

# ラット腹腔肥満細胞からの抗原および化学物質によって誘発される histamine 遊離に対する adenosine, adenosine 類似体および methylxanthine 類の効果

岡山大学医学部薬理学教室 (主任: 佐伯清美教授)

島 村 和 宏

(昭和63年7月26日受稿)

Key Words: histamine 遊離, 肥満細胞, adenosine, アナフィラキシー, compound 48/80

## 緒 言

Adenosine は生体内に広く存在する purine 誘導体で, いろいろな組織において細胞機能を調節する役割を果たしているといわれている<sup>1)-7)</sup>. また, adenosine はヒト好塩基球<sup>8)</sup>, ラット腹腔肥満細胞<sup>9)</sup>およびモルモット肺細切片<sup>10)</sup>からの histamine 遊離を調節することも証明されている. 内因性 adenosine はいろいろな刺激により細胞外液中に遊離される<sup>11)12)</sup>ので, その histamine 遊離調節機能はアナフィラキシーのような病態において重要であるかもしれない. 著者は, 予備実験において Marquardt<sup>9)</sup>らや Fredholm と Sydbom<sup>13)</sup>の報告と同様に感作ラット腹腔肥満細胞からの抗原誘発性 histamine 遊離に対する adenosine の促進効果を比較的高濃度域で確認できた. しかし, 低濃度においては adenosine は逆に抑制作用を示すことを見出した. そこで, 今回の研究では, histamine 遊離に対する adenosine の作用を詳しく検討するために, アナフィラキシー性 histamine 遊離に対する adenosine の R 部位および P 部位類似体の作用を調べた. また, compound 48/80 や  $\alpha$ -chymotrypsin などの化学物質による histamine 遊離に対する adenosine および adenosine 関連薬物の作用も検討した. さらに, adenosine R 受容体拮抗物質である, methylxanthine 類の compound 48/80 誘発性 histamine 遊離に対する効果も試験した.

## 材 料 と 方 法

### 1. 動 物

静岡県実験動物農業協同組合 (浜松) から購入した 10-14 週齢, 体重 350-450 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した. 抗卵白アルブミン血清の調製には岡山大学医学部系統保存部門から入手した 6-10 週齢の雄性 BALB/c マウスを使用した.

### 2. 試薬と薬物

卵白アルブミン (5 回再結晶) は ICN Pharmaceuticals (Cleveland, O., USA) より購入した. 牛血清アルブミン (fraction V) は Armour Pharmaceutical Co. (Kankakee, Ill., USA) より, substance P triacetate および neurotensin triacetate は Protein Research Foundation (箕面) より,  $\alpha$ -chymotrypsin, adenosine, 2-chloroadenosine, N<sup>6</sup>-methyladenosine, 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine, 2'-deoxyadenosine, adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenine, inosine, guanosine および cytosine は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA) より, そして theophylline, 3-isobutyl-1-methylxanthine, caffeine および theobromine は半井化学 (京都) より購入した. その他の試薬は市販の規格品を使用した.

### 3. 抗血清の調製

Levine と Vaz<sup>14)</sup>の方法に従い、1  $\mu$ g の卵白アルブミンと 1 mg の Al(OH)<sub>3</sub>ゲルを含む0.2mlの0.9%食塩水を4週間の間隔で2回腹腔内注射してマウスを感作した。第2回目の注射後7日目に頸動脈から1%ヘパリンで湿らせた注射器を用いて採血した。10-20匹のマウスより集めた血液をプールし、2容の Hanks' balanced salt solution (NaCl 137 mM, KCl 5.36 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.811 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.337 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.440 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.17 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM, glucose 5.55mM; 以下 HBSS と略す)で稀釈し遠心し、抗血清の5倍稀釈液(上清)を-20℃で保存した。本抗血清は、ラット背皮における異種間受動皮膚アナフィラキシー試験(heterologous PCA test)において、640-1280倍稀釈で色素漏出の閾値反応(直径5mm)を示した。

### 4. ラット腹腔肥満細胞の採取および精製

ラット腹腔内に約20mlのHBSSあるいは磷酸緩衝塩溶液(NaCl 154 mM, KCl 2.7mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, pH 7.1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>緩衝液 6.7 mM, glucose 5.55 mM; PBSと略す)を注入し腹腔を洗浄して、3-7%の肥満細胞を含む腹腔細胞を採取した。PBSはneurotensinおよびsubstance Pによるhistamine遊離実験の媒液として使用し、その他の実験ではHBSSを使用した。通常1回の実験に2-4匹から腹腔細胞を集め、特にことわらない限り肥満細胞を分離することなしにそのまま使用した。場合により肥満細胞の分離を牛血清アルブミンを使用する密度勾配遠心法<sup>15)</sup>により行った。その時得た肥満細胞の純度は約75%であった。

