

ラット腹腔肥満細胞に関する研究

第2報：肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみに対する BSA の影響について

岡山大学三朝分院内科

谷崎勝朗・田中淳太郎・駒越春樹・森永 寛

岡山大学第2内科

岸 本 卓 巳 ・ 木 村 郁 郎

クレイトン大学内科

Robert G. TOWNLEY

(1981年12月24日受付)

緒 言

肥満細胞からのヒスタミン遊離は、抗原, concanavalin A, compound 48/80, dextran, band-2 protein などの刺激によって惹起され、いずれも Ca^{2+} 依存性である。これらの刺激に際し細胞内 Ca^{2+} は必須であり、遊離機構の後期に必要とされるのに対し、細胞外 Ca^{2+} は遊離機構の初期に必要とされ、細胞膜の流動性に関係していると考えられる。この細胞外 Ca^{2+} への依存性は刺激物質の種類により異なり、例えば抗原刺激の際は、compound 48/80 と比べより依存性が高い (DIAMANT, B., 1975)。最近石坂ら (ISHIZAKA, T., et al., 1980) は、抗原刺激でラット肥満細胞上の IgE receptor が binding することにより、細胞膜面で phospholipid methylation が起こり、その結果細胞内への Ca^{2+} の取りこみ、ひきつづきヒスタミン遊離が惹起されると報告している。すなわち、細胞内への Ca^{2+} の取りこみのためには、細胞膜の流動化により calcium gate が開く必要があることを示唆している。

一方肥満細胞の比重遠心法による purification では、density medium により肥満細胞の反応性が低下する可能性が示唆 (RANADIVE, N. S., 1980) されている。最近 COURTS (COURTS, S. M., 1980) らは、BSA, Ficoll, Metrizamide などの density media により肥満細胞の抗体結合能やヒスタミン遊離が低下することを報告している。しかし、肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみに及ぼす density media の影響については、従来報告がなく不明な点が多い。今回著者らは、感作ラット腹腔肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみに及ぼす BSA の影響について若干の検討を加えたので、その概略を報告する。

対象並びに方法

対象：体重200~250gの雄または雌の sprague-Dawley 系ラットを使用した。ovalbumin 50mg/ml および Brodetella Pertussis 8×10^8 /ml を含む生理食塩水0.5ml を、両側大腿部に筋肉注射することによりラットを感作 (FOREMAN, J. C., 1977) し、感作後10~12日で屠殺し、腹腔肥満細胞および血清を採取した。採取した血清は $-20^{\circ}C$ で保存し、肥満細胞の受身感作に用いられたが、この保存血清の72時間 PCA titer は $\times 64$ であった。保存血清中の IgE 抗体の不活化は、 $56^{\circ}C$, 3時間の熱処理により行われた。IgE 抗体を含む保存血清、熱処理血清および正常ラット血清による肥満細胞の受身感作は、2倍希釈血清で $37^{\circ}C$, 1時間行った。この受身感作後の肥満細胞は、生理食塩水で2回洗滌後実験に供された。この際 BSA の影響を観察するため、第1報に述べた purification の方法に準じて肥満細胞を採取し、BSA による separation 前あるいは後に受身感作を行った肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみについて検討した。

肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみについては、RANADIVE (RANADIVE, N. S., 1980) らの方法に準じて行った。各試験管に 0.1ml の ^{45}Ca calcium chloride ($3\mu Ci/0.1$ ml, Spec. act 16.6mCi/mg, New England Nuclear) および 0.7ml の ovalbumin ($10\mu g/ml$) を含む Tyrode 液を入れ、 $37^{\circ}C$ 恒温槽であらかじめ温めた。そして、0.2ml の細胞浮遊液 ($10^5/0.2ml$) を加え、おだやかに振盪させながら10分間 incubate した。なお対照としては、ovalbumin を含まない Tyrode 液を使用した。incubation 終了後あらかじめ氷で冷やした生理食塩水5mlを加え、反応を stop させた後、 $300 \times G$, 10分

間遠心を行った。この生理食塩水による洗滌を2回くりかえした後、glass microfiber filter (Gelman, Type A/E: Pore size 0.2~10 μ m) により残存する free の ^{45}Ca を除去し、liquid scintillation counter により細胞に取りこまれた ^{45}Ca の radioactivity を測定した。なお本研究では、1回の実験に2~3匹のラットが使用され、肥満細胞の purity は平均96.6% (91.8%~98.5%) であった。また全ての ^{45}Ca 取りこみ実験は、triplicate で行われた。

