

ラット腹腔肥満細胞に関する研究

第1報：肥満細胞の purification 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

ラット腹腔肥満細胞は IgE 抗体の target cell であり、また採取が簡単であることから、従来抗原刺激の際の chemical mediator の遊離 (AUSTEN, K.F., 1966) (JOHNSON, A.R., 1969) や形態的变化などの観察にしばしば用いられている。またこの細胞は, concanavalin A (SIRAGANIAN, P. A., 1973), dextran (BAXTER, J. N., 1973), compound 48/80 (JOHNSON, A. R., 1969), Ca ionophore A23187 (FOREMAN, J.C., 1973), などによっても抗原刺激に類似した反応を示すため、chemical mediator の分泌機序の解明にも用いられている。さらに近年肥満細胞上の alpha および beta adrenergic receptor (ALM, P. E., 1981) や QNB receptor (MASINI, E., 1981) についての検討もなされており、アレルギー反応、特に即時型反応の場におけるこれら receptor の関与についての検討は、アレルギー反応の惹起から終息までの過程や反応の阻止機序などを含めて、全般的な反応機序の解明に極めて重要であると考えられる。

一方ラット腹腔肥満細胞の purification は、従来 HSA (Human serum albumin) (FOREMAN, J. C., 1977), BSA (Bovine serum albumin) (SULLIVAN, T.J., 1975), Ficoll (SULLIVAN, T.J., 1975, ISHIZAKA, T., 1975), Metrizamide (YURT, R. W., 1977) などによる比重遠心法が用いられているが、前述の肥満細胞上の種々の receptor の研究をすすめていくためには、多数の肥満細胞が必要である。すなわち、ラット腹腔から high purity と同時に high recovery rate で肥満細胞を採取する必要がある。かかる観点から、今回著者らは BSA を用いた比重遠心法により、ラット腹腔からの肥満細胞の採取および分離を試みたの

で、その概略を報告する。

対象並びに方法

対象： 体重 200~250 g の雄または雌の Sprague-Dawley 系ラットを使用した。

方法：ラット腹腔からの肥満細胞の採取および分離については、peritoneal lavage, cell washing, cell separation の3段階について検討を加えた。なお肥満細胞の同定は、既報の染色法 (KIMURA, I., 1973) を用いて行った。

1) Peritoneal lavage：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 1 cm) を入れた。この小切開口より lavaging fluid (生理食塩水に 0.1% gelatin, 0.1% BSA および heparin 25 単位/ml のわりで溶解したもの) 10 ml 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。以上の操作を 4~10 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観察した。

2) Cell washing：腹腔内液には肥満細胞の他、リンパ球、好中球、マクロファージ、時には好酸球などが含まれている。ここに述べる低速遠心による cell washing は、細胞を洗滌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目的で行われた。peritoneal lavage 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 cell pellet を回収した。cell pellet に約 8 ml の生理食塩水を加え、50 × G、10 分間の低速遠心で cell washing を行った。この低速遠心による cell washing を反復して行い、各操作ごとに減少する総細胞数と肥満細胞数を検討した。

3) Cell separation：40% (W/V) および 56%

(W/V) BSA solution を生理食塩水で作製し、比重遠心法により cell separation を行った。試験管 (15 × 102 mm) にまず 2 ml の 56% (W/V) BSA を入れ、ついで 2 ml の 40% (W/V) BSA を重層し、最後に washing 後の細胞浮遊液 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 分間遠心した。この方法では、肥満細胞は主として third layer の 56% BSA 層に集積することが観察された。top layer の細胞浮遊液層, second layer の 40% BSA 層を吸引除去した後、56% BSA 層の表面を生理食塩水で慎重に 2~3 回洗滌した。56% 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、細胞表面に附着した BSA を洗滌した。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その 95% 以上が正常であった。

