

各種刺激物質による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake と Ca²⁺拮抗剤

岡山大学三朝分院内科

谷崎勝朗・駒越春樹・周藤真康

岡山大学第2内科

大谷純・貴谷光・松香陽子・木村郁郎

クレイトン大学内科

赤木克己・Robert G. Townley

(昭和58年1月27日受稿)

Key words: 肥満細胞, ⁴⁵Ca uptake, Ca²⁺拮抗剤

緒言

肥満細胞からのChemical mediatorの遊離は、IgEの関与する抗原抗体反応の際¹⁾ばかりでなく、comp 48/80²⁾、con A³⁾、Ca ionophore A 23187⁴⁾、dextran⁵⁾、band-2 protein⁶⁾などによる刺激の際にも観察され、いずれもCa²⁺依存性である。最近平田ら⁷⁾、石坂ら⁸⁾は、抗原やcon A刺激により細胞膜面でphospholipid methylationがおこり、その結果calcium gateが開いて細胞内へのCa²⁺がとりこまれ、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。この細胞外Ca²⁺の細胞内への取りこみの機序や程度は、刺激物質により異なる。抗原やcon A刺激の場合には、phospholipid methylationによりcalcium gateが開きCa²⁺が細胞内へ取りこまれるが、comp 48/80やCa ionophore A 23187ではphospholipid methylationは惹起されない⁷⁾。Ca ionophore A 23187では、Ca²⁺はcalcium gateを通らず直接細胞内へ取りこまれる。またcomp 48/80では、抗原刺激の場合に比べ細胞外Ca²⁺への依存性は低い⁹⁾と云われている。

Ca²⁺の細胞内への取りこみとヒスタミン遊

離とはほぼ平行関係¹⁰⁾にあり、肥満細胞のCa²⁺ uptakeが抑制されればヒスタミン遊離も抑制されると考えられている。本論文では、Ca²⁺ uptakeの機序がそれぞれ異なる抗原、comp 48/80、con A、Ca ionophore A 23187を用い、これら刺激物質による肥満細胞のCa²⁺ uptakeに対するCa²⁺拮抗剤nifedipineの抑制作用について比較検討した。

対象ならびに方法

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¹⁰⁾し、感作後10~12日で屠殺し腹腔肥満細胞を採取した。この肥満細胞は抗原(ovalbumin)刺激時の⁴⁵Ca uptakeの実験に供した。

ラット腹腔肥満細胞は、40%(w/v)および56%(w/v)BSA溶液による2段階濃度勾配法により分離した。腹腔から採取した肥満細胞を50×G、10分間遠心した後、細胞浮遊液を作成した。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、最後に肥満細胞浮遊液 2 ml 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、第3層の56% (w/v) BSA に集積した肥満細胞を採取した。今回の実験に供された肥満細胞の purity は $94.5 \pm 0.7\%$ であった。

肥満細胞の Ca^{2+} uptake は Ranadive ら¹¹⁾の方法に準じて行った。各試験管に0.1mlの⁴⁵Calcium chloride ($3 \mu\text{Ci}/0.1\text{ml}$) およびそれぞれ ovalbumin ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), comp 48/80 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), con A ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), Ca ionophore A23187 ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む Tyrode 液0.7mlを入れ、37°C恒温槽であらかじめ温めた。そして、0.2mlの肥満細胞浮遊液 ($2.5-10 \times 10^4/0.2\text{ml}$) を加え、おだやかに振盪させながら10分間 incubate した。incubation 終了後あらかじめ氷で冷やした生理食塩水 5 ml を加え反応を stop させた後、300×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 μm) により残存する free の⁴⁵Ca を除去し、liquid scintillation counter により細胞にとりこまれた⁴⁵Ca の radioactivity を測定した。

Ca^{2+} 拮抗剤の抑制作用は、肥満細胞を各種濃度の nifedipine で preincubation することにより検討した。BSA 濃度勾配法により分離した肥満細胞を 0, 0.05, 0.5, 5.0, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ (final concentration) 濃度の nifedipine で 37°C, 30分間 preincubation した。その後細胞を洗浄し、 10^5 肥満細胞/0.2ml に細胞数を調整し、⁴⁵Ca uptake の実験に供した。なお全ての⁴⁵Ca uptake の実験は triplicate で行った。

