

肉芽組織の cyclic AMP 含量の histamine による増加

とその機構に関する研究

岡山大学医学部薬理学教室 (主任: 佐伯清美教授)

横 山 純

(昭和53年9月1日受稿)

緒 言

結合組織の histamine の大部分はこの組織の固着細胞である肥満細胞に含まれている。¹⁾しかし, histamine が結合組織細胞の増殖あるいは機能に対してどのような関りを持っているかということは明らかでない。

一方, histamine は胃酸分泌を強力に刺激し, 種々の心臓標品に対して陽性変力および陽性変時効果を示す。²⁾この時, histamine は胃粘膜の細胞^{3,4,5)}や心筋^{6,7,8)}に存在する H_2 -受容体を活性化し, 細胞内の cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) レベルを上昇させる。このような細胞内変化は, さらに介在過程を経て, 最終的な薬理効果の発現につながるものと考えられている。³⁻⁸⁾

肉芽組織は起炎刺激に対する結合組織の応答として形成され, 線維芽細胞と新生血管に富んでいる。また, この組織では細胞増殖と細胞間質の合成が活発に行なわれている。もしも, 肉芽組織構成細胞に H_2 -受容体が存在するならば, その活性化によってこれら細胞内の cyclic AMP レベルが上昇し, 細胞機能に影響が及ぶ可能性がある。既に, 我々は外から投与した histamine が, 肉芽組織の増殖を H_2 -受容体の刺激を通じて抑制する事実を報告している。⁹⁾

本論文では, 結合組織における histamine の病態生理学的意義を明らかにする目的で行なった, 肉芽組織の cyclic AMP 含量に対する histamine の効果についての検討成績を述べる。

材料および方法

1. 材 料

histamine dihydrochloride (試薬特級), quini-dine sulfate (試薬特級), theophylline (試薬特

級), 2-mercaptoethanol (含硫蛋白研究用特製試薬), および活性炭 (カラムクロマト用特製試薬, 80-100メッシュ) は半井化学より購入した。2,5-diphenyloxazole (PPO; ドータイト試薬), 1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene (POPOP; ドータイト試薬), トルエン (試薬特級) および Triton X-100 (化学用) は和光純薬より購入した。dextran T70 (平均分子量=70,000) は Pharmacia 社より, 牛血清アルブミン (Fraction V) は Armour 社より, cyclic AMP は Sigma 社より, adrenaline hydrochloride (日本薬局方) は三共より, propranolol hydrochloride (日本薬局方) は住友化学より, mepyramine maleate は ICN 社より購入した。burimamide と metiamide は Smith Kline and French 社より贈与された。[8-³H] cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic [³H] AMP; 27.5 Ci/mmol) は Radiochemical Centre より購入した。

2. ホルマリン濾紙肉芽腫

体重 210 ± 10 g の Wistar 系雄ラットの皮下に以前に報告した方法⁹⁾により, ホルマリン浸漬濾紙を埋没し, 肉芽腫を生成させた。

3. 生体位における薬物の効果

濾紙埋没後7日目のラットに被験薬物を投与し, 所定の時間が経過してから, Schmidt らの方法¹⁰⁾に準じて肉芽腫の cyclic AMP 含量の変動に関与する酵素を失活させる目的で, マイクロウェーブを40秒間全身照射した。マイクロウェーブの照射には電子レンジ (シャープ Model R-1501, 高周波出力 1.3 KW) を使用した。40秒間の照射により皮下組織の温度は 80°C 以上に上昇することが確認された。

マイクロウェーブ照射終了後直ちに肉芽腫を摘出

し、濾紙を除去し、重量を測定した。肉芽腫をガラスホモジナイザーに入れ、組織100mgにつき0.9mlの氷冷7%トリクロル酢酸を加えてホモジナイズした。ホモジネートのうち2mlずつを2本の試験管に入れcyclic AMPの定量に用い、残りのうちの必要量を蛋白定量に用いた。

薬物は生理食塩水に溶解し、腹腔内または皮下に注射した。注射容積は0.1ml/100g体重とした。histamineおよびadrenalineは腹腔内に、その他の薬物は皮下に注射した。histamineおよびadrenalineのそれぞれの効果に対する他の薬物の影響を試験する場合には、併用する薬物をhistamineあるいはadrenaline投与の30分前に投与した。histamineは塩基として、adrenaline, quinidine, propranololおよびmepyramineはいずれも塩として用量を表わした。なお、対照動物には生理的食塩水を注射した。

4. 試験管内における薬物の効果 組織片の調製

ホルマリン濾紙埋没後7日目にラットを脱血致死させ、すばやく肉芽腫を眼科用剪刀で摘出し、氷の上にのせたKrebs-Henseleit Ringer bicarbonate液(NaCl, 118mM; KCl, 4.7mM; CaCl₂, 2.5mM; KH₂PO₄, 1.2mM; MgSO₄, 1.2mM; NaHCO₃, 25mMおよびglucose, 11.7mMよりなる)を入れたシャーレの中で濾紙を除去した後、一辺2mm以下の小片に細切した。組織片のうち脂胞細胞が多くて液面に浮上するものを捨て、シャーレの底に沈むもののみを実験に使用した。

