The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	網膜におけるヒスタミン
Author(s)	澤井, 貞子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3054448
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

①

主論文

網膜におけるヒスタミン

沢井貞子

大阪大学医学部眼科学教室

Histamine In the Retina

Sadako Sawai

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical school

投稿予定先　大阪大学医学雑誌

I. 緒言

ヒスタミンは，平滑筋収縮，胃塩酸分泌，神経伝達など生理活性物質として作用しており，特に神経伝達物質としては，ほ乳類の脳[1]に加えて，近年，昆虫網膜の光受容器の神経伝達物質とする報告[2,3,4,5,6]が相次いでいる．哺乳類の網膜においても fluorometric assay[7,8,9,10] や radioenzymic method[11] によってヒスタミンが存在することが報告された．また抗ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）抗体による免疫組織化学的方法によりモルモット網膜にもヒスタミン作動性ニューロンが証明され[12]，脊椎動物の網膜においてもヒスタミンが何らかの神経伝達に関わっている可能性が示唆されている．一方、ヒスタミンは、アナフィラキシーほか種々の病態にも関与しており、最近糖尿病性網膜症で血液－眼球柵透過性亢進にヒスタミンが関与している可能性が示唆された。そこで今回著者らは、この網膜のヒスタミンが、神経細胞またはそれ以外に由来するものなのかどうかを明らかにするため、各種動物の神経網膜中でのヒスタミン含量と合成酵素活性を、定量分析し検討した。また，いずれにしてもヒスタミンの作用は、ヒスタミン受容体を介して発現すると考えられるため、各種哺乳動物の網膜について、ヒスタミンH_1受容体の存在、種差、特徴を，[^{3}H]メピラミンを用いる結合試験により明かにし，またそのH_1受容体の網膜内分布を[^{3}H]メピラミンによる光顕オートラジオグラフィーにて組織学的検討をした．更に，ウシ網膜より神経組織分画と微小血管分画に分離し，[^{3}H]メピラミンを用いる結合試験によってこれらの分画のヒスタミンH_1受容体を定量し，神経，血管両組織に対するhistaminergic regulationの可能性を考按した．

Ⅱ．実験材料及び方法

試薬　本実験には次の試薬を用いた．o-フタルアルデヒド（同人化学），L-ヒスチジン（和光純薬），アール液（ニッスイ製薬），[^{3}H]メピラミン（New England Nuclear 28Ci/mml), Aquasol-2 (New England Nuclear), トリプロリジン(Sigma), メピラミン(Sigma), ジフェンヒドラミン（和光純薬），ヒスタミン（和光純薬）及び一般市販薬．

実験動物　Wister albino rats, Hartley guinea-pigs, albino New Zealand rabbits, ビーグル犬 及び Macaque 猿を使用した．また，ウシ及びブタ眼球は，近隣の屠殺場より死後新鮮なものを得て 4 ℃ に保存して持ち帰った．ヒト眼球は，眼疾患以外の病気で死亡した方の病理解剖で得られた眼球を使用した．

網膜ヒスタミン含量の測定

ヒスタミンの測定には，Shoreらのo－フタルアルデヒド蛍光法を改良した大和谷らの方法を用いた[13]．死直後に摘出した各種動物眼球より神経網膜のみを顕微鏡下にて剥離し，硝子体の付着の無いことをを十分確認の上，重量を測定した．5倍量の 3%(W/V) 過塩素酸(5mM EDTAを含む)を加え，ポリトロンにて10秒間ホモゲナイズした．ホモゲネートは測定まで -40 ℃ で保存した．ホモゲネートを 10,000 xg, 20 分遠心にかけ，上清 50μl を直接強酸性樹脂 HPLC カラム（東曹，IEX 510 sp）に注入し，移動相として，0.3M KClを含む0.2Mプロピオン酸カリウム緩衝液(pH 4.0)を用いて展開し，o－フタルアルデヒド蛍光法によるポストカラム誘導体蛍光法にて分析した．

網膜ヒスチジン脱炭酸酵素活性の測定

HDC活性測定は，田口らの方法を用いた[14]．すなわち，死直後に摘出した網膜を 0.5-1.0 ml の抽出溶液（0.2mM dithiothreitol, 0.01mM pyridoxal-5'-phosphate, 1.0 %(W/V) polyethylene

glycol 300 を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8),) を加え,ポリトロンにて10秒間ホモゲナイズした後, 12,000 xg で 20 分遠心にかけ, 上清を 50 倍量の同様の抽出溶液で 3 回透析を繰り返した(overnight). 透析後の上清を酵素活性測定用の試料とし 0.25 mM L-ヒスチジンと 37 ℃で 200 分間反応させた. 試料をヒスチジンを加えずに同時に反応させブランクとした. 60%(W/V) 過塩素酸で反応を終了(最終濃度 3%(W/V)) させ, 産生されたヒスタミン量を上記の方法で測定し, ブランクのヒスタミン量との差をヒスチジン脱炭酸酵素活性とした.

ウシ網膜微小血管分画の分離

微小血管分画は, Meezan et al の方法[15] を用いた. 新鮮な牛眼より氷上にて神経網膜を剝離し, はさみで細かく切り刻み, 組織の約4倍量の氷冷アール液とともにガラスホモゲナイザーにより, テフロンペッスル を10回上下させてホモゲナイズした後, ナイロンシーブ(86 μm)上に注いだ. アール液にて洗浄の後, シーブ上の組織を再度ガラスホモゲナイザーにもどし, テフロンペッスルを5回上下させてホモゲナイズした後, ナイロンシーブ上に注ぎシーブ上に残る組織を2分間 1085 xg にて遠心し, 20-25個の牛眼から 230-270 mg wet tissue の血管塊を得た. 分離した牛網膜血管分画の純度は, 2回目のシーブ上に残った組織を再懸濁させ位相差顕微鏡にて調べた(図1). 得られた組織塊は, 血管内部に捕捉された血球が認められるが精製された網膜血管であることがわかった. 網膜血管直径は 5-50 μmであったが, 多くは約 20 μm 程度であった.

