

血管内皮細胞および滑膜線維芽細胞における ヒスタミン受容体の役割について

勝久敬太

近畿大学医学部整形外科学教室

The role of histamine receptors in endothelial cells and
synovial fibroblastic cells

Keita Katsuhisa

Department of Orthopaedic Surgery, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

The effects of histaminergic agonists on the production of interleukin-6 (IL-6) and cell proliferation in endothelial cells and synovial fibroblastic cells were examined. Both histamine and H₁-receptor agonist, 2-pyridylethylamine significantly increased IL-6 production and cell proliferation in both types of cell, while H₂-receptor agonist, dimaprit significantly decreased IL-6 production and cell proliferation in both types of cell.

Serum and synovial fluid were obtained from patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA), and their effects on the production of IL-6 and cell proliferation in endothelial cells and synovial fibroblastic cells were examined. Synovial fluid from RA patients significantly increased these events in both types of cell, without stimulation by histaminergic agonists. In addition, synovial fluid from RA patients suppressed the effects of the H₂-receptor agonist on IL-6 production and cell proliferation both in endothelial cells and synovial fibroblastic cells.

These findings indicate that a decrease in the suppressive effects of H₂-histaminergic agonist on IL-6 production and cell proliferation both in endothelial cells and synovial fibroblastic cells is involved in perpetuating the inflammatory process in RA.

Key words : endothelial cells, synovial fibroblastic cells, dermal fibroblastic cells, histamine receptors, interleukin-6

緒 言

ヒスタミンは以前より炎症の chemical me-

diator として知られており、関節炎において関節液中で高値をとることから炎症局所で重要な役割を果たすことが示唆されてきた¹。一方、ヒ

スタミン受容体には主に H1, H2 の二つの受容体の存在が明らかにされている^{2,3}。当教室においては、実験的関節炎や慢性関節リウマチ (RA) のリンパ球、骨髄細胞においてヒスタミン H2 受容体機能が低下しており、H2 受容体は主に抗体産生の抑制から関節炎に対して抑制に作用することをこれ迄に報告してきた^{4,5,6,7}

しかし、RA は関節滑膜を炎症の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患であり、その病理学的特徴は血管内皮細胞と滑膜細胞の増殖と種々の炎症細胞や免疫担当細胞の局所への浸潤にある。これらの細胞浸潤に対し血管内皮細胞は重要な役割を果たすと考えられる⁸。また、RA 滑膜では滑膜細胞は著しく増殖し、やがてパンスともよばれる肉芽組織を形成する。一方、RA 等の自己免疫疾患において種々のサイトカインの関与が報告されている^{9,10,11}。そのうちインターロイキン 6 (IL-6) には B 細胞の分化に影響を与え、リウマトイド因子や抗 II 型コラーゲン抗体を産生する作用¹² があり、さらには破骨細胞を増殖させて骨吸収を促進する作用¹³ があることが報告されている。

そこで本研究では、血管内皮細胞と滑膜細胞における IL-6 産生能および細胞増殖能に対するヒスタミン受容体の役割を検討するとともに、関節炎局所における液性因子との相互作用をみるために関節液の添加による効果の検討も行った。

材料および方法

1. 材料

1.1. 血管内皮細胞

第 2 継代のヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞 (Sanko Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) を 10% ウシ血清添加 E-GM UV (Sanko Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) で培養し、コンフルエントに達した後、これを実験に供した。

1.2. 滑膜線維芽細胞

1987 年のアメリカリウマチ協会による診断基準¹⁴ を満たす RA 患者 4 例および変形性関節

症 (OA) 患者 4 例より、人工関節置換術の際に滑膜組織を採取した。これらの滑膜組織を約 2 mm³ の大きさに細切した後、コラゲナーゼ処理を行い細胞を分離した。この細胞を Falcon 3003 円形培養フラスコ (Becton Dickinson and Company, USA) に移し、10% ウシ血清添加 Dulbecco's modified Eagle MEM (Gibco Laboratories, New York, USA) 中で 37°C、5% CO₂ 飽和水蒸気圧の条件下に、2~3 日毎に培養液を交換してコンフルエントになるまで培養した¹⁵。3 代の継代により細胞は均一な線維芽細胞様形態を呈した。今回、第 3 継代までの滑膜細胞は IL-6 産生量が不安定であることや細胞が不均一であることから第 4 継代以降の滑膜線維芽細胞を使用し、その後の細胞の特性による変化も考えられるので長期の第 8 継代まで調べた。

1.3. 皮膚線維芽細胞

第 2 継代のヒト皮膚線維芽細胞 (Sanko Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) を 10% ウシ血清添加 MEM 培地 (Gibco Laboratories, New York, USA) で培養し、コンフルエントに達した後、これを実験に供した。

1.4. 血清

健康人 8 例、RA 患者 8 例、OA 8 例より末梢血を採取し、血清を分離後使用まで -80°C で実験を行うまで保存した。

1.5. 関節液

RA 8 例、OA 8 例より関節液を採取し、4°C で 5 分間、1,000 回転で遠沈後上清を -80°C で保存し、実験に供した。

2. IL-6 産生能の検討

血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞、滑膜線維芽細胞を血管内皮細胞には 10% ウシ血清添加 E-GM UV (Sanko Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)、線維芽細胞には 10% ウシ血清添加 Dulbecco's modified Eagle MEM (Gibco Laboratories, New York, USA) を用い、それぞれ 1×10^5 個/well となるよう Falcon 3047 24 well plate (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) に播種した。細胞