組織片のインキュベーション

インキュベーション終了後の操作を迅速に行なう目的で組織片のインキュベーションは10ml用のガラスホモジナイザー中で行なった。ホモジナイザーに4.5mlのKrebs-Henseleit Ringer bicarbonate液を入れ、37℃で95%O₂-5%CO₂を十分に通気した後、約500mgの組織片を入れて、同じガスを通気しながらインキュベーションを続けた。

インキュベーション媒液へのガスの供給は次のようにして行なった。ホモジナイザーの内径に合うゴム栓に輸血針(16gauge)2本を通し、一方にポリエチレンチューブを接続した。ホモジナイザーの口にゴム栓をし、ポリエチレンのチューブの先端を媒液中に深く入れ、チューブの先端からガスを泡だて、他方の輸血針を通して排気した。通気速度は個々の気泡が識別できる最大速度に維持した。

組織のcyclic AMP濃度は、はじめ生体位における正常値に比べて著明に上昇していたが、インキュベーション期間中に漸次低下し、インキュベーション開始20分後にはほぼ定常値に落ち着いたので、薬物添加前の組織片のインキュベーション期間は30分間とした。

組織片のプレインキュベーション終了と同時に媒液を捨て、被験薬物を溶解させて37℃であらかじめ95%O₂-5%CO₂を通気しておいた4.5mlのKrebs-Henseleit液と交換して、通気ならびにインキュベーションを再開した。薬物存在下でのインキュベーション終了後、直ちに媒液を捨て、氷冷7%トリクロル酢酸4.5ml加えてホモジナイズした。以後の操作は生体位の実験の場合と同様である。

5. cyclic AMP 試料の調製

cyclic AMP定量用のホモジネート2mlのおおのに回収率検定の目的でcyclic [³H] AMP 0.045pmole (約2,700dpm)を添加した。各試料に1N塩酸0.2mlを加え2,000×gで15分間遠心した。上清を共栓付の容量10mlのガラス遠心管に移し、6mlの水飽和エーテルを加えて30秒間振盪し、遠心してエーテル相を吸引除去した。エーテルによる抽出操作をさらに4回繰り返してトリクロル酢酸と脂肪を除去した。水相に残存するエーテルは、遠心管を90℃の湯に3分間浸すことによって除去した。

Ottenらの方法¹¹⁾に準じ、全水相を0.1N塩酸と平衡させたDowex 50W-X8(200-400メッシュ、H⁺型)のカラム(0.7×3cm)に適用した。カラムを3mlの0.1N塩酸と2mlの脱イオン水で順次洗液後、cyclic AMPを4mlの脱イオン水で溶出した。溶出液を凍結乾燥してcyclic AMPの定量まで冷蔵庫に保存した。

6. cyclic AMP の定量

Brownらの方法¹²⁾に準じて、8mM theophyllineと6mM 2-mercaptoethanolを含む50mM Tris-塩酸緩衝液(PH 7.4)の0.5mlに乾燥試料を溶解した。試料を0.05mlずつ、12×105mmの2本のガラス試験管に入れ、cyclic AMPの定量に用い、残りのうち、0.25mlを回収率の検定に供した。

cyclic AMP定量用試料0.05mlを、8nCiのcyclic [³H] AMPを含む0.05mlの上記のTris-塩酸緩衝液と混和し、さらに、同じ緩衝液で24倍に希釈したcyclic AMP結合蛋白¹³⁾0.1mlを加え、最後に0.15mlの緩衝液を加えて最終容積を0.35mlとし、0℃で90分間放置した。

反応終了後、試験管に氷冷活性炭懸濁液 1 ml を加え十分に混和した後、4℃で2,000 $\times$ g 15分間遠心した。活性炭懸濁液としては、theophylline および 2-mercaptoethanol を含まない 50mM Tris-塩酸緩衝液 (PH 7.4) に、使用直前に活性炭 10mg/ml と dextran T 70 1.5mg/ml と牛血清アルブミン 2.0mg/ml を加えて十分に攪拌し懸濁あるいは溶解させたものを使用した。

上清 1 ml を、PPO 4 g と POPOP 0.1 g をトルエン 667 ml および Triton X-100 333 ml よりなる混合液に溶解して調整したシンチレーター 10ml と混和し、放射能を Liquid Scintillation Spectrometer (アロカ社製, Model LSC-653) で計測した。

上記の反応混合液の cyclic AMP 結合蛋白の代りに 0.1ml の緩衝液を加えて、同様の操作を行なうことによりブランクを求め、各測定値からブランクを差し引いた。検量曲線は 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 および 20.0 pmole/0.05ml の濃度

