The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	肥満細胞からのhistamine遊離機序の解析
Author(s)	見尾, 光庸
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35692
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

肥満細胞からのhistamine遊離機序の解析

見　尾　光　庸

［目次］

緒言 ----- 1

第Ⅰ章　肥満細胞からの histamine 遊離における細胞膜流動性の上昇 ----- 4

第Ⅱ章　モデル膜系に対する histamine 遊離物質の作用の解析 ----- 13

第Ⅲ章　モデル膜の流動性に及ぼすメチル化リン脂質の影響 ----- 36

第Ⅳ章　肥満細胞からの histamine 遊離に及ぼす lysophosphatidylcholine の作用 ----- 44

第Ⅴ章　モデル膜系における histamine 遊離抑制物質の作用機序解析 ----- 56

第Ⅵ章　肥満細胞からの histamine 遊離における細胞内 Ca ion 動態の画像解析と抗アレルギー薬の効果
Ⅰ．terfenadine と cAMP の効果を中心として ----- 67

第Ⅶ章　肥満細胞からの histamine 遊離における細胞内 Ca ion 動態の画像解析と抗アレルギー薬の効果
Ⅱ．oxatomide の効果を中心として ----- 83

結語 ----- 96

参考文献 ----- 99

[緒言]

I型アレルギー反応における最も特徴的な現象は、IgE の関与した抗原抗体反応による肥満細胞からの histamine を始めとした種々な chemical mediators の遊離反応である。肥満細胞の細胞膜表面には、IgE の Fc 部分と特異的に結合する receptor (FcεR) が存在し、FcεR に結合した IgE が抗原を認識することで、最終的には histamine 遊離にまで至る一連の反応が開始される。細胞膜表面での抗原の認識に続き、抗原認識の情報は、細胞膜を介して細胞内へと伝達されていくと考えられている。肥満細胞の細胞膜表面に存在する FcεR は、細胞膜リン脂質二重層を貫通するようにして膜に存在していることが報告されており[1]、抗原抗体反応の結果、FcεR は側方移動して aggregation や crosslinking を生じると考えられている[2]。細胞膜リン脂質二重層はリン脂質とコレステロールからなる液晶状態として存在し、流動的な性質をしていることはよく知られており[3]、FcεR の側方移動には、この様なリン脂質二重層の物理的な性質が関与しているものと考えられる。また、肥満細胞において、histamine 遊離刺激条件下に、膜電位及び膜抵抗が低下し、細胞膜の透過性が上昇することも報告されている[4]。これらの所見から、肥満細胞からの histamine 遊離には、細胞膜の物理的性質が重要な役割を担っていることが推察される。この様な細胞膜に生じる膜物性の変化に伴って、細胞外 ion の細胞内への流入や、細胞膜に存在する膜結合性酵素類の活性化が生じるものと考えられる。細胞膜を介する情報伝達機構に関与した細胞膜での生化学的な反応として、リン脂質代謝の亢進が知られている。これには phosphatidylinositol (PI) 代謝回転 (PI turnover)の亢進[5]、リン脂質メチル化反応[6]、phospholipase A_2 (PLA_2) 活性化[6]などが報告されている。PI turnover の亢進は、細胞内の Ca 貯蔵部位 (Ca store) に作用して Ca ion を放出させる inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) を生成すると言われている[5]。また、PLA_2 の活性化は、leukotrienes や prostaglandins の前駆物質となる arachidonic acid (AA) を遊離させる為、その生理的意義が注目されている。一方、リン脂質メチル化反応は、その理論展開における矛盾が既に指摘されつつあり、この反応には否定的な報告がなされてきている[7, 8, 9]。抗原抗体反応や compound 48/80, substance P のような histamine 遊離物質による肥満細胞からの histamine 遊離反応は極めて速やかに進行する反応であり、数秒以内に pla-

teau に達することが知られている[10, 11, 12]。この際に、histamine は顆粒の脱出に先行して細胞外に遊離されることも報告されている[13]。この様な速やかな histamine 遊離反応において、その反応の開始を制御する機構を何段階にもわたる複雑な酵素反応に求めることは無理があると言う指摘がなされており[7]、現在の所、histamine 遊離反応の初期過程を完全に説明し得る説は提出されていない。

この様に、histamine 遊離反応開始の場である細胞膜における反応機構の解析には、未だ consensus が得られていない部分が多いが、情報伝達の場として、また、細胞膜における酵素反応の場として、細胞膜リン脂質二重層の重要性は疑う余地がない。事実、リン脂質二重層の様々な物理的性質が、細胞膜における酵素活性の調節に大きく関与していることはよく知られている[14]。細胞膜の物理的な性質を記述する上で最も重要な parameter は、細胞膜の流動性と透過性であると考えられる。しかし、肥満細胞からの histamine 遊離反応の際に、細胞膜の透過性が上昇することは知られているものの、細胞膜の流動性がどの様に変化するかについては、直接測定した報告はない。特に、細胞膜リン脂質二重層の物理的性質に及ぼす histamine 遊離刺激の影響については、これまで殆ど知られていない。この様な観点から、本研究では、先ず histamine 遊離に伴う肥満細胞の膜流動性の変化について検討した。次いで、リン脂質と cholesterol のみからなるモデル膜系を用い、抗原抗体反応或は histamine 遊離物質によって惹起される細胞膜流動性及び透過性の変化について検討した。

肥満細胞からの histamine 遊離を抑制する薬物が抗アレルギー薬として開発されており、臨床においても広く使用されている。しかし、抗アレルギー薬がどの様な機序で肥満細胞からの histamine 遊離を抑制するかについては、まだ不明の点が多い。本研究においては、細胞膜リン脂質二重層の物理的性質に及ぼす抗アレルギー薬の作用を解析することにより、細胞膜を介した情報伝達機構に及ぼす抗アレルギー薬の効果について検討した。

肥満細胞からの histamine 遊離反応では、細胞膜における情報認識に続いて、細胞内の種々な機能が活性化され、最終的に histamine 遊離に至ると考えられている。この際、肥満細胞内における second messenger として最も重要であると考えられているのが、Ca^{2+} である。腸間膜に結合した肥満細胞を用いた実験では、

媒液中に Ca^{2+} を含まない条件（Ca-free）下では、肥満細胞からの histamine 遊離は生じないことが知られている[4]。しかし、Ca-free の条件下で compound 48/80 を作用させた腸間膜肥満細胞に Ca^{2+} を microinjection すると、瞬間的に脱顆粒が生じることが知られている[4]。また、histamine 遊離条件下に肥満細胞の Ca uptake が生じることもよく知られている。これらの所見から、histamine 遊離においては Ca^{2+} が second messenger であると示唆されている。しかし、ラット腹腔より単離した肥満細胞の場合、細胞外に Ca^{2+} が存在する条件では、histamine 遊離に伴って、Ca uptake が生じるが、Ca-free の条件下でも、compound 48/80や substance P、抗原抗体反応などにより、histamine 遊離が生じることが知られている[12, 15, 16]。この様な反応の場合には、細胞内 Ca store から Ca^{2+} が放出され、細胞の活性化に至ると考えられている[17]。しかし、この仮説についての直接的な証明は、まだ確立されていない。本研究では、Ca^{2+} 感受性蛍光色素である quin 2 を肥満細胞に取り込ませ、画像処理の手法を用いて、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離と抗アレルギー薬による制御についても検討を行った。

第Ⅰ章　肥満細胞からの histamine 遊離における細胞膜流動性の上昇

［緒言］

Ⅰ型アレルギー反応における肥満細胞からの histamine 遊離反応では、細胞膜表面に存在する Fcε receptor に結合した IgE に、polyvalent な抗原が反応して IgE receptor の cross-bridging や aggregation が生じることにより、これに続く一連の反応が開始されると考えられている。Fcε receptor は、細胞膜リン脂質二重層を貫通するようにして存在しているタンパク質であることが示されている[1]。細胞膜リン脂質二重層は生理的条件下では流動性の高い液晶状態である[3]。抗原抗体反応によって FcεR の aggregation や cross-bridging が生じる[2]のは、この様な周辺のリン脂質二重層の性質が関与しているものと考えられる。Fcε receptor の aggregation や cross-bridging が生じると、それに伴い周辺の細胞膜リン脂質の物理的性質に変化を生じる可能性があると考えられる。Fcε receptor が直接関与しないと考えられる compound 48/80 のようなhistamine 遊離物質の作用下においても、肥満細胞に生じる形態学的な変化は抗原抗体反応の場合と極めて類似していることも知られている。しかも、この様なhistamine 遊離物質の作用点は、細胞の内部ではなく細胞表面にあることが確かめられている[4]。また、抗原抗体反応あるいは histamine 遊離物質の作用下に、肥満細胞内の顆粒は腫大・突出し、脱顆粒が惹起されるが、必ずしも脱顆粒を伴わない histamine遊離も報告されている[18]。更に、histamine 遊離の際には、肥満細胞が脱分極をすることも知られている[4]。この様な知見は、histamine が遊離する条件下では、肥満細胞の細胞膜透過性が上昇する事を示しており、histamine が遊離する際には、細胞膜リン脂質二重層の物理的性質に変化を生じていることが強く示唆されている。顆粒が細胞外へ脱出する際には（exocytosis)、細胞膜と顆粒膜の fusion が起こることから、細胞膜の中でも特に脂質二重層の物理的性質の変化は、脱顆粒を惹起する要因の一つである可能性がある。本章においては、histamine 遊離に伴う細胞膜流動性の変化について、ラット腹腔肥満細胞を用いて解析を行った。

[実験方法]

1．ラット腹腔からの肥満細胞の単離

Wistar 系雄性ラット（250 - 300 g）を断頭して出血致死させ、腹腔内に氷冷した 15 ml の physiological buffered salt solution (in mM; NaCl 154, KCl 2.7, $CaCl_2$ 0.9, glucose 5.6, HEPES 5; pH 7.4: PBS) を注入し、90 秒間穏やかに massage を行った後、細胞浮遊液を回収して 80 x g, 4 ℃, 5 分間の遠心分離を行って cell pellet を得た。これを PBS で 2 回洗浄を行った後、更に Percoll 密度勾配遠心法によりラット腹腔肥満細胞を単離した[19]。Türk 液で紫色に濃染する肥満細胞を、血球計算板で count した。更に、細胞の viability は 0.3 % trypan blue 液での dye exclusion test により判定した。これらの結果から、ラット腹腔より単離され、反応性を持つ肥満細胞は、腹腔より isolate された全細胞の 95 % を占めることが分かった。

2．抗 egg albumin IgE rich マウス血清の調整

抗 egg albumin (EA) IgE rich マウス血清は、Levine and Vaz [20] の変法に従って調整した。即ち、10 μg の EA を 1.0 ml の 4 % alumina gel に溶解し、balb/c 系雄性マウス（体重 15 - 20 g）に 0.1 ml/animal (i.p.) 投与した。4 週間後に第 1 回目の booster を、最初の半分の抗原量にて行い (i.p.)、更に 2 週間後、2 回目の booster を最初の 1/4 の量で行った (i.p.)。その一週間後に頚椎脱臼後、頚動脈より採血し血清を分離した。Frick and Ishizaka [21] の方法に従って、マウス血清より IgE rich な分画を精製し、これを IgE rich マウス血清として以下の実験に使用した。

3．肥満細胞の被動感作

PBS 中で 400 - 800 倍に希釈した 1.8 ml の IgE rich マウス血清に、単離したラット腹腔肥満細胞浮遊液 0.2 ml (10^6/ml) を加え、37℃、15 分間の incubation を行って細胞を被動的に感作した。これを PBS で 3 回洗浄 (80 x g, 4℃, 5 分間) 後、PBS に再浮遊させて以下の実験に供した。

4．肥満細胞の電子顕微鏡像

(1) freeze-fracture replica 像

PBS で 400 - 800 倍に希釈した IgE rich 抗血清に肥満細胞を浸漬し、37℃、15 分間 incubate して被動感作した。その後細胞を冷 PBS で 3 回洗浄した。抗原液（EA, 20 μg/ml）を 37℃、1 分間作用させた。氷冷下に 3 % glutaraldehyde で 10 分間固定し、その後 1 % agar 液に浮遊させて急冷して包埋させた。これを液体窒素で急速凍結し、freeze-fracture 装置（エイコー、FD-2/2A）にて -110 ℃で凍結割断した。割断面に白金とカーボンを蒸着したレプリカ膜を、市販の bleach （次亜硝酸ナトリウム＋界面活性剤）と蒸留水で洗浄した後、透過型電子顕微鏡（Hitachi, H-500）で観察した。

(2) ferritin 結合 egg albumin の作成法

EA 200 mg を 0.9 % NaCl 液 2 ml に溶解させ、4 % 炭酸ナトリウム液 2 ml 及び 200 mg ferritin 液（0.9 % NaCl 液）4 ml を添加し、マグネチック・スターラーで撹拌しながら冷アセトン 1 ml に溶解させた difluoro-diphenylsulfone (FNPS) 5 mg を添加した。これを 4℃ において 24 時間撹拌し、その後 0.9 % NaCl に 4℃ で 3 日間透析した。その後、4℃、10 分間 3000 rpm で遠心して沈渣を除いた。上清を更に 13,000 rpm, 4 ℃ で 2 時間遠心し、沈渣を更に 0.9 % NaCl で 3 回洗浄したものを ferritin 結合 EA として使用した[22]。

(3) ラット肥満細胞の細胞膜分画

400 倍に希釈した IgE rich マウス血清中にラット分離肥満細胞を浮遊させ、37℃, 15 分間 incubation を行って、肥満細胞を被動的に感作した。この細胞浮遊液を ferritin 結合 EA 10 μg/ml と 37℃にて種々な時間 incubation を行った。この細胞を freeze-thawing を 5 回繰り返すことによって破壊し、10,000 x g, 30 分間の遠心分離を行った上清を、更に 50,000 x g, 1 時間の遠心分離を行い、その沈渣を細胞膜 rich fraction として集めた。この細胞膜上への ferritin 結合 EA の結合及び分布の状況を、電子顕微鏡（Hitachi, H-500）によって観察した。

5．蛍光偏光解消法による肥満細胞の細胞膜リン脂質二重層膜流動性の測定

細胞膜リン脂質二重層の流動性の指標として、細胞膜リン脂質二重層の蛍光ラベルを行い、steady-state の蛍光偏光解消法によって蛍光の偏光度を測定した。蛍光 probe として、細胞膜の脂質二重層に対する親和性が高く、細胞内の顆粒膜を始めとする organella 膜への分布が極めて少ないとされている蛍光 probe である trimethylaminodiphenylhexatriene (TMA-DPH) を用いた[23]。

(1) 肥満細胞の蛍光ラベル

肥満細胞の蛍光ラベルは、Kuhry et al.[23] の方法に準じて行った。TMA-DPH は dimethyl sulfoxide (DMSO) に 1 mM の濃度で溶解させた後、PBS で 2.0×10^{-7}M になるように希釈した。PBS に浮遊させたラット腹腔肥満細胞 (3×10^{5}/ml) に等容量の TMA-DPH溶液を加え、室温にて 1 分間 incubation を行い、肥満細胞の細胞膜に TMA-DPH を取り込ませた。TMA-DPH は疎水性の環境下において蛍光強度が著しく増大し、細胞膜に取り込まれずに溶液中に残存した分子の蛍光は無視できる程度 (0.1 % 以下) であった。

(2) 蛍光偏光の測定

蛍光偏光度の測定には、Hitachi 650-10S 蛍光分光光度計及び Polacoat 社製の偏光フィルターを使用した。TMA-DPH の励起波長は 340 nm、蛍光波長は 425 nm で測定した。測定器の光学系が有する偏光性を補正した後、偏光励起光に対して平行方向に偏光した蛍光の強度 $I_{/\!/}$ と、垂直方向に偏光した蛍光の強度 $I_{\perp}$ とを測定・記録した。測定中の蛍光セルの温度は、恒温水循環装置により 37℃に保った。得られた $I_{/\!/}$、$I_{\perp}$の値より、次式で蛍光の偏光度を算出した。

$$P = \frac{I_{/\!/} - I_{\perp}}{I_{/\!/} + I_{\perp}} = \frac{I_{/\!/}/I_{\perp} - 1}{I_{/\!/}/I_{\perp} + 1} \quad \cdots\cdots\cdots (4)$$

細胞膜リン脂質二重層の内部において、蛍光 probe である TMA-DPH はリン脂質の分子運動に束縛された分子運動をしている。蛍光の偏光度は、TMA-DPH の分子運動の大きさを反映しており、偏光度が大きいほど蛍光 probe の分子運動が制限されていること、即ち、細胞膜リン脂質二重層の流動性が低い事を示している。逆に、偏光度が小さい場合には、TMA-DPH 分子が自由に運動していることを示しており、膜の流動性が高いと考えられる。

［実験結果］

ラット腹腔より単離した肥満細胞を IgE rich マウス血清によって受動的に感作し、これに抗原である EA を作用させる前後の細胞膜の freeze-fracture 像を Fig. 1 に示す。抗原刺激前は、細胞膜に一様に分布していた細胞膜タンパクと考えられる膜内粒子（intramembrane particle）が、抗原刺激とそれに続く細胞内顆粒の腫大・突出に伴って側方に移動している像が観察された。

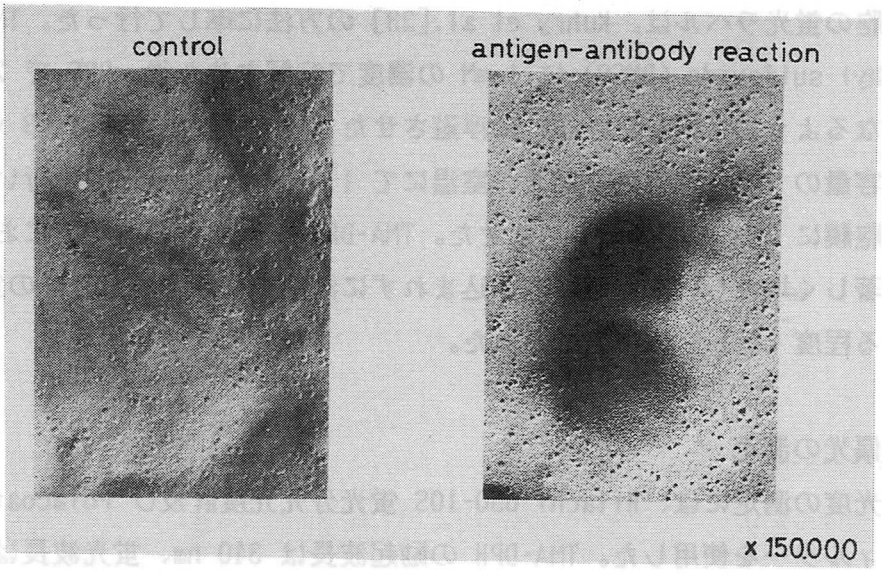


Fig. 1. Freeze-fracture appearance of the plasma membrane of rat peritoneal mast cell before and after antigen-antibody reaction.

IgE rich 抗血清で種々な時間被動感作した肥満細胞に ferritin 結合 EA を作用させて、37℃ において種々な時間 incubation を行った際の細胞膜上の ferritin 粒子の分布の変化を Fig. 2 に示す。感作しなかった対照細胞では、EA は細胞膜に殆ど付着しなかった。抗体を 30 - 60 分作用させて感作した場合、細胞膜状の ferritin 粒子の分布は不均一になって、隆起した顆粒を取り巻くように濃厚に偏在し、突出した顆粒部分には ferritin 粒子は殆ど観察されなかった。

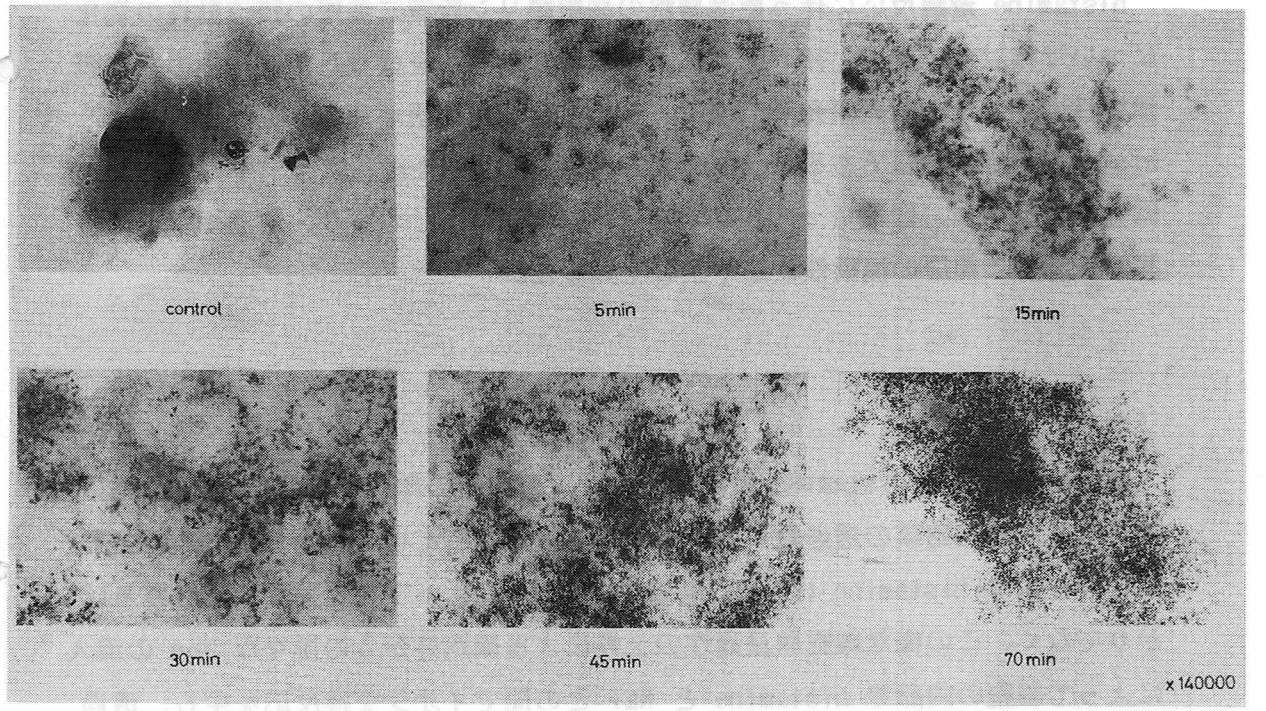


Fig. 2. Distribution of ferritin-conjugated antigen (egg albumin) on the surface of plasma membrane of rat peritoneal mast cell.

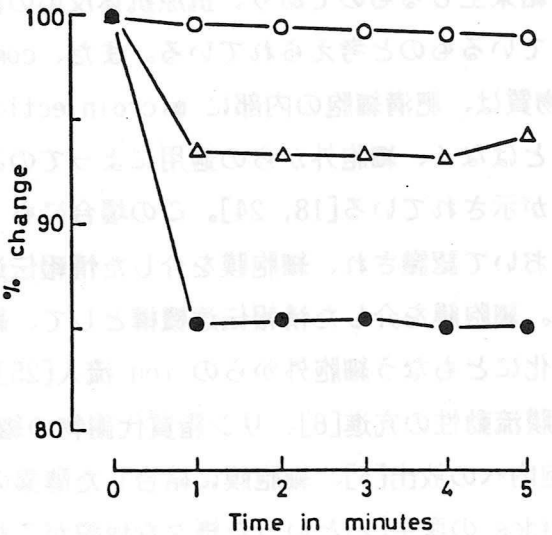


Fig. 3. Effect of compound 48/80 on the membrane fluidity of rat peritoneal mast cells. (○) control, (△) 48/80 1 μg/ml, (●) 48/80 2 μg/ml.

histamine 遊離反応に伴う肥満細胞の細胞膜リン脂質二重層の膜流動性の変化について検討するため、TMA-DPH によって蛍光ラベルを行った肥満細胞の細胞膜流動性の変化を、蛍光偏光解消法によって測定した結果を Fig. 3 に示した。histamine 遊離物質である compound 48/80 を添加した直後より TMA-DPH の蛍光偏光度は低下し、ほぼ 1 分以内に plateau に達した。つまり、肥満細胞の細胞膜リン脂質二重層の流動性が速やかに上昇した。

[考察]

肥満細胞からの histamine 遊離の際には、細胞膜の電気抵抗及び膜電位の低下が観察され、細胞膜の透過性が上昇することが示されている[4]。肥満細胞の顆粒内に存在する histamine は、exocytosis の機構によって細胞外に放出されるばかりでなく、この様な細胞膜透過性の上昇による細胞外からの種々な ion の流入によって細胞の内部で histamine と Na+ との間でイオン交換反応を生じ、透過性の上昇した細胞膜を通じて細胞外に histamine が遊離されるということも想定されている。更に、脱顆粒を伴った histamine 遊離反応の際には、細胞膜と顆粒膜の融合といった形態変化を生じる。このような一連の反応は、細胞膜表面における抗原抗体反応の結果生じるものであり、抗原抗体反応の情報が細胞膜を通じて細胞内に伝達されているものと考えられている。また、compound 48/80 のような histamine 遊離物質は、肥満細胞の内部に microinjection を行っても細胞に何ら変化を生じることはなく、細胞外からの適用によってのみ histamine 遊離・脱顆粒を生じることが示されている[18, 24]。この場合にも histamine 遊離の刺激は細胞膜の表面において認識され、細胞膜を介した情報伝達機構が関与することが示唆されている。細胞膜を介した情報伝達機構として、細胞膜に存在する ion channel の活性化にともなう細胞外からの ion 流入[25]、細胞膜リン脂質代謝の亢進による細胞膜流動性の亢進[6]、リン脂質代謝物の細胞内 second messenger としての細胞内への放出[5]、細胞膜に結合した酵素の活性化に伴って生じる cyclicnucleotides の産生[2]といった様々な仮説がこれまでに提唱されてきている。これらのいずれにおいても細胞膜のリン脂質二重層に生化学的ないし生物物理的な変化を生じることが重要な前提となっている。しかし、これまで肥

満細胞膜の物理的な性質について実際に測定が行われているのは、細胞膜の電気抵抗と膜電位の測定のみであり、細胞膜流動性の変化については、それが生じることを仮定した議論は数多くあっても、実際の測定は殆どされていない。

肥満細胞膜表面の freeze-fracture 像より明らかなように、細胞膜の膜内粒子は抗原抗体反応に伴って細胞膜上を側方移動し、細胞内部から細胞表面に突出してきつつある顆粒を取り囲むようにして密な分布を示した。膜内粒子は、細胞膜表面に存在する膜タンパク粒子であると考えられる。これはリン脂質二重層の内部に挿入された状態で存在しており、その分布や移動はいずれもリン脂質二重層の束縛を受けているものと考えられる。その様な膜内粒子の側方移動は、細胞膜のリン脂質二重層における膜流動性の上昇を反映しているものと考えられる。

同様の現象は、ferritin 結合 EA を用いて抗原抗体反応を行った肥満細胞の細胞膜の電顕像からも明かとなった。抗原である ferritin 結合 EA を感作肥満細胞に作用させると、細胞膜表面の Fcε receptor に結合して存在する IgE と抗原が反応するが、感作がほぼ完全に行われている場合には、ferritin 粒子は速やかに突出した顆粒を取り囲む様に凝集を開始し、その分布は freeze-fracture 像で観察された膜内粒子の場合と類似していた。単離された Fcε receptor のリン脂質二重層内への再構成実験などから、Fcε receptor は細胞膜リン脂質二重層を貫通するようにして存在していることが示されており[1]、細胞膜内における Fcε receptor もリン脂質二重層によって束縛された状態で存在しているものと考えられる。従って、IgE と反応した ferritin 結合 EA の細胞膜表面の分布の変動は、細胞膜リン脂質二重層の流動性が亢進していることを示していると考えられる。

histamine 遊離刺激にともなって肥満細胞の細胞膜流動性の亢進が、リン脂質二重層に於て生じていることが、蛍光偏光解消法の結果より示された。この場合、TMA-DPHは細胞膜リン脂質二重層に挿入されている。従って、TMA-DPH を偏光励起光で励起した際に発せられる蛍光の偏光度は、TMA-DPH の分子運動が大きいほど小さく、TMA-DPH が存在する環境の流動性を反映しているものと考えられる。compound 48/80 による刺激条件下に TMA-DPH の偏光度は速やかに低下した。この事は TMA-DPH の分子運動の亢進、即ち膜流動性が亢進したことを示している。この様な流動性の亢進により、膜内粒子や Fcε receptor の側方移動が生じたも

のと考えられる。

第Ⅱ章　モデル膜系に対する histamine 遊離物質の作用の解析

［緒言］

Ⅰ型アレルギー反応における肥満細胞からの histamine 遊離反応においては、細胞膜表面の Fcε receptor（FcεR）に結合した IgE が抗原を認識し、histamine 遊離に至る一連の反応が開始される。細胞膜表面での抗原認識の情報は細胞膜を介して細胞内へと伝達される。第Ⅰ章では、肥満細胞の細胞膜表面における抗原抗体反応にともなって、細胞膜に存在する膜内粒子（intramembrane particle）や膜表面の抗原抗体結合物が側方移動し、細胞膜リン脂質二重層における膜流動性の亢進が示された。この様な細胞膜に生じる物理的性質の変化にともない、細胞外イオンの細胞内への流入や、細胞膜の膜結合性酵素類の活性化が生じると考えられる。肥満細胞からの histamine 遊離反応は極めて速やかに進行する反応であり、能動感作された肥満細胞に於ける抗原抗体反応や compound 48/80 による刺激条件下では、数秒以内に plateau にまで達する事が示されている。このような速やかな histamine 遊離反応においては、その反応の開始を制御する機構を何段階にもわたる複雑な酵素反応に求めた Hirata ら[6]のリン脂質メチル化説には無理がある事が指摘されており[9]、現在の所、速やかに推移する histamine 遊離反応の初期過程を、抗原抗体の結合段階から膜で起こる事象を生化学的に説明し得る仮説はまだない。しかし、情報伝達の場としての細胞膜における酵素反応、特にリン脂質二重層における反応の重要性は疑う余地のない所である。事実、リン脂質二重層の様々な物性が、細胞膜における酵素活性の調節に大きく関与していることはよく知られている[14]。このような観点から、本章ではリン脂質二重層と histamine 遊離物質との相互作用について、モデル膜を用いて検討を行った。モデル膜を用いて抗原抗体反応の検討を行った例として、IgG と補体の関与したⅡ型アレルギーのモデル実験が black lipid membrane（BLM）や liposome の膜透過性を指標として既に行われている[26, 27, 28]。しかし、IgE の関与した抗原抗体反応がリン脂質二重層の物理的性質にどの様な影響を及ぼすのかについては全く知られていない。本章では、BLM 及び liposome を用いて IgE の関与した抗原抗体反応や、histamine 遊離物質である compound 48/80 のリン脂質二重層の膜透過性及び膜流動性に対する影響について検討した。

[実験方法]

1. 抗 egg albumin Ig E rich マウス血清の調整

抗 egg albumin (EA) Ig E rich マウス血清は、Levine and Vaz [20] の変法に従って調整した。EA を alumina gel に溶解して、balb/c 系雄性マウスの腹腔内に投与し、感作した。その 4 週後及び 6 週後に booster (i.p.) を行った。その一週間後に採血し、血清を分離した。この抗血清を使用してrat heterologous PCA を行ったところ、3200 倍希釈まで、PCA 反応は陽性であった。この IgE rich 抗血清を更に、Frick and Ishizaka の方法[21]に従って、精製した。

2. Black lipid membrane の電気抵抗の測定

リン脂質二重層の膜透過性の指標として、black lipid membrane (BLM) を作成し、その電気抵抗の変化を測定・記録した。テフロン製ビーカーの側壁に直径 1.5 - 2 mm の小孔を開け、これをガラス製ビーカー内に固定し (Fig. 1A)、両ビーカーを physiological buffered salt solution (in mM; NaCl 154, KCl 2.7, $CaCl_2$ 0.9, HEPES 5; pH 7.4: PBS) で満たした。5 mg の egg yolk phosphatidylcholine (egg-PC) と cholesterol 5 mg を 1 ml の n-decane に溶解し、BLM 作成のためのリン脂質溶液とした。Okuyama and Yoshida の方法[29]に従い、テフロンチューブを介してマイクロシリンジによりこの脂質溶液をテフロンビーカー側壁の小孔に塗布し、BLM を作製した。BLM の形成過程は、実体顕微鏡により観察した。脂質溶液塗布直後には、黄色い脂質膜が観察された。リン脂質が水溶液中へと拡散し、膜が次第に薄くなるにつれて干渉縞が観察されるようになった (colored membrane)。やがて干渉縞が消失し、側孔全体が黒に変わり、BLM が形成された。この時点で膜に pulse 通電を行い、脂質膜の電気抵抗及び capaci-tance を測定し、脂質二重層が形成されているのを確かめた。

膜の電気抵抗の測定は、Fig. 1A に示した回路で行った。BLM の両側に銀-塩化銀電極を挿入し、既知抵抗を介して一定の電圧 (20 mV) を書け、既知抵抗の両端の電圧を記録した。この際の等価回路は、Fig. 1B に示した。BLM の電気抵抗を R_m, capacitance を C_m で、既知抵抗は R_{ref} で示してある。銀-塩化銀電極の両端を短絡するスイッチを開いたとき、既知抵抗 R_{ref} の両端における電圧は、最初の電圧 V_0 から、指数関数的に減少し、一定時間後に定常値 V_∞ になった

(Fig. 1C)。

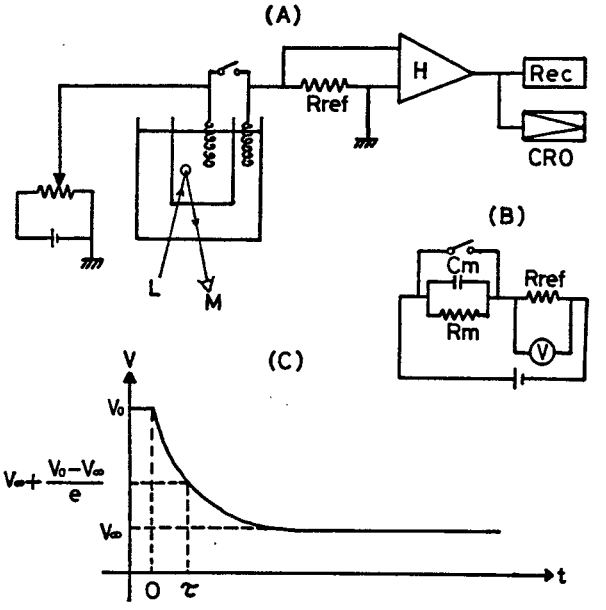


Fig. 1. Experimental arrangement for the determination of black lipid membrane resistance and capacitance.

