

ラット腹腔肥満細胞の⁴⁵Ca uptake および ヒスタミン遊離に関する研究

第1編

ラット腹腔肥満細胞の分離法並びに反応性の検討

岡山大学医学部第2内科学教室 (主任: 木村郁郎教授)

大 谷 純

(昭和62年5月6日受稿)

Key words : rat peritoneal mast cell
purification
reactivity
⁴⁵Ca uptake
histamine release

緒 言

抗原抗体反応によって惹起される肥満細胞からのヒスタミンなどの化学伝達物質遊離は、気管支喘息発症に関するアレルギー反応の主体をなすものである。化学伝達物質の遊離は、抗原¹⁾の他、concanavalin A²⁾, compound 48/80³⁾, calcium ionophore A 23187⁴⁾, dextran⁵⁾などによる刺激の際にも観察されるが、抗原やCon. A刺激による化学伝達物質の遊離機序については、近年特に詳細な検討がなされている^{6)~8)}。すなわち抗原刺激により、細胞膜の透過性が亢進し、細胞内へのCa²⁺の流入がひきおこされる⁹⁾¹⁰⁾。そして、ヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離が促進される。この際細胞内へのCa²⁺流入とヒスタミン遊離とはある程度の相関関係を有すると云われる¹¹⁾。また他の刺激物質による刺激の際も、いずれも何らかのCa²⁺依存性を持つ。したがって化学伝達物質遊離機序の初期段階としてのCa²⁺流入過程について観察を深める意義は大きい。

ラット腹腔肥満細胞は、従来から化学伝達物質遊離機序解明のための実験モデルとして使用

されることが多い。肥満細胞の分離法としては、BSA¹²⁾, Ficoll¹³⁾¹⁴⁾, HSA¹¹⁾, Metrizamide¹⁵⁾などの溶媒を用いた比重遠心法が考案され、それぞれにかなりの高い比率の肥満細胞が得られている。しかし、これらの溶媒の細胞膜に対する影響の問題や回収率に関してはなお目的意識が少ない。今回著者はBSAを用いた比重遠心法によりラット腹腔肥満細胞の高い比率、高い回収率での分離を試み、同時に分離した肥満細胞の⁴⁵Ca uptake およびヒスタミン遊離について若干の検討を加えたのでその結果を報告する。

対象並びに方法

第1節 対象

実験動物としては体重200~250 gの雄または雌のSprague-Dawley系ラットを使用した。

第2節 方法

第1項 ラットの感作方法

ovalbumin 50mg/ml および Bordetella Pertussis 8 × 10⁸/ml を含む生理食塩水0.5mlを、両側大腿部に筋肉内注射することによりラットを感作し¹¹⁾、感作後10-14日で屠殺し、腹腔

肥満細胞および血清を採取した。この肥満細胞は能動感作肥満細胞として使用した。血清は肥満細胞の受動感作に用いられたが、この血清の72時間 PCA titer は×64であった。なお受動感作は2倍稀釈血清で37℃、1時間行い、感作後の肥満細胞は生理食塩水で2回洗浄後実験に供された。

第2項 腹腔肥満細胞の分離方法

ラット腹腔からの肥満細胞の分離は、(1)腹腔洗浄、(2)細胞洗浄、(3)細胞分離の3段階の過程で行った。なお肥満細胞数およびその他の細胞数は、白血球用メランジュールを用いて、木村らの好塩基球好酸球同時直接算定用稀釈液¹⁶⁾¹⁷⁾にて1:10に稀釈染色後、Fuchs-Rosenthal 計算盤上で算定した。

(1) 腹腔洗浄

ラットを pentobarbital sodium で麻酔し、心穿刺により脱血後腹腔正中線に小切開(長さ約1cm)を入れた。この小切開口より腹腔洗浄液(0.1% gelatin, 0.1% BSA および heparin 25単位/mlを含む生理食塩水)10mlを注入し、200回腹壁をおだやかにマッサージした後、腹腔内液を試験管に採取した。この操作を4回反復して行った。

(2) 細胞洗浄

腹腔洗浄により採取した腹腔内液を、300×g、10分間遠心し、上清を捨て細胞成分を回収した。ここで細胞を洗浄すると同時に肥満細胞以外の比重の軽い細胞をある程度除外するために、細胞成分に約8mlの生理食塩水を加え、50×g、10分間の低速遠心で細胞洗浄を行った。

