Compound 48/80 によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する
2,4-Bis(2-hydroxybenzamido)benzoic Acid (AB-23) の阻害作用

大杉義征, 東平靖雄, 松野 隆, 高垣善男

中外製薬株式会社 総合研究所¹⁾

Inhibitory Effect of 2,4-Bis(2-hydroxybenzamido)benzoic Acid on Compound
48/80-induced Histamine Release from Rat Peritoneal Mast Cells

YOSHIYUKI OHSUGI, YASUO TOHIRA, TAKASHI MATSUNO, and YOSHIO TAKAGAKI

Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.¹⁾

(Received March 19, 1976)

Based on the report that 2,4-bis(2-acetoxybenzamido)benzoic acid (AB-50) gives an anti-allergic effect, which was attributed to its membrane-stabilizing effect resulting in the inhibition of antigen-induced histamine release from the mast cells, interaction of 2,4-bis(2-hydroxybenzamido)benzoic acid (AB-23), an active form of AB-50 in the body, with rat peritoneal mast cells was examined. Histamine release from the peritoneal cells induced by compound 48/80 was compared in the cells pretreated with AB-23 and those with a buffer solution alone, and less degree of histamine release was observed for AB-23-treated cells. Extent of the inhibition by AB-23 pretreatment depended on its concentration and also on the time and temperature of treatment. When the cells were incubated at 37° in the presence of AB-23 or ¹⁴C-AB-23, the inhibitory effect and the amount of radioactivity in the cells increased with the incubation time. On the other hand, when treated at 0°, the cells showed no inhibitory effect of the chemical and poor incorporation of ¹⁴C-AB-23. The inhibition of histamine release by AB-23 pretreatment was easily recovered, and responsiveness of the cells to compound 48/80 was restored by standing AB-23-pretreated cells at 37° but not by standing at 0°. Residual radioactivity within the cells pretreated with ¹⁴C-AB-23 progressively decreased while standing at 37°, whereas the radioactivity remained constant at 0°. These results indicated that AB-23 was incorporated into the cytoplasm and/or membrane of mast cells at 37°, but not at 0°, to inhibit the histamine release induced by compound 48/80.

著者らが合成した 2,4-bis(2-acetoxybenzamido)benzoic acid (AB-50) は、細胞膜安定化作用を有する抗アレルギー性の物質である。²⁾ 本化合物は、ラットのレアギン様抗体を用いた homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) ばかりではなく、家兎の IgG 様抗体を用いたモルモット PCA に対しても顕著な阻害作用を示し、しかも経口投与でも効果を発揮する。^{2b,c)} しかし、ヒスタミン、セロトニンあるいはブラジキニンのような化学伝達物質に対する直接的拮抗作用や抗炎症作用は有していない。^{2d)} 一方、AB-50 は生体内で容易に脱アセチル化され、2,4-bis(2-hydroxybenzamido)benzoic acid (AB-23) に変換することが知られているが、この AB-23 は試験管内において IgE-anti-IgE complex により引き起こされる肥満細胞の脱顆粒現象、およびラットの homocytotropic antibody と対応抗原との相互反応により誘起される肥満細胞からのヒスタミン遊離、さらにはヒスタミン遊離剤である compound 48/80 やデキストランによる同細胞からのヒスタミン遊離に対して阻害作用を示すことが知られている。^{2d)} 現在、本物質について作用機構の解明を試みているが、今回は compound 48/80 によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離現象を実験系として用いて、AB-23 と腹腔細胞との相互作用を検討したので、その結果を報告する。

1) Location: Takada, Toshima-ku, Tokyo.

2) a) 森 陸司, 大杉義征, 古野浩二, 高久 栄, 松野 隆, 小山憲次郎, 鈴木成生, 新藤 実, 高垣善男, 薬誌, 95, 1477 (1975); b) 大杉義征, 高久 栄, 森 陸司, 松野 隆, 新藤 実, 高垣善男, 薬誌, 96, 165 (1976); c) 松野 隆, 大杉義征, 森 陸司, 高久 栄, 新藤 実, 高垣善男, アレルギー, 25, 577 (1976); d) 大杉義征, 松野 隆, 森 陸司, 高久 栄, 新藤 実, 高垣善男, アレルギー, 25, 532 (1976).