A) experimental apparatus.

B) equivalent circuit.

C) schematic diagram of voltage change.

従って、記録された電圧変動と既知抵抗の値から、次のようにして R_m と C_m の値が求められる。

$$R_m : R_{ref} = V_0 - V_\infty : V_\infty$$

従って、

$$R_m = R_{ref} \cdot (V_0 - V_\infty)/V_\infty \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \quad (1)$$

また、時定数 τ は次式で与えられる。

$$\tau = R_m \cdot C_m$$

従って、C_m は次式により求められる。

$$C_m = \tau / R_m = \tau \cdot V_\infty / (V_0 - V_\infty) \cdot R_{ref} \quad \cdots\cdots\cdots \quad (2)$$

また、平行板コンデンサーの capacitance に関する公式を用いて、次のようにし

て脂質二重層の厚さ d を推定することが可能である。

$$C_m = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon' \cdot A/4\pi d$$

故に、

$$d = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon' \cdot A/4\pi C_m \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \quad (3)$$

この式で、A は BLM の面積、ε_0 は真空の誘電率、ε'は脂質の比誘電率である($\varepsilon' = 2.07$)[30]。

BLM を用いた抗原抗体反応の実験では、Hanks' 液 (in mM; NaCl 137, KCl 5.4, $CaCl_2$ 1.4, $MgCl_2$ 0.84, Na_2HPO_4 0.22, KH_2PO_4 0.44, $NaHCO_3$ 4.2; pH 7.4) によって 1000 倍希釈した抗血清含有媒液中で BLM を作成し、その後に抗原を添加した。また、compound 48/80 の作用を検討する際には、媒液は PBS とし、BLMに印加する電圧の + 側に compound 48/80 を添加した。

3. 抗原抗体反応による histamine 含有 liposome からの histamine 遊離

I 型アレルギーにおける histamine 遊離のモデル実験として、先ず antigen-coated histamine 含有 liposome を作成した。1 mg の egg-PC と cholesterol 0.5 mg とを 0.5 ml の chloroform に溶解し、減圧下に蒸発乾固した。これに EA 40 μg/ml 溶液 0.5 ml を加え、室温で 1 分間 vortex mixing を行った後、氷冷下で 10 分間超音波処理 (Tomy, UR-201P) を行った。再び溶媒を蒸発乾固し、histamine 1 mg/ml saline 溶液を 1 ml 加え、vortex mixing と超音波処理を行い EA coated histamine 含有 liposome suspension を作成した。これを透析チューブ (Spectrapor, MW cut 12,000) に移し、媒液中に残存した histamine を PBS に対して 6 時間透析して除去した。その後、Fig. 2 に示したようにして、2 ml/min の速さで PBS を inlet より流し、outlet に出てくる流出液を 1 分毎に集め、その histamine 濃度を Shore の方法[31]により蛍光定量した。

また、ラット腹腔肥満細胞より抽出した全脂質を用い、上述した方法により作成した liposome からの histamine 遊離も測定した。肥満細胞は出血致死させた Wistar 系雄性 rat (250 - 300 g) の腹腔に PBS 10 ml を注入し、穏やかに 90 秒間 massage した後、腹腔浸出細胞の浮遊液を採取し、Percoll 密度勾配遠心分離法[19]によって 肥満細胞を分離した (95 % 以上の純度)。肥満細胞からの全脂質の抽出は、Strandberg & Westerberg [32] の変法により、Fig. 3 に示した

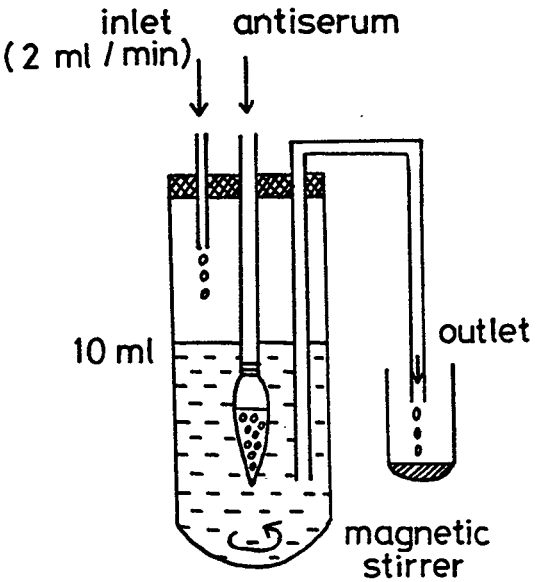


Fig. 2. Experimental arrangement for histamine release from antigen-coated liposomes.

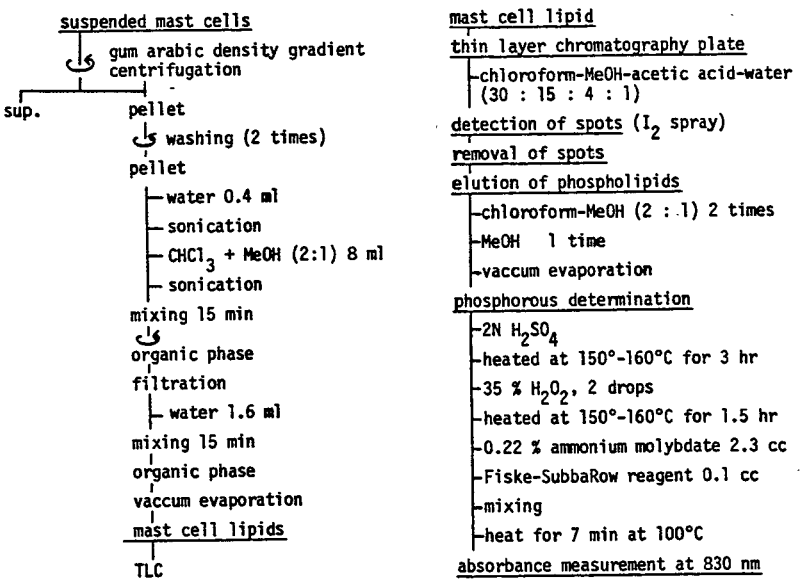


Fig. 3. Procedure for lipids extraction from isolated rat mast cells and phospholipids analysis.

flow chart に従って行った。全脂質のうち、リン脂質は、silica gel を用いた thin layer chromatography (TLC) により分離し、Bartlett の方法[33]に従って、各 spot のリン定量を行い、リン脂質組成を調べた (Fig. 3)。また、Rudel & Morris の方法[34]によって、総 cholesterol の定量を行った。

4. compound 48/80 による liposome からの histamine の遊離

3. と同様の方法によって、抗原の被覆されてない histamine 含有 liposome を作成した。liposome 懸濁液 2 ml に種々な濃度の compound 48/80 を添加し、37 ℃ で 15 分間の incubation を行った後、100,000 x g の遠心分離を行い、上清に遊離してきた histamine を Shore の方法[31]で蛍光定量した。liposome に含まれる全 histamine 量は、Triton X-100 の 1 % 液でliposome を溶解させ、溶液中の histamine を蛍光測定し、定量した。

5. liposome の電子顕微鏡像

(1) negative staining

銅製のグリッドに liposome 懸濁液を一滴落下させ、水分を濾紙で除去した後、2% のモリブデン酸アンモニウム (pH 7.4) を一滴載せ、過剰の溶液を除いた。このようにして調整した標本を透過型電子顕微鏡 (Hitachi, H-500) で観察した。

(2) freeze-fracture replica 像

標本支持台に liposome 懸濁液を一滴載せ、液体窒素で凍結し、エイコー製 FD-2A 型 freeze-fracture 作成装置により割断し、その後白金とカーボンを蒸着して replica を作成した。replica は市販の bleach で洗浄し、透過型電顕で観察した。

(3) ferritin 結合 egg albumin

Matsukura et al.[6] の変法を用いて ferritin 結合 EA を作成した。このようにして作成した ferritin 結合 EA を用いて前述の方法に従って EA-coated liposome を作成し、liposome 膜への EAの結合及び分布状況について検討した。

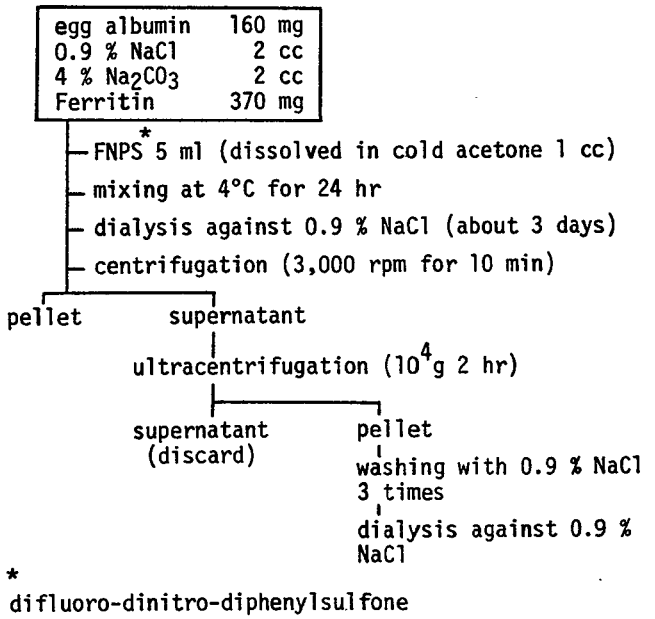


Fig. 4. Procedure for egg albumin-ferritin conjugation.

6. liposome を用いたリン脂質二重層膜流動性の測定

リン脂質二重層膜の流動性の指標として、リン脂質二重層の蛍光ラベルを行い、蛍光偏光解消法によって蛍光の偏光度を測定した。蛍光偏光解消法は、リン脂質二重層内の脂質配列の測定に広く用いられている。本章においては、モデル膜系での実験であり、細胞の場合と異なり organella 膜へのラベル分子の分布ということを考慮する必要が無いため、蛍光の偏光度を用いて order parameter の算出が可能な probe である 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用いた。この場合には、その偏光度からの order parameter の算出は Janig に従った[35]。order parameter は、脂質膜流動性の逆数として評価されている[36]。

(1) liposome の蛍光ラベル

蛍光物質である DPH は tetrahydrofuran に 1 mM になるように溶解した後、PBS に 2μM の濃度になるように suspend した。liposome の蛍光ラベルは Shinitzky and Inber [37]の変法により行った。即ち、2.5mg の phosphatidylcholine に cholesterol を加え、2.5 ml の PBS 中で 20 分間超音波処理を行っ

て liposome を作成した。egg-PC を使用する際には氷冷下で行い、dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) の場合には、その相転移温度よりも 5℃ 高い温度 (47℃) で超音波処理を行った。20,000 x g の遠心分離によって aggregate した liposome を除き、その上清を sonicated liposome 懸濁液として用いた。このようにして得た liposome 懸濁液に等容量の 2×10^{-6} M DPH を加え、25 ℃ にて 1 時間 incubation を行い、DPH を liposome の脂質二重層に取り込ませて、蛍光ラベルした。DPH は水溶液中では殆ど蛍光を発しないが、脂質二重層に取り込まれて、それを取り囲む環境が hydrophobic になると強い蛍光を発する。

(2) 蛍光偏光の測定と order parameter の計算

蛍光偏光度の測定には、Hitachi 650-10S 蛍光分光光度計及び Polacoat 社製の偏光フィルターを使用した。励起波長は 358 nm、蛍光波長は 427 nm で測定した。測定器の光学系における偏光性を補正した後、偏光させた励起光に対して平行方向で測定した蛍光の強度 $I_{/\!/}$ と、垂直方向に偏光した蛍光の強度 $I_{\perp}$ とを測定・記録した。測定中の蛍光セルの温度は、恒温水循環装置により一定に保った。得られた$I_{/\!/}$、$I_{\perp}$の値より、以下に示す式に従って蛍光の偏光度及び order parameter を算出した。

蛍光の偏光度 P は次式で定義される。

$$P = \frac{I_{/\!/} - I_{\perp}}{I_{/\!/} + I_{\perp}} = \frac{I_{/\!/}/I_{\perp} - 1}{I_{/\!/}/I_{\perp} + 1} \quad \cdots\cdots\cdots (4)$$

蛍光の異方性 r は次の式で定義されている。

$$r = \frac{I_{/\!/} - I_{\perp}}{I_{/\!/} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{/\!/}/I_{\perp} - 1}{I_{/\!/}/I_{\perp} + 2} = \frac{2P}{3 - P} \quad \cdots\cdots\cdots (5)$$

Jahnig [35] は定常光励起条件下における蛍光の異方性 (r_s) は、nanosecond 蛍光解析より次式のように表される事を報告している。

$$rs = \frac{r_0 - r_\infty}{1 + \tau/\phi} + r_\infty \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (6)$$

この式で、r_0 は回転緩和のない条件での異方性の値であり、r_∞ は時間無限大における異方性 (limiting anisotropy) である。また、τ は蛍光の寿命であり、ϕ は DPH 分子の回転緩和時間である。

DPPC 及び DPH を使用する条件下で、r_0 = 0.39 [38] 及び τ/ϕ = 8 [35] という値が使用されているので、これらの値を式(6) に代入して整理すると、

$$r_\infty = 9/8 - 0.04875 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (7)$$

となる。また、r_∞ と order parameter (S_ν)との間の関係は次式によって近似させ得ることが報告されている[35]。

$$r_\infty = 0.39\ S_\nu{}^2 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (8)$$

(7) 式と (8) 式より、order parameter の算出が可能となる。

$$S_\nu = \left(\frac{9/8\ rs - 0.04875}{0.39} \right)^{1/2} \quad \cdots\cdots\cdots (9)$$

[実験結果]

1．抗原抗体反応による BLM の電気抵抗の変化

本研究において作成し、使用した BLM の比抵抗値は 5×10^7 - 1.2×10^8 Ω・cm^2 の範囲内であり、平均値は (1.0 ± 0.13) x 10^8 Ω・cm^2 であった。この範囲以下の抵抗値を示した膜は実験には用いなかった。また、BLM の capacitance の平均値は 0.3μF/cm^2 であった。これらの値は既に報告されている BLMの電気的性質と良く一致していた[39]。この capacitance の値を式 (3) に代入することにより BLM の厚さが 54 Å であることが分かる。この厚さは、リン脂質二重層膜の厚さに相当することにより、本実験では脂質二重層が形成されていることが分かる。

Fig. 5 は、抗原抗体反応による BLM の電気抵抗の変化を示している。この場合、抗 EA IgE rich マウス血清希釈液 (1 : 1000) 中で BLM を作成した。ここに記録されているのは既知抵抗 (R_{ref}) 両端の電位差の変動であり、右端に示したのが BLM の実効抵抗値 (effective membrane resistance) である。BLM の両端を短絡していたスイッチを開くと、R_{ref} の両端で記録される電位差は BLM の抵抗 R_m と capacitance C_m で決まる時定数 τ に従って低下し、一定の定常値に達する。これが Fig. 5 の上段の図である。抗原を加える直前の抵抗値は (20.4 ± 0.8) x 10^8 Ω であった。Fig. 5 下段の図において、抗原である EA を最終濃度 6×10^{-8} g/ml 加えると、1 - 2 分の lag time の後に BLM の電気抵抗は次第に減少し始め、約 5 分後には急激な減少を見せ、6 分後に BLM は破れた。

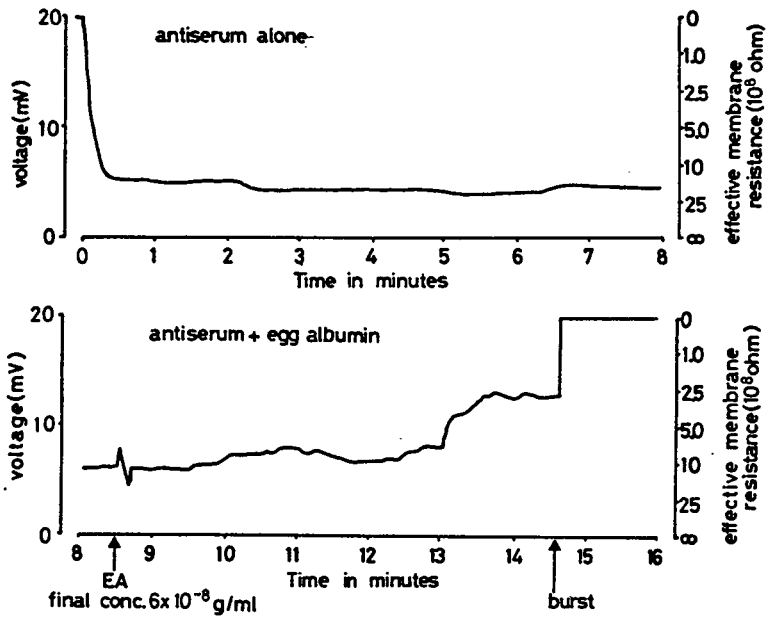


Fig. 5. Changes in black lipid membrane resistance induced by antigen-antibody reaction.

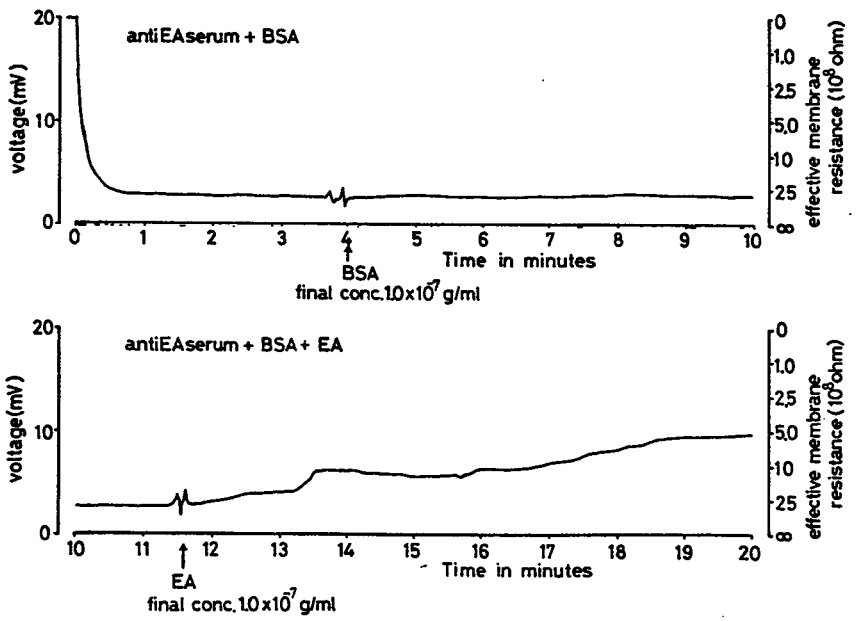


Fig. 6. Changes in black lipid membrane resistance induced by specific antigen-antibody reaction.

抗原添加により、ほぼ同様の時間経過で推移する BLM 電気抵抗の減少が反復して観察された。

この様な BLM の抵抗減少が、抗原に依存して惹起される現象であることを示したものが Fig. 6 である。上段の図で牛血清 albumin (BSA) を加えても BLM の膜抵抗に何ら変化はみられていない。しかし、ここに特異抗原である EA を加えると、下段の図のように BLM の抵抗が減少していくことが確かめられた。

2. BLM の電気抵抗に及ぼす compound 48/80 の影響

BLM の外液に compound 48/80 を最終濃度 0.5 - 10 μg/ml になるように加えた場合、Fig. 7 に示したように、compound 48/80 の濃度に依存した膜抵抗の減少が観察された。

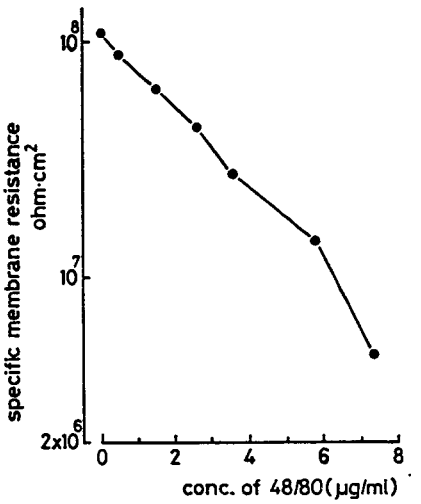


Fig. 7. Changes in electric resistance of black lipid membrane induced by compound 48/80.

Fig. 8 は、種々な塩溶液中で BLM を作成し、種々な濃度の compound 48/80 または potassium ionophore である valinomycin によって惹起される BLM の conductance の変化を示したものである。valinomycin は、K^+ に選択的に膜透過性を上昇させたが、compound 48/80 によって惹起される膜透過性の上昇には、

ion 選択性は見られなかった。

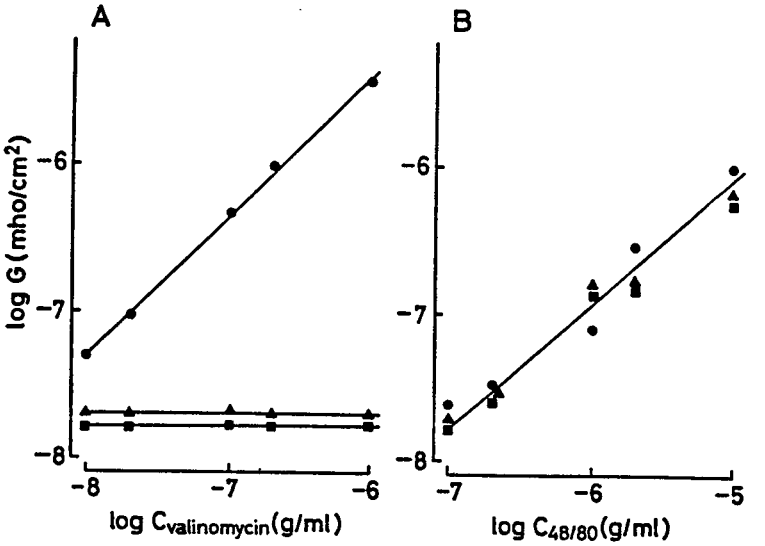


Fig. 8. Changes in electric conductance of black lipid membrane induced by compound 48/80.

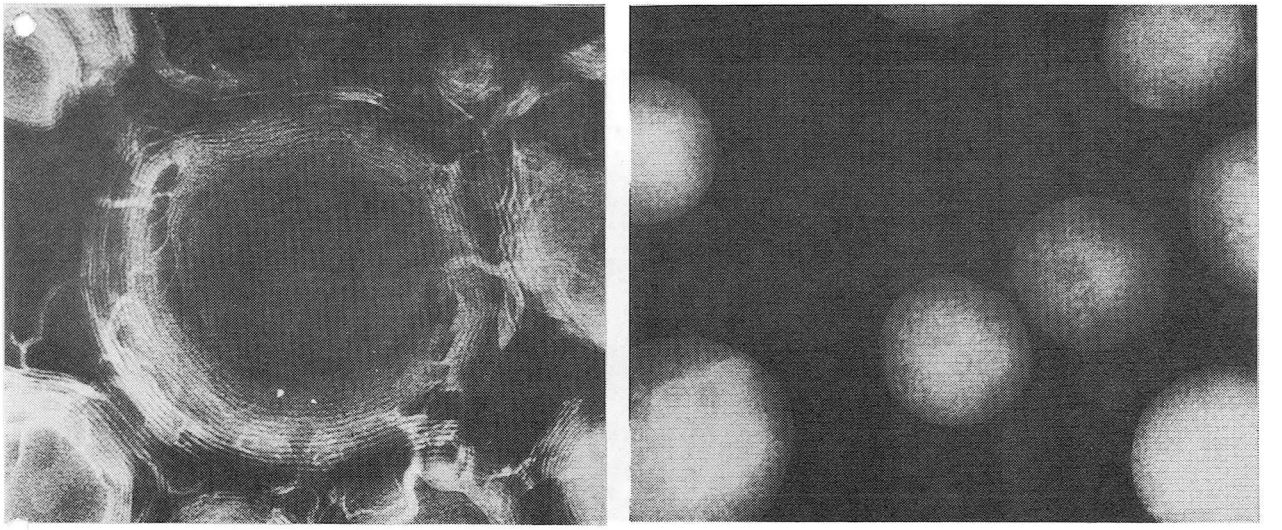
(A) Changes in membrane conductance produced by valinomycin.

(B) Changes in membrane conductance evoked by compound 48/80.

3. 抗原抗体反応による histamine 含有 liposome からの histamine 遊離

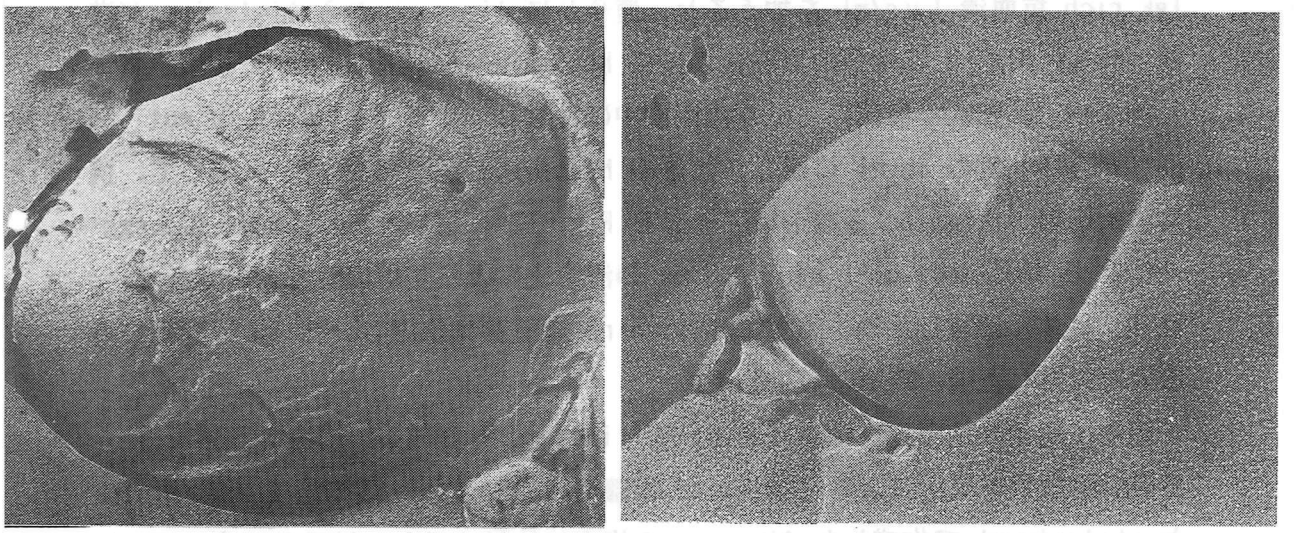
histamine 含有 liposome が unilamellar であること、及び liposome の表面に抗原である EA が一様に分布しているか否かについて、電子顕微鏡による確認を行った。vortex mixing のみを行った際に作られる liposome は multilamellar であり、その negative staining 像は Fig. 9(a) のように明らかに多重層であることが認められた。この事は freeze-fracture 像によっても確認された (Fig. 10(a))。この様な liposome に更に超音波処理を行うと、unilamellar な liposome が作られることが Fig. 9(b), Fig. 10(b) より確認された。以下の実験においては、全てこの unilamellar liposome を用いた。

また、ferritin を結合させた EA を用いて作成した EA-coated liposome の negative staining 像 (Fig. 11) に見られる様に、liposome の表面には EA が一様に分布していることも判明した。



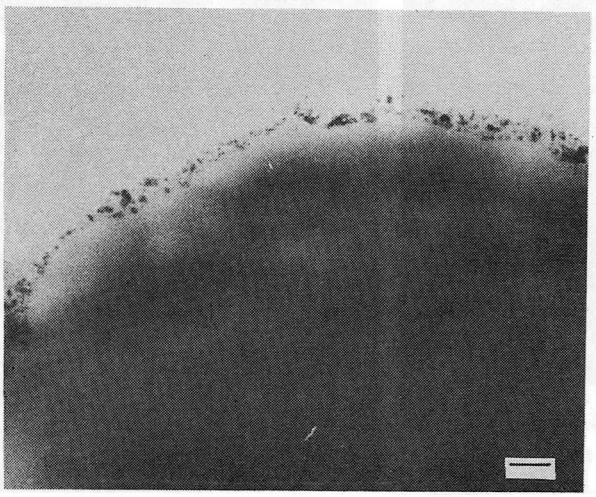
(a) (b)

Fig. 9. Negative staining electron micrograph of (a) multilamellar (x 92,000) and (b) unilamellar liposomes (x 300,000).