成績

感作ラットから採取された肥満細胞では、抗原 (ovalbumin) 刺激により Ca^{2+} の取りこみは増加傾向を示した。この際の肥満細胞の ^{45}Ca 取りこみは、平均 $1495 \pm 104\text{cpm}$ (Mean \pm SEM) であり、対照の肥満細胞の ^{45}Ca 取りこみ、 $325 \pm 31\text{cpm}$ と比べ明らかに高値を示した。一方 BSA による separation 前に IgE 抗体を含む血清で受身感作をした肥満細胞 (pre-sensitization) では、抗原刺激により ^{45}Ca の取りこみは増加し、その値は平均 $1095 \pm 55\text{cpm}$ であった。BSA によ

る separation の後で受身感作をした肥満細胞 (Post-sensitization) では、 ^{45}Ca の取りこみは平均 $1182 \pm 225\text{cpm}$ であったが、その範囲は 319 から 1968 cpm までかなり大きなばらつきを示した (Fig. 1)。

熱処理血清で incubate された肥満細胞の ^{45}Ca の取りこみは、separation 前 $375 \pm 20\text{cpm}$, separation 後 $321 \pm 27\text{cpm}$ であり、separation 前に incubate した肥満細胞による ^{45}Ca 取りこみがやや高い値を示したが、両者間に有意の差は認められなかった。また正常ラット血清で incubate した肥満細胞の ^{45}Ca 取りこみは、separation 前 $327 \pm 47\text{cpm}$, separation 後 $344 \pm 48\text{cpm}$ であった。すなわち、熱処理血清および正常ラット血清での incubation の場合は、separation の前と後とで ^{45}Ca の取りこみに差は認められなかった。以上の結果より、本実験における抗原刺激による ^{45}Ca 取りこみの増加は、IgE 抗体に mediate される反応系であることが判明した。なお細胞浮遊液を用いない blank での ^{45}Ca radioactivity は $114 \pm 15\text{cpm}$ であった (Fig 2)。

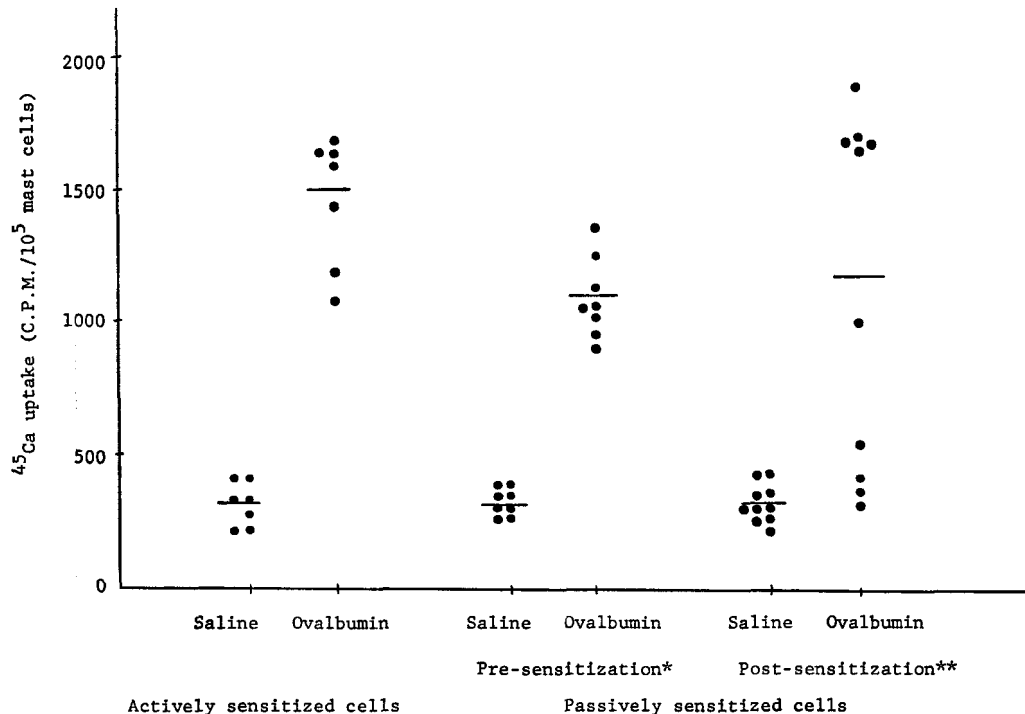


Fig. 1. ^{45}Ca uptake of actively sensitized mast cells and passively sensitized before or after separation by BSA. Horizontal bar represents mean.

