

ラット血管平滑筋のヒスタミン H₁ 受容体を介する収縮反応

朴 紅 蘭

新潟大学医歯学総合研究科・分子細胞医学専攻
薬理学分野（主任：樋口宗史教授）

Histamine H₁ Receptor - induced Contraction in Rat Blood Vessels

Honglan PIAO

*Division of Pharmacology, Molecular and Cellular Medicine,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Chief: Prof. Takashi HIGUCHI)*

Abstract

Rat blood vessels were reported not to constrict to histamine, and histamine - induced contraction at high concentration was mediated through α_1 - adrenoceptors¹⁾. In the present study, it was shown that rat arteries and veins constricted to histamine at low concentration (0.1 - 100 μ M) in a non - cumulative manner and that this contraction immediately desensitized. A histamine H₁ receptor antagonist, mepyramine, abolished this transient contraction completely, whereas cimetidine, phentolamine, reserpine and tetrodotoxin failed to inhibit the contraction, indicating that the contraction is mediated directly through H₁ receptor. H₁ receptor mRNA expression level detected by RT - PCR was quite parallel to H₁ receptor - mediated contraction in the vessels.

Key words: Histamine, H₁ receptor, rat blood vessels, contraction

はじめに

ヒスタミンはアナフィラキシーショック時など、病的状態での血液循環系において重要な作用を担っている。4種類のヒスタミン受容体サブタイプのうち、血管平滑筋では主にH₁とH₂受容体の存在が知られており、H₁受容体は血管収縮に、H₂受容体は弛緩に関与しているとされている。

しかし、ラットではヒスタミン投与により血管は弛緩もしくは無反応であるとされ、ヒスタミン受容体を介する収縮を報告したものは無い。例えば、ラット大動脈でのヒスタミン累積投与実験では高濃度のヒスタミンにより α_1 アドレナリン受容体を介して収縮が生じるとされている。本研究では、ラット摘出血管におけるヒスタミンH₁受容体による収縮反応を初めて見だし、その収縮反応量

Reprint requests to: Honglan PIAO
Division of Pharmacology
Molecular and Cellular Medicine
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8122 Japan

別刷請求先：〒951-8122 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科・分子細胞医学専攻
薬理学分野 朴 紅 蘭

と RT-PCR でラット血管平滑筋上の H_1 受容体 mRNA 量とを比較検討した。

材料と方法

1. 血管収縮の測定方法

11 週齢のウイスター系雄性ラットを麻酔致死後、頸動脈、上腕動脈、大腿動脈、腹部下大静脈、頸静脈、上腕静脈、大腿静脈を摘出した。摘出した血管は氷冷した Krebs-Henseleit 溶液 (118mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5mM $CaCl_2$, 1.2mM KH_2PO_4 , 1.2mM $MgSO_4$, 25mM $NaHCO_3$, 10mM glucose) 中で、血管周囲の結合組織、脂肪組織等を慎重に除去して幅 4mm のリング標本とした。標本は 95% 酸素, 5% 二酸化炭素で通気した Krebs-Henseleit 溶液を満たした 5ml マグネズ管内にトライアングル状ステンレス棒を用いて懸垂した。下方のステンレス棒は管内に固定し、もう一本は張力トランスデューサー (T7-30-240, Orientec, Tokyo, Japan) に接続し、等尺性収縮を導出した。最大収縮を得るために、静止張力を上腕動脈では 1g, その他動脈では 2g とし、静脈では 0.2g とした。静止張力が安定するまで 60 分 (20 分おきに溶液を交換) 張力を調節し、静止張力が安定したことを確認後、124mM- K^+ Krebs-Henseleit 溶液 (122.8mM KCl, 2.5mM $CaCl_2$, 1.2mM KH_2PO_4 , 1.2mM $MgSO_4$, 25mM $NaHCO_3$, 10mM glucose) にて、30 分おきに 4 回血管を収縮させて収縮の安定を図った。ヒスタミン収縮は、124mM- K^+ Krebs-Henseleit 溶液による 4 回目の収縮を得た 30 分後に平滑筋の緊張が安定したことを確認した後ヒスタミンを投与することで得た。