実験の部

1. AB-23 および ^{14}C -AB-23 (2 個のアミド基の炭素原子が ^{14}C ; 比放射能 726500 dpm/ μmole) は当研究所において合成したもので, compound 48/80 は Wellcome 社から購入した. 使用動物は当研究所において繁殖, 飼育したウィスター今道系雄性ラットで体重が 200—350 g のものを実験に供した.

2. 腹腔細胞浮遊液の調整 Uvnäs らの方法³⁾ に準じて行なった. すなわち, ラットを断頭, シャ血後, 約 7 ml の生理食塩液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヘパリンを含む) を腹腔内注射し, 2 分間軽くマッサージしてから開腹し, 腹腔液を採取した. 1000 rpm で 5 分間遠心分離して集めた細胞に Tris-CM 緩衝液 (25 mM Tris buffer, pH 7.4, NaCl 120 mM, KCl 15 mM, CaCl_2 0.6 mM, MgCl_2 1 mM) を加えて再浮遊し, 1 ml 中に約 3×10^4 個の肥胖細胞が含まれるように調整した.

3. Compound 48/80 による腹腔細胞からのヒスタミン遊離 細胞浮遊液 0.6 ml に AB-23 溶液, あるいは対照としての緩衝液 0.4 ml を加えて 0° および 37° で一定時間処理した後, 1500 rpm, 5 分間遠心分離して上澄を捨てた. 細胞を 5 ml の Tris-CM で 2—3 回よく洗浄し, 最終的に 0.9 ml の Tris-CM に再浮遊した. それに 0.1 ml の compound 48/80 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して 37° で 15 分間反応させてから, 2000 rpm, 5 分間遠心分離し, 上清および細胞残渣中のヒスタミン量を May らの蛍光法⁴⁾ に従って測定した.

4. ^{14}C -AB-23 の細胞への取り込み実験 細胞浮遊液 0.6 ml に ^{14}C -AB-23 溶液 ($1 \times 10^{-5}\text{M}$: 727000 dpm/ml) 0.4 ml を添加してから, 上述の方法と同じように細胞を処理, 洗浄後, 最終的に遠心分離して集めた細胞に Triton X-100 を 1 滴と 1 ml の水を加えて攪拌し, 一夜放置後, 10 ml のトルエンシンチレーター (トルエン 1 liter 中に polyphenylene oxide (PPO) 7 g, dimethyl 1,4-bis-2(5-phenyloxazolyl)benzene (POPOP) 90 mg を含む) 中に加えて, 液体シンチレーションカウンター (Nuclear Chicago Mark I 型) を用いて放射能を測定した.

5. 細胞中に取り込まれた ^{14}C -AB-23 の反応液中への遊離 細胞浮遊液 0.6 ml に ^{14}C -AB-23 溶液 0.4 ml を加えて, 37° , 30 分間処理し, 細胞を緩衝液で 2 回洗浄後, 1 ml の緩衝液に浮遊した. 0° あるいは 37° で一定時間放置後, 2000 rpm 5 分間遠心分離し, 上清はそのまま, 残渣は上述のごとく処理して, シンチレーター中に添加して放射能を測定し, 残渣および上清中の放射能の和に対する残渣中の放射能の割合 (%) を求めた.

結果

細胞浮遊液に緩衝液を添加して 37° で 2 時間保温後, 遠心分離して細胞を集め, さらに緩衝液で 3 回よく洗浄してから, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の compound 48/80 を添加した場合 (対照群), 66.9% のヒスタミンが細胞外に遊離した. $1 \times 10^{-5}\text{M}$ の AB-23 を添加して同様に処理した細胞からは対照群と同程度 (66.2%) のヒスタミンが遊離したが, 1×10^{-4} , および $4 \times 10^{-4}\text{M}$ の AB-23 で処理した細胞からのヒスタミン遊離率は, それぞれ 53.9%, 5.9% であり, AB-23 の前処理によりヒスタミン遊離が阻害された (Table I).

