

脳内ヒスタミン動態の検索

大石, 了三
九州大学医学部附属病院薬剤部

<https://doi.org/10.15017/7324370>

出版情報：福岡醫學雑誌. 86 (8), pp.325-329, 1995-08-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



総 説

脳内ヒスタミン動態の検索

九州大学医学部附属病院薬剤部

大 石 了 三

Examination of Histamine Dynamics in the Brain

Ryozo OISHI

Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Kyushu University 71, Fukuoka 812-82

は じ め に

ヒスタミン(HA)は哺乳類のほとんどすべての組織に存在する生理活性アミンで、胃酸分泌において重要な役割を演じている一方、アレルギー症状やアナフィラキシーショックの中心的原因物質である。脳においては、以前から神経伝達物質あるいは神経修飾物質として考えられ、脳室内投与されたHAの作用や抗HA薬の臨床効果から、覚醒レベル、前庭機能、体温、血圧、摂食行動、ホルモン分泌、情動行動などの調節に関与することが示唆されてきたが、HA神経系の機能的役割は以前として明確ではない。

HA神経走行の組織学的解明は、蛍光組織化学の応用が困難であったためモノアミンに比べてかなり遅れたが、ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)あるいはHA自身に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学的技法によりラットにおいて明らかにされた。HA神経の細胞体は後部視床下部に局限して存在し、その神経線維は視床下部に最も密に分布し、さらに内側前脳束を経て終脳各部位へ、また下行性に脳幹部へも分布している。

神経系の機能を研究するためにはその神経伝達物質の動態を解明することも必要である。HAの場合、脳内には神経性HAの他に非神経性HAが存在しており、これらを区別して調べなければならない。本稿では、HAおよびその脳内における主要代謝物 α -メチルヒスタミン(t-MH)の定量、HAの動的状態を推定するための代謝回転速度の測定、さらに脳内微小透析法による細胞外HA濃度の測定について著者らの方法を中心に解説する。

1. 脳内HAの定量法

Shoreら¹²⁾が報告したHAをortho-phthalaldehyde(OPA)と反応させて測定する蛍光分析法は、感度もよく広く末梢組織中HAの定量や肥満細胞からのHA遊離の実験などに利用されている。しかし、この方法では脳に多く含まれるスペルミジンによっても同様に蛍光体が生成されるので、脳内HAの定量に応用する場合にはあらかじめHAを分離精製する必要がある。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたHAの蛍光測定法では、カラムにより分離したHAを反応槽でOPAと反応させるポストカラム法が、感度、選択性の点で優れる。Yamatodaniら¹³⁾は、陽イオン交換カラムを用いてHAの高感度分析を行っているが、この方法ではH₃アゴニストの α -メチルヒスタミンとの分離が困難で、この薬物を用いた薬理学的検討の際に利用できない。著者ら⁵⁾は改良を加え、逆相系カラムを用いたイオンペアHPLC法を開発した(図1)。この方法では、 α -メチルヒスタミンとの分離も容易で、さらに高感度のHA分析が可能である(図2)。

HAの高感度分析法としてはこの他、HA抗体を利用したラジオイムノアッセイ、酵素アイソトープ法

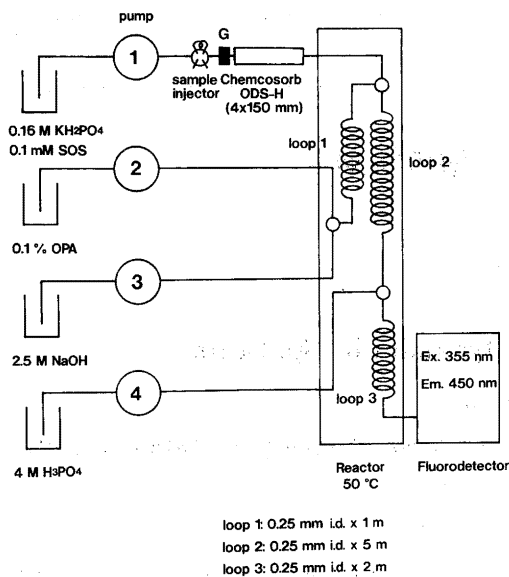


図1 HAのイオンペア-HPLC-ポストカラム蛍光分析法

SOS, Sodium octanesulfonate, G, ガードカラム (Waters μ Bondapak C18 Guard Pak).