(1) ヒスタミン初回感作による 2 回目のヒスタミン収縮の変化

ヒスタミンによる収縮反応の脱感作の時間的経過を検討するため、ヒスタミンの投与回数を 3 回とし、初回 10^{-5} M のヒスタミン投与から 30 分後に 2 回目の投与を行い、さらに 3 時間後に 2 度目の 10^{-5} M のヒスタミンをそれぞれ投与した。

(2) ヒスタミン濃度反応曲線

各標本において、 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M の各濃度のヒスタミンを単回投与し、ヒスタミン濃度反応曲線を作成した。なお、一度ヒスタミンを作用させた標本には再度ヒスタミンを作用させなかった。

(3) 各種アンタゴニストによるヒスタミン収縮の変化

ヒスタミンによる収縮に関する機構、受容体を検討するため、ヒスタミン H_1 受容体アンタゴニストのメピラミン、 α_1 アドレナリン受容体アンタゴニストのフェントラミン、Na チャネルブロッカーのテトロドトキシン、交感神経枯渇薬のレセルピンを用いた。レセルピン処理は 5mg/kg をラット腹腔内に投与し、24 時間後に血管を摘出して行った。その他の薬物はヒスタミン投与の 10 分前にマグネズ管内に投与し、各薬物存在下にヒスタミンを投与した。

2. RT-PCR による、ヒスタミン受容体の検出

各血管から Trizol 試薬 (GIBCO-BRL Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) を用いて RNA を抽出した後、RNA 中のヒスタミン受容体を検出するため、RT-PCR を、Access RT-PCR system Kit (Promega, Madison, MI, U.S.A.) と、サーマルサイクラー GenAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, U.S.A.) を用いて行った。 H_1 受容体のプライマーには、5'-TGAAGATCTACAAGGCTGTGCGGCGACACT-3' (nucleotides 666-695 of rat H_1) と、5'-TTGTGCCAATGAGCTTTGCCA-3' (nucleotides 1481-1501 of rat H_1) を用いた。また、G3PDH のプライマーには、5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (nucleotides 856-879 of rat G3PDH) と、5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (nucleotides 1813-1836 of rat G3PDH) を用いた。逆転写反応は 48 °C, 45 分間行い、その後 DNA の増幅は 90 °C, 30 秒間の変性反応, 60 °C, 1 分間の解離反応, 68 °C, 2 分間の DNA 合成反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。また、ラット脳

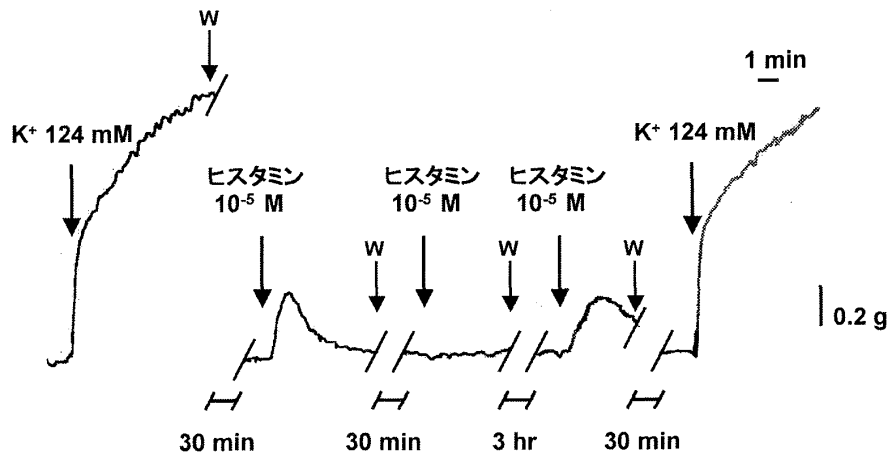


図1 ラット大腿動脈でのヒスタミン収縮

ラット大腿動脈でのヒスタミン 10^{-5} M 投与による最大収縮を得てから洗浄後、30分後にヒスタミン 10^{-5} M を再度投与した。続いてさらに3時間後再投与した時に得られた結果のトレースを示した。

