ヒスタミンとその受容体機能に関する研究 (I)

—特異的 IgE 抗体産生におよぼす役割—

色 川 正 貴, 梅 枝 愛 郎

群馬大学医学部第一内科学教室 (主任: 小林節雄教授)

(平成 2 年 8 月 29 日 受付, 2 年 9 月 20 日 採択)

I. は じ め に

ヒスタミンは抗原と IgE 抗体の反応の結果肥満細胞から遊離され, その主作用は H_1 受容体を介する平滑筋収縮, 血管拡張, 知覚神経終末刺激などである。一方, 免疫応答や炎症反応に関わる細胞群にもヒスタミン受容体が存在し, ヒスタミンは主にその H_2 受容体を介して諸反応の調節に関わっていることが近年報告されている。たとえば PHA や ConA 刺激によるリンパ球の活性化の抑制, 遅延型皮膚反応の抑制, MIF などのリンホカインの調整などの作用である^{1,2)}。抗体産生系に関しては, IgG や IgM などの抗体産生に関与するリンパ球もヒスタミン受容体を有するとの報告がある^{3,4)}。しかしヒスタミン自体の遊離に密接に関与する IgE 抗体の産生に対するヒスタミン受容体保有免疫担当細胞の影響について検討した報告は少ない⁵⁾。

今回著者らは, ヒスタミン, およびその受容体拮抗薬, 刺激薬が, マウスの *in vivo* における特異的 IgE 抗体産生にいかなる影響を与えるかについて検討を試み, 若干の興味ある成績を得たので報告する。

II. 材 料

- A) 抗原: 既報⁶⁾に準じて作成したコンニャク舞粉水抽出液の, 90%飽和硫酸沈殿分画 (以下 Ag 90) を使用した。
- B) アジュバント: 水酸化アルミニウム $Al(OH)_3$ ゲル, いわゆる alum を既報⁷⁾に準じて作成し使用した。
- C) 動物: IgE 抗体産生系は雄の BALB/c マウス 7—8 週齢を使用し, 1 群は 9 匹以上とした。Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) の

recipient としては Sprague-Dawley 系の雄ラット, 10—12 週齢を使用した。ともに静岡県実験動物農業協同組合より購入し, 入手後 1 週間以上たってから使用した。

- D) 薬剤: ヒスタミンは Histamine dihydrochloride (第一化学薬品) を, H_1 受容体拮抗薬は Chlorpheniramine maleate (塩野義製薬) を, H_2 受容体拮抗薬は Cimetidine (スミスクライン藤沢) を使用した。また H_1 受容体刺激薬は 2-pyridyl-ethylamine (以下 2-PEA), H_2 受容体刺激薬は Dimaprit を使用した。なおヒスタミン受容体刺激薬は山之内製薬から供与されたものである。

III. 方 法

- A) 抗 Ag 90 特異的 IgE 抗体の産生: 既報⁸⁾に準じて Ag 90 30 μ g を alum 1 mg に吸着させてマウスの腹腔内に投与して免疫した。ヒスタミン受容体拮抗薬は抗原投与の 30 分前に, ヒスタミンやヒスタ

図 1 Time schedule. Ag 90 with or without histamine was administered on day 0. Mice received H_1 and/or H_2 antagonists 30 min before immunization. On day 14, mice were bled for measuring anti-Ag 90 IgE antibody titers.

