モルモット皮膚アルサス反応局所におけるヒスタミン 代謝および浸潤細胞の時間的変動

立花隆夫・戸田憲一・古川福実^{*1)}、谷口信吉^{*2)}、今村貞夫^{*1)}

Time dependent changes of histamine metabolism and infiltrating cell populations in the Arthus reaction sites prepared in guinea pig skin The cutaneous concentration of histamine and the specific activities of its degrading enzymes, histamine-N-methyltransferase (HMT) and diamine oxidase (DAO), were examined in the Arthus reaction sites induced in guinea pig skin, and kind of cells infiltrated in the lesional sites was also investigated. Histamine concentration revealed a prominent linear decrease at the early stage to about 15% of the control level, and recovered linearly to 85% 6 hours after the initiation without significant infiltration of mast cells and basophils, and no remarkable change was observed thereafter up to 48 hours. The activity of HMT, a major enzyme in the degradation of histamine having almost 15 times greater activity than that of DAO, sustained the control level till 1 hour, followed by a prominent linear decrease to 35% at 6 hours and to 10% at 48 hours. Another histamine degrading enzyme (DAO) activity increased to about 150% till 1 hour, and decreased linearly like the time course of HMT activity. These changes in enzyme activities seemed to well explain the quantitative change in histamine concentration in the reaction sites. The effect of released histamine in the lesional sites was also discussed.

Takao Tachibana・Ken-ichi Toda・Fukumi Furukawa^{*1)}, Shinkichi Taniguchi^{*2)},
Sadao Imamura^{*1)}

^{*1)}Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Kyoto University

^{*2)}Department of Dermatology, Kurashiki Central Hospital

key words: Arthus reaction, histamine metabolism, inflammatory infiltrates

ヒスタミンは、その強い生理作用ゆえに各種炎症反応における代表的なケミカルメディエーターの一つと考えられている。Ⅲ型アレルギー反応においても、免疫複合体の沈着に引きつづき補体系が活性化される結果、C_{3a}、C_{5a} が産生されるとこれらはアナフィラトキシンとして作用し、ヒスタミンをはじめとする種々のケミカルメディエーターが遊離され¹⁾、炎症反応の成立に重要な役割を果たすものと考えられている。一方、Ⅲ型反応の発症は抗ヒスタミン剤によって抑制できないこと^{2,3)}、また、ヒスタミンにより本反応を誘発できないことより⁴⁾、Ⅲ型反応におけるヒスタミンの関与を疑問視する報告もある。

ヒスタミンは、一般に哺乳類の諸組織では、histamine-N-methyltransferase (HMT)、diamineoxidase (DAO) によって不活性化され、その作用を失うものとされる(図1)。また、炎症局所では、肥満細胞あるいは好塩基球に貯蔵されたヒスタミンが放出されて炎症反応を引き起こすものと考えられる。したがって、ヒスタミンに起因する炎症の強さは、反応早期においては合成系の関与

よりも遊離されたヒスタミンと不活化されるヒスタミンの量によって左右されるものと想定される⁵⁾。

筆者らは、いままでに、Ⅲ型アレルギー反応の関与が考えられているヒト紅斑症において、またヒト全身性紅斑性狼瘡(SLE)と類似した皮疹を自然発症する MRL/Mp-lpr/lpr(MRL/l) マウスにおいて、病変局所のヒスタミン分解酵素活性の低下が共通して観察されることを報告してきた^{6,7)}。さらには、モルモット皮膚に実験的に作製したアルサス反応、クロトン油皮膚炎、DNCBアレルギー性接触皮膚炎のうちで、代表的なⅢ型アレルギー反応であるアルサス反応病変部において、同酵素の活性低下がみられるのに対し、他の2種の炎症局所では、そのような異常が認められないことを報告してきた⁸⁾。

今回、筆者らは、モルモット皮膚に作製したアルサス反応局所におけるヒスタミン濃度、およびその分解酵素活性、さらには局所浸潤細胞の時間的推移、変動を検討したのでここに報告する。

