気道, 肺におけるヒスタミン受容体の検討 —実験喘息モデルにおけるヒスタミン受容体サブタイプを中心に—

大川 健太郎, 東田 有智, 田中 明
原口 龍太, 杉原 鍊三, 村木 正人
浦上 理恵, 長坂 行雄, 山崎 公世
中島 重徳

Experimental Investigation of Histamine Receptors in Bronchial Asthma

Kentaroh Ohkawa, M.D., Yuji Tohda, M.D., Akira Tanaka, M.D.,
Ryuta Haraguchi, M.D., Renzoh Sugihara, M.D., Masato Muraki, M.D.,
Rie Urakami, M.D., Yukio Nagasaka, M.D., Kimiyo Yamazaki, M.D.,
and Shigenori Nakajima, M.D.

Fourth Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine, Osaka

Histamine has multiple effects on the airways that are mediated by the H1-, H2-, and H3-receptors. Histamine causes bronchoconstriction partly by a direct effect on the H1-receptors in the airway smooth muscle and partly by activating a cholinergic reflex. In the present study, we examined the correlation between airway hyperreactivity and the density of muscarinic acetylcholine receptors. Because histamine causes broncho-constriction partly by activating a cholinergic reflex, it is necessary to confirm the correlation between histamine receptors and hyperreactivity.

Therefore, in this study, we studied the characteristics of the H1 and H2 receptors in guinea pig pulmonary tissues and the following results were obtained.

1) The density of H1 receptors in the lung tissue of OA-sensitized guinea pigs was higher than that in the control group. No difference was obtained between the affinity of the H1-receptors in the OA sensitized lungs and that in the control lungs.

2) The density of H2-receptors in the OA-sensitized lungs was lower than that in the control lungs. There was no difference between the affinity of the H2-receptors in the OA-sensitized lungs and that of the control lungs.

These results indicate that an increased density of H1 receptors and a decreased density of H2-receptors are involved in the pathogenesis of bronchial asthma.

Key words : bronchial asthma, histamine receptors, H1-receptors, H2-receptors

I. はじめに

気管支喘息の発症機序の重要な原因の一つにアレルギー性炎症があり, ヒスタミンはこのアレルギー性炎症に深く関与していると考えられている。ヒスタミンはヒスタミン受容体を介し

近畿大学医学部第4内科学教室
別刷請求: 〒589 大阪府大阪狭山市大野東377-2
近畿大学医学部第4内科学教室
大川健太郎
投稿受付: 1994年6月27日

て気道に効果を与えると考えられるが, Black^らは, ヒスタミン受容体が2種類存在すると報告した。そして, ヒスタミンは H_1 受容体を介して血管透過性亢進や平滑筋収縮を引き起こし, H_2 受容体を介して胃液分泌作用を起こすことが明らかにされた。

気管支喘息の発症機序に関する記述では, Chand²⁾ が H_2 受容体の欠如が気管支の過反応性の原因となる可能性を示唆したが, H_2 受容体の気道における役割はいまだに確定していない。今回, ヒスタミン受容体の気管支喘息における役割の一端を明らかにする目的で, OA 感作喘息モルモットの肺膜分画 H_1 受容体および H_2 受容体について検討した。

II. 対 象

対象はハートレイ系雄モルモット400 gで, 健常群11匹, OA 感作群10匹の計21匹である。喘息群は当科の東田の方法³⁾に基づいてOA 感作喘息反応モルモットを作製し, 最終感作3週後に使用した。

III. 方 法

1. 肺膜分画の調整

頭部打撲により動物を致死させ, ただちに肺を摘出し, 大血管および気管支を取り除き鋏で細かく切った後, 氷冷した Tris HCl buffer A (Tris buffer 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 11.3% sucrose, pH 7.40) 20容積中で, Polytron homogenizer を用いて45秒間ホモジェナイズした。ホモジェネートは, $500 \times g$, $4^\circ C$, 10分間遠沈し, 得られた上清を4層のガーゼで濾過した。濾過液を $30,000 \times g$, 15分間遠沈し, 得られた沈渣を Tris HCl buffer B (Tris buffer 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH 7.40) で $30,000 \times g$, 15分間2回遠沈洗浄し, 最終的に得た沈渣を buffer B に再懸濁 (蛋白量約0.3 mg/ml) した。この懸濁液を radio receptor assay に用いた。蛋白濃度は, Lowry^ら⁴⁾の方法により測定した。

