肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす アレルギー制御薬の効果

—臍帯血由来ヒト培養肥満細胞を用いた検討—

神戸直智^{*1)}, 黒沢元博^{*2)}, 五十嵐 康・天野博雄・
松島陽一郎^{*1)}, 宮地良樹^{*3)}

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Effect of anti-allergic drugs on histamine release from mast cells—Analysis with cord blood-derived human cultured mast cells

Mast cells have been regarded as one of the most important effector cells in IgE-dependent allergic response. Recently the heterogeneity of mast cells in localization and species have been recognized. However, whether anti-allergic drugs possess inhibitory effects on histamine release from human mast cells still remains uncertain. Therefore, in the present study, effects of anti-allergic drugs on histamine release from human mast cells, which were derived by the culture of cord blood cells with 80 ng/ml recombinant human stem cell factor and 50 ng/ml interleukin 6. The human cultured mast cells presented functional IgE receptors on their cell surfaces and were effectively stimulated to release histamine in dose-dependent and time-dependent manners of anti-IgE antibody. Anti-allergic drugs, such as azelastine, ketotifen, and emedastin, were able to inhibit histamine release from the human mast cells in dose-dependent manners. Immunosuppressive agent, cyclosporin A, and flavonoid, quercetin, also showed inhibitory effects on the histamine release from the human cultured mast cells.

Rec. 11/26/1998, Acc. 12/26/1998

Naotomo Kanbe^{*1)}, Motohiro Kurosawa^{*2)}, Yasushi Igarashi・
Hiroo Amano・Youichiro Matsushima^{*1)}, Yoshiki Miyachi^{*3)}

key words : mast cells, histamine, anti-allergic drugs, cyclosporin A, quercetin

1877年, Paul Ehrlichにより記載された肥満細胞の機能は長い間不明であった。その後半世紀以上を経て, 1938年に肥満細胞顆粒内にヘパリンが, 1953年にヒスタミンの存在¹⁾が確認された。1966年に石坂公成, 照子夫妻によりレアギン活性

を有する抗体としてIgEが発見され²⁾, それに基づき肥満細胞表面に高親和性IgE受容体(FcεRI)が存在することが証明されると, 肥満細胞はIgE依存性即時型アレルギー反応における重要なエフェクター細胞として認識されるようになった。さらに近年では, 肥満細胞からさまざまなサイトカインが産生されることが明らかとなっている。アレルギー疾患をアレルギー炎症³⁾という炎症学的立場からとらえる際, アレルギー疾患の難治化, 慢性化における肥満細胞の果たす役割が注目されつつある⁴⁾。

肥満細胞には多様性が存在する⁵⁾。齧歯類の肥

^{*1)} Department of Dermatology, Gunma University School of Medicine 群馬大学医学部皮膚科学教室

^{*2)} Department of Geriatric Medicine, Hirosaki University School of Medicine 弘前大学医学部老年科学教室

^{*3)} Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine 京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教室

Offprint requests to : Motohiro Kurosawa, Department of Geriatric Medicine, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki, Aomori 036-8562, Japan

満細胞では、消化管粘膜や気道上皮に存在する肥満細胞(mucosal mast cell, MMC)と結合織に存在する肥満細胞(connective tissue mast cell, CTMC)では性質が異なる。特に、MMCが顆粒内プロテオグリカンとしてコンドロイチン硫酸を豊富に含むのに対し、CTMCがヘパリンを含有することが両者の染色性の違いとして反映される。しかし、このMMC、CTMCという特性がそのままヒト肥満細胞に当てはまるわけではない。ヒト肥満細胞はその局在とともに、顆粒に含まれるセリンプロテアーゼの違いから tryptase のみを含有する MC_T細胞と、tryptase と chymase の両者を含有する MC_{TC}細胞の2種類に分類される⁶⁾。

齧歯類とヒトでは、肥満細胞を誘導する増殖因子も異なる。マウスでは、骨髓細胞を interleukin 3(IL-3)共存下で培養することで、肥満細胞(bone marrow derived cultured mast cell, BMMC)を得ることができる。一方、ヒト血液幹細胞を IL-3 共存下に培養しても、好塩基球や好酸球の増殖はみられるが、肥満細胞の出現はみられない⁷⁾。これに対し、今日ヒト肥満細胞必須の増殖因子は stem cell factor(SCF)であることが明らかにされている^{8~10)}。