成 績

1) Peritoneal lavage

予備実験で、1 回 10 ml の lavage を 10 回反復することにより、1 回ごとに採取される細胞数を観察した

が、第 5 回目の lavage 以後にはほとんど細胞が含まれていなかったため、ここでは第 4 回目の lavage までに採取された総細胞数、肥満細胞数について検討を加えた。またこの予備実験の結果から、lavage の回数は 4 回で十分であることが明らかになった。第 1 回から第 4 回までの lavage により採取される総細胞数、肥満細胞数を 8 匹のラットで検討した結果は、Table 1 に示すごとくである。計 4 回の lavage により 1 匹のラットから採取される総細胞数 ($\times 10^6$) は平均 18.4 ± 1.8 (Mean \pm SEM) (range: 10.2-27.1) であり、また肥満細胞数 ($\times 10^6$) は 1.9 ± 0.1 (1.1-2.4) であった。また lavage の回数を重ねるにつれて総細胞数、肥満細胞数いづれも著減傾向を示し、第 1 回の lavage により肥満細胞の約 62% が、また 2 回目までの lavage により約 88% が採取された。したがって、多数のラットを同時に処置する場合などは、手間を省く意味では 2 回の lavage で十分であると考えられるが、本論文の以下の実験は、全て 4 回 lavage により採取された細胞を使用した (Table 1)。

2) Cell washing

Table 1. Number of total cells and mast cells from rat peritoneal cavity

	No of lavage				Total	% Mast cells
	1	2	3	4		
Total cells ($\times 10^6$)	13.98* ± 1.69	4.10 ± 0.88	0.87 ± 0.12	0.54 ± 0.09	18.39 ± 1.75	10.58 \pm 0.97
Mast cells ($\times 10^6$)	1.17 ± 0.15	0.48 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.87 ± 0.14	

*Numbers are presented as mean \pm SEM

peritoneal lavage により採取された細胞について、50 × G, 10 分間の低速遠心による細胞数の減少度を、総細胞数、肥満細胞数別に検討した。第 1 回目の低速遠心により、総細胞数 ($\times 10^6$) は 19.1 ± 1.1 から 13.5 ± 0.4 (-31.0%) へ減少し、また肥満細胞数 ($\times 10^6$) は 1.8 ± 0.2 から 1.6 ± 0.2 (-11.5%) へと減少した。同様に第 2 回目の低速遠心で総細胞数は 8.5 ± 0.4 (-56.8%)、肥満細胞数は 1.4 ± 0.2 (-24.8%) となり、また第 3 回目の低速遠心で総細胞数は 5.5 ± 0.2 (-72.8%)、肥満細胞数は 1.2 ± 0.1 (-36.6%) へと減少した。すなわち、低速遠心により肥満細胞に比べその他の細胞がより高度に除外され、その他の細胞に対する肥満細胞の百分率では、低速遠心前の 9.4 ± 1.2 % から第 1 回遠心後は、 11.5 ± 1.6 %, 第 2 回後は 16.3 ± 2.0 %, 第 3 回

後は 21.8 ± 0.9 % と上昇傾向を示した (Fig 1)。

3) Cell separation

低速遠心による cell washing を 3 回行うと、前述のごとく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する。したがって、この項における cell washing 後の細胞浮遊液としては、低速遠心を行わなかったもの、低速遠心を 1 回あるいは 2 回行ったものの 3 種類を用い、BSA による比重遠心後の肥満細胞の purity および細胞浮遊液中の肥満細胞数に対する recovery rate を検討した。すなわち、この項における肥満細胞の recovery rate は cell separation procedure におけるものを示し、全過程における recovery rate は次項で述べることにする。