がコンフルエント（血管内皮細胞は約 2.13×10^5 個，RA 滑膜細胞は約 1.97×10^5 個，OA 滑膜細胞は約 2.01×10^5 個，皮膚線維芽細胞は約 2.13×10^5 個）に達した後，無血清の培地に交換し，経時的に培養上清中の IL-6 濃度を IL-6 ELISA キット (Toray Fuji Bionics Inc., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

3. 細胞増殖能の検討

血管内皮細胞，皮膚線維芽細胞，滑膜線維芽細胞を IL-6 産生能の検討と同様の培地で， 1×10^4 個となるよう Falcon 3047 96 well plate (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) に播種し，細胞がコンフルエントに達するまで培養した。無血清培地に移し，20時間培養した。[methyl- ^3H]-thymidine (ICN Biomedicals, Inc., Irvine, CA, USA) を 1.85×10^{-2} MBq 加えて，さらに4時間培養した。細胞を氷冷 PBS で3回洗浄後，細胞捕集フィルター (LABOMASH, LM 101-10) を用いて回収した。 ^3H -thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンターを用いて測定した¹⁶。

4. IL-6 産生および細胞増殖に及ぼすとヒスタミン受容体作用薬の影響。

細胞がコンフルエントに達した後，Histamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)，ヒスタミン H1 受容体アゴニストとして 2-Pyridylethylamine dihydro-

chloride (Smith Klin & French Laboratories 71432, U, K.) およびヒスタミン H2 受容体アゴニストとして Dimaprit dihydrochloride (Smith Klin & French Laboratories 91449, U, K.) を各々 10^{-6} M から 10^{-3} M 添加して培養し，その影響を検討した。

5. IL-6 産生および細胞増殖に及ぼす RA, OA 患者血清，関節液の影響

各細胞を well に播種する時点より，それぞれ5%濃度に調製した健常人，RA，OA の血清，あるいは RA，OA の関節液を添加して培養し，IL-6 産生能および細胞増殖能を検討した。さらに，この系においても 10^{-4} M の Histamine dihydrochloride 及びヒスタミン H1, H2 受容体アゴニストを添加し，ヒスタミン受容体の作用に対するこれら血清，関節液の影響も検討した。

6. 統計学的検討

有意差の検定には Student's t test を用いた。

結 果

1. IL-6 産生能および細胞増殖能に対するヒスタミン受容体作用薬の影響

1.1. 血管内皮細胞

Mitogen 刺激なしでも，血管内皮細胞よりの IL-6 産生が認められ，培養上清中に放出され

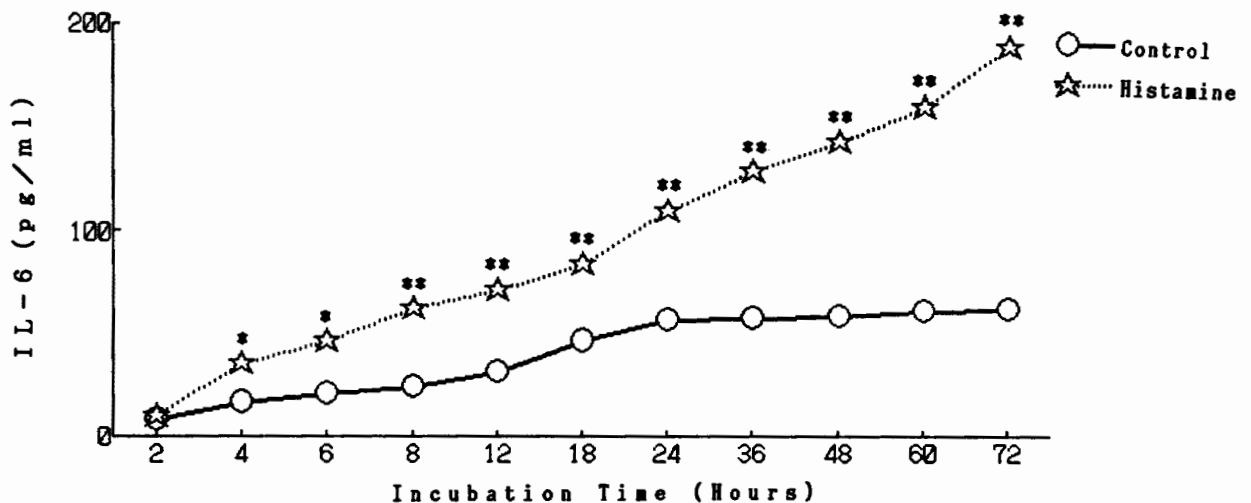


Fig. 1 Time-course of IL-6 production in culture supernatants from endothelial cells (control), or with histamine (10^{-4} M). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, significantly different from control