(3) 細胞分離

40% (W/V) 及び 56% (W/V) の BSA (Fraction V, Sigma) 溶液を生理食塩水で作製し、比重遠心法により細胞分離を行った。試験管(15×102mm)にまず2mlの56% (W/V) BSA を入れ、ついで2mlの40% (W/V) BSA を重層し、最後に細胞洗浄後の細胞浮遊液2mlを重層した。この試験管を室温で20分間静置した後、300×g、20分間遠心した。56% (W/V) BSA 層に集積した肥満細胞をより高い比率で得るために、細胞浮遊液層、40% (W/V) BSA 層を吸引除去した後、56% (W/V) BSA

層の表面を生理食塩水で慎重に2~3回洗浄した。その後、56% (W/V) BSA 層に生理食塩水を加え、300×g、10分間の遠心操作を3回行い、細胞表面に付着した BSA を洗浄した。かかる操作後に得られた肥満細胞は、顕微鏡下の形態的観察では95%以上が正常であった。

第3項 肥満細胞の⁴⁵Ca uptake の測定方法

肥満細胞の⁴⁵Ca uptake については、Ranadive^ら¹⁰⁾の方法を発展させて行った。各試験管に0.1mlの⁴⁵Calcium chloride(3 μCi/0.1ml)および0.7mlの Tyrode 液(1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl)を入れ、37℃恒温槽であらかじめ温めた。なお各種刺激物質はこの Tyrode 液に加えた。そして0.2mlの細胞浮遊液(5×10⁵肥満細胞/ml)を加え、おだやかに振盪させながら10分間孵置した。孵置終了後、あらかじめ氷で冷やした生理食塩水5mlを加え反応を中止させた後、300×g、10分間の遠心を行った。この生理食塩水による洗浄を2回くり返した後 glass microfiber filter (Whatman, type GF/C, pore size 1.2 μm)により残存する free の⁴⁵Ca を除去し、liquid scintillation counter により細胞に取り込まれた⁴⁵Ca の radioactivity 測定した。なおすべての⁴⁵Ca uptake の実験は triplicate で行った。

第4項 肥満細胞からのヒスタミン遊離の測定方法

肥満細胞からのヒスタミン遊離の測定は以下の方法で行った。各種刺激物質を含む Tyrode 液0.8mlをシリコン化試験管に入れ、37℃恒温槽であらかじめ温めた後、細胞浮遊液0.2mlを加え15分間孵置した。孵置終了後、0℃氷水中に入れ反応を中止させた後、4℃、300×g、10分間遠心し、上清と細胞成分に分離した。上清と細胞成分それぞれのヒスタミン含量を測定し、

ヒスタミン遊離率

上清のヒスタミン含量

= $\frac{\text{上清のヒスタミン含量}}{\text{上清のヒスタミン含量} + \text{細胞成分のヒスタミン含量}}$ × 100

上清のヒスタミン含量

+ 細胞成分のヒスタミン含量

として表わした。なおヒスタミンの測定は、上清に0.8Nの過塩素酸1mlを加え、また細胞成分にはTyrode液を加えて1mlとして、1.0Nの塩酸を1滴添加し、100℃、10分間煮沸後、0.8Nの過塩素酸1mlを加え、ともに4℃にて2200×g、20分間遠心し、その上清のヒスタミンをTechnicon社の自動分析測定装置¹⁸⁾¹⁹⁾にて測定することにより行った。ヒスタミン遊離の実験はすべてduplicateで行った。

第5項 各種刺激物資

各種刺激物資としては、ovalbumin (Sigma), Con. A (Sigma), Comp. 48/80 (Sigma), Ca ionophore A 23187 (Calbiochem-Behling)を用いた。なおovalbuminによる刺激は、能動および受動感作肥満細胞を用い、同時にphosphatidylserine (Sigma)添加の影響も検討した。

第6項 推計学的検索

結果はすべてMean ± standard error (M ± SEM)にて表わし、有意差の検定にはstudent's t-testを用いた。

成 績

第1節 ラット腹腔肥満細胞の分離方法

第1項 腹腔洗浄の検討

腹腔洗浄の操作を4回反復して行い、1回ごとに採取される総細胞数と肥満細胞数を検討した。洗浄の回数を重ねるにつれて、総細胞数、

肥満細胞数のいずれも著減傾向を示した。無処置ラットでは総細胞数合計 $16.72 \pm 1.38 \times 10^6$ のうち、第1回の腹腔洗浄で $12.54 \pm 1.02 \times 10^6$ 、第2回で $3.37 \pm 0.61 \times 10^6$ と第2回までに全体の85.1%が採取された。肥満細胞数は合計 $1.90 \pm 0.21 \times 10^6$ のうち、第1回の腹腔洗浄で $1.23 \pm 0.13 \times 10^6$ 、第2回で $0.44 \pm 0.05 \times 10^6$ と第2回までに全体の88.3%が採取された。感作ラットでも同様に、洗浄の回数を重ねるにつれて総細胞数、肥満細胞数のいずれも著減傾向を示し、第2回までに総細胞数の84.5%、肥満細胞数の87.8%が採取された。また無処置および感作ラット両群間で総細胞数に有意差はみられなかったが、肥満細胞数は感作ラットで有意の減少傾向が示された ($p < 0.005$) (表1)。