Table 2 に示すごとく、いづれの細胞浮遊液を使用し

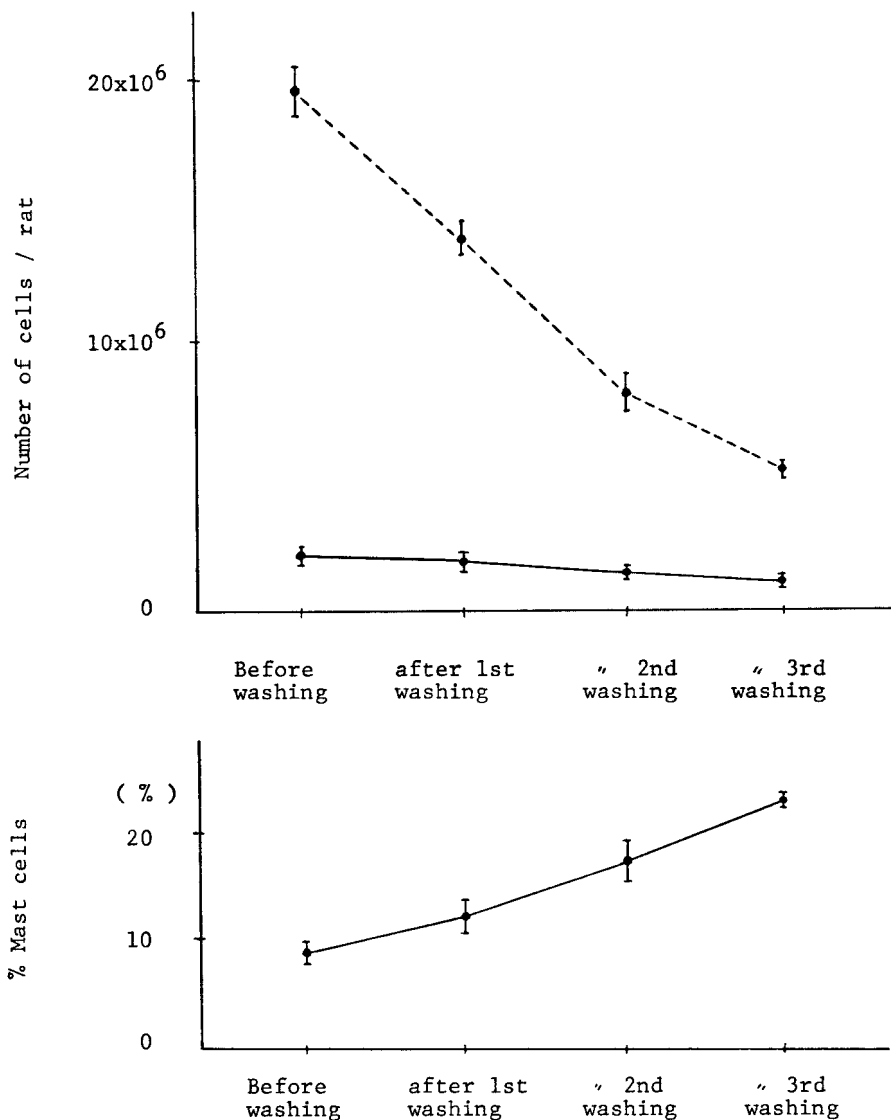


Fig. 1. Changes in number of total cells (●-----●) and mast cells (●——●), and % mast cells in peritoneal fluid after each washing in which cells were washed by low speed centrifugation at 50x g for 10 min. Data are presented as mean ± SEM for three experiments.

ても、肥満細胞は主として third layer (56% BSA) に集まるため、方法の項で述べたごとく、third layer の肥満細胞を回収し、その purity と recovery rate を観察した。その結果、低速遠心を行わなかった細胞浮遊液の purity は 88.1%, recovery rate は 68.6%であり、1回低速遠心を行った細胞浮遊液では purity 94.9%, recovery rate 82.0%, また低速遠心による washing を行った細胞浮遊液では purity 95.3%, recovery

rate 92.8%であった。すなわち、低速遠心による washing の回数が増えるにしたがい、cell separation 時の肥満細胞の recovery rate は増加する傾向が示された。そして、低速遠心を行わなかった細胞浮遊液からの肥満細胞の recovery rate は低く、 0.5×10^6 の肥満細胞が second layer (40% BSA) に残された。これらの結果は、比重の比較的軽い肥満細胞が、Fig 1 に示すごとく、低速遠心による washing 時にすでに除外され

ていることを示すものと考えられる (Table 2).

4) All procedures における肥満細胞の purity および recovery rate

前述のごとく cell washing 後の recovery rate は、低速遠心を行わなかった細胞浮遊液では95.6%, 1回低速遠心を行った後では 88.9%, 2回後では 75.4% であった。一方これらの細胞浮遊液の BSA による cell separation 後の recovery rate は、それぞれ 68.6%, 82.7%, 92.8% であり, Table 3 に示すごとく cell

washing 時の recovery rate が高い程, BSA による cell separation 時の recovery rate は低下する傾向が示された。この2つの procedure 後の recovery rate は、それぞれ65.6%, 73.7%, 69.9%であり, 低速遠心による cell washing を1回行った後の cell separation が recovery rate が最も高いことが判明した (Table 3)。そしてこれらの procedure により一匹のラットから採取される肥満細胞数は平均 $1.46 \pm 0.22 \times 10^6$ であり, その purity は $94.9 \pm 1.0\%$ であった (Table 3)。

Table 2. Number of total cells and mast cells in each layer after separation of cell suspensions without or single and double washing with low speed centrifugation