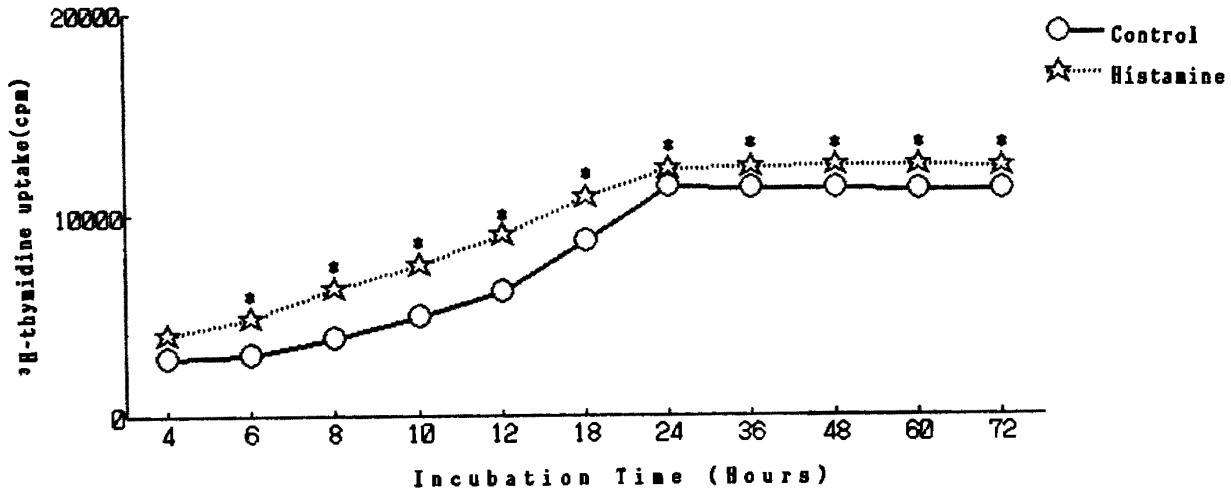


Fig. 2 Time-course of ³H-thymidine uptake by endothelial cells (control), or with histamine (10⁻⁴M). *p<0.05, significantly different from control

Table 1 Effects of histamine and histaminergic agonists on IL-6 production in culture supernatants from endothelial cells and ³H-thymidine uptake by endothelial cells

		IL-6(pg/ml)	³ H-thymidine uptake(cpm)
Control		58.26±1.90	11450±336
Histamine	10 ⁻⁶ M	62.35±3.15	11916±448
	10 ⁻⁵ M	102.56±5.90*	13080±596**
	10 ⁻⁴ M	141.72±2.49**	12413±227*
	10 ⁻³ M	113.48±4.97**	5891±545**
2-pyridylethylamine	10 ⁻⁶ M	73.59±9.29	12213±550
	10 ⁻⁵ M	114.33±5.05**	12958±293*
	10 ⁻⁴ M	135.19±2.51**	12387±128
	10 ⁻³ M	70.19±3.42	4625±321*
Dimaprit	10 ⁻⁶ M	56.58±3.39	11305±218
	10 ⁻⁵ M	48.35±4.34	9825±222
	10 ⁻⁴ M	26.51±0.78**	8310±519*
	10 ⁻⁴ M	12.21±3.97**	4664±521**

Results are expressed as mean of triplicate.

* : p<0.05 ** : p<0.01, significantly different from control.

る IL-6 濃度は 2 時間後より検出され、24 時間後に最高値となり、72 時間後までほぼ一定であった (Fig. 1)。Histamine 10⁻⁴ M 添加時も同様に、2 時間後より IL-6 は検出されるが、72 時間を過ぎても IL-6 産生量の増加が認められ、histamine による産生刺激は長時間維持されていた。

同様に mitogen 刺激なしでも、血管内皮細胞における ³H-thymidine の取り込みは認められ、24 時間後に最高値となり 72 時間後までほぼ

一定であった (Fig. 2)。Histamine 10⁻⁴ M 添加時も同様に、24 時間後に最高値となり、72 時間後までほぼ一定であった。

以上の結果より、以下の実験は培養 24 時間後の IL-6 産生および ³H-thymidine の取り込みにて検討した。Histamine 添加 24 時間後の IL-6 産生は 10⁻⁶ M から 10⁻⁴ M までは濃度依存性に増加したが、10⁻³ M ではその増加効果は減少した (Table 1)。細胞増殖能においては、10⁻⁶ M から 10⁻⁵ M までは濃度依存性に ³H-

Table 2 IL-6 production in culture supernatants from synovial fibroblastic cells and ³H-thymidine uptake by synovial fibroblastic cells obtained from patients with RA and OA

	IL-6 (pg/ml)		³ H-thymidine uptake(cpm)	
	RA	OA	RA	OA
4th passage	60.25±3.56	59.26±6.21	12437±451	11968±523
5th passage	59.39±2.38	58.32±4.36	12387±392	12316±406
6th passage	62.35±1.98	60.28±2.65	12427±538	12012±288
7th passage	58.86±2.14	57.19±5.07	12399±612	12160±507
8th passage	60.05±1.84	59.32±2.53	12376±412	11865±381

Table 3 Effects of histamine and histaminergic agonists on IL-6 production in culture supernatants from synovial fibroblastic cells obtained from patients with RA and ³H-thymidine uptake by synovial fibroblastic cells with RA

		IL-6(pg/ml)	³ H-thymidine uptake(cpm)
Control		62.31 ± 3.52	12536 ± 425
Histamine	10 ⁻⁶ M	64.96 ± 5.62	13521 ± 511
	10 ⁻⁵ M	119.18 ± 6.08*	15260 ± 439*
	10 ⁻⁴ M	159.72 ± 3.67**	13981 ± 361
	10 ⁻³ M	98.25 ± 6.28**	6248 ± 483**
2-pyridylethylamine	10 ⁻⁶ M	68.46 ± 5.07	13058 ± 821
	10 ⁻⁵ M	124.28 ± 2.98**	14025 ± 267*
	10 ⁻⁴ M	138.29 ± 3.46**	13425 ± 251
	10 ⁻³ M	66.15 ± 8.27	5016 ± 284**
Dimaprit	10 ⁻⁶ M	58.47 ± 4.26	11264 ± 614
	10 ⁻⁵ M	44.31 ± 2.69*	8201 ± 219*
	10 ⁻⁴ M	29.55 ± 1.58**	6018 ± 428**
	10 ⁻³ M	13.58 ± 4.29**	3518 ± 308**

Results are expressed as mean of triplicate.