RNA から同様に H_1 受容体の増幅を行い、 H_1 受容体検出のコントロールとして用いた。なお、G3PDH は mRNA の内部コントロールとして用いた。

得られた RT-PCR 産物中に増幅された DNA 断片が含まれていることを確認するため、RT-PCR 産物 $5\mu\text{l}$ を ethidium bromide 含有の 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動した。

3. 統計処理

実験結果は、平均士標準誤差で表した。有意差検定は Student's t-test に行い、 $P < 0.05$ を統計的有意と判定した。

結 果

1. ヒスタミンによる血管収縮反応

図1に示すように、大腿動脈リング標本に初回 10^{-5} M のヒスタミンを投与し、その30分後にもう一度同濃度のヒスタミンを投与すると、反応の消失(脱感作現象)が認められた。そこで、脱感作現象の時間的経過を検討したところ投与間隔3時間で初回投与時までヒスタミン収縮は回復し

た。この脱感作現象は大腿動脈以外の今回用いた全ての血管でも認められた。

2. ヒスタミン濃度反応曲線

脱感作の影響を避けるため、各血管において、 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M の各濃度のヒスタミンを単回投与して得られた濃度反応曲線を図2に示した。図に示すように収縮反応はヒスタミン濃度依存的に増大した。また、 3×10^{-6} M 程度の低濃度でも収縮を認めた。

3. ヒスタミン収縮に対する各種薬物の影響

ヒスタミンによる血管収縮機構を検討するため、 α アドレナリン受容体アンタゴニスト、フェントラミン 10^{-6} M 存在下で 10^{-5} M および 10^{-4} M のヒスタミンを投与したが、フェントラミンにより、ヒスタミンの収縮反応は有意な変化を認めなかった(図3)。また、実験開始24時間前にレセルピン処理し、化学的に交感神経除神経したラット血管を用いたが、ヒスタミンによる収縮は有意な変化を認めなかった(図4)。さらに、