材料と方法

Turk らの方法⁹⁾に準じ、Dunkin-Hartley 系モルモット

*1) 京都大学医学部皮膚科学教室

*2) 倉敷中央病院皮膚科

図1 ヒスタミンの代謝経路

表1 モルモット正常皮膚におけるヒスタミン含量およびその分解酵素活性

histamine	HMT	DAO
12.6 ± 2.7 nmol/g wet weight	1.655 ± 0.173 nmol/min/g wet weight	0.100 ± 0.008 nmol/min/g wet weight
(mean ± SE, n=4)		

トの背部皮膚にアルサス反応を作製した。体重300から400gのモルモットに、アラム卵白アルブミン(1mg/ml) 1mlを2週間間隔で計2回皮下および筋肉内注射した。そして、最終注射1週間目にアラム吸着卵白アルブミン(10mg/ml) 100 μ lを剃毛したモルモット背部皮膚に皮内注射し、アルサス反応を惹起した。

12匹のモルモット(雄6匹、雌6匹)を3グループにわけ、グループ1では惹起前および惹起後10、20、30分後、グループ2では惹起後1、2、3、4時間後、グループ3では惹起後5、6、24、48時間後に無麻酔下で皮膚を採取した。

皮膚採取後、皮下脂肪を除去し、二つに分割し、一方を20倍量のリン酸緩衝液(10mM・pH 7.8)中でglass-glass homogenizerを用いてすりつぶした。つぎにhomogenateを二分し、一つは40,000 $\times$ gで20分間遠心、他方は90 $^{\circ}$ Cにて5分間熱処理した後、同様に遠心した。そして得られた上清画分を、おのおのヒスタミン分解酵素活性およびヒスタミン含量の測定に用いた。また、他方の皮膚片は、10%ホルマリン固定後、反応局所浸潤細胞の算定に用いた。

(1) ヒスタミンの定量

組織中のヒスタミン量は、Shaffらの方法¹⁰⁾に準じ、

酵素アイソトープ法により測定した。ラット腎臓より部分精製したhistamine-N-methyltransferase(HMT)とメチル基を³HラベルしたS-adenosyl-L-methionine(SAM: 0.5 μ Ci, 60nM)とをリン酸緩衝液(50mM, pH 7.8)中で37 $^{\circ}$ C 90分間反応させ、生成された³H-methylhistamineを抽出し、標準ヒスタミンを用いて作製した定量曲線より、ヒスタミン含量(nmol/g wet weight)を求めた。

なお、筆者らの精製したHMTを用いてヒスタミンを測定すると、標準曲線は0.1pmolから30pmolの範囲で直線的であった。

(2) histamine-N-methyltransferase(HMT)活性の測定

モルモット皮膚より得た酵素標品50~200 μ gにヒスタミン(0.2mM), ³H-SAM(0.5 μ Ci, 2 μ M), リン酸緩衝液(50mM, pH 7.8)を加え合計500 μ lとした。37 $^{\circ}$ C 30分間反応後、0.5mlの1N NaOHを加え反応を停止させ、生成された³Hラベルの1-methylhistamineをAxelrodの方法¹¹⁾で抽出、測定し、その酵素活性をnmol/min/g wet weightであらわした。

(3) diamine oxidase(DAO)活性の測定

酵素標品100~200 μ gに¹⁴C-putrescine(0.2 μ Ci, 20 μ M), リン酸緩衝液(0.1M, pH 7.8)を加え合計200 μ lとした。37 $^{\circ}$ C 30分間反応後、1,300 μ lの氷冷したリン酸緩衝液(0.1M, pH 7.8)および0.5gのNaHCO₃を加え反応を停止させ、生成された¹⁴C-aminobutylaldehydeをSnyderらの方法¹²⁾に準じて抽出、測定し、その活性をnmol/min/g wet weightであらわした。

(4) 浸潤細胞の算定

Dvorakらの方法¹³⁾に従い、固定、包埋後、ギムザ染色を施行し、真皮上層部の浸潤細胞を好塩基球、肥満細胞、好酸球、好中球、単核球として同定し、油浸1,000倍下5視野の合計にてその数を算定した。