		Number of		
		Total cells (10^6 /rat)	Mast cells (10^6 /rat)	% Mast cells
Top layer	A)	6.48±0.66	0.11±0.07	1.7±1.0
	B)	4.36±0.36	0.02±0.01	0.5±0.2
	C)	5.13±0.22	0.02±0.01	0.5±0.1
Second layer (40% BSA)	A)	11.83±0.55	0.5 ±0.05	4.3±0.5
	B)	7.7±0.47	0.28±0.1	3.7±1.3
	C)	3.12±0.32	0.09±0.02	3.2±1.3
Third layer (56% BSA)	A)	1.51±0.17	1.33±0.17	88.1±3.3
	B)	1.54±0.23	1.46±0.22	94.9±1.0
	C)	1.34±0.18	1.28±0.17	95.3±0.3

Each A), B) and C) represent cell suspension : without washing by low speed centrifugation (A), after single washing (B) and after double washing (C). Numbers are Presented as mean ± SEM for three experiments.

Table 3. Changes in number of total cells and mast cells during all procedures

	No of cells ($\times 10^6$)					Recovery rate of mast cells (%)		
	Before washing		After washing		After separation			
	Total cells	Mast cells	Total cells	Mast cells	No of mast cells in third layer	During washing	During* separation	During all procedures
Without washing	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
Single washing	19.88 ± 1.86	1.98 ±0.27	13.60 ± 1.0	1.76 ± 0.26	1.46 ± 0.22	88.9	82.0	73.7
Double washing	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

Numbers are presented as mean ± SEM for three experiments.

*Recovery rate of mast cells during separation was calculated as percentage of mast cells in the third layer.

総括並びに考案

ラット腹腔からの肥満細胞の purification については従来 HSA (FOREMAN, J.C., 1977), BSA (SULLIVAN, T.J., 1975), Ficoll (ISHIZAKA, T., 1975), Metrizamide (YURT, R.W., 1977) などによる比重遠心法が行われている。そしてこれら比重遠心法による肥満細胞の purity は, HSA では80%以上, BSA では 95.4%, Ficoll では 90.8%, Metrizamide では 90-95 %と報告されており, その purity は肥満細胞に関する多くの研究においてほぼ満足できるものであると考えられる。すなわち, これら既報の方法は, 主として purity を高めることにその焦点がしぼられており, recovery rate に関する検討はほとんどなされていない。しかし, 肥満細胞に関する研究が, 肥満細胞特有の IgE receptor やヒスタミン遊離などから, その他の細胞も共有している可能性が強い alpha および beta adrenergic receptor (ALM, P.E., 1981) や QNB receptor (MASINI, E., 1981) の研究, calcium ion の uptake (SULLIVAN, T.J., 1975, RANADIVE, N. S., 1980) の検討などへと進展するにつれて, 肥満細胞の purity ばかりでなく, いかに多くの細胞が採取しえるかと言うことも重要な課題となってくる。かかる観点より, 本論文では40%(W/V) および56%(W/V) BSA による2段階濃度勾配遠心法により, ラット腹腔からの肥満細胞のより高い recovery rate を得るための種々の条件について検討を加えた。その結果, 1回の低速遠心による cell washing 後 BSA による cell separation により, ラット腹腔から採取される肥満細胞の73.7%が, high purity (94.9%) で回収されることが判明した。今回の実験においては, 50×G, 10分間の低速遠心により, 肥満細胞およびその他の細胞がかなりの頻度で除外されており, 低速遠心による肥満細胞の減少率は, 第1回後 11.5%, 第2回後 24.6%, 第3回後 36.6%であった。その減少率は, 肥満細胞に比べその他の細胞においてより高度であった。この結果は, 肥満細胞には比重の軽いものから重いものまでかなりの幅があることを示しているものと考えられる。そして今回主として集められた肥満細胞は, 比重の比較的重いものであることは言うまでもない。比重の差により, 肥満細胞の機能上の差が存在するかどうかは現在明らかではないが, 比重遠心法により purify された肥満細胞を用いて実験を行う場合は, 常にこの機能上の差の有無を念頭においておかねばならないと考えられる。

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, ラット腹腔からの肥満細胞の purification を試み, 以下の結果を得た。