成 績

抗原刺激時および生理食塩水添加時の肥満細胞の⁴⁵Ca uptake を細胞数により比較検討した。ovalbumin 刺激時には、肥満細胞数 2.5×10^4 でその⁴⁵Ca uptake は $354 \pm 14\text{cpm}$ (Mean \pm SEM) であった。同様に肥満細胞数 5×10^4 , 10×10^4 では⁴⁵Ca uptake はそれぞれ $634 \pm 10\text{cpm}$, $1383 \pm 36\text{cpm}$ であり、細胞数の増加に比例して⁴⁵Ca uptake はほぼ直線的に亢進する傾向がみられた。一方抗原の代りに生理食塩水を添加した場合は、

肥満細胞数 2.5×10^4 , 5×10^4 , 10×10^4 での⁴⁵Ca uptake はそれぞれ $182 \pm 23\text{cpm}$, $280 \pm 25\text{cpm}$, $348 \pm 28\text{cpm}$ であり、抗原刺激時のごとき⁴⁵Ca uptake の著明な亢進はみられなかったが、細胞数の増加にともない若干の増加傾向がみられた。また blank (no cell) の⁴⁵Ca radioactivity は $114 \pm 15\text{cpm}$ であった (図1)。

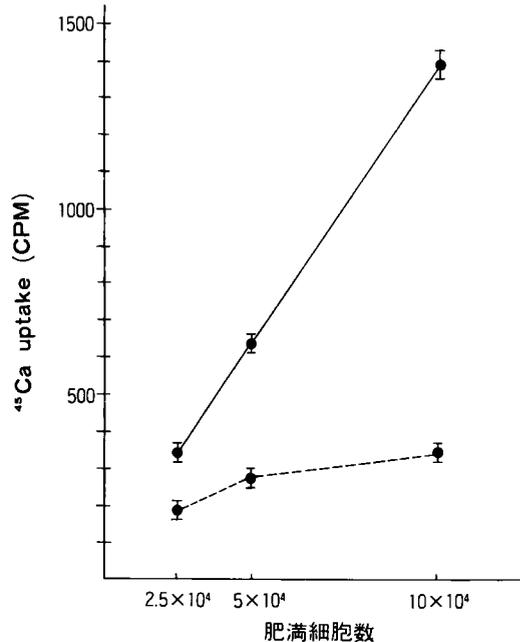


図1. 肥満細胞数と⁴⁵Ca uptake の関係
抗原刺激 (●—●), 対照 (●---●)

各種刺激物質による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake は、図2に示すごとくである。肥満細胞数 10^5 での⁴⁵Ca uptake は、ovalbumin ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激では $1469 \pm 94\text{cpm}$, comp 48/80 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) では $947 \pm 43\text{cpm}$, con A ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) では $1154 \pm 43\text{cpm}$, Ca ionophore A23187 ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) では $1128 \pm 84\text{cpm}$ であり、いずれも対照 ($274 \pm 20\text{cpm}$) に比べ有意の⁴⁵Ca uptake の亢進が観察された (図2)。

ovalbumin 刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake に対する nifedipine の抑制作用を、その抑制率で検討すると以下のごとくであった。nifedipine 濃度 0.05, 0.5, 5.0, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ でその抑制率はそれぞれ 10 ± 4.9 , 41 ± 5.5 , 64 ± 4.0 , $38 \pm 2.3\%$ であり、dose-dependent な抑制効果を示した。そ

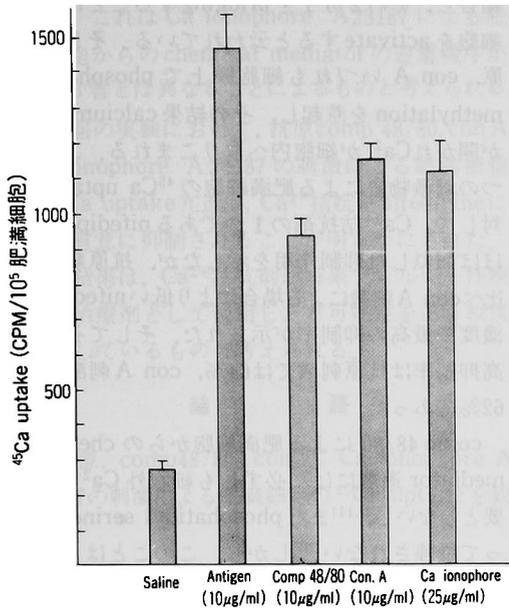


図2. 各種刺激物質による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake

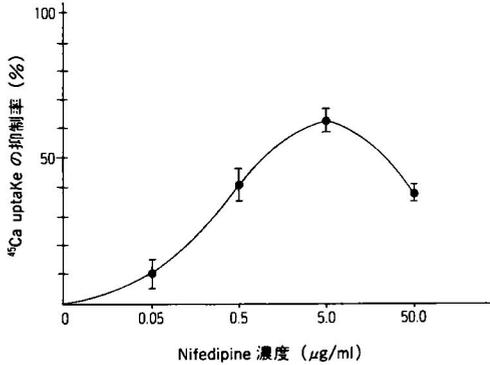


図3. Ovalbumin 刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake に対する Nifedipine の抑制効果