ミン受容体刺激薬は抗原と同時に腹腔内に投与した(図1)。

ヒスタミンの単独投与の検討では, Histamine dihydrochloride (0.05mg, 0.5mg, 5 mg/kg) を抗原と同時に投与した。H₁あるいはH₂受容体拮抗薬の投与実験では, それぞれ Chlorpheniramine maleate (1 mg, 5 mg, 10mg/kg), Cimetidine (1 mg, 5 mg, 10mg/kg) を投与し, 30分後にヒスタミンと抗原を投与して, IgE 抗体産生におよぼす影響を検討した。一方 H₁, H₂ 受容体刺激薬の検討では, それぞれ 2-PEA (0.01–100mg/kg), Dimaprit (0.005–50mg/kg) を抗原投与時に投与した。又 H₁, H₂ 受容体拮抗薬の併用投与時の検討では, Chlorpheniramine 5 mg/kg, Cimetidine 5 mg/kg を使用した。なおこれら薬剤の投与量, 投与時期は富永の報告⁹⁾を参考とした。

B) 採血: 予備実験⁹⁾で感作2週後には抗 Ag-90 IgE 抗体が検出され, かつそれ以降の週における抗体価の経時的変動が少ないことを確認してあるので, 原則として感作2週後にエーテル麻酔下で大腿動脈より採血し, 血清分離後, 使用直前まで–20°Cに保存した。

C) 抗体価の測定: Mota ら¹⁰⁾の方法に準じて PCA で行った。すなわち剃毛したラットの背部に生理的食塩水で連続2倍希釈した抗血清を0.1ml ずつ皮内注射して受身感作を行い, 感作24時間後に Ag 90 1 mg含有の1% Evans blue 1 ml を静脈注射し, 30分後に局所に生じた blue spot を観察し, 直径5 mm以上を陽性とした。陽性を示した最高希釈倍数の逆数をもって抗体価とし, 4倍希釈陰性の抗体価を2倍とした。なおこれら抗体価の測定は同一検体を2系列測定して行った。

D) 統計処理: 各群間の抗体価の有意差検定は, 2を底とする log PCA 抗体価より各群の対数による平均 (Mean: M) と標準誤差 (Standard Error: SE) を求め, t 検定で行った。結果は () 内に各群の対数による $M \pm SE$ と相乗平均 (geometric mean: GM) を示した。

IV. 結 果

A) ヒスタミン単独投与の IgE 抗体産生におよぼす影響

ヒスタミン (5 mg/kg) を抗原感作時にマウス

図2 Effect of histamine on mouse IgE antibody production. Histamine (5 mg/kg) was administered on day 0. Parenthesis indicates the number of mice.

に投与し, IgE 抗体産生に対する影響を検討したが, 抗原と alum のみを投与した群 (以下対照群) との間には抗体価の有意な差を認めなかった (対照群: 4.87 ± 0.28 ($M \pm SE$), 29.2 (GM), ヒスタミン群: 5.11 ± 0.24 , 34.5, 図2)。またヒスタミンの投与量 (0.05–5 mg/kg) を変えても, 対照群の抗体価との間には有意の差を認めなかった (図3)。

図3 Effect of dose of histamine on mouse IgE antibody production. Parenthesis indicates the number of mice.

以上より本実験系では, 上記のヒスタミンの投与量内 (0.05–5 mg/kg) ではIgE 抗体産生に影響を与えないことがわかった。

以下の実験ではヒスタミンの投与量を5 mg/kgとして行った。

B) ヒスタミンとその受容体拮抗薬および刺激薬の IgE 抗体産生に与える影響

1. H₁ 受容体拮抗薬 (H₁-R 拮抗薬) の影響

H₁-R 拮抗薬 (5 mg/kg) をマウスの腹腔内投与30

図4 Effect of histamine and H₁ antagonist on mouse IgE antibody production. Mice received histamine type 1 receptor antagonist 30min before immunization with histamine. Hista.: histamine. H₁ antag.: histamine type 1 receptor antagonist.

分後、ヒスタミン (5 mg/kg) と抗原を同時に投与した群の抗体価は、対照群に比し有意に低値であった (対照群: 4.52 ± 0.24 , 22.9, ヒスタミン+H₁-R拮抗薬群: 3.37 ± 0.25 , 10.3, $P < 0.005$, 図4)。

ヒスタミンの投与量 (5 mg/kg) は一定とし、H₁-R拮抗薬の量を変えて IgE 抗体産生におよぼす効果を検討したところ、各投与量 (1–10 mg/kg) で抗体産生の有意な抑制がみられたが、1 mg/kgの投与で最も強い抑制が認められた (図5)。

図5 Effect of dose of histamine and H₁ antagonist on mouse IgE antibody production. Hista.: histamine. H₁ antag.: histamine type 1 receptor antagonist.

