炎症滲出液による骨髓細胞のヒスタミン産生増大 とその制御

平沢典保・船場由利子・渡辺雅子^{*1)}、鶴藤 丞^{*2)}、大内和雄^{*1)}

Regulation of histamine production of bone marrow cells stimulated by inflammatory exudate

The mechanism for histamine release of bone marrow cells stimulated by the inflammatory exudate, the pouch fluid in air pouch type allergic inflammation in rats, was examined. When bone marrow cells were incubated in the medium containing dialyzed pouch fluid supernatant, histidine decarboxylase activity in the cells and histamine level in the medium were significantly increased when compared with those in bone marrow cells incubated in the medium alone. Addition of an RNA synthesis inhibitor, actinomycin D, or a protein synthesis inhibitor, cycloheximide, into the medium strongly reduced the dialyzed pouch fluid supernatant-induced increase in histamine level in the medium. Inhibitors of DNA synthesis, mitomycin C and cytosine arabinoside, reduced it partially. In addition, it was inhibited by retinoic acid, a differentiation-inducer, but was augmented by sodium n-butyrate, which induces differentiation of bone marrow cells to basophils. Without dialyzed pouch fluid supernatant, retinoic acid and sodium n-butyrate did not affect histamine production. These results suggest that the inflammatory exudate in allergic inflammation has an activity to stimulate histamine production by bone marrow cells by inducing de novo synthesis of histidine decarboxylase which is regulated by growth and differentiation of histamine-producing cells.

Noriyasu Hirasawa・Yuriko Funaba・Masako Watanabe*, Susumu Tsurufuji**, Kazuo Ohuchi*

key words: histamine production, allergic inflammation, bone marrow cells, histidine decarboxylase

ヒスタミンは肥満細胞や好塩基球の脱顆粒により放出されるだけでなく、ヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の誘導に基づくヒスタミン産生の亢進によっても放出されることが、細胞増殖が盛んな組織^{1,2)} などにおいて認められて

いるが、その機序については不明の点が多い。

筆者らは、ラットの空気嚢型アレルギー炎症モデルを用いて、ヒスタミンの役割について検討してきたが、ヒスタミンはアナフィラキシー相において肥満細胞の脱顆粒により放出されるだけでなく、その後24時間まで持続的に炎症滲出液中に産生放出され³⁾、この第2相(ポストアナフィラキシー相)のヒスタミンの放出は、炎症組織中のヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)活性の増加に伴い、ヒスタミン産生が亢進した結果である⁴⁾ こと、およびアナフィラキシー相のヒスタミンは H₁ 受容体を介して、血管透過性亢進に関与している⁵⁾ のに対し、ポストアナフィラキシー相のヒスタミンは H₂ 受容体を介して白血球浸潤に抑制的に作用している³⁾ ことを明らかにしてきた。

また、ポストアナフィラキシー相の炎症滲出液中には、骨髓細胞のヒスタミン産生を増大させる活性として測定されるヒスタミン産生増大因子が存在し⁴⁾、しかも、この活性は炎症組織のヒスタミン産生亢進にやや先立って増加することから、この因子がアレルギー炎症のポストアナフィラキシー相におけるヒスタミン産生に関与している可能性を示唆してきた⁴⁾。

今回は、空気嚢内液中のヒスタミン産生増大因子にもっともよく応答する骨髓細胞を用いた *in vitro* の実験系を用いて各種薬物の効果を検討し、この因子による HDC 誘導機序について明らかにすることを目的とした。

方 法

(1) 空気嚢型アレルギー性炎症モデルの誘発⁶⁾

SD 系雄性ラット140~160 g(日本チャールズリバー)に、抗原 azobenzencarsonate-acetyl bovine serum albumin 5 mg を含む生理食塩水とフロインドの完全アジュバント(Difco)との1:1乳剤を皮内注射することにより感作した。9日後、背部皮下に空気 8 ml を注射して空気嚢を作成し、そ

*1) Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University., Aoba Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980, Japan 東北大学薬学部生化学講座

*2) Institute of Cytosignal Research, Inc., Ohmori, Ohta-ku, Tokyo 143, Japan サイトシグナル研究所