の抑制率は nifedipine 5.0 μg/ml で最も高く、50 μg/ml の高濃度ではむしろ抑制率は低下する傾向がみられた。すなわち、抗原刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake に対しては、0.05~5.0 μg/ml の範囲で nifedipine は dose-dependent な抑制作用のあることが示された (図3)。

comp 48/80 刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake に対する nifedipine の抑制作用は、抗原刺激

時とはほぼ同じ傾向であった。nifedipine 濃度 0.05, 0.5, 5.0, 50 μg/ml でその抑制率はそれぞれ 9.0 ± 4.9, 44 ± 7.2, 58 ± 3.6, 37 ± 3.6% であり、nifedipine 5.0 μg/ml で最も高い抑制率が示された (図4)。

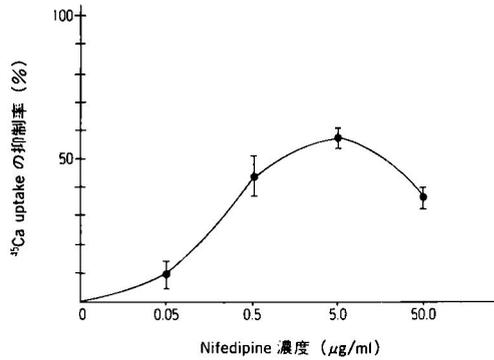


図4. Comp 48/80 刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake に対する Nifedipine の抑制効果

con A 刺激の際の nifedipine の抑制作用は、抗原および comp 48/80 とは最高抑制率を示す濃度に差がみられたが、全般的には前二者の場合と類似したものであった。nifedipine 0.05, 0.5, 5.0, 50 μg/ml での⁴⁵Ca uptake 抑制率はそれぞれ 41 ± 11, 62 ± 5.5, 46 ± 11.5, 42 ± 12.9% であり、その抑制率は 0.5 μg/ml 濃度で最高を示し、5.0, 50 μg/ml のより高い濃度では抑制率がむしろ低下する傾向を示した。すなわち、con A 刺激では、抗原や comp 48/80 刺激に比べ nifedipine の

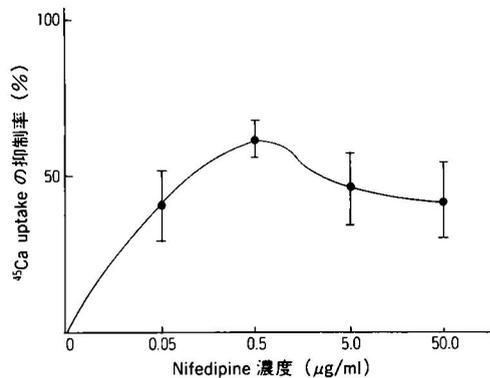


図5. Con A 刺激による肥満細胞の⁴⁵Ca uptake に対する Nifedipine の抑制効果

抑制作用はより低い濃度で最高となり、濃度が高くなるにつれて低下する傾向がみられた(図5)。そして、抗原, comp 48/80, con A いずれの刺激物質による場合でも, nifedipineの ^{45}Ca uptake に対する抑制作用は biphasic であり, 至適濃度以上ではむしろその抑制率は低下する傾向が示された。

Ca ionophore A23187 による刺激の場合には, nifedipine の抑制作用は前2者とは異なった dose-dependent curve を示した。nifedipine 0.05, 0.5, 5.0, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での ^{45}Ca uptake の抑制率はそれぞれ 25 ± 11.0 , 47 ± 5.2 , 49 ± 4.8 , 55 ± 3.8 % であり, 濃度が高くなるにつれてその抑制率も高くなる傾向が示された(図6)。