### 5. ラット腹腔肥満細胞の感作

肥満細胞(1.0-1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>個)を含む腹腔細胞をマウス抗卵白アルブミン血清5倍稀釈液1mlに浮遊させ、時々試験管を軽く振りながら0℃で1時間インキュベートした。

### 6. ラット腹腔肥満細胞からの histamine 遊離

すべての実験操作を通じてシリコン加工したガラス器具、ポリプロピレン器具を使用した。ラット腹腔肥満細胞を0.05%牛血清アルブミンを含むHBSSあるいはPBS(以後のすべての操作には0.05%牛血清アルブミンを含む溶液を使

用した)に浮遊させ、室温で150 x g, 5分間遠心することにより2回洗浄した。12ml容ポリプロピレン試験管に0.7-1.8 $\times$ 10<sup>6</sup>個の肥満細胞が入るように細胞浮遊液を入れ、HBSSあるいはPBSを加えて最終反応液を1mlとした。37℃での5分間のプレインキュベーションの後、細胞を10分間被検薬物とインキュベートし、その後卵白アルブミン(抗原)あるいはcompound48/80などのhistamine遊離物質を反応媒液に加え、さらに5分間インキュベーションを継続した。ただし卵白アルブミンを添加した場合は感作した細胞を10分間インキュベートした。インキュベーション終了後、直ちに各試験管を水槽に移し0℃で650 x g10分間遠心し、上清と沈澱のhistamine含量を定量した。すべてのhistamine遊離は重複試料について測定した。

### 7. histamine の定量

各試料のhistamine含量の定量はShoreら<sup>16)</sup>の方法における有機溶媒による抽出過程を省略し直接蛍光測定を行うLoefflerら<sup>17)</sup>の方法に従って行った。使用したすべての薬物はhistamineの測定に干渉しなかった。histamineの遊離率は次式で計算した。histamine遊離率(%)=(上清のhistamine含量) $\times$ 100/[(上清のhistamine含量)+(沈澱のhistamine含量)]。histamine遊離の抑制率は次式で計算した。histamine遊離抑制率(%)=[(対照の遊離率)-(被検薬物を添加した細胞からの遊離率)] $\times$ 100/(対照の遊離率)。

### 8. 統計学的解析

すべての実験データはpaired t-testを用いて統計学的に検討した。

## 結 果

### 1. 肥満細胞からのアナフィラキシー性 histamine 遊離に対する adenosine の効果

未分離のラット腹腔肥満細胞からのアナフィラキシー性histamine遊離に対してadenosineは10<sup>-6</sup>Mで有意の抑制効果を示し、10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup>Mでは逆に有意の促進効果を示した(Fig. 1 A)。分離した肥満細胞を用いた場合でも同様にadenosineの二相性の効果が観察された。特にhistamine遊離促進効果は純化していない腹腔肥

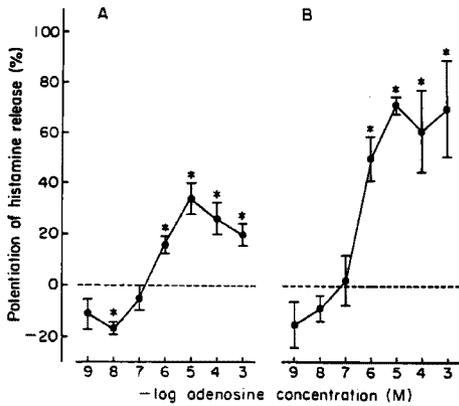


Fig. 1 Effect of adenosine on antigen-induced histamine release from rat peritoneal non-purified (A) and purified (B) mast cells. After the 5-min preincubation, sensitized mast cells were treated with different concentrations of adenosine for 10 min at 37°C. Ovalbumin (3.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added at the end of the treatment with adenosine and the incubation was continued for a further 10 min at the same temperature. Each value is the mean  $\pm$  S. E. M. of 4 experiments on different pools of cells. The control histamine releases in A and B were  $16.8 \pm 1.5$  and  $6.8 \pm 0.4\%$ , respectively, after being corrected for less than 8 and 4% respective spontaneous releases. \*  $p < 0.01$  as compared with the respective control values.

満細胞を用いた場合よりも著明であった (Fig. 1 B). また, adenosine は実験に使用した濃度では histamine の自然遊離に影響を与えなかった.

