612.112.93：547.781.5

Toluidine Blue による肥満細胞からの Histamine 遊離機構

岡山大学医学部薬理学教室（主任：山崎英正教授）

古　元　重　光

〔昭和45年3月27日受稿〕

緒　言

塩基性 aniline 色素により metachromasia をおこす特徴をもつた顆粒の存在によつて，結合織細胞中から Ehrlich (1877, 1879) が氏の命名した肥満細胞 (Mastzellen) を識別したことは周知である．塩基性 aniline 色素のうち toluidine blue (以下TBと略記) はとくに美麗な metachromasia を呈するため肥満細胞染色の目的に広く利用されてきたが，これを生体染色に用いる場合屢々顆粒脱出の認められることが気付かれており (Camble, 1952; Wegelius and Hjelmman, 1955; Gustafsson and Cronberg, 1959), Gustafsson らは TB のような metachromatic dyes で生存中に染色した組織では他の肥満細胞脱顆粒物質の作用を適正に評価することはできないと注意している．

しかし，Smith (1958 a, b) は TB が適当な濃度ではラット腸間膜肥満細胞に可視的な形態変化をきたすことなく histamine (以下 hist. と略記) 遊離をおこすのを認め，その hist. 遊離は merocrine 的性質のものであると考えた．また一方，Wegelius, Hjelmman and Wasastjerna (1955) は TB による肥満細胞の形態変化および崩壊を認めながらも，それは毎常ではなく色素濃度の高い場合にはおこらないとのべ，変化のないのは細胞の固定による急速致死の徴候であると説明している．

このように TB の肥満細胞形態への影響については諸家の観察がなされているが，その所見は必ずしも一致しておらず，またその hist. 遊離作用を認めているのは前記の Smith (1958 a, b) と Riley (1959) にすぎず，遊離機構に関しては全く研究をみない．しかし，この色素が有機塩基であるところからみて，すでに豊富に研究されてきた compound 48/80 や sinomenine の作用との類似性を想定することは可能である．著者は事実この色素について分離肥満細胞からの hist. 遊離作用および脱顆粒作用を確認できた．そこで，これらの作用に関する現象的観察とその分析を進め，それらの知見にもとづいて，本物質の hist. 遊離機構を推考しようとした．実験は主としてラットの分離肥満細胞についておこなつたが，一部ラットの腸間膜肥満細胞およびイヌの全身投与実験も加えた．

実験材料および方法

肥満細胞の分離法　Saeki (1964) の方法によつた．すなわち，体重 200 g 付近の Wistar ラット (両性)を瀉血後，直ちに緩衝生理塩溶液 (NaCl 154 mM, KCl 2.7mM, $CaCl_2$ 0.9mM, Sörensen 緩衝液 6.7mM (pH7.0), 牛血清 albumin 0.1%) (以下緩衝生理液と略記) の 5 ml を腹腔内に注入し，90秒間腹壁上から腸管をマッサージしたのち，腹壁切開口からピペットを入れて腹水を集めた．この液を牛血清 albumin を37% (w/w) に緩衝生理液にとかした液上に氷冷下に重層し110×g, 20分間冷却遠沈する．Albumin 液をしずかに注射器で吸いとり緩衝生理液で 6 ml にうすめたのち250×g, 5 分間同様に遠沈する．沈渣を緩衝生理液で洗つてもう一度遠沈し，これを再懸濁したものを氷上に保存し，数時間中に実験に使用した．この操作では肥満細胞は正常な形態と反応能力を保持した．

Histamine 遊離の測定　分離した肥満細胞浮遊液の 0.9ml (細胞数 4～5 ×10^4個) を含む試験管 8～10本を 37°C, 15分 incubate したのち，TB 0.5～1000 μg/ml (終末濃度) または compound 48/80 0.2～200 μg/ml (終末濃度) を加えて全量 1 ml とし，さらに 37°C, 15分間 incubate した．そのあと冷却遠沈 (110×g, 20分) し，上清液および緩衝生理液の 1 ml を加えた沈渣に 1N HCl 0.1 ml を加えて 5 分間沸騰浴中においてから，氷冷後 1N-NaOH で中和し，hist. 定量に供した．両液の hist. 量の合計にたいする上清液の hist. 量の割合を薬物による hist. 遊離率 (%) とした．両薬物の

hist. 遊離作用にたいするラット血清の影響の検討には血清 10% v/v を incubation 開始時に加えた. Hist. 定量はモルモット回腸法によつた.

Histamine 遊離速度の測定 2種の方法によつた. 第1の方法は, Uvnäs and Thon (1961) に準じたもので, やや大まかな測定法である. 分離肥満細胞を小ガラス漏斗上の目の細かい濾紙 (東洋濾紙 No. 5B) 上に置き, たえず 37°C に保温しつつある緩衝生理液のゆるやかな点滴で灌流しながら, これをTB 50～100μg/ml を含む同じ灌流液の点滴に切りかえる. 灌流速度は漏斗上に液の貯溜しない程度に保つ. 15～30 秒毎の灌流液を採取しそれらの hist. 含量を測定する. 対照として肥満細胞のかわりに灌流の途中 hist. 5μg を濾紙上に置いて, 灌流液中の hist. 含量変化をしらべた. 実験終了後灌流液の遠心沈渣の検鏡により肥満細胞および顆粒の通過はみとめなかつた.

第2の方法は, Bloom, Fredholm and Haegermark (1967) の用いた手技を参考としたもので, 前法より精度が高い. 37°C 保温の TB 500 μg/ml または 48/80 5 μg/ml 溶液の 0.1 ml をいれた試験管数本を用意し, これに 37°C 保温中の肥満細胞 (5～10×10⁴個) をいれた生理的緩衝液 0.9ml を添加し, 2, 5, 10, 15, 30秒後に各1本に氷冷した生理的緩衝液の 9 ml を注加し, 直ちに氷水中にうつして冷却する. これを 0°C 冷却遠沈 (3000 rpm) し, 上清および沈渣中の hist. の測定をおこない, 各試験管について hist. 遊離率をもとめる.