これまで肥満細胞に関する研究は、検討に必要な十分量のヒト肥満細胞を得ることが困難なことなどから、主に齧歯類の肥満細胞を用いて行われてきた。これら肥満細胞からのメディエーター遊離抑制を指標として抗アレルギー薬が開発され、アレルギー疾患治療薬としてわが国のアレルギー疾患治療において大きな位置を占めてきたが、はたしてヒト肥満細胞に対しても同様の抑制作用を発揮するか否かは不明である。

ヒト肥満細胞の培養

筆者らは、中畑ら¹¹⁾、斉藤ら¹²⁾の方法に基づき、臍帯血を SCF と IL-6 共存下に培養することでヒト肥満細胞の大量純培養系を確立している^{13~16)}。すなわち、分娩時にヘパリン加に採取したヒト臍帯血から、Ficoll-paque(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて単核球を採取し、10%ウシ胎児血清、80 ng/ml SCF および 50

ng/ml を添加した Media I(免疫生物研究所、藤岡)に 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させ培養した。培地交換は週に一度行い、12 週以上培養した。肥満細胞の純度の確認は、Irani らの方法⁶⁾に準じ、tryptase に対する免疫化学染色を行った¹⁶⁾。すなわち、培養細胞をサイトスピン(Cytospin 3: Shandon, Pittsburgh, PA, USA)を用いてポリリジン処理したスライドガラス上に付着させ、風乾した。固定後、5%ウシ血清アルブミン(BSA)で非特異的蛋白吸着の阻止操作を行い、アルカリフォスファターゼ標識マウス抗 tryptase 抗体(Chemicon, Temecula, CA, USA)と一晚インキュベーションしたのち、Fast Blue(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)で発色した。

この培養系では、培養2週目よりさまざまな血液細胞に混じて tryptase 陽性細胞が出現してくる。さらに培養をつづけると、tryptase 陽性細胞の占める割合は増加し、培養10週以降ではほぼ100%に達する(図1)。

ヒスタミン測定法

培養肥満細胞におけるヒスタミン含有量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて計測した¹³⁾。すなわち、細胞ペレットに最終濃度1%の過塩素酸を加えて除蛋白を行ったのち、陽イオン交換カラム(#3011-C, 日立、東京)で分離し、o-phthaldialdehyde(Sigma)と反応させ、蛍光光度計(#F-1050, 日立)で励起波長375 nm、蛍光波長460 nm で検出した。ヒスタミン量は、蛍光強度をプロットしたピーク下の面積から換算し(#D-2500, 日立)、同時に測定した既知量のヒスタミン測定値から作成した検査線より求めた。

臍帯血由来培養ヒト肥満細胞は、細胞 1×10^6 個あたりヒスタミン $5.6 \mu\text{g}$ を含有しており¹³⁾、ヒト肺肥満細胞のヒスタミン含有量($2 \sim 3.9 \mu\text{g}$)と比較して、十分に成熟した細胞と考えられた。

FcεRI の発現

培養肥満細胞における FcεRI の発現は、FAC-Scan(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)を用いて確認した。すなわち、細胞を抗 FcεRI α 鎖

図1 臍帯血由来ヒト培養肥満細胞の培養経過
A: 培養細胞総数と tryptase 陽性細胞比率の推移 B: 培養10週時における tryptase に対する免疫染色所見

抗体(極東製薬, 東京)と1時間反応させたのち, FITC 標識した二次抗体(Jacson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA)を加え30分間インキュベーションし, 解析を行った。

臍帯血由来ヒト培養肥満細胞は無刺激の状態では, 13.6%の細胞が $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を発現しているにすぎないが, 平均蛍光強度の比較からは明らかに $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を発現していた(図2)。さらに, 培養肥満細胞を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト myeloma IgE (Chemicon) と一晩反応させることで, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の発現は蛍光強度で約6倍に増強した。

ヒスタミン遊離試験

肥満細胞を培養液中で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト myeloma IgE と1時間反応させ, 感作した。ハanks緩衝液で洗浄したのち, 細胞を BSA およびカルシウム, マグネシウムを含むハanks緩衝液に再浮遊させ, 37度の恒温槽中で振盪させながら, 抗ヒト IgE 抗体(Cappel, Durham, NC, USA)で刺激した。反応停止後, 上清とペレットに分離し, HPLC を用いた上記の方法でヒスタミン量を測定した。刺激によるヒスタミン遊離量は, 自然遊離量および総ヒスタミン含有量を測定したのち, net% histamine release であらわした。

IgE で受動感作した培養肥満細胞を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 IgE 抗体で刺激すると, 刺激5分後には明らか