なお H₁-R 拮抗薬 (5 mg/kg) 投与30分後に抗原のみを投与し、拮抗薬自身の IgE 抗体産生におよぼす影響を検討したが、対照群の抗体価と有意な差は認められなかった (対照群: 4.67 ± 0.65 , 25.5, H₁-R拮抗薬群: 4.38 ± 0.24 , 20.8)。

2. H₁ 受容体刺激薬の影響

抗原投与時に、2-PEA (0.01–100 mg/kg) を投与して H₁ 受容体を刺激してその効果をみたところ、100 mg/kg 投与群で対照群に比して有意な IgE 抗体産生の増強が認められた (対照群: 4.00 ± 0.55 , 16.0, 2-PEA 100 mg/kg 群: 5.11 ± 0.26 , 34.6, $P < 0.05$, 図6)。

図6 Effect of H₁ agonist (2-pyridylethylamine) on mouse IgE antibody production. Parenthesis indicates the number of mice.

3. H₂ 受容体拮抗薬 (H₂-R 拮抗薬) の影響

ヒスタミンの投与量 (5 mg/kg) を一定にして H₂-R 拮抗薬の量 (1–10 mg/kg) を変えて抗体産生に与える効果について検討したところ、投与量が 1 mg/kg と 5 mg/kg の群において対照群に比し抗体産生量の有意な増加がみられ、1 mg/kg 投与群でより高い抗体価が認められた (対照群: 4.60 ± 0.72 , 24.3, ヒスタミン+H₂-R 拮抗薬 (1 mg/kg) 群: 6.45 ± 0.25 , 87.4, $P < 0.025$, ヒスタミン+H₂-R 拮抗薬

図7 Effect of histamine and H₂ antagonist on mouse IgE antibody production. Hista.: histamine. H₂ antag.: histamine type 2 receptor antagonist.

(5 mg/kg) 群: 6.30 ± 0.26 , 78.8, $P < 0.025$, 図 7). なお, H_2 -R 拮抗薬 (5 mg/kg) 投与30分後に抗原のみを投与し H_2 -R 拮抗薬自身の影響を検討したが, 対照群の抗体価との間には差を認めなかった (対照群: 4.59 ± 0.46 , 24.1, H_2 -R 拮抗薬群: 4.94 ± 0.44 , 30.7).

4. H_2 受容体刺激薬の影響

抗原投与時に, Dimaprit (0.005–50mg/kg) を投与したところ, 5, 50mg/kg投与群で対照群に比して有意な IgE 抗体産生の低下が認められた (対照群: 4.89 ± 0.39 , 29.6, Dimaprit 5 mg/kg群: 3.00 ± 0.42 , 8.0, $P < 0.005$, 50mg/kg群: 4.00 ± 0.24 , 16.0, $P < 0.05$, 図 8).

図 8 Effect of H_2 agonist (dimaprit) on mouse IgE antibody production. Parenthesis indicates the number of mice.