肥満細胞の形態変化と染色状態の時間的経過の観察 分離肥満細胞の緩衝生理液浮遊液を 37°C 保温下で, 倒立型位相差顕微鏡 (Olympus PMB 480×, 1200×) 下の底を平面に作つたホールグラス上に置いて観察した. TB 50～100μg/ml (終末濃度) 添加後の形態および染色状態の変化は15秒ごとの連続カラー写真撮影によつて観察した.

腸間膜肥満細胞についての実験 頸動脈瀉血ラットの腸間膜を腸管とともにその起始部から切除し, 緩衝生理液中に浮遊させたまま張力を加えないように鋭利な鋏を使用して, 腸管から切り離し, 均等大の8～10個の小片の材料をえた. 試験管中の 0.9ml 緩衝生理液中に各1個の小片を浮遊させ, 37°C, 10分間の preincubation 後 TB および 48/80 を被検濃度に加え, さらに30分間 incubate したのち, 肥満細胞の場合と同様にして hist. 遊離率を測定した.

イヌにおける実験 Pentobarbital-Na 35mg/kg 静注麻酔した 10kg 前後のイヌの頸動脈血圧変化を水銀マノメーター法で記録した. TB の静注前後の血圧変化および大腿動脈血の血漿 hist. 含量を測定した. 血漿 hist. の抽出および定量は Code (1937) 法によつた.

被検薬物 Toluidine blue (Toluidine blue-O) は Merck, compound 48/80 は Dr. J. J. Burns, Burroughs Wellcome & Co. Inc. Tuckahoe, New York の好意により提供されたものである. 他の試薬類は市販の最純品を用いた.

実 験 成 績

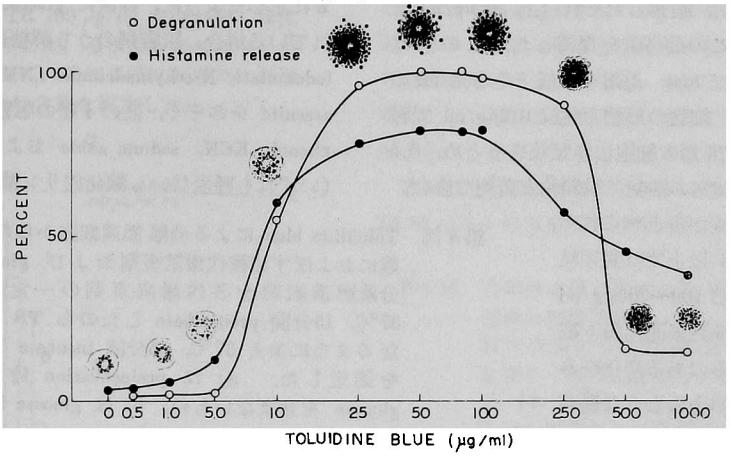
1. Toluidine blue による分離肥満細胞からの histamine 遊離と細胞の形態変化. Compound 48/80 の作用との比較

ラット腹水分離肥満細胞を緩衝生理液中で 37°C, 15分間 preincubate したのち, TB の 0.5～1000 μg/ml の間の10段階濃度を作用させ, さらに15分間 incubate したのちの各濃度における hist. 遊離率を測定し, 同時に肥満細胞の形態変化を位相差検鏡した.

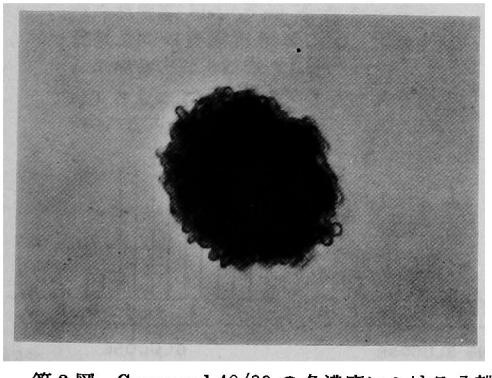
その結果は, 第1図に示した如く, hist. 遊離は 10 μg/ml よりはじまり, 50 μg/ml で84～87%の最高に達したが, 250～1000 μg/ml の高濃度ではそれ以上の上昇をみることなくかえつて減少の傾向を示した. 一方形態変化は 5～10 μg/ml では細胞の膨化, 顆粒の屈折率の変化によつて示される内部構造の乱れが認められ, 10μg/ml では50～62%の細胞膜表面の顆粒の突出ないし顆粒の細胞膜外への脱出などの変化がみられた. 25～50μg/ml では顆粒の細胞外脱出がますます著明で, かつ胞質内空胞の形成が著しく, compound 48/80 0.5～1 μg/ml 濃度作用下に一般に認められるような定型的な脱顆粒像に一致した形態の変化を認めた. この範囲の濃度では胞質内顆粒に著明な赤紫色の metachromasia がみられた.

50 μg/ml の場合に一部の細胞, 100 μg/ml の場合にはほとんどの細胞に次のような変化がみられた. すなわち弱拡大では脱顆粒のようにみえるが, 強拡大で仔細に検鏡すると細胞膜外へ実際には顆粒は遊離しておらず, 細胞全体が顆粒を内包した小空胞の突出をもつておおわれる形態を示した. 細胞膜から突出した小空胞の顆粒には明瞭な metachromasia が認められた(第2図). このような外観の細胞は弱拡

第1図　Toluidine blue の各種濃度における分離肥満細胞の脱顆粒率（%）と histamine 遊離率（%）．各濃度における主なる細胞形態の変化を模型的に示してある．50～250μg/ml の間でみられた顆粒を内包した小空胞の突出を認める細胞（本文参照）もこの図では脱顆粒として算定した．pH 7.0，37°C，15分間作用．



第2図　Toluidine blue 50μg/ml 作用後の分離肥満細胞．37°C，15分 iucubation．細胞膜下に顆粒を内包した多数の小空胞の突出がみられるが顆粒の脱出はみとめられない．倍率　×1300.