範囲の authentic の cyclic AMP を用いて作成した。

回収率検定用の試料は、0.75ml の水および 10ml のシンチレーターと混合した後、放射能を計測した。もとの試料中の cyclic AMP 含量は直接アイソトープ希釈法によって算定した。

7. 蛋白質の定量

ホモジネートの蛋白含量は牛血清アルブミンを標準にして Lowry らの方法¹³⁾により測定した。

実験成績

I. 肉芽腫の cyclic AMP 含量に対する生体位での薬物の効果

1. histamine の効果

histamine をラットに腹腔内注射すると、用量依存性の、肉芽腫 cyclic AMP 含量上昇効果が認められた (Table 1)。0.05mg/kg では投与 20 分後に、0.5 mg/kg では投与 20 および 30 分後に肉芽腫の cyclic AMP 値の上昇がみられたが、これらの上昇効果は対

Table 1. Effect of intraperitoneally injected histamine on cyclic AMP levels in formalin-soaked filter-paper granulomas in the rat

Experiment No.	Dose (mg/kg)	Time of injection (min before microwave irradiation)	n	Cyclic AMP concentration (pmoles/mg protein)
1	Control	—	10	1.70 $\pm$ 0.08
	0.05	20	8	1.89 $\pm$ 0.09
	0.5	20	10	2.01 $\pm$ 0.16
	0.5	30	7	1.81 $\pm$ 0.17
2	Control	—	7	1.49 $\pm$ 0.15
	5	10	11	2.36 $\pm$ 0.02 ⁺
	5	15	10	2.08 $\pm$ 0.13 ⁺
	5	20	13	2.41 $\pm$ 0.12 ⁺
	5	30	8	2.41 $\pm$ 0.13 ⁺
3	Control	—	10	1.70 $\pm$ 0.08
	5	60	8	1.57 $\pm$ 0.11 ⁺
4	Control	—	10	2.13 $\pm$ 0.08
	50	20	10	2.59 $\pm$ 0.10 ⁺

On day 7 after subcutaneous implantation of filter paper, histamine was administered to the animals and they were exposed to microwave irradiation different periods thereafter. Histamine dose is expressed as the base. Control groups received 0.9 % saline. Immediately after microwave irradiation 2 to 4 granulomas were removed from each rat and duplicate determinations of cyclic AMP content of each granuloma were made. The numbers of such determinations are given in the table. Values represent mean $\pm$ S.E.M. ⁺Significantly different from respective control groups by *t*-test, *P* < 0.01.

照動物の肉芽腫 cyclic AMP 含量と比べて有意差が認められなかった。5 mg/kgの用量では、投与10分後から有意の cyclic AMP 含量上昇効果が観察され、効果は20分後に最大に達した。60分後には cyclic AMP 値は正常値に復帰した。histamine の用量をさらに増やして 50mg/kg にした場合、投与 20分後に有意の cyclic AMP 含量増加を引き起こしたが、この効果は 5 mg/kgの効果よりも劣っていた。

2. histamine の効果に対する burimamide と mepyramine の拮抗作用

histamine の肉芽腫 cyclic AMP 含量上昇効果は投与20分後にピークに達したので、histamine の効果に対する他の薬物の影響は、すべて histamine 投与の 20 分後に判定した。Table 2 に示すように、histamine 5 mg/kg の効果は histamine H_2 -受容体拮抗剤 burimamide¹⁴⁾ 1 mg/kg によりラットを前処置することによって、殆んど完全に抑制された。histamine 5 mg/kg と burimamide 5 および 10 mg/kg を併用した場合、肉芽腫の cyclic AMP 含量は burimamide の同量を単独投与した場合の測定値以下に低下し、しかもこのような効果は併用する burimamide の量が 5 よりも 10 mg/kg のときの方が顕

著であった。

単独投与した burimamide は、1 mg/kg で肉芽腫の cyclic AMP 値を有意ではないが軽度上昇させ、5 mg/kg ではこのような効果は極めて弱く、10mg/kgでは全く無効であった。

histamine H_1 -受容体拮抗剤 mepyramine 1 mg/kg による前処置により、histamine 5 mg/kg の効果は 45.7% の抑制を受けたが、この抑制効果は同量の burimamide の抑制効果に比べると弱かった。histamine と併用する mepyramine の量を 5 mg/kg に高めると、肉芽腫の cyclic AMP 含量は mepyramine 5 mg/kg 単独投与の場合以下に低下した。

mepyramine の単独投与では、1 および 5 mg/kg のいずれの用量でも、肉芽腫の cyclic AMP 含量に対する有意の影響は認められなかった。

burimamide 1 mg/kg と mepyramine 1 mg/kg の併用によって前処置した動物では、histamine 5 mg/kg の効果は完全に遮断された。

3. histamine の効果に対する propranolol の影響
histamine 5 mg/kg による肉芽腫 cyclic AMP レベルの上昇は、 β -遮断剤 propranolol 1 mg/kg により 60.9%抑制された。histamine と併用する propran-