結果

モルモット正常皮膚におけるヒスタミン含量ならびにその分解酵素であるhistamine-N-methyltransferase(HMT)活性、diamine oxidase(DAO)活性は、それぞれ12.6 ± 2.7 nmol/g wet weight, 1.655 ± 0.173 nmol/min/g wet weight, 0.100 ± 0.008 nmol/min/g wet weightであった(表1)。筆者らの測定方法によると、HMT活性はDAO活性の約15倍の活性を有しており、モルモット皮膚におけるヒスタミンの代謝は、主にHMTによるものと考えられた。

アルサス反応局所のヒスタミン含量、およびその分解酵素活性の時間的推移を図示すると図2上のような。すなわち、ヒスタミン含量は惹起直後より低下しはじめ、2時間後には惹起前の15%と著減するが、6時間

後には85%まで回復し、以後測定を行った48時間後まで有意の変動を示さなかった。また、その主たる分解酵素である HMT 活性は、惹起後1時間まではほとんど変動を示さないが、3時間で35%、48時間では10%と著明な活性低下を示した。DAO 活性は、惹起後30分から60分まで惹起前の150%程度の活性を有したが、以後はHMT 活性と同様に低下の経過を辿り、6時間では35%、48時間では惹起前の10%となるような変動を示した。

一方、同時に行った浸潤細胞の算定に関しては、多核球が惹起後4時間以降増加しはじめ12~18時間後に最高の浸潤を認め、以後減少する山型の変動を示したのに対し、単核球、好酸球は4時間後以降徐々に増加する一相性の変動を示した。しかし、ヒスタミンを多量に含有すると考えられる肥満細胞、好塩基球は、局所のヒスタミン含量が増加する惹起後2時間以降も浸潤を認めることはできなかった(図2下)。

考 察

抗ヒスタミン剤投与でⅢ型アレルギー反応を抑制できないことより³⁾、またヒスタミンの皮内注射によっても同反応を惹起できないことより⁴⁾、本反応の成立に関し、ヒスタミンはそれほど重要な役割を果たしていないとも考えられる。しかし、Ⅲ型反応の場合においては、活性化された補体系によりアナフィラトキシンが産生され、好塩基球、肥満細胞よりヒスタミンなどのケミカルメディエーターが遊離されることより¹⁾、本炎症の成立にそれらがなんらかの役割を果たしているとも考えられている。

ヒスタミンは、histidine decarboxylase によりヒスチジンより合成され、肥満細胞、好塩基球内に大量に貯蔵されている。したがって、遊離されたヒスタミンの炎症に及ぼす反応の強さは、急性炎症反応の早期では、合成系の関与よりは炎症局所における好塩基球、肥満細胞からのヒスタミン分泌量と、局所の分解酵素活性により左右されるものと考えられる⁵⁾。モルモット皮膚における histamine-N-methyltransferase(HMT) 活性は、diamine oxidase(DAO) 活性の約15倍の 1.655 ± 0.173 nmol/min/g wet weight であり、また、正常モルモット皮膚におけるヒスタミン含量は 12.6 ± 2.7 nmol/g wet weight であることより、局所に分泌されたヒスタミンは、HMT により容易に分解されることが考えられる。

すなわち、HMTのヒスタミンに対する K_m 値は 2.0×10^{-5} M であり、また HMT のもうひとつの基質である S-adenosyl-L-methionine (SAM) の今回の反応系における K_m 値は 1.7×10^{-6} M であることより¹⁴⁾、モルモット正常皮膚における SAM 濃度がラット肝臓¹⁵⁾ ($10^{-5} \sim 10^{-6}$ M) と同量もしくは1/10量であれば、ヒスタミン濃度が遊離反応によって炎症局所において十分高

図 2

上: モルモット皮膚アレルギー反応局所のヒスタミン含量およびその分解酵素活性の時間的推移 (mean $\pm$ SE, n=4)

HMT: histamine-N-methyltransferase

DAO: diamine oxidase

下: モルモット皮膚アレルギー反応局所への浸潤細胞の時間的変動 (mean $\pm$ SE, n=4)

mono: 単核球, neutro: 好中球, eosino: 好酸球

mast: 肥満細胞, baso: 好塩基球

くなっていると仮定すると、HMT は十分にヒスタミンを分解しようと思われ、*in vitro* 同様 *in vivo* でもやはり HMT がヒスタミン分解の主要経路と思われる。

