

## マグネシウム欠乏ラットの脾細胞のヒスタミン 貯蔵におよぼすヒスタミン遊離剤の影響

西尾 晃・松本修治\*・石黒 茂・宮尾 陟

(家畜薬理学研究室)

昭和59年8月9日 受理

### Effects of some histamine releasers on histamine storage in spleen cells isolated from magnesium-deficient rats.

Akira NISHIO, Shuji MATSUMOTO, Shigeru ISHIGURO  
and Noboru MIYAO

(Laboratory of Veterinary Pharmacology)

#### 緒 言

幼若ラットをマグネシウム (Mg) 欠乏飼料で飼育すると、ヒスタミン含有細胞である mast cell が多く存在している皮膚組織のヒスタミン量はほとんど変動しないにもかかわらず、脾臓のヒスタミン量が著しく増加し、対照飼料を与えた場合の20~30倍にもなることを明らかにした<sup>12)</sup>。

本論文では、Mg 欠乏により脾臓で増加するヒスタミンがどのような貯蔵様式をとるかを明らかにする目的で、mast cell からヒスタミンを遊離させることが知られている各種の薬剤<sup>1-7,9,14,19,21)</sup>を用いて比較検討した。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 使用動物

離乳直後 (23日齢) の Wistar 系ラットを雌雄の別なく用いた。これらのラットを粉末飼料に慣らすため、3日間 Table 1 に示した対照飼料で飼育したのち二群にわけた。I群は0.07%の Mg を含む合成粉末飼料で (対照群)、II群は0.001%の Mg を含む合成粉末飼料で (Mg 欠乏群)、それぞれ8日間飼育した。なお、給水には脱イオン水を用いた。

##### 2. 脾細胞と腹腔 mast cell の採取

ラットを頸椎脱臼後、Sugiyama の方法<sup>18)</sup>にしたがって mast cell を採取した。すなわち、腹腔に7ml の氷冷 PBS (NaCl 154 mM, KCl 2.7 mM, CaCl<sub>2</sub>

Table 1. Experimental diet

	% of total diet	
	Control	Deficient
Vitamin-free casein	20	20
Glucose	35	35
Sucrose	27.28	27.40
Cellulose	5	5
Liver oil	8	8
Choline chloride	0.15	0.15
Vitamin mixture <sup>*1</sup>	0.85	0.85
Mineral mixture <sup>*1</sup>	3.6	3.6
Magnesium oxide	0.1161	0.00167
Final Mg concentration	0.07 <sup>*2</sup>	0.001

<sup>\*1</sup> Mineral and vitamin mixtures were prepared by formula of Harper<sup>8)</sup>.

<sup>\*2</sup> Replaced with sucrose in magnesium deficient diet.

0.9 mM, Sørensen の phosphate buffer 6.7 mM, pH 7.2, 牛血清アルブミン 0.05%) を注射器で注入し、腹壁を軽くマッサージしたのち、開腹して腹腔液を集め、これを 3,000 r. p. m., 15 min. 0 °C で遠心し、腹腔細胞を得た。これを PBS で数回洗滌して実験に供した。なお、この細胞浮遊液中には3~4%の mast cell が含まれている。

腹腔細胞採取後のラットより脾臓をとりだし、眼科ハサミで細片にしたのち、メッシュ上でスパーテルにて圧迫することにより分離脾細胞を作成した。数個の脾細胞よりなる細胞塊は、さらにパスツールピペットでピペティングすることにより単一の脾細胞に分離した。この細胞浮遊液をガーゼでろ過することにより、結合織および細胞の塊を除いた。このようにして集めた脾細胞を数回 PBS で洗滌したのち実験に用いた。

Mast cell はトルイジンブルー液で、脾細胞はチル

本論文は松本修治君の修士論文の一部であり、第95回日本獣医学会 (1983年4月) および第56回日本薬理学会総会 (1983年3月) にて発表した。

\* 現在 大日本製薬株式会社 (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka)

ク氏液で染色したのち、Bürker-Türk 計算板を用いて細胞数を算定した。

### 3. ヒスタミン遊離実験法

上述のようにして調整した mast cell と脾細胞の浮遊液をそれぞれポリエチレン試験管に0.9 ml ずつ入れ、37°C で5分間静置したのち、ヒスタミン遊離剤を含んだ溶液0.1 ml 加え、さらに5分間37°C で静置した。正確に5分後、氷冷 PBS を2 ml 加えることにより反応を停止させた。反応停止後3,000 r. p. m., 15 min. 0°C で遠心し、上清と沈渣に分け、沈渣には PBS 3 ml を加えてよく混和したのち、1 N-HCl 0.1 ml を加え、3分間100°C に保ち、細胞内のヒスタミンを遊離させたのちに、上清とともにヒスタミン測定時まで-20°C に保存した。