TABLE I. Compound 48/80-induced Histamine Release from Rat Peritoneal Cells Pretreated with AB-23

Drug concentration (M)	Histamine release (%) ^{a)}	Inhibition (%)
0	66.9 $\pm$ 3.1	
1×10^{-5}	66.2 $\pm$ 2.4	1.0
1×10^{-4}	53.9 $\pm$ 2.1	19.4
4×10^{-4}	5.9 $\pm$ 0.9	91.2

AB-23 was added to the rat peritoneal cell suspension. After incubation for 2 hr at 37° , cells were harvested by centrifugation, washed 3 times, and resuspended with the buffer solution. After there 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of compound 48/80 was added.

a) mean $\pm$ S. D.

$4 \times 10^{-4}\text{M}$ の AB-23 を添加して, 37° で 30—120 分間前処理をすることによるヒスタミン遊離について同様に検討したが, Table II に示した如く, 30 分間の処理でも顕著に阻害された. なお, 反応終了後遠心分離して得られた上清および細胞残渣中のヒスタミン量を合計して算出した全ヒスタミン量については, 対照群と AB-23 処理群でまったく差がなかった.

3) B. Uvnäs, I.L. Thon, *Exptl. Cell Res.*, **18**, 512 (1959).

4) C.D. May, M. Lynan, R. Alberto, J. Cheng, *J. Allergy*, **46**, 12 (1970).

TABLE II. Compound 48/80-induced Histamine Release from Rat Peritoneal Cells Pretreated with AB-23

	Treatment (min)	Histamin release (%) ^{a)}	Inhibition (%)	Total histamine (μg/tube) ^{a)}
Control	30	76 ± 4.4		4.4 ± 0.17
	60	77 ± 3.0		4.1 ± 0.35
	120	75 ± 3.5		4.2 ± 0.10
AB-23 $4 \times 10^{-4} M$	30	25 ± 4.4	67	4.3 ± 0.17
	60	14 ± 1.2	82	4.3 ± 0.17
	120	14 ± 1.7	81	4.0 ± 0.20

AB-23 was added to the peritoneal cell suspension. After incubation at 37° for varying time indicated in the table, the cells were treated as described in legend to Table I.

^{a)} mean ± S. D.

次に AB-23 前処理の処理温度および処理時間について詳細に検討した。結果は Fig. 1 に示したが、 $4 \times 10^{-4} M$ の AB-23 を細胞浮遊液に添加して 37° で処理した場合には、すでに 5 分間の処理で明らかな阻害効果が認められ、処理時間の延長に伴って効果が強く表われて、60 分間処理によりヒスタミン遊離はほとんど完全に阻害された。一方、同濃度の AB-23 を添加して 0° で処理した場合には 120 分間でもほとんど阻害されなかった。

そこで、¹⁴C でラベルした AB-23 を用いて前処理の条件によって細胞に取り込まれる ¹⁴C-AB-23 量がどのように変動するかについて検討を加えた。すなわち、 $4 \times 10^{-4} M$ の ¹⁴C-AB-23 を細胞浮遊液に加えて 0° および 37° で一定時間細胞を処理し、2—3 回洗浄後細胞中に検出される放射能を測定した。結果を Fig. 2 に示したが、細胞中の放射活性は、処理後 5 分では 0° と 37° の場合で同程度であったが、処理時間が長くなるにつれて 37° で細胞処理した方が、0° の場合に比べて多く検出された。

Fig. 1. Influence of Incubation Time and Temperature on the Inhibition of Compound 48/80-induced Histamine Release by AB-23 Pretreatment

Cell suspension was pretreated with AB-23 ($4 \times 10^{-4} M$) for 5 to 120 min at 0° (●), or 37° (▲).