Table 2. Antagonism by drugs of histamine action on cyclic AMP levels in formalin-soaked filter-paper granulomas in the rat

Drug pretreatment (mg/kg, s. c.)	Cyclic AMP concentration (pmoles/mg protein)		
	Control A	Histamine 5 mg/kg, i. p. B	B - A
Control	1.49±0.15 (7)	2.41±0.12 (13)	0.92 ⁺
Burimamide 1	1.76±0.13 (8)	1.85±0.16 (8)	0.09
5	1.57±0.13 (8)	1.36±0.12 (10)	-0.21
10	1.49±0.08 (10)	1.11±0.17 (10)	-0.38
Mepyramine 1	1.42±0.15 (8)	1.92±0.20 (7)	0.50
5	1.36±0.08 (10)	1.12±0.05 (10)	-0.24
Burimamide 1 + Mepyramine 1	1.33±0.08 (7)	1.34±0.18 (8)	0.01
Propranolol 1	1.39±0.07 (8)	1.75±0.09 (8)	0.36 ⁺
5	1.34±0.06 (8)	1.10±0.05 (8)	-0.24

On day 7 after subcutaneous implantation of filter paper, histamine was injected 20 min before microwave irradiation, and test drugs were administered 30 min before histamine injection. Control groups received 0.9% saline. Histamine does is expressed as the base and those of mepyramine and propranolol as the salts. Values are the means $\pm$ S.E.M. for the numbers of granulomas indicated in parentheses. ⁺ Significant difference between control (A) and histamine-treated (B) groups, $P < 0.01$.

Table 3. Antagonism by drugs of adrenaline action on cyclic AMP levels in formalin-soaked filter-paper granulomas in the rat

Drug Pretreatment (mg/kg, s. c.)		Cyclic AMP concentration (pmoles/mg protein)		
		Control A	Adrenaline 1 mg/kg, i. p. B	B-A
Control		1.49±0.15 (7)	2.46±0.16 (4)	0.97 ⁺
Propranolol	1	1.39±0.07 (8)	1.10±0.09 (8)	-0.29
	5	1.34±0.06 (8)	1.07±0.08 (8)	-0.27
Burimamide	1	1.76±0.13 (8)	2.51±0.15 (8)	0.75 [§]
	5	1.57±0.13 (8)	2.32±0.23 (7)	0.75 [‡]
Mepyramine	1	1.42±0.15 (8)	2.15±0.17 (8)	0.73 [§]
	5	1.36±0.08 (10)	2.49±0.19 (7)	1.13 [§]

On day 7 after subcutaneous implantation of filter paper, adrenaline was injected 20 min before microwave irradiation, and test drugs were administered 30 min before adrenaline injection. Control groups received 0.9% saline. The doses of adrenaline, propranolol and mepyramine are expressed as the salts. Values are the means ± S.E.M. for the numbers of granulomas indicated in parentheses. Significant difference between control (A) and adrenaline-treated (B) group: ⁺P<0.05, [‡]P<0.02, [§]P<0.01.

Table 4. Effect of quinidine on histamine and adrenaline actions on cyclic AMP levels in formalin-soaked filter-paper in the rat

Drugs (mg/kg, i. p.)		Cyclic AMP concentration (pmoles/mg protein)		
		Control A	Pretreatment by quinidine 10mg/kg, s. c. B	B-A
Control		1.49±0.15 (7)	1.15±0.05 (6)	-0.34
Histamine	5	2.41±0.12 (13)	2.55±0.08 (8)	0.14
Adrenaline	1	2.46±0.16 (4)	2.99±0.18 (8)	0.53

On day 7 after subcutaneous implantation of filter paper, either histamine or adrenaline was injected 20 min before microwave irradiation, and quinidine was administered 30 min before histamine or adrenaline injection. Control groups received 0.9% saline. Histamine dose is expressed as the base and those of adrenaline and quinidine as the salts. Values are the means ± S.E.M. for the numbers of granulomas indicated in parentheses.

olol の量を 5 mg/kg に増やすと, propranolol 単独投与群の肉芽腫の cyclic AMP 値よりも, 両者併用群の cyclic AMP 値の方が低くなった.

単独投与した propranolol は 1 および 5 mg/kg のいずれの用量でも, 肉芽腫の cyclic AMP 含量に対して有意の影響を与えなかった.

4. adrenaline の効果と, それに対する β -遮断剤 および 抗 histamine 剤の影響

Table 3 に示すように, adrenaline 1 mg/kg を腹腔内投与した場合にも, histamine 5 mg/kg の効果にはほぼ匹敵する肉芽腫 cyclic AMP 上昇効果が, 20 分後における測定で認められた. この adrenaline の効果は, propranolol 1 mg/kg による前処置により完全に遮断されただけでなく, adrenaline 1 mg/kg と pro-

pranolol 1 mg/kg の併用群では, 肉芽腫の cyclic AMP 含量は propranolol の同量単独投与群の値以下に低下した. propranolol 5 mg/kg を adrenaline 1 mg/kg と併用した場合にも同様の成績が得られた.

burimamide と mepyramine は 1 および 5 mg/kg のいずれの用量においても, adrenaline 1 mg/kg の効果に対して顕著な影響は及ぼさなかった.