*Mast cells were sensitized before purification. **Mast cells were sensitized after purification.

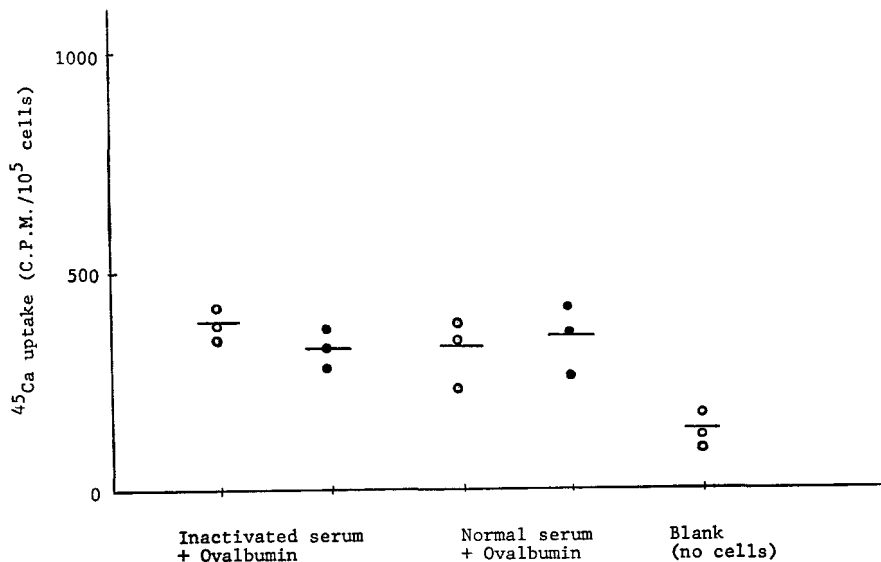


Fig. 2. ^{45}Ca uptake of mast cells incubated with inactivated or normal serum before separation (open circle) or after separation (closed circle). Horizontal bar represents mean.

総括並びに考案

肥満細胞はヒスタミン, SRS-A, ECF-A, PAF などの chemical mediator を遊離するため, 細胞膜面の hospholipid methylation, Ca^{2+} の取りこみなどを含めて, 遊離機構を解明するためには有用な実験モデルの1つである. しかし, density media により purify された肥満細胞の遊離機構について検討する場合は, density media の細胞膜に及ぼす影響が考慮されなければならない. RANADIVE (RANADIVE, N.S., 1973) らは, 30% Ficoll で purify された肥満細胞は, 30% BSA に比べ compound 48/80 によるヒスタミン遊離量が少なく, 同等のヒスタミン遊離を観察するためには約5倍量の compound 48/80 が必要であったと報告している. また COURTTS (COURTTS, S.M., 1980) らは, density media により purify された肥満細胞では, compound 48/80 や Ca ionophore A 23187 に対する反応性が低下することを観察している. 彼らは同様に, density media により purify された肥満細胞の IgE receptor の結合能はかなり減少しており, その減少率は BSA で 50%, Ficoll で 76%, Metrizamide で 79% であり, 同時にヒスタミン遊離も減少すると報告している. さらに肥満細胞の受身感作の場合には, density media による separation 前に行うと, separation 後に比べ抗原に対する反応性の減少度合が少なかったと述べている. これらの所見は, ヒスタミン遊離や IgE

receptor 結合能が desity gradient purification により影響を受ける可能性を示唆している.

Ca^{2+} はヒスタミン遊離機構の trigger としての重要な役割を持っており, 特に抗原抗体反応の場合には細胞外 Ca^{2+} 依存性 (FOREMAN, J.C., 1973) が強い. しかしながら, density media の肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみに及ぼす影響については, 十分な検討がなされていない. 本論文では, BSA density media により purify された肥満細胞の Ca^{2+} 取りこみについて検討を加えた. その結果, 能動感作の肥満細胞では, 抗原刺激により一定の Ca^{2+} の取りこみ増加が認められた. また受身感作の肥満細胞でも, BSA による separation 前に感作した場合には, ほぼ同様の結果が得られた. 一方 separation 後に感作した場合には, 一定の Ca^{2+} 取りこみ増加を示さず, 実験によりかなりの取りこみの差が認められた. この理由は十分明らかではないが, COURTTS らは, 受身感作前の density media により IgE receptor が被われてしまうか, あるいは不活性化されるかもしれないと推測している. なお本論文において, separation 前の受身感作肥満細胞において, separation 後に比べ ^{45}Ca の取りこみがやや少いのは, 感作後の洗滌回数差 (separation 前では5回, 後では3回) が影響しているかもしれない. いづれにせよ, BSA により purify した肥満細胞を受身感作する場合は, separation 前に行うことが望ましいと考えられる.