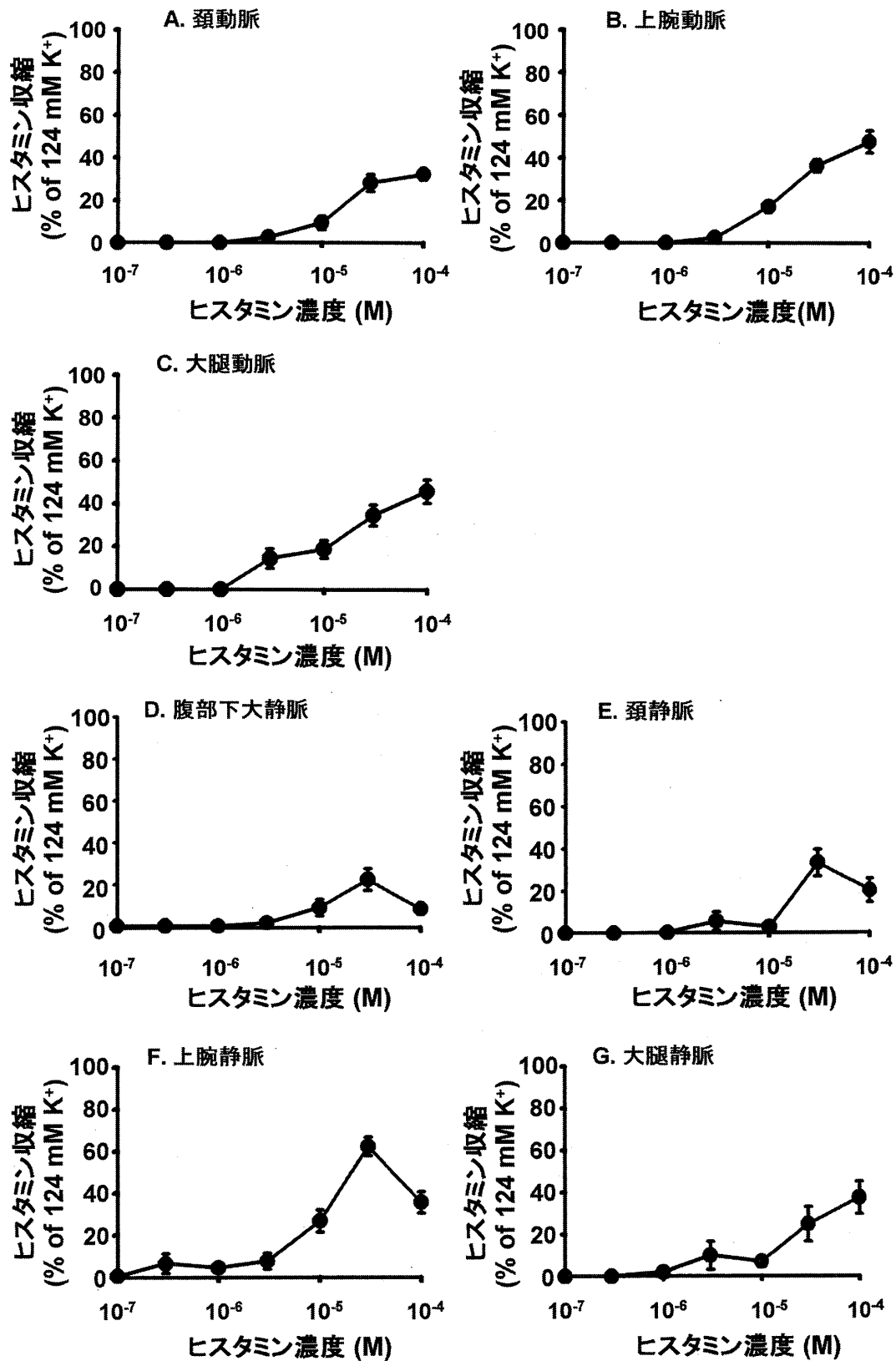


図2 ラット血管におけるヒスタミン収縮曲線

ヒスタミン単回投与によるラット頸動脈 (A), 上腕動脈 (B), 大腿動脈 (C), 腹部下大静脈 (D), 頸静脈 (E), 上腕静脈 (F), 大腿静脈 (G) での収縮反応曲線である。

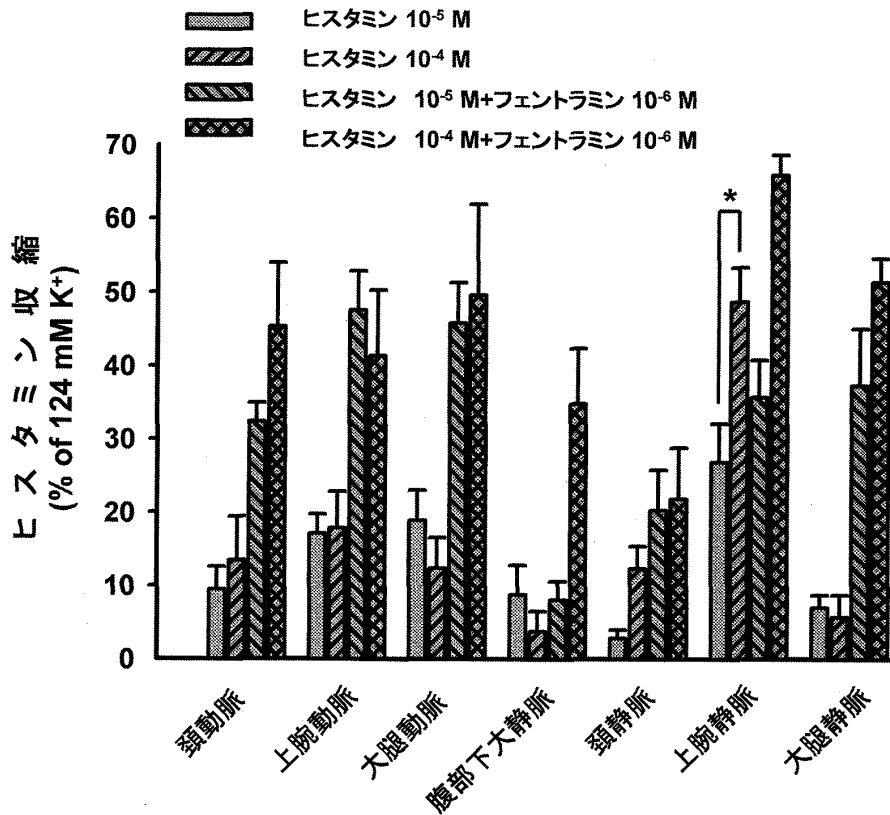


図3 ラット血管ヒスタミン収縮に対するフェントラミンの作用
ヒスタミン 10^{-5} M, 10^{-4} M 単独での収縮反応とフェントラミン 10^{-6} M 存在下でのヒスタミン 10^{-5} M, 10^{-4} M 投与による収縮反応との比較を示した。