5. histamine および adrenaline の効果に対する quinidine の影響

ある種の H_1 -拮抗剤ならびに propranolol には quinidine 様の非特異的作用があると言われているので, histamine および adrenaline 効果に対して, quinidine がどのような影響を及ぼすか調べてみた. Table 4 に示す通り, quinidine 10 mg/kg は単独投与で cyc-

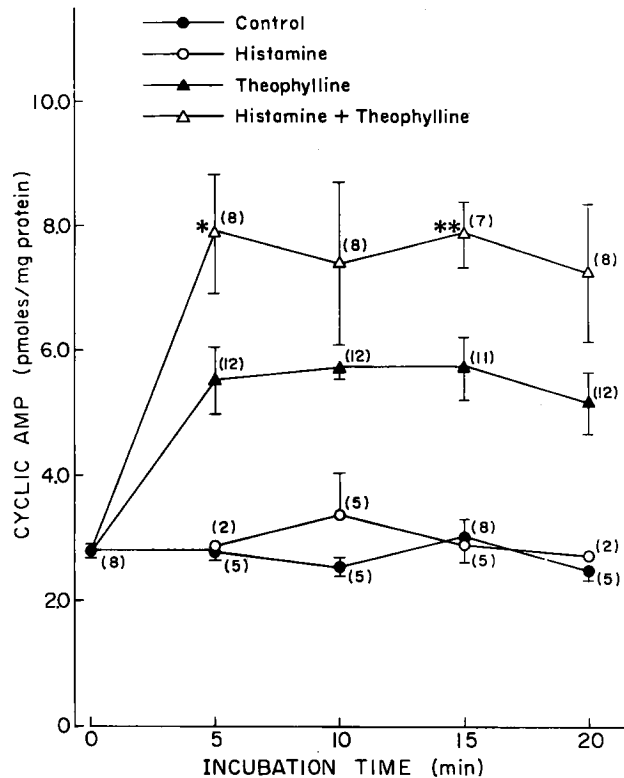


Fig 1. Effects of histamine and theophylline on cyclic AMP levels in chopped granuloma tissue. Granulomas were removed from rats on day 7 after subcutaneous implantation of filter paper and immediately chopped into small pieces. Granulation tissue was incubated for periods indicated on the abscissa in modified Krebs-Henseleit Ringer bicarbonate solution with (1 mM) or without test drugs. Each point is the mean for the numbers of experiments given in parentheses, and the vertical bar represents the S.E.M. Significantly different from corresponding values in the presence of theophylline alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$.

lic AMP 含量をやや低下させたが, histamine 5 mg/kg あるいは adrenaline 1 mg/kg と併用すると, これらの薬物をそれぞれ単独で投与したときの値以上に cyclic AMP 値を上昇させた.

II. 肉芽腫切片の cyclic AMP 含量に対する試験管内での薬物の効果

1. histamine および theophylline の効果

Fig. 1 に示すように, 肉芽腫切片を 1 mM の histamine 存在下でインキュベートした場合, インキュベーション開始から 5-20 分後のいずれの測定でも, 肉芽組織の cyclic AMP 含量に有意の増加は認められなかった. ところが, histamine 1 mM と theophylline 1 mM の共存下では肉芽組織の cyclic AMP 含量は, theophylline 1 mM を単独で加えた場合の値を上回ることが, インキュベーション開始 5-20 分後のいずれの測定においても認められた. histamine と theophylline 共存下での組織の cyclic AMP レベルと theophylline 単独存在下でのそれとの間の差は, インキュベーション時間が 5 および 15 分の場合には有意であった. theophylline 1 mM は, 単独でも薬物を添加しない対照に比べると常に有意の cyclic AMP レベルの上昇を引き起こした ($p < 0.001$).

histamine の濃度が 0.1 mM およびそれ以下では, theophylline 1 mM の併用の有無にかかわらず,

cyclic AMP レベルに対する有意の上昇効果は, 5-20 分のいずれのインキュベーション時間においても認められなかった.

2. histamine の効果に対する metiamide と mepyramine の影響

Table 5 に示すように, theophylline 1 mM の共存下での histamine 1 mM の効果は, 1 mM の H_2 -拮抗剤 metiamide によって完全に遮断された. 一方, 1 mM の histamine の効果に対して, mepyramine 1 mM は部分的な抑制作用を示すに過ぎなかった. また mepyramine 1 mM は単独でかなりの cyclic AMP 含量減少効果を示した.