### 4. ヒスタミンの定量

-20°C に保存した試料を解凍後、1 N-NaOH で中和したのち、0.03 M-Na-phosphate buffer (pH 6.0) 6 ml を加え、0.1 N-HCl または 0.1 N-NaOH で溶液の pH を正確に6.0に調整したのち、Cellex-P カラムを通し、ヒスタミンを抽出した。抽出液中のヒスタミンは Shore らの方法<sup>15)</sup> に準じて蛍光法により定量した。

### 5. 使用したヒスタミン遊離剤

Compound 48/80 (Sigma), Polymyxin B sulfate (Sigma), Concanavalin A (Sigma), Calcium ionophore A23187 (Calbio-Chem-Behring Corp.), Dextran (分子量100,000~20,000, 和光純薬), Phosphatidyl serine (L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serine from bovine brain, approx 98%) (Sigma).

### 6. その他

その他の必要な事項については、それぞれの個所に記載した。

## 結 果

### 1. Mg 欠乏ラットから分離した脾細胞と腹腔 mast cell のヒスタミン量

Mg 欠乏飼料で8日間飼育したラットより、材料と方法の項に述べた方法にしたがい、単離した脾細胞と腹腔 mast cell のヒスタミン量を測定した。Table 2 に示したように、Mg 欠乏ラットより得た脾細胞のヒスタミン含量は対照ラットの脾細胞のそれに比し、約10倍のヒスタミン量を含有していた。いっぽう、腹腔 mast cell では約2倍の増加を示すにすぎなかった。

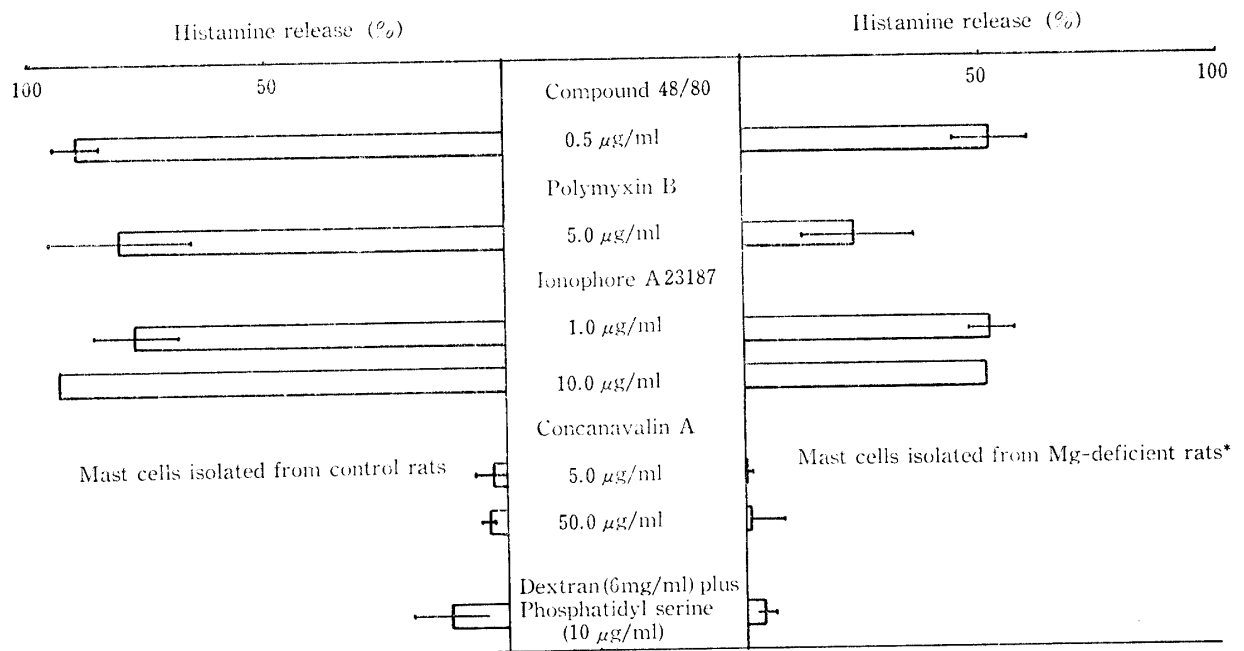


Fig. 1. Histamine release by some histamine releasers from peritoneal mast cells isolated from control and Mg-deficient rats.

