancet*, 287(i), 822, 1972.