2. Radiobinding Assay

1) H_1 受容体

H_1 受容体最大結合数 (B_{max}) の測定は, 肺膜分画懸濁液0.4 ml, 10^{-4} M pyrilamine 溶液あ

るいは Tris HCl buffer 0.2 ml, 各種濃度の 3H -pyrilamine ($1 \sim 20$ nM) 0.2 ml を含む計0.8 ml を reaction mixture として, $37^\circ C$, 60分間インキュベーションし, ついで $4^\circ C$ Tris HCl buffer 5 ml を加えて反応を停止させた。その後懸濁液を Mili-pore 1225 sampling manifold 上の GF/C filter で濾過し, bound と free の分離を行った。さらに Tris HCl buffer B 5 ml で3回 filter を洗浄した。filter は乾燥後カウンティングバイアルに移し, 10 ml の scintillator (ATOMLIGHT[®]) を加えてよく振盪した。その後, 細胞膜に結合して filter 上に補足された 3H -pyrilamine 由来の放射能を液体シンチレーションカウンター (PACKARD 650C) で測定した。Tris HCl buffer $200 \mu l$ を加えてインキュベーションを行った場合の放射活性を全体結合量, 10^{-4} M pyrilamine $200 \mu l$ を加えてインキュベーションを行った場合の放射活性を非特異的結合量とし, この差を特異的結合量とした。各種濃度の 3H -pyrilamine に相当する特異的結合量を用い, Scatchard analysis により B_{max} , K_d を求めた。 B_{max} は mg 蛋白当たりの最大受容体数を fmol で示した (fmol/mg prot.)。

2) H_2 受容体

H_2 受容体最大結合数 (B_{max}) の測定は, 肺膜分画懸濁液0.4 ml, 10^{-3} M cimetidine 溶液あるいは Tris HCl buffer 0.2 ml, 各種濃度の 3H -tiotidine ($0.1 \sim 2.0$ nM) 0.2 ml を含む計0.8 ml を reaction mixture として, $37^\circ C$, 60分間インキュベーションした後, $4^\circ C$ Tris HCl buffer 5 ml を加えて反応を停止させた。そして, これ以後 H_1 受容体の場合と同様に実験を進め, 3H -tiotidine 由来の放射能を液体シンチレーションカウンター (PACKARD 650 C) で測定した。Tris HCl buffer $200 \mu l$ を加えてインキュベーションを行った場合の放射活性を全体結合量, 10^{-3} M cimetidine $200 \mu l$ を加えてインキュベーションを行った場合の放射活性を非特異的結合量とし, この差を特異的結合量とした。各種濃度の 3H -tiotidine に相当する特異的結合量を用い, Scatchard analysis により B_{max} , K_d を求めた。 B_{max} は mg 蛋白当たりの最大受容体数を fmol で示した (fmol/mg prot.)。

IV. 結 果

1. H_1 受容体

1) Dose Response Curve

図1は、 3H -pyrilamine の H_1 受容体への結合を示したもので、縦軸に 3H -pyrilamine の特異的結合量を、横軸に 3H -pyrilamine の濃度をとったものであるが、 3H -pyrilamine は10~15 nM で飽和に達した。

2) 結合解離曲線

図2は、 3H -pyrilamine での結合解離曲線を示したもので、縦軸に 3H -pyrilamine の結合量を、横軸に時間をとったものである。非特異的結合量は時間に無関係にほぼ一定の値をとったが、特異的結合量は急速に増大し、50~60分で飽和に達し、その後大量の pyrilamine を加えることにより速やかに減少した。

3) Scatchard Analysis

図3は、健常モルモットの Scatchard analysis の1例である。プロットはほぼ直線となり、receptor site は1つであることが推測された。X 軸切片が受容体最大結合数 B_{max} を、直線の傾きの逆数が親和性 K_d を表すが、この例では B_{max} が166.0 fmol/mg prot., K_d が10 nM となった。

4) 健常群およびOA感作喘息群の B_{max} および K_d

健常群の H_1 受容体の B_{max} は 156.3 ± 10.6 fmol/mg prot., K_d が 11.2 ± 2.8 nM, OA 感作喘息群 B_{max} は 239.1 ± 21.6 fmol/mg prot., K_d が 10.8 ± 1.2 nM で、OA 感作喘息群 B_{max} は健常群より明らかに高値を示した。 K_d は両群間に明らかな差はみられなかった(図4)。

2. H_2 受容体

1) Dose Response Curve

図5は、 3H -tiotidine の H_2 受容体への結合を示したもので、縦軸に 3H -tiotidine の特異的結合量を、横軸に 3H -tiotidine の濃度をとったものであるが、 3H -tiotidine は1.5~2.0 nM で飽和に達した。

2) 結合解離曲線

図6は 3H -tiotidine での結合解離曲線を示したもので、縦軸に 3H -tiotidine の結合量を、横軸に時間をとったものであるが、非特異的結合量

図1 モルモット肺膜分画 H_1 受容体における 3H -pyrilamine の容量反応曲線の1例
 3H -pyrilamine は10~15 nM で飽和に達した。