テトロドトキシン 10^{-6} M により, 血管周囲神経からの収縮物質放出抑制した血管でもヒスタミン収縮は有意な抑制を認めなかった。ただし, 上腕動脈では有意な増加が認められた (図5)。図6に示すように, ヒスタミン H_1 受容体アンタゴニスト, メピラミン 10^{-6} M 存在下では, ヒスタミンによる収縮が全ての部位で完全に抑制された。

4. RT-PCR による, ヒスタミン受容体の検出

ヒスタミンによるラット血管の収縮に関与しているヒスタミン受容体を確認するため, RT-PCR を用いてヒスタミン H_1 受容体の mRNA を増幅したところ, 図7の上段に示すように, 全ての血管, および脳から抽出した RNA からヒスタミン H_1 受容体のバンドが検出された。なお, 下段にはコ

ントロールとして用いた解糖系酵素 G3PDH mRNA の検出結果を示した。また, この H_1 受容体 mRNA の発現量の半定量を行ったグラフを下に示した。

考 察

現在まで, ヒトをはじめ, さまざまな動物でヒスタミンによる血管収縮が報告されているが, ラット血管ではヒスタミン投与により収縮は起きない, もしくは非常に高い濃度が必要とされてきた。しかし, 今回の研究では, ヒスタミン 10^{-5} M を単回で投与することにより収縮反応が認められることを示した。また, このヒスタミンによる収縮はより低い濃度 3×10^{-6} M でも認められた。但

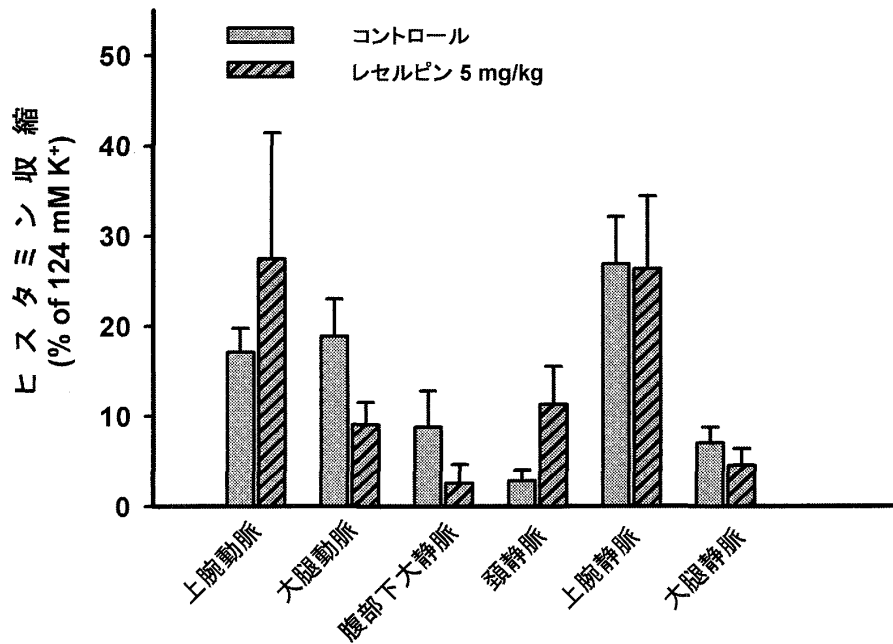


図4 ラット血管ヒスタミン収縮に対するレセルピンの作用
レセルピン 5mg/kg 腹腔内投与したラット血管によるヒスタミン 10^{-5} M による収縮反応の変化を示した。