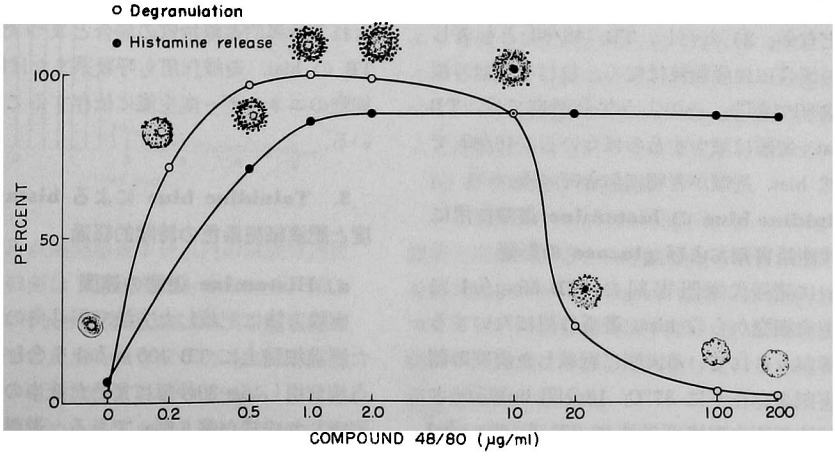


大の検鏡では真の脱顆粒と識別しにくいため，第1図の算定には一応脱顆粒として取扱つた．

250 μg/ml 以上の高濃度になると脱顆粒および周辺部の小空胞形成による小突起の度合が急に減少した．そして細胞は著明に濃染し，metachromasia も識別しがたい．したがつて一見濃染した正常の肥満細胞のようにみえるが，この場合細胞の大きさは正常のものよりも幾分縮少しているのが気付かれた．1000μg/ml の高濃度ではこの細胞の形態の縮少が一層著明となり，染色度はむしろ軽度で，細胞内構造も一見正常に近く，脱顆粒や周辺部の小空胞の突起もまつたくみられなかつた．

以上の所見を compound 48/80 の作用と対比するため，48/80 の 0.2～200 μg/ml 範囲の8種類の

第3図　Compound 48/80 の各濃度における分離肥満細胞の脱顆粒率（%）と histamine 遊離率（%）．各濃度における主なる細胞形態の変化を模型的に示してある．pH 7.0, 37°C，15分間作用．



濃度における hist. 遊離と形態変化を同様の条件でしらべた結果が第3図である．この場合 hist. 遊離は0.5μg/ml で73～75%に達し 1 μg/ml で最高値の86%におよんだが，観察したそれ以上 200μg/ml までの濃度では，この最高値を保持した．この点は高濃度でかえつて hist. 遊離率の低下をみた TB の場合と相違した．細胞の形態変化は 0.2μg/ml で軽度の膨化と 70～75 %の細胞に脱顆粒をみとめ，0.5 μg/ml では95～98%の細胞に脱顆粒と著明な膨化，細胞質内空胞形成がみとめられた．しかし，20μg/ml 以上では脱顆粒細胞は急速に減じ100～200μg/ml では細胞縮少，細胞表面に所々皺襞を思わせる窪みのある変化をみたが，低濃度の場合のような脱顆粒像はなく，むしろ TB 高濃度のように正常細胞に近似する像がみとめられた．

以上を要約すると，TB と48/80 による hist. 遊離と形態変化とは類似性が認められるが，細部では若干の相違がある．すなわち，1）TB では比較的低い一定の濃度範囲においては定型的な脱顆粒がみられるが，中等度以上の濃度では定型的な脱顆粒を示す細胞は急に少なくなり，顆粒は細胞膜下の小空胞内に包まれて細胞の外へは出なくなる．しかし，そのような状態でも hist. 遊離はおこつている．これにたいし，48/80 では定型的脱顆粒のおきる濃度範囲がひろく，どの濃度でも顆粒が細胞膜下の小空胞にとどまるという所見はほとんどない．2）ただし，TB，48/80 とも著しく高濃度の場合には脱顆粒はなく，むしろ細胞容積の縮少が著明である．そのような高濃度では，TB の場合 hist. 遊離は減少するのにたいし，48/80 ではなお依然 hist. 遊離が著明におきている．

第4図 Toluidine blue による分離肥満細胞からの histamine 遊離におよぼす諸種代謝阻害剤および glucose の影響．
分離肥満細胞を各代謝阻害剤の一定濃度を加えて 37°C，15分間 preincubate したのち TB を 50μg/ml となるように加え 37°C，15分間 incubate して hist. 遊離を測定した． a）は preincubation 時にメジウムに glucose を含まないもの，b）は glucose 5.6 mM を含むもの．
1，対照；2，DNP 10^{-4}M；3，KCN 10^{-3}M；4，Sod. azide 10^{-3}M；5，Amytal sodium 10^{-3}M；6，Iodoacetate 10^{-3}M；7，Sod. arsenite 10^{-3}M；8，N-ethylmaleimide 10^{-4}M.

2. Toluidine blue の histamine 遊離作用にたいする代謝阻害剤および glucose の影響

第4図a に諸種代謝阻害剤の，TB 50μg/ml による分離肥満細胞からの hist. 遊離作用にたいする抑制的影響が示されている．図に記載した濃度の諸種代謝阻害剤の存在下に 37°C，15分間 incubate された肥満細胞緩衝生理液浮遊液に TB を 50 μg/ml になるように添加し，15分後の遊離率を阻害剤を含まぬ対照と比較した．7種の阻害剤のいずれによつても殆んど完全な抑制がみられる．しかし，第4図 b に示したように，媒液に glucose 5.6 mM が含まれている場合，阻害剤のうち解糖系抑制作用をもつ iodoacetate, N-ethylmaleimide（NEM）および sodium arsenite をのぞく，他の4種の阻害剤，2, 4-dinitrophenol, KCN, sodium azide および amytal sodium（いずれも呼吸ないし酸化的リン酸化阻害剤）の抑制効果はほとんど認められなかつた．

この結果は，compound 48/80, sinomenine で代表される特異的遊離物質の場合とまつたく同じで，TB の hist. 遊離作用も呼吸系または解糖系による細胞のエネルギー産生能に依存することを示している．

3. Toluidine blue による histamine 遊離速度と肥満細胞染色の時間的経過

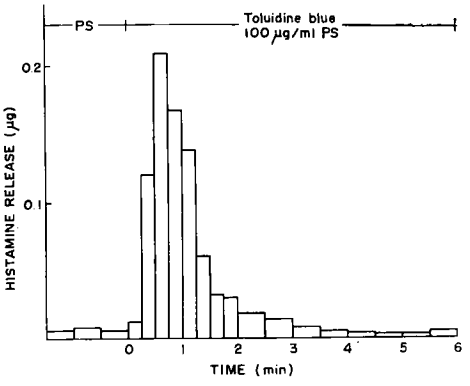
a）Histamine 遊離の速度

実験方法に記載した方法で漏斗内の濾紙上においた肥満細胞上に TB 100 μg/ml を含む緩衝生理液を点滴作用し15～30秒毎に集めた液中の hist. 含量を測定した成績が第5図a である．遊離された hist.