各種動物網膜及びウシ網膜血管の膜分画の作成

各種動物眼球神経網膜及び微小血管分画に, 50 mMNa/K リン酸緩衝液(Na_2HPO_4 37.8mM, KH_2PO_4 12.2mM; pH 7.4) を加え, ポリトロンで 20 秒間ホモゲナイズした. ホモゲネートを50,000 xg, 20 分間で 2 回遠心後, 膜分画を得た. その沈澱をNa/Kリン

酸緩衝液に加えて2-10 mg protein/ml になるように懸濁し，-80 ℃で保存した．

膜分画の[^{3}H]メピラミン結合試験

0.2-1.0 mg 蛋白量を有する膜分画試料を，10 μM トリプロリジンの存在（非特異性結合）または，非存在（総結合）条件で，各種濃度（ 0.3-10 nM ）の [^{3}H]メピラミンと 25 ℃で 45 分間インキュベーションした．ガラス繊維濾紙（ Whatman GF/B ）で濾過し，50 mM Na/K リン酸緩衝液(3ml)で三回洗った後，10ml の Aquasol-2 により，濾紙に付着した[^{3}H]メピラミンを抽出し，液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した．特異性結合は，総結合から非特異性結合を差し引いて計算した．

蛋白の定量

試料蛋白の定量は，Lowry の方法[16] によりウシ血清アルブミンを標準として行なった．

[^{3}H]メピラミン結合試験データの解析

[^{3}H]メピラミン結合飽和実験データを下記の式[1]を用いて非線形最小二乗法で解析した．

$$B = \Sigma(B_{max_i} \times F/(K_{D_i} + F)) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \text{式 [1]}$$

B は特異性結合量，F は遊離リガンドの濃度，i は結合部位数，Bmax は最大結合能量，K_D は解離定数である．結合部位数の決定に 'extra sum- of- squares' F-試験[17,18] を用いた．各種薬物の [^{3}H]メピラミン結合に対する阻害の分析にはプロビット変換法[19] を用いた．

[^{3}H]メピラミンによるオートラジオグラフィー

ブタ眼球を，摘出直後，液体窒素で凍結し，cryostat にて厚さ 20μm の組織切片を作成した．乾燥後，15 分間の preincubation (50 mM NaKPBS 4°C)の後，total binding として [^{3}H]メピラミン

2 nM, non-specific binding として[^{3}H]メピラミン及び1 μMトリプロリジン存在下にて，切片を 1時間 incubationした(25 ℃). 洗浄後，オートラジオグラフィーの手技に従い，切片に乳剤を塗布し，5週間冷暗所で露出，現像後，光学顕微鏡にて観察した.

Ⅲ. 結果

網膜ヒスタミン含量及びヒスチジン脱炭酸酵素活性

各種動物神経網膜におけるヒスタミン含量の測定結果を表1に示す. 測定した全動物網膜よりヒスタミンが検出された. 最もヒスタミン含量が多かった種はイヌ(540 pmol/g wet tussue)であり，最も少なかった種はウシ(13 pmol/g wet tussue)であった. ラット(105), ウサギ(65), モルモット((43), ブタ(37), サル(36)らはこの2種の中間の値を示した. また表2に測定されたヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)活性を示す. 測定した全種より酵素活性が検出され，最も HDC 活性が高かった種はイヌ(151 mol HA synthesized/mg prot./min.) であり，最も少なかった種はサル(2.9 pmol/g wet tussue)であった. ただし，イヌ以外の種の，モルモット(13), ブタ(7.7), ウシ((5.7), ラット(4.3), ウサギ(3.0)らは最も低かったサルと近似した値であり，イヌ網膜HDC活性のみが，他の種に比して著しく高い値を示した.

各種網膜膜分画の [^{3}H]メピラミン結合試験

ウシ，ブタ，イヌ，及びヒトの網膜膜分画に対する[^{3}H]メピラミンへの特異的結合はラジオリガンドの濃度の増加により飽和した. その結合を 式[1] を用いて非線形最小二乗法で分析した. それぞれの結合解離定数と最大結合量を表3に示す. 最も高い親和性を持つ種はブタ(KD=1.8±0.6 nM)であり，最も低い親和性を持つ種はウシ(KD=3.8±1.2 nM)であったが，いずれも脳組織における値[20,21]と近似した. 最も最大結合量が多かったヒト網膜に対する[^{3}H]メピラミン結合の飽和曲線とScatchard plotsを図2に示す. どの種に

おいても 1結合部位モデル（式[1], i=2）が 2結合部位モデル（式[1], i=2）より著しくよい結果が得られた（ $P<0.05$ ）．また，各種の H_1拮抗薬が nM のオーダーで [^{3}H]メピラミンの対する結合を阻害した（表4）．しかし，モルモットとウサギの網膜膜分画からは，1チューブに 1.5 mg の蛋白量を用いても有意な [^{3}H]メピラミンの特異的結合を得られなかった．

豚網膜切片の光顕オートラジオグラフィー

図3はブタ網膜切片の光顕オートラジオグラフィーの結果を示す．総結合（左）では，視細胞層から神経節細胞層まで[^{3}H]メピラミンの結合部位が分布しているが，非特異的結合（右） では[^{3}H]メピラミンの網膜内層の結合が阻害された．特異的結合部位の網膜内分布は，内網状層を中心に内顆粒層，神経節細胞層と網膜内層に多く分布していた．

ウシ網膜血管分画及び神経分画の[^{3}H]メピラミン結合試験

ウシ網膜血管の膜分画に対する[^{3}H]メピラミンの結合試験を行なった．その結果，[^{3}H]メピラミンへの特異的結合はラジオリガンドの濃度の増加により飽和した．結合解離定数は 2.78±0.32 nMで 最大結合量は 53.8±1.7 fmole/mg protein であった．また，ナイロンシーブにて濾過された神経組織の膜分画についても同様に結合試験を行なった．神経組織分画でも特異的結合は飽和し，結合解離定数は 4.4±0.52 nM, 最大結合量は 108.9±3.1 fmol/mg protein であった．図4と図5はそれぞれウシ網膜血管分画と神経組織分画に対する [^{3}H]メピラミン結合の飽和曲線と Scatchard plots を示す．

両分画とも1結合部位モデル（式[1], i=2）が2結合部位モデル（式[1], i=2）より著しくよい結果が得られた（ $P<0.05$ ）．また，血管分画の H_1結合部位の特異性を各種の H_1拮抗薬との結合阻害試験にて検討した．表5は，網膜血管へのメピラミン結合に対する H_1拮抗薬の阻害定数(Ki)である．メピラミンとトリプロリジンは強

く阻害し，ジフェンヒドラミンはやや弱く，ヒスタミンは弱かった．

Ⅳ．考按

種々の動物網膜におけるヒスタミン量とヒスチジン脱炭酸酵素は，イヌを除いて，以前の網膜での報告[11,22]の約１／１０であり，ラット脳組織のそれらの約１／４０から１／１００であった．しかし，以前の報告[8,9,23]では検出不能とされたウサギ網膜においてもヒスチジン脱炭酸酵素活性が測定可能であった．これは，著者らの用いたヒスタミンの検出方法の測定感度がよく，また HPLC を使用したことでヒスタミン以外の不純物を除くことができ特異性が増したためと考えられた．

表６に正常ラットの皮膚，脳組織及び網膜のヒスタミン含量（HA），ヒスチジン脱炭酸酵素活性（HDC）とその比（HDC/HA）を示した．含有ヒスタミンのほとんどが肥満細胞に由来するラット皮膚では，高いヒスタミン量（HA）に比して非常に低いヒスチジン脱炭酸酵素活性（HDC）のため，その比は 0.00002 である[24]．一方ヒスタミン神経線維に富む脳組織の比は，1.4 である[14,25]．皮膚，脳両組織における HDC/HA のこの差異は，肥満細胞系と神経細胞系のヒスタミン生合成の turn-over の違いに帰すと考えられる．我々の結果から網膜組織での HDC/HA は，それぞれ 0.44-0.04であり（表７），脳の HDC/HA よりは小さいが，皮膚の HDC/HA の約1000-10000倍大きい値であった．

特に，イヌ網膜においては，脳組織のそれらと近似する高いヒスタミン含量とヒスチジン脱炭酸酵素活性が得られたが，さらに，神経組織に於けるヒスタミンの代謝酵素（HMT:ヒスタミン－Ｎ－メチル基転移酵素）活性も存在した(131.1 pmol HA metabolized/min/mg protein).