図2 臍帯血由来ヒト培養肥満細胞における高親和性 IgE 受容体の発現

なヒスタミン遊離を認め, 30分でプラトーに達する, 反応時間に依存したヒスタミン遊離が認められた(図3A)。また, 肥満細胞を $0.01\sim 10.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で各種濃度の抗 IgE 抗体と30分間反応させると, 濃度依存性にヒスタミン遊離が認められた(図3B)。

ヒト肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす抗アレルギー薬の効果

$1\mu\text{g}/\text{ml}$ IgE で受動感作した臍帯血由来ヒト培養肥満細胞を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 IgE 抗体で30分間刺激すると, 明らかなヒスタミン遊離が認められ

図3 抗IgE抗体刺激による臍帯血由来ヒト培養肥満細胞からのヒスタミン遊離
A: 刺激後5分後に明らかなヒスタミン遊離を認め、30分でプラトーに達する。
B: 抗IgE抗体の濃度依存性にヒスタミン遊離を認める。

図4 抗IgE抗体刺激した臍帯血由来ヒト培養肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす抗アレルギー薬の効果
A: azelastine B: ketotifen C: emedastine

た^{13,14)}ことから、この系に抗アレルギー薬を添加することで、培養肥満細胞からのヒスタミン遊離が抑制されるか否かを検討した。抗アレルギー薬は、抗IgE抗体刺激の1分前に添加し、抗IgE抗体刺激は薬剤の共存下で30分間行った。ヒスタミン遊離抑制率は薬剤非共存下を基準に%histamine releaseであらわした。

Azelastine, ketotifen および emedastine は、添加した薬剤の濃度依存性にヒト肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制した(図4)。しかし、それぞれの薬剤がヒスタミン遊離を抑制した濃度は、臨床的に常用量内服時に期待される血中濃度である 10^{-9} ~ 10^{-8} Mと比較すると明らかに高濃度であった。また、 10^{-3} M以上の濃度のazelastineとketotifen添加は細胞障害性に作用した。

これらの薬剤は臨床的に期待される血中濃度でH1受容体拮抗作用を示すことから、これら薬剤の臨床的有効性は、ヒスタミン遊離抑制作用というよりは、メディエーター拮抗作用によるものと考えられた。

ヒト肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼすアレルギー炎症制御薬の効果

アレルギー炎症制御薬として、免疫抑制薬のヒト培養肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する効果を検討した。抗アレルギー薬の際と同様に、薬剤は抗IgE抗体刺激の1分前に添加し、抗IgE抗体刺激は薬剤の共存下で30分間行った。ヒスタミン遊離抑制率は薬剤非共存下を基準に、%histamine releaseであらわした。

図5 抗IgE抗体刺激した臍帯血由来ヒト培養肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす cyclosporin A および quercetin の効果
A: cyclosporin A B: quercetin

Cyclosporin A は、検討した濃度 (5×10^{-9} から 5×10^{-7} g/ml, それぞれ 4×10^{-6} から 4×10^{-4} M に相当) においてヒスタミン遊離抑制作用を示した (図5A)。

Cyclosporin A は、今回検討した濃度で肥満細胞からのサイトカイン遊離抑制作用を示すことから、免疫抑制薬はヒスタミン遊離抑制作用のみならずサイトカイン遊離抑制作用を介しても、肥満細胞の機能を制御しているものと考えられた。

ヒト肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす flavonoid の効果

新規アレルギー炎症制御薬の候補の一つとして、flavonoid である quercetin のヒト培養肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する効果を検討した。flavonoid は、アルミニウムや鉄などの金属イオンと結合した配糖体として植物に広く含まれており、2-phenyl-4-chromone, すなわち flavone 構造を有する物質である。Quercetin の構造は cromoglycate に近いが、両者のヒスタミン遊離抑制機構は異なり、quercetin は Ca^{2+} -ATPase を活性化して細胞内 Ca^{2+} レベルを低く保つことで、肥満細胞あるいは好塩基球からのヒスタミン遊離を抑制すると考えられている¹⁷⁾。なお、検討条件は、抗アレルギー薬および cyclosporin A の際と同様である。