第5図　灌流法による histamine 遊離速度の経時的観察.

a) 37°C に保温した緩衝生理液のゆるやかな点滴で濾紙上の肥満細胞を灌流しながら TB 100 μg/ml を含む同じ灌流液に切りかえ，流出液を最初の2分間は15秒毎に，それ以後は30秒毎に採取して hist. 含量を測定した.

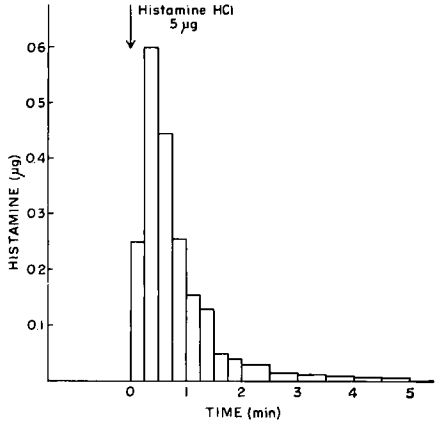
a



b) 対照，分離肥満細胞は用いず，灌流液点滴中に hist. 5 μg を含む小滴を濾紙上におき流出液の hist. 含量を a の場合と同様に測定した.

a, b ともに2分以内の流出液に大半の hist. をみとめた.

b

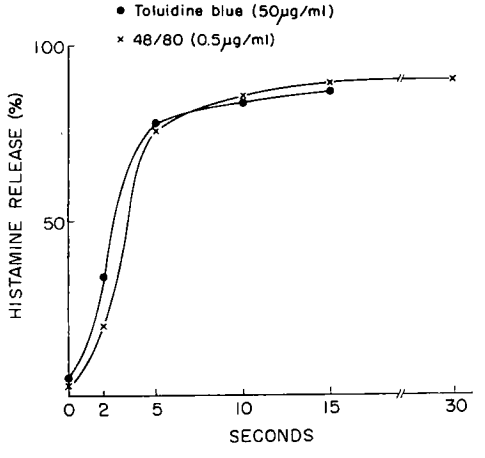


のほとんどが TB 点滴開始後2分以内の試験管内にあり，そのうち61%は1分以内のものである．第5図b は塩酸 hist. 5 μg を濾紙上において緩衝生理液の同じスピードの点滴をおこなつたものであるが，この場合もやはり流出されるべき hist. のほとんどは2分以内に集められており，そのうち80%が1分以内の試験管内にある．この方法では，肥満細胞から遊離された後漏斗内に停滞する割合長い時間を考慮しなければならないために，遊離速度を正しく観察することはできないが，少なくとも濾紙に加えた hist. の流出経過とほとんど差のない時間経過で肥満細胞からの遊離 hist. が流出しおわるという事実から，実際の遊離速度が極めて短時間のものであるということを知ることができる.

第6図は緩衝生理液（37°C）の中で肥満細胞に TB 50 μg/ml 作用後任意の時間後に冷却によつて反応を停止する方法によつて遊離の時間的経過を前法よりもはるかに厳密にしらべたものである．図にみるように，5秒後にはほとんど大部分の遊離はおわつている．比較のためしらべた 48/80 0.5 μg/ml による遊離も同じく5秒でほぼ完了している.

第6図　冷却反応停止法による histamine 遊離速度の経時的観察

37°C 保温の分離肥満細胞浮遊液 0.9ml を同じく37°Cに保温してある500μg/ml の TB または 5 μg/ml の 48/80 の 0.1ml に添加して作用させ，横軸に示した時間（秒）後に氷冷緩衝生理液 9ml を注加して反応を停止した．両薬物とも5秒間で殆んどの hist. 遊離を完了している.

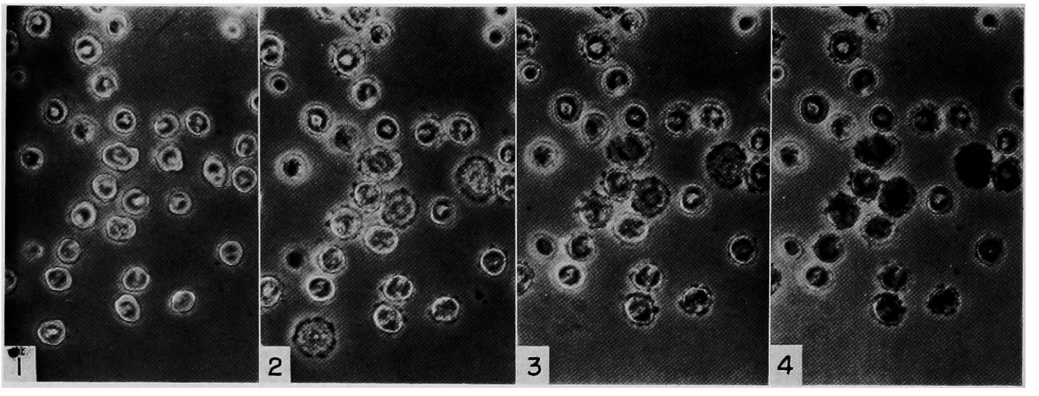


b) 肥満細胞の染色経過

37°C 保温の位相差顕微鏡下のホールグラス中に緩衝生理液に浮遊した肥満細胞をおき，これに TB を終末濃度 50～100 μg/ml 添加して染色経過を追つてカラー撮影した（第7図）．生きた肥満細胞は底のガラス面に付着して移動しないため同一細胞の追跡が可能であつた.

細胞の形態変化はきわめて迅速であつて10～15秒

第7図 分離肥満細胞の toluidine blue による染色経過.
倒立型位相差顕微鏡下のホールグラス（37°C 保温）に分離肥満細胞浮遊液をいれ，これに TB 50 μg/ml（終末濃度）を添加して染色経過を経時的に撮影したもの（Fuji color film R100 による）.
1．作用前；2．作用1分後；3．作用5分後；4．作用15分後.
1分後にすでに形態変化は完了しており，5分以後では染色度の増加がみられる．カラー印画では1分後ではまだ細胞質への色素の侵入はみられない.