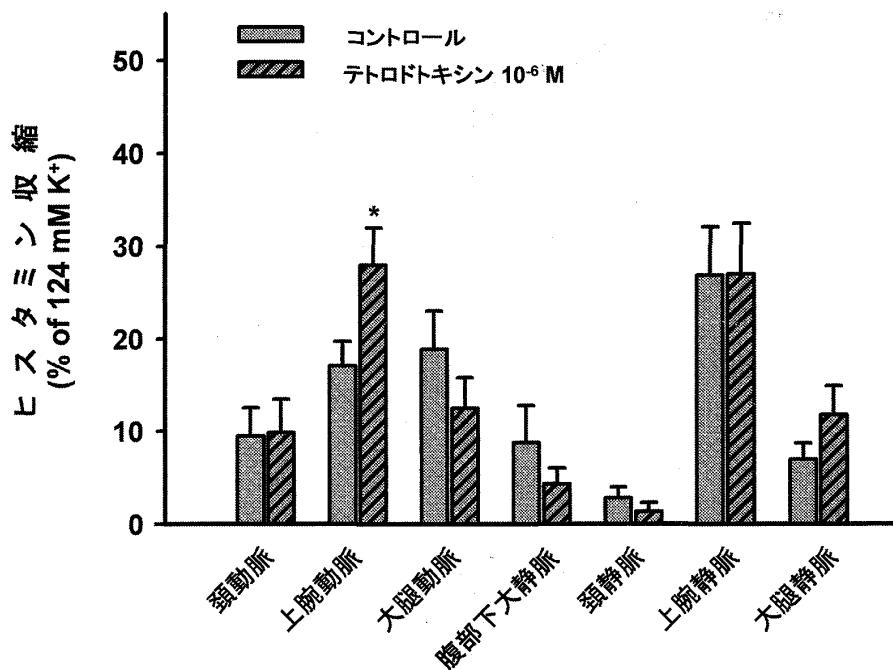


図5 ラット血管ヒスタミン収縮に対するテトロドキシシンの作用
ヒスタミン 10^{-5} M 単独での収縮反応とテトロドキシシン 10^{-6} M 存在下でのヒスタミン 10^{-5} M による収縮反応との比較を示した。

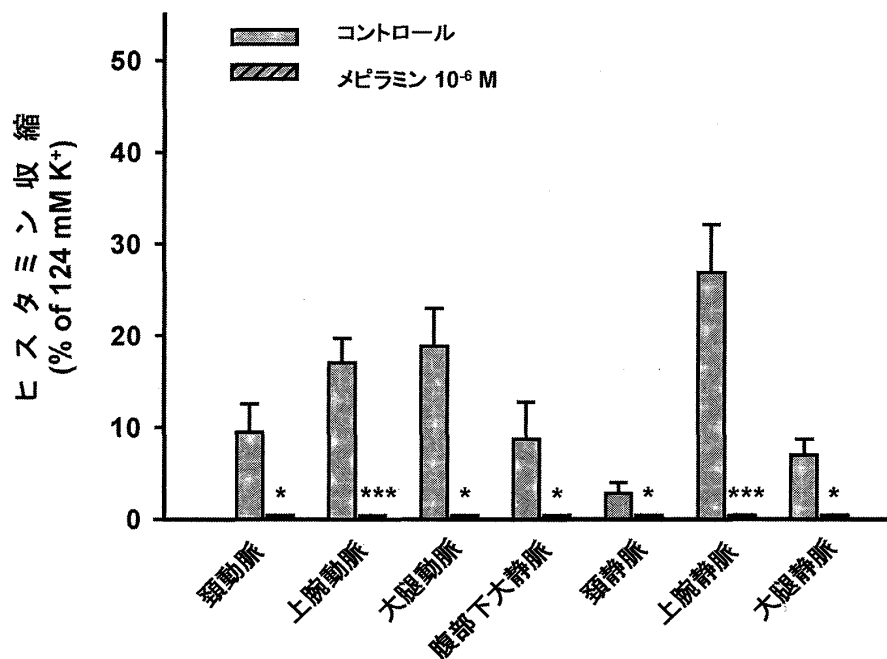


図6 ラット血管ヒスタミン収縮に対するメピラミンの作用
ヒスタミン 10^{-5} M 単独での収縮反応とメピラミン 10^{-6} M 存在下でのヒスタミン 10^{-5} M を単回投与による収縮反応との比較を示した。