*: p<0.05 **: p<0.01, significantly different from control.

thymidine の取り込み量は増加したが、10⁻⁴ M ではその増加は有意であるものの減少し、10⁻³ M ではコントロールに比し減少した。

次に、2-pyridylethylamine 添加では、histamine と同様に 10⁻⁴ M までは濃度依存性に IL-6 産生は増加し、³H-thymidine の取り込み量も 10⁻⁵ M までは濃度依存性に増加した。一方、dimaprit 添加時では、10⁻⁶ M から 10⁻³ M に至るまで濃度依存性に IL-6 産生および ³H-thymidine の取り込みに対し抑制効果を示した。

1.2. 滑膜線維芽細胞

滑膜細胞は mitogen 刺激なしでも IL-6 を

産生し、RA および OA の間に、またそれぞれの第 4 継代から第 8 継代にいたるまでの各継代間に、IL-6 産生および ³H-thymidine の取り込みに有意差は認められなかった (Table 2)。

RA 滑膜細胞における IL-6 産生は、histamine 添加により 10⁻⁶ M から 10⁻⁴ M までは濃度依存性に増加し、10⁻³ M ではその増加は減少した (Table 3)。細胞増殖能においても、10⁻⁶ M から 10⁻⁵ M までは濃度依存性に ³H-thymidine の取り込み量の増加が認められたが、10⁻⁴ M ではその増加効果は減少し、10⁻³ M では、コントロールに比し減少していた。

Table 4 Effects of histamine and histaminergic agonists on IL-6 production in culture supernatants from synovial fibroblastic cells obtained from patients with OA and ³H-thymidine uptake by synovial fibroblastic cells with OA

		IL-6(pg/ml)	³ H-thymidine uptake(cpm)
Control		60.51±4.09	11935±513
Histamine	10 ⁻⁶ M	65.21±3.98	12539±622
	10 ⁻⁵ M	115.32±7.26*	14957±394*
	10 ⁻⁴ M	152.94±4.05**	13258±421
	10 ⁻³ M	87.26±5.21**	5874±411**
2-pyridylethylamine	10 ⁻⁶ M	63.84±6.02	12458±625
	10 ⁻⁵ M	113.35±6.05*	14153±368*
	10 ⁻⁴ M	142.37±3.55**	13045±169
	10 ⁻³ M	70.14±5.64	4218±229**
Dimaprit	10 ⁻⁶ M	55.21±5.26	10568±715
	10 ⁻⁵ M	40.21±3.61*	7958±304*
	10 ⁻⁴ M	24.58±2.49**	4012±326**
	10 ⁻³ M	16.47±6.02**	2597±416**

Results are expressed as mean of triplicate.

*:p<0.05 ** :p<0.01, significantly different from control.

Table 5 Effects of histamine and histaminergic agonists on IL-6 production in culture supernatants from dermal fibroblastic cells and ³H-thymidine uptake by dermal fibroblastic cells

		IL-6(pg/ml)	³ H-thymidine uptake(cpm)
Control		73.54±5.29	11586±712
Histamine	10 ⁻⁶ M	80.36±6.23	11369±725
	10 ⁻⁵ M	128.26±4.12**	13529±401*
	10 ⁻⁴ M	182.34±6.23**	12237±601
	10 ⁻³ M	101.47±4.97*	6012±385**
2-pyridylethylamine	10 ⁻⁶ M	78.12±5.13	11745±297
	10 ⁻⁵ M	114.37±3.08*	13623±425*
	10 ⁻⁴ M	154.74±4.88**	12151±714
	10 ⁻³ M	86.24±6.75	6128±411**
Dimaprit	10 ⁻⁶ M	82.65±7.15	12149±514
	10 ⁻⁵ M	138.27±5.61**	14257±625*
	10 ⁻⁴ M	186.32±4.19**	12631±845
	10 ⁻³ M	112.36±8.25*	6814±713*

Results are expressed as mean of triplicate.

* : p<0.05 ** : p<0.01, significantly different from control.

