

氏名(本籍)	ひら 平	さわ 澤	のり 典	やす 保
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	薬	第	300	号
学位授与年月日	平成元年	6月	28日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			

学位論文題目            アレルギー炎症におけるヒスタミンの役割

論文審査委員            (主 査)  
教授 南 原 利 夫        教授 橋 本 嘉 幸  
教授 佐 藤                進

## 論文内容要旨

ヒスタミンは、肥満細胞から放出され、アナフィラキシー反応に関与していることが知られている。一方、アナフィラキシー反応により産生され、平滑筋を徐々に収縮させるものとして古くから知られていたslow reacting substance (SRS) の本体が、アラキドン酸代謝産物のLTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>及びLTE<sub>4</sub>であることが最近解明された。これらは強い気管支収縮作用、血管透過性亢進作用をもつことが明らかにされ、アナフィラキシー反応の化学媒介物質として注目されるようになって、ヒスタミンの重要性について再検討が必要となってきた。またヒスタミンは、in vitroの実験系において、免疫、炎症性細胞のH<sub>2</sub>受容体を刺激することによりその機能発現を抑制することが明らかにされたが、実際にアレルギー炎症において内因性のヒスタミンが、炎症反応の調節に関与しているかどうかは、全く解明されていなかった。本研究では、ラットのアレルギー性空気嚢型炎症モデルにおいて、炎症局所のヒスタミンレベルが2相性に増加することを明らかにし、それぞれのヒスタミンの役割について検討した。同時に、いくつかの抗炎症、抗アレルギー薬の作用機序を解明した。

### [実験方法]

(1) アレルギー性空気嚢型炎症の誘発：SD系雄ラットを抗原azobenzene arsonate conjugated acetylbovine serum albuminで感作し、9日後、背部皮下に空気8mlを注射して空気嚢を作成する。翌日、抗原を含む2%CMC溶液4mlを空気嚢内に注射してアレルギー反応を惹起した。(2) 血管透過性、及び浸潤白血球数の測定：血管透過性は、<sup>125</sup>I標識ヒト血清アルブミン (<sup>125</sup>I-HSA) を用いて測定した。<sup>125</sup>I-HSA 1 μCiを静脈注射し、30分後にラットを脱血死させ空気嚢内液を回収する。投与された<sup>125</sup>I-HSAの何%が、30分間に空気嚢内に漏れてたかを求め、血管透過性の指標とした。空気嚢内液中に浸潤した白血球数は、血球計算盤を用いて測定した。(3) 空気嚢内液中のヒスタミン、及びセロトニン量の測定：ヒスタミン、及びセロトニンは、抽出操作後、蛍光法で定量した。(4) 空気嚢壁中のヒスタジン脱炭酸酵素活性：空気嚢の上部の皮膚、皮下組織をとり、ホモジナイズした。遠心上清にヒスタジンを加え、単位時間当りヒスタミンの産生量を求めて、ヒスタジン脱炭酸酵素活性とした。(5) ヒスタミン産生増大活性の測定：骨髄細胞4×10<sup>6</sup>個を、空気嚢内液存在下、非存在下で24時間培養し、その培養上清中のヒスタミン量を測定した。

## [結果と考察]

### (1) アナフィラキシー様の血管透過性亢進反応の機序について

血管透過性亢進反応は、アレルギー反応惹起後30分以内に最大となり、以後減少する。この時、空気嚢内液中のヒスタミン量、及びセロトニン量は有意に増大しており、肥満細胞の脱顆粒が生じていると考えられる。SRSの特異的拮抗剤FPL55712は、LTC<sub>4</sub>とPGE<sub>2</sub>あるいはLTD<sub>4</sub>とPGE<sub>2</sub>による血管透過性亢進反応を抑制するが、その濃度ではアレルギー反応惹起後30分以内にみられるアナフィラキシー様の血管透過性亢進反応を抑制しなかった。それに対し、ヒスタミンH<sub>1</sub>拮抗剤pyrilamine、あるいはセロトニン拮抗剤methysergideを抗原と共に空気嚢内に投与すると、アナフィラキシー様の血管透過性亢進反応は強く抑制され、両者を併用すると無感作群でみられる弱い血管透過性亢進値まで抑制された。また、シクロオキシゲナーゼ阻害剤indomethacinは、全く抑制効果を示さなかった。従って、アナフィラキシー様の血管透過性亢進反応には、SRSやPGsの関与はほとんどなく、ヒスタミン、セロトニンの関与がきわめて大きいことが明らかとなった。