ポンプ流速 (ml/min), 1:0.6, 2:0.12, 3:0.12, 4:0.14.

カラムで分離されたHAはアルカリ条件下でOPA反応され (loop 2), リン酸で安定化される (loop 3).

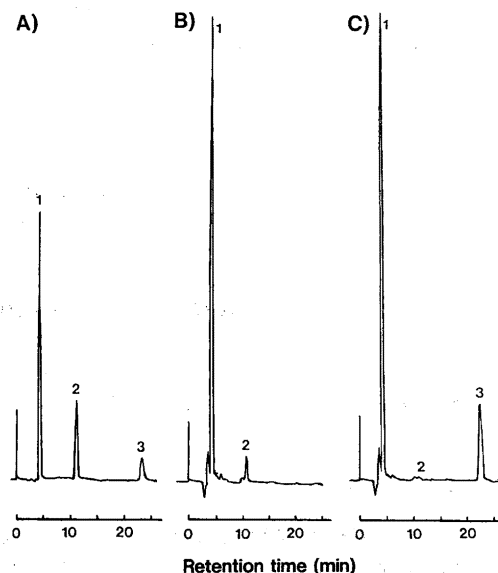


図2 クロマトグラム

ピーク1: ヒスチジン (His), 2: HA, 3: α -メチルヒスタミン (α -MH).

A) 標準液 His 1.5 ng, HA 15 pg, α -MH 15 pg, B) ウレタン麻酔下のラット視床下部からの透析液, C) α -MH (5 mg/kg, i.p.) 投与30~60分後の透析液. HAは著明に減少し, 脳に移行した α -MHのピークが出現する.

がある。後者は、試料に [^{14}C]-S-adenosylmethionine と HA-N-メチルトランスフェラーゼ (HMT) を加え、HA を t-MH に変えてこれをクロロホルムで抽出する方法で、内標準として一定量の [^3H]-HA を加えておき、生成された t-MH の [^{14}C] / [^3H] の比から試料中の HA 量を求めるのがダブルアイソトープ法であり、 [^3H]-S-adenosylmethionine のみを用いるものがシングルアイソトープ法である。しかし、この方法では HMT を利用しているため、その阻害薬や基質となる α -メチルヒスタミンを投与した場合には用いることができない。

II. 脳内 HA および t-MH の同時定量法

t-MH のみの測定法としては、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによる方法があるが、装置が高価であり、またこの方法では HA を別に定量する必要があることなどを考えると、HPLC による HA と t-MH の同時定量の方が何かと都合がよい。著者らは、HA と t-MH をブタノール抽出、陽イオン交換カラムによる精製後に、2-mercaptoethanol 存在下に OPA と反応させ、HPLC で分離定量するプレカラム法で脳内 HA と t-MH の同時定量を行った。この方法は実際的にはいろいろな工夫が必要であるが、装置が簡単で分析時間も短くてすむため多数の試料の微量定量に適している⁷⁾。

III. 脳内 HA の代謝回転速度および半減期

HA 神経の活動性は HA の代謝回転速度を測定することにより推定できる。HA は HDC により L-ヒスチジンから合成され、神経から遊離された HA は再取り込みされずにほとんどすべて HMT により t-