次に、2-pyridylethylamine の添加では、histamine と同様に 10⁻⁴ M までは濃度依存性に IL-6 産生増加が認められた。また、³H-thymidine の取り込み量も 10⁻⁵ M までは濃度依存性に増加した。

一方、dimaprit の添加では、逆に濃度依存

性に IL-6 産生および ³H-thymidine の取り込みはともに抑制された。

OA 滑膜細胞における histamine, 2-pyridylethylamine, dimaprit 添加時の IL-6 産生および細胞増殖能は RA 滑膜細胞におけるそれと同じであった (Table 4)。

Table 6. Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on IL-6 production in culture supernatants from endothelial cells (EC), synovial fibroblastic cells (SFC) from patients with RA and OA and dermal fibroblastic cells (DFC)

	EC	SFC (RA)	SFC (OA)	DFC
Normal serum	49.13±3.12	54.12±4.66	52.36±5.91	70.28±5.20
RA serum	72.45±4.86**	74.16±6.97*	73.28±4.58*	88.51±6.11*
RA synovial fluid	142.67±6.87**	171.36±8.31**	178.64±7.47**	204.15±9.27**
OA serum	47.38±5.93	49.77±2.51	51.66±3.14	63.01±5.38
OA synovial fluid	46.01±3.18	47.91±3.03	45.28±2.93	63.17±3.18

Results are expressed as mean of eight samples.

*:p<0.05. **:p<0.01, significantly different from control

Table 7 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on ³H-thymidine uptake by endothelial cells (EC), synovial fibroblastic cells (SFC) from patients with RA and OA and dermal fibroblastic cells (DFC)

	EC	SFC (RA)	SFC (OA)	DFC
Normal serum	10285±383	11825±466	11742±591	11421±613
RA serum	11105±486*	12069±397	12108±386	12064±527
RA synovial fluid	11585±587*	12415±531*	12601±519*	12504±621*
OA serum	10545±593	11453±351	11824±281	11287±318
OA synovial fluid	9956±318	11369±463	11911±416	11175±412

Results are expressed as mean of eight samples.

*:p<0.05, significantly different from control.

1.3. 皮膚線維芽細胞

皮膚線維芽細胞は mitogen 刺激なしでも IL-6 を産生し、ヒスタミンおよび H1, H2 受容体作用薬いずれの添加においても、 10^{-6} M から 10^{-4} M までは濃度依存性に IL-6 産生増加が認められ、 10^{-3} M では増加効果の減少がみられた (Table 5).

細胞増殖能においても、いずれの添加にても 10^{-6} M から 10^{-5} M までは濃度依存性に ³H-thymidine の取り込み量は増加したが、 10^{-4} M ではその増加効果は減少し、 10^{-3} M ではコントロールに比し減少した。

2-pyridylethylamine の効果は滑膜線維芽細胞と同様であったが、dimaprit の効果は滑膜線維芽細胞とは逆に IL-6 産生、細胞増殖能両者に対し促進的に作用した。

2. IL-6 産生能および細胞増殖能に対する各種血清・関節液の影響

血管内皮細胞、RA 及び OA 滑膜線維芽細胞、皮膚線維芽細胞ともに、IL-6 産生は健康人血清に比し RA 血清を添加する事により有意に増加し、RA 関節液添加ではより強い産生増加を示した (Table 6)。一方、OA の血清、関節液は有意の作用を示さなかった。

細胞増殖能については、RA 血清添加では血管内皮細胞で有意の ³H-thymidine の取り込み量の増加を示し、滑膜線維芽細胞、皮膚線維芽細胞では有意ではないもののやはり ³H-thymidine の取り込み量の増加傾向がみられた (Table 7)。さらに、RA 関節液添加では全ての細胞で ³H-thymidine の取り込み量は有意に増加した。また、IL-6 産生と同様に OA の血

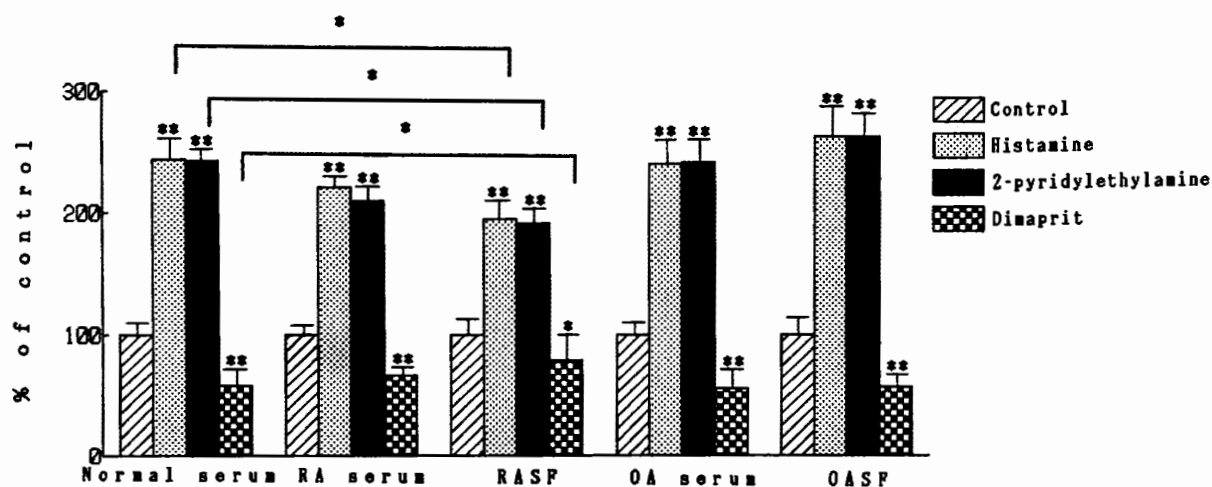


Fig. 3 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on IL-6 production in culture supernatants from endothelial cells stimulated with histamine(10^{-4} M), 2-pyridylethylamine(10^{-4} M) or dimaprit(10^{-4} M).