後の画像では影響をうけた細胞はいずれも大小さまざまの程度で膨化し，胞質内には周辺部に空胞が認められ，細胞膜の外面には顆粒の突出ないし脱出がみとめられた．それらの顆粒は orthochromatic に染色されており，metachromatic の色調はない．この所見でとくに注目すべきことは，この段階では細胞内部が ortho または metachromatic のいずれにも染色されている様子がなく，色素はもつぱら細胞表面にとどまつていることである.

この時点で認められた細胞形態の変化は，その後の時間推移によつてとくに大きく進展する様子はなく，ただ染色のみは漸次膜上で濃さを増し，かつ形態変化の著しい細胞では胞質内に色素の侵入がおこり5分後の所見では metachromasia が認められ，その色調は10～15分後には一層著明となつた.

このような所見は，TB による肥満細胞の脱顆粒を含めた主要な形態変化が極めて迅速（少なくとも15秒以内）におきるもので，しかもその段階においては恐らく TB 色素は胞質内に侵入しておらず，細胞膜に付着しているにすぎないことを推察させる．したがつて，5秒以内に完了する hist. 遊離もまた TB の細胞内透入前，すなわち細胞膜上に付着している段階でおきるものと考えねばならない.

4. 腸間膜肥満細胞からの *in vitro* histamine 遊離. Toluidine blue と compound 48/80 の作用

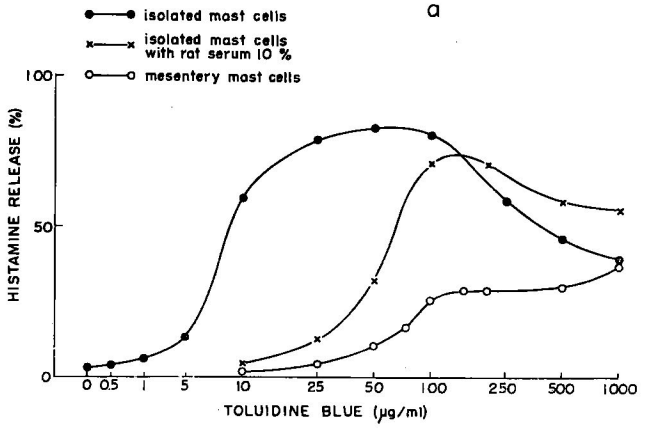
緩衝生理液中でラット腸間膜小片に作用させた場合の TB による hist. 遊離（37°C, 15分間）は，分離肥満細胞の場合よりも軽度で 50 μg/ml の濃度ではじめて遊離が認められ（8％），100μg/ml で24～27％に達し，500 μg/ml でも遊離率はそれ以上には増大しなかつた．この遊離率は分離肥満細胞の場合の 50μg/ml における84～87％にくらべて著しく低い（第8図，a）．48/80 においても 0.5μg/ml で19～23％，1 μg/ml で29～35％となつており，分離肥満細胞の場合のそれぞれ73～75％および86％にくらべて遊離率がやはり低い（第8図，b）.

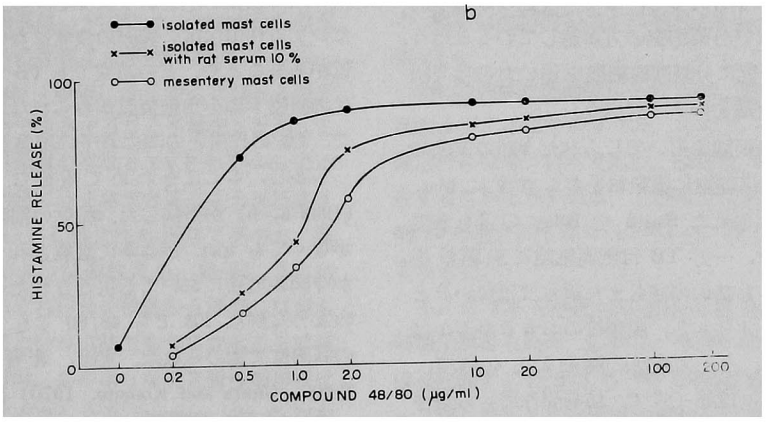
このように腸間膜肥満細胞からの遊離率の低い理由が肥満細胞膜外の被護的な物質の存在に基因する可能性をしらべる目的で，分離肥満細胞を含む媒液（緩衝生理液）中に10％の割合に新鮮ラット血清を加えてみた．TB および 48/80 の遊離作用はいずれも，血清の存在しない場合にくらべて明らかに減弱するのが認められた（第8図，a および b）.

5. イヌの血圧および血漿 histamine にたいする toluidine blue の影響

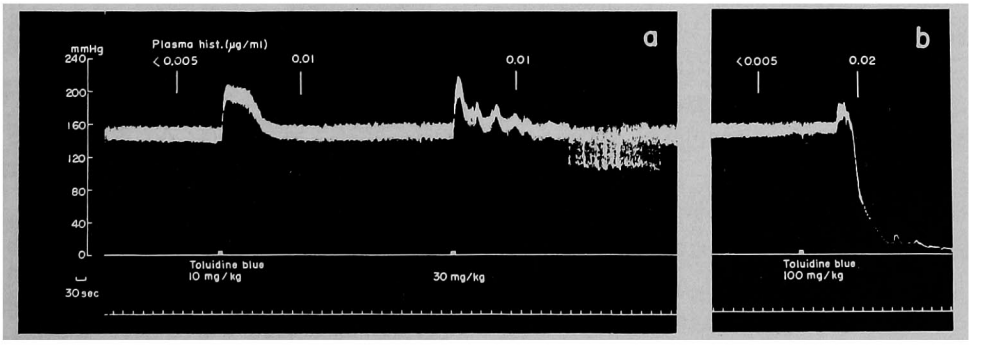
Pentobarbital 麻酔犬で TB 10mg/kg 静注は約 40 mmHg の動脈血圧上昇をきたし，約2分後には復旧した．15分後 30mg/kg 再注射ではそれ以上の上昇はなく，同高程度の血圧上昇がより短時間あらわれたあと著しい動揺と不整脈がつづき，注射後10分で平常に復した（第9図，a）．別のイヌに 100mg/kg の1回投与をおこなつたところ，直後のごく一過性の経度の上昇につづいて急激な深い下降に移行し3分後には死亡した（第9図，b）．前のイヌの血漿 hist. 含量は TB 注射前 <0.005 μg/ml から，注射後 0.01μg/ml に上昇，後のイヌでは <0.005μg/ml

第8図　ラット分離肥満細胞および腸間膜からの histamine 遊離の比較ならびに分離肥満細胞からの histamine 遊離におよぼすラット血清の影響.
a, Toluidine blue ;　b, Compound 48/80.