(a) (b)

Fig. 10. Freeze-fracture appearance of multilamellar (x 36,000) and (b) unilamellar liposomes (x 60,000).



30 nm

Fig. 11. Negative staining appearance of liposome associated with ferritin-conjugated egg albumin.

EA-coated liposome の懸濁液に Frick and Ishizaka の方法[21]で精製した IgE rich 抗血清 1μg/ml を加えると、速やかに liposome から histamine が遊離される。Fig. 2 に示した方法によって histamine を含有し、EA で被覆した liposome を PBS で灌流した際、灌流液中に遊離してくる histamine の out put がほぼ一定の level に達したときの histamine 遊離量を 100 % として、抗体添加後の histamine 遊離の時間経過を Fig. 12 に示した。liposome は、egg-PC と cholesterol を 1 mg : 0.5 mg の混合比によって作成したものである。抗 EA 抗体を添加した後、直ちに histamine 遊離量は急増し、約 10 分間高い遊離量を維持した後、次第に減少した。

肥満細胞より抽出した全脂質を用いて liposome を作成し、同様の実験を行った際の抗原抗体反応による histamine 遊離の結果を Fig. 13 に示した。egg-PC と cholesterol で作成した liposome の場合に比較すると、はるかに高い hist-amine 遊離率を示した。なお、この際に使用した肥満細胞から抽出した全脂質組成を Table 1 に示してある。この脂質組成比は、Strandberg and Westerberg によって報告された値[32]と良く一致した。肥満細胞の全脂質量は 43.2 ± 2.97

μg/10⁶ cells であり、cholesterol 量は 7.45 ± 0.24 μg/10⁶ cells であった。

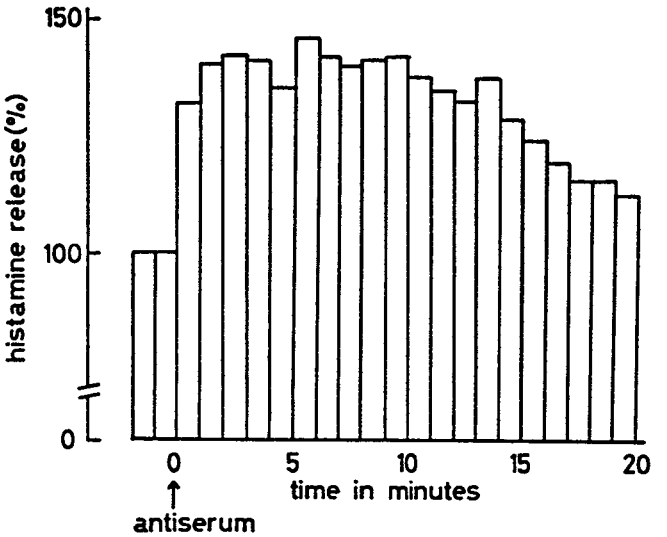


Fig. 12. Histamine release from antigen-coated liposomes elicited by antibody exposure. Liposomes were prepared by a mixture of phosphatidyl-choline and cholesterol.

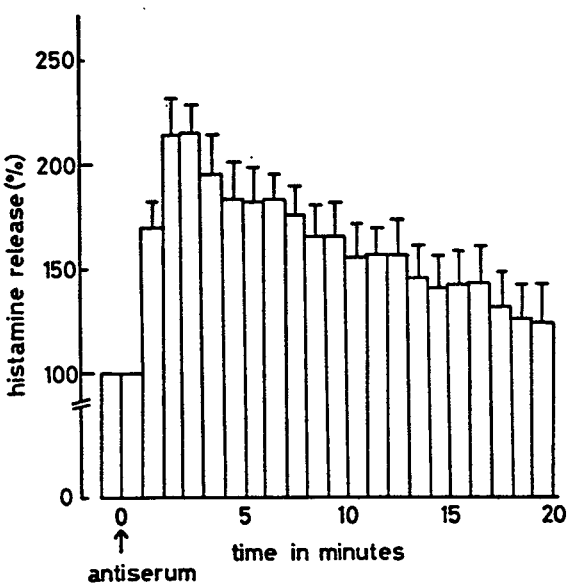


Fig. 13. Histamine release from antigen-coated liposomes elicited by antibody exposure. Liposomes were prepared by sonication of the total mast cell lipids.

phospholipid	percentage ± S.E.M
phosphatidylethanolamine	34.0 ± 0.91
phosphatidylserine + phosphatidylinositol	14.8 ± 0.55
phosphatidylcholine	33.0 ± 0.98
sphingomyelin	13.5 ± 0.44
lysophosphatidylcholine	0.5 ± 0.04
others	4.7 ± 0.56

Table 1. Phospholipid composition of isolated rat peritoneal mast cells.

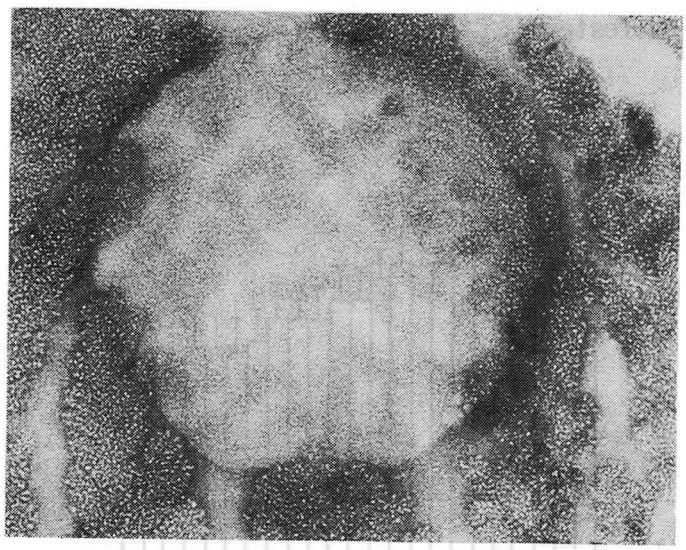


Fig. 14. Negative staining electron micrograph of unilamellar liposome after antigen-antibody reaction (x 72,000).

抗原抗体反応を惹起させた後の liposome の電子顕微鏡像を Fig. 14 に示した。

Fig. 9(b) と比較して、liposome の辺縁は平滑さを失い、pit の形成を示唆する像も観察された。また、2 - 3 個の liposome が融合している像も観察された。

4. compound 48/80 による liposome からの histamine 遊離

egg-PC と cholesterol (1 : 0.5 w/w) で作成した histamine 含有 liposome に種々な濃度の compound 48/80 を 37℃ で 15 分間作用させ、100,000 x g の遠心分離によって分離された上清中の histamine 量を測定した結果を Fig. 15 に示した。縦軸の histamine 遊離率は、上清に遊離された histamine の量を a、histamine の spontaneous な遊離量を b、Triton X-100 によって liposome を破壊して求めた liposome 中の全 histamine 量を c として、次式によって算出した。

% histamine release = 100 x (a - b)/(c - b)

0.5 μg/ml の compound 48/80 の作用下に liposome からの histamine 遊離が観察され、1 μg/ml では約 18 %、5 μg/ml では約 40 % の histamine が lipo-some から遊離された。

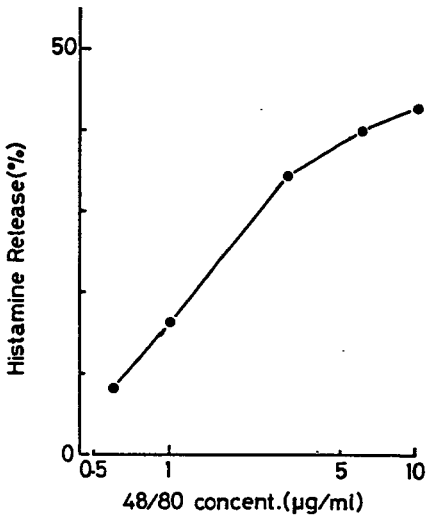


Fig. 15. Liposomal histamine release induced by compound 48/80.

5. liposome の order parameter に及ぼす抗原抗体反応の効果

これまでの実験結果より、肥満細胞からの histamine 遊離を惹起する抗原抗体反応或は compound 48/80 の様な刺激はリン脂質二重層膜に対して直接作用し、リン脂質膜の物理的性質に影響を及ぼしている可能性が示唆されたため、その解析のために、liposome 膜の order parameter を測定した。

前述の方法に従って、egg-PC と cholesterol (1 : 0.5 w/w) を用いて EA-coated liposome を作成し、この liposome suspension に抗 EA IgE rich マウス血清を作用させた際の order parameter の変化を Fig. 16 に示した。抗血清を添加後速やかに EA-coated liposome の order parameter は低下し、liposome のリン脂質二重層膜の流動性が亢進していることが示された。

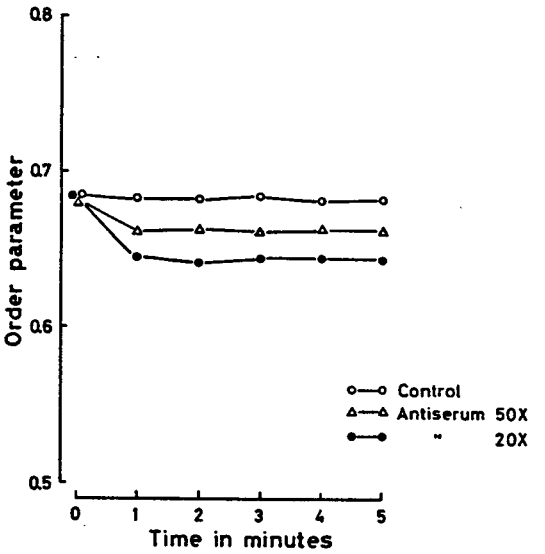


Fig. 16 Changes in order parameter (liposomal membrane fluidity) produced by antigen-antibody reaction.

6. liposome の order parameter に及ぼす compound 48/80 の影響

リン脂質二重層に対する compound 48/80 の直接的な作用について解析を行うために、liposome の order parameter に及ぼす compound 48/80 の作用についても検討した。Table 2 は、その結果をまとめたものである。ここに用いた liposome は、liposome からの histamine 遊離反応の際に用いたものと同じ方法で

作成したものである。EA-coated liposome は、EA で被覆していない liposomeよりも低い order parameter を示した。これは EA の疎水部分が脂質と結合し、脂質二重層に何らかの perturbation が生じた事を示唆している。compound 48/80 を作用させた際、5 x 10^{-6} g/ml の濃度でいずれの liposome においても order parameter の低下が観察され、5 x 10^{-5} g/ml では更に著しい order parameter の低下が見られた。この様な order parameter の減少は、liposome を取り巻く環境の温度を 5 - 10℃ 上昇させた際に観察される変化に対応していた。

liposome	48/80 (g/ml)	before	after 5 min incubation
lipids extracted	$5x10^{-6}$	0.695±0.009	0.659±0.007*
from rat mast cells	$5x10^{-5}$		0.609±0.008**
〃	10^{-6}	0.561±0.005	0.552±0.006
(EA coated)	$5x10^{-6}$		0.543±0.004*
	$5x10^{-5}$		0.520±0.007**
egg-PC+cholesterol	$5x10^{-6}$	0.667±0.006	0.632±0.007*
	$5x10^{-5}$		0.618±0.008**

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ (37℃, pH 7.4)

Table 2. Effect of compound 48/80 on the order parameter of liposomes.

Fig. 17(A) は肥満細胞から抽出した全脂質で作成した liposome、Fig. 17(B) はこれを EA で coat した liposome の order parameter 変化の時間経過を示したものである。compound 48/80 を作用させた後、極めて速やかに反応が進行していることが判明した。

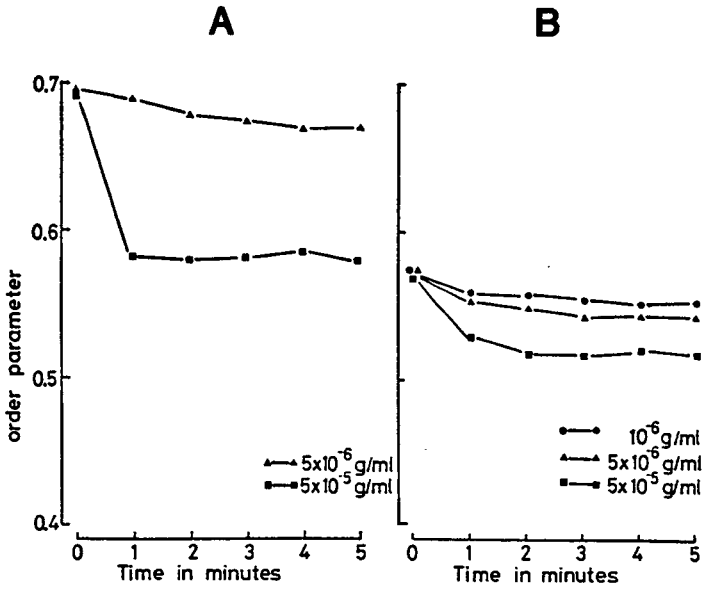


Fig. 17 Effect of compound 48/80 on liposomal membrane fluidity.

[考察]

抗原抗体反応によって BLM の電気抵抗が減少し、histamine 含有 liposome からの histamine 遊離が惹起されたことは、モデル膜で惹起された抗原抗体反応がリン脂質二重層の透過性を亢進させたことを意味する。ここで用いた抗血清は IgE rich の抗血清を Frick and Ishizaka の方法[21]に従って硫安分画して精製したものであり、補体の影響は無視し得るものと考えられる。現に Barfort et al. [26] や Michaels et al. [40]は、通常の IgG rich 抗血清に補体を加えることによって初めて膜抵抗が減少することを報告している。本実験で用いた抗血清は IgE rich であり、PCA titer は 3200 - 6400 倍まで陽性であったことから、本研究に於て観察された膜抵抗の減少は、IgE のみの関与した抗原抗体反応の結果であると考えられる。BLM を IgE rich 抗血清希釈液中で作成すると、IgE の Fc 部分の疎水性領域が BLM に結合するものと考えられる。EA の添加によって抗原と抗体が結合し、その結果、膜構造の歪みないし欠損が生じ、膜透過性が上昇して、抵抗が減少したものと考えられる。リン脂質膜に対する非特異的なタンパ

クの吸着だけでは、この様な膜抵抗の減少が生じないことは、BSA 添加で膜透過が変化しないことから確認されている。liposome に抗原である EA を組み込んだ場合、EA が liposome 膜に一様に分布することは、電子顕微鏡によって確認された。これに IgE rich 抗血清を作用させると、やはり膜透過性亢進による histamine 遊離が観察された。IgE は、元来 Fcε receptor を介して肥満細胞の細胞膜に結合し、polyvalent な抗原と反応して histamine 遊離を惹起するものと考えられているが、ここで見られた現象は、IgE と抗原の結合だけでも liposome 膜の透過性を充分亢進させ得ることを示唆している。二価抗体である IgE と EA の結合によって、EA の高次構造にひずみを生じ、それが EA の入り込んでいる脂質二重層に対してもひずみないしは揺らぎを生じさせ、このひずみを通して liposome 内に trap されていた histamine が liposome 外に流出したものと考えられる。

Haxby et al.[27] や Six et al.[41] は Forssman 抗原或はハプテン化リン脂質 (dinitrophenyl-aminocaproylphosphatidylethanolamine) を組み込んだ liposome を用いて IgG と補体の関与した抗原抗体反応の解析を行っている。彼らの使用した系では、marker として liposome に trap された glucose を liposome から遊離させるのには、補体の添加が必須であったことが示されている。補体系には phospholipase 作用は無い事が知られており、補体の関与による膜透過性の亢進は、何等かの物理的要因による膜障害の結果であると考えられている[42, 43]。本研究に於ては、IgE と抗原との相互作用だけで膜透過性の亢進が生じたことから、IgG と IgE はいずれも二価抗体であるにも関わらず、抗原との結合様式が異なっている可能性が考えられる。即ち、IgE-抗原結合物の形成だけで、脂質二重層の物理的性質の変化を惹起するのに充分であったと考えられる。lipo-someからの histamine 遊離の実験に於て、egg-PC と cholesterol によって作成したliposome よりも、肥満細胞より抽出した全脂質を用いて作成した liposome の方がより高い histamine 遊離率を示したことは、liposome を構成する脂質の heterogeneity と cholesterol 含量の違いによるものと推定される。

Diamant et al. [44] や Tasaka et al. [45]の微小電極法による所見や、蛍光もしくはスピンラベルした compound 48/80 を用いた実験[46, 47]、或は脱顆粒を伴わない histamine 遊離[13, 48]などの所見から、compound 48/80 は肥満細

胞の細胞膜に直接作用して、膜透過性を亢進させ、その結果媒液中より細胞内に流入した Na^+ により、顆粒のヘパリン-タンパク質複合体に静電結合していた histamine が Na^+ とイオン交換して細胞外に放出されると考えられている[4, 49]。compound 48/80 による肥満細胞からの histamine 遊離は、抗原抗体反応における histamine 遊離に類似しているものと考えられており[50, 51]、種々な histamine 遊離物質のうちで最も広く使用されている。BLM や liposome のようなモデル膜系に於ても、compound 48/80 を作用させた際に抗原抗体反応と極めて類似した膜透過性の亢進がみられたという所見は、肥満細胞におけるこれらの作用機序を裏付けるものであると考えられる。また、compound 48/80 の BLM に対する作用には ion 選択性は全くみられず、特定の ion に対する透過性を選択的に上昇させるという ionophore として作用は持っていないことが判明した。

抗原抗体反応や compound 48/80 を作用させた際のいずれでも、liposome の order parameter は低下した。order parameter はリン脂質の脂肪酸側鎖の配列の秩序度を示す parameter であり、規則性が高い配列をしている場合には 1、側鎖が全く random な動きをしている場合には 0 となる。従って、order parameter は、脂質二重層の膜流動性の逆数と考えることも可能である[36]。抗原抗体反応や compound 48/80 のような肥満細胞から histamine 遊離を惹起する条件下では、リン脂質二重層の order parameter が低下する、つまり、膜流動性が上昇するということを意味する。この事は、肥満細胞の細胞膜脂質二重層における膜流動性の亢進に対応するものと考えられる。リン脂質二重層における脂質配列の乱れ即ち、perturbation の生じた部分では膜透過性が亢進するものと考えられる。

抗原抗体反応や compound 48/80 のように肥満細胞からの histamine 遊離を惹起する刺激は、脂質二重層膜に対して作用して膜流動性及び膜透過性を亢進させるが、BLM や liposome と言った non-enzymatic なモデル系でこれらの作用が示されたことは、肥満細胞の細胞膜表面における反応の初期段階にもこの様な物理的性質の変化が生じている可能性を示唆している。能動的に感作した肥満細胞での抗原抗体反応や compound 48/80 によって生じる histamine 遊離反応は、数秒以内に plateau に達する立ち上がりの速い反応である。従って、これを仲介する細胞膜を介した情報伝達機構も速やかに進行する機構が必須であるとされてきている。これまで種々な機構が仮説として提唱されてきているが、何段階にもわた

る酵素反応を仮定したリン脂質メチル化の様な考え方[6]はこの反応の立ち上がりを説明することが困難である。しかし、肥満細胞の細胞膜表面に於て、抗原抗体反応や compound 48/80 による膜透過性・膜流動性の亢進が、non-enzymatic に生じていることは確実であると考えられ、これが立ち上がりの速い histamine遊離反応の初期過程の少なくとも一部を説明しうるものであると考えられる。

第Ⅲ章　モデル膜の流動性に及ぼすメチル化リン脂質の影響

［緒言］

肥満細胞からの histamine 遊離反応においても、細胞膜の表面における刺激の認識とそれに続く細胞膜を介した情報伝達が生じるものと想定されている。細胞膜を介した情報伝達系において、細胞膜リン脂質のメチル化が生じ、これがhist-amine 遊離を開始させる trigger になるという仮説が報告された[2, 6]。即ち、肥満細胞の細胞膜表面において抗原抗体反応が生じると、細胞膜リン脂質二重層の内部において phosphatidylethanolamine (PE) のメチル化が生じ、細胞膜の流動性が上昇するというものである。この仮説に対しては、これが提唱された当初から、膜流動性の亢進を説明するにはメチル化されるリン脂質の量が余りにも少ない事[7]や、立ち上がりの速やかな histamine 遊離を説明するには PE の N-メチル化速度が遅い事などの批判が続いていた[7, 8]。また、数種の細胞系において、リン脂質メチル化は刺激応答の process においては生じないということも指摘されていた[8, 9, 52]。しかし、この様な一連の議論の中で、PE のメチル化誘導体である N-methyl PE (MPE), N,N-dimethyl PE (DMPE) が実際に細胞膜の流動性を亢進し得るか否かの検討を行った例はなく、リン脂質メチル化と細胞膜流動性の亢進の間の相関についての検討は十分に行われていなかった。

本章においては PE のメチル化誘導体が本当にリン脂質二重層の流動性を亢進させるか否かの検討を行うため、N-メチル化された PE 誘導体を含有する種々な liposome を作成し、示差走査熱量分析と蛍光偏光解消法による解析を行った。

［実験方法］

1．示差走査熱量分析

リン脂質二重層のモデルである liposome は、dipalmitoylphosphatidylcho-line (DPPC), DMPE, MPE, PE 及びラット好塩基球白血病細胞 (RBL-1) より抽出した全脂質を用いて作成した。RBL-1 からの脂質の抽出は、Bligh and Dyer [53] の方法に従って行った。リン脂質メチル化反応はリン脂質の親水基の部分に生じる反応であり、脂肪酸側鎖とは全く無関係に進行すると考えられる反応である。従って、合成リン脂質を用いて実験を行う際には、全てのリン脂質の側鎖は

二本の palmitic acid よりなる dipalmitoyl 誘導体を用いた。合成リン脂質である DPPC, DMPE, MPE, PE がいずれも 99 % 以上の純度を持つことを TLC によって確認し、実験に供した。何れの脂質を用いる場合においても、脂質の均一な混合を行うために chloroform に 5 mg/ml の濃度になるように溶解させた後、種々な比率で脂質を混合した。これを 5 mg/test tube となるように分注し、減圧下に脂質を乾固させた。これに 200 μl の physiological buffered salt solution (in mM; NaCl 154, KCl 2.7, $CaCl_2$ 0.9, HEPES 5; pH 7.2: PBS) を加え、脂質の相転移温度よりも 5℃ 高い温度において 1 分間の超音波処理を行い、multi-lamellar liposome の懸濁液を作成した。この 20 μl を aluminum 製の sample pan に封入し、正確に秤量した後、Perkin-Elmer 製 DSC-2c を用いて 5℃/min の scan speed で示差走査熱量分析を行った。同一の sample について少なくとも 3 回の scan を行い、脂質の相転移 peak の再現性を確認した。

2. 蛍光偏光解消法

本章では、リン脂質メチル化の脂質二重層に対する効果をリン脂質の親水性領域、疎水性領域のそれぞれで検討する目的で、2- もしくは 16-(9-anthroyloxy)-palmitic acid (2-AP, 16-AP) を蛍光 probe として用いた。2-AP の分子運動は親水性領域、16-AP の場合は疎水性領域の膜流動性を反映しうる[54, 55]。2-AP, 16-AP はいずれも 3 μM の濃度で PBS に suspend して使用した。

種々な濃度で混合したリン脂質の chloroform 溶液 (2.5 mg/test tube) を減圧下に乾固させた。これに PBS に suspend させた 2-AP もしくは 16-AP 溶液 2.5 ml を加え、リン脂質の相転移温度よりも 5℃ 高い温度において 20 分間の超音波処理を行った。超音波処理の後、liposome 懸濁液を室温にて 1 時間静置したのちに蛍光測定を行った。2-AP, 16-AP いずれの場合にも蛍光発色団である 9-anthroyloxy 基は周辺環境の疎水性が高い場合に強い蛍光を発するが、水溶液中では殆ど蛍光を発することはなく、脂質膜外に存在する 2-AP, 16-AP による蛍光は、無視できる程度であった。蛍光偏光解消法は、Hitachi 650-10S 蛍光分光光度計に Polacoat 社製の偏光フィルターを組み込んだ系で測定した。励起光の波長は 365 nm, 蛍光波長は 470 nm を使用した。蛍光分光光度計の光学系における偏光性を補正した後、励起光の偏光方向に平行な蛍光の強度を $I_{//}$、垂直に偏光

した蛍光の強度を $I_{\perp}$ として、定常光励起条件下における蛍光の偏光度（P）を次式により算出した。

$$P = (I_{/\!/} - I_{\perp})/(I_{/\!/} + I_{\perp})$$

蛍光偏光度の温度依存性を測定する際には、蛍光分光光度計のセルホルダーを恒温水循環装置によって一定の温度に保ちながら、0.5℃/min の heating rate で昇温を行った。

［実験結果］

Fig. 1 に示したように、DPPC の相転移温度は 41.6℃ であり、MPE の相転移温度は 59.1℃ であった。いずれの場合にも相転移には吸熱反応を伴った。DPPC と MPE を種々な割合で混合した liposome の場合には、DPPC と MPE の相転移温度の間で単一の吸熱 peak を示したが、DPPC あるいは MPE 単独の liposome の

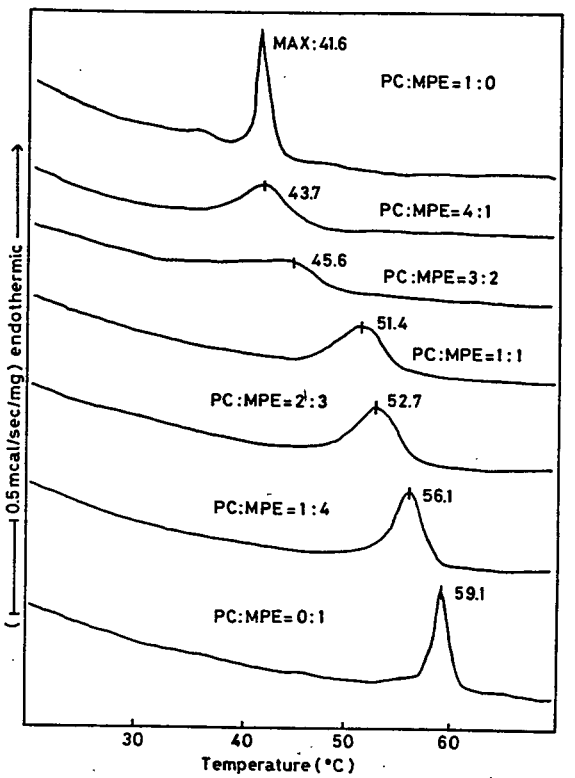


Fig. 1 Calorimetric scans of the liposomes made of DPPC and dipalmitoyl MPE in various molar ratios.

場合に比較して、broad で低い peak を示した。この所見は、DPPC と MPE の混合物がどの様な混合比においても均一な固溶体を形成し、相分離を示さない事を示唆している。

Fig. 1 の結果に基づいて作成した DPPC と MPE の混合 liposome の相図が Fig. 2 である。相図は単一の幅の広い spindle shape となり、DPPC と MPE が gel 相においても液晶相においても互いに均一に混合し合うことを示している。

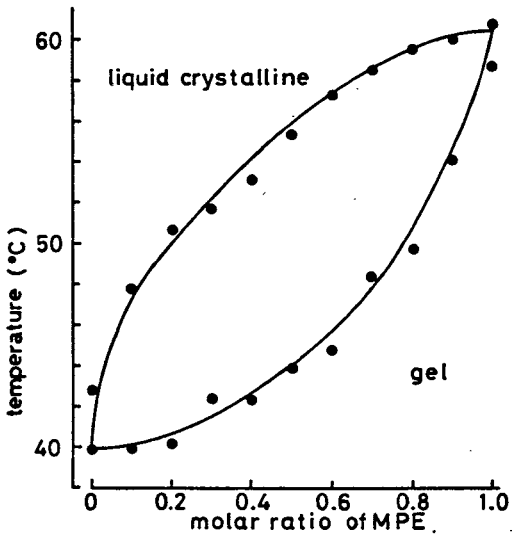


Fig. 2 Phase diagram of the mixture of DPPC and dipalmitoyl MPE.