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, significantly different from control

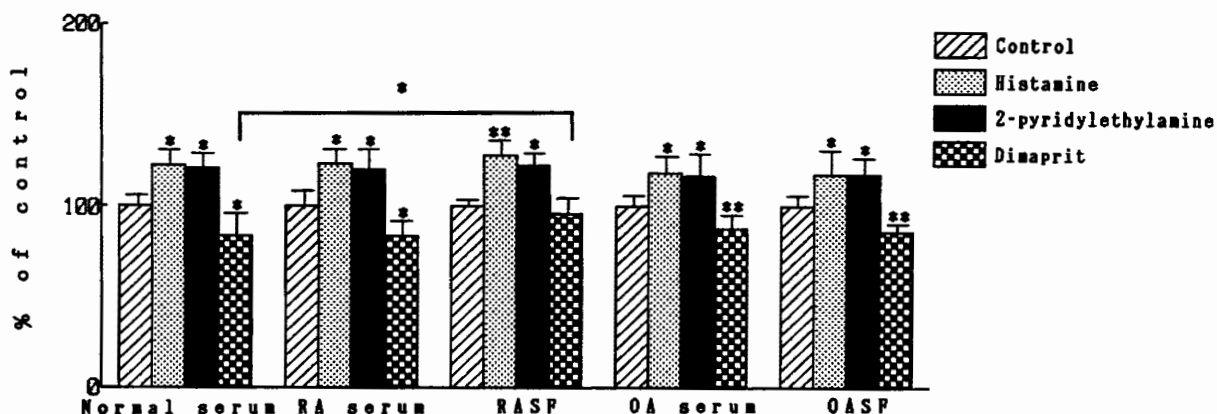


Fig. 4 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on ^3H -thymidine uptake by endothelial cells stimulated with histamine(10^{-4} M), 2-pyridylethylamine(10^{-4} M) or dimaprit(10^{-4} M). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, significantly different from control

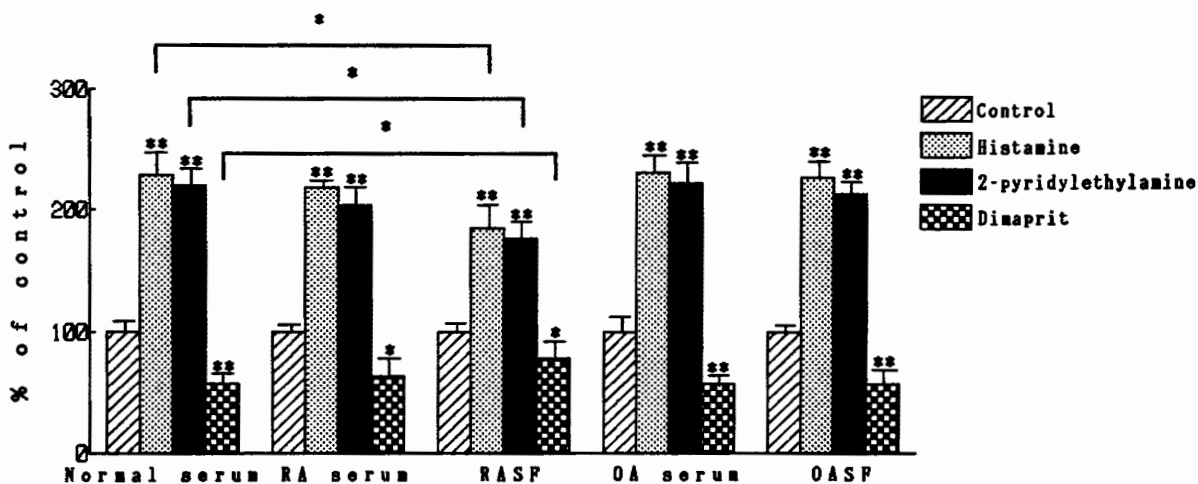


Fig. 5 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on IL-6 production in culture supernatants from synovial fibroblastic cells from patients with RA stimulated with histamine(10^{-4} M), 2-pyridylethylamine(10^{-4} M) or dimaprit(10^{-4} M).

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, significantly different from control

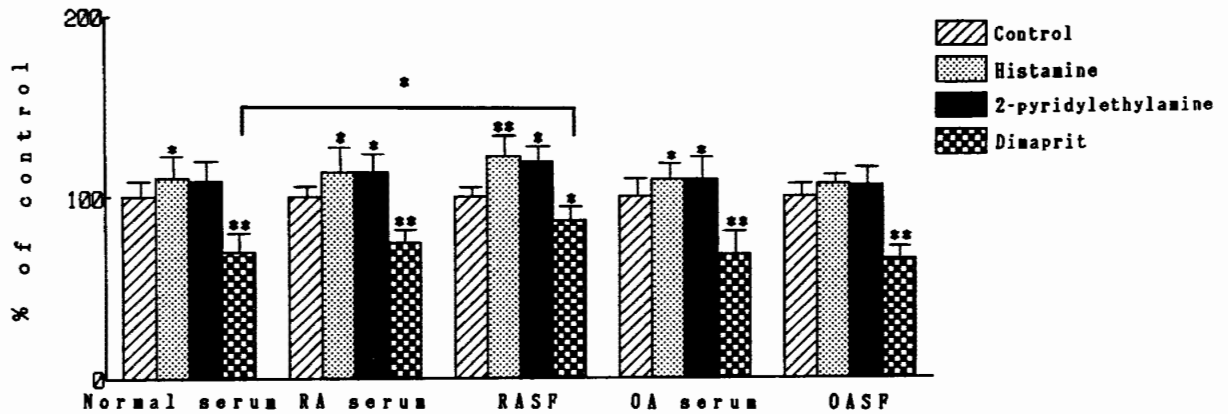


Fig. 6 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on ³H-thymidine uptake by synovial fibroblastic cells from patients with RA stimulated with histamine(10⁻⁴M), 2-pyridylethylamine(10⁻⁴M) or dimaprit(10⁻⁴M).
*p<0.05 **p<0.01, significantly different from control