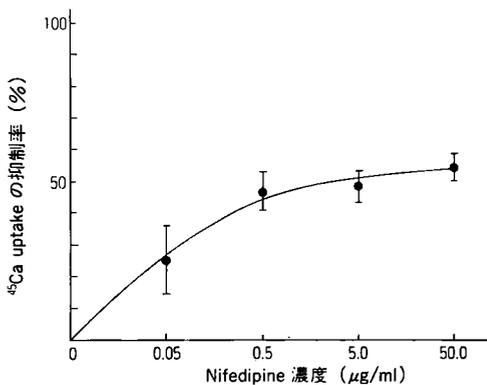


図6. Ca ionophore A23187 刺激による肥満細胞の ^{45}Ca uptake に対する Nifedipine の抑制効果

考 案

肥満細胞からの chemical mediator 遊離には, 原則的に細胞外 Ca^{2+} を必要とするが, 細胞内への Ca^{2+} の取りこみ機序は刺激物質により異なっている。抗原刺激の場合は細胞外 Ca^{2+} 依存性が強く¹²⁾この際の遊離機序の特徴としては, 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, 4)phospholipid methylation が惹起される⁹⁾ 5)細胞内 cyclic AMP によって modulate される^{14), 15)} ことなどがあげられている。con A による chemical mediator の遊離機序は抗原刺激とよく類似¹⁶⁾しており, 細胞膜上の IgE と

結合し, その2分子を bridging することにより細胞を activate すると云われている。そして抗原, con A いずれも細胞膜上で phospholipid methylation を惹起し, その結果 calcium gate が開かれ Ca^{2+} が細胞内へ取りこまれる。この2つの刺激物質による肥満細胞の ^{45}Ca uptake に対して, Ca^{2+} 拮抗剤の1つである nifedipine はほぼ類似した抑制作用を示したが, 抗原刺激に比べ con A 刺激による場合により低い nifedipine 濃度で最高の抑制率が示された。そしてその最高抑制率は抗原刺激では64%, con A 刺激では62%であった。

comp 48/80 による肥満細胞からの chemical mediator 遊離には, 必ずしも細胞外 Ca^{2+} は必要としないし^{9), 11)} また phosphatidyl serine によって増強されない¹³⁾ しかし, このことは comp 48/80 刺激による遊離機序に細胞外 Ca^{2+} が関与しないことを意味するわけではない。Douglas ら²⁾は, あらかじめ EDTA で処理された肥満細胞では, comp 48/80 刺激による chemical mediator の遊離はおこらず, 遊離のためには Ca^{2+} を加える必要があると報告している。いずれにせよ, comp 48/80 による肥満細胞の Ca^{2+} uptake, chemical mediator の遊離機序は, 抗原や con A 刺激の場合とはかなり異った面を有している。comp 48/80 による肥満細胞の ^{45}Ca uptake に対して, nifedipine は抗原刺激時とほぼ類似した dose-dependent な抑制効果を示し, その最高抑制率は58%であった。

Ca ionophore A23187 は Ca^{2+} の carrier であり, Ca^{2+} に対する細胞膜の透過性を選択的に亢進させる¹⁷⁾ 従って Ca^{2+} は通常の calcium gate を通過せず細胞内へ取りこまれ, 細胞内 cyclic AMP 濃度の影響を受けることはない。抗原刺激による細胞膜の透過性の亢進が一過性でごく短時間に終了するのに対し, Ca ionophore A23187 による透過性の亢進はむしろ持続的である¹⁸⁾ Ca ionophore A23187 刺激により肥満細胞の ^{45}Ca uptake は有意の亢進を示したが, これに対する nifedipine の抑制作用は, 今回の実験で用いた濃度の範囲では他の3者とは異なった dose dependent curve を示し, 濃度が高くなるにつれてその抑制効果は強くなる傾向が示さ

れた。これは Ca ionophore A23187 による肥満細胞からの chemical mediator の遊離機序が、他の3者とは異なることによるものと考えられる。

今回の実験において、抗原 comp 48/80, con A, Ca ionophore A23187 の刺激による肥満細胞の ^{45}Ca uptake 亢進は、 Ca^{2+} 拮抗剤 nifedipine により有意に抑制されることが明らかにされた。この結果は、 Ca^{2+} 拮抗剤が将来アレルギー性疾患の治療剤として使用しえる可能性をある程度示唆しているものと考えられる。

結 語

抗原, comp48/80, con A, Ca ionophore A23187 の刺激による肥満細胞の ^{45}Ca uptake を観

察し、同時に ^{45}Ca uptake に対する nifedipine の抑制作用について検討を加えた。

1. 抗原刺激による肥満細胞の ^{45}Ca uptake は、細胞数の増加に比例してほぼ直線的に亢進する傾向がみられた。

2. 抗原, comp 48/80, con A, Ca ionophore A23187 いづれの刺激によっても、肥満細胞の ^{45}Ca uptake は有意の亢進を示した。