DMPE, PE の相転移温度はそれぞれ 48.6℃、63℃ であった。MPE と PE あるいは DMPE と DPPC の混合 liposome においても、DPPC と MPE の混合 liposome の場合と同様な結果が得られたが、相図の spindle はより狭いものとなった。これは、混合するリン脂質の相転移温度の差が、DPPC と MPE の場合には 17.5℃ であったのに、MPE と PE では 3.9℃、DMPE と DPPC では 7.0℃ と狭いためであると考えられた。

RBL-1 細胞からの抽出脂質を用いて作成した liposome を用いて示差走査熱量分析を行ったところ、5℃ から 75℃ の範囲内では、吸熱或は発熱いずれの方向でも peak は全く出現せず、MPE や DMPE を添加した際の効果を判定することも困難であった。

N-メチル化 PE のリン脂質二重層膜流動性に及ぼす効果を検討するために、liposome の膜内に挿入された 2-AP あるいは 16-AP の蛍光偏光度の測定を行った。Fig. 3 は DPPC と MPE の混合 liposome を用いた場合の結果である。

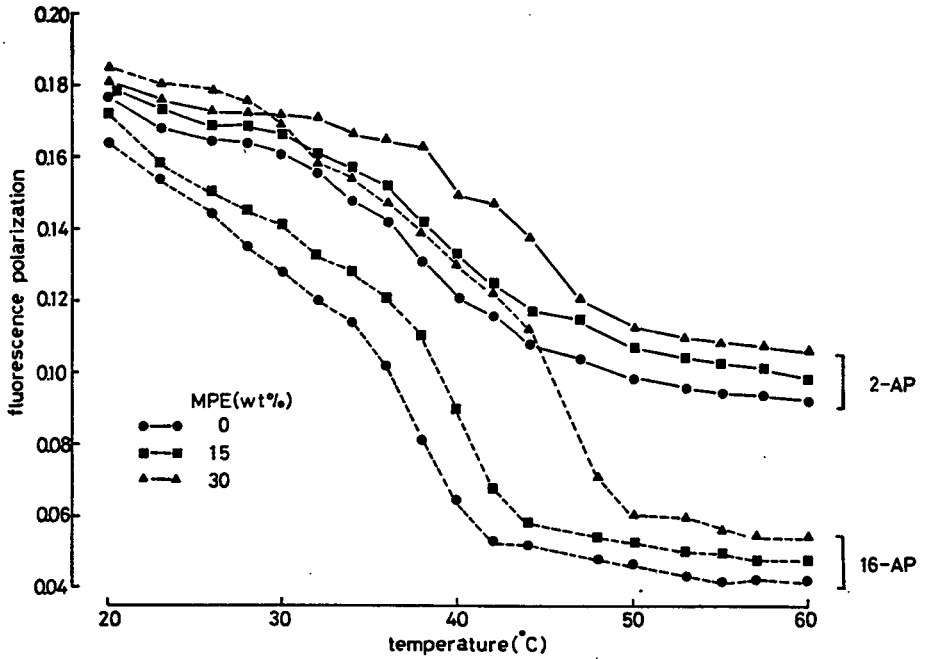


Fig. 3 Temperature dependency of the fluorescence polarization of 2- or 16-AP incorporated into the liposomes of DPPC and dipalmitoyl MPE.

一般に、2-AP で得られる蛍光偏光度は、16-AP で得られるものよりも高い値を示した。DPPC 単独で作成した liposome においては、温度の上昇とともに偏光度は低下し、特に、相転移温度付近では急激に大きく低下した。liposome を構成する MPE の比率を上昇させると、2-AP、16-AP 何れの場合においても全ての温度領域で偏光度の上昇が観察された。この事は、MPE の混合によって DPPC 単独の場合と比較して、脂肪酸側鎖の配列は規則性を増し、脂質二重層の流動性が低下した事を示している。これに対し、MPE を PE に添加して作成した liposome の場合には、Fig. 4 に示したように、liposome の膜流動性は、PE 単独の場合と比較して、殆ど変化しなかった。

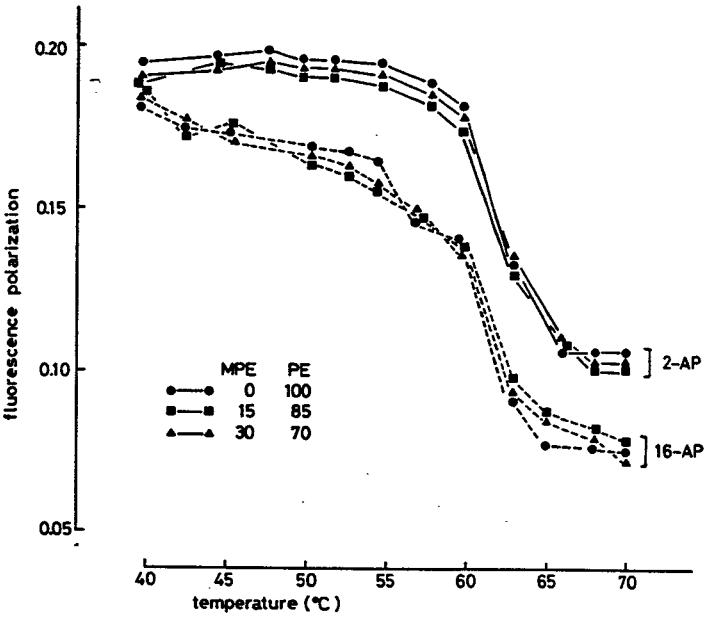


Fig. 4 Temperature dependency of the fluorescence polarization determined with 2- or 16-AP incorporated into the liposomes made of dipalmitoyl PE and dipalmitoyl MPE.

[考察]

蛍光偏光解消法で用いた蛍光 probe の 2-AP と 16-AP は共通の蛍光発色団である 9-anthroyloxy 基を palmitic acid 側鎖に持っている。2-AP の場合には 9-anthroyloxy 基は palmitic acid の 2 位に結合しており、脂質二重層内における 2-AP の蛍光偏光度は、リン脂質二重層の親水性領域の膜流動性を反映する。一方、16-AP は palmitic acid の 16 位に蛍光発色団を有しているために、その蛍光偏光度はリン脂質二重層の疎水性領域の流動性を反映している[55]。2-AP と極めて類似した 2-(9-anthroyloxy)stearic acid (2-AS) と 16-AP の蛍光偏光度を、等方的な溶媒である paraffin oil 中で比較した報告によれば、16-AP の蛍光偏光度は常に 2-AS よりも低い値を示すことが報告されている[56]。従って、本章の実験において 16-AP による蛍光偏光度が 2-AP の場合よりも低い値を示したことは、脂質二重層内における蛍光発色団の位置の違いだけによるものではなく、これら 2 種類の蛍光 probe の性質の違いに起因したものもあると考えられ

る[56, 57]。

MPE は親水性領域・疎水性領域のいずれにおいても、DPPC liposome の膜流動性を低下させ、脂質配列の規則性を上昇させる効果を示したが、PE liposome の膜流動性に対しては殆ど作用しなかった。DPPC と dipalmitoyl MPE の化学構造上の差異は親水性の頭部にある。DPPC は choline 基を有しており、その構造は (N,N,N-trimethylethanolamine) であり、MPE では N-methylethanolamine である。従って、DPPC の方が MPE よりもメチル基二つ分だけ大きい親水性基を有していることになる。このため、DPPC 単独の場合よりも DPPC の大きな頭部は MPE の比較的小さい頭部と混じり合って密な packing を作成しうるものと考えられる。DPPC + MPE liposome では、DPPC 単独 liposome の場合に比較してより高い蛍光偏光度を示したのはこの様な理由によると推察される。しかし、PE に MPE を添加した liposome では、Fig. 4 に示した様に、リン脂質二重層の膜流動性は殆ど変化しなかった。これは、リン脂質頭部の大きさの差がメチル基一つ分しかないことによるものと考えられる。また、この事は、MPE と PE の相転移温度がそれぞれ 59.1℃、63℃と、極めて近接していたこととも良く一致する。

DPPC liposome の液晶相に及ぼす MPE の効果は流動性を低下させるものであり、この様な効果は、リン脂質二重層に対して膜安定化効果を発揮することの知られている局所麻酔薬の作用とも類似していた[58]。Hirata ら[6]は、リン脂質メチル化反応は phospholipase A_2 の活性化を促すとしているが、局所麻酔薬の膜安定化効果は、逆に phospholipase A_2 の活性を抑制することが知られており[58]、この点からも、メチル化反応が流動性を亢進するという仮説には難点がある。

S-adenosyl-methonine を基質としたメチル化反応が細胞膜で生じているということが、リン脂質メチル化反応の一つの根拠となっている。しかし、S-adenosyl-methionine を基質としたメチル化反応は必ずしもリン脂質だけにしか起こらない反応ではなく、タンパク質の carboxy-methylation も生じることが知られている[59]。タンパク質のメチル化反応も細胞膜の流動性に影響を及ぼす可能性は否定できない。

本章における解析の結果、PE の N-メチル化はリン脂質二重層の脂質配列の規則性を上昇させ膜流動性を低下させるという、膜安定化効果を発揮することが示された。同様な効果は、細胞膜のリン脂質二重層においても生じる可能性が考え

られる。しかし、ラット肥満細胞膜における刺激応答の結果として産生される MPE 量が極めて少ないこと[7]、ないしは殆ど産生されないこと[9]が報告されており、実際の細胞で産生される MPE が細胞膜に対する安定化効果を発揮するか否かを明らかにすることは現在の所困難である。

第IV章　肥満細胞からの histamine 遊離に及ぼす lysophosphatidylcholine の作用

［緒言］

抗原抗体反応や種々な histamine 遊離物質によって惹起される肥満細胞からの histamine 遊離反応においては、細胞膜におけるリン脂質代謝回転の亢進が重要な役割を担っていることが示唆されている[2, 6]。肥満細胞が適当な刺激を受けた際惹起される phospholipase A_2 の活性化は、リン脂質に作用して arachidonic acid とその一連の代謝物（arachidonic cascade）を生ずることで特に重要視されている。しかし、この酵素の活性化は生化学的にも重要な意義を持つ lyso-リン脂質も生ずる。特に lysophosphatidylcholine（lyso-PC）は細胞膜流動性を亢進させる可能性が指摘されており[6]、その他、細胞膜と顆粒膜の融合を促進する原因物質であることも示唆されている[60, 61]。更に、phospholipase A_2 や lyso-PC によって惹起される histamine 遊離反応においては、micelle 形成に起因する細胞膜破壊が強調されている[62]。しかし、肥満細胞の細胞膜内における lyso-PC の含量は僅かであり[32]、細胞の活性化の過程で産生される lyso-PC の量も、細胞膜の内部で micelle 形成を起こしうる程高くないと考えられる。この様な点から、肥満細胞からの histamine 遊離反応における lyso-PC の役割について解析を行った。

［実験方法］

<u>ラット腹腔肥満細胞からの histamine 遊離</u>

前述の方法により、Wistar 系雄性ラット（250 - 300 g）より肥満細胞を 95 % 以上の純度で単離し、PBS で 2 回洗浄した後、以下の実験に供した。

ラット腹腔肥満細胞浮遊液を種々な濃度の lyso-PC と 37℃、10 分間 incuba-tion を行った後、0.5 μg/ml の compound 48/80 を加え、更に 10 分間 incu-bation を行った。氷冷により反応を停止させ、100 x g, 4℃, 10 分間の遠心分離によって細胞と上清を分離し、上清中に遊離した histamine 量と細胞に残存した histamine 量をそれぞれ Shore の方法[31]に従って蛍光定量し、histamine 遊離率を求めた。なお、lyso-PC としては 1-palmitoyl-L-α-lyso-PC を用いた。

ラット腹腔肥満細胞の ^{45}Ca uptake

ラット腹腔肥満細胞への ^{45}Ca uptake は、Spataro et al. の方法[63]に準じて測定した。95 % 以上の純度で単離したラット腹腔肥満細胞 2.5 x 10^5 cells を、1.35μCi の ^{45}Ca と 37℃, 1 分間の incubation を行った後、種々な濃度の lyso-PC を加えて 15 分間 incubation を続けた。これに 0.5μg/ml の compound 48/80 を加えて更に 5 分間 incubation を続けた。氷冷によって反応を停止させた後、細胞を PBS にて 2 回洗浄し、10 % Triton X-100 を作用させて細胞を可溶化した。これに 5 ml の液体シンチレーター (New England Nuclear, ATOMLIGHT) を加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-700) によって測定した。

ラット腹腔肥満細胞への ^{14}C-lyso-PC の取り込み

単離肥満細胞 (10^6 cells/tube) を 1-(1-^{14}C)-palmitoyl lyso-PC (0.46μCi/tube, 4μM in PBS) と 37℃, 15 分間の incubation を行って ^{14}C-lyso-PC を取り込ませた。氷冷によって反応を停止させた後、細胞を PBS によって 2 回洗浄した。肥満細胞からの全脂質の抽出は Bligh and Dyer の方法[53]によって行い、抽出した脂質を Silica gel G plate に apply した。$CHCl_3$:MeOH:AcOH:H_2O (30:15:4:1) の組成を持つ展開溶媒で展開した後、plate を 30 fractions に分割し、各 fraction を $CHCl_3$:MeOH (2:1) で抽出した。有機溶媒層に液体シンチレーター (New England Nuclear, ATOMLIGHT) を加え、放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

liposome からの carboxy fluorescein (CF) 遊離

CF 含有 liposome は、egg yolk phosphatidylcholine (egg-PC) と cholesterol を用いて、Klausner et al. [64] の変法により作成した。即ち、100 mM の CF を含む HEPES buffered saline (in mM; NaCl 154, HEPES 5; pH 7.4) 中に egg-PC と cholesterol (5 : 1) を加え、氷冷下で 20 分間の超音波処理を行うことにより sonicated liposome を作成した。これを Sepharose 4B カラム (2.5 cmφ x 30 cm) に apply して HEPES buffered saline で溶出することによって liposome に trap されない CF を除去し、CF を trap した unilamellar

な liposome だけを選択的に集めた。この liposome 懸濁液に種々な濃度の lyso-PC を加え 37℃, 5 分間の incubation を行い、その後、compound 48/80 を媒液中に添加した。CF が liposome に取り込まれている状態では、liposome 内の CF の濃度は極めて高く、CF 分子間の self-quenching のために全く蛍光を発しない。しかし、liposome から compound 48/80 の作用下に CF が遊離してくると、CF は self-quenching から解放され、強い蛍光を発するようになる。従って、励起波長 470 nm、蛍光波長 515 nm で CF liposome 懸濁液の蛍光強度の変化を記録することにより、liposome からの CF の遊離の時間経過が記録できる[64]。

蛍光偏光解消法による liposome の膜流動性の測定

liposome の膜流動性は、第Ⅲ章に記述した方法に従って 2- もしくは 16-(9-anthroyloxy)palmitic acid (2-AP, 16-AP) を蛍光 probe として用いて測定した。種々な濃度の lyso-PC を含有する dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を、3 μM の 2-AP 或は 16-AP を含む PBS 中で超音波処理を行って liposome を作成した。励起波長 375 nm、蛍光波長 470 nm にて蛍光偏光度の測定を行った。励起光の偏光方向に平行に偏光した蛍光強度を $I_{/\!/}$、垂直に偏光した蛍光強度を $I_{\perp}$ とし、次式によって蛍光の偏光度を算出した[54, 65]。

$$P = (I_{/\!/} - I_{\perp}) / (I_{/\!/} + I_{\perp})$$

ラット赤血球の低張溶血

ラット赤血球の低張溶血に及ぼす lyso-PC の効果は、Seeman and Weinstein [66] の変法によって判定した。hypotonic buffer (in mM; NaCl 68, HEPES 5; pH 7.4)として、70 % hemolysis を生じる浸透圧の溶液を用いた。種々な濃度の lyso-PC を含む hypotonic buffer 中にラット赤血球を加え、37℃, 5 分間の incubation を行ったのち、200 x g, 4℃, 10 分間の遠心分離を行い、上清の 543 nmにおける吸光度を測定した。実験結果は hypotonic buffer 中にて生じる control の溶血 (70 % 溶血) を 1 とした相対値で表示した。

lactate dehydrogenase 活性の測定

Percoll 密度勾配遠心分離法によって単離したラット腹腔肥満細胞 (5×10^5 cells/tube) を PBS に浮遊させた後、種々な濃度の lyso-PC を加えて 37℃、15 分間の incubation を行った。氷冷によって反応を停止させた後、100 x g, 4℃, 10 分間の遠心分離によって細胞と上清を分離した。上清と細胞中の LDH 活性を以下の方法によって測定した。分離された細胞には 1 ml の PBS を加え、氷冷下 15 秒間の超音波処理によって破壊し、LDH 活性の測定に供した。

LDH 活性の測定には試料と等容量の assay solution (0.6 mM pyrubate, 0.38 mM NADH, 50 mM phosphate buffer, pH 7.5) を加え、35℃, 2 分間の preincubation の後、基質である pyruvate が lactate へと還元される反応にともなって NADH が NAD^+ へと変換される過程を 340 nm の吸光度によって記録した。LDH 活性は Wroblewski and LaDue [67] に従って、次式により求めた。

$$\text{LDH activity} = -1720 \times \Delta E(340\ \text{nm})/2\ \text{min}$$

lyso-PC の critical micelle concentration (CMC) の測定

CMC の測定は、hydrophobic fluorescent probe である 1-anillino-8-naphthalene sulfonate (ANS) を用いて行った。micelle が形成され環境の疎水性が上昇すると ANS の量子収率が上昇し、強い蛍光を発するようになる。

種々な濃度の lyso-PC を PBS に溶解した後、10 μM の濃度になるように ANS を添加し、37℃ にて励起波長 375 nm、蛍光波長 485 nm で蛍光強度の測定を行った。蛍光強度を lyso-PC の濃度に対して plot し、蛍光強度が急激に立ち上がる濃度を CMC とした[68]。

肥満細胞の viability の測定

肥満細胞の viability は、0.2 % の Trypan blue を使用した dye exclusion test によって確認した。

ラット腹腔肥満細胞のリン脂質組成の分析

Percoll 密度勾配遠心分離法によって 95 % 以上に purify したラット腹腔肥満細胞より、前述のように、Strandberg & Westerberg [32] の方法に従ってリン

脂質の抽出を行い、Bertlett [33] の方法によりリン脂質組成の分析を行った。

[実験結果]

肥満細胞を lyso-PC と incubation を行った際、4μM 以下の濃度においては、肥満細胞からの spontaneous な histamine 遊離にはなんら影響はなかった。しかし、compound 48/80 によって惹起された肥満細胞からの histamine 遊離は、4μM 以下の lyso-PC によって濃度依存的に抑制された。lyso-PC の濃度が 4μM を超えると、逆に lyso-PC 単独でも著明な histamine 遊離を惹起した (Fig. 1)。

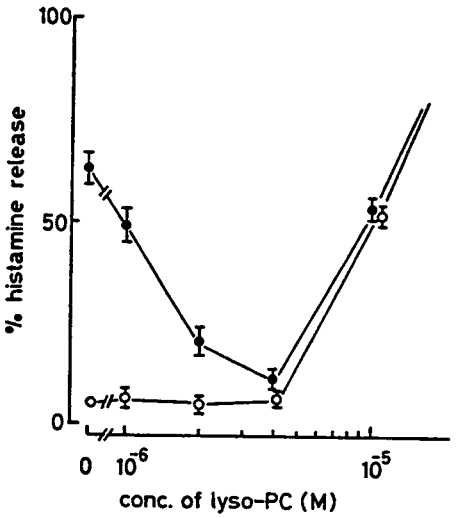


Fig. 1 Effect of lysophosphatidylcholine on the histamine release from isolated rat peritoneal mast cells due to compound 48/80 (0.5μg/ml).

肥満細胞において lyso-PC の代謝によって生成されることが予測される palmitic acid や phosphatidylcholine は、いずれも 100μM の濃度まで作用させても、spontaneous な histamine 遊離に対しても compound 48/80 によって惹起された histamine 遊離に対しても、全く影響を示さなかった。また、肥満細胞への ^{45}Ca uptake は compound 48/80 の作用下に control (387.8 ± 19.6 dpm/10^6 cells, n=6) の約 2.5 倍に上昇した (986.4 ± 25.7 dpm/10^6 cells, n=6,

$p < 0.01$)。この効果は、4μM 以下の lyso-PC によって濃度依存的に抑制された。特に 4μM の濃度においては、lyso-PC による抑制効果は最大となり (403.7 ± 21.8 dpm/10^6 cells, n=6, $p < 0.01$)、^{45}Ca uptake は control level にまで抑制された。

^{14}C-lyso-PC をラット腹腔肥満細胞と incubation した後に、肥満細胞の全リン脂質を抽出して lyso-PC の代謝による ^{14}C 放射活性の他の fraction への移動を検討した結果、37℃、15 分間の incubation という条件下においては大部分の放射活性が lyso-PC fraction にとどまっており、palmitic acid 及び phosphatidylcholine fraction へ移行した放射活性は僅かしかなかった (Fig. 2)。

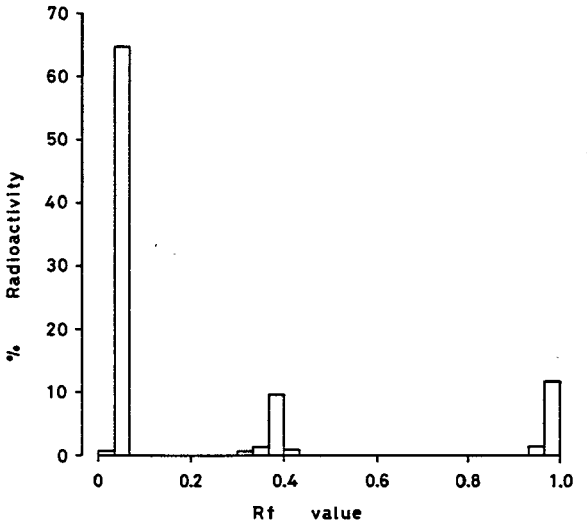


Fig. 2 Distribution of ^{14}C-radioactivity in phospholipid fractions extracted from rat mast cells. R_f values of authentic samples were as follows: lyso-PC 0.05, phosphatidylcholine 0.38, palmitic acid 0.98.

lyso-PC の histamine 遊離抑制効果の機序を検討するために、モデル膜を用いて lyso-PC の膜作用について検討した。CF 含有 liposome を作成し、これに compound 48/80 を作用させると、速やかに CF 遊離が生じる。しかし、4μM 以下の lyso-PC を前処置させることによって、CF 遊離は濃度依存的に抑制された (Fig. 3)。

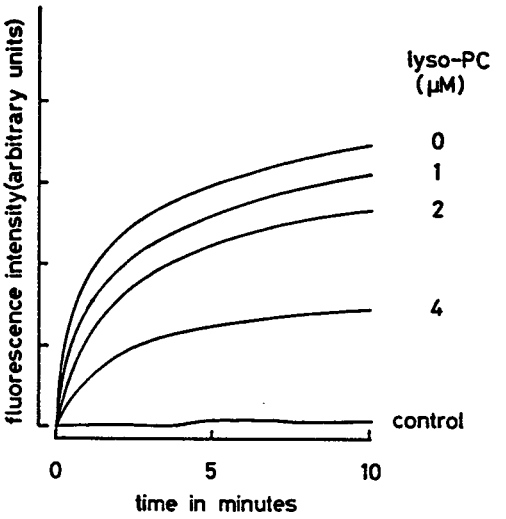


Fig. 3 Effect of lysophosphatidylcholine on the carboxy fluorescein release from liposomes induced by compound 48/80 (5μg/ml).

Fig. 4 は liposome のリン脂質二重層の膜流動性に対する lyso-PC の効果について検討したものである。蛍光偏光度はリン脂質二重層中での蛍光 probe の配向状態を示しており、偏光度が高いほど蛍光 probe の分子運動が制限されており、偏光度が低いと脂質二重層の流動性が高いことを示している。

DPPC 単独で作成した liposome においては、温度の上昇にともなって、2-AP, 16-AP いずれの蛍光偏光度も DPPC の相転移温度付近において、急激で大きな減少を示した。lyso-PC を添加して作成した liposome においては、30℃ 以下の gel 状態においては 2-AP, 16-AP いずれの蛍光偏光度も低下させ、膜流動性を上昇させていることが示された。一方、DPPC の液晶状態においては、lyso-PC は 2-AP, 16-AP の蛍光偏光度を上昇させ、膜流動性を低下させていることが示された。この効果は liposome に添加する lyso-PC の用量に依存していた。

以上の検討から lyso-PC の作用がリン脂質二重層に対する膜安定化作用である可能性が示唆されたため、膜安定化効果の指標として知られているラット赤血球の低張溶血に対する阻止効果[66]について検討した。Fig. 5 に示したように、4 μM 以下の lyso-PC は濃度依存的に赤血球の低張溶血を阻止したが、それ以上の

濃度においては逆に溶血を促進することが示された。

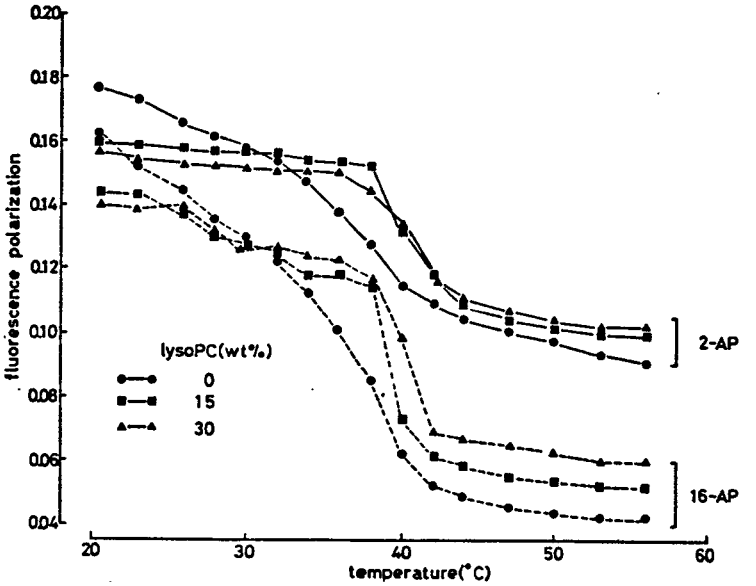


Fig. 4 Temperature dependency of the fluorescence polarization of 2- or 16-(9-anthroyloxy)palmitic acid incorporated into the liposomes made of dipalmitoylphosphatidylcholine and 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine. ● (DPPC : lyso-PC = 100 : 0), ■ (DPPC : lyso-PC = 85 : 15), ▲ (DPPC : lyso-PC = 70 : 30).

lyso-PC は、4μM 以下の場合とそれ以上の濃度では、この様に相反する効果を発揮する。この問題について検討するために、ANS を用いて臨界ミセル濃度を推定したところ、7μM という値が得られた。また、肥満細胞を種々な濃度の lyso-PC と incubation を行い、細胞質の marker enzyme である LDH の遊離について検討したところ、4μM 以下の lyso-PC では殆ど LDH の遊離は観察されなかったが、7μM 以上の lyso-PC によって、急激に LDH の遊離が生じることが示された (Fig. 6)。

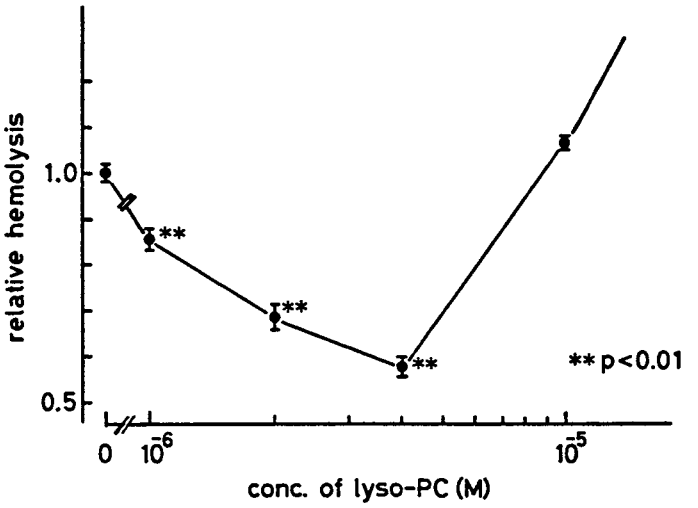


Fig. 5 Influence of lysophosphatidylcholine on hypotonic haemolysis.

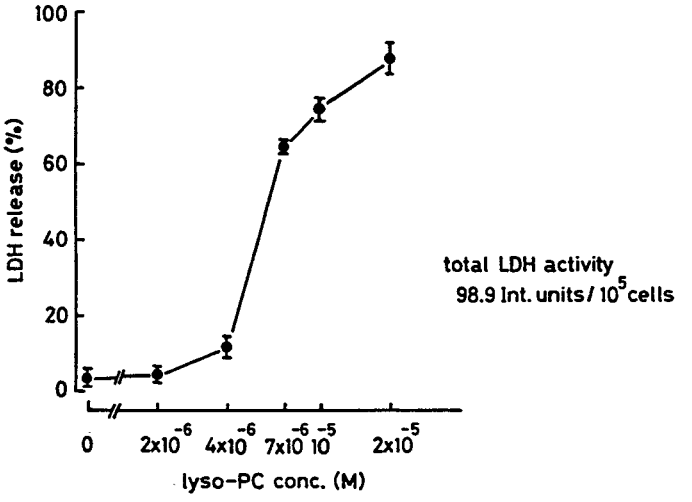


Fig. 6 LDH release induced by lysophosphatidylcholine from rat peritoneal mast cells.

同様の結果は Trypan blue を用いた dye exclusion test によっても示され、

4μM 以下の lyso-PC 処理による肥満細胞の viability は 95 % 以上であったが、10μM の lyso-PC 処理によってほぼ 100 % の細胞が damage を受けていた。

compound 48/80 の作用下に phosphatidylserin + phosphatidylinositol の僅かな上昇傾向と、lyso-PC がやや減少する傾向がみられたものの、差は極めて小さく、compound 48/80 の作用下に肥満細胞のリン脂質組成は殆ど変化しないことが示された。

phospholipid	% composition		
	control	48/80 treated group	
		5 min	15 min
phosphatidylethanolamine	34.0±1.31	34.2±1.56	34.0±1.79
phosphatidylinositol + phosphatidylserine	14.7±0.065	12.9±0.654	16.4±0.844
phosphatidylcholine	33.0±1.55	33.0±2.32	32.2±1.33
sphingomyelin	13.5±0.575	14.5±1.02	14.4±0.664
lysophosphatidylcholine	0.5	not detectable	0.4
others	4.7±1.18	4.4±1.27	3.1±0.64

Table 1. Changes in phospholipid composition of rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 (0.5 μg/ml).