考察

肉芽腫の cyclic AMP レベルは 5 mg/kg あるいはそれ以上の用量の histamine の投与によって有意に上昇した. histamine 5 mg/kg の効果が burimamide 1 mg/kg による前処置によって殆んど完全に遮断されたことは, histamine のこの効果が主として H_2 -受容体の活性化を通じて引き起こされることを示している. しかし, mepyramine 1 mg/kg にも同じ用量の burimamide の効果に比べると劣ってはいたが, histamine による cyclic AMP 値の上昇に対する明らかな遮断作用が認め

Table 5. Inhibition by metiamide and mepyramine of the histamine-induced increase in cyclic AMP levels in chopped granulation tissue in the presence of theophylline *in vitro*

Drugs (1 mM)	n	Cyclic AMP concentration (pmoles/mg protein)
Control	11	5.76 ± 0.52
Histamine	7	7.86 ± 0.53 ⁺
Metiamide	6	6.57 ± 0.67
Histamine + Metiamide	6	5.75 ± 0.55
Mepyramine	6	4.43 ± 0.59
Histamine + Mepyramine	6	4.96 ± 0.31

Granulomas were removed from rats on day 7 after subcutaneous implantation of filter paper and immediately chopped into small pieces. Granulation tissue was incubated for 15 min in modified Krebs-Henseleit Ringer bicarbonate solution containing 1 mM theophylline and test drugs. The numbers of duplicate determinations are given in the table and each value represents the mean ± S.E.M. ⁺ Significantly different from control value in the presence of theophylline alone, $P < 0.02$.

られたので、この histamine 効果には、 H_2 -受容体の活性化もある程度関与している可能性がある。

histamine の肉芽腫 cyclic AMP レベル上昇効果に対する H_1 -および H_2 -拮抗剤の生体位での遮断作用の特異性は、これらの拮抗剤が adrenaline の cyclic AMP レベル上昇効果は全然抑制しなかったことから明らかである。また、quinidine が histamine と adrenaline のいずれの効果にも何ら抑制作用を示さなかったことから、生体位での H_1 -拮抗剤の抑制作用には、いわゆる quinidine 様作用は関係がないものとみられる。そして同様のことは、propranolol の histamine や adrenaline の効果に対する抑制作用についてもあてはまると思われる。

histamine は副腎髄質から H_2 -受容体刺激によって catecholamine 類を遊離させることが知られており¹⁵⁾、今回の実験でも、肉芽腫の cyclic AMP レベルに及ぼす histamine の効果は mepyramine および propranolol のどちらによっても抑制された。従って、histamine のこのような効果には、histamine によって遊離される catecholamine 類の、肉芽腫構成細胞に対する β -受容体刺激作用も含まれているものとみられる。ただし、propranolol は adrenaline の効果を完全に遮断する用量で、histamine の効果を部分的にしか抑制しなかったもので、catecholamine 類の遊離を介するこの間接作用は histamine 効果の主要な因子となっているとは考えにくい。

histamine の用量を 5 mg/kg から 50 mg/kg に増した場合、肉芽腫 cyclic AMP 含量増加効果が、かえって減弱したが、その理由は明らかでない。高濃度の histamine に phosphodiesterase 活性増強作用があることが、試験管内の実験で見出されている⁹⁾。大量の histamine は、adenylate cyclase を活性化する他に生体位でも phosphodiesterase 活性を増強し、そのため今回観察されたような現象が起こるのかも知れない。

生体位の実験では、肉芽腫構成細胞に histamine 受容体が存在し、その刺激によって cyclic AMP レベルの上昇が起こったと断定することはできないので、摘出した肉芽組織を用いる試験管内の実験でこの点を検討した。この場合、 H_2 -受容体拮抗剤として burimamide の代りに metiamide を使用したのは、後者の方が効力が強い¹⁶⁾からである。theophylline 1 mM 存在下での、histamine 1 mM による肉芽組

織切片の cyclic AMP 含量増加は metiamide 1 mM により完全に遮断され、cyclic AMP 値は theophylline と metiamide 存在下での値以下に低下した。これに対して、mepyramine 1 mM は histamine の効果に部分的に拮抗したに過ぎなかった。このような成績から、肉芽腫中の細胞には H_2 -受容体が存在し、histamine による cyclic AMP 含量増加に主要な役割を演じるものとみられる。また、肉芽組織には H_1 -受容体も存在していて、これも cyclic AMP レベルの上昇にある程度関与する可能性がある。既に、モルモット脳組織については、 H_2 -受容体以外に H_1 -受容体も histamine による cyclic AMP レベルの上昇に関与することが知られている¹⁰⁾。しかし、mepyramine は単独でも肉芽組織切片の cyclic AMP 値をある程度低下させたので、試験管内における mepyramine の作用には非特異的要素が含まれている可能性は否定できない。