第2項 細胞洗浄およびBSAによる細胞分離の検討

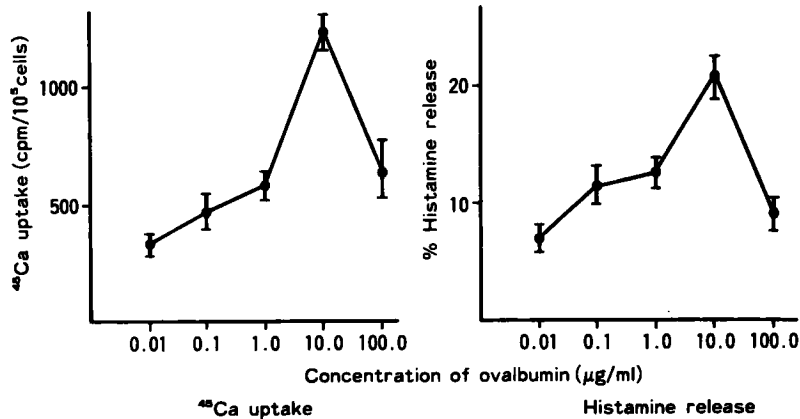
細胞成分採取後、低速遠心による細胞洗浄を行わなかったもの、1回または2回行ったものの各々につき、BSAによる比重遠心後の肥満細胞の回収率および比率を検討した。いずれの細胞浮遊液を使用しても肥満細胞は主として第3層(56% (W/V)層)に集まるため、第3層の肥満細胞を回収し、その回収率と比率を観察した。その結果、低速遠心を行うと回数を重ねるに従って、総細胞中の肥満細胞の百分率は増加するものの、細胞数はかなり減少し、一方、BSAによる細胞分離後の回収率は低速遠心の

表1 Peritoneal lavageによりラット腹腔から採取される総細胞数および肥満細胞数

			Peritoneal lavage				計	肥満細胞 (%)
			1	2	3	4		
無処置ラット	N = 5	総細胞数 (×10 ⁶)	12.54 ±1.02	3.37 ±0.61	0.92 ±0.14	0.35 ±0.08	16.72 ±1.38	12.40 ±1.01
		肥満細胞数 (×10 ⁶)	1.23 ±0.13	0.44 ±0.05	0.13 ±0.02	0.09 ±0.01	1.90 ±0.21	
感作ラット	N = 5	総細胞数 (×10 ⁶)	15.27 ±1.38	5.20 ±1.11	1.43 ±0.25	0.64 ±0.10	22.31 ±3.70	4.15 ±1.03
		肥満細胞数 (×10 ⁶)	0.49 ±0.13	0.28 ±0.08	0.15 ±0.04	0.02 ±0.01	0.79 ±0.19	

表2 全過程における総細胞数と肥満細胞数の変動および回収率 (n = 3)

Cell washing の回数	細胞数 (×10 ⁶)					回収率 (%)		
	Cell washing 前		Cell washing 後		BSAによる 分離後第3層 の肥満細胞	Cell washing 後	BSA による 分離後	全過程
	総細胞	肥満細胞	総細胞	肥満細胞				
0	21.18 ±1.86	2.03 ±0.18	19.82 ±1.23	1.94 ±0.15	1.33 ±0.17	95.6	68.6	65.6
1	19.88 ±1.86	1.98 ±0.27	13.60 ±0.27	1.76 ±0.26	1.46 ±0.22	88.9	82.0	73.7
2	19.56 ±1.08	1.83 ±0.23	9.59 ±0.38	1.38 ±0.15	1.28 ±0.17	75.4	92.8	69.9

図1 抗原刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake とヒスタミン遊離 (n = 4)

回数を重ねるに従って増加する傾向がみられた。そして、その回収率は、細胞洗浄を行わなかったもので65.6%、1回行ったもので73.7%、2回では69.9%であり、1回行ったもので最も高い回収率が示された。また各場合の肥満細胞の比率はそれぞれ、88.1%、94.9%、95.3%であった(表2)。