Peritoneal mast cells were incubated with or without histamine releaser for 5 min. at 37°C. Histamine release, corrected for spontaneous release, is expressed as the percentage of total histamine contents in mast cells.

\*On 8th day of Mg depletion.

2. ヒスタミン遊離剤の脾細胞と腹腔 mast cell のヒスタミン量におよぼす影響

Mg 欠乏により増加した脾細胞のヒスタミンがどのような貯蔵様式をとるかを明らかにするため、腹腔 mast cell からヒスタミンを遊離させることが知られている各種のヒスタミン遊離剤のヒスタミン遊離効果を検討した。

まず、対照飼料で飼育した対照ラットの腹腔 mast cell を用いて、各種のヒスタミン遊離剤の効果を調べ、その結果を Fig. 1 に示した。Compound 48/80, polymyxin B および ionophore A23187 は対照ラットの腹腔 mast cell のヒスタミン量を 80~90% 遊離させ

Table 2. Histamine contents in the spleen cells and the peritoneal mast cells isolated from control and Mg-deficient rats

	Spleen cell ( $\mu\text{g}/10^8$ cells)	Peritoneal mast cell ( $\mu\text{g}/10^6$ cells)
Control	$0.21 \pm 0.02$	$11.23 \pm 1.89$
Mg-deficient*	$1.89 \pm 0.36$	$18.08 \pm 3.04$

\*On 8th day of Mg depletion. Mean  $\pm$  S.D.

た。Concanavalin A および dextran と phosphatidyl serine の混液はヒスタミン遊離効果を示さなかった。Mg 欠乏ラットより得た腹腔 mast cell は、compound 48/80, polymyxin B および ionophore A23187 により 25~50% のヒスタミン遊離率を示すにすぎなかった。

Mg 欠乏ラットより得た腹腔 mast cell のヒスタ

Table 3. Effects of magnesium on the histamine release by compound 48/80 from peritoneal mast cells isolated from control and Mg-deficient rats

	MgCl <sub>2</sub> (12mM)	Compound 48/80 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Histamine release (%)
Control	-	+	89.0
	+	+	87.0
Mg-deficient*	-	+	51.2
	+	+	55.5

Peritoneal mast cells were incubated with or without MgCl<sub>2</sub> for 30 min. then incubated with compound 48/80 for 5min.

\* On 8th day of Mg depletion.