2. 肥満細胞からのアナフィラキシー性 histamine 遊離に対する adenosine 類似体の効果

Adenosine R 部位類似体である N<sup>6</sup>-methyladenosine はラット腹腔肥満細胞からのアナフィラキシー性 histamine 遊離に対して  $10^{-9}$  と  $10^{-8}$  M で有意の抑制効果を示し,  $10^{-5}$  M では有意の促進効果を示した (Fig. 2 A). しかし, 2-chloroadenosine はデータのばらつきが大きく高濃度域で促進効果の傾向を示すにすぎなかった. 一方, adenosine P 部位類似体である 9- $\beta$ -D-

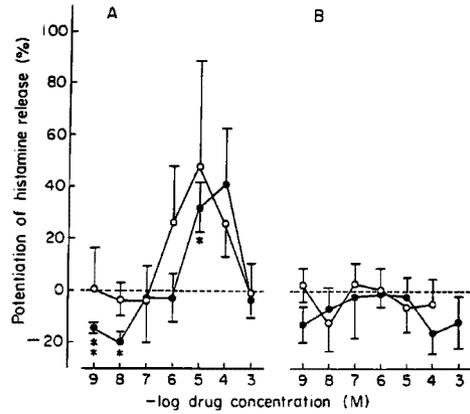


Fig. 2 Effect of adenosine R-site (A) and P-site (B) analogs on antigen-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. A: 2-chloroadenosine ( $\circ$ ) and N<sup>6</sup>-methyladenosine ( $\bullet$ ). B: 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine ( $\circ$ ) and 2'-deoxyadenosine ( $\bullet$ ). The procedure was the same as in Fig. 1. Each value is the mean  $\pm$  S. E. M. of 4 and 6 experiments in A and B, respectively. The control histamine releases in A and B were  $12.8 \pm 2.3$  and  $9.8 \pm 1.1\%$ , respectively, after being corrected for less than 8% spontaneous release. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  as compared with the respective control values.

arabinofuranosyladenine および 2'-deoxyadenosine はアナフィラキシー性 histamine 遊離に対して  $10^{-9}$  から  $10^{-4}$  M の濃度において有意の効果を示さなかった (Fig. 2 B).

### 3. Compound 48/80, $\alpha$ -chymotrypsin, substance P および neurotensin による肥満細胞からの histamine 遊離に対する adenosine の効果

Adenosine は compound 48/80 ( $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) による histamine 遊離に対して  $3.3 \times 10^{-5}$  M でプラトーに達する用量依存性の抑制効果を示した (Fig. 3 A). また, adenosine は  $\alpha$ -chymotrypsin ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) による histamine 遊離に対しても用量依存的な抑制効果を示し,  $3.3 \times 10^{-5}$  M 以上で効果は有意であった. しかし,

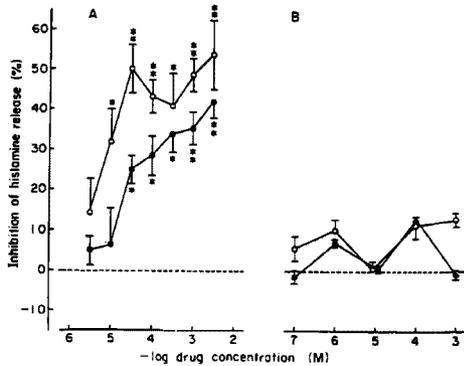


Fig. 3 Effect of adenosine on histamine release induced by chemical substances from rat peritoneal mast cells. After the 5-min. preincubation, mast cells were treated with different concentrations of adenosine for 10 min at 37°C. Histamine releasers were added at the end of the treatment with adenosine and the incubation was continued for a further 5 min at the same temperature. A: compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ) (○) and  $\alpha$ -chymotrypsin ( $50\mu\text{g/ml}$ ) (●). B: substance P ( $10^{-5}\text{M}$ ) (○) and neurotensin ( $10^{-5}\text{M}$ ) (●). PBS, pH 7.1, was used as the suspending medium in B. Each value is the mean  $\pm$  S. E. M. of 4 experiments on different pools of cells. The control histamine releases in experiments on compound 48/80,  $\alpha$ -chymotrypsin, substance P and neurotensin were  $42.5\pm 5.3$ ,  $40.6\pm 4.1$ ,  $30.6\pm 1.8$  and  $14.9\pm 0.9\%$ , respectively, after being corrected for less than 8% spontaneous release. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  as compared with the respective control values.

substance P ( $10^{-5}\text{M}$ )あるいはneurotensin ( $10^{-5}\text{M}$ )によるhistamine遊離に対して, adenosineは $10^{-7}$ – $10^{-3}\text{M}$ の濃度において, 有意な影響をおよぼさなかった (Fig. 3 B). なお, substance Pおよびneurotensinによるhistamine遊離の至適pHは6.6周辺である<sup>18)</sup>ので, これらのペプチドを用いた実験ではHBSS (pH7.4)の代わりにPBS (pH7.1)を使用した。