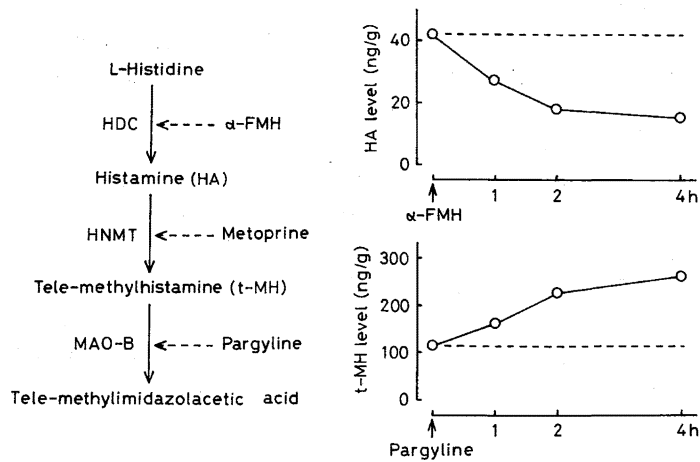


図3 脳内 HA の合成および代謝経路と HA 代謝回転の測定
 α -FMH, metoprine, pargyline は合成および代謝阻害薬。右図はマウス全脳における、 α -FMH 投与後の HA の減少と pargyline 投与後の t-MH の蓄積。

MH となり、これはさらに B 型モノアミン酸化酵素 (MAO) によって代謝される。定常状態では HA の合成および代謝速度が一定であると仮定すれば、合成あるいは代謝阻害薬を利用することによって HA の代謝回転速度を測定できる (図3)。

α -フルオロメチルヒスチジン (α -FMH) は強力で特異的な非可逆的 HDC 阻害薬である⁹⁾。マウスに α -FMH を投与すると脳内 HA 含量は指数関数的に減少し、4 時間後には投与前値の約 40~50% となり、少なくとも 48 時間後まではそのまゝの状態が続く⁹⁾。 α -FMH により減少しない HA は、肥満細胞のような非神経性細胞に由来する半減期が非常に長いもので、 α -FMH による HA の最大減少量は神経性 HA の量を表すものと考えられる。HA の代謝回転速度は、 α -メチルチロシン投与によるカテコラミンの代謝回転速度の測定の場合と同様に算出できる。すなわち代謝回転速度は、

$$-d[HA]/dt = k[HA]_0$$

ただし、 $[HA]_0$ は神経性 HA の定常レベル、 $[HA]$ は α -FMH 投与後時間 t における HA レベル、 k は HA 減少 (代謝回転) の速度定数を表す。

積分して、 $\log_{10}$ に変換すると、

$$\log [HA] = \log [HA]_0 - 0.434 kt$$

$\log [HA]$ を時間 t に対してプロットすると直線が得られ、その勾配 ($-0.434 k$) から速度定数および代謝回転速度が求められる。HA 半減期 ($t_{1/2}$) は、この式に $[HA] = [HA]_0/2$ を代入して、 $0.693/k$ となる。

MAO 阻害薬パージリンを投与すると脳内 t-MH 含量が初めの数時間はほぼ直線的に増加し、この蓄積速度から HA の代謝回転速度を測定できる。 α -FMH を利用する場合には HA の減少を調べるために HA の測定にはそれだけより高度の厳密性が必要となるが、この方法では t-MH の増加を調べるためにその測定は逆に容易になり、また薬物の効果も検討しやすいという利点がある。著者らによりこの方法で測定された HA の代謝回転速度は、ラット全脳で 0.37 nmol/g/h 、マウス全脳では $0.35 \sim 0.55 \text{ nmol/g/h}$ である¹¹⁾。HA の代謝回転速度は視床下部で最高である。その他の部位における順序は動物種や報告により異なるが、橋・延髄や小脳では低い。ラット脳内各部位における神経性 HA の半減期は、線条体で 7.7 分と最も短く、視床や視床下部では逆にそれぞれ 42.3 分、56.6 分と長い。ラットの他の部位では 10~25 分である¹⁰⁾。