^{a)} mean ± S. D.

Fig. 2. Incorporation of ¹⁴C-AB-23 into the Peritoneal Cells: Influence of Incubation Time and Temperature

¹⁴C-AB-23 ($4 \times 10^{-4} M$) was added to cell suspension. Mixture was incubated for 5 to 120 min at 0° (○, ●), or 37° (△, ▲). Cells were harvested by centrifugation and washed with buffer 2 (solid line), or 3 (dotted line) times. Radioactivity within the cells was counted.

^{a)} mean of duplicate experiment

Fig. 3. Restoration of the Responsiveness to Compound 48/80 by Standing of the Cell Suspension Pretreated with AB-23

Cells were treated with 4×10^{-4} M AB-23 for 5 (dotted line), or 30 (solid line) min at 37°, washed 3 times and resuspended with the buffer. After standing at 37° (Δ, ▲), or 0° (○, ●) for 5 to 60 min, 1 μg/ml of compound 48/80 was added.

a) mean ± S.D.

Fig. 4. Influence of Standing Time and Temperature on Extracellular Release of Radioactivity-Incorporated into Peritoneal Cells by ^{14}C -AB-23 Pretreatment

Cells were treated with 4×10^{-4} M ^{14}C -AB-23 for 30 min at 37°, washed 3 times and resuspended with the buffer. After standing at 37° (▲), or 0° (●) for 5 to 60 min, cell suspension was centrifuged. Radioactivity in supernatant and cell residue was counted.

a) mean ± S. D.

b) R: cpm in cell residue; T: total cpm = R + cpm in supernatant

Fig. 3 には 4×10^{-4} M の AB-23 で前処理した細胞の compound 48/80 に対する反応性が、処理細胞を 0° および 37° で一定時間放置することによりどのような影響を受けるかについて検討した結果を示した。37° で 5 分間前処理することにより、ヒスタミン遊離は約 43% 阻害された。この処理細胞を 0° で放置すると 60 分後までにわずかに阻害率が低下しただけであった。これに対して処理細胞を 37° で放置すると 30 分後にはもはや阻害作用はまったく認められず、compound 48/80 に対する細胞の反応が完全に回復した。また、37° で 30 分間前処理された細胞の場合も同様に 37° で放置することによって回復現象が認められたが、5 分間前処理細胞に比べると完全に元には回復しなかったし、また 0° で放置しても阻害率はまったく低下しなかった。

このような回復現象と前処理により細胞に取り込まれた AB-23 量との間の関連性について検討を加えた。Fig. 4 に示したように、細胞浮遊液に 4×10^{-4} M の ^{14}C -AB-23 を添加して 37° で 30 分間処理し、細胞を緩衝液で 2 回洗浄後、1 ml の緩衝液に浮遊した。浮遊直後に遠心分離した (standing time=0) 細胞中には 30% の放射能が認められた。処理細胞浮遊液を 0° で 60 分間処理しても細胞中の放射活性はまったく変動しなかったが、これに対して 37° で放置した場合には、すでに 5 分後には放射活性の細胞外への移行が認められ、30 分後には約 60% が細胞外に遊出した。

考 察

試験管内において、compound 48/80 によるラット腹腔脂肪細胞からのヒスタミン遊離に対して、AB-23 が顕著な抑制作用を有することは既に明らかとされているが、^{2d)} 今回の実験では、AB-23 を添加して 37° で一定時間前処理された腹腔細胞をよく洗浄してから、compound 48/80 を添加した場合でも、細胞外へのヒスタミン遊離が阻害されることが明らかにされた。AB-23 で細胞を前処理しても、その全ヒスタミン量 (上清および細胞残渣

中のヒスタミン量の和)は対照と差がなく、前処理により反応液中に細胞中のヒスタミンが一部遊出するということはないと考えられる。また前処理によりヒスタミン遊離能が低下した細胞は、後述するように容易にヒスタミン遊離能を回復することから、AB-23には細胞を死滅させるような作用はないと考えてよからう。