第2節 ラット腹腔肥満細胞の反応性

第1項 抗原刺激時の⁴⁵Ca uptake とヒスタミン遊離の検討

1. 能動感作 感作ラットから採取された肥満細胞を0.01–100.0 μg/mlの各種濃度の ovalbumin で刺激し、⁴⁵Ca uptake とヒスタミン遊離を観察した。⁴⁵Ca uptake と%ヒスタミン遊

離はともに0.01–10.0 μg/mlの間では濃度依存性に増加し、10.0 μg/mlの濃度で各々最高1351 ± 78 cpm, 21.3 ± 4.1%を示した。しかし、100.0 μg/mlの濃度ではともにその反応は減弱する傾向がみられた(図1)。

2. 受動感作 IgE抗体を含む血清で受動感作した肥満細胞でも、10.0 μg/mlの ovalbumin 刺激により⁴⁵Ca uptake は亢進し、その値は能動感作の1559 ± 112 cpm に対して1217 ± 74 cpmを示した。一方、56℃、3時間の熱処理による不活化血清を加えて孵置した肥満細胞の⁴⁵Ca uptake は374 ± 14 cpm、無処置ラット血清を加えて孵置した肥満細胞では309 ± 38 cpmであり、対照の無処置肥満細胞の⁴⁵Ca uptake 261

表3 抗原刺激時の肥満細胞の ⁴⁵Ca uptake

肥満細胞の感作方法	肥満細胞の ⁴⁵ Ca uptake (cpm/10 ⁵ cell)				Mean ± SEM
	1	2	3	4	
能動感作	1443	1644	1320	1829	1559 ± 112
受動感作					
IgE 血清	1259	1064	1366	1180	1217 ± 74
不活化血清	370	366	347	413	374 ± 14
正常血清	377	370	254	234	309 ± 38
生食水	306	283	235	222	261 ± 20

• P<0.02 ** P<0.05

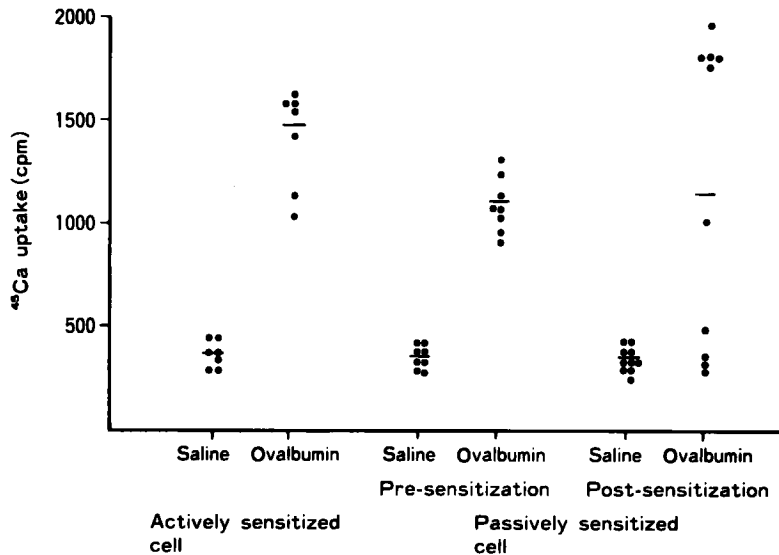


図2 肥満細胞の ⁴⁵Ca uptake に及ぼす感作方法とBSAの影響

±20 cpm と比べやや高値を示したものの、有意な ⁴⁵Ca uptake の亢進はみられなかった。以上の結果より、本実験における抗原刺激後の ⁴⁵Ca uptake の亢進は IgE 抗体を介した反応系であることが証明された (表3)。

3. BSA の影響 受動感作された肥満細胞の ⁴⁵Ca uptake に対する BSA による細胞分離の影響を検討した。ovalbumin 10.0 μg/ml 刺激時の ⁴⁵Ca uptake は、BSA による細胞分離前に IgE 抗体を含む血清で受動感作した時1095 ±

55 cpm であり、細胞分離後に受動感作した時には1182 ± 225 cpm であった。すなわち、両者の平均値には大きな差はみられなかったが、後者では319 cpm から1968 cpm まで非常に広い分散が示された。また能動感作に比べて受動感作肥満細胞の ⁴⁵Ca uptake はやや低い傾向がみられた (図2)。