以上より今回の結果は，網膜含有ヒスタミンが，肥満細胞ではなく神経細胞に存在し，神経組織にて生合成の結果貯蔵されたことを示すと考えられた．また，イヌ網膜をはじめ，HDC/HAの高いウシ，ブタ，イヌ，モルモットではヒスタミンが神経伝達に大きく関わっ

ている可能性が推察される．

網膜の[^{3}H]メピラミン結合が，ウシ，ブタ，イヌ，およびヒトにおいて測定できた．それらの結合親和性は高く，脳における結合解離定数と近似していた．さらに，種々の H_1拮抗薬による阻害試験の結果もやはり今までの脳における報告と同等の阻害定数を示した．これより，網膜 H_1受容体は，脳とほぼ同じ薬理学的性質を持っていることが明かになった．ウシ網膜での結果は，以前の Arbones らの報告[26] した結合解離定数とほぼ近似した．Nowak[27]らは[^{3}H]メピラミンの結合部位を2種類報告しているが，非線形解析がなされていないので確定的ではない．

また，モルモットとウサギ網膜で有意な特異的結合が得られなかった．しかし，上記の網膜ヒスタミン量やヒスチジン脱炭酸酵素も種によってかなり変動があり，網膜のヒスタミンの役割にも，種差があると推察される．また，ヒスタミン受容体は，H_1，H_2とH_3受容体サブタイプに分けられる．種によってはそれ以外の受容体が働いている可能性も否定できない．

網膜血管には，ヒスタミン H_1受容体が網膜神経組織と同様に存在し，全網膜[26,27]，および脳膜分画[20,21,28,29] とほぼ同じ薬理学的性質を持っていた．網膜血管の組織蛋白あたりの H_1受容体容量は，網膜神経組織に比して約半分であり，これは以前に報告[30,31] された牛脳血管と脳皮質との割合に近似している．しかし，全網膜にしめる細胞数（蛋白量）は，血管組織に比べ神経組織の方が圧倒的に多いことを考慮すると、網膜 H_1受容体活性は大部分神経細胞組織に分布すると結論される。

また，光顕オートラジオグラフィーの結果より特異的結合は網膜内層に分布しており，その存在部位は，内層に豊富である血管系と神経細胞系の両方が推測された．しかし，網膜血管は最内層により豊富であり，メピラミン結合が特に内網状層に多いことから，結合存在部位は神経組織系に多いと考えられた．これは定量分析の結果とも一致している．

網膜血管には，その他インスリン受容体[32,33]，アドレナリン受

容体[34,35]，アンギオテンシンⅡ受容体[36]，などが存在し，そのうちインスリン受容体とアドレナリン受容体は，血管と神経組織の両方への存在が証明されている[33,34]．したがってヒスタミンの受容体が血管，神経両組織に存在しうると考えられた．

中枢神経組織の血管制御に関するヒスタミンの役割については，内頸動脈にヒスタミンを注入すると血管拡張反応や透過性亢進がおこる，など多くの報告がある[39,40]．このヒスタミンの血管作用は，血管に存在する H_1 と H_2 受容体を介すると思われるが，これらの受容体の存在場所も明かではない．脳血管の平滑筋か，内皮細胞膜上が示唆されて[41,42,43,44]おり，網膜血管も同様であろうと推察される．作用をおこすヒスタミンのoriginは，血液中に含まれるヒスタミンや，傍血管組織[45]や分離された脳微小血管[46]にみられる肥満細胞が脱顆粒し放出されたヒスタミンである，など諸説はあるが未だ明らかにされていない．

網膜血管の H_1 受容体を標的とするヒスタミンのoriginは今後の解明が必要である．還流ヒスタミンまたは網膜神経組織に含まれるヒスタミンが候補と考えられる．特に網膜神経組織には，上で示したように，ヒスタミンとともにヒスチジン脱炭酸酵素が含有されている．なにかの病的状態にて，血清ヒスタミン量の上昇，または網膜ヒスタミン合成能の亢進がおこるのかもしれない．近年，ストレプトゾトシン－糖尿病ラットで血管組織[47]や血中[48]，尿中[49]のヒスタミン含量の増加が報告された．特に網膜ヒスタミン合成が糖尿病で亢進するという報告[50]は注目される．ウシ網膜血管のヒスタミン H_1 受容体は，神経組織に比しては少ないが，十分血管拡張作用を有しえると考えられる．

以上よりヒスタミンは，各種哺乳動物網膜の主に神経組織に存在し，その H_1 受容体は，神経細胞と微小血管の両組織に存在し，網膜ヒスタミンが，神経細胞及び微小血管を標的細胞として働いている可能性が示唆された．

参考文献

1. Schwartz JC, Pollard H and Quach TT: Histamine as a neurotransmitter in mammalian brain. J Neurochem 35:26, 1980.
2. Hardie RC: Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? J Comp Physiol A 161:201, 1987.
3. Hardie RC: Effects of antagonists on putative histamine receptors in the first visual neuropile of the housefly. J Exp Biol 138:221, 1988.
4. Pirvola U, Tuomisto L, Yamatodani A and Panula P:Distribution of histamine in the cockroach brain and visual system: An immunocytochemical and biochemical study. J Comp Neurol 276:514, 1988.
5. Simmons PJ and Hardie RC: Evidence that histamine is a neurotransmitter of photo-receptors in the locust ocellus. J exp Biol 138:205, 1988.
6. Nawwel DR, Holmqvist MH, Hardie RC, Hakanson R and Sundler F:Histamine-like immunoreactivity in photoreceptors of thecomponud eyes and ocelli of the flies. Cell Tissue Res253:639, 1988.
7. Nowak JZ, Nawrocki J, and Maslinski C: Distribution and localization of histamine in bovine and rabbit eye. Agents and Actions 14:335, 1984.
8. Nowak JZ, and Kulinski JZ: The origin and fate of histamine in the rabbit retina. Neurochem Int 8:53, 1986.
9. Nowak JZ, Nawrocki J, and Maslinski C: Histamine in the rabbit eye:distribtion, synthesis, catabolism, and changes by light stimulation. Agents and Actions 16:80, 1985.
10. Nowak JZ, and Nawrocki J: Histamine in the Human Eye. Ophthalmic Res 19:72, 1987.
11. Ehinger B, and Hallengren C: Histamine in the

retina. Acta Physiol Scand 129:263, 1987.