我々は以前に、histamine の連日皮下投与によって、ホルマリン浸漬濾紙の皮下埋没による肉芽腫の生成が著明に抑制される事を見出した⁹⁾。一方、細胞内 cyclic AMP レベルの上昇と細胞増殖の抑制との因果関係を示唆する多くの知見がある。例えば、cyclic AMP とその類似化合物が培養腫瘍細胞の増殖を阻害することや¹⁹⁻²¹⁾、adenylate cyclase を刺激するプロスタグランジンが培養した腫瘍細胞²⁰⁾ならびに線維芽細胞²²⁾の増殖を抑制すること、培養した腫瘍化ならびに非腫瘍化線維芽細胞の増殖速度と細胞内の cyclic AMP レベルとの間に逆相関が存在すること²³⁾などである。そこで、肉芽腫の生成に対する histamine の抑制効果は、histamine が肉芽腫構成細胞の cyclic AMP レベルを上昇させるためではないかと推測された⁹⁾。実際に、今回の実験で、推測通り histamine が肉芽組織の cyclic AMP 含量を増加させることが証明できた。

肉芽腫増殖に対する histamine の抑制作用は H_2 -受容体拮抗剤では遮断されるが、 H_1 -拮抗剤では遮断されない⁹⁾ことがわかっている。ところが、histamine の肉芽腫 cyclic AMP 上昇効果は H_2 -受容体拮抗剤だけでなく H_1 -受容体拮抗剤によっても抑制された。従って、細胞内 cyclic AMP レベルの上昇が肉芽組織の増殖阻害の原因となるとすれば、 H_2 -受容体刺激だけが有効である理由を明らかにする必要がある。一つの可能性として、histamine に対する H_1 および H_2 の両受容体が、肉芽組織中の異なった種類の細胞に存在していて、 H_2 -受容体を持った

細胞だけが cyclic AMP レベルの上昇による増殖阻害を受けることが考えられる。また、もう一つの可能性としては、異った種類のアゴニストに対応する受容体-adenylate cyclase 複合体が、細胞の機能的に別個の compartments に局在しているために、効果のうえで差異が生ずるということもあり得るかも知れない。

histamine による肉芽組織 cyclic AMP レベルの上昇は、肉芽組織構成細胞の増殖の抑制以外に、細胞間質の合成や分泌のような細胞機能の調節の上でも重要な意義があるかも知れない。

要約

ホルマリン浸漬濾紙の皮下埋没によって形成される、ラットの肉芽組織の cyclic AMP 含量に対する histamine の効果を調べ、次のような成績を得た。

histamine 注射 (5 mg/kg, i. p.) 後 10-30 分にはわたって有意の cyclic AMP レベルの上昇が認められ、histamine の用量を 50 mg/kg に増やすと効果は減弱した。histamine 5 mg/kg による cyclic AMP の増加は burimamide 1 mg/kg, s.c. あるいは mepyramine 1 mg/kg, s.c. による前処置により抑制されたが、burimamide の方が mepyramine よりもより有効であった。これらの両拮抗剤の併用によって histamine の効果は完全に遮断された。

burimamide と mepyramine は、1 mg/kg の用量

ではいずれも adrenaline 1 mg/kg, i. p. による cyclic AMP 増加を遮断しなかった。

propranolol 1 mg/kg, s.c. によって、adrenaline の効果は逆転し、histamine の効果は部分的に抑制された。

試験管内実験で、1 mM およびそれ以下の濃度の histamine は、単独では、肉芽組織切片の cyclic AMP レベルに影響を与えなかった。しかし、histamine 1 mM は theophylline 1 mM の共存下では、theophylline 単独の場合に比べて cyclic AMP を有意に増加させた。theophylline 単独でも、薬物を添加しない対照に比べると有意の cyclic AMP 増加が起こった。

metiamide 1 mM は、theophylline 1 mM 存在下での histamine 1 mM による cyclic AMP 増加を完全に遮断した。一方、mepyramine 1 mM は、この histamine 効果を部分的に抑制した。

以上の成績より、肉芽組織構成細胞には H_2 -受容体が存在していて、その刺激が histamine による cyclic AMP 増加に主要な役割を演じるものと考えられる。また、 H_1 -受容体も cyclic AMP 増加に或る程度関与しているものとみられる。

稿を終えるに臨み御指導、御校閲を賜った佐伯清美教授に深甚の謝意を捧げます。

文献

- 1) Riley, J. F. and West, G. B. : The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol.*, Lond., **120**, 528-537, 1953.
- 2) Douglas, W. W. : In *The pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. L. S. Goodman and A. Gilman, 5th Edn., MacMillan, New York, pp. 590-613, 1975.
- 3) Karppanen, H. O. and Westerman, E. : Increased production of cyclic AMP in gastric tissue by stimulation of histamine₂ (H_2)-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **279**, 83-87, 1973.
- 4) Dousa, T. P. and Code, C. F. : Effect of histamine and its methyl derivatives on cyclic AMP metabolism in gastric mucosa and its blockade by an H_2 receptor antagonist. *J. clin. Invest.*, **53**, 334-337, 1974.
- 5) McNeill, J. H. and Verma, S. C. : Stimulation of rat gastric adenylate cyclase by histamine and histamine analogues and blockade by burimamide. *Br. J. Pharmacol.*, **52**, 104-106, 1974.
- 6) Pösch, G., Kukovetz, W. R. and Scholz, N. : Specific inhibition by burimamide of his-