- 1) 1回10 ml の lavaging fluid を用いた peritoneal lavage を4回行うことにより, 一匹のラットから得られる総細胞数は $18.4 \pm 1.8 \times 10^6$, 肥満細胞数は $1.9 \pm 0.1 \times 10^6$ であった。
- 2) 50×G, 10分間の低速遠心による cell washing での総細胞数および肥満細胞数の減少率は, それぞれ第1回遠心後31.0%, 11.5%, 第2回遠心後56.8%, 24.8%, 第3回後72.8%, 36.6%であり, 肥満細胞に比べ総細胞数の減少率がより高度であった。
- 3) BSA による cell separation では, 低速遠心を行わなかった細胞浮遊液からの肥満細胞の purity は 88.1%, recovery rate は68.1%, 1回低速遠心後の細胞浮遊液では purity 94.9%, recovery rate 82.0%, 2回後のものでは purity 95.3%, recovery rate 92.8%であった。

以上の結果より, 1回低速遠心による cell washing を行った後, BSA による cell separation を行った場合が, recovery rate が最も高く (73.7%), その purity は 94.9%であった。

(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) ALM, P.E. and BLOOM, G. D. : What -if any- is the role of adrenergic mechanisms in histamine release from rat mast cells? *Agents and Actions*, **11**, 60-66, 1981.
- 2) AUSTEN, K.F. and BECKER, E.L. : Mechanisms of immunologic injury of rat peritoneal mast cells. II. Complement requirement and phosphonate ester inhibition of release of histamine by rabbit anti-rat gamma globulin. *J. Exp. Med.*, **124**, 397-416, 1966.
- 3) BAXTER, J.N. : Role of Ca^{++} in mast cell activation, desensitization, and histamine release by dextran. *J. Immunol.*, **112**, 1470-1473, 1973.
- 4) FOREMAN, J.C., MONGAR, J.L. and GOMPERS, B.D. : Calcium ionophore and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. *Nature, Lond.*, **245**, 249-251, 1973.

- 5) FOREMAN, J. C., HALLETT, M. B. and MONGAR, J.L. : The relationship between histamine secretion and ⁴⁵calcium uptake by mast cells. *J. Physiol.*, **271**, 193-214, 1977.
- 6) ISHIZAKA, T., KONIG, W., KURATA, M., MAUSER, L. and ISHIZAKA, K. : Immunologic properties of mast cells from rat infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.*, **115**, 1078-1081, 1975.
- 7) JOHNSON, A.R. and MORAN, N.C. : Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48/80 and antigen. *Am. J. Physiol.*, **216**, 453-459, 1969.
- 8) KIMURA, I., MORITANI, Y. and TANIZAKI, Y. : Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin. Allergy*, **3**, 195-202, 1973.
- 9) MASINI, E., BLANZINA, P., FRATOZZI, R., BRUNELLESCHI, S. and MANNAIONI, F. : Correlation between cholinergic histamine release and quinuclidiny-benzilate ([³H]-QNB) binding in mast cell membranes. *Agents and Actions*, **11**, 55-59, 1981.
- 10) 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.
- 11) SIRAGANIAN, P. A. and SIREGENIAN, R.P. : Basophil activation by concanavalin A : Characteristics of the reaction. *J. Immunol.*, **112**, 2117-2125, 1973.
- 12) SULLIVAN, T.J., PARKER, K.L., STENSON, W. and PARKER, C.W. : Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. I. Response to pharmacologic, metabolic, and physical stimuli. *J. Immunol.*, **114**, 1473-1479, 1975.
- 13) YURT, R.W., LEID, R. W. Jr., SPRAGG, J. and AUSTEN, K.F. : Immunologic release of heparin from purified rat peritoneal mast cells. *J. Immunol.*, **118**, 1201-1207, 1977.

STUDIES ON RAT PERITONEAL MAST CELLS

II PURIFICATION OF MAST CELLS FROM RAT PERITONEAL CAVITY

by Yoshiro TANIZAKI, Juntaro TANAKA, Haruki KOMAGOE, Hiroshi MORINAGA,
Department of Medicine, Misasa Medical Branch, 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 get a high recovery rate of mast cells from the rat peritoneal cavity, a new modified method was discussed using BSA density gradient. Three procedures, peritoneal lavage, washing of peritoneal cells and purification by BSA, were tested in this study, and the numbers of total cells and mast cells in each procedure were calculated. The recovery rate was the highest in BSA density gradient purification of the cells washed once with low speed centrifugation. The recovery rate was 73.7% and the number of mast cells taken from one rat was approximately 1.5×10^6 . The purity of the cells with this procedure was 95.0% (range from 93.0 to 96.0%).