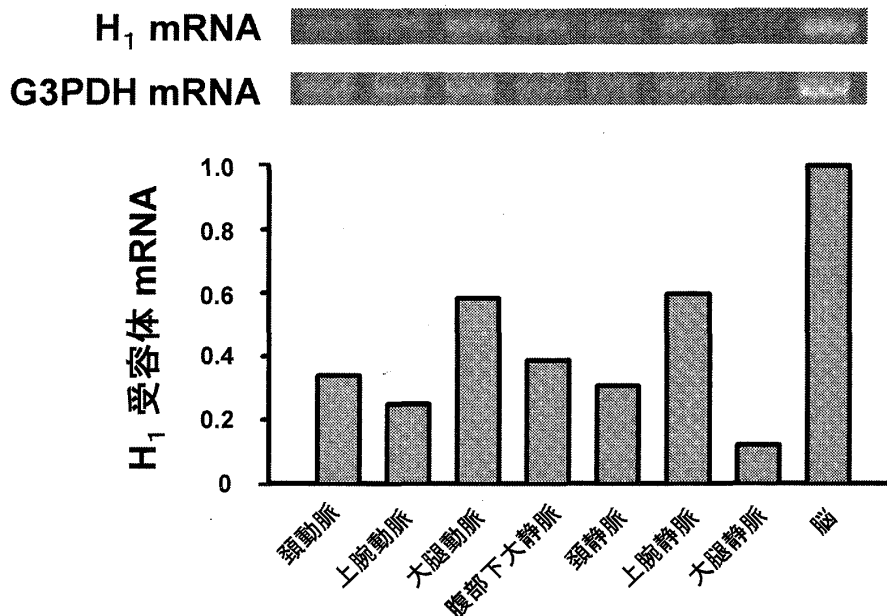


図7 ラット血管におけるヒスタミン H_1 受容体 mRNA の発現と半定量
RT-PCRにてラット各血管でのヒスタミン H_1 受容体 mRNA 量の検出結果を示した(写真上段). 下段は内部コントロールとして用いた解糖系酵素 G3PDH での結果を示した. グラフは, 脳での H_1 受容体発現量と1とした時の各血管での発現量を表したものである.

し、ヒスタミン初回投与により収縮を認めてから洗浄し、30分後にヒスタミンを再投与しても収縮反応が認められず、さらに洗浄を続け3時間後に収縮の回復を認めた。このことはラット血管平滑筋での強いヒスタミンへの脱感作を示している。今までのラット血管を用いた報告ではヒスタミンの低濃度からの累積投与を行っており、長時間ヒスタミンに暴露され、脱感作が起きることにより収縮を認めなかったものと思われる。この考えに基づき、累積投与ではなく、単回投与を行ったところ、濃度依存的なヒスタミン収縮反応曲線が得られた。

Schoeffter らの報告によるとラット大動脈におけるヒスタミンの高濃度投与による収縮は α_1 アドレナリン受容体を介する収縮反応であるとされているので、 α アドレナリン受容体アンタゴニスト、フェントラミン 10^{-6} M 存在下でのヒスタミンの収縮反応影響を観察したところ、ヒスタミン 10^{-5} M および 10^{-4} M による収縮には有意な抑制が認められなかった。このことより、ヒスタミンによる収縮には α アドレナリン受容体の関与はほとんどないと思われる。また、交感神経の化学的遮断薬であるレセルピンにより、ヒスタミンによる収縮は全く抑制されなかった。従って、ヒスタミンによる収縮反応は交感神経を介さずに起こっていることが考えられた。

さらに、テトロドキシンの存在下にヒスタミンを投与してもヒスタミンによる収縮は抑制されなかった。従って、ヒスタミンの収縮反応には何らかの介在神経の関与は無いと考えられる。但し、上腕動脈ではテトロドキシンのより有意に増加しているが、このテトロドキシンの収縮増加のメカニズムについては検討中であり、現時点では詳細なことは不明である。以上より、一般にヒスタミン収縮は血管周囲の神経を介さず平滑筋を刺激して生じていると考えられる。

ヒスタミン H₁ 受容体アンタゴニスト、メピラミンよりヒスタミンの収縮反応は完全に抑制された。データには示していないが、H₂ 受容体のアンタゴニストのシメチジン 10^{-4} M の存在下で収縮は全く抑制されなかった。また、RT-PCR によ