図2 モルモット肺膜分画 H_1 受容体へのpyrilamine の特異的結合の1例

特異的結合は急速に増大し、50~60分で飽和に達し、その後大量の pyrilamine を加えることにより速やかに減少した。

図3 H_1 受容体への pyrilamine の特異的結合の Scatchard plot の1例

Scatchard plot はほぼ直線となり、receptor site は1つと推定された。

図4 モルモット肺膜分画 H_1 受容体の B_{max} と K_d
 B_{max} は OA 感作群が明らかに高値を示したが, K_d は両群間に差はなかった。

図5 モルモット肺膜分画 H_2 受容体における 3H -tiotidine の容量反応曲線の 1 例
 3H -tiotidine は 1.5~2.0 nM で飽和に達した。

図6 モルモット肺膜分画 H_2 受容体への tiotidine 特異的結合の 1 例

特異的結合は急速に増大し, 50~60分で飽和に達し, その後大量の cimetine を加えることにより速やかに減少した。

図7 H_2 受容体への tiotidine の特異的結合の Scatchard plot の 1 例
 Scatchard plot はほぼ直線となり, receptor site は 1 つと推定された。

図8 モルモット肺膜分画 H_2 受容体の B_{max} と K_d
 B_{max} は OA 感作群が明らかに低値を示したが, K_d は両群間に差はなかった。

は時間に無関係にほぼ一定の値をとったが, 特異的結合量は急速に増大し, 50~60分で飽和に達し, その後大量の cimetine を加えることにより速やかに減少した。

3) Scatchard Analysis

図7は健康モルモットの Scatchard analysis の 1 例である。プロットはほぼ直線となり, receptor site は 1 つであることが推測された。X 軸切片が受容体最大結合数 B_{max} を, 直線の傾きの逆数が親和性 K_d 表すが, この例では B_{max} が 13.0 fmol/mg prot., K_d が 1.0 nM となった。

4) 健康群および OA 感作喘息群の B_{max} および K_d

健康群の H_2 受容体の B_{max} は 12.1 ± 2.9 fmol/mg prot., K_d が 1.1 ± 0.1 nM, OA 感作喘息群 B_{max} は 4.8 ± 1.5 fmol/mg prot., K_d が 1.0 ± 0.2 nM で OA 感作喘息群 B_{max} は健康群

より明らかに低値を示した。 K_d は両群間に明らかな差はみられなかった (図 8)。

V. 考 察

アレルギー性炎症が気管支喘息の重要な原因と考えられている現在、ヒスタミンをはじめとするメディエーターはアレルギー性炎症における重要な factor である。アレルギー性炎症に関与する細胞群にもヒスタミン受容体が確認され⁵⁾、ヒスタミンはヒスタミン受容体保有細胞に働き、免疫機能に影響を与えることが知られている。一方、気道においては、ヒスタミンは一部は気管支平滑筋上の H_1 受容体を介して、また一部は副交感神経を介して気管支収縮を引き起こすと考えられている。このようにヒスタミンは、気管支喘息の発症機序にとって重要な、炎症と自律神経異常の両面に関与していると考えられる。これまでに著者は、気道過敏性の亢進に、ムスカリン性アセチルコリン受容体数の増加が関与することを報告したが⁶⁾、今回は、OA 感作喘息モルモット肺膜分画の H_1 および H_2 受容体が、健常モルモットと比較しどのように変化しているかを検討した。

図 4 に示すように、肺膜分画 H_1 受容体は OA 感作群において明らかに数の増加がみられたが、親和性には両群間に差がなかった。教室の村木は、東田の方法にて作製した OA 感作喘息モルモットのヒスタミンに対する気道反応性が、無感作群と比較して亢進していることを報告したが⁷⁾、同濃度のヒスタミンを吸入させた場合に気道反応が大きく変化することは、 H_1 受容体数増加と関連があると考えられ、今回のわれわれの結果は村木が示した結果と矛盾がないと考えられた。

Stable asthma において、血清あるいは気管支肺胞洗浄液中のヒスタミン濃度は上昇しないという報告と^{8,9)}、上昇するという報告があり^{10,11)}、現在論争中である。今回の検討では、OA 感作群は発作を誘発させていない状態で肺膜分画を作製しているが、受容体は様々な状態に対応して、up regulation および down regulation によりその数を増減させるため、肺組織中のもしくは血中のヒスタミン値と合わせて検討することが必要であると考えられた。

OA 感作により H_1 受容体数が増加する理由は明らかではないが、TXA₂ 様物質の STA₂ の吸入により、モルモット肺組織のヒスタミン受容体数、およびムスカリン性アセチルコリン受容体数が増加するという報告もあり¹²⁾、アレルギー性炎症と自律神経異常が深く関わっていることも考えられる。