Compound 48/80 による腹腔細胞からのヒスタミン遊離に対する AB-23 前処理の効果は、薬物濃度、処理温度および処理時間に依存し、細胞に AB-23 を加えて 37° で前処理した場合、処理時間の延長に伴い阻害作用は強くあらわれた。これに対応して ^{14}C -AB-23 の細胞への取り込み量が処理時間とともに増加した。また細胞内に取り込まれた ^{14}C -AB-23 は、処理細胞を 37° で放置することにより処理時間の経過と共に比較的速やかに反応液中に遊出し、これとほぼ同じ時間経過をとって細胞のヒスタミン遊離能が回復した。一方、処理細胞を 0° で放置した場合には ^{14}C -AB-23 の細胞外への遊出現象はほとんど観察されず、この場合にはヒスタミン遊離能も回復しなかった。これらの実験結果から、compound 48/80 による細胞外へのヒスタミン遊離現象に対する AB-23 前処理の阻害作用は、前処理によって細胞に取り込まれた AB-23 量によって決定づけられることが示唆された。しかしながら、同じ濃度の AB-23 を添加して 0° で細胞を処理した場合には、120 分間処理してもほとんど作用は認められなかったが、同じ条件下での細胞への ^{14}C -AB-23 取り込み量は 120 分後には 37°、30 分間処理と同程度だった。また処理 5 分後における ^{14}C -AB-23 の細胞への取り込み量は 0° と 37° で殆んど差は認められなかったにもかかわらず阻害作用に大きな差が認められた。これらのことは、 ^{14}C -AB-23 の細胞への取り込み量と阻害作用との相関性に疑問を投げかけるものであるが、以下に記すように 0° と 37° で処理した場合では、 ^{14}C -AB-23 の細胞中での存在様式が異なる可能性も考えられる。すなわち、先述の如く一度細胞に取り込まれた ^{14}C -AB-23 は 37° では容易に細胞外に遊出するが、0° では遊出してこないという事実は、AB-23 が細胞表面に結合しているのではなく細胞質内あるいは細胞膜内に入り込んでいることを示唆しており、0° に比べ 37° の場合の方が AB-23 の細胞膜通過性が高いことを示している。従って 0° で処理した細胞に認められる ^{14}C -AB-23 は細胞表面に付着したものであり、37° の場合には、細胞膜あるいは細胞内に入り込んだものであり、AB-23 は細胞表面にある程度結合しても作用を発揮することはできず、膜を通過して初めてその活性を示すのではないかと考えられる。しかし、使用した腹腔細胞は肥胖細胞の他に数種の細胞集団を含んでいるので、37° で処理した場合には AB-23 は肥胖細胞に取り込まれるが、0° の場合は肥胖細胞に取り込まれる量が少なく他の細胞集団により多く取り込まれるという可能性も否定することはできない。

細胞を AB-23 で長時間処理すればするほど、処理細胞を 2 回洗浄した場合と 3 回洗浄した場合の ^{14}C -AB-23 の細胞内への取り込み量の減少率が小さくなる傾向が認められ、従って処理時間が長いほど一度細胞に取り込まれた AB-23 は洗浄操作を加えても細胞外へ遊出し難くなることが示唆された。このことは回復実験の結果によっても支持されており、5 分間しか処理されなかった細胞はヒスタミン遊離能を完全に正常まで回復できたが、30 分間処理された細胞は 30 分間放置してもヒスタミン遊離能が部分的にしか回復しなかった。

以上の結果から、AB-23 は細胞内あるいは細胞膜内に入り込み、compound 48/80 による細胞外へのヒスタミン遊離現象に対して阻害的に働くことが明らかにされたが、どのような作用メカニズムでヒスタミン遊離を阻害するかについては、現在の所ほとんど不明でありさらに検討を続けている。