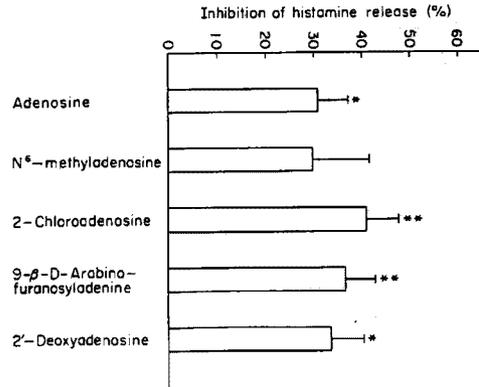


Fig. 4 Effect of adenosine and adenosine analogs on histamine release induced by compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ) from rat peritoneal mast cells. Each drug ( $3.3\times 10^{-5}\text{M}$ ) was tested by the same procedure as in Fig. 3. Each value is the mean  $\pm$  S. E. M. of 4 experiments on different pools of cells. The control histamine release was  $40.4\pm 5.4\%$ , after being corrected for less than 9% spontaneous release. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  as compared with the control value.

#### 4. 肥満細胞からの compound 48/80による histamine 遊離に対する adenosine 類似体の効果

ラット腹腔肥満細胞からの compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ )による histamine 遊離に対して, adenosine の R 部位類似体である 2-chloro-adenosine および P 部位類似体である 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine と 2'-deoxy-adenosine は  $3.3\times 10^{-5}\text{M}$  の濃度で adenosine とほぼ同程度の抑制効果を示した (Fig. 4). R 部位類似体の N<sup>6</sup>-methyladenosine も同様の抑制傾向を示したが, データのばらつきが大きく有意差は認められなかった。

#### 5. 肥満細胞からの compound 48/80による histamine 遊離に対する purine および pyrimidine 誘導体の効果

試験した purine 誘導体のうち ATP 以外のすべての化合物は  $3.3\times 10^{-5}\text{M}$  の濃度でラット腹腔

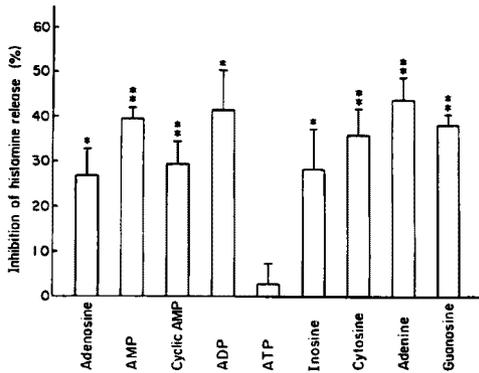


Fig. 5 Effect of purine and pyrimidine derivatives on histamine release induced by compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ) from rat peritoneal mast cells. Each drug ( $3.3 \times 10^{-5}\text{M}$ ) was tested by the same procedure as in Fig. 3. Each value is the mean  $\pm$  S. E. M. of 4 experiments on different pools of cells. The control histamine release was  $39.5 \pm 6.8\%$ , after being corrected for less than 10% spontaneous release. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  as compared with the control value.

肥満細胞からの compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ) による histamine 遊離を有意に抑制した (Fig. 5). pyrimidine 誘導体の cytosine も同じ濃度で有意な抑制効果を示した。なお、使用した濃度ではこれらの化合物は histamine の自然遊離に対してはほとんど影響しなかった。

#### 6. 肥満細胞からの compound 48/80による histamine 遊離に対する methylxanthine 類の効果

Theophylline は  $10^{-8}$ – $3.3 \times 10^{-3}\text{M}$  の範囲で compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ) による遊離を有意に抑制したが、その効果は  $10^{-8}$ – $3.3 \times 10^{-6}\text{M}$  の範囲で一度プラトーの状態を呈し、 $10^{-5}\text{M}$  以上では濃度に依存してふたたび増大した (Fig. 6)。しかし、3-isobutyl-1-methylxanthine, caffeine および theobromine は histamine 遊離に対して有意の影響をおよぼさなかった。