[考察]

肥満細胞からの histamine 遊離反応においては、lyso-PC が界面活性作用を発揮して細胞膜に障害を生じ、これが histamine 遊離の原因となるという事を示唆

する多くの報告がある[2, 6, 69]。histamine 遊離の初期過程において、肥満細胞の lyso-PC 含量が上昇することや、phospholipase A_2 によって histamine遊離が惹起されることが、この作業仮説の一つの根拠となっている[60, 62, 70]。この場合、phospholipase A_2 は肥満細胞からの histamine 遊離反応における key enzyme であると想定されている[6, 69]。しかし、肥満細胞の活性化にともなって細胞膜で生成される lyso-PC の量が、細胞膜の破壊を生じるほどの濃度に達し得るか否かについての直接的な証拠は、全く示されていない。

肥満細胞とリン脂質二重層に対する lyso-PC の直接作用について検討した結果、lyso-PC は 4μM 以下の低濃度では compound 48/80 により惹起される肥満細胞からの histamine 遊離及び ^{45}Ca の取り込みを抑制した。この事から、lyso-PC がこれまで指摘されていたような histamine 遊離に対する促進的な因子というよりも、細胞外からの刺激に対する内在性の防御因子である可能性が高いことが示唆された。

肥満細胞における lyso-PC の代謝経路は、アシル化反応による phosphatidyl-choline への変換、或は脱アシル化反応による脂肪酸の遊離であると考えられる。本研究において ^{14}C-lyso-PC を肥満細胞と incubation して肥満細胞に取り込まれた lyso-PC の代謝を検討した結果、本実験条件下においては代謝される lyso-PC の量は僅かであり、細胞外から作用させた lyso-PC はほとんどが lyso-PC のままで細胞膜に存在することが示された。しかも、phosphatidylcholine や palmitic acid によっては肥満細胞からの histamine 遊離は全く影響を受けなかったことから、lyso-PC による histamine 遊離抑制作用は lyso-PC の代謝物によるものではないことが示された。

lyso-PC が肥満細胞からの histamine 遊離のみならず、compound 48/80 によって惹起された CF-含有 liposome からの CF 遊離も抑制したことは、lyso-PC がリン脂質二重層に直接作用して、リン脂質二重層の膜透過性上昇を抑制していることを示唆している。compound 48/80 は、リン脂質二重層に perturbation を惹起してリン脂質二重層の膜流動性と膜透過背を上昇させ、これが histamine 遊離の一つの原因になると考えられる[71]。これに対し、lyso-PC が compound 48/80 によって惹起される膜透過性の亢進を抑制したことは、lyso-PC の作用点がリン脂質二重層にあって、膜安定化効果を発揮しているものであると考えられ

る。DPPC の膜流動性に対する lyso-PC の効果は、この考えを支持している。lyso-PC は DPPC の gel 状態の流動性を上昇させたものの、液晶状態の流動性は低下させた。細胞膜の脂質二重層は、生理的条件下では液晶状態で存在しているということを考えると、lyso-PC の細胞膜に対する作用も膜流動性の低下であると考えられる。膜安定化効果は、ラット赤血球を用いた低張溶血阻止作用においても確認された。

以上のような解析より、lyso-PC の histamine 遊離抑制作用は、lyso-PC が肥満細胞の細胞膜脂質二重層に作用して、細胞膜に対する安定化効果を発揮することにより細胞膜流動性及び膜透過性の亢進を抑制し、肥満細胞の活性化段階を阻止していることによるものと推察される。

一方、lyso-PC は臨界ミセル濃度を超える濃度では、それ自身で肥満細胞からの histamine 遊離を惹起した。この様な効果の逆転現象は、赤血球低張溶血反応においても同様に観察された。また、肥満細胞 LDH も、CMC 以上の濃度の lyso-PC によって濃度依存的に急激に遊離されたことより、高濃度の lyso-PC による histamine 遊離促進効果は、lyso-PC の micelle 形成にともなう細胞膜障害の結果である事が示された。

Table 1. で示されたように、肥満細胞からの histamine 遊離を惹起する濃度の compound 48/80 作用下にも、肥満細胞のリン脂質組成は殆ど変動せず、lyso-PC は、むしろ減少傾向を示した。従って、肥満細胞からの histamine 遊離反応において、本実験で示されたような CMC を超えるほどの lyso-PC が生成されるということは極めて困難であると考えられる。生理的条件下での lyso-PC は、CMC 以下の濃度であると考えられ、これまで指摘されているような histamine 遊離の促進因子として作用するのではなく、細胞膜安定化効果を有した内因性の histamine 遊離抑制因子であると考えるべきであると思われる。

第V章　モデル膜系における histamine 遊離抑制物質の作用機序解析

［緒言］

I型アレルギー反応における肥満細胞からの histamine 遊離反応は、histamine のみならず種々な chemical mediators の放出を伴う重要な生体反応である。従って、肥満細胞からの histamine 遊離を抑制する化合物は、抗アレルギー薬として使用されている。事実、histamine 遊離抑制を一つの目標として種々な抗アレルギー薬の開発が行われている。抗アレルギー薬の作用機序としては、細胞内 c-AMP レベルの上昇や細胞内への Ca ion 流入の抑制といった機構が想定されている[72]。しかし、代表的な抗アレルギー薬である cromolyn sodium (DSCG) の histamine 遊離抑制作用は、媒液中の Ca^{2+} の有無とは無関係であることが報告されており[73]、抗アレルギー薬による histamine 遊離抑制作用の機序は充分に理解されていないのが現状である。DSCG の作用機序として Ennis et al. [73]は細胞膜の安定化効果による細胞膜を介した情報伝達の抑制を示唆しているが、それがどの様な機序によって発現されるのかは検討されていない。肥満細胞からの histamine 遊離反応を開始させるのは、細胞膜表面における刺激の認識とその情報の細胞内への伝達であると考えられている。この際には、細胞膜脂質二重層が重要な役割を担っており、histamine 遊離刺激は脂質二重層に対して perturbation を生じさせる。また、lysophosphatidylcholine は細胞膜に対する安定化効果を有しており、histamine 遊離に対する抑制効果を発揮することも明らかにされている[74]。これらの知見より、種々な抗アレルギー薬の細胞膜脂質二重層に対する作用の解明は、抗アレルギー薬の作用機序の理解につながるものと考え、モデル膜系に対する抗アレルギー薬の作用解析を行った。

［実験方法］

<u>示差走査熱量分析</u>

DPPC 5 mg に被検薬物を加え、0.2 ml の PBS 中にて DPPC の相転移温度よりも 5℃ 高い温度で 30 秒間の超音波処理を行い、multilamellar liposome suspension を作成した。この 20μl を aluminum 製の sample pan に封入し、正確に秤量した後、Perkin Elmer 製 DSC-2c によって示差走査熱量分析を行った。温

度操作範囲は 10℃ から 60℃ とし、走査速度は 5℃/min で行った。使用した被検薬物は、いずれも走査温度の範囲内では吸熱或は発熱反応を示さなかった[65]。

リン脂質二重層の膜流動性に及ぼす抗アレルギー薬の作用

リン脂質二重層のモデルとして、dipalmitoylphosphatidylcholine を用いた liposome を作成した。膜流動性の指標として、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用いた蛍光偏光解消法により order parameter の測定を行った[71]。

DPPC に被検薬物を添加し physiological buffered salt solution (in mM; NaCl 154, KCl 2.7, CaCl2 0.9, HEPES 5; pH 7.4: PBS) 中で (46℃)、20 分間の超音波処理を行い liposome を作成した。これらの liposome の order parameter の温度依存性を測定し、種々な被検薬物がリン脂質二重層の脂質配列に対していかなる作用を及ぼすのかについて検討した。本実験では、DPPC の濃度が 1 mM になるようにした。

低張溶血に対する阻止効果

Wistar 系雄性ラット (250 - 300 g) をエーテル麻酔下頚動脈にカニューレを挿入し、ヘパリン溶液 (1000 units/ml) を添加した試験管中に全血を採血した。これを遠心分離し、赤血球を PBS で 2 回洗浄した。Seeman and Weinstein [66] の方法に準じて、被検薬物を含む溶液に赤血球を 5 x 10^7 cells/ml 加え、37℃、5 分間の incubation を行った後、200 x g, 4℃, 1 分間の遠心分離を行い上清の吸光度 (543 nm) を測定した。溶血度の判定は、0.9 % NaCl 中での溶血を 0 %、0.1% NaCl 中での溶血を 100 % 溶血とし、種々な濃度の NaCl 溶液中での吸光度を測定し、検量線を作成した。また、薬物の溶血阻止効果の判定は、薬物を含まない 0.4 % NaCl + 5 mM HEPES (pH 7.4) 液 (148 mOsm) での溶血度、即ち、70 %溶血を指数 100 とし、薬物をこの液に溶解して溶血度を求め、70 % 溶血に対する溶血指数として求めた。

[実験結果]

示差走査熱量分析による DPPC と抗アレルギー薬との相互作用の解析

種々の抗アレルギー作用を有する薬物の作用機序解明の手がかりを得る目的で、

DPPC をモデル膜としたリン脂質二重層と薬物との相互作用を示差走査熱量分析によって検討した。Fig. 1 - 5 はこれらの薬物を加えて作成した DPPC liposome を用いて示差走査熱量分析を行った結果を示している。DPPC 単独の場合には 41.6℃ に極大を持った吸熱 peak が main transition peak として出現している。

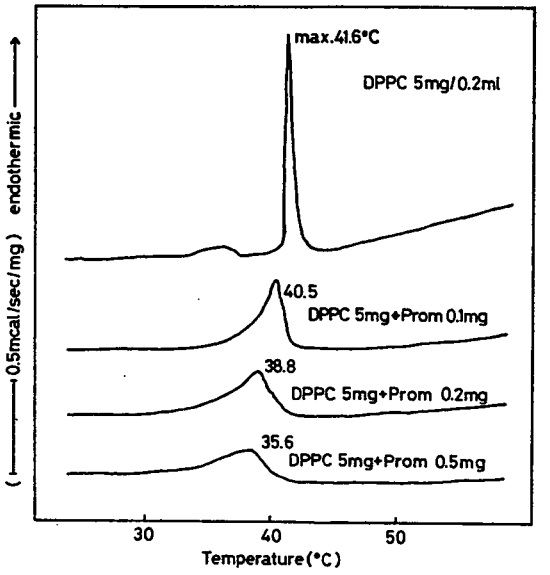


Fig. 1 Calorimetric scans of DPPC containing promethazine.

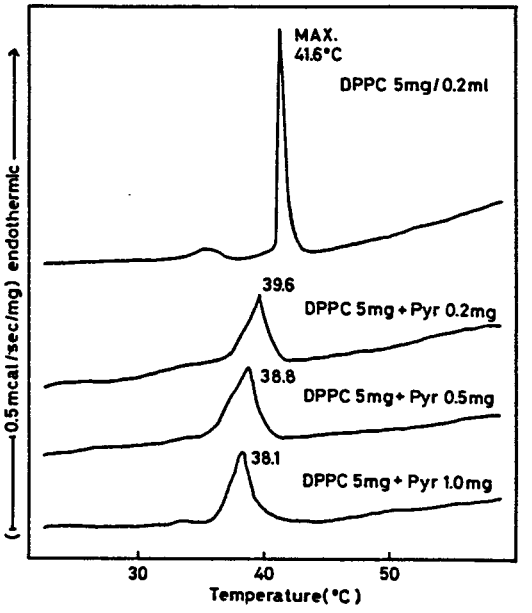


Fig. 2 Calorimetric scans of DPPC containing pyrilamine.

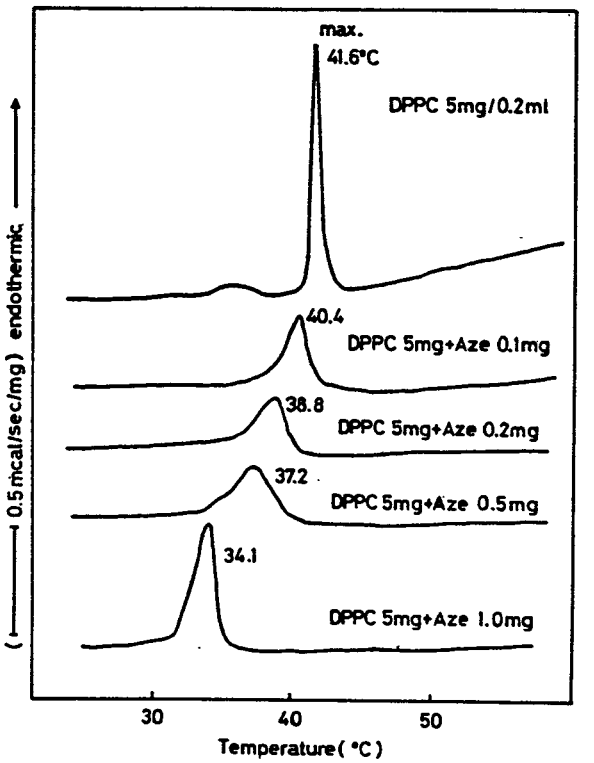


Fig. 3 Calorimetric scans of DPPC containing azelastine.

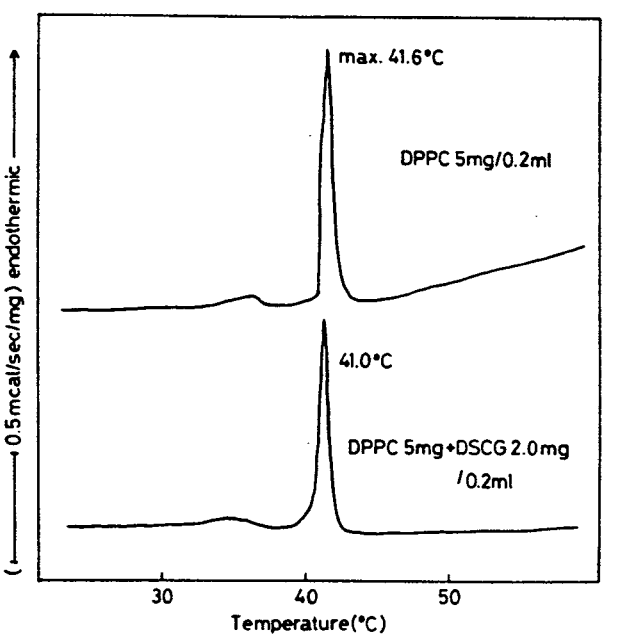


Fig. 4 Calorimetric scans of DPPC containing cromoglycate.

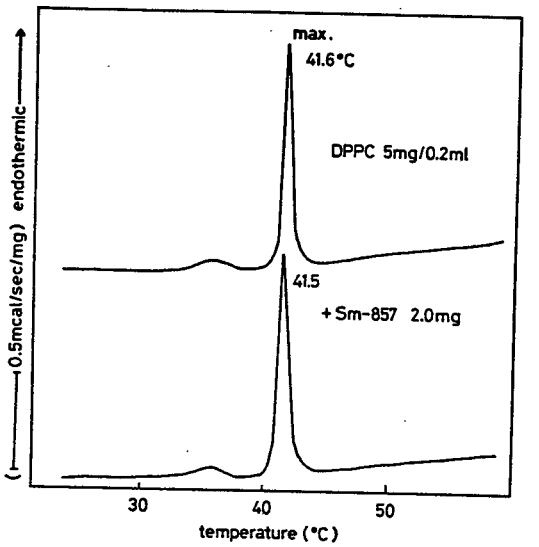


Fig. 5 Calorimetric scans of DPPC containing SM-857.

これは、DPPC の gel から液晶状態への相転移に由来するものである。また、34 ℃ 付近に pretransition と呼ばれる小さな peak も出現している。

compounds	dose for a 1℃ drop for 1 mg of DPPC (μmole)
promethazine•HCl	0.044
pyrilamine maleate	0.243
azelastine•HCl	0.048
DSCG	> 1.2
SM-857	> 1.5

Table 1. Drug concentration required for 1℃ drop of the phase transition temperature of DPPC.

DSCG, SM-857 以外の薬物を加えて作成した liposome では、Fig. 1 - 3 に示したように、添加する薬物の量に依存して、相転移 peak がブロードになり、相転移温度が低下した。これらの薬物においては、5 mg の DPPC に対して 0.05 - 0.1 mg の薬物を加えた liposome で既に pretransition peak は消失している。しかし、Fig. 5, 6 に示したように、DSCG 及び SM-857 の場合には、他の薬物と異なり、DPPC の pretransition, main transition のいずれにも全く作用しなかった。DSCG は Na 塩であるが、free acid の形にしたものを用いて同様の測定を行った際にも、DPPCの相転移は全く影響を受けなかった。DPPC の相転移 peak (main transition) の温度を 1℃ 低下させるのに要する薬物の量を Table 1 に示した。抗アレルギー作用の強い promethazine, azelastine は多少の程度の差はあったもののほぼ同程度の用量で相転移温度を低下させることが示された。また、比較的弱い histamine 遊離抑制作用を有する pyrilamine では、DPPC の相転移温度を低下させる効果はやや弱く、DSCG, SM-857 には全くこの様な効果がなかった。

histamine 遊離抑制物質の DPPC の相転移に及ぼす効果は、Ladbrooke et al. [75]や de Kruyff et al. [76] らによって報告されている cholesterol 効果や、Vigo et al. [58]によって報告されている麻酔薬の効果と極めて類似していた。

DPPC の order parameter の温度依存性に対する抗アレルギー薬の作用

order parameter は DPPC の脂肪酸側鎖の分子運動の parameter と考えられ、温度依存性が強く、gel 相から液晶相へと相転移を起こすと、急激な減少を起こす。cholesterol は脂質二重層のリン脂質配列の間隙に入り込み、gel 相から液晶相への転移を阻害する。示差走査熱量分析において cholesterol に類似した効果を示した薬物について、DPPC liposome の order parameter に及ぼす影響を検討した。Fig. 6 - Fig. 8 はそれぞれ DPPC に薬物を添加して作成した liposome の order parameter の温度依存性を示している。DPPC 単独の場合、相転移温度以下の gel 相では order parameter は非常に高い値を示すが、強い histamine 遊離抑制作用が報告されている promethazine を含有する liposome では、相転移温度付近での急激な order parameter の変動は軽減され、相転移温度以下の order parameter は DPPC 単独のものに比較して小さい値を示すようになった。

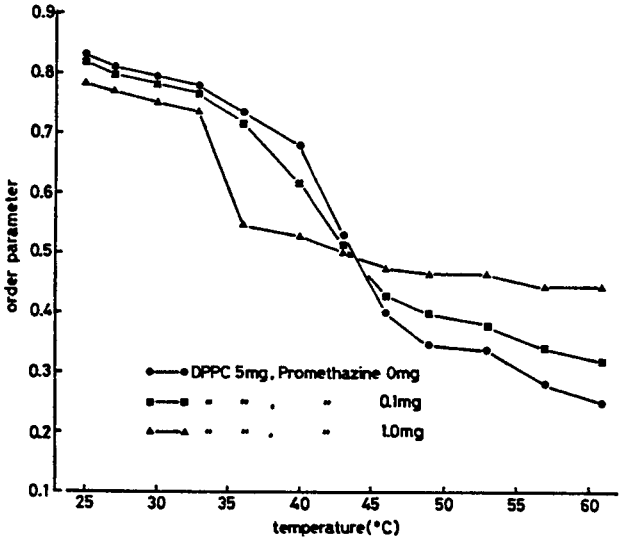


Fig. 6 Temperature dependency of the order parameter of the liposomes prepared with DPPC containing promethazine.

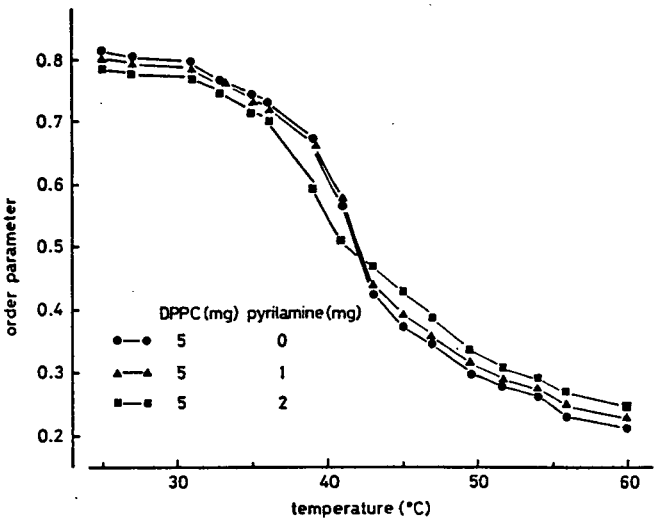


Fig. 7 Temperature dependency of the order parameter of the liposomes prepared with DPPC containing pyrilamine.

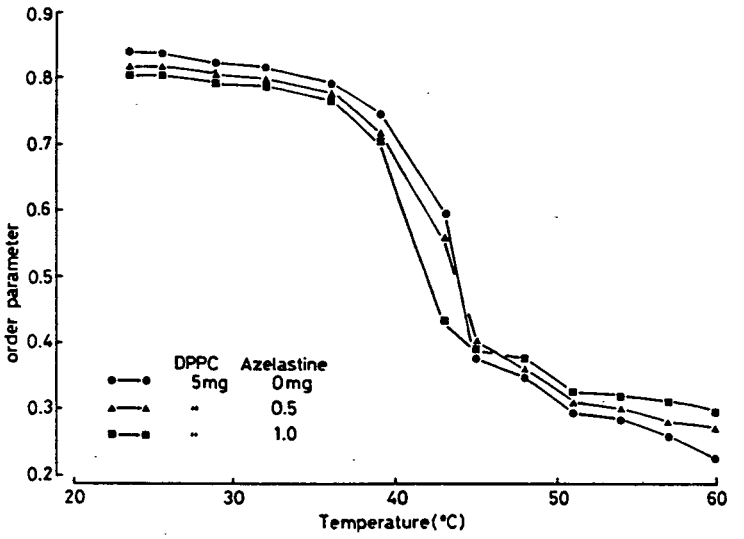


Fig. 8 Temperature dependency of the order parameter of the liposomes prepared with DPPC containing azelastine.

しかし、相転移温度よりも高い温度領域の液晶相では、抗アレルギー薬を添加した liposome の order parameter は、DPPC 単独の場合に比較して高い値を示した。同様の効果は pyrilamine, azelastine 等においても観察されたが、promethazine と比較すると弱かった。

細胞膜脂質二重層と強い相互作用を示す薬物で、一般に膜安定化効果を持つとされている局所麻酔薬や tranquilizer は、低張溶血を阻止する作用を持つことが知られている[66]。モデル膜を用いた実験より二、三の抗アレルギー薬は脂質膜に作用点をもつことが示唆されたため、抗アレルギー薬の低張溶血阻止効果について検討した。モデル膜との相互作用が特に強いことが示されている promethazine は、Fig. 10 に示したように、強い溶血阻止能を有していた。azelastine や pyrilamine といった薬物においても、同様な効果が観察された。一方、DSCG は非常に高濃度 (10^{-2}M) でのみ抑制傾向を示したが、この濃度では、浸透圧は 30 mOsm 上昇して 178 mOsm に達しており、この抑制効果は浸透圧の上昇によるものと考えられた。

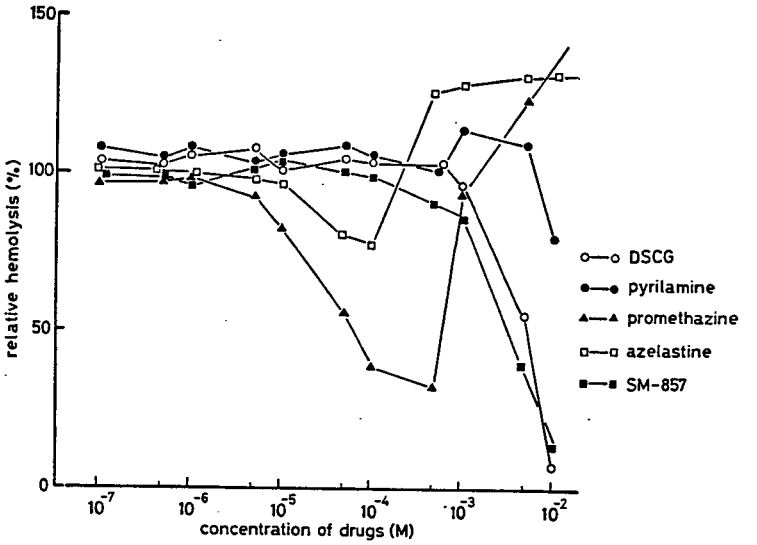


Fig. 9 Inhibitory effects of some antiallergic agents on the hypotonic hemolysis.

［考察］

Ⅰ型アレルギーにおける肥満細胞からの histamine 遊離反応の際、細胞膜のリン脂質二重層の膜流動性や膜透過性が亢進する。これと平行して、細胞膜リン脂質を基質とした酵素反応の活性化を生じ、アラキドン酸代謝産物の遊離を惹き起こすことも示されている[6]。この様に、細胞膜リン脂質二重層は、物質透過や酵素反応の場として極めて重要な役割を担っているものと考えられる。細胞膜安定化作用という概念はこの様な透過性や酵素反応の抑制という観点から、局所麻酔薬や tranquilizer などで広く検討されている[77]。このような膜安定化作用を持った局所麻酔薬が、肥満細胞からの histamine 遊離を抑制することは既に報告されている[78]。

検討を行った抗アレルギー薬のうち promethazine, pyrilamine, azelastine はいずれも塩基性の化合物であり、比較的疎水性の高い環構造を有している。一方 DSCG, SM-857 は酸性の化合物であり、水溶性が高い化合物である。脂質二重層に対する膜安定化効果を示したのは、いずれもこの塩基性化合物であり、酸性

の DSCG, SM-857 には脂質二重層との相互作用はみられなかった。DPPC の相転移温度を低下させる効果は、その薬物の脂質二重層に対する分配係数の高さを反映しているものと考えられる[79]。

DPPC の示差走査熱量分析曲線は、その order parameter の温度依存性曲線を微分したものと対応するものと考えられる。gel 相から液晶相への転移に伴う相転移温度付近での急激な order parameter の変化は、リン脂質分子の運動の変化を捕らえたものである。即ち、order parameter そのものはリン脂質分子の運動を反映している。一方、示差走査熱量分析によって得られる縦軸は、試料の比熱を表している。比熱は、単位質量当り、単位時間当りの熱量という dimension を持っている (mcal/sec/mg)。熱量はリン脂質分子の運動によって規定される量であり、これを時間で微分したものが比熱となる。この様な理由により、order parameter の温度依存性曲線を微分したものが、示差走査熱量分析の曲線に対応すると考えられる。従って、この両者の data は相補的であり、脂質二重層に対する薬物の作用様式が、異なった面から判定できるものと考えられる。示差走査熱量分析に於て相転移温度を低下させる効果は、van't Hoff の式でも分かるように、均一な分子種からなる相への異種分子の混入の程度を示しており、これは、薬物の脂質二重層に対する分配係数の高さを反映している[79]。また、相転移幅は、脂質二重層を構成する分子が相転移を生じる際に何個の分子が協同した集団として転移をするかという cluster の大きさを表す cooperativity に対応しており、転移幅が狭いほど cooperativity が高い事が示されている[79]。抗アレルギー薬によって相転移の幅が広くなる現象は、抗アレルギー薬が脂質二重層に侵入し、脂質分子間の協同性即ち cooperativity を低下させるためであることが分かる。この様な効果は、細胞膜に於て、receptor や膜内酵素周辺に存在して cluster を形成し、酵素活性などの調節の役割を担っている boundary lipid の cluster size を低下させる効果の発現につながる可能性があると考えられる。この様な効果は、麻酔薬による ion channel の抑制機序としても提唱されている[80]。order parameter の測定によって得られる効果は、膜内の脂質配列の情報である。抗アレルギー薬は、脂質二重層の gel 相においては膜流動性を上昇させ、液晶相においては膜流動性を低下させた。この様な効果はリン脂質二重層に対する局所麻酔薬や cholesterol の効果と類似する[58, 75, 76]。細胞膜の脂質二重

層は基本的には液晶状態にあるものと考えられるため、抗アレルギー薬の効果は細胞膜脂質二重層の膜流動性を低下させ、histamine 遊離刺激によって膜脂質に生じる perturbation [71] を抑制する効果があることが示唆された。

脂質二重層に対して膜安定化効果を発揮する薬物は、赤血球の低張溶血を抑制する効果があることが、Seeman らによって古くから示されている[66, 77]。本研究においても、脂質二重層に対する作用が強力であることがモデル膜系で示された薬物は、赤血球の低張溶血を強力に抑制することが示された。この効果は、細胞膜に対する膜安定化効果を反映する。なお、高濃度においては薬物自身で溶血を促進したが、これらの薬物は脂質に対する分配の高さと同時に水溶性も有した両親媒性物質であるため、高濃度では micelle 形成が生じたためと考えられた[74]。また、脂質に対する相互作用が極めて弱いことがモデル膜系で示された DSCG は、高濃度においてのみ溶血を抑制したが、これはむしろ薬物濃度を増大させた結果、浸透圧が上昇したための二次的な効果であると考えられた。

モデル膜を用いた解析により、ある種の抗アレルギー薬の作用点が細胞膜リン脂質二重層にあり、膜脂質を安定化させて作用を発現していることが判明した。同時に、モデル膜流動性の測定や示差走査熱量分析といった脂質二重層の物理的性質の測定は、抗アレルギー薬の薬効解析の強力な手段であることが明かとなった。

第VI章　肥満細胞からの histamine 遊離における細胞内 Ca ion 動態の画像解析と抗アレルギー薬の効果

I．terfenadine と cAMP の効果を中心として

［緒言］

抗原抗体反応を始め、compound 48/80 のような histamine 遊離物質による histamine 遊離反応においては、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが知られている[81, 82]。しかし、単離した肥満細胞を用いた実験により、compound 48/80 や substance P により惹起される histamine 遊離反応や抗原抗体反応における histamine 遊離の一部では、細胞外液中に Ca^{2+} を必要としないことが明らかにされている[12, 15]。Ca free の媒液中で生じる histamine 遊離の際には、細胞内 Ca 貯蔵部位（Ca store）からの Ca^{2+} の遊離が生じることが示唆されているが[17]、その直接的な証明は現在の所なされていない。細胞内 Ca^{2+} の動態を解析する目的で、Ca^{2+} と chelate 結合して蛍光を発する Ca probe である quin 2 を用い、蛍光顕微鏡に画像処理装置を組み合わせた系を用いて実験を行った。quin 2 そのものは親水性の高い化合物であり、細胞膜を通過しないが、この tetraacetoxymethyl ester である quin 2/AM は細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる[83]。細胞内に取り込まれた quin 2/AM は、細胞内の esterase によって加水分解され、quin 2 となる。quin 2 自身の蛍光は弱いが、quin 2-Ca complex は強い蛍光を発する。quin 2/AM は Ca^{2+} との chelate 能力はなく、蛍光強度も弱い[83]。最近、quin 2 よりも蛍光強度が強く、Ca^{2+} 感受性も高い蛍光性 Ca probe として fura 2 や indo 1 が使用されるようになっている[84]。しかし、fura 2 あるいは indo 1 を細胞内に導入するために作成されたそれぞれの pentaacetoxymethyl ester である fura 2/AM もしくは indo 1/AM は、細胞内の esterase による分解速度が遅く、5 つの ester 結合が未分解もしくは完全に分解されない状態のまま細胞内の種々な organella に取り込まれてしまい、細胞内 Ca^{2+} の動態を測定するには問題が多いことが報告されている[85, 86, 87]。quin 2 にはこのような指摘はなく[87]、細胞内 Ca 動態の解析に適しているものと考え、本研究においては quin 2 を使用した。