ステロイド抗炎症薬dexamethasoneは、アラキドン酸代謝産物の産生を抑制して、あるいは、肥満細胞の脱顆粒を抑制して、抗炎症、抗アレルギー作用を発現すると考えられている。しかし、上述のように、SRS及びPGsの関与が小さいアナフィラキシー様の血管透過性亢進反応をdexamethasoneは強く抑制した。このとき、空気嚢内液中のヒスタミン量の低下がみられなかったことから、肥満細胞の脱顆粒は抑制されていないと考えられる。この結果から、dexamethasoneの作用点は、化学媒介物質の産生側でなく、応答側すなわち血管内皮細胞であると考えられる。

### (2) $\beta$ -アドレナリン作動薬のアナフィラキシー様の血管透過性抑制機序

$\beta$ -アドレナリン作動薬は、肥満細胞の脱顆粒抑制作用が知られており、これが、その抗アナフィラキシー作用機序であると考えられている。本炎症モデルのアナフィラキシー様の血管透過性亢進反応は、 $\beta$ -アドレナリン作動薬isoproterenol, procaterol及びsalbutamol、それぞれ、 $10^{-7}$ Mから $10^{-6}$ Mを抗原液に溶解して空気嚢内に投与することにより用量依存的に抑制された。この時、いくつかの群において空気嚢内液中のヒスタミン量の低下が見られるが、用量依存性はみられず、血管透過性の抑制効果と相関性は全く見られなかった。一方、肥満細胞の脱顆粒抑制剤disodium cromoglycateのアナフィラキシー様の血管透過性亢進反応抑制作用は、空気嚢内液中のヒスタミン量の低下とよく一致していた。以上の結果は、 $\beta$ -アドレナリン作動薬は肥満細胞の脱顆粒抑制作用とは異なった機序で血管透過性亢進反応を抑制していると考えられる。これはまた、 $\beta$ -アドレナリン作動薬が、肥満細胞の脱顆粒を介さない血管透過性亢進反応、すなわち、セロトニンにより誘発される血管透過性亢進反応、及び、アレルギー反応惹起後4時間の血管透過性亢進反応に対しても強い抑制作用を発現したことから確認された。従って、 $\beta$ -アドレナリン作動

薬の作用点は、肥満細胞ではなく、血管系、おそらく血管内皮細胞であると考えられる。なお、この血管透過性抑制作用は、 $\beta$ 受容体遮断薬propranololで打ち消されることから $\beta$ 受容体を介したものであることが判明した。

### (3) ポストアナフィラキシー相のヒスタミンの役割

本炎症モデルにおいてヒスタミンは、アレルギー反応惹起後30分以内に肥満細胞から放出されるだけでなく、8時間ごろから、24時間をピークに持続的に増加する。このポストアナフィラキシー相のヒスタミンの血管透過性亢進反応、及び白血球浸潤反応に対する役割について検討した。アレルギー反応惹起後23.5-24時間の血管透過性亢進反応は、pyrilamine及びmethysergideの併用、あるいは、pyrilamineと $H_2$ 拮抗剤cimetidineの併用では全く抑制されなかった。この結果から、ヒスタミンは血管透過性亢進反応には関与していないと考えられる。その理由として、アレルギー反応惹起後23.5時間に、ヒスタミンを空気嚢内に注射しても血管透過性亢進はみられず、組織の反応性が低下していることが明らかとなった。一方、histaminaseを空気嚢内に連続投与して空気嚢内液中のヒスタミン濃度を持続的に低下させたとき、あるいは、cimetidineを2回投与して作用を持続させた場合、空気嚢内液中の浸潤白血球数は有意に増加したが、この作用はpyrilamineではみられなかった。また、ヒスタミンを空気嚢内に注射すると浸潤白血球数は減少し、ヒスタミンに白血球浸潤抑制作用があることが確認された。以上から、ポストアナフィラキシー相のヒスタミンは、血管透過性亢進には関与せず、 $H_2$ 受容体を介して白血球浸潤に対し抑制的に作用していることが明らかになった。