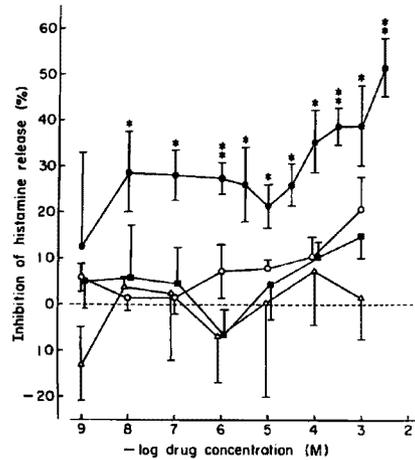


Fig. 6 Effect of methylxanthines on histamine release induced by compound 48/80 ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ) from rat peritoneal mast cells. Theophylline (●), 3-isobutyl-1-methylxanthine (○), theobromine (△) and caffeine (■) were tested by the same procedure as in Fig. 3. Each value is the mean  $\pm$  S. E. M. of 4-10 experiments on different pools of cells. The control histamine releases in experiments on theophylline, 3-isobutyl-1-methylxanthine, theobromine and caffeine were  $38.7 \pm 3.6$ ,  $49.6 \pm 2.1$ ,  $31.6 \pm 1.2$  and  $29.8 \pm 1.5\%$ , respectively, after being corrected for less than 5% spontaneous release. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  as compared with the control value.

## 考 察

今回の実験において adenosine はラット腹腔肥満細胞からのアナフィラキシー性 histamine 遊離を  $10^{-8}\text{M}$  という比較的低濃度で抑制し、高濃度では反対に促進した。adenosine がラット肥満細胞<sup>9)13)19)</sup>あるいはモルモット肺細切片<sup>10)</sup>からのアナフィラキシー性 histamine 遊離を促進することはすでに報告されている。しかし、これらの報告において adenosine の低濃度域での抑制効果については記載されていない。Sydobom と Fredholm<sup>19)</sup>は、高速液体クロマトグラフィーを使用して、肥満細胞 ( $50000$ 個/ $\text{ml}$ ) のインキュ

ベーション液上清中の内因性 adenosine の濃度を測定したところ、約  $3 \times 10^{-8} \text{M}$  であったと報告している。肥満細胞のインキュベーション液中の adenosine を完全に除去することはこの種の実験では困難である。使用したラットの系統差、肥満細胞の採取部位(腹腔と胸腔)、あるいは洗浄過程の違いなどによって、今回の実験においては肥満細胞インキュベーション液中の内因性 adenosine の濃度が十分低かったために比較的濃度域での外因性 adenosine の効果を観察できたのかもしれない。

今回の実験において、adenosine R 部位類似体  $\text{N}^6$ -methyladenosine は adenosine と同様に低濃度において肥満細胞からのアナフィラキシー性 histamine 遊離を抑制し高濃度では促進した。しかし、P 部位類似体である  $9-\beta$ -D-arabinofuranosyladenine あるいは  $2'$ -deoxyadenosine は histamine 遊離に対して有意の効果を示さなかった。したがって、adenosine の二相性の効果はこれらのアゴニストの R 受容体との相互作用により生じることが示唆される。adenosine および R 部位類似体の二相性の効果には R 受容体の二つのサブクラスが関与している可能性が考えられる。今回の実験では肥満細胞の cyclic AMP レベルを測定していないが、adenosine の低濃度域での histamine 遊離抑制効果は、adenosine が高親和性部位  $\text{R}_1^{133}$  (すなわち  $\text{A}_1^{201}$ ) の刺激により adenylyl cyclase を抑制した結果であり、高濃度における histamine 遊離促進効果は、低親和性部位  $\text{R}_2^{133}$  (すなわち  $\text{A}_2^{201}$ ) の刺激による adenylyl cyclase の活性化によるためであると考えるのが妥当ではないだろうか。もしそうだとすれば、adenosine の用量-反応曲線は両方の効果の和として現れたものであろう。

Holgate ら<sup>21)</sup>は肥満細胞からのアナフィラキシー性 histamine 遊離を adenosine の P 部位類似体が抑制すると報告しているが、これは今回の結果とは異なっている。Fain ら<sup>2)</sup>は adenylyl cyclase が P 部位類似体によって抑制されるのを観察している。また、Holgate ら<sup>21)</sup>の実験ではアナフィラキシー性 histamine 遊離の程度が今回の実験と比較して大きい。このような相違が P