- tamine effects on myocardial contraction and cyclic AMP. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac., **280**, 223-228, 1973.
- 7) McNeill, J. H. and Verma, S. C. : Blockade by burimamide of the effects of histamine and histamine analogs on cardiac contractility, phosphorylase activation and cyclic AMP. J. Pharmac. exp. Ther., **188**, 180-188, 1974.
 - 8) Verma, S. C. and McNeill, J. H. : Cardiac histamine receptors and cyclic AMP. Life Sci., **19**, 1797-1802, 1976.
 - 9) Saeki, K., Yokoyama, J. and Wake, K. : Inhibition of granulation tissue growth by histamine. J. Pharmac. exp. Ther., **193**, 910-917, 1975.
 - 10) Schmidt, M. J., Schmidt, D. E. and Robison, G. A. : Cyclic adenosine monophosphate in brain areas : microwave irradiation as a means of tissue fixation. Science, N. Y., **173**, 1142-1143, 1971.
 - 11) Otten, J., Johnson, G. S. and Pastan, I. : Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3' : 5' - monophosphate. J. biol. Chem., **247**, 7082-7087, 1972.
 - 12) Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, R. P. and Sgherzi, A. M. : A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3' : 5' -cyclic monophosphate. Biochem. J., **121**, 561-562, 1971.
 - 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem., **193**, 265-275, 1951.
 - 14) Black, J. W., Duncan, W. A. M., Durant, C. J., Ganellin, C. R. and Parsons, E. M. : Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. Nature, Lond., **236**, 385-390, 1972.
 - 15) Staszewska-Barczak, J. and Vane, J. R. : The release of catechol amines from the adrenal medulla by histamine. Br. J. Pharmac., **25**, 728-742, 1965.
 - 16) Goodman, H. M. : Proposed mode of action of histamine. Nature, Lond., **219**, 1053, 1968.
 - 17) Black, J. W. and Spencer, K. E. V. : In International Symposium on Histamine H₂-Receptor Antagonists, ed. C. J. Wood and M. A. Simkins, Smith Kline and French Laboratories, Welwyn Garden City, pp. 23-27, 1973.
 - 18) Baudry, M., Martres, M. P. and Schwartz, J. C. : H₁ and H₂ receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices. Nature, Lond., **253**, 362-364, 1975.
 - 19) Ryan, W. L. and Heidrick, M. L. : Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3' : 5' - monophosphate. Science, N. Y., **162**, 1484-1485, 1968.
 - 20) Naseem, S. M. and Hollander, V. P. : Insulin reversal of growth inhibition of plasma cell tumor by prostaglandin or adenosine 3' , 5' -monophosphate. Cancer Res., **33**, 2909-2912, 1973.
 - 21) Sheppard, J. R. : Restoration of contact-inhibited growth to transformed cells by dibutyryl adenosine 3' : 5' - cyclic monophosphate. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., **68**, 1316-1320, 1971.
 - 22) Jonson, G. S. and Pastan, I. : Change in growth and morphology of fibroblasts by prostaglandins. J. natn. Cancer Inst., **47**, 1357-1364, 1971.
 - 23) Otten, J., Johnson, G. S. and Pastan, I. : Cyclic AMP levels in fibroblasts; relationship to growth rate and contact inhibition of growth. Biochem. biophys. Res. Commun., **44**, 1192-1198, 1971.

Histamine-induced increase in cyclic AMP levels in granulation tissue and its mechanism

Jun YOKOYAMA

Department of Pharmacology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. K.Saeki)

The effect of histamine on cyclic AMP levels in rat granulation tissue was examined. Granulomas formed by subcutaneous implantation of formalin-soaked filter paper disks were used as granulation tissue.

Histamine injection (5 mg/kg i.p.) produced a significant increase in the cyclic AMP levels. Administration of either burimamide or mepyramine blocked the cyclic AMP increase induced by histamine. Propranolol reversed the cyclic AMP increase by adrenaline but partially blocked a similar effect of histamine. Quinidine slightly but insignificantly potentiated the cyclic AMP increase induced by injection of either histamine or adrenaline.

When histamine (1 mM) was added concomitantly with theophylline (1 mM) to the incubation medium in which the chopped granulation tissue was immersed, cyclic AMP levels in the granulation tissue significantly increased compared to the addition of theophylline alone. Metiamide (1 mM) completely blocked the cyclic AMP increase caused by histamine, while mepyramine (1 mM) partially blocked this histamine effect.

These results suggest the presence of histamine H₂-receptors on the cells of granulation tissue and a major role of these receptors in the increase in cyclic AMP caused by histamine, although some extent of involvement of H₁-receptors is also suggested.