4. Phosphatidylserine の影響 phosphatidylserine 添加時の感作ラット肥満細胞の ⁴⁵Ca uptake とヒスタミン遊離について検討した。

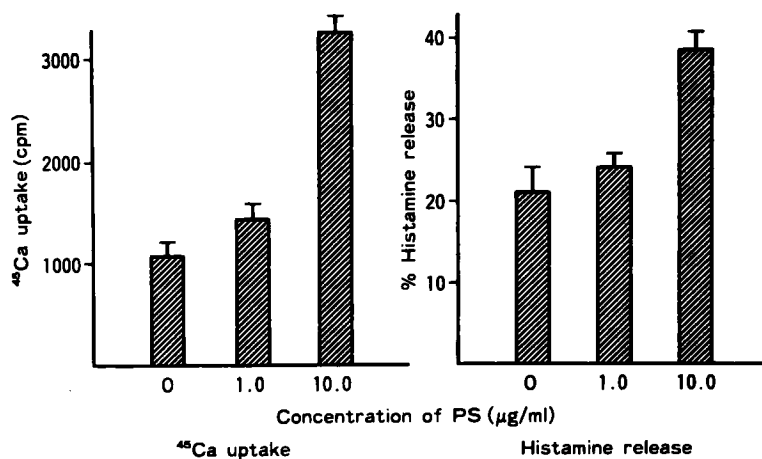


図3 抗原刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptakeとヒスタミン遊離に及ぼす phosphatidylserine (PS) 添加の影響 (n=3)

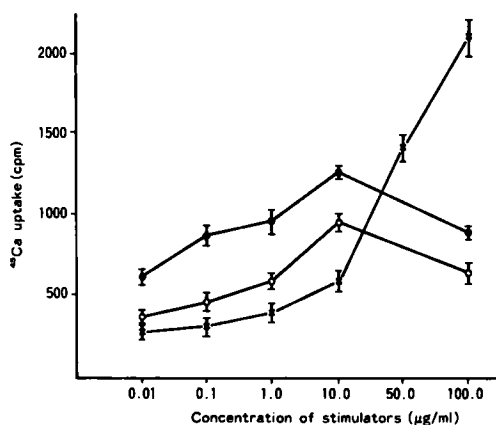


図4 諸種刺激物質による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake (cpm/10⁵ cells)
Con. A (●), Com. 48/80 (○), Ca ionophore A 23187 (×) (n=3)

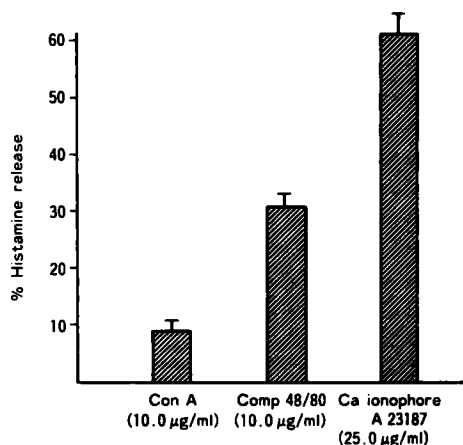


図5 諸種刺激物質による肥満細胞からのヒスタミン遊離 (n=3)

ovalbumin 10.0 μg/ml 刺激時に phosphatidylserine を同時に添加した場合の⁴⁵Ca uptake は無添加時の1184±13 cpm に対して添加濃度1.0 μg/ml では1414±87 cpm, 10.0 μg/ml では3217±55 cpm と有意に増加した (p<0.001). また%ヒスタミン遊離は無添加時の21.2±2.5% に対して添加濃度1.0 μg/ml では24.1±1.8%, 10.0 μg/ml では37.3±2.2% と⁴⁵Ca uptake と同様に10.0 μg/ml では有意に増加した (p<0.01) (図3).

第2項 各種刺激物質刺激時の⁴⁵Ca uptake とヒスタミン遊離の検討

0.01-100.0 μg/ml の各種濃度の Con. A, Comp. 48/80, Ca ionophore A 23187 刺激時の無処置肥満細胞の⁴⁵Ca uptake を検討した. Con. A と Comp. 48/80 ではともに10.0 μg/ml の濃度で⁴⁵Ca uptake は最高値に達したが, その値は Con. A 刺激の1265±7 cpm に比べて Comp. 48/80 刺激では735±21 cpm と低値であった. またともに100.0 μg/ml の濃度ではその反応はむしろ減弱した. Ca ionophore A 23187

刺激では前2者と異なり、肥満細胞の ^{45}Ca uptake は $100.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで濃度依存性の反応増加が認められ、 $100.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で最高 $2103 \pm 193 \text{ cpm}$ が示された(図4)。一方、 $10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Con. A と Comp. 48/80刺激時の肥満細胞からの%ヒスタミン遊離は $8.0 \pm 0.9\%$ 、 $30.4 \pm 5.9\%$ であり、 $25.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Ca ionophore A 23187刺激時の%ヒスタミン遊離は $61.9 \pm 6.7\%$ であった(図5)。