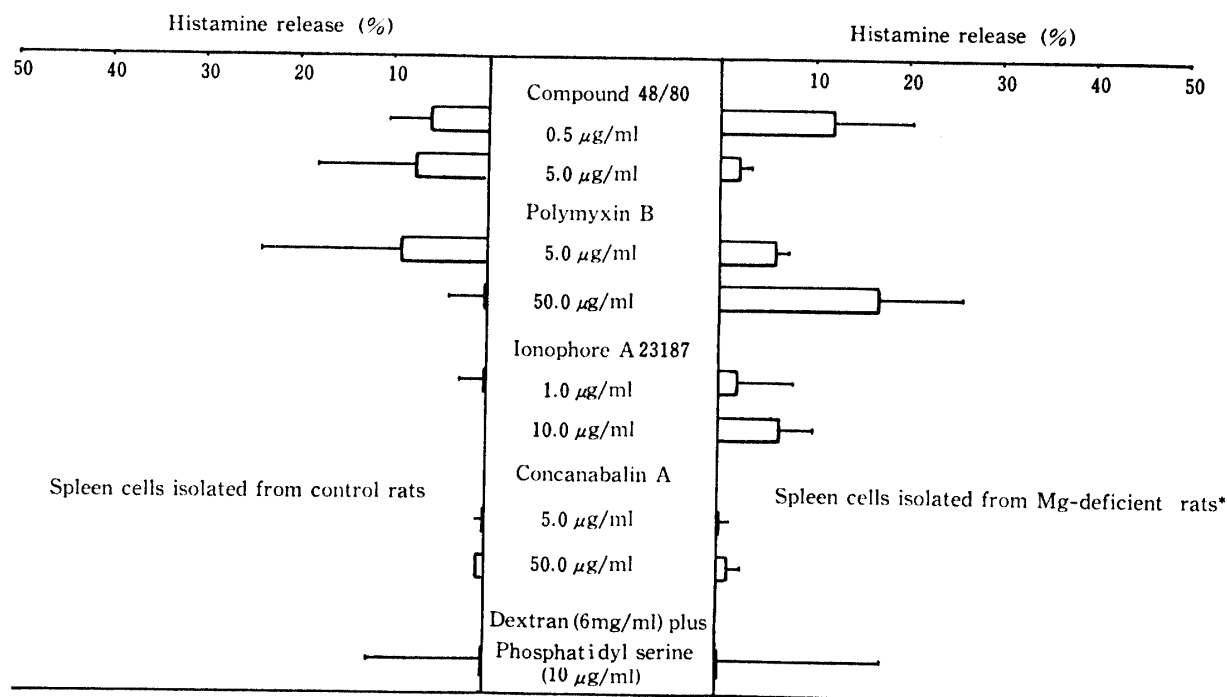


Fig. 2. Histamine release by some histamine releasers from spleen cells isolated from control and Mg-deficient rats. Spleen cells were incubated with or without histamine releaser for 5 min. at 37°C. Histamine release, corrected for spontaneous release, is expressed as the percentage of total histamine contents in spleen cells. \*On 8th day of Mg depletion.

ミン遊離剤によるヒスタミン遊離率の低下の原因の一つとして、Mg イオンの不足が考えられる。そこで、腹腔 mast cell 浮遊液に Mg イオンを添加して、30 分後に compound 48/80 を作用させてこの点を検討した。Table 3 に示したように、腹腔 mast cell 浮遊液への MgCl<sub>2</sub> (12 mM) の添加は compound 48/80 によるヒスタミン遊離率には影響しなかった。

分離した脾細胞からのヒスタミン遊離に対するヒスタミン遊離剤の効果について検討した。Fig. 2 に示したように、いずれのヒスタミン遊離剤によっても、腹腔 mast cell でみられたようなヒスタミン遊離率の上昇はみられず、20% 以下であった。また、Mg 欠乏ラットより得た脾細胞と対照ラットより得た脾細胞のヒスタミン遊離率には著明な差はみられなかった。

### 3. ヒスタミン遊離剤のラット basophilic leukemia cell のヒスタミン量におよぼす影響

本論文で使用したヒスタミン遊離剤は、腹腔 mast cell のヒスタミンを特異的に遊離させるが、その他のヒスタミン含有細胞、例えば、好塩基性白血球<sup>16)</sup>や胃の enterochromaffin-like cell<sup>17)</sup> のヒスタミンを遊離させないことが知られている。他方、著者らは Mg 欠乏によりラットの脾臓重量の増加すること、および脾臓の組織化学的検索により好塩基性白血球の増加することを明らかにしている<sup>10)</sup>。そこで、ラットの basophilic leukemia cell (大日本製薬 K.K. より購入) を好塩基性白血球のモデルとして、compound 48/80 と ionophore A23187 のヒスタミン遊離効果を検討した。Table 4 に示したように、両ヒスタミン遊離剤ともに、ヒスタミン遊離効果を示さないことが確かめられた。

Table 4. Histamine release by compound 48/80 or ionophore A23187 from the rat basophilic leukemia cells in vitro

Treatment		Incubation time	
Drug	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	15 min.	30 min.
—	—	2.30	6.03
Compound 48/80	0.5	2.78	3.13
Ionophore A23187	1.0	4.65	4.39

### 考 察

ラットを Mg 欠乏飼料で飼育すると、脾臓のヒス

タミン合成活性の上昇とヒスタミン量の著しい増加がみられることを明らかにしてきた<sup>12,13)</sup>。Table 2 に示したように、Mg 欠乏ラットから分離した脾細胞のヒスタミン量も対照ラットに比べ約 10 倍に増加していた。このように増加したヒスタミン量に対する compound 48/80 や ionophore A23187 などのヒスタミン遊離剤のヒスタミン遊離効果を検討したが、Fig. 2 に示したように、これらヒスタミン遊離剤のヒスタミン遊離効果は弱いものであった。この成績は、Mg 欠乏ラットの脾臓でのヒスタミン量の増加には mast cell が関与していないことを強く示唆するもので、著者ら<sup>10,12)</sup>が先に示した組織学的検討成績をさらに強く支持するものである。また、非 mast cell 性のヒスタミン含有細胞である胃の enterochromaffin-like cell<sup>17)</sup> や parietal cell<sup>20)</sup> および basophilic leukemia cell<sup>16)</sup> のヒスタミン遊離についての成績と類似していた。さらに、石黒ら<sup>10)</sup>は Mg 欠乏ラット脾臓の組織化学的および電顕による検討により、脾臓でのヒスタミン含有細胞は好塩基性白血球である可能性の大きいことを示している。脾臓からの好塩基性白血球の分離精製が困難であったことから、本論文ではラットの basophilic leukemia cell をモデルとして検討したところ、Table 4 に示したように、脾細胞と同様に、compound 48/80 や ionophore A23187 によりヒスタミンを遊離しなかった。