部位類似体の histamine 遊離抑制効果に関する Holgate ら<sup>21)</sup>の成績と今回の成績の不一致の原因ではないかと考えられる。

今回の実験において、adenosine は compound 48/80 および  $\alpha$ -chymotrypsin による肥満細胞からの histamine 遊離を抑制した。しかし substance P あるいは neurotensin による histamine 遊離に対しては有意の影響をおよぼさなかった。Marquardt ら<sup>9)</sup>は adenosine が compound 48/80, A23187, 抗 IgE 抗体および concanavarin A による histamine 遊離を促進すると報告している。しかし Sydbom と Fredholm<sup>19)</sup>は adenosine が compound 48/80 による histamine 遊離に対して有意の効果をおよびさないと報告している。このように研究者によって実験結果が一致しない理由は現在のところ明らかでない。adenosine の R 部位および P 部位の両方の類似体がともに効果を発揮することから、compound 48/80 による histamine 遊離に対する adenosine の抑制効果は明らかに受容体部位に非特異的なものであると思われる。また、pyrimidine 誘導体の cytosine など、いろいろな化合物が同様の作用を示したことから、この作用に関係する部位はアナフィラキシー性 histamine 遊離を調節する adenosine 受容体とはまったく異なっているものと考えられる。しかし、これらの部位が肥満細胞の表面に存在するというはおそらく間違いないであろう。なぜならば、細胞による取り込みを受けない  $2$ -chloroadenosine, cyclic AMP, AMP, ADP あるいは cytosine が compound 48/80 による histamine 遊離に対して抑制効果を発揮するからである。purine や pyrimidine 誘導体が compound 48/80 の肥満細胞への結合を妨げることによってその効果を抑制するという可能性も考えられる。

Compound 48/80 は肥満細胞の細胞膜の最も外側の水に接した部位よりも内側の疎水性部位と結合するものと考えられている<sup>22)</sup>。一方、アナフィラキシー性 histamine 遊離に関して Winslow と Austen<sup>23)</sup>は、肥満細胞表面の 2 つの IgE 受容体間の架橋形成が IgE 受容体、グアニンヌクレオチド結合調節蛋白質 (G 蛋白質) および adenylyl cyclase の 3 つ組複合体の形成を促す

ものと考え、adenosineはおそらく adenylate cyclase 活性を変化させることにより IgE によるラットの肥満細胞からの histamine 遊離を調節するのではないかと想像している。アナフィラキシー性 histamine 遊離と compound 48/80 誘発性 histamine 遊離に対する adenosine の作用様式の相違は、両者の histamine 遊離の機序の相違と関係があるかも知れない。

IgE 媒介性の histamine 遊離が serine protease 阻害剤の diisopropylfluorophosphate により抑制され<sup>24)</sup>、 $\alpha$ -chymotrypsin が histamine 遊離をおこす<sup>15)25)</sup>ことから、免疫学的に誘発される histamine 分泌過程における早い段階での出来事として protease の活性化がおこるものと考えられる。しかし、アナフィラキシー性 histamine 遊離と  $\alpha$ -chymotrypsin による遊離に対する adenosine の効果の差は、これらの分泌反応がどこかの段階において明らかに異なっていることを示唆している。compound 48/80 と substance P あるいは neurotensin による histamine 遊離の機序にもかなりの差があると考えられるが、adenosine が後の二者による histamine 遊離に影響をおよぼさなかった理由は明らかでない。

今回の実験で theophylline は compound 48/80 による histamine 遊離を有意に抑制した。theophylline は phosphodiesterase を阻害し<sup>26)</sup>、肥満細胞の cyclic AMP レベルを高める<sup>27)28)</sup>。theophylline が histamine 遊離を抑制するのはそのためであるという説<sup>29)</sup>があるが、それに反対する研究者も多い<sup>19)28)</sup>。3-isobutyl-1-methylxanthine は phosphodiesterase を強く抑制する<sup>30)</sup>が、今回の実験でこの薬物が有意の効果を示さなかったことは、theophylline が phosphodiesterase 抑制以外の作用機序により compound 48/80 による histamine 遊離を抑制することを示唆している。theophylline は抗 adenosine 作用を有している<sup>20)31)</sup>が、compound 48/80 誘発性 histamine 遊離に対して adenosine と theophylline がともに抑制効果を示すことから、抗 adenosine 作用が theophylline の compound 48/80 誘発性 histamine 遊離に対する抑制効果に関係するとは思われない。また、3-isobutyl-1-methylxanth-

ine, caffeine および theobromine のいずれにも有意の効果が認められないことから、histamine 遊離抑制作用は methylxanthine 類に共通の性質であるとは考えにくい。

## 結 論

ラット腹腔肥満細胞からの抗原、compound 48/80、 $\alpha$ -chymotrypsin、substance P あるいは neurotensin による histamine 遊離に対する adenosine とその類似体、および methylxanthine 類の効果を調べた。結果を得た。

1) adenosine はアナフィラキシー性 histamine 遊離を低濃度で抑制し高濃度で促進した。adenosine の R 部位類似体の N<sup>6</sup>-methyladenosine はアナフィラキシー性 histamine 遊離に対して adenosine と同様の二相性効果を示したが、adenosine の P 部位類似体の 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine および 2'-deoxyadenosine は抑制効果も促進効果も示さなかった。