表 1 Time changes of histamine level in the medium, and histamine content and HDC activity in bone marrow cells and effects of dialyzed pouch fluid supernatant

incubation time (hr)	medium alone			dialyzed pouch fluid supernatant		
	histamine (ng/dish)		HDC activity (pmol/min/10 ⁶ cells)	histamine (ng/dish)		HDC activity (pmol/min/10 ⁶ cells)
	cell	sup.		cell	sup.	
2	116±2	36±3	0.14±0.01	118±3	30±1	0.20±0.06
4	118±2	44±1	0.16±0.02	119±1	46±3 ^{*3)}	0.26±0.03 ^{*3)}
8	113±5	52±2 ^{*2)}	0.14±0.01	121±2	62±1 ^{*3)}	0.59±0.05 ^{*3)} #3)
12	105±3	63±3 ^{*3)}	0.19±0.02	117±3 ^{*2)}	106±1 ^{*3)}	0.51±0.01 ^{*3)} #3)
24	103±2 [*]	88±3 ^{*3)}	0.21±0.03	125±1 ^{*3)}	177±5 ^{*3)}	0.56±0.02 ^{*3)} #3)

Bone marrow cells (4×10^6) were incubated in EMEM alone or in the EMEM containing dialyzed pouch fluid supernatant at 37°C in 5% CO₂-95% air. At the indicated time, histamine level in the medium, and histamine content and HDC activity in cells were determined. Values are the means±SEM of 4 samples.

*2): P<0.01, *3): P<0.001 vs corresponding medium alone group and #2): P<0.01, #3): P<0.001 vs. corresponding 2 hr values

の24時間後に空気嚢内に抗原 2 mg を含む 2 % sodium carboxymethylcellulose-0.9% NaCl 溶液 4 ml を注入して、アレルギー反応を惹起した。

(2) 空気嚢内液の採取と処理

アレルギー反応を惹起して24時間後に、ラットをエーテル麻酔下脱血死させ、空気嚢内液を回収した。氷冷した生理食塩水で2倍希釈したのち、10,000 g 4°C で10分間遠心し浸潤細胞を除いた。遠心上清を Hanks' balanced salt solution で透析し、使用するまで -40°C で保存した。

(3) 骨髓細胞のヒスタミン産生の測定

ラット(200~300 g)の大腿骨および頸骨から骨髓細胞を採取し、Eagle's minimum essential medium(EMEM)中に 1×10^7 個/ml となるように調整した。また、前項(2)に記した方法により、調製した空気嚢内液を EMEM で4倍希釈し、その0.4 ml と細胞浮遊液 0.4 ml を混合し(空気嚢内液の最終濃度は6.25%(v/v)である)、12 well-dish を用いて、5 % CO₂-95% air, 37°C で24時間培養した。培養液を回収して、4°C で800 g 5分間遠心し、その上清中のヒスタミン量を Shore らの方法⁷⁾により測定した。

(4) 細胞中のヒスチジン脱炭酸酵素活性の測定

一定時間培養後、培養液を回収し、4°C で800 g 3分間遠心して遊離細胞を得る。さらに、dish に付着している細胞をラバーポリスマンにより剝離後回収し、上記遊離細胞と合わせる。得られた細胞を超音波処理により破碎後、1,700 g 4°C 10分間遠心し、その上清中の HDC 活性を Watanabe ら

の方法⁸⁾により測定し、細胞内 HDC 活性とした。

(5) 薬物投与法

各種薬物はエタノールまたはEMEMに溶解後、さらに、EMEM で希釈したのち、骨髓細胞浮遊液と1:1で混合し培養を行った。薬物をエタノールで溶解した場合には、その最終濃度を0.2%とし、対照群にも同量のエタノールを加えた。

結 果

(1) 培養上清中のヒスタミン量と骨髓細胞中のヒスチジン脱炭酸酵素活性の経時的変化

骨髓細胞をメディウムのみで培養した場合、細胞中の HDC 活性は培養開始前のレベルでほぼ一定であったが、培養上清中のヒスタミン量は徐々にではあるが経時的に増加した(表1)。

一方、アレルギー炎症を誘発し、24時間後の空気嚢内液の遠心上清を透析して得た試料をメディウム中に添加して培養すると、HDC 活性はメディウムのみで培養した場合にくらべて4時間以降で有意に上昇しはじめ、培養開始後8時間以後はノラトーに達した。また、培養上清中のヒスタミン量は持続的に増加し、24時間後で比較すると、メディウムのみで培養した場合にくらべて、約2倍高くなった(表1)。しかし、細胞内のヒスタミン量は両群とも顕著な増加はみられなかった(表1)。