3. これら刺激物質による肥満細胞の ^{45}Ca uptake の亢進は、 Ca^{2+} 拮抗剤 nifedipine により有意に抑制された。

(本研究の一部は、NIAID # 5 POAT12027 および Wander Foundation の援助により行われた。)

文 献

1. Mota, I.: The mechanism of anaphylaxis. I. Production and biological properties of 'mast cell sensitizing' antibody. *Immunology*. 7, 681-692, 1964.
2. Douglas, W.W. 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.* 234, 97-98, 1973.
3. Keller, R.: Concanavalin A, a model 'antigen' for the in vitro detection of cell-bound reaginic antibody in rat. *Clin. Exp. Immunol.* 13, 139-147, 1973.
4. Diamant, B. and Patkar, S.A.: Stimulation and inhibition of histamine release from isolated rat mast cells. Dual effect of ionophore A23187. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 49, 183-200, 1975.
5. Baxter, J.N.: Role of Ca^{++} in mast cell activation, desensitization and histamine release by dextran. *J. Immunol.* 3, 1470-1473, 1973.
6. Ranadive, N.S. and Ruben, D.H.: The effect of phosphatidyl serine on the activation stage of histamine release induced by neutrophil cationic protein. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 55, 314-323, 1977.
7. Hirata, F., Axelrod, J. and Crews, F.T.: Concanavalin A stimulates phospholipid methylation and phosphatidylserine decarboxylation in rat mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 4813-4816, 1979.
8. Ishizaka, T., Hirata, F., Ishizaka, k. and Axelrod, J.: Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{2+} influx & histamine release by bridging of IgE receptors on rat mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1903-1906, 1980.
9. Douglas, W.W.: Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis vesiculation sequence. *Biochem. Soc. Symp.* 39, 1-28, 1974.
10. Foreman, J.C., Hallett, M.B. and Mongar, J.L.: The relationship between histamine secretion and ^{45}Ca uptake by mast cells. *J. Physiol.* 271, 193-214, 1977.
11. Ranadive, N.S. and Dhanani, N.: Movement of calcium ions and release of histamine from rat mast cells. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 61, 9-18, 1980.

12. Foreman, J.C. and Mongar, J.L.: The role of alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion. *J. Physiol.* **224**, 743-769, 1973.
13. Goth, A., Adams, H.R. and Knoohuizen, M.: Phosphatidylserine: Selective enhancer of histamine release. *Science* **173**, 1034-1035, 1971.
14. Orange, R.P., Kaliner, M.A., LaRaria, P.J. and Austen, K.F.: The immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. II. Influence of cellular levels of cyclic AMP. *Fed. Proc.* **30**, 1725-1732, 1971.
15. Kaliner, M., Orange, R.P. and Austen, K.F.: 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.* **136**, 556-563, 1972.
16. Siraganian, R.P. and Siraganian, P.A.: Mechanism of action of concanavalin A on human basophils. *J. Immunol.* **114**, 886-893, 1975.
17. Pressman, B.C., Harris, E.J., Jagger, W.S. and Johnson, J.H.: Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 1949-1958, 1968.
18. Foreman, J.C. and Garland, L.G.: Desensitization in the process of histamine secretion induced by antigen and dextran. *J. Physiol.* **239**, 381-391, 1974.

**Inhibitory effect of Ca^{2+} antagonist on
 ^{45}Ca uptake by mast cells**

Yoshiro TANIZAKI, Haruki KOMAGOE and Michiyasu SUDO

Department of Medicine, Okayama University Medical School

Misasa Branch Hospital

Jun OHTANI, Hikaru KITANI, Yohko MATSUKA

and Ikuro KIMURA

The 2nd Department of Medicine, Okayama University Medical School

Katsumi AKAGI and Robert G. Townley

Department of Medicine, Creighton University School of Medicine

^{45}Ca uptake by rat peritoneal mast cells was observed, and the inhibitory effect of nifedipine, a Ca^{2+} antagonist, on ^{45}Ca uptake by mast cells, stimulated by an antigen, comp. 48/80, concanavalin A and Ca ionophore A 23187, was examined. The increase in ^{45}Ca uptake by mast cells induced by the antigen paralleled the increase in mast cell number. A significant increase in the uptake of ^{45}Ca by mast cells was observed with the stimulation by the antigen, comp. 48/80, concanavalin A and Ca ionophore A 23187. The increased uptake of ^{45}Ca induced by antigen was inhibited by nifedipine, and this dose-dependent inhibitory effect of nifedipine on ^{45}Ca uptake was also observed in the mast cells stimulated by comp. 48/80, concanavalin A and Ca ionophore A 23187.