HA 神経の終末にも他の神経系にみられるようなシナプス前受容体 (H_3 受容体) を介する HA の遊離および合成調節機構が存在する。この H_3 受容体に強力かつ特異的で、しかも血液脳関門を通過できるアゴニストの α -メチルヒスタミンならびにアンタゴニストのチオペラミドが開発され、それぞれ大脳皮質切片からの HA 遊離を著明に抑制ならびに亢進させる²⁾。これらはパージリンによる脳内 t-MH の蓄積をそれぞれ著明に抑制および促進する³⁾。

HMT 阻害薬メトプリンは、特異性が低いこと、脳内 HMT 活性が非常に高いこと、HA の蓄積によりフィードバック機構を介する代謝回転の低下が比較的早く起こることなどの理由により HA 代謝回転の測定に利用できない。

HA の代謝回転速度はアイソトープ法によっても測定されている。これは、 $[^3H]$ -ヒスチジンを脳室内あるいは静脈内に投与し、 $[^3H]$ -ヒスチジンと合成された $[^3H]$ -HA の脳内濃度の経時的变化から HA の代謝回転速度と半減期を算出する方法である。この方法では、ラット全脳で HA の代謝回転速度は 0.31 nmol/g/h、半減期は 46 分、またマウス全脳でそれぞれ 0.29 nmol/g/h、49 分と、パージリンによる t-MH の蓄積により求められたものに近い値が報告されている。

IV. 脳内微小透析法による細胞外 HA 濃度の測定

脳内微小透析法は神経伝達物質の細胞外濃度を無麻酔無拘束下に測定することができるため、モノアミン、アセチルコリン、アミノ酸などの細胞外液中動態を研究するために広く応用されている。しかし、脳内 HA の微小透析法による実験は、高感度 HA 測定法や組織傷害による非神経性 HA の混入などの問題があり、とくに無麻酔無拘束下では細心の注意が必要である。少なくとも測定した HA が神経由来であることを十分確認しなければまったく意味がない。そのための薬理学的手段として、 α -FMH および α -メチルヒスタミンは非常に有用である。

微小透析法による検討は、特定な機能との関係を考える場合には、測定感度およびプローブの大きさの問題で、ラットでは線条体や大脳皮質に限られる。次に著者らが行った線条体における無麻酔無拘束での実験について、実験方法および結果を述べる¹⁾。

ラットをペントバルビタール麻酔下に脳定位固定装置に固定し、U 字型プローブ (エイコム製, BDP-UI-8-03) を目的部位に植え込み、翌日に無拘束下で $1\mu\text{l}/\text{min}$ の速度でリング液の灌流を行った。灌流液は過塩素酸と混合して直接ループインジェクターに集め 30 分毎に HPLC に注入し、イオンペア HPLC-ポストカラム法で HA を定量した。この方法による HA の検出限界は 0.5 pg である。灌流液中の HA 濃度は灌流開始直後は高い値を示したが、1 時間から 7 時間後はわりに安定で $5.9\sim 8.4\text{ pg}/30\text{ min}$ であった。このプローブの *in vitro* の回収率 37.7% を考慮すると、線条体の細胞外 HA 濃度は $4.6\sim 6.7\text{ nM}$ と推定された。HA 遊離量は、灌流液中の K^+ イオン濃度を 100 mM に上昇させると約 40% 増加し、 $1\mu\text{M}$ のテトロドトキシンを添加すると基礎遊離量の 32% にまで低下した。また、 α -メチルヒスタミン投与では 12% に減少し (図 2)、 α -FMH では投与 4 時間以後には検出限度以下にまで減少することから、測定された HA のほとんどが神経活動に由来するものであることが薬理学的に明かとなった。