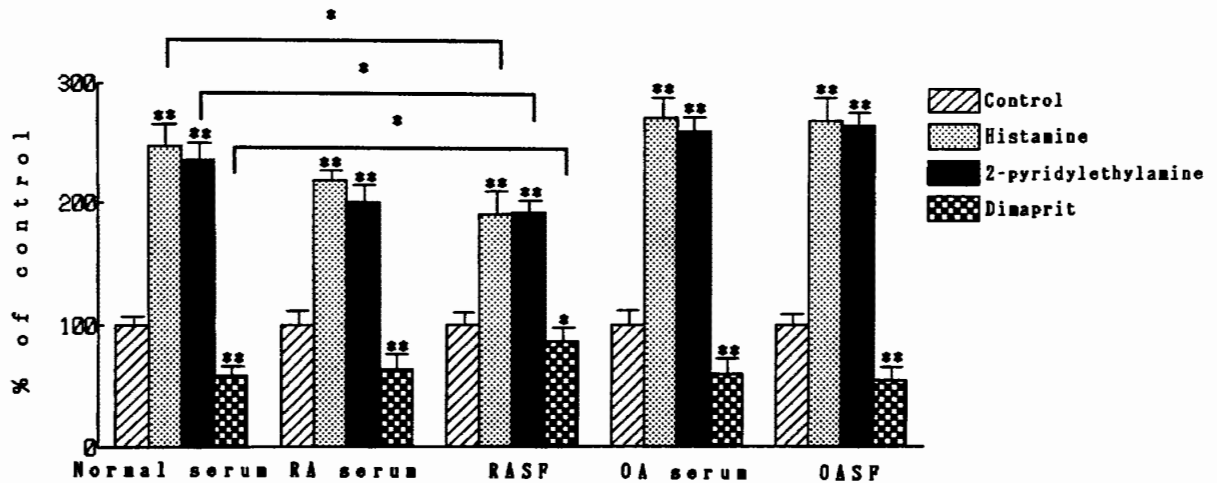


Fig. 7 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on IL-6 production in culture supernatants from synovial fibroblastic cells from patients with OA stimulated with histamine(10⁻⁴M), 2-pyridylethylamine(10⁻⁴M) or dimaprit(10⁻⁴M).
*p<0.05 **p<0.01, significantly different from control

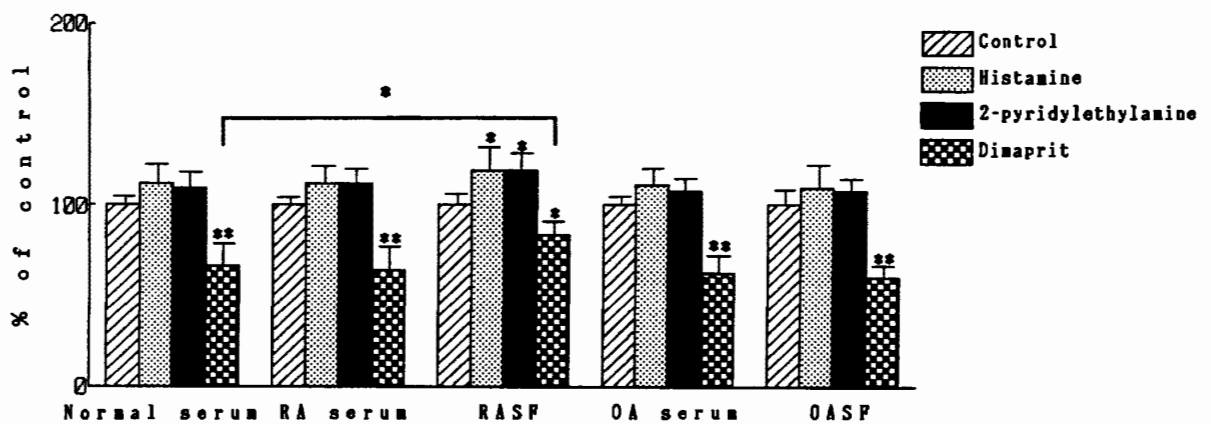


Fig. 8 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on ³H-thymidine uptake by synovial fibroblastic cells from patients with OA stimulated with histamine(10⁻⁴M), 2-pyridylethylamine(10⁻⁴M) or dimaprit(10⁻⁴M).
*p<0.05 **p<0.01, significantly different from control