2) adenosine は compound 48/80 および  $\alpha$ -chymotrypsin のどちらによる histamine 遊離も用量依存的に抑制した。

3) adenosine の R および P 部位類似体だけでなく、adenine, AMP, cyclic AMP, ADP, guanosine, inosine および cytosine のような purine および pyrimidine 誘導体も compound 48/80 誘発性 histamine 遊離に対して抑制効果を示した。

4) adenosine は substance P および neurotensin による histamine 遊離には影響しなかった。

5) theophylline は compound 48/80 誘発性 histamine 遊離をかなりの低濃度から抑制したが、3-isobutyl-1-methylxanthine, caffeine および theobromine は無効であった。

以上の結果より、adenosine はアナフィラキシー性 histamine 遊離を adenosine R<sub>1</sub> 受容体刺激により抑制し、R<sub>2</sub> 受容体刺激により促進すること、また、compound 48/80 誘発性 histamine 遊離に対する adenosine の抑制効果は adenosine 受容体刺激とは無関係であることが示唆される。さらに、theophylline の histamine 遊離抑制効果は adenosine 受容体拮抗と phosphodiesterase

抑制のどちらによっても説明しにくいように思われる。

清美教授に厚く御礼申し上げます。また終始御援助を頂いた薬理学教室の諸学兄に心から感謝いたします。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜った佐伯

#### 文 献

- 1) Daly JW, Bruns RF and Snyder SH : Adenosine receptors in the central nervous system : Relationship to the central actions of methylxanthines. *Life Sci* (1981) **28**, 2083—2097.
- 2) Fain JN, Pointer RH and Ward WF : Effects of adenosine nucleosides on adenylate cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine monophosphate accumulation, and lipolysis in fat cells. *J Biol Chem* (1972) **247**, 6866—6872.
- 3) Londos C, Cooper DMF, Schlegel W and Rodbell M : Adenosine analogs inhibit adipocyte adenylate cyclase by a GTP-dependent process : Basis for actions of adenosine and methylxanthines on cyclic AMP production and lipolysis. *Proc Nat Acad Sci USA* (1978) **75**, 5362—5366.
- 4) Londos C, Cooper DMF and Wolff J : Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Nat Acad Sci USA* (1980) **77**, 2551—2554.
- 5) Londos C and Wolff J : Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci USA* (1977) **74**, 5482—5486.
- 6) Haslam RJ and Lynham JA : Activation and inhibition of blood platelet adenylate cyclase by adenosine or by 2-chloroadenosine. *Life Sci* (1972) **11**, 1143—1154.
- 7) Marone G, Plaut M and Lichtenstein LM : Characterization of a specific adenosine receptor on human lymphocytes. *J Immunol* (1978) **121**, 2153—2159.
- 8) Marone G, Findlay SR and Lichtenstein LM : Adenosine receptor on human basophils : Modulation of histamine release. *J Immunol* (1979) **123**, 1473—1477.
- 9) Marquardt DL, Parker CW and Sullivan TJ : Potentiation of mast cell mediator release by adenosine. *J Immunol* (1978) **120**, 871—878.
- 10) Welton AF and Simko BA : Regulatory role of adenosine in antigen-induced histamine release from the lung tissue of actively sensitized guinea-pigs. *Biochem Pharmacol* (1980) **29**, 1085—1092.
- 11) Mentzer RM Jr, Rubio R and Berne RM : Release of adenosine by hypoxic canine lung tissue and its possible role in pulmonary circulation. *Am J Physiol* (1975) **229**, 1625—1631.
- 12) Fredholm BB : Release of adenosine from rat lung by antigen and compound 48/80. *Acta Physiol Scand* (1981) **111**, 507—508.
- 13) Fredholm BB and Sydbom A : Are the antiallergic actions of theophylline due to antagonism at the adenosine receptor? *Agents Actions* (1980) **10**, 145—147.
- 14) Levine BB and Vaz NM : Effects of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse : A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1970) **39**, 156—171.
- 15) Saeki K : Effects of compound 48/80, chymotrypsin and antiserum on isolated mast cells under aerobic and anaerobic conditions. *Jap J Pharmacol* (1964) **14**, 375—390.
- 16) Shore PA, Burkhalter A and Cohn VH Jr : A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* (1959) **127**, 182—186.
- 17) Loeffler LJ, Lovenberg W and Sjoerdsma A : Effects of dibutyryl-3'5'-cyclic adenosine monophos-