5. H_1 , H_2 受容体拮抗薬併用の影響

H_1 , H_2 -R 拮抗薬をそれぞれ 5 mg/kg前投与し, 30分後に抗原のみで感作した群とヒスタミン (5

Hista.	Antagonist		Reciprocal PCA titers				
	H_1	H_2	2	4	8	16	32
0	0	0	(15)				
5	5	5	(13)				
0	5	5	(13)				
	(mg/kg)						

図 9 Effect of histamine and H_1 , H_2 antagonists on mouse IgE antibody production. Hista.: histamine. H_1 : histamine type 1 receptor, H_2 : histamine type 2 receptor.

mg/kg) を抗原と同時に投与した群, さらに対照群との 3 群間の抗体価の差を検定したが, 各群間には有意な抗体産生の差は見い出せなかった (対照群: 4.67 ± 0.65 , 25.5, ヒスタミン+ H_1 , H_2 -R 拮抗薬併用群: 4.38 ± 0.59 , 20.8, H_1 , H_2 -R 拮抗薬併用群: 3.77 ± 0.39 , 13.6, 図 9).

V. 考 察

ヒスタミンの投与やヒスタミン受容体保有細胞が液性免疫に及ぼす影響について検討した報告は, 主に IgG, IgM, IgA 抗体に関するものであり^{3,4)}, IgE 抗体に関する報告は少ない⁵⁾. しかし IgE 抗体も他の免疫グロブリンと同様に, 免疫担当リンパ球の相互作用によって調節されていることは当然予測され得ることである.

今回の研究では, ヒスタミン受容体細胞が IgE 抗体産生系に対しいかなる作用を及ぼすのか, マウスを使用した実験系で検討した.

さて, 結果としては, ヒスタミンの単独投与では IgE 抗体産生に影響を与えないが, H_1 -R 拮抗薬投与後にヒスタミンを投与した場合, および H_2 -R 刺激薬を投与した場合に, 抗体産生の有意な抑制がみられた. 一方, H_2 -R 拮抗薬投与後にヒスタミンを投与した場合, および H_1 -R 刺激薬を投与した場合には, IgE 抗体産生の有意な増強が認められた. また, H_1 , H_2 -R 拮抗薬を併用投与後にヒスタミンを投与した場合には IgE 抗体産生には影響がみられなかった.

Baker ら⁵⁾は, DNP-OA (dinitrophenyl-ovalbumin) を抗原とする IgE 抗体産生系において, H_1 -R 刺激薬 (2-methylhistamine) や H_2 -R 拮抗薬 (metiamide) の単独投与で IgE 抗体産生が有意に増強され, H_2 -R 刺激薬 (4-methylhistamine) や H_1 -R 拮抗薬 (pyrilamine) の単独投与では有意に抑制されると報告しており, 薬剤の投与方法, 量など多少異なるものの, 今回の著者らの成績はこれとほぼ一致した成績であった.

本実験ではヒスタミンの単独投与では対照群の抗体価と差が認められなかった. Baker ら⁵⁾は 1–20 mg/kg のヒスタミンの連続投与では対照に比し IgE 抗体産生は増強される傾向にはあるが変動が多く有意な差ではないとしており, 我々の成績とほぼ合致するものであった.

次に H_1 -R 拮抗薬を前投与し, 30分後の免疫時にヒスタミンを投与すると対照群に比して完全ではな

いがある有意な IgE 抗体産生の抑制がみられた。この抑制は H_1 , H_2 -R 拮抗薬の併用で解除されること、および dimaprit の投与では対照群に比し、有意な IgE 抗体産生の低下がみられたことから、IgE 抗体産生細胞の H_2 受容体を刺激すると IgE 抗体産生の抑制がおこることが示唆され、前述の Baker らの報告と一致するものであった。In vitro の系では、Shearer ら³⁾はマウスの実験系で IgG, IgM 抗体産生がヒスタミン受容体をもつ細胞群によって制御される可能性を示唆している。Segal ら⁴⁾もマウスで羊赤血球に対しトレランスを誘導した実験で、このトレランスはヒスタミンカラムに吸着される細胞群の除去により解除され、この細胞群が T リンパ球で抗 θ 抗体と補体との処理で抑制能は完全に失活したと報告している。Mozes ら¹¹⁾もマウス脾細胞を用いた系で、 H_1 -R 拮抗薬添加による抗体産生の抑制を報告した。