筆者らは、いままでに、Ⅲ型反応の関与が示唆されるヒトの紅斑症紅斑病変部において、ヒスタミン分解酵素活性がいちじるしく低下しているのに対し、その他の炎症性疾患(乾癬、湿疹など)の病変部では、このような変化のみられないことを明らかにしてきた⁶⁾。さらに、モルモット皮膚に作製したアレルギー反応においても、同様の酵素活性低下が観察されたのに対し、Ⅲ型反応の対照として検討したⅣ型反応の DNCB アレルギー性接触皮膚炎、一時刺激反応のクロトン油皮膚炎の病変部皮膚、またアレルギー反応を作製した動物の健常部皮膚においては、正常対照と変化のないことも報告してきた⁶⁾。

今回は、モルモット皮膚のアレルギー反応部におけるヒスタミン含量と、その分解酵素活性の時間的推移を検索し、さらには、皮膚局所の浸潤細胞の変動との比較検討を試みた。ヒスタミン含量の推移は、2時間後に惹起前の15%と減少し、以後漸増するU字型の変動を示し、過

去の Inderbitzin の報告¹⁶⁾とよく似た経過を示した。しかし、このような二相性の推移について、彼は惹起後12～24時間にみられたヒスタミン含量の増加を、局所への炎症性細胞浸潤や循環血漿からのヒスタミンの供給によって説明するには無理があるとしている。

また、今回筆者らが試みた炎症局所への浸潤細胞の種類の詳細な検討でも、ヒスタミンを多量に含有すると考えられる肥満細胞、好塩基球の浸潤はみられなかった。しかし、ヒスタミン分解酵素(HMT・DAO)の活性低下を考慮すれば、この説明は比較的容易なように思われる。

すなわち、惹起直後においては、局所の肥満細胞より放出されたヒスタミンは、なお高い活性を有する酵素によって分解されること、あるいは局所の血管透過性が亢進していることより、組織液の流れとともに局所外に除去されることによって、ヒスタミン含量は一過性に減少するものと思われ、したがってこの減少量は、炎症局所におけるヒスタミンの遊離量を反映しているものと解釈できる。一方、惹起後2時間後以降では、炎症局所への多核球の浸潤、分解酵素活性の障害が起こり、また血管を中心とした炎症の修復機構によって、組織液流による処理効果が働かないことも考えられ、さらには局所におけるヒスタミンの合成によりヒスタミン含量は徐々に増加しはじめ、全体としては二相性の推移を示すのであろう。

それでは、なぜⅢ型反応においてのみヒスタミン分解酵素活性の障害がみられるのであろうか。まず、循環血漿の関与、すなわち反応局所の浮腫性変化により、湿重量(wet weight)の増加が計算上の酵素の活性低下を引き起こしている可能性が考えられる。事実、モルモット血清、白血球、赤血球のヒスタミン分解酵素活性は低く(表2)、局所の浮腫が強くなりければ、計算上の同酵素活性は低くなりうる。しかし、反応局所の浮腫性変化はアルサス反応に特有なものではなく、他の酵素活性低下を示さない炎症反応(DNCB アレルギー性接触皮膚炎、クロトン油皮膚炎)にも認められる。また、局所の浮腫は血管透過性亢進のみられる惹起後早期より起こっているであろうが、酵素活性の低下は今回示したように、時間依存性に減少している。さらに、HMT と DAO 活性の変化は同様でなく、DAO 活性は反応早期にむしろ高くなっていることより、酵素活性の低下を局所への細胞浸潤や、循環血漿の関与のみによって説明することはむりがあると思わざるをえない。

現時点では、このような酵素活性の変化がⅢ型反応の原因となりうるものか、たんなる結果であるかは不明であるが、ヒスタミン分解酵素活性の低下が、ヒト、マウス、モルモットのⅢ型反応皮膚に共通してみられたことより、同反応に共通な現象であり、さらには、炎症局所