り、血管に H₁ 受容体の存在も確認された。従って、ラット動静脈におけるヒスタミンによる収縮は血管平滑筋の H₁ 受容体を介すると考えられる。ヒスタミン H₁ 受容体は G 蛋白介在性の細胞膜 7 回貫通型受容体である。G_q 蛋白を介してホスホリパーゼ C と共役しており、セカンドメッセンジャーとしてはイノシトール三リン酸を介した Ca²⁺ 動員とジアシルグリセロールを介したプロテインキナーゼ C の活性化により収縮反応が起きるとされている²⁾³⁾。

ラットを用いた本研究ではヒスタミン収縮の脱感作を認めたが、ラット以外の動物種の血管、例えばヒトの内胸動脈、伏在静脈⁴⁾ とモルモットの脳底動脈⁵⁾ ではヒスタミン収縮には脱感作が起きず、H₁ 受容体を介する収縮が生じると報告されている。しかし、今回の実験と同様にラットの心臓ではヒスタミン刺激による反応は脱感作により無反応であると報告されている⁶⁾。従って、ヒスタミンの収縮反応は種によって異なり、ラットでの急激な脱感作はラット H₁ 受容体の特徴であると考えられる。脱感作の原因としてもっとも考えられるのは受容体のリン酸化である。ヒト、ウシ、モルモットとラットの間で PKC による H₁ 受容体のリン酸化部位には差異を認めなかったのでラット H₁ 受容体の脱感作は PKC に非依存的なリン酸化であり、恐らく G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) であろうと推測される⁷⁾⁸⁾。

また今回の実験で、H₁ 受容体 mRNA が全ての血管部位で検出され、H₁ 受容体の発現量とヒスタミンの収縮反応がよく相関していることが認められた。このことはアナフィラキシーショック時の病的状態における血液循環にヒスタミンが大きく関与していることの裏付けになる所見である。

結 語

ラット血管平滑筋が生理的濃度のヒスタミンで血管平滑筋上の H₁ 受容体を介して収縮することが初めて明らかになった。このヒスタミンによる H₁ 受容体による収縮反応は種特異性があり、ラットでは強い脱感作が起きることが解った。

謝 辞

研究を指導して頂いた薬理学教室の樋口宗史教授, 弦巻立先生, および協同で実験を行った長井慎吾先生, また, 動物の管理をしてくださった三富明夫技官, 長谷川歩未さんに心より深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Schoeffter P and Godfraind T: Characterization of histamine - induced contraction in rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol* 197: 193 - 200, 1991.
- 2) Fujimoto K, Ohta K, Kangawa K, Kikkawa U, Ogino S and Fukui H: Identification of protein kinase C phosphorylation sites involved phorbol ester - induced desensitization of the histamine H₁ receptor. *Mol Pharmacol* 55: 735 - 742, 1999.
- 3) Jeong JH, Yun MC, Shin CY, Lee YS, Song HJ and Sohn UD: Signaling via histamine receptors in cat duodenal smooth muscle cells. *Mol Cells* 16: 180 - 186, 2003.
- 4) Schoeffter P and Godfraind T: Histamine receptor in the smooth muscle of human internal mammary artery and saphenous vein. *Pharmacol Toxicol* 64: 64 - 71, 1989.
- 5) Chang JY, Hardebo JE and Owman CH: Differential vasomotor action of noradrenaline, serotonin, and histamine in isolated basilar artery from rat and guinea - pig. *Acta Physiol Scand* 132: 91 - 102, 1988.
- 6) Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y and Levi R: Histamine H₁ and H₂ receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 309: 786 - 795, 2004.
- 7) Iwata K, Luo J, Penn RB and Benovic JL: Bimodal Regulation of the human H₁ histamine receptor by G protein - coupled receptor kinase 2. *J Bio Chem* 280: 2197 - 2204, 2005.
- 8) Dickenson JM and Hill SJ: Homologous and heterologous desensitization of histamine H₁ - and ATP - receptors in the smooth muscle cell line, DDT 1MF - 2: the role of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 110: 1449 - 1456, 1993.

(平成18年1月16日受付)