(2) RNA 合成阻害剤および蛋白質合成阻害剤の効果

RNA 合成阻害剤アクトノマイシン D(10^{-8} ~

表 2 Effects of cycloheximide and actinomycin D on dialyzed pouch fluid supernatant-induced histamine release by bone marrow cells

treatment		histamine(ng/dish)
medium alone		121±1* ³⁾
dialyzed pouch fluid supernatant		
+cycloheximide	0 M	210±3
	10 ⁻⁷ M	145±4* ³⁾
	10 ⁻⁶ M	78±1* ³⁾
	10 ⁻⁵ M	75±1* ³⁾
medium alone		62±3* ³⁾
dialyzed pouch fluid supernatant		
+actinomycin D	0 M	184±6
	10 ⁻⁸ M	150±4* ³⁾
	10 ⁻⁷ M	82±2* ³⁾
	10 ⁻⁶ M	78±1* ³⁾

Cycloheximide or actinomycin D was added into the EMEM containing dialyzed pouch fluid supernatant. Bone marrow cells (4×10^6) were incubated at 37°C in 5% CO₂-95% air for 24hr and histamine level in the medium was determined. Values are the mean±SEM of 4 samples.

*³⁾: P<0.001 vs corresponding pouch fluid control

10⁻⁶M), および蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド (10⁻⁷~10⁻⁵M) を骨髓細胞の培養液に添加し, 24時間培養すると, いずれの薬物も, 空気嚢内液から調製した試料添加により上昇するメディウム中のヒスタミン量の上昇を用量依存的に強く抑制した(表2).

(3) DNA 合成阻害剤の効果

DNA 合成阻害剤マイトマイシン C(10⁻⁶~10⁻⁴ M)およびシトシンアラビノシド(10⁻⁵~10⁻³M)を含むメディウム中で骨髓細胞を培養すると, 空気嚢内液から調製した試料添加により上昇するメディウム中のヒスタミン量の増加は用量依存的に抑制されるが, その抑制作用は強力ではなかった(表3).

(4) 分化誘導剤の効果

レチノイン酸は10⁻⁶および10⁻⁵Mにおいて, 無刺激下における骨髓細胞のヒスタミン産生には影響を与えなかったが, 空気嚢内液から調製した試料存在下で増大するヒスタミン産生放出を用量依存的に抑制した(表4).

また, 酪酸ナトリウムを培養液中に添加すると, 単独では骨髓細胞のヒスタミン産生に影響を

表 3 Effects of mitomycin C and cytosine arabinoside on dialyzed pouch fluid supernatant-induced histamine release by bone marrow cells

treatment		histamine(ng/dish)
medium alone		100±6* ³⁾
dialyzed pouch fluid supernatant		
+mitomycin C	0 M	234±11
	10 ⁻⁶ M	225±9
	10 ⁻⁵ M	172±2* ³⁾
	10 ⁻⁴ M	147±3* ³⁾
medium alone		90±2* ³⁾
dialyzed pouch fluid supernatant		
+cytosine arabinoside		
	0 M	237±8
	10 ⁻⁵ M	231±1
	10 ⁻⁴ M	193±5* ³⁾
	10 ⁻³ M	168±3* ³⁾

Mitomycin C or cytosine arabinoside was added into the EMEM containing dialyzed pouch fluid supernatant. Bone marrow cells (4×10^6) were incubated at 37°C in 5% CO₂-95% air for 24hr and histamine level in the medium was determined. Values are the mean±SEM of 4 samples.

*³⁾: P<0.001 vs corresponding pouch fluid control.

与えなかったが, 空気嚢内液から調製した試料共存下では, 1 mMでヒスタミン産生を有意に増加させた(表5).

考 察

ラットの空気嚢型アレルギー炎症モデルでは, 空気嚢内液中にはヒスタミン産生増大因子が存在し, 炎症組織での持続的なヒスタミン産生の誘発に関与している可能性があることを筆者らは報告してきた⁴⁾. 今回, *in vitro*の実験系としてこの空気嚢内液による骨髓細胞のヒスタミン産生増大系を用いて, アレルギー炎症におけるヒスタミン産生の誘発機構について解析した.