Quercetin は、検討した 10^{-6} から 10^{-4} M の濃度においてヒスタミン遊離抑制作用を示した (図5

B)。

おわりに

最近 Gommerman ら¹⁸⁾ は、SCF が肥満細胞にカルシウム流入を惹起することに注目して、SCF 共存下において ketotifen がこのカルシウム流入を阻害して、むしろ SCF 濃度依存性に肥満細胞をアポトーシスに至らしめることを報告した。SCF はヒト肥満細胞の必須の増殖因子であるのみならず、肥満細胞遊走活性¹⁹⁾ やサイトカイン産生増強作用など肥満細胞の活性化を有する。したがって、活性化された肥満細胞ほど抗アレルギー薬によって障害されやすいというこの現象は、抗アレルギー薬の新たな炎症制御機構を解明する手がかりになるかもしれない。

群馬大学医学部皮膚科学教室における臍帯血由来ヒト肥満細胞の培養を確立するにあたっては、国立小児病院の斎藤博久先生、東京大学医科学研究所の中畑龍俊先生、KIRIN ビールの柳田 誠先生にご教授をいただきました。また、国立小児病院の田知本寛先生、岐阜薬科大学の七条通孝先生とのディスカッションを通じて貴重な示唆を得ることができました。ここに感謝致します。

文 献

- 1) Riley JF, West GB: The presence of histamine in tissue mast cells. J Physiol 120: 528-537, 1953.

- 2) Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM : Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV : presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 97 : 75-85, 1966.
- 3) 神戸直智, 黒沢元博, 宮地良樹 : 肥満細胞をめぐる最近の話題. *臨床免疫* 30 : 843-850, 1998.
- 4) 黒沢元博, 宮地良樹・編 : アレルギー炎症性疾患—新たなアプローチ. 先端医学社, 東京, 1994.
- 5) 黒沢元博, 神戸直智, 宮地良樹 : アレルギー炎症における肥満細胞の新たな役割. *炎症* 18 : 357-361, 1998.
- 6) Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB : Detection of MC_T and MC_{TC} types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37 : 1509-1515, 1989.
- 7) Saito H, Hatake K, Dvorak AM, Leiferman KM, Donnenberg AD, Arai N, Ishizaka K, Ishizaka T : Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 2288-2292, 1988.
- 8) Valent P, Spanblöchl E, Sperr RW, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobel H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K : Induction of differentiation of mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 80 : 2237-2245, 1992.
- 9) Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, Craig SS, Ashman LK, Ishizaka T, Zsebo KM, Schwartz LB : Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood* 80 : 3009-3021, 1992.
- 10) Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, Irani AM, Schwartz LB, Inagaki N, Takei M, Ishizaka K, Zsebo KM, Gillis S, Ishizaka T : Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 735-739, 1993.
- 11) Nakahata T, Tsuji K, Tanaka R, Muraoka K, Okumura N, Sawai N, Takagi M, Itoh S, Ra C, Saito H : Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function. Kitamura Y, Yamamoto S, Galli SJ, Elsevier Science Publishers, USA, 1995, p 13-24.
- 12) Saito H, Ebisawa M, Sakaguchi N, Onda T, Iikura Y, Yanagida M, Uzumaki H, Nakahata T : Characterization of cord-blood-derived human mast cells cultured in the presence of Steel factor and interleukin-6. *Int Arch Allergy Immunol* 107 : 63-65, 1995.
- 13) Igarashi Y, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Saito H, Ebisawa M, Iikura Y, Yanagida M, Uzumaki H, Nakahata T : Characteristic of histamine release from cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy* 26 : 597-602, 1996.
- 14) Kurosawa M, Inamura H, Kanbe N, Igarashi Y, Tomita T, Takeda J, Miyachi Y : Phase-contrast microscopic studies using cinematographic techniques and scanning electron microscopy on IgE-mediated degranulation of cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy* 28 : 1007-1012, 1998.
- 15) Kanbe N, Kurosawa M, Nagata H, Saitoh H, Miyachi Y : Cord blood-derived human cultured mast cells produce transforming growth factor β 1. *Clin Exp Allergy* 29 : 105-113, 1999.
- 16) Kanbe N, Kurosawa M, Miyachi Y, Kanbe M, Kempuraj D, Tachimoto H, Saito H : Carnoy's fixative reduces the number of chymase-positive cells in immunocytochemical staining of cord-blood-derived human cultured mast cells. *Allergy* 53 : 981-985, 1998.
- 17) Foreman JC : Mast cells and the action of flavonoids. *J Allergy Clin Immunol* 73 : 769-774, 1984.
- 18) Gommerman JL, Berger SA : Protection from apoptosis by Steel factor but not interleukin-3 is reversed through blockade of calcium influx. *Blood* 91 : 1891-1900, 1998.
- 19) Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR : The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79 : 958-963, 1992.