第9図　イヌの血圧および血漿 histamine にたいする toluidine blue の影響
a) 9.2 kg ♂ ; b) 11.0 kg ♂イヌ (pentobarbital 麻酔).



から 0.02μg/ml に上昇したので，hist. 遊離のあつたことは認められるが，48/80 や sinomenine の大量投与後における著しい血漿 hist. 値の上昇 (Yamasaki, Endo and Saeki, 1969) にくらべれば頗る軽度で無視されうる程度である．したがつて，血圧下降の原因を hist. 遊離には帰しがたい．

考　　察

TB が肥満細胞から hist. を遊離する事実については Smith (1958 a, b) と Riley (1959) が記載

し，また一方 TB が肥満細胞に脱顆粒をおこすという観察が Camble (1952), Wegelius and Hjelmman (1955), Wegelius, Hjelmman and Wasastjerna (1955) および Gustafsson and Cronberg (1959) の論文にみられる．しかし，Smith (1958 a, b) はラットの腹腔内注射により hist. 遊離をおこした TB が腸間膜肥満細胞に脱顆粒やその他観察しうる何らの形態変化もおこさなかつたとのべており，Riley (1959) もこれを追試確認している．このような TB による肥満細胞形態変化についての相反する所見の生じた理由は一体何であろうか．

上記諸家を含めて今日まで TB の肥満細胞にたいする作用の観察はいずれもラットまたはハムスターの腸間膜，cheek pouch などが用いられておるが，上記のような疑問を解決するためにも，またその作用機構をしらべる目的でも，なるべく他の組織学的要素の加わらない分離細胞の方が適していると思う．TB の作用の研究に分離肥満細胞を用いたのは今回の著者の実験が最初のように思う．

この分離肥満細胞を用いてしらべた今回の実験の結果，TB が肥満細胞に脱顆粒をおこさずに hist. 遊離をきたすと唱えた Smith や Riley の言も事実であるし，また，一方 TB は肥満細胞に脱顆粒をおこすと主張した諸氏の言もまた誤りではないことを供覧できた．すなわち，脱顆粒のおきるか否かは TB の作用条件，とくに濃度に関係するもので，pH 7.0 の緩衝生理液 (37°C, 15分間作用) の条件下では 10～50 μg/ml の比較的せまい濃度範囲内で定型的な脱顆粒がおきた．100～250 μg/ml の範囲では検鏡下に一見脱顆粒と区別しにくい顆粒含有小空胞の細胞輪郭外への突出という形態変化が生ずるが，これは厳密には脱顆粒ではない．250 μg/ml 以上の高濃度になると，この小空胞の突出もなくなり，細胞輪郭は正常な細胞のように円滑で，濃染のために内部構造は見わけにくいが，一見変化をうけていない細胞のようにみえる．したがつて，一定の低濃度範囲では脱顆粒のおきることはまさしく事実である．しかし，hist. を遊離し，しかも脱顆粒のおきないという濃度は，著者の実験条件では100～250μg/ml の比較的高い濃度の場合であつて，Smith がラットに腹腔内注射した 10～200 μg/ml (1 : 100,000 － 1 : 5,000) の濃度範囲のうち 50 μg/ml 以下では分離肥満細胞では定型的な脱顆粒がおきるはずであり，また 100～200 μg/ml では定型的脱顆粒はおきなくても少なくとも彼のいう "absence of morphological change" ではない．

Smith のデータからこれらの場合の hist. 遊離率を%として知ることができないため，現在の著者のデータと比較できないのは残念だが，彼の観察した腸間膜の肥満細胞では分離細胞にくらべて微妙な形態変化を観察しにくいこと，この腸間膜肥満細胞は細胞膜外に若干の barrier 的構造物の存在すること，48/80 や sinomenine の作用に分離肥満細胞の場合には不要である Ca^{++} を要求する事実(Saeki, 1964; Yamasaki and Saeki, 1965) が示すように作用条件に差異のあること，などが分離肥満細胞におけるような形態変化を認められなかつた原因と考えられないこともない．著者の今回の実験においても腸間膜肥満細胞からの hist. 遊離は分離肥満細胞の場合よりも高い濃度を必要とした．

今回の成績が示すように 48/80 の分離肥満細胞にたいする作用は広い範囲の濃度において定型的脱顆粒があることや，どの濃度でも TB でみられるような細胞膜下の小空胞突起がみられなかつたなどの点で，TB の作用との間に若干の相違が認められる．

しかし，ここにきわめて重要なことは，Smith (1958 a, b) が指摘した．顆粒の細胞外脱出の所見がなくても hist. が高率に遊離されうるという実例が今回の実験においても供覧されたことである．このような例は TB でも 48/80 でも 100μg/ml 以上の高濃度で認められた．実際，著者ら (Yamasaki, Fujita, Ohara and Komoto, 1970) は 48/80 の 100 μg/ml 作用下の分離肥満細胞がまつたく脱顆粒をおこしていないことを電顕像において認めている．このような事実は，高率の hist. 遊離がおこなわれる場合においても顆粒の細胞外脱出は必須の条件ではないことを示している．

TB による肥満細胞からの hist. 遊離は 48/80 の場合とまつたく同じく，ほとんど爆発的な速さで完了する瞬間的反応であることが確認された．TB の細胞膜をこえて細胞質内への侵入がこの hist. 遊離の迅速さに先行しうるということは常識的にも考えにくいが，実際に経時的に写真でとらえた所見でも適用15秒後ではまだ TB 色素は細胞膜の表面にとどまつているようにみえる．しかし，細胞におこるべき形態変化はすべておそくとも15秒以前には事実上完了している．このことは，TB の作用が細胞膜のレベルで行なわれ，ここでおきた膜の局部的変化が trigger となつて，胞質内顆粒の hist. 放出を可能にする細胞質ないし顆粒構造の変化を誘発させることを示している．