表2 モルモット血清、白血球、赤血球におけるヒスタミン分解酵素活性

	HMT 活性	DAO 活性
血 清	0.0037 nmol/min/ ml	0.0379 nmol/min/ ml
白血球	5.98 nmol/min/g protein	<0.2 nmol/min/g protein
赤血球	<0.01 nmol/min/g protein	<0.1 nmol/min/g protein

で強力な作用を発揮していると思われるヒスタミンの効果の遷延を引き起こすことが考えられる。ヒスタミンはⅢ型反応において従来から考えられていた以上に大きく関与しているものと想像されるが、このような酵素活性の変動が生じる機序については、今後の検討を待たねばならない。また、種々薬剤(抗ヒスタミン剤、抗炎症剤など)処置により、皮膚局所にどのような変化がみられるか興味ある問題であり、さらに検索を進めたいと考えている。

本成果の一部は、財団法人清水免疫学振興財団の助成による。

文 献

- 1) Grant, J.A., Dupree, E., Goldman, A.S.: Complement-mediated release of histamine from human leukocytes. *J. Immunol.* 114: 1101-1106, 1975.
- 2) Blackham, A., Radziwonik, H., Shaw, I.H.: The Arthus reaction in guinea-pig knee joints, a test for anti-inflammatory drugs. *Agents Actions* 5: 519-527, 1975.
- 3) Carter, G.W., Martin, M.K., Krause, R.A., Young, P.R.: The effects of anti-inflammatory and other agents on the rat dermal Arthus reaction. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* 35: 189-207, 1982.
- 4) Croxatto, O.C.: The failure of histamine to reproduce the Arthus phenomenon. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 90: 439-450, 1952.
- 5) Yamamoto, S., Francis, D., Greaves, M.W.: Enzymic histamine catabolism in skin and its possible clinical significance: a review. *Clin. Exp. Dermatol.* 2: 389-393, 1977.
- 6) Imamura, S., Tachibana, T., Taniguchi, S.: Impaired histamine metabolism in human erythematous dermatoses. *J. Dermatol.* 12: 308-312, 1985.
- 7) Tachibana, T., Furukawa, F., Taniguchi, S., Hamashima, Y., Imamura, S.: Histamine metabolism in skin of MRL/l mice. *Arch. Dermatol. Res.* 278: 57-60, 1985.
- 8) Imamura, S., Tachibana, T., Taniguchi, S.: Impaired histamine metabolism in the Arthus

reaction induced in guinea pig skin. Arch. Dermatol. Res. 277: 313-317, 1985.

- 9) Turk, J.L., Polak, L.: Action of anti-lymphatic serum on reaction caused by immune-complex formation. Lancet 1: 130-131, 1969.
- 10) Shaff, R.E., Beaven M.A.: Increased sensitivity of the enzymatic isotopic assay of histamine: measurement of histamine in plasma and serum. Anal. Biochem. 94: 425-430, 1979.
- 11) Axelrod, J.: Histamine-N-methyltransferase (pig liver). Methods Enzymol. 17 B: 766-769, 1971.
- 12) Snyder, S., Hendley, E.D.: Sensitive fluorometric and radiometric assays for monoamine oxidase and diamine oxidase. Methods Enzymol. 17B: 741-746, 1971.
- 13) Dvorak, H.F., Mihm, M.C., Dvorak, A.M., Johnson, R.A., Manseau, E.J., Morgan, E., Colvin, R.B.: Morphology of delayed type hypersensitivity reactions in man I. Quantitative description of the inflammatory response. Lab. Invest. 31: 111-130, 1974.
- 14) Tachibana, T., Taniguchi, S., Fujiwara, M., Imamura, S.: Regulation of the activity of histamine-N-methyltransferase from guinea pig skin by biogenic amines. Exp. Mol. Pathol. 45 (in press).
- 15) Salvatore, F., Utili, R., Zappia, V.: Quantitative analysis of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in animal tissues. Anal. Biochem. 41: 16-28, 1971.
- 16) Inderbitzin, T.: The effects of acute and delayed cutaneous allergic reactions on the amount of histamine in the skin. Int. Arch. Allergy 7: 140-148, 1955.