

市販保冷温庫で培養したマスト細胞の顆粒放出について

ドルトン東京学園中等部・高等部

小泉堇 (中2)

1. はじめに

アレルギーの研究では培養マスト細胞が利用される。この細胞はスズメバチの毒素など各種刺激物質によってアレルギー症状を引き起こす物質を放出する。これを脱顆粒という。脱顆粒を抑制する物質にはアレルギーを抑える可能性があるため、脱顆粒を測定する実験ができれば、アレルギー薬を見つけられる可能性がある。培養細胞は普通、CO₂ インキュベーターで培養するが、この装置を学校で準備することは大変である。しかし、同好会のメンバーが家庭用保冷温庫で培養できることを見つけた。そのため、これを使って培養したマスト細胞で脱顆粒が起きるかどうかが調べることにした。今回の実験ではマスト細胞を活性化させる「Compound 48/80」という物質で顆粒が放出されるかどうか調べた。

2. 方法

刺激剤の濃度や刺激時間、培養時の濃度を様々な条件で実験をし、脱顆粒が起こる条件を求めたことにした。細胞を新しいフラスコに植えついでから6日目のものを、新しい培地に懸濁し、0.25mLずつ24wellプレートに入れた。さらに0.25, 0.5, 0.75mLの培地をマイクロピペットで加えた。これを一晩、市販の保冷温庫で培養した。次に、24wellプレートをひっくり返し培地を捨て、ハンクス緩衝生理食塩水HBSSを0.5mLずつ入れて軽く振ってから捨てた。この洗浄作業を再度行い、0.5mLのHBSSをそれぞれのwellに入れた。その後すぐにCompound 48/80を入れた。Compound 48/80を入れた後の濃度は1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ (1 μg =0.001mg)となるようにした。また、細胞内のすべての顆粒を測定するwellでは、0.5%トライトン(洗剤の一種)を0.003mL入れた。その後、恒温槽にwellプレートを浮かべて、37°Cで10分間インキュベートした。その後、wellプレートを軽く回転させて溶液を混合し、HBSSを0.18mLずつ96wellプレートに移動した。96wellプレートを、プレート遠心機で5分間遠心し、その上清0.01mLをマイクロピペットで採取し、新しい96wellプレートに入れた。次に各上清に0.05mLの基質を入れて、ビニルテープで蓋をしてから市販の保冷温庫に入れて一晩インキュベートした。翌日、各wellにグリシン緩衝液を入れた。細胞から顆粒がでてきたところは溶液が黄色くなった。この色の強さを、マイクロプレートリーダー(光の強さを数値化する機械)で測定した。顆粒が出てきた量は、compound 48/80で刺激して出てきた顆粒が、すべての顆粒(トライトンで壊した部分)に対して何%かを計算で求めた。

3. 結果

横軸はcompound 48/80の濃度、奥行きは刺激時間、縦軸は顆粒の放出率を示す。Compound 48/80の濃度が30 $\mu\text{g/ml}$ のとき、刺激時間20分では5.2%、40分では4.5%となった。しかし、他の条件では顆粒の放出がほとんど見られなかった。

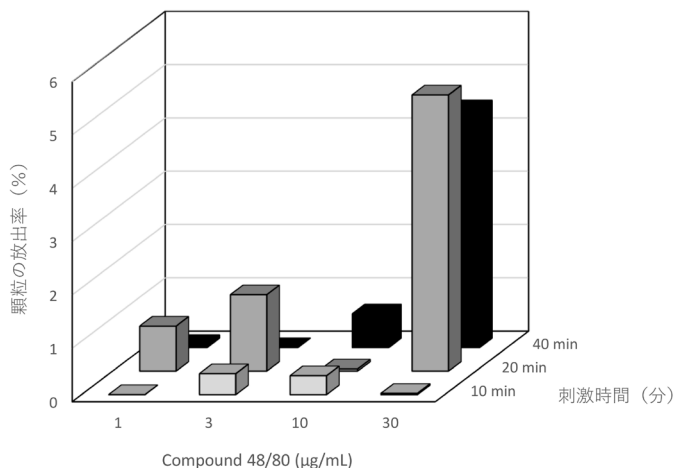


図1 刺激の量と時間による顆粒の放出率の変化

4. 考察

本研究では家庭用保冷温庫で培養したマスト細胞から顆粒を放出させる条件を検討した。その結果、30 $\mu\text{g/ml}$ で20分以上の刺激が必要であることがわかった。このような結果が出たのは、アレルギー反応が生じやすい時間とマスト細胞が最も活性化する時間に関係があるのではないかと考えた。今後は、スズメバチ毒素マストパランなど他の刺激剤で可能かどうか検討し、実験の種類を増やす。また、放出量を増やす他の条件の検討や、顆粒放出を抑える物質の探索も行いたい。具体的にはお茶成分カテキンやブドウ・リンゴポリフェノールなど食品の成分での抑制効果について調べる。

5. 今後の展望

今回の実験では、家庭用保冷温庫で培養した培養マスト細胞がアレルギーの研究で用いられる刺激剤で脱顆粒を起こすことがわかった。今後は抗アレルギー薬でこれを抑制する実験で薬をさがすための実験ができることを確認し、それがわかった後で脱顆粒を抑える物質や促進する物質を探したい。そのような物質を見つけることで、アレルギーや炎症が治せたり、和らげられるかもしれない。

謝辞

本研究は公益財団法人双葉電子記念財団2020年度青少年創造性開発育成事業の助成を受けました