空気嚢内液を遠心し, その上清を透析して得た試料をメディウム中に添加して骨髓細胞を培養すると, 骨髓細胞のメディウム中へのヒスタミン放出は経時的に増大し, その上昇は細胞内の HDC 活性の増加と一致する(表1)ことから, 炎症滲出液中には骨髓細胞内でヒスタミンの産生を促進させて細胞外にヒスタミンを放出させる作用があることが強く示唆された. なお, 細胞内ヒスタミン

表 4 Effects of retinoic acid on histamine release by bone marrow cells in the absence or presence of dialyzed pouch fluid supernatant

treatment		histamine(ng/dish)
medium alone		
+retinoic acid	0 M	45±3
	10 ⁻⁶ M	44±3
	10 ⁻⁵ M	46±3
dialyzed pouch fluid supernatant		
+retinoic acid	0 M	288±4 ^{#1)}
	10 ⁻⁶ M	213±3 ^{*3)} ^{#1)}
	10 ⁻⁵ M	190±11 ^{*3)} ^{#1)}

Retinoic acid was added into EMEM or the EMEM containing dialyzed pouch fluid supernatant. Bone marrow cells (4×10^6) were incubated at 37°C in 5% CO₂-95% air for 24hr and histamine level in the medium was determined. Values are the mean±SEM of 4 samples.

*³⁾: P<0.001 vs corresponding pouch fluid control and ^{#1)}: P<0.001 vs medium alone.

量の増加はわずかであり、したがって、細胞内で産生されたヒスタミンはほとんど細胞外に放出されていると考えられる。この HDC 活性の増加は、RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D、および蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドにより強く抑制される(表 2)ことから、細胞内 HDC が炎症滲出液中に存在する因子によって修飾を受け活性型に変化するのではなく、HDC の de novo 合成が誘導されるものであると考えられる。

これらの結果は、アレルギー炎症のポストアナフィラキシー相において炎症局所でみられるヒスタミン産生亢進の特徴、すなわち空気嚢内にシクロヘキシミドを投与すると、空気嚢内液中のヒスタミン量が低下する結果⁹⁾とよく一致し、したがって、ポストアナフィラキシー相の炎症局所におけるヒスタミン産生に関する *in vitro* 実験系として、骨髓細胞の培養系を適用することは妥当性があるものと思われる。

2種の DNA 合成阻害剤マイトマイシン C およびシトシンアラビノシドは、いずれも空気嚢内液から調製された試料による骨髓細胞のヒスタミン産生を部分的に抑制し(表 3)、この結果は、ヒスタミン産生亢進に細胞増殖が部分的に関与することを示唆するものである。炎症滲出液中に存在する因子によるヒスタミン産生増大には、細胞増殖が部分的に関与している可能性のほかに、ヒスタ

表 5 Effects of sodium butyrate on histamine release by bone marrow cells in the absence or presence of dialyzed pouch fluid supernatant

treatment		histamine(ng/dish)
medium alone		
+sodium butyrate	0 M	107±5
	10 ⁻⁴ M	135±10
	10 ⁻³ M	88±5
dialyzed pouch fluid supernatant		
+sodium butyrate	0 M	385±14 ^{#1)}
	10 ⁻⁴ M	400±20 ^{#1)}
	10 ⁻³ M	481±10 ^{*3)} ^{#1)}

Sodium butyrate was added into EMEM or the EMEM containing dialyzed pouch fluid supernatant. Bone marrow cells (4×10^6) were incubated at 37°C in 5% CO₂-95% air for 24hr and histamine level in the medium was determined. Values are the mean±SEM of 4 samples.

*³⁾: P<0.001 vs corresponding pouch fluid control and ^{#1)}: P<0.001 vs medium alone

ミン産生細胞の分化の過程と関連しているかどうかについて、各種分化誘導剤を用いて検討したところ、レチノイン酸は、ヒト骨髓性白血病細胞 HL 60 を好中球に分化させる¹⁰⁾ことが知られているが、そのような作用を発現する濃度で空気嚢内液中の因子による骨髓細胞のヒスタミン産生増大を抑制することが明らかになった(表 4)。

この濃度のレチノイン酸で骨髓細胞を培養しても、メディアウム中の LDH レベルは上昇せず、また、無刺激下の骨髓細胞のヒスタミン放出には影響を与えないことから、レチノイン酸は毒性発現によりヒスタミン産生を抑制したとは考えにくい。