総括並びに考案

肥満細胞からの化学伝達物質遊離は即時型アレルギー反応において中心的な役割を担うものである。ラット腹腔肥満細胞は、従来からこの反応系の実験モデルとして使用されることが多く、肥満細胞の分離法についても、HSA¹¹⁾、BSA¹²⁾、Ficoll¹³⁾¹⁴⁾、Metrizamide¹⁵⁾などの溶媒による比重遠心法を中心にして多くの検討がなされている。そして従来の方法で肥満細胞の比率に関しては、HSAで80%以上、BSAで95.4%、Ficollで90.8%、Metrizamideで90-95%といずれもかなりの結果が得られている。ただ、今後各種受容体の検討²⁰⁾²¹⁾や近年化学伝達物質遊離機序に関連して注目され始めた Ca^{2+} 流入の検討を進めるには、できるだけ多数の肥満細胞を採取する必要があるが、これら既報の方法では回収率に関する検討はほとんどなされていない。また肥満細胞を比重遠心法で分離する場合、使用された濃度溶媒の細胞膜に及ぼす影響、すなわち無毒性、膜表面からの易離脱性などが考慮されなければならない。Couttsら²²⁾は濃度溶媒を通して得られた肥満細胞のIgE受容体の結合能は、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Comp. 48/80やCa ionophore A 23187に対する反応性も低下することを示している。またRanadiveら²³⁾は、30% Ficollで分離された肥満細胞は30% BSAに比べComp. 48/80によるヒスタミン遊離量が著しく少ないことを報告している。今回著者は、ラット腹腔肥満細胞の分離を(1)腹腔洗浄、(2)低速遠心による細胞洗浄、

(3)40% (W/V) および56% (W/V) BSA 2段階濃度勾配法による細胞分離の3段階の過程で行って、一定の肥満細胞の比率を保持しつつより高い回収率を得るための種々の条件について検討を加えた。また得られた肥満細胞の諸種刺激物質刺激時の ^{45}Ca uptake とヒスタミン遊離を検討した。

細胞洗浄の検討では、回数が0回の場合最終的な肥満細胞の比率が88.1%と十分でなく、2回の場合回収率が1回に比べやや低下した。これは低速遠心によって肥満細胞に比べその他の細胞が比較的比重の重いものも含めてより高度に除外されるが、回数を重ねるに従って肥満細胞にも影響が及ぶためであると思われる。比率と回収率をともに満足させるには細胞洗浄を1回施行する方法が適当であることが示唆された。

能動および受動感作の検討では、いずれの場合も抗原刺激により有意の ^{45}Ca uptake の亢進が認められたが、能動に比べ受動感作肥満細胞の ^{45}Ca uptake はやや低値であり、また受動感作肥満細胞ではBSAによる細胞分離後の ^{45}Ca uptake の分散が非常に高度であった。これは能動に比べ受動感作肥満細胞の細胞膜がBSAの影響をより受けやすいことを示唆しているものと思われる。

各種刺激物質の化学伝達物質遊離の機序はそれぞれ異なる。細胞内への Ca^{2+} 流入の機序も刺激物質により異なる。抗原刺激の場合の遊離機序の特徴として(1)細胞外 Ca^{2+} 依存性が強い、(2)phosphatidylserineにより促進される、(3)2-deoxy-glucoseにより抑制される⁸⁾、(4)phospholipid methylationが惹起される⁸⁾、(5)細胞内cyclic AMPによって調整される²⁴⁾²⁵⁾、ことなどがあげられている。しかし、最近ではphospholipid methylationについては否定的な見解が多い。Con. A刺激の場合は抗原刺激とよく類似しており、細胞外 Ca^{2+} 依存性が強く Ca^{2+} 流入も細胞膜上でリン脂質代謝の亢進が惹起されcalcium gateが開かれ細胞内に取り込まれるという抗原刺激の場合と同様の過程を経る。一方、Comp. 48/80は肥満細胞の細胞膜に作用し、細胞内 Ca^{2+} を動員して化学伝達物