最近、histamine 遊離抑制作用を持つ数種の化合物が、抗アレルギー薬として

開発されている。細胞外に Ca^{2+} を含まない媒液中で compound 48/80 や substance P を作用させた際に誘発される肥満細胞からの histamine 遊離に対してもこれらの抗アレルギー薬が有効であるという所見[73]は、これら薬物の作用点が細胞外からの Ca ion の流入抑制にあるのではないという事を明示している。また、抗アレルギー作用を示す薬物の一部には、theophylline や dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) のように、細胞内 cAMP level を上昇させる事によって、肥満細胞からの histamine 遊離を抑制するものがあるが[72]、cAMP が細胞内でどの様な機序により histamine 遊離抑制作用を発揮するのかについては充分知られていない。抗アレルギー薬の作用を解析するにあたり、これらの問題について検討を行った。

[実験方法]

肥満細胞への quin 2 の load と microfluorometry

Wistar 系雄性ラット (250 - 300 g) を出血致死させた後、腹腔内に 15 mlの Ca-free physiological buffered salt solution (in mM; NaCl 154, KCl 2.7, glucose 5.6, EGTA 0.1, HEPES 5; pH 7.4: PBS-Ca) を注入し、gentle massage して開腹し、腹腔液を採取した。遠心分離して細胞を集め、PBS-Ca で 2 回洗浄した。細胞を quin 2 loading solution (in mM; NaCl 154, KCl 2.7, EGTA 1, glucose 5.6, HEPES 5, quin 2/AM 5μM; pH 7.4) に suspend して 37℃、30 分間の incubation を行って細胞内に quin 2 を取り込ませた。この細胞を PBS-Ca で 2 回洗浄した後、以下の実験に供した。

肥満細胞内に取り込まれた quin 2 が細胞内の Ca ion と結合することにより発する蛍光強度の測定には、同軸落射蛍光顕微鏡 (Nikon, XF) に photon counter (Nikon,P-1) を連結し、microfluorometry により個々の細胞の蛍光強度を測定した。励起光の光源には、50 W の高圧水銀ランプを使用し、340 nmの干渉フィルターを通して励起光として使用した。対物レンズには、100 x UV-F レンズを使用した。リレーレンズの絞りに直径 1 mm の円形 slit を挿入し、1 個の肥満細胞から出る蛍光だけが photon conter に入射するようにした。photon counter の直前に 480 nm の干渉フィルターを挿入し、quin 2-Ca complex に起因する蛍光の peak 波長だけを記録した。蛍光強度の測定は、一回につき最低 50 個の細

胞について行い、一群あたり少なくとも 5 例の実験を行った。

肥満細胞内 Ca ion 分布の画像解析

上述の方法で quin 2 を取り込ませたラット腹腔肥満細胞の蛍光顕微鏡像を、同軸落射蛍光顕微鏡（Nikon, TMZ）に超高感度テレビカメラと実時間画像解析装置（Hamamatsu, C-1966-20）を接続して、3/4 inch video tape recorder（VTR, Sony）に記録した。励起光による quin 2 の退色を避けるため、励起フィルターの直前に透過率 4 % の neutral density filter を挿入して使用した。この条件下では quin 2 の蛍光強度は極めて微弱であったため、画像の S/N 比を上げるため、実時間画像処理装置によって background image を除去し、次式に従って、画像の real time averaging を行った[88]。

$$A_t = \sum_{n=1}^{t} \frac{1}{N} \left(\frac{N-1}{N}\right)^{t-n} \cdot V$$

At: frame n から t frame だけ経過した時点における処理画像

V : frame n における画像 data

N : averaging weight （N = 8 もしくは 16 を使用した）

VTR に記録された肥満細胞の蛍光顕微鏡像は、更に、画像解析装置（NEC, ACOS-1000, image system for online processing）を用いて、疑似カラー処理・intensity profile 処理、intensity histogram 処理を行った。 蛍光強度は 8 bit の AD 変換を施されて処理されているため、画像を構成する各画素（pixel）について、0 から 255 の digital 値で表現した。また、2×10^5 photons/mm^2/sec の蛍光強度を最大として処理を行ったため、これ以上の強度を持った蛍光の場合は、すべて digital 値は 255 として処理した。疑似カラー処理の際は、もっとも蛍光強度の強いものを白とし、以下画素値に従って、赤、橙、黄、緑、青、藍、紫、黒の順で処理を行った[89, 90]。

ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離

肥満細胞からの histamine 遊離反応は、Ca-free の条件下で行った。ラット腹腔より単離した肥満細胞を PBS-Ca に浮遊させ、37℃、5 分間の preincubation を行った後、最終濃度 0.1μg/ml の compound 48/80 もしくは 2μM の substance P を加え、更に 12 分間の incubation を行った。氷冷により反応を停止した後遠心分離により上清と細胞を分離し、上清に遊離された histamine 量と細胞に残存した histamine 量を蛍光法によって定量した。肥満細胞からの histamine 遊離に対する抗アレルギー薬の効果を検討する際には、histamine 遊離物質添加 10 分前に抗アレルギー薬を媒液に添加した。

liposome の order parameter の測定

抗アレルギー薬のリン脂質二重層に対する効果を検討する際には、2 mg の dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を、10^{-6} M の 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を含む PBS-Ca 中で、45℃ にて 20 分間の超音波処理を行い、liposome を作成した。蛍光偏光は、Polacoat 社製偏光フィルターを用いて測定し、前記の方法に従って order parameter を算出した[71]。

示差走査熱量分析

抗アレルギー薬の細胞膜に対する作用の解析にあたり、示差走査熱量分析を行った。5 mg の DPPC を 200μl の PBS-Ca 中で、45℃ にて 1 分間の超音波処理を行い、liposome を作成した[91]。

[実験結果]

単一肥満細胞内 Ca level の microfluorometry

肥満細胞内の Ca level の測定には、Ca^{2+} と結合して蛍光を発する quin 2 を用いた。細胞内の Ca^{2+} と結合する quin 2 が細胞内に高濃度に存在する場合には、肥満細胞の活性化過程に対して抑制的な影響を及ぼす恐れがある。予め、Ca-free の媒液中で 0.1μg/ml の compound 48/80 によって惹起される肥満細胞からの histamine 遊離に対する quin2/AM の影響について検討したところ、媒液

中の quin 2/AM が 10μM 以上の場合には、濃度に依存する histamine 遊離の抑制が観察された。しかし、それ以下の濃度においては histamine 遊離に対してなんら影響を及ぼさなかったため、以下の実験には、5μM の quin 2/AM を用いて実験を行った。

ラット腹腔肥満細胞に quin 2 を取り込ませた後、microfluorometry により、個々の肥満細胞について、蛍光強度の測定を行った。Ca free の媒液中で histamine 遊離物質である compound 48/80 或は substance P を作用させた。Fig. 1 には、0.1μg/ml の compound 48/80 で刺激を行った際の蛍光強度の経時変化と、種々な濃度の compound 48/80 刺激後 30 秒における蛍光強度の変化を示した。いずれも刺激前を 100 % として示した。肥満細胞に 0.1 μg/ml の compound 48/80 を作用させると quin 2 の蛍光強度は速やかに上昇し、30 秒後には plateau に達し、その後 2 分以上ほぼ同じ level を維持した。また、高濃度の

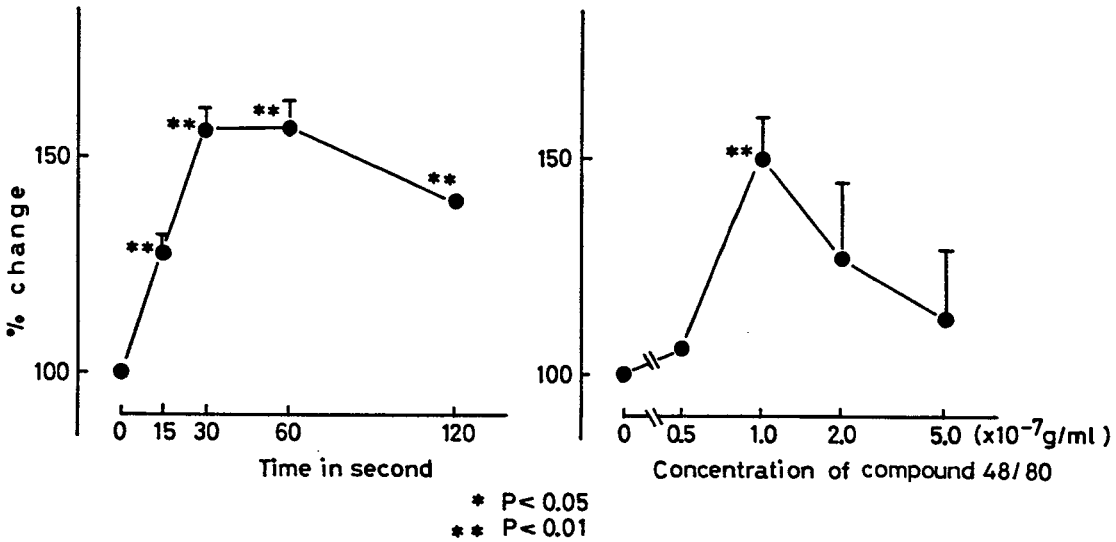


Fig. 1 Changes in fluorescence intensity of quin 2 incorporated into rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80.

compound 48/80 を作用させた際には蛍光強度が低下しているが、それは細胞膜脂質二重層の膜透過性が上昇し、細胞内の Ca^{2+} 或は quin 2-Ca complex が漏出したためと考えられた。最大の蛍光強度は 0.1μg/ml の compound 48/80 を 30 秒

間作用させた際に発現することが分かったので、以下の実験ではこの条件を使用した。

同様の実験を substance P について行ったものを Fig. 2 に示す。蛍光強度の時間経過については、compound 48/80 とほぼ同様の profile が得られたが、最大蛍光強度については compound 48/80 の場合よりも低い値となった。substance P の最大効果は、2 μM で 30 秒間刺激した際に発揮されることが分かった。

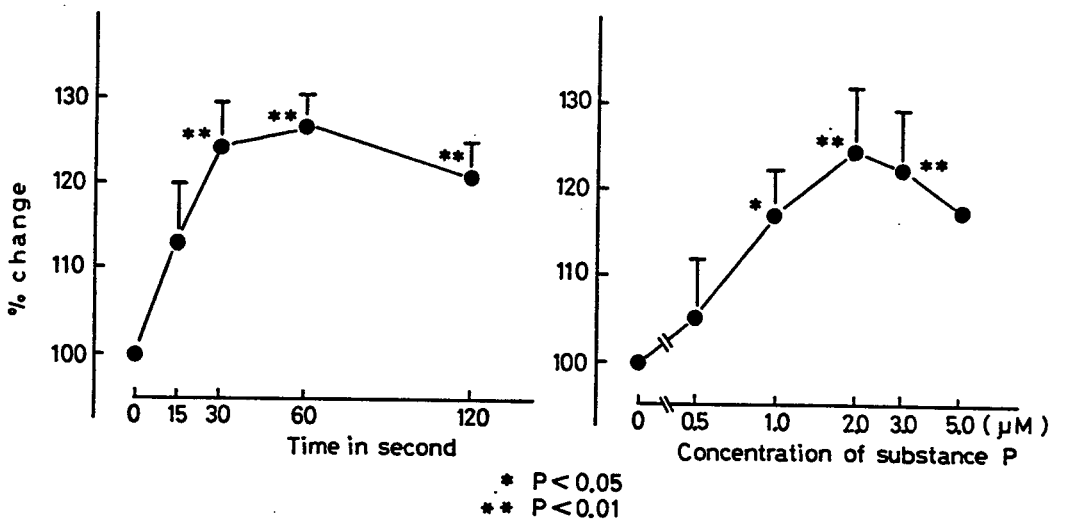


Fig. 2 Changes in fluorescence intensity of quin 2 incorporated into rat peritoneal mast cells induced by substance P.

これらの実験は Ca-free の媒液中で行っており、ここで観察された quin 2 の蛍光強度の上昇は細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を反映しているものと考えられた。

細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離に及ぼす cAMP の効果

肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離に及ぼす cAMP の効果について検討するため、細胞内の cAMP level を上昇させて histamine 遊離を抑制することがよく知られている db-cAMP 及び theophylline を用いて実験を行った[72]。ラッ

ト腹腔肥満細胞を 0.1 - 5.0 mM の theophylline、もしくは 0.01 - 1.0 mM の db-cAMP の存在下で 37℃、5 分間 incubation を行った後、compound 48/80 或は substance P によって惹起される histamine 遊離に対する抑制効果と細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離に対する抑制効果を一括して Fig. 3 に示した。図より明らかなように、compound 48/80, substence P のいずれの histamine 遊離物質による刺激に対しても、histamine 遊離と細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離はほぼ並行して抑制された。

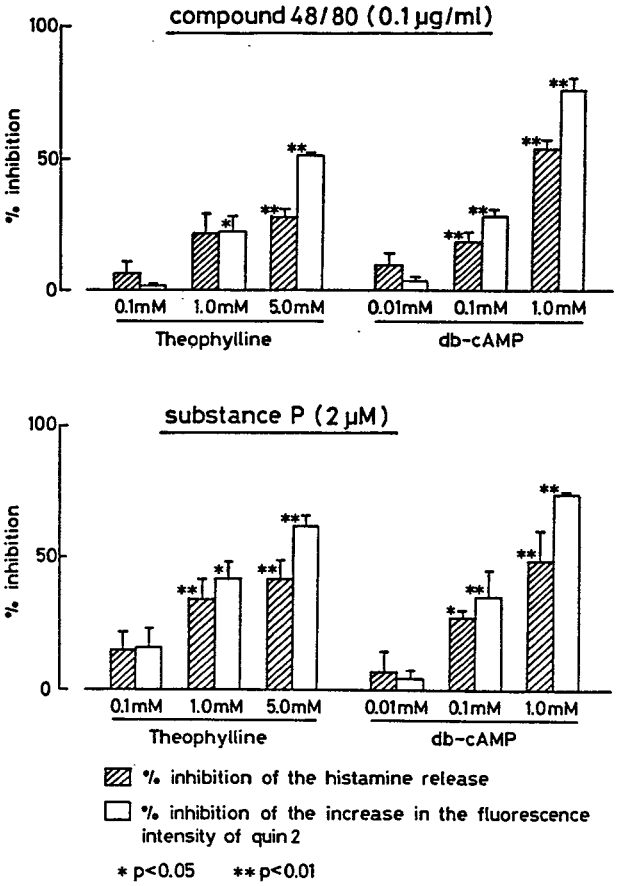


Fig. 3 Inhibitory effects of theophylline and db-cAMP on the histamine release and the increase of fluorescence intensity due to histamine releasers.

drugs	concentration (mM)	% inhibition	
		compound 48/80	substance P
db-cAMP	1.0	76.40 **	74.74 **
	0.1	28.98 **	35.39 **
	0.01	7.20	4.07
theophylline	5.0	51.27 **	62.12 **
	1.0	22.51	42.19 **
DSCG	1.0	70.91 **	70.09 **
	0.1	52.47 **	68.92 **
	0.02	32.58 **	38.36 **
	0.01	26.58 *	30.36 *
terfenadine	0.01	63.41 **	96.45 **
metabolite I	0.01	25.78 *	45.38 **
metabolite II	0.01	7.85	8.53
mequitazine	0.015	31.09 **	65.63 **

Table 1. Inhibitory effects of some antiallergic compounds on the increase of fluorescence intensity determined with quin 2-loaded mast cells elicited by compound 48/80 (0.1 μg/ml) or substance P (2 μM).

DSCG was pretreated for 30 seconds. Metabolite I and II are metabolites of terfenadine. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

drugs	concentration (μM)	% inhibition
terfenadine	2	8.7±0.6
	10	77.2±6.1 **
	20	99.0±5.1 **
metabolite I	2	29.0±1.2
	10	43.0±9.1 **
	20	67.8±1.1 **
	100	97.3±2.9 **
metabolite II	2	- 6.0±1.2
	10	- 3.0±7.1
	20	- 1.4±4.5
	100	2.6±1.0
ketotifen	2	19.7±6.3
	10	25.0±3.2 *
	20	27.7±1.4 *
mequitazine	2	6.2±1.1
	10	34.7±5.7 **
	20	88.2±3.6 **

Table 2. Inhibitory effects of some antiallergic agents on the histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80.
In each experiment, at leaset n = 3 were performed. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ in Student's t-test.

肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離に及ぼす抗アレルギー薬の効果

quin 2 を取り込ませたラット腹腔肥満細胞を種々な抗アレルギー薬と incuba-tion を行った後、compound 48/80 もしくは substance P による刺激を行い、

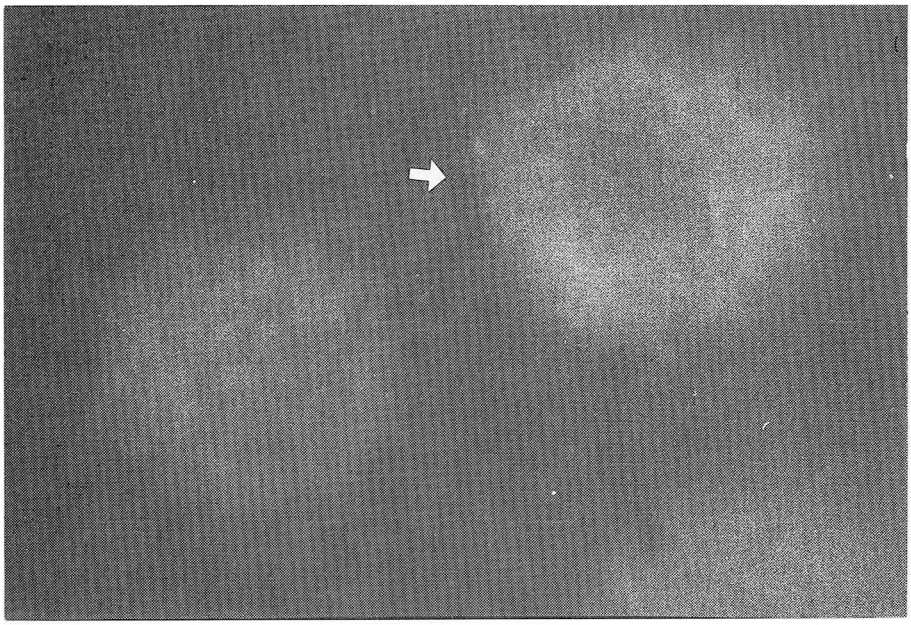
細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離に及ぼす抗アレルギー薬の効果を検討した。その結果を Table 1 に一括して示した。いずれの薬物も肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を強力、かつ濃度依存的に抑制することが判明した。

これらの薬物による肥満細胞からの histamine 遊離抑制作用は、Ca-free の条件下でも発現することを Table 2 に示した。いずれの薬物も、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を抑制する濃度とほぼ同程度の濃度において、Ca-free の媒液中で 0.35μg/ml の compound 48/80 によって惹起される histamine遊離を、濃度依存的に抑制した。

肥満細胞内 Ca^{2+} 動態の画像解析

quin 2 を取り込ませた正常肥満細胞の蛍光顕微鏡像を Fig. 4A に示す。矢印で示した細胞を、蛍光強度に応じて疑似カラー処理したものが Fig. 4C である。細胞を囲む四角の画面内の各画素の持つ画素値を横軸に左から右に向かって高い値を示すように取り、縦軸にその頻度を取って histogram としたものを画面中央に overlap させて示してある。肥満細胞に 0.1μg/ml の compound 48/80 を作用させると、細胞の蛍光強度が著しく増大した。Fig. 4B は Fig. 4A で示した細胞と同じ細胞に compound 48/80 を作用させた 1 分後の蛍光顕微鏡像である。Fig. 4B に矢印で示した細胞に疑似カラー処理を施したものが Fig. 4D である。Fig. 4C では細胞は青い部分が多く、蛍光強度は低いことを示している。画素値の低いことが、histogram からも明かである。また、蛍光強度は細胞内で不均一な分布を示しており、Ca^{2+} が細胞質の顆粒間隙に分布しているのが分かる。また、細胞質の部分に比較して、核の蛍光強度は低いことも明かとなった。これに com-pound 48/80 を作用させた際の像が Fig. 4D である。細胞全体が強い蛍光強度を反映する赤もしくは白として表示され、画素値の histogram も右に偏った分布となり、細胞内 Ca level の上昇が示されている。この疑似カラー像でも、細胞質でのカラー分布は不均一であり、核に相当する部位の色調はその周囲の色調よりも低かった。また、細胞が compound 48/80 刺激にともなって swelling を生じ、細胞の直径が拡大している事もこの画像から明かとなった。

A



B

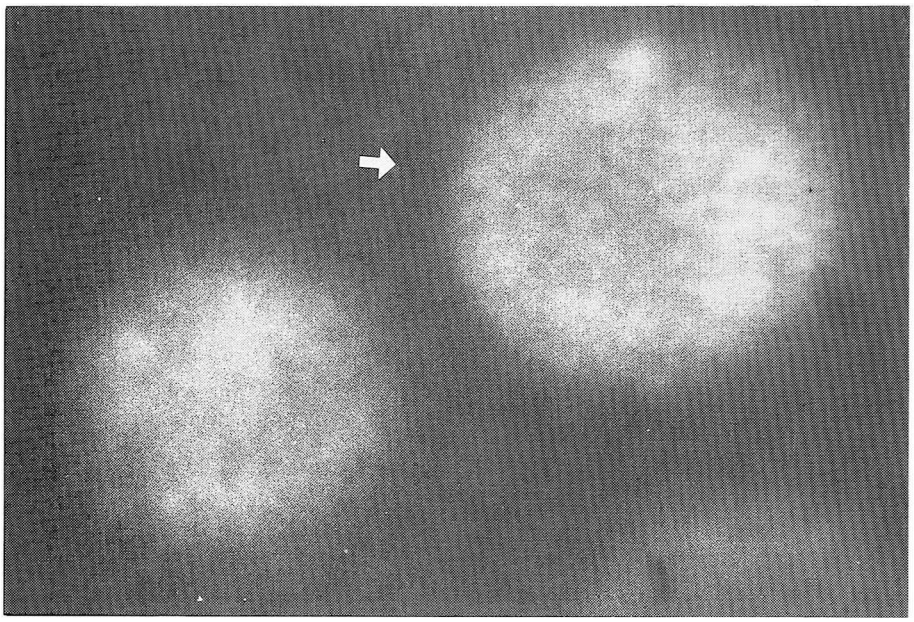
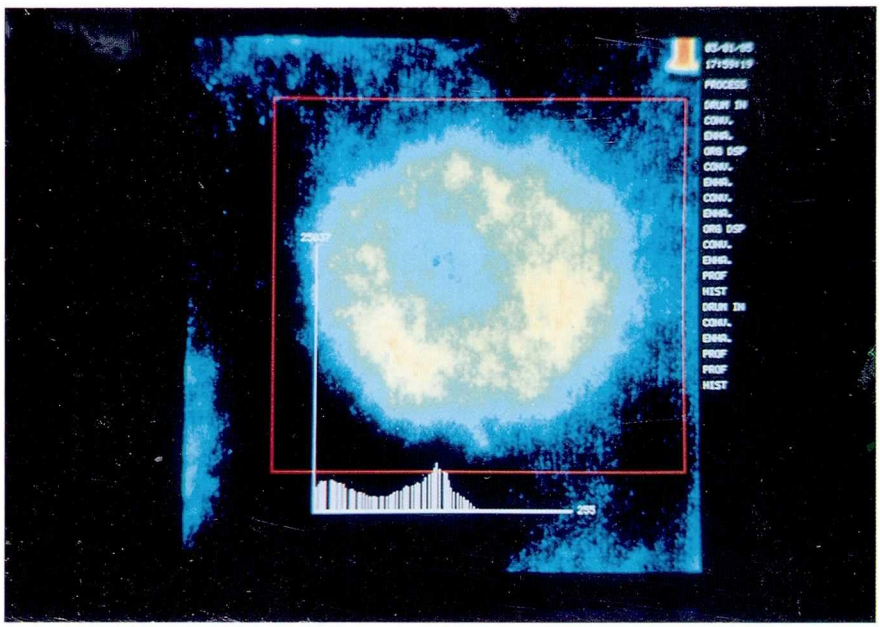


Fig. 4A, 4B. Fluorescence image of rat mast cell loaded with quin 2.

C



D

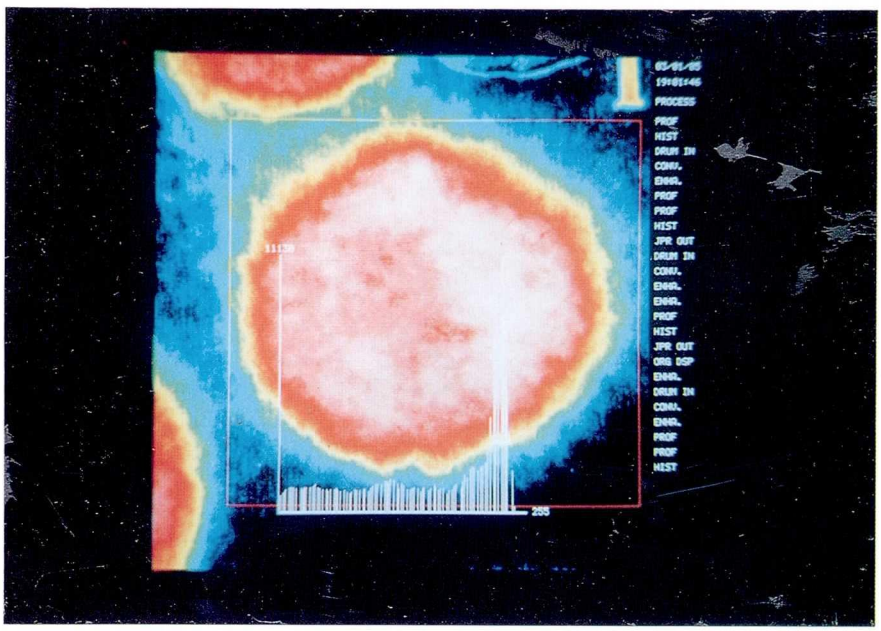


Fig. 4C, 4D. Florescence image of rat mast cell loaded with quin 2.

Fig. 4C 及び Fig. 4D で示した細胞を横切る軸に沿って画素値の profile を求め、縦軸を画素値の大きさとして、画素値の分布を三次元表示したものが Fig. 5 である。対照細胞においては細胞の蛍光強度は低く、特に核の部分の蛍光強度が低い事が、この表示では細胞中央の窪みとして示されている。compound 48/80 の作用下に蛍光強度は細胞全体にわたって上昇し、細胞の直径が拡大していることも明らかに示された。また、compound 48/80 を作用させた後では細胞中央の核の部分に対応していた蛍光強度の窪みは小さくなり、ほとんど flat となることも明かとなった。

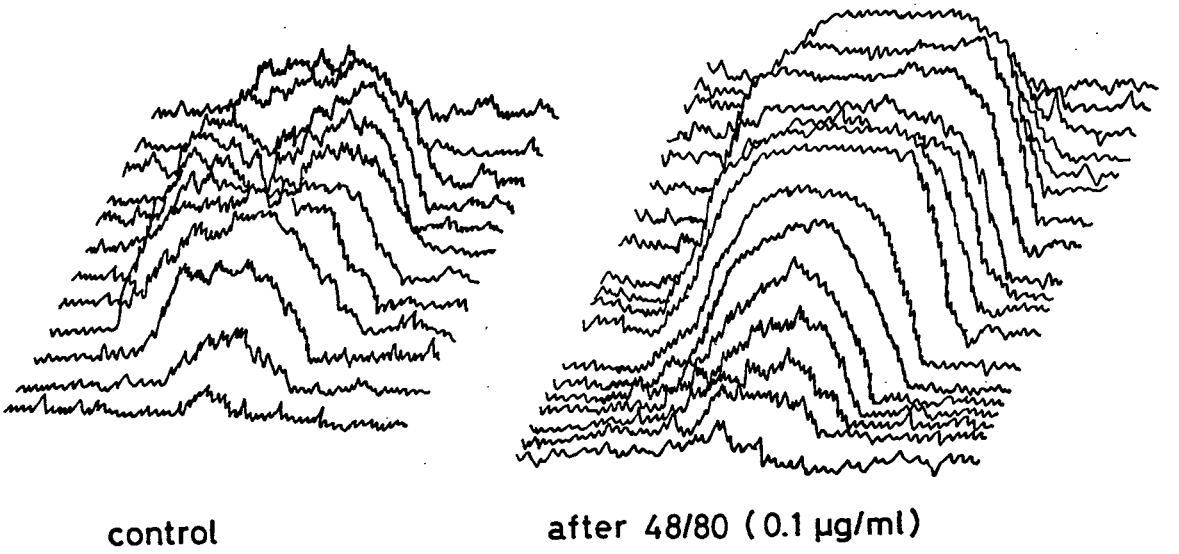


Fig. 5. Three dimensional projection of fluorescence intensity derived from quin 2 incorporated into mast cells.