12. Yamamoto MA, Kiyama H, Hayashi H, Fukui H, Tohyama M, Watanabe T, and Wada H: Demonstraion of histaminergic neurons in horizontal cells of guinea pig retina. Brain Res 410:269,1987.
13. Yamatodani A, Fukuda H, and Wada H: High-performance liquid chromatoghraphic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples. J Chromato 344:115, 1985.
14. Taguchi Y, Watanabe T, Kubota H, Hayashi H, and Wada H: Purification of Histidine Decarboxylase from the Liver of Fetel Rats and Its Immunochemical and Immunohistochemical Characterization. J Biol Chem 259:5214, 1984.
15. Meezan E, Brendel K and Carlson EC: Isolation of a purified preparation of metabolically active retinal blood vessels. Nature 251:65, 1974.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein mesurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265,1951.
17. Burgisser E: Model testing in radioligand/receptor interaction by Monte Carlo stimulation. J Recept Rec 3:249,1983.
18. Lean AD, Hancock AA and Lefkowitz RJ: Validation and statistical analysis of radioligand bindng data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. Mol Pharmacol 21:5, 1982.
19. Colquhoun D: Lecture on Biostatistics, 楠正ら訳. 大阪 医薬ジャーナル社, 185-188, 1982.
20. Hill SJ, Emson PC and Young JM: The binding of [^{3}H]mepyramine H_1 receptors in guinea-pig brain. J Neuroche 31:997, 1978.
21. Hill SJ and Young JM: Histamine H_1-receptors in the brain of the guinea-pig and the rat. Br J Pharmacol 68:687, 1980.
22. Nowak JZ: Histaminergic mechanisms in the

vertebrate visual system. Pol J Pharmacol Pharm 37:783, 1985.

23. Nowak JZ, Socko R and Uznanski P: Circadian rhythm of histamine metabolism in the rabbit central nervous system. Agents and Actions 23:233, 1988.
24. Yamatodani A, Maeyama K, Watanabe T, Wada Hand Kitamura K:Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficientin mast cells. Biochem Pharmac 31:305, 1982.
25. Maeyama K, Watanabe K, Taguchi Y, Yamatodani A and Wada H:Effect of α-fluoromethylhistidine decarboxylase, on histamine levels in mouse tissues. Biochem Pharmac 31:2367, 1982.
26. Arbones ML, Claro E, Picatoste F and Garcia A: [^{3}H]Mepyramine binding to histamine H_1 receptors in bovine retina. Biochem Biophys Res Commun 445:135, 1986.
27. Sawai S, Wang NP, Fukui H, Fukuda M, Manabe R and Wada H:Histamine H_1-receptor in the retina: Species differences. Biochem Biophys Res Commun 150:316, 1988.
28. Chang RSL, Tran VT and Snyder SH: Characterestics of histamine H_1-receptors in peripheral tissues labeled with[^{3}H]mepyramine. J Pharmacol Exp Ther 209:437, 1979.
29. Tran VT, Chang RSL and Snyder SH: Histamine H_1 receptors identified in mammalian brain membranes with [^{3}H]mepyramine. Proc Natl Acad Sci USA 75:6290, 1978.
30. Peroutka SJ, Moskowitz MA, Reinhard JF and Snyder SH:Neurotransmitter Receptor binding in bovine cerebral microvessels. Science 208:610, 1980.
31. Culvenor AJ and Jarrott B: Comparison of histamine H_1-receptors in bovine intracerebral microvessels with cerebralgrey matter by [^{3}H]mepyramine binding. Neurochem Int 3:365, 1981.
32. Cotlier E and Davidson C: Insulin receptors

in calf and human retinal blood vessels. Ophthalmic Res. 15:29, 1983.

33. Im JH, Pilion DJ and Meezan E: Comparison of insulin receptors from bovine retinal blood vessels and nonvascular retinal tissue. Invest Ophtahlmol Vis Sci 27:1681, 1986.
34. Forster BA, Ferrrari-Dileo G and Anderson DR: Adrenergic $alpha_1$ and $alpha_2$ binding sites are present in bovine retinal blood vessels. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:1741, 1987.
35. Kobayashi H, Iwasaki T, Izumi F and Kurimoto S: Adrenergic receptors in bovine retinal microvessels. Neurosci 24:237, 1988.
36. Ferrrari-Dileo G, Davis EB and Anderson DR: Angiotensin binding sites in bovine and human retinal blood vessels. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:1747, 1988.
37. Nowak JZ: Histaminergic mechanisms in the vertebrate visual system. Pol J Pharmacol Pharm 37:783, 1985.
38. Arbones L, Garcia VJ, Picatoste F and Garcia A: Presence and distribution of histaminergic components in rat and bovine retina. Neurochem Int 13:97, 1988.
39. Gross PM, Harper AM and Teasdale GM: Cerebral circulation and histamine:1. J Cereb Blood Flow Metabol 1:1, 1981.
40. Gross PM: Multiple actions of histamine on cerebral blood vessels. In: Frontiers in Histamine Research. UK:Pergamon, 1985:341-349.
41. Gross PM, Harper AM and Teasdale GM: Cerebral circulation and histamine:2. J Cereb Blood Flow Metabol 1:219, 1981.
42. Gross PM: Hitamine H_1-H_2-receptors are differentially and spatiallly distributed in cerebral vessels. J Cereb Blood Flow Metabol 1:441, 1981.
43. Karnushima IL, Palacios JM, Barbin G, Dux E, Joo F and Schwarts JC: histamine-related enzymes and histamine receptors in isolated

brain capillaries. Agents Actions 9:90, 1979.

44. Gross PM:Cerebral histamine: Indications for neuronal and vascular regulation. J Cereb Blood Metabol 2:1, 1982.
45. Edvinsson L, Owman C and Sjoberg NO: Autonomic nerves, mast cells, and amine receptors in human brain vessels. A. histochemical and pharmacological study. Brain Res 115:377, 1976.
46. Head RJ, Hjelle JT, Jarrott B, Berkiwitz B, Cardinal G and Spector S: Isolated brain microvessels: Preparation, morphology, histamine and cathecholamine contents. 17:173, 1980.
47. Orlidge A and Hollis TM: Aortic endothelial and smooth muscle histamine metabolism in experimental diabetes. Arteriosclerosis 2:142, 1982.
48. Hollis TM, Kern JA, Enea NA, and Cosgarea AJ: Changes in plasma histamine concentraion in the streptozotocin-diabetic rat. Exp Mol Pathol 43:90, 1985.
49. Markle RA, Hollis TM, and Cosgarea AJ: Renal histamine increases in the streptozotocin-diabetic rat. Exp Mol Pathol 44:21, 1986.
50. Carroll WJ, Hollis TM and Gardner TW: Retinal histamine synthesis is increased in experimental diabetes. Invest Ophtahlmol Vis Sci 29:1201, 1988.

Table 1. Histamine contents in the retina of different species.

SPECIES	HISTAMINE (pmole/g wet tissue)	*n*
Rat	104.6±11.9	6
Guinea-pig	43.2±3.5	8
Rabbit	64.5±12.3	5
Bovine	13.1±1.8	11
Pig	37.2±6.2	5
Dog	542.1±82.5	6
Monkey	35.7±0.5	3

HA in the sensory retna was determined using a specific method by the HPLC with a cation exchanger and an automated Shore's fluorometric assay system. Four retinas of rats were put together as necesarry to reach the threshold value of the detection. One retina of other species was much enough for one sample of the assay. Results represent means ± S.E.M. Number of assays = *n*.