質遊離を惹起すると考えられている。リン脂質代謝の亢進は起こさず、phosphatidylserineによって増強されず²⁶⁾、抗原刺激に比べ細胞外Ca²⁺への依存性は低いと云われる⁴⁾¹⁰⁾。しかし、このことはComp. 48/80刺激による遊離機序に細胞外Ca²⁺が関与しないことを意味するわけではない。Douglasら³⁾は、あらかじめEDTAで処理された肥満細胞では、Comp. 48/80による化学伝達物質の遊離は起こらず、遊離のためにはCa²⁺を加える必要があると報告している。またCa ionophore A 23187はCa²⁺のcarrierであり、リン脂質代謝の亢進を介さずに直接Ca²⁺に対する細胞膜の透過性を選択的に亢進させて細胞外Ca²⁺流入を促す²⁷⁾。今回観察された抗原とCon. A刺激の際の⁴⁵Ca uptakeが比較的類似していること、Comp. 48/80刺激では前2者より⁴⁵Ca uptakeの亢進が目立たないこと、Ca ionophore A 23187刺激では他と異なった濃度依存性を示すことなどの諸点はいずれも上述の刺激物質のCa²⁺流入機序の差異に基づくものと推測される。

⁴⁵Ca uptakeの実験を行うには、大量に比率の高い、しかも高度の反応性を有する肥満細胞が必要とされる。今回著者の試みたラット腹腔肥満細胞の分離法はかかる⁴⁵Ca uptakeの実験に必要な肥満細胞を得る上で有用な方法であると思われた。

結 語

40% (W/V) および56% (W/V) BSAを用いた2段階濃度勾配遠心法を用いて、ラット腹腔肥満細胞の高い比率、高い回収率での分離を試み、同時に分離された肥満細胞の⁴⁵Ca uptakeおよびヒスタミン遊離について検討を加え、以下の結果を得た。

1) 腹腔洗浄の操作により1匹の無処置ラットから採取される総細胞数は $16.72 \pm 1.38 \times 10^6$ 、肥満細胞数は $1.90 \pm 0.21 \times 10^6$ であり、感作ラットから採取される総細胞数は $22.31 \pm 3.70 \times 10^6$ 、肥満細胞数は $0.79 \pm 0.19 \times 10^6$ であった。

2) 肥満細胞の回収率は、低速遠心による細胞洗浄を1回行った後、BSAによる細胞分離を行った場合が最も高く、1匹のラットから採取される肥満細胞数は $1.46 \pm 0.22 \times 10^6$ であり、その比率は $94.9 \pm 1.0\%$ であった。

3) 能動感作肥満細胞では、抗原刺激により有意の⁴⁵Ca uptake およびヒスタミン遊離の亢進がみられ、これらはphosphatidylserine添加により高度となった。

4) 受動感作の際には、BSAによる分離の前に感作を行った場合に、より安定した⁴⁵Ca uptakeの亢進がみられた。

5) Con. A, Comp. 48/80, Ca ionophore A 23187の各種刺激物質によって⁴⁵Ca uptakeの亢進がみられたが、その程度や濃度依存曲線はそれぞれ異なっていた。

以上の結果より本分離法により得られたラット腹腔肥満細胞は、化学伝達物質遊離の初期段階として重要な役割を担うCa²⁺流入の検索を進める上で有用な研究材料であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なる御指導を賜った三朝分院内科谷崎勝朗教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第35回日本アレルギー学会総会において発表した。

文 献

1. Mota I: The mechanism of anaphylaxis. I. Production and biological properties of mast cell sensitizing, antibody. *Immunology* (1964) 7, 681-692.
2. Keller R: Concanavalin A, a model 'antigen' for the in vitro detection of cell-bound reaginic antibody in rat. *Clin Exp Immunol* (1973) 13, 139-147.