最近著者ら（Tasaka, Sugiyama, Komoto and Yamasaki, 1970）は微小電極を用いて1個の分離肥満細胞の膜の一部にこれを接近させて，イオン泳動法により TB, 48/80 および sinomenine を細胞外面に適用した結果，その局部に限局する脱顆粒のおこるのをみとめ，さらに同じ細胞の別の膜局部に適用してこの現象が繰りかえしおこしうることを観察した．しかし，これらの遊離物質を細胞内部に直接注入した場合には脱顆粒はおこらなかつた．また一方，杉山・山崎（1968）は 4°C に冷却した緩衝生理液中に懸濁した分離肥満細胞に 48/80 を作用させたのち，冷たい同媒液で 48/80 を3回洗つて可及的にこれを除いた肥満細胞を 37°C に温めると，著明な hist. 遊離がおこることを観察した．この所見は 48/80 がすでに細胞における作用部位に結合していることを示唆している．今一つ，同じ問題に関連する興味ある知見は，48/80 と sinomenine の交叉耐性を示すイヌの存在する事実の発見である．Endo and Yamasaki (1969) はこのようなイヌが天然に約20%の割合で実在することを報告したが，これらのイヌは作用機構の異なる PVP や Tween のような hist. 遊離物質には正常犬と同じように反応するし，hist. にたいする感受性も正常であつた．著者自身最近，このような耐性犬を，48/80，または sinomenine のそれぞれ単独を微量から漸増しながら反復静注を重ねるという方法でもつて作ることに成功した（古元 1970）．このような交叉耐性の存在は両化合物が共通に占有しうる receptive site の存在することを示唆している．

以上のような，一連の実験事実は，今回の実験結果と同じく，これらの塩基性 hist. 遊離物質の作用点が肥満細胞の膜にあり，かつ，それら化合物が共通する receptive sites (receptors) との結合によつてその作用が発現されることを強く示唆するものである．

48/80 などの塩基性 hist. 遊離物質の作用が，それらが hist. よりも強い塩基であることから，顆粒内酸性物質（たとえば heparin）と hist. との結合にたいし，イオン交換によつて hist. を遊離するという推論がある．(MacIntosh, 1956 ; Smith, 1958b ; Riley, 1959)．この考えは確かな論拠を欠いだ仮説にすぎないが，肥満細胞顆粒内に塩基性物質である hist. と強酸性物質の heparin が共存するという事実を背景にして，かなり根づよく一般には盲信されているようにみえる．しかし，今回の実験結果によつてこれらの遊離物質が細胞内顆粒に直接接触しないまえに hist. 遊離がおこるという証拠が提示された以上，おのずからその可能性は否定されたことになる．

TB の肥満細胞からの hist. 遊離作用は諸種の代謝阻害剤によつてブロックされ，これらのうち呼吸ないし酸化的リン酸化の抑制剤の影響が glucose の存在によつて除かれたことは，48/80 や sinomenine の作用の場合とまつたく同じであつて，TB の作用もまた肥満細胞のエネルギー代謝の健在を必要とすることを示している．ここで産生される ATP が顆粒の細胞外放出に必要であろうと考える研究者（たとえば Uvnäs and Thon, 1966）もあるが，それを支える実験的な論拠はない．遠藤（未発表）は今回の実験で脱顆粒を示さなかつた高濃度（200μg/ml）の 48/80による分離肥満細胞からの hist. 遊離もまた，上記の代謝抑制剤によつて抑制されることを観察している．したがつて，hist. 遊離が依存する ATP は脱顆粒のために利用されるものとは考えにくい．

TB の分離肥満細胞からの hist. 遊離は血漿の存在によつてかなり弱まつた．このことは TB が血漿蛋白に結合されるためと，細胞表面に蛋白被膜を生ずるためと思われる．このような血漿の影響は 48/80 の場合にも認められるので TB に特異なものではない．

イヌに TB を静注した場合血漿 hist. にわずかの増加がみられた．しかし，48/80 のショック用量（1 mg/kg）に匹敵する TB 100 mg/kg 静注でショック死したイヌの血漿中に増加した hist. 含量は，48/80 ショックの場合にくらべて比較にならぬほどの微量であつた．また TB の静注では少量の場合，血圧下降よりもむしろ上昇の方が著明であつた．このような強い血圧上昇は 48/80 や sinomenine ではみられない．したがつて，TB 静注によるイヌのショックは hist. 遊離のためではなく，別の機構によることを考えねばならない．Congo 赤の静注で知られているいわゆる "colloid shock"（上村ら，1957）の可能性も考えられるが，現在の知見だけではなんともいえない．しかし，ラットで in vitro または腹腔内注射によつて肥満細胞から著明な hist. の遊離をおこした TB が，なにゆえにイヌに in vivo の hist. 遊離をおこしえなかつたのか，TB の作用に特異な種属差があるのかどうか興味ある問題である．今後の研究に委ねられねばならない．TB が分離肥満細胞に，48/80 ではみられない特異な形態変化（細胞膜下の小空胞生成）をきたした点からみても，

TBの作用は塩基性 hist. 遊離物質として 48/80 や sinomenine と主要な点においては共通するものの，かなり相違する面をそなえていることは否定できない．

総 括

1. 37°C の緩衝生理塩溶液中のラット腹水分離肥満細胞から toluidine blne (TB) は10～250μg/ml 濃度範囲において 50～100μg/ml 濃度を最高として著明な hist. 遊離をきたした．

2. TB の 25～50μg/ml 濃度において肥満細胞は典型的な脱顆粒を示したが，100 μg/ml 濃度附近では細胞の外縁に顆粒を含む小空胞の突起を生ずる特異な像を呈し，それよりも高濃度ではそのような突起すらなく正常像と同様の滑らかな輪郭を示した．したがつて比較的高濃度の場合は，TB は脱顆粒を伴わないで hist. を遊離するということができる．