Table 2. L-Histidine decarboxylase(HDC) activities in the retina of different species.

SPECIES	HDC (fmole HA/min/mg protein)	*n*
Rat	4.3±1.5	4
Guinea-pig	13.1±0.8	8
Rabbit	3.0±0.7	5
Bovine	5.7±0.3	9
Pig	7.7±0.2	4
Dog	151.0±13.2	6
Monkey	2.9±0.9	5

The activities were determined by the assay of histamine formed durinig the reaction carried out with 0.25 mM l-histidine for 200 min at 37.°C. Four to six retinas of rats and a pair of guinea-pigs were put together as necesarry to reach the threshold value of the detection. One retina of other species was much enough for one sample of the assay. Results represent means± S.E.M. Number of assays =*n*.

Table 3. [^{3}H]Mepyramine binding to H_1-receptors in retinas of various species.

	HISTAMINE	B_{max}(fmole/mg protein)
Guinea-pig	n.d.	n.d.
Rabbit	n.d.	n.d.
Bovine	3.8±1.2	75.6±15.1
Pig	1.8±0.6	158.8±28.0
Dog	2.6±0.6	114.2±17.0
Human	3.0±0.9	290.7±51.7

Data were analyzed by nonlinear regression using equation [1]. Values were mean ± S.E.M.(n=4)
n.d.: not detectable.

Table 4. Drug influences on [^{3}H]mepyramine binding to retinas of bovine and pig (Ki).

DRUG	BOVINE	PIG
Mepyramine	0.7±0.2 nM	2.3±0.7 nM
Triprolidine	5.1±1.5 nM	4.3±1.3 nM
Diphenhydramine	63.9±19.0 nM	27.6±8.2 nM
Histamine	45.8±13.6 μM	34.0±10.0 μM

The inhibition of specific binding of [^{3}H]mepyramine (5nM) was determined with five concentrations of competing drugs assayed in replicate. The mean inhibitory concentration (Ic_{50}) values were determined from the log-probit analysis and Ki values were calculated from the equation $Ki = Ic_{50}/(1 + [^3H]\text{mepyramine}/K_D)$. Values were mean ±S.E.M.(n=4)

Table 5. Drug influences on [^{3}H]mepyramine binding to the blood vessels of bovine retinas were shown.

Drugs	K_i (nM)
Triprolidine	3.6±2.1
Mepyramine	1.9±1.1
Diphenhydramine	24.4 ±14.2
Histamine	15.4±9.0(μM)

The inhibition of specific binding of [^{3}H]mepyramine (5nM) was determined with five concentrations of competing drugs assayed in replicate. The mean inhibitory concentraion(IC_{50}) values were determined from the log probit analysis and K_i values were calculated from the equation $K_i = IC_{50}/(1 + [^3H]mepyramine/K_D)$.

Table 6. Histamine contents and L-Histidine decarboxylase(HDC) activities in the brain, the skin and the retina of rats.

	Histamine (nmol /g wet tissue)	HDC (fmol HA/min/mg protein)	HDC/HA (/min)
Brain	0.399±0.062	563.2±23.8	1.4
Skin	436.6±85.0	8.3±34.1	0.00002
Retina	0.104±0.012	4.3±1.5	0.04

8 rats were used for the assay. Results represent means± S.E.M.

Table 7. The ratios of HDC activities vs. HA contents in the retinas of different species.

SPECIES	HDC/HA (/min)
Rat	0.04
Guinea-pig	0.30
Rabbit	0.05
Bovine	0.44
Pig	0.21
Dog	0.28
Monkey	0.08

The values were obtained by the devision of each HDC activity(table 2) by HA content(table 1).

Figure 1. Phase-contrast micrograph of the isolated bovine retinal vessels used for the binding experiments.

Magnification:A= x100, B= x400. Bar= 100 μm

Figure 2. (A) Saturation analysis of [^{3}H]mepyramine binding to receptors in human retina. Specific [^{3}H]mepyramine bindings, total binding minus nonspecific binding, were poltted as a function of increasing concentration. Points were means of the replicates from a single experiment. The experiment was replicatedat least 3 times. Equation [1] described in the textwas fitted to the data in (A).

(B) Scatchard analysis of the same data. K_D=3.0±0.9 nM. Bmax=290.7±51.7 fmole/mg protein.

Figure 3. Autoradiography of pig retina under light-microscope. (A) Total binding and (B) non-specific binding of [^{3}H]mepyramine.

GCL:ganglion cell layer. IPL:inner plexiform layer. INL:inner nuclear layer. ONL:outer nuclear layer.

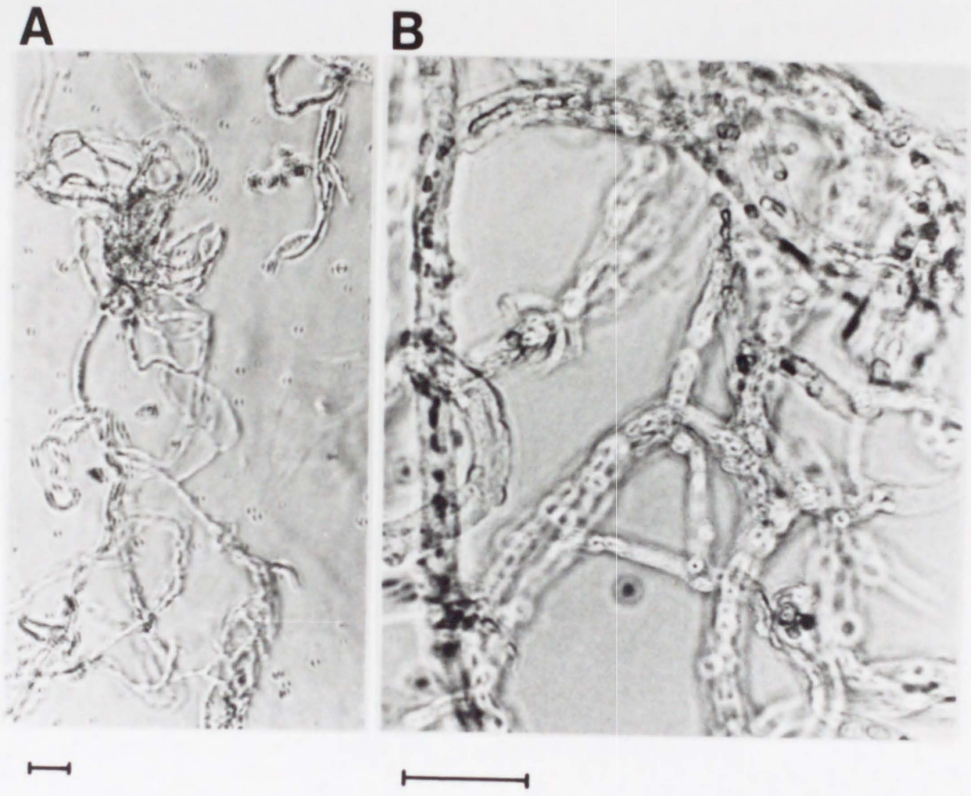
Figure 4. (A)Saturation analysis of [^{3}H]mepyramine binding to blood vessels of bovine retinas. Specific [^{3}H]mepyramine bindings,total binding minus nonspecific binding, were poltted as a function of increasing concentration. Points were means of the replicates from a single experiment. The experiment was replicated at least 3 times. Equation [1] described in the text was fitted to the data in (A).