一方、HL 60 細胞を好塩基球に分化させる酪酸ナトリウム¹¹⁾は、空気嚢内液中の因子による骨髓細胞のヒスタミン産生を増加させた(表 5)。酪酸ナトリウムは、無刺激下の骨髓細胞のヒスタミン産生には影響を与えないことから、空気嚢内液中のヒスタミン産生増大因子による骨髓細胞の活性化の段階を酪酸ナトリウムが促進しているものと考えられる。また、データを示してはいないが、HL 60 細胞をマクロファージに分化させることが知られている活性型ビタミン D₃¹²⁾やホルボールミリステートアセテート¹³⁾は、空気嚢内液中の因子による骨髓細胞のヒスタミン産生増大には影響

を与えなかった。

これらの分化誘導剤を用いた結果から、空気嚢内液中の因子による骨髓細胞のヒスタミン産生増大は、骨髓細胞が好塩基性細胞へ分化する初期段階に引き起こされることが示唆され、実際、空気嚢内液から調製した試料存在下で骨髓細胞を7日間培養すると、好塩基性細胞が増加することが最近判明した。

血液幹細胞や未成熟な細胞に作用するサイトカインとして知られる IL-3 や GM-CSF には骨髓細胞のヒスタミン産生を亢進させる作用があることが知られている^{14,15)}。空気嚢内液中のヒスタミン産生増大因子の分離精製、また、炎症局所でのこの因子の産生と作用発現機序については、現在解析を進めているところである。

文 献

- 1) Kahlson, G., Nilson, K., Rosengren, E., Zederfeldt, B.: Wound healing as dependent on rate of histamine formation. *Lancet* 2: 230-234, 1960.
- 2) Kahlson, G., Rosengren, E.: New approaches to the physiology of histamine. *Physiol. Rev.* 48: 155-196, 1968.
- 3) Hirasawa, N., Ohuchi, K., Watanabe, M., Tsurufuji, S.: Role of endogenous histamine in postanaphylactic phase of allergic inflammation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 967-973, 1987.
- 4) Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawarasaki, K., Watanabe, M., Tsurufuji, S.: Occurrence of histamine-production-increasing factor in the postanaphylactic phase of allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88: 386-393, 1989.
- 5) Ohuchi, K., Hirasawa, N., Watanabe, M., Tsurufuji, S.: Pharmacological analysis of the vascular permeability response in the anaphylactic phase of allergic inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 337-345, 1985.
- 6) Tsurufuji, S., Yosino, S., Ohuchi, K.: Induction of an allergic air pouch inflammation in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 69: 189-198, 1982.
- 7) Shore, P.A., Burkhalter, A., Cohn, V.H., Jr.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 182-186, 1959.
- 8) Watanabe, T., Taguchi, Y., Sasaki, K., Tsuyama, K., Kitamura, Y.: Increase in histidine decarboxylase activity in mouse skin after application of the tumor promoter tetradecanoylphorbol acetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 427-432, 1981.
- 9) 平沢典保, 大内和雄, 平野寧乃, 河原崎紀美子, 渡辺雅子, 鶴藤 丞: アレルギー炎症における2相性のヒスタミンレベルの上昇に対する薬物効果について. 日本薬学会第108年会講演要旨集, 1988, p 219.
- 10) Breitman, T.R., Selonick, S.E., Collins, S.J.: Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2936-2940, 1980.
- 11) Hutt-Taylor, S.R., Harnish, D., Richardson, M., Ishizaka, T., Denburg, J.A.: Sodium butyrate and a T lymphocyte cell line-derived differentiation factor induce basophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Blood* 71: 209-215, 1988.
- 12) Miyaura, C., Abe, E., Kuribayashi, T., Tanaka, H., Konno, K., Nishii, Y., Suda, T.: $1\alpha, 25$ -dihydroxy vitamin D_3 induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 937-943, 1981.
- 13) Lotem, J., Sachs, L.: Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5158-5162, 1979.
- 14) Ihle, J.N., Keller, J., Oroszlan, S., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Fitch, F., Prystowsky, M.B., Goldwasser, E., Schrader, J.W., Palaszynski, E., Dy, M., Lebel, B.: Biologic properties of homogenous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J. Immunol.* 131: 282-287, 1983.
- 15) Schneider, E., Pollard, H., Lepault, F., Guy-Grand, D., Minkowski, M., Dy, M.: Histamine-producing cell-stimulating factor induce de novo synthesis of histidine decarboxylase in hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 139: 3710-3717, 1987.