腹腔 mast cell のヒスタミン量は、Mg 欠乏 8 日目には対照ラットのそれに比し約 2 倍になっていた。対照ラットの腹腔 mast cell は Fig. 1 に示したように、compound 48/80, polymyxin B および ionophore A23187 により約 90% のヒスタミンを遊離したが、Mg 欠乏ラットの腹腔 mast cell ではこれらのヒスタミン遊離剤により約 50% のヒスタミンが遊離するにすぎなかった。すなわち、Mg 欠乏ラットの腹腔 mast cell のヒスタミンは、これらヒスタミン遊離剤に非感受性の存在様式をとることが示唆された。Johnson<sup>11)</sup> や Erjavec<sup>4)</sup> が指摘しているように、mast cell のヒスタミン pool に 2 種類存在しており、Mg 欠乏によりヒスタミン遊離剤に非感受性のヒスタミン pool が増すためかも知れない。本論文では、非感受性の原因の一つとして、Mg イオンの不足を考え、この点を検討したが、Table 3 に示したように、Mg イオンを in vitro で添加しただけではヒスタミン遊離率に変化はみられず、非感受性の原因がただ単にイオンバランスが一過性に変化したことによるものではないことが示された。

以上の成績より, Mg 欠乏により脾臓で増加するヒスタミン量には mast cell の関与の可能性はきわめて少ないことが示された。

脾臓で増加するヒスタミン含有細胞が, ヒスタミン合成活性の活発な細胞と同一であるかどうかを明らかにすることが必要と思われる。

### 要 約

マグネシウム欠乏ラットから分離した脾細胞のヒスタミン貯蔵様式を, 腹腔 mast cell のそれと比較検討した。マグネシウム欠乏ラットから分離した脾細胞のヒスタミン含量は, 欠乏 8 日目には対照ラットのそれよりも約 10 倍多くなっていたが, 腹腔 mast cell のヒスタミン含量は約 2 倍の増加にすぎなかった。マグネシウム欠乏 8 日目に, 脾細胞および腹腔 mast cell のヒスタミン含量に対する数種のヒスタミン遊離剤の効果を in vitro で検討した。Compound 48/80 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), polymyxin B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) および ionophore A23187 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は, 腹腔 mast cell からヒスタミンを遊離させたが, その遊離の程度は, マグネシウム欠乏ラットでは対照ラットに比べ弱かった。これらヒスタミン遊離剤は, 対照ラットおよびマグネシウム欠乏ラットから分離した脾細胞からヒスタミンをほとんど遊離させなかった。同様の成績は, ラット basophilic leukemia cell でもみられた。