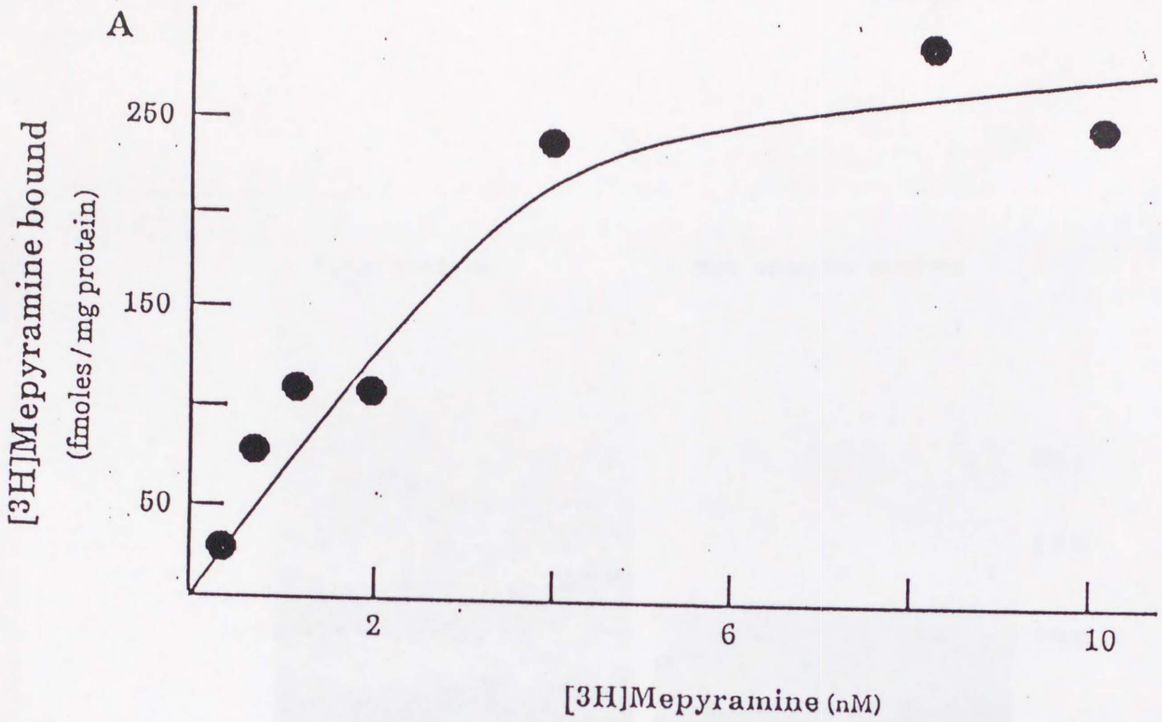
(B) Scatchard analysis of the same data. K_D=2.78±0.32 nM. Bmax=53.8±1.7 fmole/mg protein.

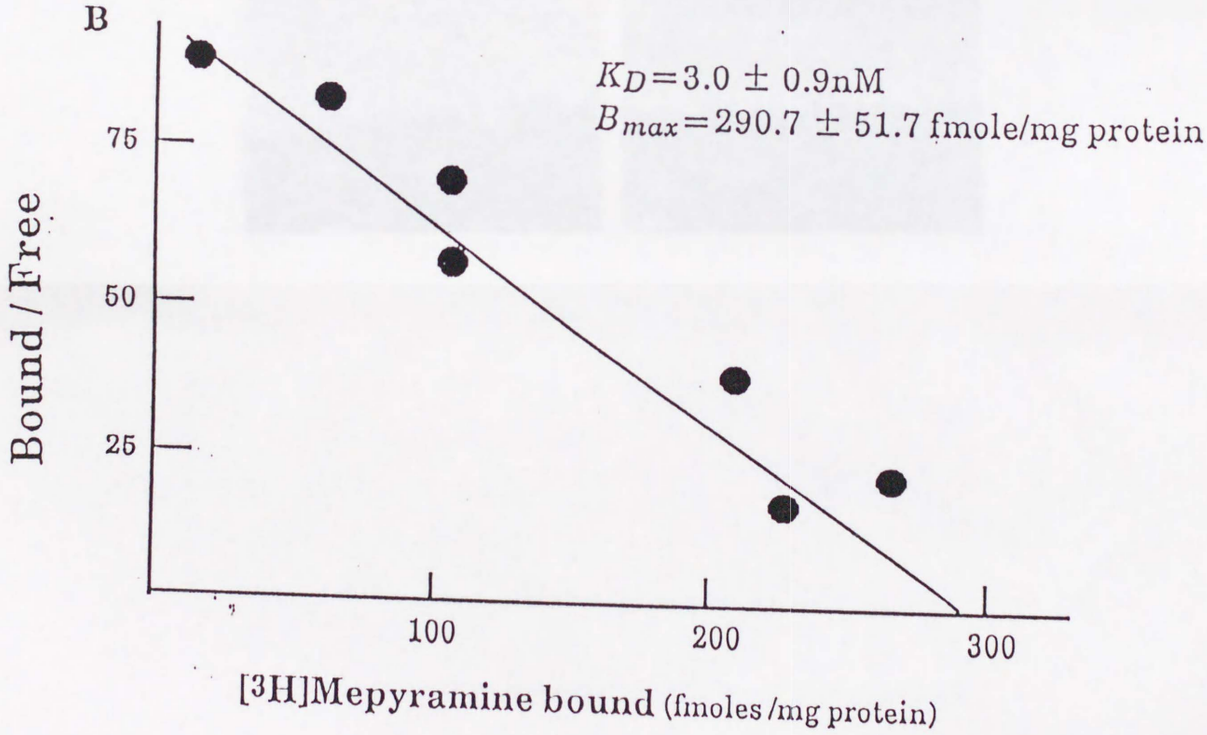
Figure 5. (A) Saturation analysis of[^{3}H]mepyramine binding to neuronal fraction of bovine retinas. Specific [^{3}H]mepyramine bindings, total binding minus nonspecific binding, were poltted as a function of increasing concentration. Points were means of the replicates from a single experiment. The experiment was replicated at least 3 times. Equation [1] described in the text was fitted to the data in (A).

(B) Scatchard analysis of the same data. K_D=4.40±0.52 nM. Bmax=108.9±3.1 fmole/mg protein.