DPPC の order parameter の温度依存性の測定

肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離と肥満細胞からの histamine 遊離を強力に抑制した terfenadine が、細胞膜の脂質二重層に対してどの様な影響を及ぼすのかを DPPC liposome を用いて検討した。

DPPC に terfenadine を添加して作成した liposome の場合、DPPC の相転移温度（41℃）以下の温度領域での order parameter は減少傾向を見せ、逆に、41℃以上の液晶相では order parameter の上昇が観察された（Fig. 6)。この所見は、

他の抗アレルギー薬において観察されるものと類似した。

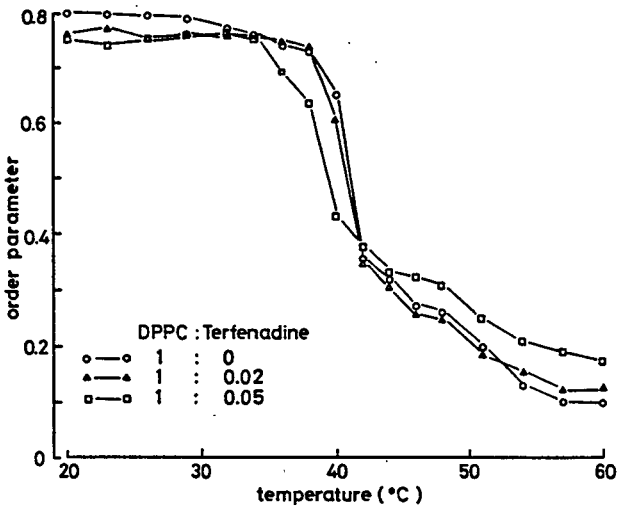


Fig. 6. Temperature dependency of the order parameter of the liposomes made of DPPC with or without terfenadine.

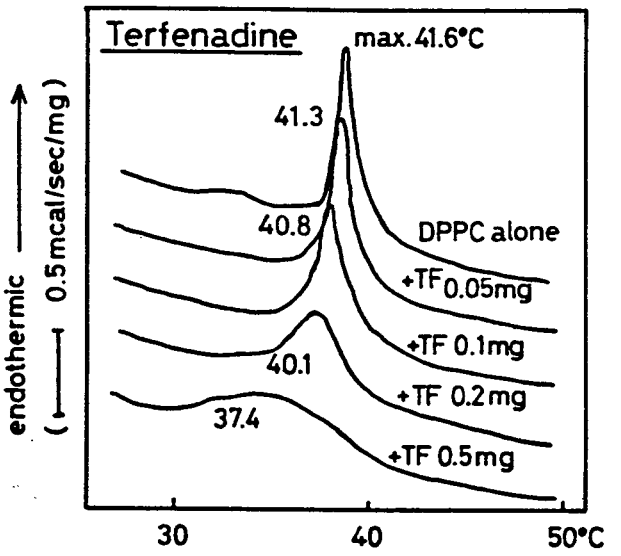


Fig. 7 Calorimetric scans of the liposomes made of DPPC containing terfenadine.

DPPC liposome の示差走査熱量分析

DPPC に terfenadine を加えて作成した liposome では、相転移温度の低下と共に、相転移 peak は broad になった。この効果は、添加する terfenadine 量の増加と共により明瞭になった (Fig. 7)。

[考察]

Ennis et al. [73] は、DSCG, theophylline, db-cAMP といった薬物が Ca-freeの条件下で生じる肥満細胞からの histamine 遊離を抑制することを報告しているが、肥満細胞内における Ca^{2+} の動員やその抑制という点についての直接的な検討は行っていない。compoud 48/80 及び substance P は Ca-free の条件下で肥満細胞から histamine を遊離させることが知られており、本実験においてもこの二つの histamine 遊離物質を使用した[12, 15]。compound 48/80 及び sub-stance P を Ca-free の条件下で、quin 2 を取り込ませた肥満細胞に作用させた際、quin 2-Ca complex 蛍光の著しい増大が観察され、肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離が惹起されていることが示された。theophylline, db-cAMP 及び terfenadine は、いずれも肥満細胞からの histamine 遊離を抑制する濃度で、compound 48/80 や substance P によって惹起される肥満細胞内 quin 2-Ca complex による蛍光増大を顕著に抑制した。この所見は、これらの薬物による histamine 遊離抑制作用機序の少なくとも一部には、肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離抑制作用があることが示された。特に、theophylline 及び db-cAMP はいずれも細胞内 cAMP level を上昇させて histamine 遊離を抑制するということが再々指摘されてきているが、cAMP を介する遊離抑制の機序については殆ど知られていない。本研究の結果より、cAMP は細胞内 Ca store に作用して、Ca^{2+} の放出を抑制していることが明らかになった。これは cAMP の histamine 遊離抑制につながる機序の一つであると理解される。

肥満細胞や rat basophile leukemia cell に quin 2 を取り込ませて、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇の時間経過を測定した例は、これまで White et al. [81] や Beaven et al. [82] によって報告されている。しかし、単一の細胞を用いて、細胞内 Ca^{2+} の動態についての検討を行った例は、これまで全く報告されていない。

本研究において、細胞内に quin 2 を取り込ませた肥満細胞を用い、超高感度テレビカメラと画像処理装置を組み合わせて、肥満細胞の蛍光顕微鏡像の画像解析を行うことで、細胞内 Ca^{2+} の分布とその動態に関する知見が得られた。静止状態の肥満細胞では、細胞内 Ca^{2+} は顆粒間隙の細胞質に低濃度に分布し、核や顆粒の Ca level は低い。これに compound 48/80 を作用させると、細胞の swell-ing によって quin 2 の蛍光の分布が広くなると共に、quin 2 の蛍光強度が細胞全体にわたって著しく増大した。swelling という現象は、細胞膜透過性の上昇に基づく Na^{+} 及びそれに伴われる水の流入により惹起されると考えられているが[4]、細胞外より流入する水は store より放出される Ca^{2+} の均一な分布にも寄与していることが本実験の結果より推定された。

一方、terfenadine は、他の抗アレルギー薬と同様に、細胞膜脂質二重層に対する膜安定化作用を有することが、order parameter の測定及び示差走査熱量分析の結果から示された。肥満細胞からの histamine 遊離を惹起する刺激は、リン脂質二重層の膜透過性を上昇させる[71]。terfenadine のリン脂質二重層に対する安定化効果は、細胞膜を介した細胞内への ion の流入や、細胞膜における情報伝達機構を抑制し、これが histamine 遊離を抑制する一つの機序として作用すると考えられる。

本実験結果より、抗アレルギー薬は細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を抑制することが示されたが、terfenadine や ketotifen などの疎水性の高い塩基性の化合物は、細胞膜の脂質二重層の安定化作用を発揮するのに対し、DSCG は細胞膜脂質二重層と相互作用せずに、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を抑制することが判明した。細胞内 cAMP level の上昇は、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を抑制することが本章の実験より明らかにされたが、DSCG の効果は細胞内 cAMP level とは無関係に発現するということも指摘されている[73]。現在の所、DSCG が如何なる機序によって細胞内 store からの Ca^{2+} の遊離を抑制しているのかは明かではないが、細胞膜から細胞内 Ca store への情報伝達に関与する細胞膜レベルでの機構に対し抑制的な影響を及ぼしているものと考えられる。

第VII章　肥満細胞からの histamine 遊離における細胞内 Ca ion 動態の画像解析と抗アレルギー薬の効果

II. oxatomide の効果を中心として

肥満細胞からの histamine 遊離反応の際には、細胞内 Ca level の上昇が必須である事は周知である。特に、Ca-free の媒液中で生じる histamine 遊離反応の際には、細胞内 Ca store から Ca^{2+} が放出される。また、抗アレルギー薬の histamine 遊離抑制作用の一つの機序が、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の放出抑制にあることも明かとなった[90]。

Ca antagonist は、Ca channel を介した細胞外からの Ca^{2+} の流入を抑制する化合物であり、肥満細胞からの histamine 遊離を抑制することが既に知られている[92, 93]。しかし、一般に Ca antagonist が肥満細胞からの histamine 遊離を抑制する濃度は、心臓血管系に効果を有する濃度よりも遙かに高いことが指摘されており[92]、Ca antagonist を抗アレルギー薬として使用する試みは必ずしも成功していない。一方、diphenylpiperazine 系の Ca antagonist に類似した構造を有する oxatomide は、感作肺切片や感作好塩基球からの抗原抗体反応による histamine 遊離を抑制し、実験喘息モデルに於て強い抑制効果が認められている薬物である[94, 95]。oxatomide 及び数種の Ca antagonist の肥満細胞からの histamine 遊離抑制機序の解明を目的として、これらの薬物の細胞内 Ca 動態に及ぼす効果について検討した。

[実験方法]

<u>感作モルモット肺切片からの histamine 遊離</u>

Hartley 系雄性モルモットを Mota の方法[96]に準じて、ovalbumin で感作した。4 週間後に肺を摘出し、氷冷 Tyrode solution (in mM; NaCl 137, KCl 2.7, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1, NaH_2PO_4 0.42, $NaHCO_3$ 12, glucose 5.5; pH 7.2) 中にて肺を細切した (約 1 mm^3)。200 mg の肺切片を Tyrode solution 中に suspend し、被検薬物を添加して 37℃、10 分間の incubation を行った。その後、抗原 (20 μg/ml) を加えて更に 20 分間 incubation した。氷冷により反応を停止させて遠沈し、上清中に遊離された histamine と組織に残存した histamine を別

々に蛍光定量し[97]、histamine 遊離率を求めた。

肥満細胞への ^{45}Ca の取り込み

ラット腹腔肥満細胞への ^{45}Ca の取り込みは、Spataro et al. の方法[63]に準じて行った。Wistar 系雄性ラット腹腔より採取した肥満細胞を、Percoll 密度勾配遠心分離法によって purify した。これに ^{45}Ca を加え 37℃、1 分間の incu-bation を行った後、種々な濃度の被検薬物を加え、更に 10 分間の incubation を行った。0.5 μg/ml の compound 48/80 を添加して 5 分間の incubation し、細胞を氷冷 PBS にて 2 回洗浄後、1 % Triton X-100 により細胞を可溶化した。これに液体シンチレーター（New England Nuclear, ATOMLIGHT）を加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター（Aloka, LSC-700）により定量した[74]。

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の microfluorometry による測定

ラット腹腔肥満細胞を Ca-free PBS で洗浄後、5 μM の quin 2 と 1 mM の EGTA を含む Ca-free PBS 中で 37℃、30 分間 incubation した後、種々の濃度の被検薬物を含む Ca-free PBS 中で 37℃、5 分間の incubation を行った。この細胞に 0.1 μg/ml の compound 48/80 を 1 分間作用させた。肥満細胞内の Ca^{2+} と chelate 結合した quin 2 によって発せられる蛍光の強度を、個々の細胞について、蛍光顕微鏡（Nikon, XF）に photon counter（Nikon, P-1）を接続した microfluorometry により測定した（n = 30）。

肥満細胞内 Ca 動態の画像処理による解析

quin 2 を取り込ませた肥満細胞の蛍光顕微鏡像を、超高感度テレビカメラに接続した実時間画像処理装置（Hamamatsu, C-1966-20 video intensified microscopy（VIM）system）を通して、3/4 inch video tape recorder（Sony, VTR）に記録した。肥満細胞の蛍光強度の変化を、実時間で記録し、画像処理システム（NEC, ACOS-1000, image system for online processing）を用いて疑似カラー処理を行った。蛍光の強度は 8 bit の A-D 変換により、0 から 255 の digital 値に変換し、この値に応じて蛍光強度が最大のものを白とし、以下、赤、橙、黄、

白、青、藍、紫、黒、にカラー処理を行った[90]。

新生児ラット心筋細胞の初代培養細胞への ^{45}Ca の取り込み

新生児ラット心筋細胞の培養は Harary and Farley の方法[98]に準じて行った。生後 1 - 5 日目の Wistar 系ラット新生児の心臓を摘出し、細切した後、PBS に溶解した 0.25 % Trypsin を加えて 37℃、20 分間の incubation を行った。細胞をPBS にて洗浄後、10 % 牛胎児血清 (Flow Laboratories) を含む RPMI-1640 培地に 2 x 10^5 cells/ml となるように浮遊させた。この細胞浮遊液を micro-plate (Falcon 3047) に 1 ml/well となるようにして、5 % CO_2 incubator にて 37℃、48 時間の培養を行った。その後、これらの心筋細胞が周期的に収縮するのを位相差鏡検により確認した。

ラット心筋初代培養細胞を、種々の濃度の被検薬物を含む PBS 中で 37℃、5 分間の incubation を行った後、microplate の各 well に 1 μCi の ^{45}Ca を添加し、更に 1 分間の incubation を行った。その後、100 μl の 100 mM $CaCl_2$ を加えて isotope の取り込みを停止させた後、細胞を 1 ml の氷冷 PBS で洗浄した。microplate の well の底部に吸着した細胞を 0.5 N NaOH を加えて可溶化し、上述の方法に従って、^{45}Ca 取り込み量を定量した。

モルモット肺における cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) 及び cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (cGMP) 含量の定量

感作モルモットの肺切片を種々な濃度の被検薬物存在下に 37℃、10 分間の incubation を行った後、20 μg/ml の抗原を添加して更に 20 分間の incuba-tion を行った。肺切片を遠心分離した後、Polytron (Kinematika)によってこれを homogenize し、組織中の cAMP 及び cGMP 含量を、それぞれの radioimmuno-assay kit (Yamasa) を用いて定量した[99]。

統計処理

実験に於て得られた data の有意性は Student の t-test によって検定した。IC_{50} 値は Litchfield-Wilcoxon 法によって求めた。

[実験結果]

抗原抗体反応による感作モルモット肺切片からの histamine 遊離

感作モルモット肺に抗原を作用させると、27.6 ± 3.6 % の histamine 遊離が惹起された (N = 6)。Table 1 に示した様に、oxatomide は 0.1μM 以上の濃度に於て肺からの histamine 遊離を濃度依存的に強力に抑制した。ketotifen の抑制効果は oxatomide に比較するとかなり弱かった。

compounds	μM	% histamine release − ovalbumin	% histamine release + ovalbumin	% inhibition
control		4.9±0.5	27.6±3.6	−
oxatomide	0.01	5.8±1.1	23.6±1.4	15.3
	0.1	4.9±0.4	20.0±3.5 *	27.7
	1	4.7±0.4	18.3±0.6 **	40.1
	10	4.2±0.5	15.9±0.8 **	48.5
ketotifen	0.1	3.3±0.3	24.4±3.5	7.0
	1	3.8±0.4	20.0±0.7 *	27.8
	10	4.7±0.7	18.8±1.0 **	37.9
	100	7.5±0.7	22.9±2.0 *	32.2

Table 1. Effects of oxatomide and ketotifen on the histamine release from chopped lung pieces of sensitized guinea-pig induced by antigen-antibody reaction.

Each value represents the mean±SEM (n=5). Significantly different from the control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

ラット腹腔肥満細胞への ^{45}Ca の取り込み

ラット腹腔肥満細胞への ^{45}Ca 取り込みに及ぼす oxatomide と Ca antagonist である verapamil の効果を比較した。静止状態における ^{45}Ca の取り込み量は 378.6 ± 16.9 dpm/10^6 cells であったが、compound 48/80 の作用下に ^{45}Ca の取り込みは 1163.5 ± 58.8 dpm/10^6 cells に上昇した。Fig. 1 に示す如く、oxatomide は ^{45}Ca の取り込みを 0.1 μM 以上の濃度で濃度依存に抑制した。^{45}Ca 取り込み抑制作用を示す oxatomide の濃度は、histamine 遊離抑制作用を示す濃度と一致した[95]。また、spontaneous な ^{45}Ca 取り込みに対しては、oxatomide はなんら影響を及ぼさなかった。一方、verapamil は ^{45}Ca の取り込みには弱い抑制作用しか示さず、有意な抑制効果は 100 μM 以上の濃度で観察された。

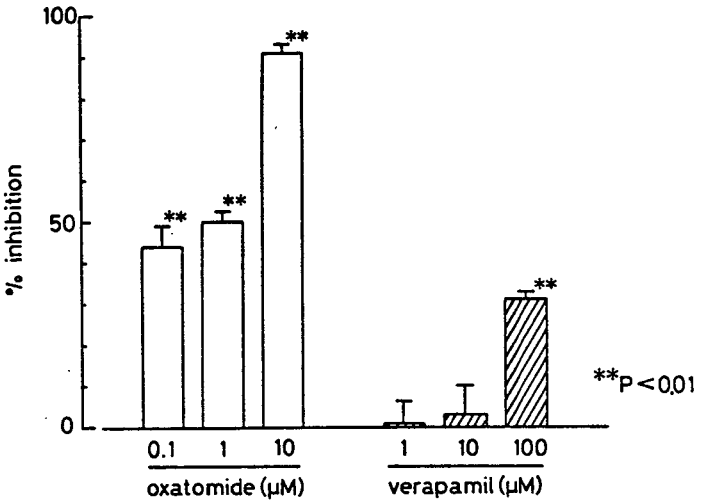


Fig. 1. Inhibitory effects of oxatomide and verapamil on ^{45}Ca uptake into rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 (0.5 μg/ml).

Each column represents the mean±SEM of 5 experiments. Significantly different from the control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

ラット腹腔肥満細胞内 Ca^{2+} 濃度の microfluorometry

ラット腹腔肥満細胞に quin 2 を取り込ませ、細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を

microfluorometry によって検討した。対照時の状態の蛍光強度を 100（± 6.8, n = 260）とした場合、0.2μg/ml の compound 48/80 を 37℃、1 分間作用させると、蛍光強度は 149.6 ± 8.7（n = 250, $p < 0.01$）に上昇した。この実験は Ca-free の媒液中にて行ったので、この Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離を反映している。細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離に対する oxatomide, verapamil, D-600 および ketotifen の抑制効果を検討した結果を Fig. 2 に示した。compound 48/80 による細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離に対し、oxatomide は最も強い抑制作用を示し、1μM ではほぼ完全にこれを抑制した。verapamil と D-600 の効力は、それぞれ oxatomide の約 1/10、1/100 であった。ketotifen の効果は、極めて弱かった。

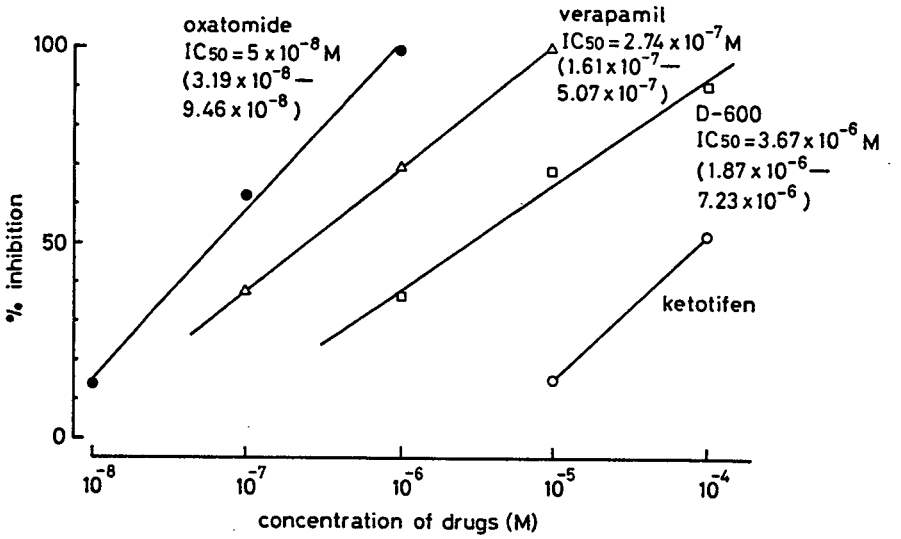


Fig. 2. Inhibitory effects of some antiallergic compounds and calcium antagonists on the fluorescence intensity increase of quin 2-loaded mast cells induced by compound 48/80 (0.2μg/ml).

<u>単一肥満細胞を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の画像処理法による経時的測定</u>

quin 2 を取り込ませたラット肥満細胞を compound 48/80 によって刺激した際の蛍光強度の上昇を、VIM system を用い単一細胞で経時的に測定した。蛍光強度を測定した target area は、Fig. 3 の細胞上に四角で示した。蛍光強度は、

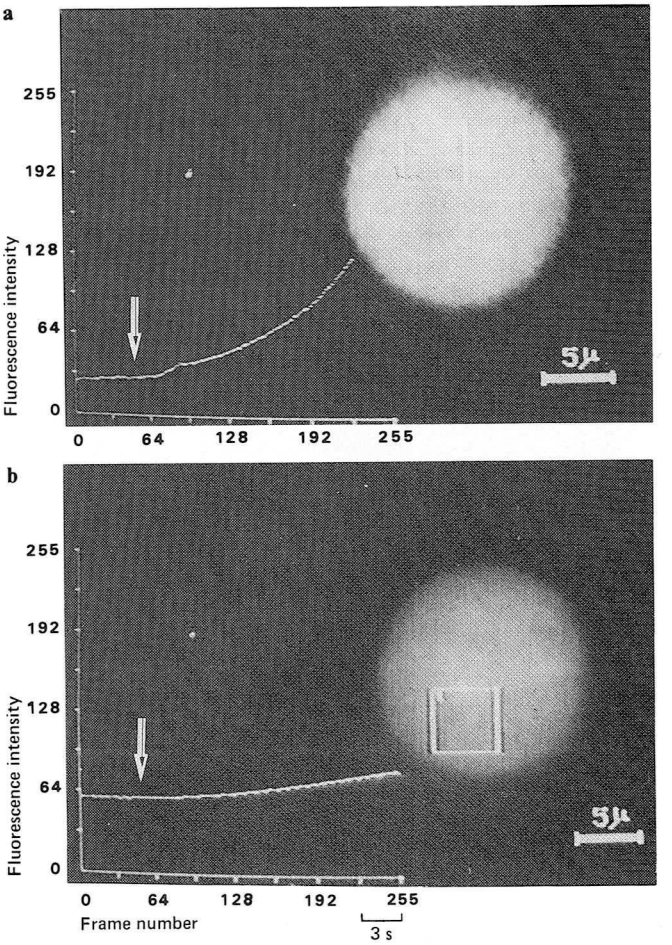


Fig. 3. Real time measurement of the fluorescence intensity of quin 2-loaded single mast cell stimulated with compound 48/80 (0.2μg/ml).

a) mast cell exposed to compound 48/80.

b) mast cell pretreated with 1μM of oxatomide.

この部分を構成する全ての画素（pixel）の画素値（pixel value）を実時間で集積し、8 bit（0 から 255）の相対値で画面上の縦軸に表示した。蛍光強度の測定は 10 video frame ごと（即ち 1/3 sec ごと）に行った。Fig. 3a に示すように、Ca-free 媒液中での compound 48/80（0.2 μg/ml）作用下に、蛍光強度は速やかに上昇し、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離が示された。これに対し、1 μM

の oxatomide で前処置した肥満細胞においては、細胞の蛍光強度は殆ど上昇しなかった (Fig. 3b)。この事より、oxatomide は細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離を強く抑制していることが確かめられた。

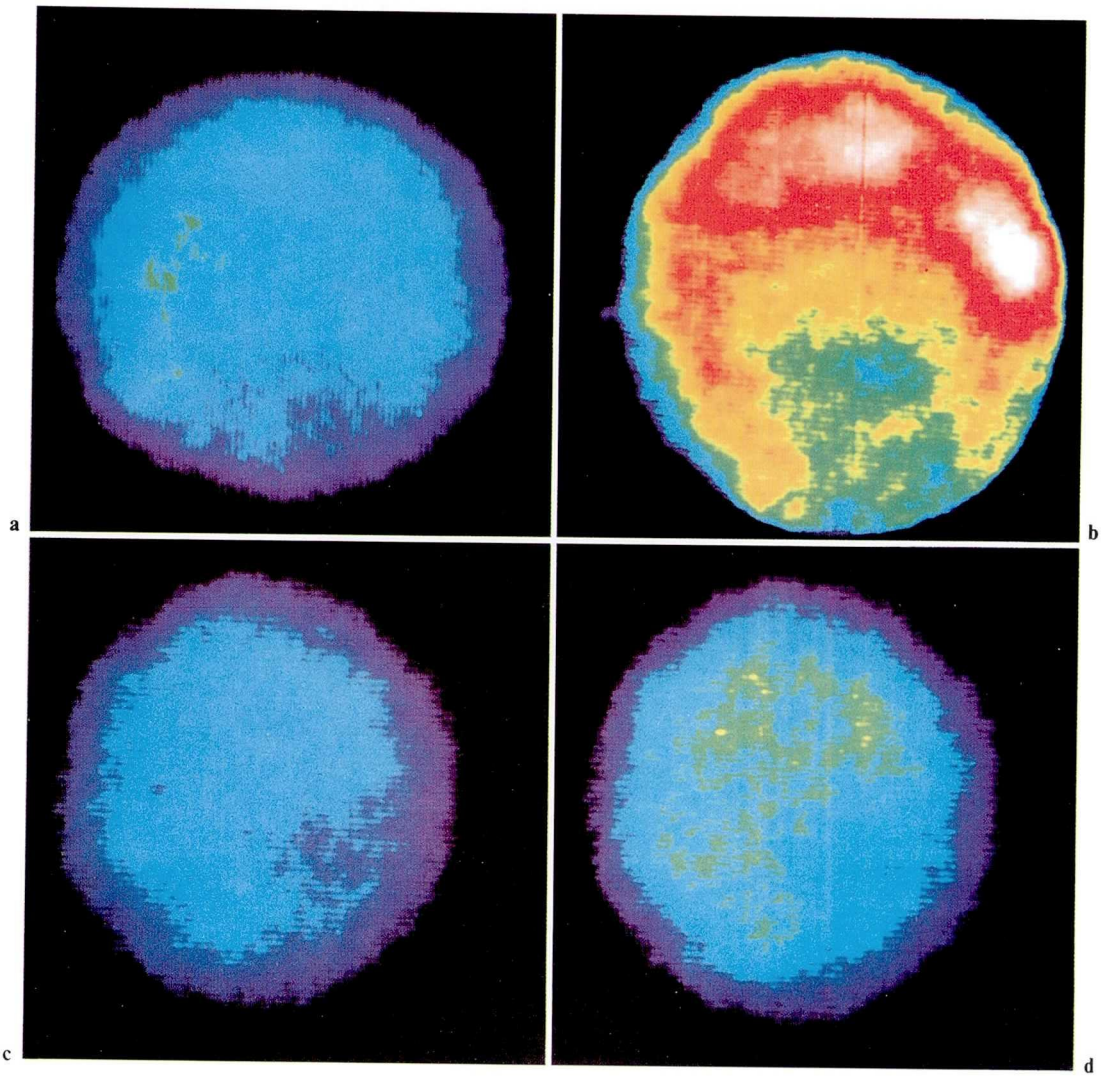


Fig. 4. Pseudo-color conversion of the fluorescence images of quin 2 loaded mast cells.

細胞内 Ca^{2+} 分布の画像解析

肥満細胞内 Ca^{2+} の動態を解析するために、quin 2 を取り込ませた肥満細胞の蛍光顕微鏡像の疑似カラー変換を行った。

正常肥満細胞においては細胞の蛍光強度は低く、疑似カラー像では細胞全体にわたって青い色を示し、特に、核の部分での蛍光強度は低かった (Fig. 4a)。この細胞に compound 48/80 を作用させた 1 分後の疑似カラー像を Fig. 4b に示した。細胞の蛍光強度が全体に著しく上昇しており、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離が生じていることが明かとなった。一方、あらかじめ 1 μM の oxatomide で前処置した肥満細胞においては、疑似カラー像においても compound 48/80 による蛍光強度は対照細胞に比較して殆ど増加しておらず、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離が強く抑制されていることが示された (Fig. 4c, d)。

モルモット肺における cyclic nucleotide 含量に及ぼす作用

感作モルモット肺切片中の cAMP 及び cGMP の含量に及ぼす oxatomide、ketotifen の効果について検討を行った。対照群においては、モルモット肺切片中の cAMP、cGMP の含量は、それぞれ 348.8 ± 3.7 及び 31.7 ± 0.4 pmoles/g であった。何れの薬物も、単独では両 cyclic nucleotides の含量に対して全く影響を及ぼさず、cAMP と cGMP の含量比 (A/G ratio) も変化しなかった。

抗原を作用させた際には、cAMP 含量は 223.9 ± 1.4 pmoles/g tissue に減少し、一方、cGMP 含量は 63.8 ± 3.4 pmoles/g tissue へと上昇した。この結果、A/G ratio は著しく減少した。oxatomide と ketotifen の何れの薬物も、抗原抗体反応によって惹起される cyclic nucleotide 含量の変化を有意に抑制したが、その効果は、ketotifen よりも oxatomide の方が強力であった (Table 2)。

新生児ラット心筋初代培養細胞への ^{45}Ca の取り込み

新生児ラット心筋初代培養細胞への ^{45}Ca の取り込みに及ぼす oxatomide 及び verapamil の効果を比較、検討した。拍動する新生児ラット心筋培養細胞は、強力な ^{45}Ca の取り込みを示した (444.8 ± 29.2 dpm/10^6cells, n = 4)。この ^{45}Ca 取り込みに対して、verapamil は 1 nM 以上の濃度で濃度に依存する強力な抑制作用を示した。oxatomide も類似の作用を示したが、作用発現には 1 μM 以

上の濃度を必要とし、その効果は 50 % 抑制値で比較すると、verapamil の約 1/100 であった (Fig. 5)。

compounds	μM	cAMP pmol/g tissue	cGMP pmol/g tissue	A/G ratio
control		223.9±1.4	63.8±3.4	3.5
oxatomide	0.01	256.5±3.5 **	68.7±5.3	3.7
	0.1	331.5±1.3 **	50.8±4.3 *	6.5
	1	333.5±4.2 **	44.9±3.5 **	7.4
	10	357.0±1.2 **	60.0±6.4	6.0
ketotifen	0.1	243.0±4.4 **	58.4±1.8	4.2
	1	323.3±0.5 **	57.1±1.6	5.7
	10	352.1±2.5 **	50.3±4.4 *	7.0
	100	309.0±1.7 **	40.5±1.6 **	7.6

Table 2. Effects of oxatomide and ketotifen on the cyclic nucleotide contents in the sensitized guinea-pig lung pieces after antigen challenge. Antigen (ovalbumin) was added to a final concentration of 50μg/ml. Each value represents the mean±SEM of 5 samples; each assay was carried out in duplicate. Significantly different from the control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

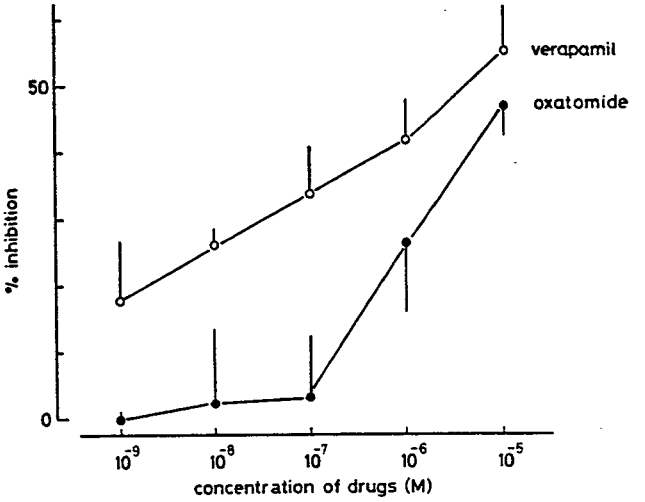


Fig. 5. Inhibitory effects of oxatomide and verapamil on ^{45}Ca uptake into cultured neonatal rat heart cells.