### (4) シクロオキシゲナーゼ阻害剤の白血球浸潤抑制作用発現におけるヒスタミンの関与

シクロオキシゲナーゼ阻害剤indomethacin, diclofenac及びtiaprofenic acidを抗原と共に空気嚢内に投与すると、8時間後の空気嚢内液中の $PGE_2$ 量は用量依存的に減少し、それにとまって血管透過性亢進反応、及び白血球浸潤が抑制された。この時、空気嚢内液中のヒスタミン量は、逆に増大し、その程度は、各薬物の抗炎症効果の強さと相関していた。indomethacinのヒスタミン量増加作用は、その抗炎症作用と同様に $PGE_2$ の投与により打ち消されたことから、PG産生阻害の結果を生じたものであると考えられる。次に、このレベルが増加したヒスタミンが、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の抗炎症効果を減弱あるいは増強しているかどうか、抗ヒスタミン剤を用いて検討した。pyrilamineをindomethacin投与後空気嚢内に投与した場合、indomethacinの血管透過性抑制作用、白血球浸潤抑制作用は全く影響されなかった。ところが、cimetidineを同様に投与したときには、indomethacin及びdiclofenacの血管透過性亢進反応抑制作用は影響されなかったが、白血球浸潤抑制作用は有意に打ち消された。また、他の $H_2$ 拮抗剤ranitidine及びfamotidineを用いた場合でも同様の結果が得られた。以上の結果から、シクロオキシゲナーゼ阻害剤は、白血球浸潤抑制作用を持つポストアナフィラキシー相のヒスタミンの産生を増加させ、

白血球浸潤抑制作用を発現していると考えられる。

(5) ポストアナフィラキシー相のヒスタミン放出機序ヒスタミン産生増大因子の存在

アナフィラキシー相のヒスタミンは、肥満細胞から放出されるものであり、空気嚢内液中のレベルは抗原刺激後30分以内に著しく増大し、その後1-2時間で消失する。一方、ポストアナフィラキシー相のヒスタミンは、8時間ごろから持続的に増加しはじめ、24時間に最大になる。この経時変化の相違は、ヒスタミン放出機序が異なることを示唆する。そこで、空気嚢上部の皮膚、皮下組織中のヒスタミン産生酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）活性を測定したところ、24時間をピークとして持続的に亢進し、その経時変化は、ポストアナフィラキシー相のヒスタミン量の増加とよく一致した。HDC阻害剤alpha-fluoromethylhistidineは、アナフィラキシー相のヒスタミン放出は抑制しないが、ポストアナフィラキシー相のヒスタミン放出は用量依存的に抑制したことから、ポストアナフィラキシー相のヒスタミンは、HDC活性の増大により新たに産生されたものであると考えられる。一方、空気嚢内液中には、骨髓細胞のヒスタミン産生を増加させる活性が存在することをみいだした。この活性は、無処置ラットの血清中、及びヒスタミン産生の見られない無感作群の空気嚢内液中には認められなかった。しかも、アレルギー群の空気嚢内液中のこの活性は、ヒスタミン量の増加とよく一致して増大した。これらの結果から、骨髓細胞のヒスタミン産生を指標として測定されるヒスタミン産生増大活性は、ポストアナフィラキシー相のヒスタミン産生に関与していると考えられる。このヒスタミン産生増大因子は、70℃、30分の処理、あるいは、トリプシン処理で活性の低下が認められることから蛋白性の因子であると考えられ、その分子量は25,000-40,000と推定された。