次に H_2 受容体についてであるが、Chand は H_2 受容体の欠如が気管支の過反応性の原因となる可能性を報告している²⁾。今回、われわれの検討では OA 感作喘息群において H_2 受容体数は無感作群より減少しており、Chand の説と関連性のある結果が出たが、これは感作群においては、肺膜分画操作中にヒスタミンが遊離されて、それにより H_2 受容体が down regulation を起こした結果とも考えられ、受容体測定とともに肺組織中のヒスタミン値を同時に測定して検討する必要があると考えられた。また、 H_2 受容体拮抗剤であるシメチジンは肺葉、区域、亜区域気管支のヒスタミン dose response curve に影響を与えない¹³⁾ という報告や、シメチジンはヒスタミンに対する気管支の反応を大きく変化させなかった^{14,15)} という報告もあり、さらに検討を重ねる必要があると考えられた。また、最近 H_3 受容体がコリン性の神経伝達を抑制するという報告もあり¹⁶⁾、 H_1 、 H_2 、および H_3 受容体は気管支喘息における自律神経異常に、深く関与していると考えられた。

VI. 結 論

モルモット肺膜分画の H_1 、 H_2 受容体を測定し、以下の知見を得た。

1) モルモット肺膜分画の H_1 受容体の最大結合数 (B_{max}) は、OA 感作喘息群が健常群より明らかに高値を示したが、親和性 (K_d) は両群間に明らかな差はみられなかった。

2) モルモット肺膜分画の H_2 受容体最大結合数 (B_{max}) は、OA 感作喘息群が健常群より明らかに低値を示したが、親和性 (K_d) は両群間に明らかな差はみられなかった。

3) 以上のことから、喘息の病態には H_1 受容体の関与が大きいことが示唆された。

文 献

- 1) Black, J.W., Duncan, W.A., Durant, C.J., et al. : Definition and antagonism of histamine receptors. *Nature*, 236 : 385, 1972.
- 2) Chand, N. : Is airway hyperreactivity in asthma due to histamine H₂ receptor deficiency? *Med. Hypothesis*, 6 : 1105-1112, 1980.
- 3) 東田有智 : 気管支喘息の発症機序の実験的解明—実験的2相性喘息モデルによる検討—. *近畿大医誌*, 14 : 133-149, 1989.
- 4) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et al. : Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
- 5) Saxon, A., Morledge, D., and Bonavida, B. : Histamine receptor leukocyte (HRL). Organ and lymphoid distribution in man. *Clin. Exp. Immunol.*, 28 : 394-399, 1977.
- 6) 大川健太郎 : 気管支喘息におけるムスカリン性アセチルコリン受容体に関する臨床的および実験的検討. *近畿大医誌*, 16 : 43-61, 1991.
- 7) 村木正人 : 実験喘息モデルモット気道反応性亢進における気道炎症とchemical mediatorの役割. *近畿大医誌*, 18 : 263-283, 1993.
- 8) Ind, P.W., Barnes, P.J., Brown, M.J., Causon, R. : Measurement of plasma histamine in asthma. *Clin. Allergy*, 13 : 61-67, 1983.
- 9) Skoner, D.P., Asman, B., Gillen, L., et al. : Plasma elevations of histamine and a prostaglandin metabolite in acute asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 137 : 1009-1014, 1988.
- 10) Barnes, P.J., and Brown, M.J. : Plasma venous histamine in exercise and hyperventilation-induced asthma in man. *Clin. Sci.*, 61 : 159-162, 1981.
- 11) Barnes, P.J., Ind, P.W., and Brown, M.J. : Plasma histamine and catecholamine in stable asthmatic subjects. *Clin. Sci.*, 62 : 661-663, 1982.
- 12) 竹花泰雄, 菊池伸次, 草間 寛・他 : 抗原誘発モデルモット気道過敏性に対する特異的Thromboxane (TX)A₂合成酵素阻害剤(E)-3-[p-(1H-imidazol-1-ylmethyl)phenyl]-2-propenoic acid hydrochloride monohydrate) OKY-046・HClの影響. *基礎と臨床*, 24 : 461-468, 1990.
- 13) Armour, C.L., Lazar, N.M., Schellenberg, R. R., et al. : A comparison of *in vivo* and *in vitro* human airway reactivity to histamine. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 129 : 907-910, 1984.
- 14) Nogrady, S.G., and Bevan, C. : H₂ receptor blockade and bronchial hyperreactivity to histamine in asthma. *Thorax*, 36 : 268-271, 1981.
- 15) Jackson, P.J., Manning, P.K., and O'Byrne, P. M. : A new role for histamine H₂-receptors in asthmatic airways. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 138 : 784-788, 1988.
- 16) Ichinose, M., and Barnes, P.J. : Inhibitory histamine H₃-receptors on cholinergic nerves in human airways. *Eur. J. Pharmacol.*, 163 : 383-386, 1989.