著者らはこのような HA 遊離に対するいくつかの中枢作用薬の効果を調べた^{3,4)}。HA 遊離量はペントバルビタールナトリウム ($50\text{ mg}/\text{kg}$, i.p.) および GABA アゴニスト、ムシモール ($5\text{ mg}/\text{kg}$, i.p.) の投与で、20% および 30~50% に一過性に減少し、ジアゼパム ($20\text{ mg}/\text{kg}$, i.p.) 投与では 3 時間後まで約 50% の減少を示した。 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール ($5\text{ mg}/\text{kg}$, i.p.) は投与 30 分後では HA 遊離量を 60% 増加させたが、投与 2 時間後では逆に投与前の 20% に著明に低下させた。一方、塩酸モルヒネ ($5\text{ mg}/\text{kg}$, s.c.) は、投与 3 時間後まで 2, 3 倍に著明に増加させた。これらの結果は代謝回転に対する薬物の効果とほぼ一致している。

おわりに

現在、脳内の HA 神経系や受容体の分布はかなり詳細に明らかにされている。また、優れた HDC 阻害薬や H_3 アゴニストおよびアンタゴニストの登場により選択的に内因性の HA 神経機能を変化させるこ

とが可能である。さらに本稿で述べたように、HA 分析法も進み、代謝回転や細胞外濃度を調べることに
より神経活動の変化を正確にとらえることができるようになってきた。今後、さらに特異的で実用的な受
容体作用薬や HMT 阻害薬などの開発が望まれるが、総合的な研究により HA 神経系と疾患との関係あ
るいは機能的役割が明らかになってくるであろう。

参 考 文 献

- 1) Adachi N, Itoh Y, Oishi R and Saeki K: Direct evidence for increased continuous histamine release produced by middle cerebral artery occlusion in the striatum of conscious freely moving rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 477-483, 1992.
- 2) Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, Lecomte JM, Pollard H, Robba M, Schunack W and Schwartz JC: Highly potent and selective ligands for histamine H_3 -receptors. *Nature* 327: 117-123, 1987.
- 3) Chikai T, Oishi R and Saeki K: Microdialysis study of the effects of sedative drugs on extracellular histamine in the striatum of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1277-1281, 1993.
- 4) Chikai T, Oishi R and Saeki K: Increase in the extracellular histamine concentration in the rat striatum by μ -opioid receptor activation. *J. Neurochem.* 62: 724-729, 1994.
- 5) Itoh Y, Oishi R, Adachi N and Saeki K: A highly sensitive assay for histamine using ion-pair HPLC coupled with postcolumn fluorescent derivatization: its application to biological specimens. *J. Neurochem.* 58: 884-889, 1992.
- 6) Kollonitsch J, Patchett AA, Marburg S, Maycock AL, Perkins LM, Doldouras GA, Duggan DE and Aster SD: Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature* 274: 906-908, 1978.
- 7) 大石了三: 中枢神経系の Histamine の代謝回転と薬物によるその変化. *日薬理誌*, 92: 271-281, 1988.
- 8) Oishi R, Itoh Y, Nishibori M and Saeki K: Effects of histamine H_3 -agonist (R)- α -methylhistamine and antagonist thioperamide on histamine metabolism in the mouse and rat brain. *J. Neurochem.* 52: 1388-1392, 1989.
- 9) Oishi R, Itoh Y, Nishibori M, Saeki K and Ueki S: Enhancement by α -fluoromethylhistidine of the thiopental sleep-prolonging action of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology* 95: 77-81, 1988.
- 10) Oishi R, Nishibori M and Saeki K: Regional differences in the turnover of neuronal histamine in the rat brain. *Life Sci.*, 34: 691-699, 1984.
- 11) Saeki K and Oishi R: Turnover of neuronal histamine in the mammalian brain and its changes induced by drugs and observed in disease models, In Watanabe T and Wada H (ed): *Histaminergic neurons: morphology and function*. pp. 345-363, Boca Raton: CRC Press, 1991.
- 12) Shore PA, Burkhalter A and Cohen VH: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 182-186, 1959.
- 13) Yamatodani A, Maeyama K, Watanabe T, Wada H and Kitamura Y: Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells: clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. *Biochem. Pharmacol.* 31: 305-309, 1982.