さらに Rocklin ら^{1,12)}は、HSF (histamine-induced suppressor factor) がリンパ球培養時にヒスタミンを加える結果産生されること、この HSF がリンパ球芽球化反応やリンホカインの産生の抑制のみならず、抗体産生抑制能のあることを示し、また HSF が H_2 受容体を有するリンパ球で産生されることを報告している。これらの in vitro の事実は、今回の我々の H_2 受容体を刺激すると IgE 抗体産生の抑制がみられたという成績を側面から支持する成績と考えられる。

次に細胞の H_1 受容体刺激効果であるが、 H_2 -R 拮抗薬投与後にヒスタミンを投与すると、拮抗薬の投与量が 1~5 mg/kg の場合に、対照群に比し抗体価の有意な増加が観察された。また 2-pyridylethylamine (H_1 -R 刺激薬) 100mg/kg 投与した群でも有意な IgE 抗体の産生増強が認められた。これらの結果は、IgE 抗体産生系において H_1 受容体を刺激すると、抗体産生の増強がおこることを示唆している。

なお H_1 , H_2 -R 拮抗薬の併用投与後にヒスタミンを投与した場合には、その抗体価は対照群との間に差を認めなかった。これは両受容体がブロックされたため、受容体が刺激され得なかったためと思われる。

これらの事実は、マウスにはヒスタミン受容体を有する免疫細胞が存在し、IgE 抗体産生はその誘導期においては H_1 受容体刺激により抗体産生が増強され、 H_2 受容体の刺激により抑制されることを示

すものと考えられる。ただし、今回の実験系は in vivo であるため、いかなる種類の細胞が上記の役割を担っているかは不明であり、又 IgE 抗体産生系でも誘導期以外の on going の状況下ではいかなる影響を受けるのか、など解決すべき点が残されている。

今回の我々の検討では、直線的な量反応関係が認められず、多くの免疫反応と似て、最大反応を示す適量が存在しているようにみえるが、完全には明らかになしえなかった。この理由として 1) 本実験系が in vivo であったこと 2) 今回使用した H_1 , H_2 -R 拮抗薬、刺激薬が薬理学的に完全に選択性を持たず、高濃度では互いに他の受容体にも作用したことなどが想定される。

いずれにしても以上の結果から、ヒスタミン受容体を保有する免疫細胞はある抗原に対する特異的 IgE 抗体産生を調節しており、その細胞表面に存在する H_2 受容体に対する選択的刺激によりその抗体産生が抑制され、一方 H_1 受容体が刺激された場合には抗体産生が増強されるものと推定された。すなわち、ヒスタミンはそれ自身の遊離に密接に関係する IgE 抗体産生を調節している可能性が想定される。

V. 小 括

免疫時に投与したヒスタミンおよびその H_1 , H_2 受容体拮抗薬と刺激薬が、マウスの in vivo における特異的 IgE 抗体産生にいかなる作用を及ぼすのかを検討し、以下の成績を得た。

1. ヒスタミンの単独投与では、IgE 産生に影響を与えなかった。
2. H_1 拮抗薬前投与+ヒスタミン投与時および H_2 刺激薬の単独投与時に、IgE 産生の抑制を認めた。
3. 一方 H_2 拮抗薬前投与+ヒスタミン投与時および H_1 刺激薬の単独投与時では、IgE 産生の増強効果を認めた。
4. H_1 , H_2 拮抗薬の併用前投与+ヒスタミン投与の条件下では、明らかな作用を認めなかった。