[総括]

ラットのアレルギー性空気嚢炎症モデルでは、炎症局所のヒスタミンレベルは2相性に増大することが明らかになった。アナフィラキシー相のヒスタミンは、肥満細胞の脱顆粒により放出され、血管透過性亢進に大きく関与しているのに対し、ポストアナフィラキシー相のヒスタミンは、HDC活性の増大により産生されたもので、血管透過性亢進には関与せず、白血球浸潤をフィードバック的に抑制していること、さらにシクロオキシゲナーゼ阻害剤の白血球浸潤抑制作用にも関与していることが明らかになった。また、dexamethasoneや $\beta$ -アドレナリン作動薬の抗アナフィラキシー作用は、肥満細胞の脱顆粒抑制が主作用ではなく、応答細胞すなわち血管内皮細胞の応答を抑制していることが示唆された。以上、アレルギー炎症の進展におけるヒスタミンの役割を解明し、さらに、本モデルは抗アレルギー薬の作用機序解明に優れたモデルであることが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

本論文は、ラットのアレルギー性気管支炎モデルを活用することにより、アレルギー反応を原因とする炎症の病態について内因性ヒスタミンの立場から解析を試み、ケミカルメディエーターとしてのヒスタミンの重要性に多くの新知見を加えるとともに、数種の薬物の抗炎症抗アレルギー作用についても、ヒスタミンの視点からの新しい作用機序を提示したものである。

第1章では、抗原惹起直後におけるアナフィラキシー相の血管透過性亢進反応には、組織肥満細胞の脱顆粒により放出されたヒスタミン、セロトニンが大きく関与し、最近注目されているSRS(slow reacting substance)やプロスタグランジンの関与は小さいことを明らかにした。さらに、ステロイド性抗炎症薬は、このアナフィラキシー相における血管透過性亢進反応を抑制することを明らかにし、その抑制作用は、従来提唱されている作用機序すなわちアラキドン酸代謝の抑制あるいは肥満細胞の脱顆粒抑制によるものではなく、ケミカルメディエーターに対する毛細血管内皮細胞の応答性を抑制する機序が重要であることを示した。

第2章では、抗喘息薬として用いられる $\beta$ -アドレナリン作動薬のアナフィラキシー相における血管透過性亢進反応の抑制機序について解析し、その作用機序は、肥満細胞の脱顆粒抑制によるものではなく、血管内皮細胞の応答性を直接抑制するためであることを明らかにした。

第3章では、ヒスタミンは、アナフィラキシー相における一過性の増加のみでなく、アレルギー反応惹起後24時間をピークとして持続的に炎症局所に増加することを見だし、このアナフィラキシー相以降に出現するヒスタミンは血管透過性亢進反応には全く関与せず、 $H_2$ 受容体を介して炎症局所への白血球浸潤を抑制していることを明らかにした。

第4章では、白血球浸潤抑制作用をもつシクロオキシゲナーゼ阻害剤の作用機序解明を行い、その結果、これらの薬物は炎症局所におけるヒスタミン産生を促進させ、産生されたヒスタミンが $H_2$ 受容体を介して白血球浸潤を抑制するという新しい機序を提示した。

第5章では、ポストアナフィラキシー相のヒスタミンは、肥満細胞の脱顆粒により放出されるのではなく、炎症局所のヒスタジン脱炭酸酵素活性の増加により新たに産生されるものであることを明らかにするとともに、ヒスタミン産生を増大させる活性因子が炎症滲出液中に存在することを見出し、その生化学的特徴を示した。

以上、本論文は、アレルギー炎症において、内因性のヒスタミンが炎症反応の調節因子としてきわめて重要な役割を多面的に果たしていることを明らかにし、さらに抗炎症抗アレルギー薬の作用機序についても新知見を加えたものであり、学位論文として十分価値ある内容と認める。