結 語

density media である BSA の肥満細胞膜に対する影響を検討するため、能動および受身感作した肥満細胞の抗原刺激時の Ca^{2+} 取りこみについて観察した。能動感作肥満細胞の抗原刺激時の ^{45}Ca 取りこみは、平均 1495 ± 104 cpm であり、また BSA による separation 前に受身感作した肥満細胞では 1095 ± 55 cpm であり、いづれもほぼ一定の ^{45}Ca の取りこみ増加が観察された。一方 BSA による separation 後に受身感作した肥満細胞では、実験により ^{45}Ca 取りこみにかなりの差がみられ、ある程度 BSA の影響があったものと考えられた。また熱処理により IgE 抗体を不活化した血清では、 ^{45}Ca 取りこみの増加がほとんど認められなかったことから、本研究の抗原抗体反応は IgE 抗体に mediate されたものであることが明らかにされた。

(本研究の一部は、著者の 1 人谷崎が米国留学中に行ったものであり、data の分析に協力頂いたクレイトン大学内科 Gavin WATT 氏に感謝します)

文 献

- 1) COUTTS, S.M., NEHRING, R.E. Jr. and JARIWARA, N.U. : Purification of rat peritoneal mast cells : Occupation of IgE-receptors by IgE prevents loss of the receptors. *J. Immunol.*, **124**, 2309-2315, 1980.
- 2) DIAMANT, B. and PATKER, S.A. : Stimulation and inhibition of histamine release from isolated rat mast cells. Dual effect of ionophore A23187. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **49**, 183-207, 1975.
- 3) FOREMAN, J.C. and MONGAR, J.L. : The role of alkaline earth ions anaphylactic histamine secretion. *J. Physiol.*, **224**, 743-769, 1973.
- 4) FOREMAN, J.C., HALLETT, M.B. and MONGAR, J.L. : The relationship between histamine release and ^{45}Ca uptake by mast cells. *J. Physiol.*, **271**, 193-214, 1977.
- 5) ISHIZAKA, T., HIRATA, F., ISHIZAKA, K. and Axelrod, J. : Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{2+} influx and histamine release by bridging of IgE receptors on rat mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1903-1906, 1980.
- 6) RANADIVE, N.S. and RUBEN, D.H. : Mechanism of histamine release from rat mast cells by compound 48/80. Comparison with the release induced by cationic protein. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **44**, 745-758, 1973.
- 7) RANADIVE, N. S. and DHANANI, N. : Movement of calcium ions and release of histamine from rat mast cells. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **61**, 9-18, 1980.

STUDIES ON RAT PERITONEAL MAST CELLS

2. EFFECT OF BSA ON Ca^{2+} UPTAKE OF MAST CELLS

by Yoshiro TANIZAKI, Juntaro TANAKA, Haruki KOMAKOE, Hiroshi MORINAGA,
Department of Medicine, Misasa Medical School, Okayama University Medical School
Takumi KISHIMOTO, Ikuro KIMURA,
2nd Department of Medicine, Okayama University Medical School

and Robert G. TOWNLEY
Department of Medicine, Creighton University School of Medicine

Abstract: To examine the effect of BSA on the cell surface of mast cells, the ^{45}Ca influx was observed in mast cells from actively sensitized rats and also in cells passively sensitized with IgE-containing serum before or after purification by BSA. The mast cells from actively sensitized rats showed a marked increase in the ^{45}Ca uptake with stimulation by ovalbumin. The value of ^{45}Ca uptake by the cells was 1495 ± 104 cpm / 10^5 cells. The uptake of ^{45}Ca by mast cells passively sensitized before or after separation through BSA was also increased in response to ovalbumin, although the degree of ^{45}Ca uptake by the latter showed marked variation. These results may suggest that BSA affects mast cell surface when the cells are sensitized after separation by BSA.