Figure 1



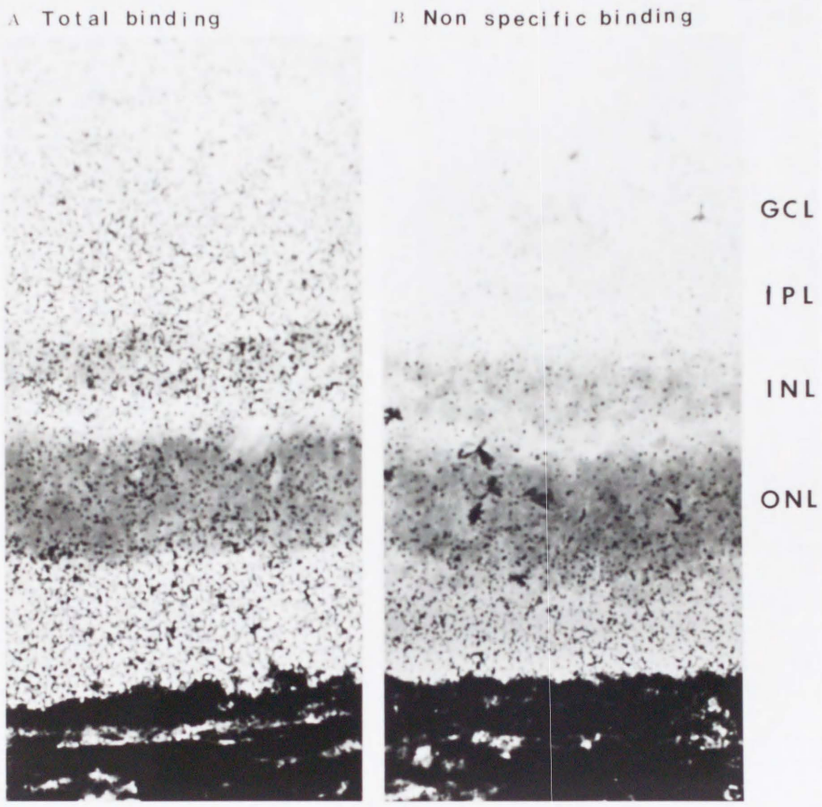

A
250
150
50
[3H]Mepyramine bound
(fmoles / mg protein)
2
6
10
[3H]Mepyramine (nM)

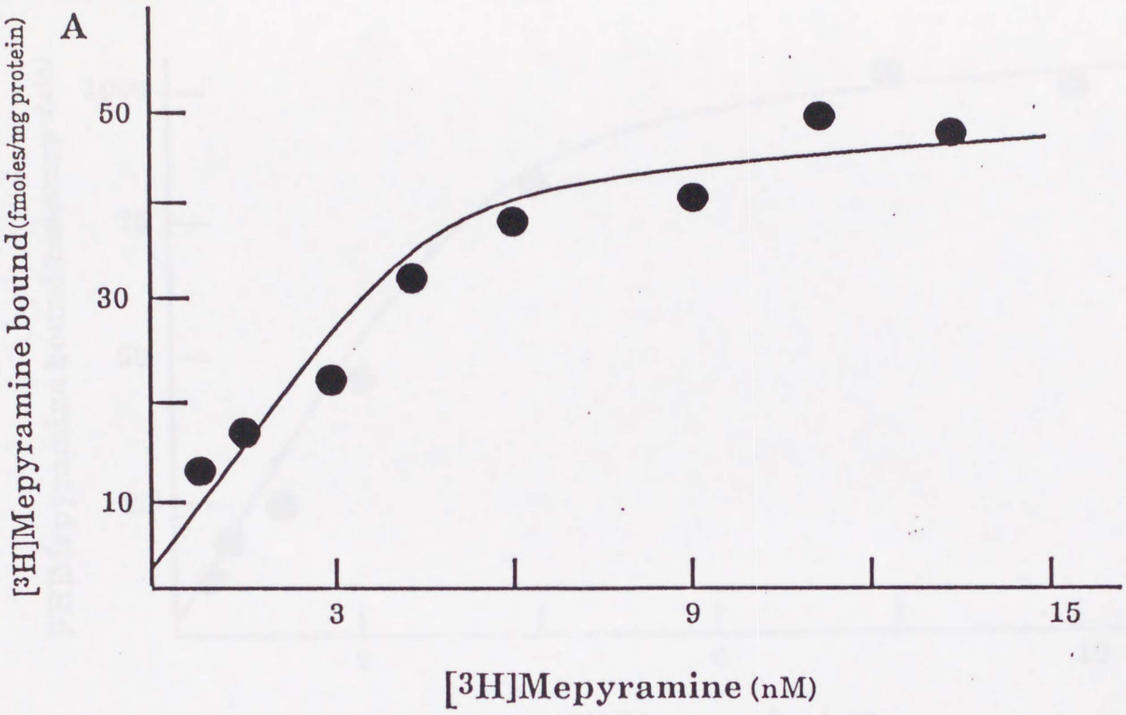

B
$K_D = 3.0 \pm 0.9$nM
$B_{max} = 290.7 \pm 51.7$ fmole/mg protein
75
50
25
Bound / Free
100
200
300
[3H]Mepyramine bound (fmoles /mg protein)

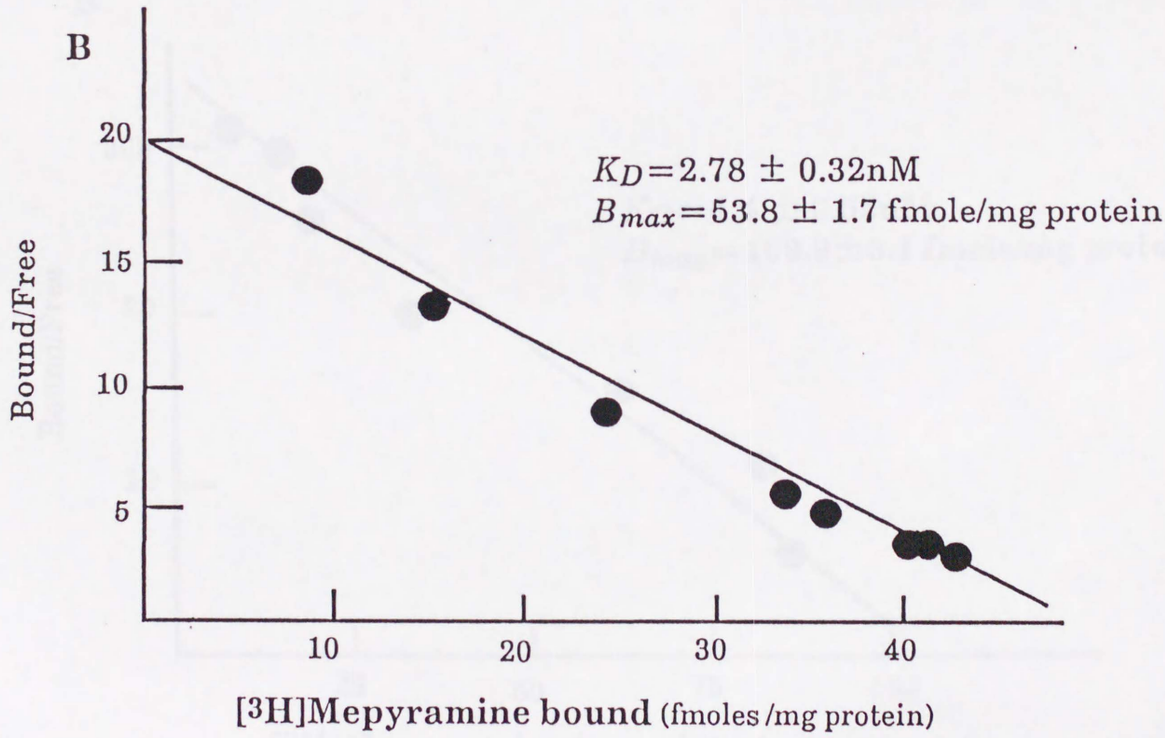
top

Figure 2.