- phate, phosphodiesterase inhibitors and prostaglandin  $E_1$  on compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. *Biochem Pharmacol* (1971) **20**, 2287—2297.
- 18) Kurose M and Saeki K : Histamine release induced by neurotensin from rat peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol* (1981) **76**, 129—136.
  - 19) Sydbom A and Fredholm BB : On the mechanism by which theophylline inhibits histamine release from rat mast cells. *Acta Physiol Scand* (1982) **114**, 243—251.
  - 20) Williams M : Purinergic receptors and central nervous system function ; in *Psychopharmacology—The Third Generation of Progress*, Meltzer ed, Raven Press, New York (1987) pp 289—301.
  - 21) Holgate ST, Lewis RA and Austen KF : Role of adenylate cyclase in immunologic release of mediators from rat mast cells : Agonist and antagonist effects of purine and ribose-modified adenosine analogs. *Proc Nat Acad Sci USA* (1980) **77**, 6800—6804.
  - 22) Ortner MJ and Chignell CF : Spectroscopic studies of rat mast cells, mouse mastocytoma cells, and compound 48/80-II. *Biochem Pharmacol* (1981) **30**, 283—288.
  - 23) Winslow CM and Austen KF : Enzymatic regulation of mast cell activation and secretion by adenylate cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinases. *Fed Proc* (1982) **41**, 22—29.
  - 24) Becker EL and Austen KF : Mechanisms of immunologic injury of rat peritoneal mast cells. I. The effect of phosphonate inhibitors on the homocytotropic antibody-mediated histamine release and the first component of rat complement. *J Exp Med* (1966) **124**, 379—395.
  - 25) Uvnäs B and Antonsson J : Triggering action of phosphatidase A and chymotrypsins on degranulation of rat mesentery mast cells. *Biochem Pharmacol* (1963) **12**, 867—873.
  - 26) Johnson AR, Moran NC and Mayer SE : Cyclic AMP content and histamine release in rat mast cells. *J Immunol* (1974) **112**, 511—519.
  - 27) Sullivan TJ, Parker KL, Eisen SA and Parker CW : Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. II. Studies on the relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and histamine release. *J Immunol* (1975) **114**, 1480—1485.
  - 28) Norn S, Skov PS, Geisler A, Klysner R and Permin H : The mast cell and cyclic nucleotide regulation. Histamine release in rheumatoid arthritis and cystic fibrosis ; in *The Mast Cell : Its Role in Health and Disease*, Pepys and Edwards eds, Pitman Medical Publishing Co, Tunbridge Wells (1979) pp 53—60
  - 29) Sullivan TJ and Parker CW : Pharmacologic modulation of inflammatory mediator release by rat mast cells. *Am J Pathol* (1976) **85**, 437—464.
  - 30) Peytremann A, Nicholson WE, Liddle GW, Hardman JG and Sutherland EW : Effects of methylxanthines on adenosine 3'5'-monophosphate and corticosterone in the rat adrenal. *Endocrinology* (1973) **92**, 525—530.
  - 31) Rall TW : Central nervous system stimulants. The methylxanthines ; in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Edition, Gilman, Goodman, Rall and Murad eds, Macmillan, New York (1985) pp 589—603.

**Effect of adenosine, adenosine analogs and methylxanthines  
on histamine release induced by antigen and  
chemical substances from rat peritoneal mast cells**

**Kazuhiro SHIMAMURA**

**Department of Pharmacology,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. K. Saeki)**

Effect of adenosine, adenosine analogs and methylxanthines was studied on histamine release induced by antigen, compound 48/80,  $\alpha$ -chymotrypsin, substance P and neurotensin from rat peritoneal mast cells.

Adenosine inhibited anaphylactic histamine release at low concentrations but enhanced it at higher concentrations.  $N^6$ -methyladenosine, an adenosine R-site analog, had a similar dual effect on anaphylactic histamine release. However, 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine and 2'-deoxyadenosine, adenosine P-site analogs, had neither inhibitory nor enhancing effect. Adenosine inhibited histamine release induced by compound 48/80 and  $\alpha$ -chymotrypsin but not the release induced by substance P and neurotensin. Not only adenosine R- and P-site analogs, but also a large variety of purine and pyrimidine derivatives inhibited compound 48/80-induced histamine release. Theophylline inhibited compound 48/80-induced histamine release. However, 3-isobutyl-1-methylxanthine, caffeine and theobromine were ineffective.

These results suggest that adenosine inhibits anaphylactic histamine release by stimulating adenosine  $R_i$  receptors but enhances the release by stimulating  $R_a$  receptors. It is also suggested that the inhibition by adenosine of compound 48/80-induced histamine release is not caused by the stimulation of specific adenosine receptors. By either the antagonism at adenosine receptors or the inhibition of phosphodiesterase it seems to be difficult to explain the inhibition by theophylline of compound 48/80-induced histamine release.