3. Douglas WW and Ueda Y: Mast cell secretion (histamine release) induced by comp 48/80: Calcium dependent exocytosis inhibited strongly by cytochalasin only when glycolysis is rate-limiting. *J Physiol Lond* (1973) 234, 97-98.
4. Diamant B and Patkar SA: Stimulation and inhibition of histamine release from isolated rat mast cells. Dual effect of ionophore A 23187. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1975) 49, 183-200.
5. Baxter JN: Role of Ca^{++} in mast cell activation, desensitization and histamine release by dextran. *J Immunol* (1973) 3, 1470-1473.
6. Hirata F, Axelrod J and Crews FT: Concanavalin A stimulates phospholipid methylation and phosphatidyl-serine decarboxylation in rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 74, 4813-4816.
7. Ishizaka T, Foreman JC, Sterk AR and Ishizaka K: Induction of calcium flux across the rat mast cell membrane by bringing IgE receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76, 5858-5862.
8. Ishizaka T, Hirata F, Ishizaka K and Axelrod J: Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{2+} influx, & histamine release by bringing of IgE receptors on rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) 77, 1903-1906.
9. Foreman JC and Mongar JL: The role of alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion. *J Physiol* (1973) 224, 743-769.
10. Ranadive NS and Dhanani N: Movement of calcium ions and release of histamine from rat mast cells. *Int Archs Allergy Appl Immunol* (1980) 61, 9-18.
11. Foreman JC, Hallett MB and Mongar JL: The relationship between histamine secretion and ^{45}Ca uptake by mast cells. *J Physiol* (1977) 271, 193-214.
12. Sullivan TJ, Stenson W and Parker CW: Modulation of cyclic AMP in purified mast cells. I. Responses to pharmacologic, metabolic and physical stimuli. *J Immunol* (1975) 114, 1473-1479.
13. Bach MK, Bloch KJ and Austen KF: IgE and IgG_A antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. I. Optimum conditions for in vitro preparation of target cells with antibody and challenge with antigen. *J Exp Med* (1971) 133, 752-771.
14. Ishizaka T, König W, Kurata M, Mauser L and Ishizaka K: Immunologic properties of mast cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol* (1975) 115, 1078-1083.
15. Yurt RW, Leid RW Jr, Spragg J and Austen KF: Immunologic release of heparin from purified rat peritoneal mast cells. *J Immunol* (1977) 118, 1201-1207.
16. 木村郁郎, 谷崎勝朗: 好塩基球および好酸球の適切な同時直接算定法の考案とその臨床的評価. *医学のあゆみ* (1969) 69, 25-28.
17. Kimura I, Moritani Y and Tanizaki Y: Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin Allergy* (1973) 3, 195-202.
18. Siraganian RP and Siraganian PA: Mechanism of action of concanavalin A on human basophils. *J Immunol* (1975) 114, 886-893.
19. Siraganian RP and Brodsky MJ: Automated histamine analysis for in vitro allergy testing. I. A method utilizing allergen induced histamine release from whole blood. *J Allergy Clin Immunol* (1976) 57, 525-531.
20. Alm PE and Bloom GD: What - if any - is the role of adrenergic mechanisms in histamine release from rat mast cells? *Agents Actions* (1981) 11, 60-66.
21. Masini E, Blanzina P, Fratozzi R, Brunelleschi S and Mannaioni F: Correlation between cholinergic histamine release and quinuclidinylbenzilate (^3H)-QNB binding in mast cell membranes. *Agents Actions* (1981) 11, 55-59.

22. Coutts SM, Nehring PE Jr and Jariwara NU: Purification of rat peritoneal mast cells: Occupation of IgE-receptors by IgE prevents loss of the receptors. *J Immunol* (1980) **124**, 2309-2315.
23. Ranadive NS and Ruben DH: Mechanism of histamine release from rat mast cells by compound 48/80. Comparison with the release induced by cationic protein. *Int Archs Allergy Appl Immunol* (1973) **44**, 745-758.
24. Orange RP, Kaliner MA, Lararia PJ and Austen KF: The immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. II. Influence of cellular levels of cyclic AMP. *Fed Proc* (1971) **30**, 1725-1732.
25. Kaliner M, Orange RP and Austen KF: The immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. IV. Enhancement by cholinergic and alpha adrenergic stimulation. *J Exp Med* (1972) **136**, 556-563.
26. Goth A, Adams HR and Knoohuizen M: Phosphatidyl-serine: Selective enhancer of histamine release. *Science* (1971) **173**, 1034-1035.
27. Pressman BC, Harris EJ, Jagger WS and Johnson JH: Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* (1968) **58**, 1949-1958.

**Studies on ^{45}Ca uptake and histamine release by
rat peritoneal mast cells**

Part I Purification and reactivity of rat peritoneal mast cells

Jun OHTANI

**Second Department of Medicine,
Okayama University Medical School
(Director: Prof. Ikuro Kimura)**

Purification of mast cells from the peritoneal cavity of rats and reactivity of the cells to antigen were studied. After peritoneal lavage, the peritoneal cells were washed, the mast cells were isolated by a density gradient centrifugation method. The recovery rate of mast cells was highest when mast cells were separated by BSA density gradient centrifugation after washing the cells on time by low speed centrifugation (50xg). The purity of mast cells obtained by this method was $94.1 \pm 1.0\%$, and the number of mast cells obtained was approximately 1.46×10^6 cells/rat. Mast cells of actively sensitized rats showed a significant increase in ^{45}Ca uptake and histamine release after stimulation by antigen. ^{45}Ca uptake by mast cells of passively sensitized rats was affected by BSA medium, and the most suitable results were obtained using mast cells passively sensitized before separation of the cells by BSA. Mast cells showed a significant increase in ^{45}Ca uptake after stimulation by various stimulatory agents, such as Con. A, Comp. 48/80 and Ca ionophore A 23187. These results indicate that rat peritoneal mast cells isolated by the present method can be used in studies on Ca^{2+} influx into the cells.