Figure 3.



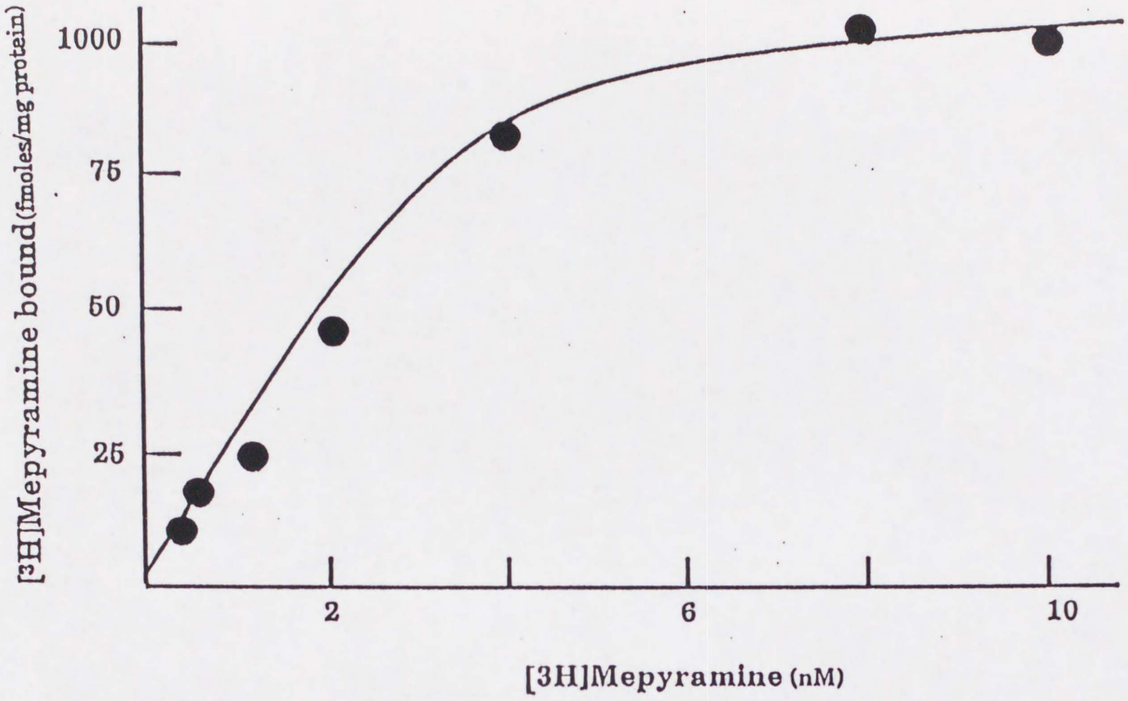

A
[3H]Mepyramine bound (fmoles/mg protein)
50
30
10
3
9
15
[3H]Mepyramine (nM)


B
Bound/Free
20
15
10
5
K_D=2.78 ± 0.32nM
B_{max}=53.8 ± 1.7 fmole/mg protein
10
20
30
40
[3H]Mepyramine bound (fmoles /mg protein)

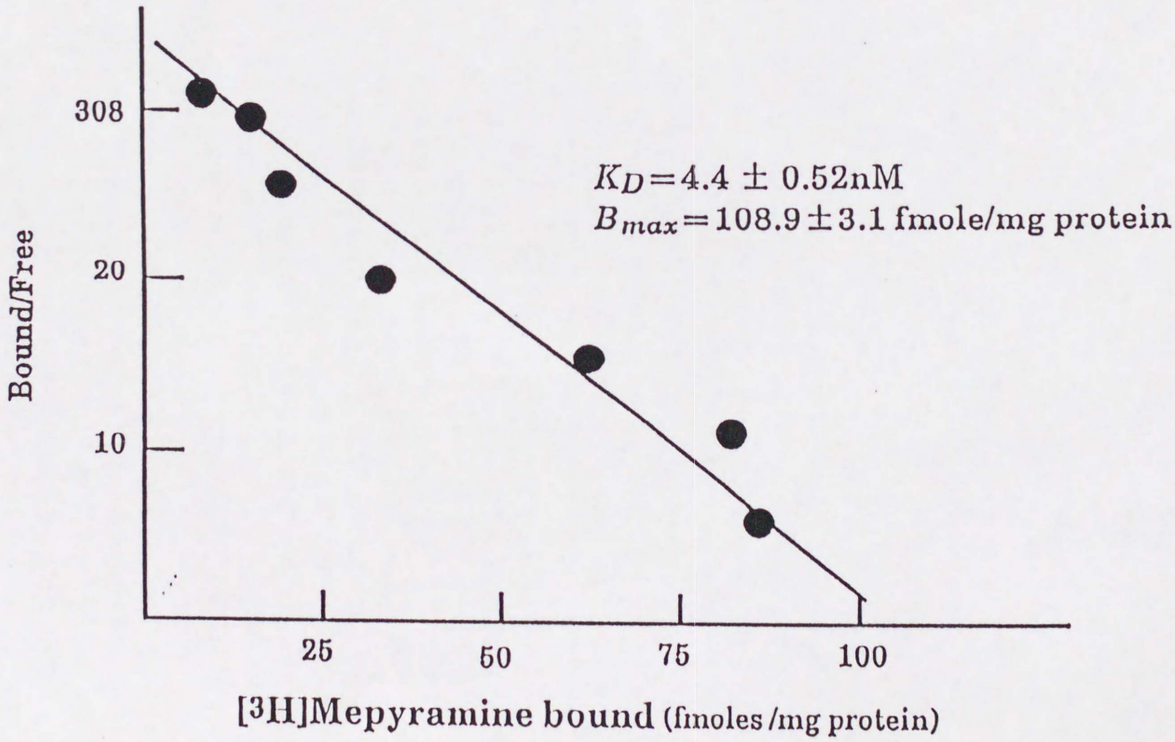
top

Figure 4.

A


[3H]Mepyramine bound (fmoles/mg protein)
1000
75
50
25
2
6
10
[3H]Mepyramine (nM)

B


Bound/Free
308
20
10
$K_D = 4.4 \pm 0.52$nM
$B_{max} = 108.9 \pm 3.1$ fmole/mg protein
25
50
75
100
[3H]Mepyramine bound (fmoles /mg protein)

top

Figure 5.