Each plot represents the mean±SEM of 4 experiments.

[考察]

肥満細胞からの histamine 遊離の際には、細胞内 Ca^{2+} level の上昇は必須である。細胞外に Ca^{2+} を含まない媒液中での反応の際にも、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離が惹起され、種々な抗アレルギー薬の前処置は、この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制する。本章では、化学構造が diphenylpiperazine 系の Ca antagonist に類似した oxatomide に着目し、肥満細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離に及ぼす効果を中心に、Ca antagonist 及び ketotifen との比較検討を行った。

抗原抗体反応や compound 48/80、A23187 といった histamine 遊離物質によって惹起されるラット腹腔肥満細胞からの histamine 遊離に対し、oxatomide が強力な抑制作用を有しており、その効果は clemastine、promethazine、ketotifen、astemizol などよりも強力であることが既に示されている[100, 101]。本実験に於て、感作モルモット肺からの抗原抗体反応による histamine 遊離を抑制した

oxatomide の濃度は、既に報告されている oxatomide の histamine 遊離抑制濃度とよく一致した[100, 101]。oxatomide と diphenylpiperadine 系 Ca antago-nist の化学構造の類似性、および既存の Ca antagonist でも抗アレルギー効果が報告されていることなどより、oxatomide の作用機序の一つとして Ca antago-nist と類似した細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制する可能性が考えられた。肥満細胞への ^{45}Ca 取り込みに対する抑制効果を verapamil と比較した際、compound 48/80 によって惹起される ^{45}Ca 取り込みに対して、oxatomide は verapamil よりも約 1000 倍強力な抑制効果を示した。一方、ラット心筋初代培養細胞における ^{45}Ca 取り込みに対して、oxatomide の抑制効果は verapamil の約 1/100 であった。このことは、oxatomide が肥満細胞に対して高い選択性を持つ Ca ant-agonist であることを示唆している。

compound 48/80 は、Ca-free の媒液中においても、肥満細胞内 Ca store から Ca^{2+} を遊離させる。oxatomide、ketotifen のような抗アレルギー薬と、vera-pamil、D-600 のような Ca antagonist を前処置し、compound 48/80 の Ca^{2+} 遊離抑制作用を比較したところ、oxatomide が最も強い抑制作用を示した。Ca antagonist である verapamil、D-600 で前処置した肥満細胞に於ても、抑制効果は観察されたが、ketotifen の作用は最も弱かった。この結果、oxatomide や Ca antagonist による肥満細胞からの histamine 遊離抑制効果には、細胞外からの Ca 流入抑制作用のみならず、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離抑制作用も関与していることが判った。oxatomide は、verapamil よりも約 10 倍、D-600 よりも約 100 倍強力にこれを抑制した。

oxatomide による細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離抑制作用は、画像処理を用いた解析によって、更に明かとなった。Ca-free 媒液中で compound 48/80 作用下に、肥満細胞内 Ca store から速やかに Ca^{2+} 遊離が惹起されるが、1 μM oxatomide 前処置によって、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離はほぼ完全に抑制され、細胞内における Ca^{2+} の分布も、対照細胞での分布と極めて類似した。

肥満細胞からの histamine 遊離に際しては、細胞内の cAMP level が低下するが、theophylline や dibutyryl cAMP (db-cAMP) のような細胞内 cAMP level を上昇させる薬物は、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離を抑制し、histamine 遊離を抑制することが知られている[72, 90]。一方、牛の培養 chromaffin cell や

ラット肝細胞を用いた実験から、muscarinic な刺激や calcium ionophore の作用下に細胞内 Ca^{2+} level が上昇すると、細胞内 cGMP 含量が増加することも示されている[102, 103]。これは、Ca^{2+} 取り込みにともなう guanylate cyclase 活性の増大に起因すると考えられている。このため、細胞内の cGMP level は、細胞が Ca^{2+} level の上昇によって活性化されている事を示す一つの指標となり得る。感作モルモット肺切片における抗原抗体反応の結果、cAMP 含量の低下と cGMP 含量の上昇が観察され、A/G ratio は低下した。oxatomide、ketotifen の両薬物とも、単独ではこれらの cyclic nucleotide 含量に何ら変化を及ぼさなかったが、抗原抗体反応によって惹起される変化に対しては cAMP 含量の低下、cGMP 含量の上昇のいずれも抑制した。両薬物とも、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制することが示されており、ここで観察された cGMP 濃度上昇に対する抑制効果は、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が抑制されたためとも考えられる。また、cAMP 含量の低下を抑制する作用は、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離に対して抑制的な効果を及ぼすものと考えられた。

本章における実験の結果より、oxatomide は細胞外からの Ca^{2+} 流入抑制と細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離を強く抑制することが示された。また、verapamil や D-600 のような Ca antagonist は、肥満細胞に作用して、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離を抑制することも示された。しかし、肥満細胞に対する verapamilの効果は、心筋培養細胞に対する効果よりもかなり弱かった。oxatomide の場合は丁度逆の関係が成立し、細胞種によって薬物の効果がかなり異なっている事が明らかになった。

［結語］

肥満細胞からの histamine 遊離反応においては、細胞膜の表面における刺激情報の認識が、反応開始の第一段階である。これに続いて細胞膜を介した情報伝達が生じ、細胞内へと刺激情報が伝達されるものと考えられる。細胞内で second messenger として作用するのは Ca2+ であると考えられており、細胞骨格や calmodulin といった Ca2+ に依存した細胞機能調節因子を活性化し、最終的に histamine 遊離に至るものと考えられている。

肥満細胞からの histamine 遊離を惹起する抗原抗体反応や compound 48/80 の作用下に、肥満細胞の膜透過性が上昇することは、電気生理学的な研究から示されてきていたが、本研究において、この様な反応の際には細胞膜の流動性が上昇することが示された。特に、細胞膜のリン脂質二重層における流動性の上昇が生じていることが、リン脂質二重層を蛍光ラベルした蛍光偏光解消法によって明かとなった。これが、細胞膜表面における IgE receptor の cross-bridging や aggregation を可能とし、細胞膜の透過性を上昇させる主要な要因になることが考えられた。

細胞膜の透過性、流動性の上昇というような物理的性質の変化が、細胞膜のリン脂質二重層において生じていることが示唆されたため、モデル膜系を用いた解析を行った結果、抗原抗体反応や compound 48/80 の作用下に、人工的な膜モデルである liposome や black lipid membrane の膜透過性及び膜流動性が上昇した。このような膜流動性及び膜透過性の上昇に対して、抗アレルギー薬は抑制的な作用を示すことも示された。肥満細胞からの histamine 遊離の際には、細胞膜流動性及び透過性亢進の結果、細胞内へのイオン流入が生じ、これが histamine 遊離の trigger となりうると考えられた。抗アレルギー薬は、リン脂質二重層に対する膜安定化効果によって、histamine 遊離反応初期の細胞膜に生じる perturbation を抑制することが示唆された。

細胞膜リン脂質二重層における情報伝達機構として、リン脂質を基質とした種々な酵素反応が想定されている。しかし、肥満細胞からの histamine遊離反応は、特に能動感作された細胞や、compound 48/80 のような histamine 遊離物質を用いた場合には、数秒以内に plateau に達するという極めて速やかな反応である。この速い立ち上がりを、何段階にもわたる step を経るような生化学的反応では、

適切に説明することは困難である。抗原抗体反応や histamine 遊離物質による刺激に続いて、リン脂質のメチル化反応が生じ、細胞膜の流動性が上昇するという仮説は、反応の進行に時間がかかることや、生成されるメチル化リン脂質の量が少ないと批判されているが、メチル化リン脂質が細胞膜リン脂質二重層の透過性にどの様な影響を及ぼすのかについては、直接的な証明はなされていなかった。また、細胞の活性化にともなって活性化を受ける phospholipase A2 の代謝産物である lysophosphatidylcholine (lyso-PC) が膜流動性、膜透過性を上昇させるということが想定されていたが、現実の細胞において生じ得る lyso-PC の量はかなり少ないため、これに対する疑問も提出されていた。この様な点について、メチル化リン脂質及び lyso-PC の作用をモデル膜を用いて検討した結果、何れもリン脂質二重層に対する膜安定化効果を示すことが判明した。また、lyso-PC は、肥満細胞からの histamine 遊離反応を抑制することも示された。

以上のような知見より、肥満細胞からの histamine 遊離反応が開始される初期の反応段階では、リン脂質二重層を中心にした生物物理的な process も重要な役割を果たすことが示唆された。

肥満細胞からの histamine 遊離反応の開始段階では、細胞内の Ca2+ level が上昇することが必須であり、特に、Ca-free の条件下で生じる histamine 遊離反応においては、細胞内 Ca store からの Ca2+ 遊離が重要であると考えられている。この点について、Ca2+ と chelate 結合して強い蛍光を発する色素である quin 2 を肥満細胞に取り込ませ、microfluorometry 及び画像処理の手法を用いて検討した。その結果、細胞が resting の状態では、細胞内の Ca2+ は細胞質に低レベルで分布しており、核や顆粒内の Ca2+ は細胞質よりも低いことが判明した。この細胞を histamine遊離物質で刺激した際には、細胞内 Ca store から細胞質全体へと広がる Ca2+ の速やかな遊離が生じていることが証明された。また、抗アレルギー作用を持った薬物は、細胞内 Ca store からの Ca2+ 遊離を抑制することも示された。

本研究における肥満細胞の刺激応答機構の解析から、肥満細胞からの histamine 遊離反応においては、細胞膜リン脂質二重層の perturbation が生じて細胞膜の流動性及び膜透過性が亢進する事、これに続いて細胞内 Ca store からの Ca2+ の遊離が生じ、細胞の活性化が起きる事が示された。ある種の抗アレルギー

薬はこの様な細胞の初期活性化段階を抑制することにより、肥満細胞からのhistamine 遊離反応を抑制することも明かとなった。

[謝辞]

本論文を終えるにあたり、本研究の実施に終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜った岡山大学薬学部田坂賢二教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成に際し、御指導を賜った大阪大学薬学部岩田平太郎教授に篤く御礼申し上げます。

また、有益な御助言と御指導を頂いた岡山大学薬学部亀井千晃助教授、岡山大学薬学部赤木正明助手に深謝致します。更に、有益な御助言と御討論を頂いた岡山大学薬学部薬物学教室の各位に深く感謝致します。

[参考文献]

[1] Metzger, H., Goetze, A., Kanellopoulos, J., Holowka, D. and Fewtrell, C.: Structure of the high-affinity mast cell receptor for IgE.
Fed. Proc., 41 (1982) 8 - 11

[2] Ishizaka, T., Hirata, F., Sterk, A. R., Ishizaka, K. and Axelrod, J. A.: Bridging of IgE receptors activates phospholipid methylation and adenylate cyclase in mast cell plasma membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 6812 - 6816

[3] Singer, S. J. and Nicolson, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science, 175 (1972) 720 - 731

[4] 田坂賢二：肥満細胞における脱顆粒機構の電気生理学的研究
臨床免疫, 6 (1974) 697 - 713

[5] Muto, Y., Tohmatsu, T., Yoshioka, S. and Nozawa, Y.: Inositol 1,4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from permeabilized mastocytoma cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 135 (1986) 46 - 51

[6] Hirata, F. and Axelrod, J.: Phospholipid methylation and biological signal transmission.
Science, 209 (1980) 1082 - 1090

[7] Vance, D. E. and de Kruijff, B.: The possible functional significance of phosphatidylethanolamine methylation.
Nature, 288 (1980) 277 - 279

[8] Moore, J. P., Smith, G. A., Hesketh, T. R. and Metcalfe, J. C.: Early increases in phospholipid methylation are not necessary for the mitogenic stimulation of lymphocytes.
J. Biol. Chem., 257 (1982) 8183 - 8189

[9] Benyon, R. C., Church, M. K. and Holgate, S. T.: IgE dependent activation of mast cells is not associated with enhanced phospholipid methylation.

Biochem. Pharmacol., 35 (1986) 2535 - 2544

[10] Foreman, J. C., Hallett, M. B. and Monger, J. L.: The relationship between histamine secretion and ^{45}calcium uptake by mast cells.
J. Physiol., 271 (1977) 193 - 214

[11] Horsfield, G. I.: The effect of compound 48/80 on the rat mast cell.
J. Pathol. Bacteriol., 90 (1965) 599 - 605

[12] Fewtrell, C. M. S., Foreman, J. C., Jordan, C. C., Oehme, P., Renner, H. and Stewart, J. M.: The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat.
J. Physiol., 330 (1982) 393 - 411

[13] Bloom, G. D. and Hägermark, O.: A study on morphological changes and histamine release induced by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells.
Exp. Cell Res., 40 (1965) 637 - 654

[14] Sandermann, H., jr.: Regulation of membrane enzymes by lipids.
Biochim. Biophys. Acta, 515 (1978) 209 - 237

[15] Ennis, M., Atkinson, G. and Pearce, F. L.: Inhibition of histamine release induced by compound 48/80 and peptide 401 in the presence and absence of calcium. Implications for the mode of action of antiallergic compounds.
Agents Actions, 10 (1980) 222 - 228

[16] Foreman, J. C. and Monger, J. L.: The role of the alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion.
J. Physiol., 224 (1972) 753 - 769

[17] Ennis, M, Truneh, A., White, J. R. and Pearce, F. L.: Calcium pools in involved in histamine release from rat mast cells.
Int. Arch. Aller. Appl. Immunol., 62 (1980) 467 - 471

[18] Uvnäs, B., Aborg, C.-H. and Bergendorff, A.: Storage of histamine in rat mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to pro-

tein carboxyls in the granule heparin-protein complex.
Acta Physiol. Scand., 78 (1970) suppl. 336, 1 - 26
[19] Nemeth, A. and Röhlich, P.: Rapid separation of rat peritoneal mast cells with Percoll.
Eur. J. Cell. Biol., 20 (1980) 272 - 275
[20] Levine, B. B. and Vaz, N. M.: Effect of combination of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse.
Int. Arch. Aller., 39 (1970) 156 - 171
[21] Frick, O. L. and Ishizaka, K.: Association of IgE with reaginic activity in sera from grass pollen- and horse dander-sensitive individuals.
J. Aller., 45 (1969) 220 - 233
[22] Matsukura, Y., Tomita, T. and Shigeno, R.: Electron microscopic observation on the ABO antigen sites of the human erythrocyte membranes with ferritin-antibody conjugates. I. On the serological specificity of ferritin antibody conjugates.
Niigata Igakkai Zatshi, 83 (1969) 234 - 244
[23] Kuhry, J. G., Bronner, C., Amellal, M. and Landry, Y.: Plasma membrane fluidity studies by fluorescence polarization in rat mast cells stimulated by compound 48/80.
Agents Actions, 16 (1985) 109 - 112
[24] Tasaka, K., Endo, K. and Yamasaki, H.: A fluorescent study of hist-amine release from a single mast cell of the rat mesentery.
Proc. J. Acad., 46 (1970) 831 - 836
[25] Foreman, J. C., Mongar, J. L. and Gomparts, B. D.: Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process.
Nature, 245 (1973) 249 - 251
[26] Barfort, P., Arquilla, E. R. and Vogelhut, P. O.: Resistance

changes in lipid bilayers: Immunological applications.
Science, 160 (1968) 1119 - 1121
[27] Haxby, J. A., Kinsky, C. B. and Kinsky, S. C.: Immune response of a liposomal model membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61 (1968) 300 - 307
[28] Alving, C. R., Urban, K. A. and Richards, R. L.: Influence of temperature on complement-dependent immune damage to liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, 600 (1980) 117 - 125
[29] Okuyama, M. and Yoshida, T.: New formation techniques of a tough bilayer (life time 24 hrs, breakdown voltage 7 V), a large bilayer (16.5 cm x 3.0 cm x 4.6 nm) and low resistance bilayer (10^3 ohm•cm^2) in aqueous solution.
Membrane, 1 (1976) 263 - 272
[30] Taylor, J. and Haydon, D. A.: Stabilization of thin films of liquid hydrocarbon by alkyl chain interaction.
Discuss. Faraday Soc., 42 (1966) 51 - 68
[31] Shore, P. A.: Fluorometric assay of histamine.
In 'Methods in Enzymology' vol. 17-b, (eds.) H. Tabor and C. W. Tabor, Academic Press, New York, (1971) pp. 842 - 845
[32] Strandberg, K. and Westerberg, S.: Composition of phospholipids and phospholipid fatty acids in rat mast cell.
Mol. Cell. Biochem., 11 (1976) 103 - 107
[33] Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography.
J. Biol. Chem., 234 (1957) 466 - 468
[34] Rudel, L. L. and Morris, M. D.: Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde.
J. Lipid Res., 14 (1973) 364 - 366
[35] Jähnig, F.: Structural order of lipids and proteins in membranes: Evaluation of fluorescence anisotropy dada.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 6361 - 6365

[36] van Blitterswijk, W. J., van Hoeven, R. P., and van der Meer, B. W.: Structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurement.
Biochim. Biophys. Acta, 644 (1981) 323 - 332
[37] Shinitzky, M. and Inber, M.: Difference in microviscocity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells.
J. Mol. Biol., 85 (1974) 603 - 615
[38] Lakowicz, J. R., Prendergast, F. G. and Hogen, D.: Differential polarized phase fluorometric investigations of diphenylhexatriene in lipid bilayer. Quantitation of hindered depolarizing rotation.
Biochemistry, 18 (1979) 508 - 519
[39] Brunner, J., Graham, D. E., Hauser, H. and Semenza, G.: Ion and sugar permeabilities of lecithin bilayers: Composition of curved and planar bilayers.
J. Membr. Biol., 57 (1980) 133 - 141
[40] Michaels, D. W., Abramovitz, A. S., Hammer, C. H. and Mayer, M. M.: Increased ion permeability of planar lipid bilayer membranes after treatment with the C5b - 9 cytolytic attack mechanism of complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 (1976) 2852 - 2856
[41] Six, H. R., Young, W. W., jr., Uehara, K. and Kinsky, S. C.: Effect of antibody-complement on multiple vs. single compartment liposomes. Application of a fluorometric assay for following changes in liposomal permeability.
Biochemistry, 13 (1974) 4050 - 4058
[42] Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J.: Molecular nature of the complement lesion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 5655 - 5659
[43] Podack, E. R., Biesecker, G. and Muller-Eberhard, H. J.: Membrane attack complex of complement: Generation of high-affinity phospholipid

binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 897 - 901
[44] Diamant, B., Kruger, P. G. and Uvnäs, B.: Local degranulation of rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80.
Acta Physiol. Scand., 79 (1970) 1 - 5
[45] Tasaka, K., Sugiyama, K., Komoto, S. and Yamasaki, H.: Repeated local degranulation of isolated rat mast cell by microelectrophoresis of basic histamine releasers.
Proc. Japan Acad., 46 (1970) 311 - 316
[46] Ortner, M. J. and Chignell, C. F.: The effect of contraction on the binding of compound 48/80 to rat mast cells: A fluorescence microscopy study.
Immunopharmacol., 3 (1981) 187 - 191
[47] Ortner, M. J. and Chignell, C. F.: Spectroscopic studies of rat mast cells, mouse mastocytoma cells, and compound 48/80 —— II. The synthesis and some binding properties of spin-labelled 48/80.
Biochem. Pharmacol., 30 (1981) 283 - 288
[48] Röhlich, P., Anderson, P. and Uvnäs, B.: Electron microscope obser-vation on compound 48/80-induced degranulation in rat mast cells.
J. Cell Biol., 51 (1971) 465 - 483
[49] Uvnäs, B.: Histamine storage and release.
Fed. Proc., 33 (1974) 2172 - 2176
[50] Johnson, A. R. and Moran, N. C.: Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48/80 and antigen.
Am. J. Physiol., 216 (1969) 453 - 459
[51] Johnson, A. R. and Moran, N. C.: Release of histamine from rat mast cells: a comparison of the effects of 48/80 and two antigen-antibody systems.
Fed. Proc., 28 (1969) 1716 - 1720
[52] Audubert, F. and Vance, D. E.: Pitfalls and problems in studies on

the methylation of phosphatidylethanolamine.
J. Biol. Chem., 258 (1983) 10695 - 10701
[53] Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extrac -tion and purification.
Can. J. Biochem. Physiol., 37 (1959) 911 - 917
[54] Cadenhead, D. A., Keller, B. M. J., Jacobson, K. and Papahadjopoulos, D.: Fluorescence probes in model membranes I.: Anthroyl fatty acid derivatives in monolayers and liposomes of dipalmitoylphospha -tidylcholine.
Biochemistry, 16 (1977) 5386 - 5392
[55] Thulborn, K. R., Tilley, L. M., Sawyer, W. H. and Treloar, F. E.: The use of n-(9-anthroyloxy)fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipid bilayers.
Biochim. Biophys. Acta, 558 (1979) 166 - 178
[56] Matayoshi, E. D. and Kleinfeld, A. M.: Emission wavelength-dependent decay of the 9-anthroyloxy-fatty acid membrane probes.
Biophys. J., 35 (1981) 215 - 235
[57] Vincent, M., de Foresta, B., Gallay, J. and Alfsen, A.: Fluorescence anisotropy decays of n-(9-anthyroyloxy)fatty acids in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. Localization of the effects of cholesterol addition.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 107 (1982) 914 - 921
[58] Vigo, C., Lewis, G. P. and Piper, P. J.: Mechanisms of inhibition of phospholipase A_2.
Biochem. Pharmacol., 29 (1980) 623 - 627
[59] Gagnon, C. and Heisler, S.: Protein carboxy-methylation: role in exocytosis and chemotaxis.
Life Sci., 25 (1979) 993 - 1000
[60] Whelan, C. J.: Histamine release from rat peritoneal mast cells by phospholipase A. The 'activation' of phospholipase A by phospholipids.

Biochem. Pharmacol., 27 (1978) 2115 - 2118

[61] Utsumi, H., Inoue, K., Nojima, S. and Kwan, T.: Interaction of spin-labeled lysophosphatidylcholine with rabbit erythrocytes.

Biochemistry, 17 (1978) 1990 - 1996

[62] Nakao, A., Buchanan, A. M. and Potokar, D. S.: Possible involvement of phospholipase A_2 in A-23187-induced histamine release from purified rat mast cells.

Int. Arch. Aller. Appl. Immunol., 63 (1980) 30 - 43

[63] Spataro, A. C. and Bosmann, H. B.: Mechanism of action of disodium cromoglycate —— mast cell calcium ion influx after a histamine-releasing stimulus.

Biochem. Pharmacol., 25 (1976) 505 - 510

[64] Klausner, R. C., Kumar, N., Weinstein, J. N., Blumenthal, R. and Flavin, M.: Interaction of tubulin with phospholipid vesicles. I. Associ-ation with vesicles at the phase transition.

J. Biol. Chem., 256 (1981) 5879 - 5885

[65] Mio, M., Okamoto, M., Akagi, M. and Tasaka, K.: Effect of N-methyl-ation of phosphatidylethanolamine on the fluidity of phospholipid bilay-ers.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 120 (1984) 989 - 995

[66] Seeman, P. and Weinstein, J.: Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines.

Biochem. Pharmacol., 15 (1966) 1737 - 1752

[67] Wroblewski, F. and LaDue, J. S.: Lactic dehydrogenase activity in blood.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90 (1955) 210 - 213

[68] Ortner, M. J., Sik, R. H., Chignell, C. F. and Sokoloski, E. A.: A nuclear magnetic resonance study of compound 48/80.

Mol. Pharmacol., 15 (1979) 179 - 188

[69] Martin, T. W. and Lagunoff, D.: Rat mast cell phospholipase A_2:

Activity toward exogenous phosphatidylserine and inhibition by N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)phosphatidylserine.
Biochemistry, 21 (1982) 1254 - 1260
[70] Strandberg, K., Sydbom, A. and Uvnas, B.: Incorporation of choline, serine, ethanolamine and inositol into phospholipids of isolated rat mast cells.
Acta Physiol. Scand., 94 (1975) 54 - 62
[71] Mio, M., Akagi, M., Sakuma, Y. and Tasaka, K.: Antigen-antibody reaction on the black lipid membrane and histamine release from antigen-coated liposome in immune response.
In 'Advances in histamine research', (eds.) B. Uvnäs and K. Tasaka, Pergamon Press, Oxford, 1982, pp. 7 - 23
[72] Tasaka, K.: Anti-allergic drugs.
Drugs Today, 22 (1986) 101 - 133
[73] Ennis, M., Truneh, A., White, J. R. and Pearce, F. L.: Inhibition of histamine secretion from mast cells.
Nature, 289 (1981) 186 - 187
[74] Mio, M., Ikeda, A., Akagi, M. and Tasaka, K.: Inhibitory effect of lysophosphatidylcholine on the histamine release from rat peritoneal mast cells.
Agents Actions, 16 (1985) 113 - 117
[75] Ladbrooke, B. D., Williams, R. M. and Chapman, D.: Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction.
Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 333 - 340
[76] de Kruyff, B., van Dijck, P. W. M., Demel, R. A., Schuijff, A., Brants, F. and van Deenen, L. L. M.: Non-random distribution of choleste-rol in phosphatidylcholine bilayers.
Biochim. Biophys. Acta, 356 (1974) 1 - 7
[77] Seeman, P.: The membrane action of anesthetics and tranquilizers.

Pharmacol. Rev., 24 (1972) 583 - 655

[78] Kazimierczak, W., Peret, M. and Maslinski, C.: The action of local anesthetics on histamine release.
Biochem. Pharmacol., 25 (1976) 1747 - 1750

[79] Mabrey-Gaud, S.: Differential scanning calorimetry of liposomes. In 'Liposomes: from physical structure to therapeutic applications', (ed.) C. G. Knight, Elsevier, Amsterdam, (1981) pp. 105 - 138

[80] Trudell, J. R.: A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separation in nerve membranes.
Anesthesiology, 46 (1977) 5 - 10

[81] White, J. R., Ishizaka, T., Ishizaka, K. and Sha'afi, R. I.: Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by quin-2 in stimulated rat peritoneal mast cell.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984) 3978 - 3982

[82] Beaven, M. A., Roger, J., Moore, J. P., Hesketh, T. R., Smith, G. A. and Metcalfe, J. C.: The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells.
J. Biol. Chem., 259 (1984) 7129 - 7136

[83] Tsein, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T. J.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intra-cellularly trapped fluorescence indicator.
J. Cell Biol., 94 (1982) 325 - 334

[84] Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsein, R. Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties.
J. Biol. Chem., 260 (1985) 3440 - 3450

[85] Almers, W. and Neher, E.: The Ca signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the method of dye-loading.
FEBS Lett., 192 (1985) 13 - 18

[86] Highsmith, S., Bloebaum, P. and Snowdowne, K. W.: Sarcoplasmic reticulum interacts with the Ca(2+) indicator precursor fura 2-AM.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 138 (1986) 1153 - 1162
[87] Luckhoff, A.: Measuring cytoplasmic free calcium concentration in endothelial cells with indo-1: The pitfall of using the ratio of two fluorescence intensities recorded at different wavelengths.
Cell Calcium, 7 (1986) 233 - 248
[88] Hayakawa, T., Kinoshita, K., Miyaki, S., Fujiwake, H. and Ohsuka, S.: Ultra-low light level camera for photon counting imaging.
Photochem. Photobiol., 43 (1986) 95 - 97
[89] Tasaka, K., Mio, M. and Okamoto, M.: Changes in intracellular Ca^{2+} distribution of rat peritoneal mast cells before and after histamine release.
Agents Actions, 18 (1986) 61 - 64
[90] Tasaka, K., Mio, M. and Okamoto, M.: Intracelluar calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs.
Ann. Aller., 56 (1986) 464 - 469
[91] Akagi, M., Mio, M. and Tasaka, K.: Histamine release inhibition and prevention of the decrease in membrane fluidity induced by certain anti-allergic drugs: Analysis of the inhibitory mechanism of NCO-650.
Agents Actions, 13 (1983) 149 - 156
[92] Ritchie, D. M., Sierchio, J. N., Bishop, C. M., Hedli, C. C., Levinson, S. L. and Capetola, R. J.: Evaluation of calclium entry blockers in several models of immediate hypersensitivity.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 229 (1984) 690 - 695
[93] Petel, K. R.: The effect of calclium antagonist, nifedipine in exercise-induced asthma.
Clin. Aller., 11 (1981) 429 - 432
[94] 大森健守，石井秀衛，武井好三，周藤勝一，中溝喜博： Oxatomide (KW-4354) の薬理作用　第 3 報　実験的喘息および Shultz-Dale 反応に対する作用.
日薬理誌，80 (1982) 481 - 493

[95] Church, M. K. and Gradidge, C. F.: Oxatomide: Inhibition and stimu-lation of histamine release from human lung and leukocytes in vitro.
Agents Actions, 10 (1980) 4 - 7
[96] Mota, I.: The mechanism of anaphylaxis.
Immunology, 7 (1964) 681 - 699
[97] Siraganian, R. P.: An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine.
Anal. Biochem., 57 (1974) 383 - 394
[98] Harary, I. and Farley, B.: In vitro study on single beating rat heart cells.
Exp. Cell Res., 29 (1963) 451 - 465
[99] Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue.
Biochem. Med., 18 (1977) 257 - 273
[100] De Clerk, F., Van Reempts, J. and Borgers, M.: Comparative effects of oxatomide on the release of histamine from rat peritoneal mast cells.
Agents Actions, 11 (1981) 184 - 192
[101] 大森健守，石井秀衛，周藤勝一，中溝喜博： Oxatomide (KW-4354) の薬理作用　第 4 報　ラット腹腔浸出細胞及び肺切片からの Histamine 遊離に及ぼす影響.
日薬理誌, 80 (1982) 441 - 449
[102] Ohsako, S. and Deguchi, T.: Phosphatidic acid mimicks the muscarinic action of acetylcholine in cultured bovine chromaffin cells.
FEBS Lett., 152 (1983) 62 - 66
[103] Pointer, R. H., Butcher, F. R. and Fain, J. N.: Studies on the role of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate and extracellular Ca^{2+} in the regulation of glycogenesis in rat liver cells.
J. Biol. Chem., 251 (1976) 2987 - 2992