以上の結果より、マウスの IgE 抗体産生系において、 H_1 受容体刺激は促進的に、一方 H_2 受容体刺激は抑制的に働き、ヒスタミンが IgE 抗体産生において何らかの regulation を果たしている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Rocklin, R.E.: Histamine-induced suppressor factor (HSF); effect on migration inhibitory factor (MIF) production and proliferation. *J. Immunol.*, 118: 1734-1738, 1977.
- 2) 古澤修一, 野口義圀: ヒスタミン・レセプター陽性細胞による免疫統御. *アレルギー*, 34: 52-61, 1985.
- 3) Shearer, G.M., Melmon, K.L., Weinstein, Y. and Sela, M.: Regulation of antibody response by cells expressing histamine receptors. *J. Exp. Med.*, 136: 1302-1307, 1972.
- 4) Segal, S., Melmon, K.L. and Weinstein, Y.: Isolation of suppressor T-lymphocytes adherent to histamine conjugated albumin and their role in suppression of IgG response to SRBC. *Cell. Immunol.*, 59: 171-181, 1981.
- 5) Baker, A.P., Chakrin, L.W., Holden, D.A., Smith, W.J. and Sung, C.P.: Effect of histamine agonists and antagonists on the production of murine reagenic antibodies. *Int. J. Immunopharmacol.*, 3: 349-356, 1981.
- 6) 金子由之助: こんなやく喘息の起因抗原に関する研究. *アレルギー*, 15: 819-830, 1966.
- 7) Levine, B.B. and Vaz, N.M.: Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. *Int. Arch. Allergy*, 39: 156-171, 1970.
- 8) 梅枝愛郎, 中沢次夫, 松井 茂, 小林節雄: ヒスタミンおよびその受容体拮抗剤のマウス IgE 産生に及ぼす影響. *医学のあゆみ*, 132: 133-134, 1985.
- 9) 富永憲治: 遅延型過敏反応の effector phase でのヒスタミンによる制御. *アレルギー*, 29: 1008-1016, 1980.
- 10) Mota, I. and Wong, D.: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.*, 8: 813-820, 1969.
- 11) Mozes, E., Weinstein, Y., Bourne, H.R., Melmon, K.L. and Shearer, G.M.: In vitro correction of antigen induced immune suppression; effects of histamine, dibutyryl cyclic AMP and cholera enterotoxin. *Cell. Immunol.*, 11: 57-63, 1974.
- 12) Garovoy, M.R., Reddish, M.A. and Rocklin, R.E.: Histamine-induced suppressor factor (HSF); inhibition of helper T cell generation and function. *J. Immunol.*, 130: 357-361, 1983.

EFFECTS OF HISTAMINE AND ITS RECEPTOR ANTAGONISTS AND AGONISTS ON IgE ANTIBODY PRODUCTION IN MICE

MASATAKA IROKAWA, YOSHIO UMEGAE

First Department of Internal Medicine,
Gunma University School of Medicine, Maebashi 371, Japan
(Director : Prof. Setsuo Kobayashi)

This study was undertaken to investigate the effects of histamine and its receptor antagonists and agonists on IgE antibody production in mice.

BALB/c mice were immunized intraperitoneally with lmg alum plus 30 μ g of Ag90, an antigen prepared from the water soluble fraction of "Konnyaku Maiko" precipitated by 90% saturated ammonium sulfate. Histamine receptor antagonists were administered before immunization and histamine at sensitization; histamine receptor agonists were administered at sensitization. The mice were bled 14 days after immunization and anti-Ag 90 IgE antibody titers were measured by passive cutaneous anaphylaxis reaction in Sprague-Dawley rats.

The titers were expressed as a reciprocal of the highest dilution that yielded a positive reaction.

Treatment with histamine did not affect the level of specific IgE antibody. Prior administration of the H₁ antagonist to histamine suppressed IgE production significantly; H₂ agonist also suppressed it. In contrast, pretreatment with H₂ antagonist or administration of H₁ agonist augmented IgE antibody production. Treatment with H₁+H₂ antagonists prior to histamine had no effect on antibody production.

These results suggested that histamine, in the induction phase, suppressed specific IgE antibody production via the H₂ receptor and enhanced it through the H₁ receptor.

Key words : Histamine, H₁,H₂ receptor, IgE antibody, Immune regulation