3. 同じ条件で TB の肥満細胞からの hist. 遊離はきわめて迅速におこり，冷却によつて反応を停止する方法によつて測定すると，5秒以内に遊離はほとんど完結した．

4. 経時的顕微鏡撮影によると，この場合15秒以内に形態変化もほぼ完了している．しかし，少なくとも1分以内の時点では TB 色素は細胞膜より内部に透入した形跡はみとめられない．したがつて，TB は細胞膜上の receptive sites と結合することによつて，hist. 遊離ならびに細胞の形態変化の発現を trigger するものと考えられる．

5. TB の肥満細胞からの hist. 遊離は諸種の呼吸系または解糖系代謝阻害剤によつて抑制される．

6. ラット腸間膜肥満細胞からの hist. 遊離は，分離肥満細胞の場合よりも TB の高濃度を要する．血漿の添加は分離肥満細胞からの hist. 遊離を一部阻害する．

7. TB はイヌに大量静注すればショックをきたすが，血漿中にこの反応を説明するに足るだけの hist. の増加はみられない．この点 compound 48/80 によるショックの場合と相違がある．

8. TB の hist. 遊離作用は基本的には compound 48/80 に代表される塩基性 hist. 遊離物質の特性をそなえているが，TB と compound 48/80 の作用の間には若干の差異のあることを，同じ条件下における両者の作用を比較しながら供覧した．

この研究は文部省科研，総合研究「生体アミンの貯蔵と遊離機構に関する研究」(代表者 山崎英正教授) の分担課題「肥満細胞からの Histamine の遊離機構」の一部としてなされたものである．

稿を終るに臨み御指導と御校閲を頂いた山崎英正教授に深謝し，御援助を頂いた田坂賢二講師，佐伯清美助手，遠藤晃市助手および杉山勝三助手に感謝する．

本研究の一部は昭和42年6月4日，第31回日本薬理学会近畿部会（大阪府立大学農学部）において報告した．

文 献

1) Bloom, G. D., Fredholm, B. and Haegermark, O.: Acta physiol. scand. 71, 270 (1967).
2) Camble, P.: Fedn Proc. 11, 409 (1952).
3) Code, C. F.: J. Physiol. 89, 257 (1937).
4) Ehrlich, P.: Arch. mikr. -Anat. 13, 263 (1877).
5) Ehrlich, P.: Arch. Anat. Physiol. 3, 166 (1879).
6) Endo, K. and Yamasaki, H.: Acta Med. Okayama 23, 589 (1969).
7) Gustafsson, B. E. and Cronberg, S.: Acta rheum. scand. 5, 179 (1959).
8) 上村之雄，田坂賢二，西嶋克巳，久米政夫：岡山医会誌 69, 2023 (1957).
9) 古元重光：岡山医会誌，82, 147 (1970).
10) MacIntosch, F. C.: Ciba Foundation Symposium, Histamine, p. 20, J. & A. Churchill Ltd. London (1956).
11) Riley, J. F.: The Mast Cells. E. & S. Livingstone, Ltd., London (1959).
12) Saeki, K.: Jap. J. Pharmac. 14, 375 (1964).
13) Smith, D. E.: Am. J. Physiol. 193, 573 (1958a).
14) Smith, D. E.: Science 128, 207 (1958b).
15) 杉山勝三，山崎英正：日薬理誌, 64, 149§(1968).
16) Tasaka, K., Sugiyama, K., Komoto, S. and Yamasaki, H.: Proc. Japan Acad. 46, 311(1970).
17) Uvnäs, B. and Thon, Inga-Lisa: Exp. Cell

Res. 23, 45 (1961).
18) Uvnäs, B. and Thon, Inga-Lisa: Mechanisms of Release of Biogenic Amines, p. 361, Pergamon Press, Oxford (1966).
19) Wegelius, O. and Hjelmman, G. : Acta path. microbiol. scand. 36, 304 (1955).
20) Wegelius, O., Hjelmman, G. and Wasastjerna, C. : Acta path. microbiol. scand. 36, 309 (1955).
21) Yamasaki, H. and Saeki, K. : Proc. Japan Acad. 41, 958 (1965).
22) Yamasaki, H., Endo, K. and Saeki, K. : Acta Med. Okayama 23, 453 (1969).
23) Yamasaki, H., Fujita, T., Ohara, Y. and Komoto, S. : Arch. histol. jap. 31, 373 (1970).

Histamine Release by Toluidine Blue from Isolated Rat Mast Cells

By

Shigemitsu KOMOTO

Department of Pharmacology, Okayama University Medical School, Okayama
(Director : Prof. H. Yamasaki)

Toluidine blue released histamine from isolated rat mast cells suspended in a buffered physiological solution at 37°C, in concentrations ranging from 10 to 250 μg/ml. The highest histamine release was seen at concentrations from 50 to 100 μg/ml. In concentrations between 25 and 50 μg/ml, mast cells responded with a typical degranulation quite similar to that seen under the action of 0.5 μg/ml of compound 48/80, while at 100 μg/ml the cell surface showed indentation with a number of small protrusions in which the granules were occasionally contained. However, a smooth cell surface was seen in higher concentrations over 100 μg/ml of toluidine blue. This indicates that toluidine blue releases histamine without accompanying degranulation.

When the time course of histamine release was determined by abrupt cooling to stop the reaction at various time sequence, it was shown that histamine release at 37°C is a very rapid process actually accomplishing within 5 sec. All morphological changes of mast cell completed at longest within 15 sec after the addition of toluidine blue, while the dye could not be seen inside the cytoplasm before 1 min after the addition. These observations suggest that toluidine blue reacts with receptive sites on the cell surface of mast cell and this may trigger the further processes leading to the histamine release as well as to morphological changes.

The histamine release by toluidine blue was inhibited by respiratory inhibitors or uncouplers of oxidative phosphorylation and these inhibitions were overcome by the presence of glucose. Toluidine blue released histamine from the mast cells of rat mesentery but the effective concentrations were higher than that in the isolated mast cells. In the dog, a large amount of toluidine blue injected i. v. caused a severe hypotension, but there was no marked increase in the plasma histamine differing from the action of compound 48/80. With respect to the mechanisms of histamine release the mode of action of toluidine blue may be in common to that of other basic histamine releasers, although distinct difference existed in some aspects of the action between toluidine blue and compound 48/80.

Author