ヒスタミン遊離剤を用いたこれらの成績より, 脾細胞のヒスタミン貯蔵様式は明らかに腹腔 mast cell とは異なることが示唆された。

### 文 献

- 1) Atkinson, G., Ennis, M. and Pearce, F.L.: The effect of alkaline earth cations on the release of histamine from rat peritoneal mast cells treated with compound 48/80 and peptide 401. *Br. J. Pharmacol.*, **65**, 395-402 (1979)
- 2) Elliott, A. B.: Release of histamine from spleen by kidney extracts, reserpine and compound 48/80. *J. Physiol. (Lond.)* **165**, 83-88 (1963)
- 3) Enerbäck, L., Löwhagen, G., Löwhagen, O. and Wingren, U.: The effect of polymyxin B and some mast-cell constituents on mucosal mast cells in the duodenum of the rat. *Cell Tissue Res.*, **214**, 239-246 (1981)
- 4) Erjavec, F.: Species and tissue differences of histamine storage and release. *Agents and Actions*, **12**, 81-85 (1982)
- 5) Fawcett, D. W.: Cytological and pharmacological observations on the release of histamine by mast cells. *J. Exp. Med.*, **100**, 217-224 (1954)
- 6) Goth, A., Adams, H.R. and Knoohuizen, M.: Phosphatidyl serine-selective enhancer of histamine release. *Science*, **173**, 1034-1035 (1971)
- 7) Goth, A. and Johnson, A.R.: Current concepts on the secretory function of mast cells. *Life Sci.*, **16**, 1201-1214 (1975)
- 8) Harper, A.E.: Amino acid balance and imbalance. *J. Nutr.*, **68**, 405-418 (1959)
- 9) Hook, W.A., Dougherty, S.F. and Oppenheim, J. J.: Release of histamine from hamster mast cells by concanavalin A and phytohemagglutinin. *Infection and Immunity*, **9**, 903-908 (1974)
- 10) 石黒 茂, 西尾 晃, 宮尾 隼, 森川嘉夫, 竹野一, 柳谷岩雄: Mg 欠乏ラット脾臓のヒスタミン含有細胞. *日薬理誌*, **83**, 15p (1984)
- 11) Johnson, H.L.: Nonmast-cell histamine kinetics. II. Effect of histidine decarboxylase inhibitors on rates of decline of tissue  $^3\text{H}$ -histamine in the female rat. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 651-658 (1969)
- 12) 西尾 晃, 石黒 茂, 生垣一郎, 宮尾 隼: ラットの実験的 Mg 欠乏症に関する毒性薬理学的研究 I. 低 Mg 血症時の組織ヒスタミン量. *日獣誌*, **44**, 653-659 (1982)
- 13) Nishio, A., Ishiguro, S. and Miyao, N.: Toxicological and pharmacological studies on magnesium deficiency in rats: Histamine-metabolizing enzymes in some tissues of magnesium-deficient rats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **45**, 699-707 (1983)
- 14) Norton, S.: Quantitative determination of mast cell fragmentation by compound 48/80. *Br. J. Pharmacol.*, **9**, 494-497 (1954)
- 15) Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182-186 (1959)
- 16) Siraganian, R., Kulczycki, A., Mendoza, G. and Metzger, H.: Ionophore A23187 induced histamine release from rat mast cells and rat basophil leukaemia (RBL-1) cells. *J. Immunol.*, **115**, 1599-1602 (1975)
- 17) Soll, A.H., Lewin, K.J. and Beaven, M.A.: Isolation of histamine-containing cells from rat gastric mucosa: Biochemical and morphologic differences from mast cells. *Gastroenterology*, **80**, 717-727 (1981)
- 18) Sugiyama, K.: Calcium-dependent histamine release with degranulation from isolated rat mast cells by adenosine 5'-triphosphate. *Japan. J. Pharmacol.*, **21**, 209-226 (1971)
- 19) Sullivan, T.J., Greene, W.C. and Parker,

- C. W. : Concanavalin A-induced histamine release from normal rat mast cells. *J. Immunol.*, **115**, 278-282 (1975)
- 20) Tobe, T. and Tanaka, C. : Histamine-containing cells in the human gastric mucosa. *Am. J. Gastroent.* N.Y., **58**, 133-137 (1972)
- 21) West, G.B. : Histamine release from isolated and intact mast cells of rats. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.*, **66**, 225-228 (1981)

### Summary

The histamine storage-mechanisms in the spleen cells isolated from magnesium-deficient rats were compared with those in the peritoneal mast cells. Histamine contents of the spleen cells isolated from magnesium-deficient rats increased about 10 times as much as the control level on the 8th day, while those in the peritoneal mast cells increased only about 2 times the control level on the identical day. On the 8th day of magnesium deficiency, the effects of some histamine releasers on histamine contents both in the spleen cells and in the peritoneal mast cells were studied in vitro. Compound 48/80 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), polymyxin B (5  $\mu\text{g/ml}$ ) and ionophore A23187 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) induced a release of histamine from the peritoneal mast cells, however, the extent of histamine release from these cells was less in the magnesium-deficient rats than in the control rats. The spleen cells isolated both from the control and from the magnesium-deficient rats were far less responsive to these releasers than the peritoneal mast cells. Such a low responsiveness to histamine releasers was similarly noted in the rat basophilic leukemia cells, too.

From these studies carried out, using histamine releasers, it was suggested that the histamine storage-mechanisms in spleen cells should obviously be different from those in peritoneal mast cells.