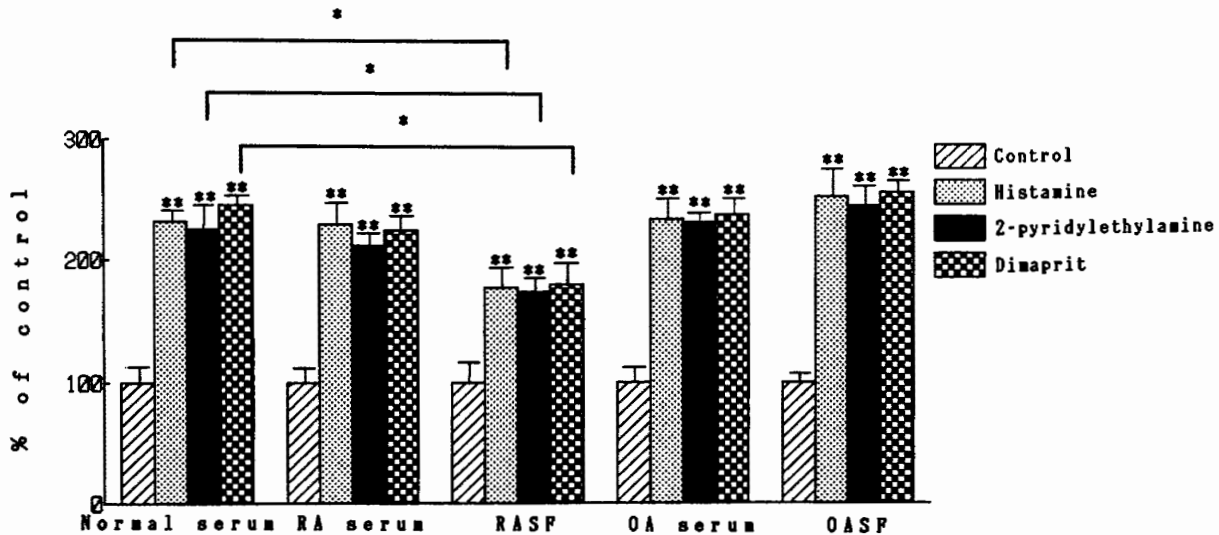


Fig. 9 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on IL-6 production in culture supernatants from dermal fibroblastic cells stimulated with histamine(10^{-4} M), 2-pyridylethylamine(10^{-4} M) or dimaprit(10^{-4} M). ** $p < 0.01$, significantly different from control

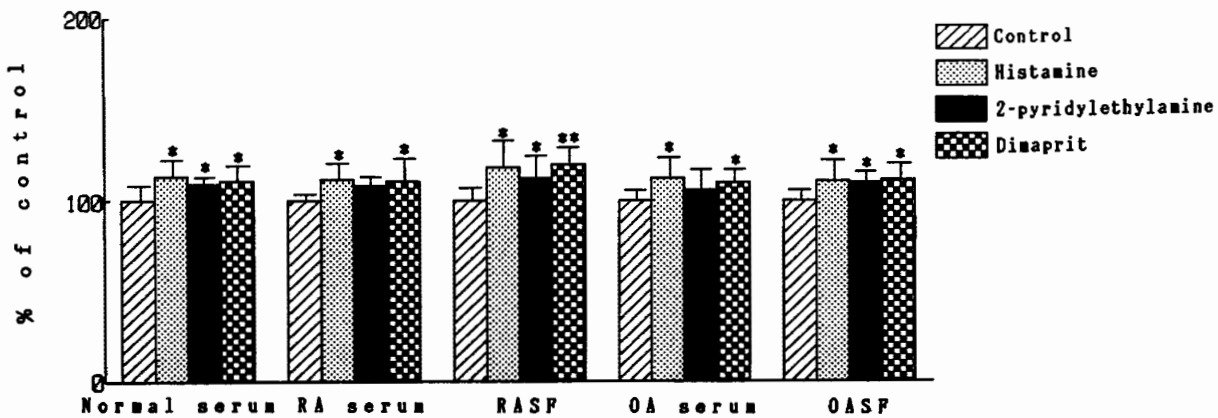


Fig. 10 Effects of serum or synovial fluid obtained from RA and OA on ^3H -thymidine uptake by dermal fibroblastic cells stimulated with histamine(10^{-4} M), 2-pyridylethylamine (10^{-4} M) or dimaprit(10^{-4} M). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, significantly different from control

清, 関節液は有意の作用を示さなかった。

3. ヒスタミン受容体作用薬の効果に対する各種血清・関節液の影響

3.1. 血管内皮細胞

IL-6 産生に対する histamine および 2-pyridylethylamine による IL-6 産生増加効果に対し, RA 関節液添加により有意に抑制された (Fig. 3). 同様に, dimaprit による IL-6 産生抑制効果に対しても, RA 関節液添加により有意に効果の減少がみられたが, RA 血清, OA 血清, OA 関節液添加では明らかな変化は認められなかった。

細胞増殖能については, dimaprit による増殖抑制作用が RA 関節液添加による有意に減少した (Fig. 4). しかし, RA 血清, OA 血清, OA 関節液の添加による作用は認められなかった。

3.2. 滑膜線維芽細胞

RA 滑膜線維芽細胞 (Fig. 5, 6) および OA 滑膜線維芽細胞 (Fig. 7, 8) では, IL-6 産生に対する histamine および 2-pyridylethylamine の産生増加効果は RA 関節液の添加により抑制された。また, dimaprit による産生抑制効果は RA 関節液の添加により減少した。

細胞増殖能についても, dimaprit による増殖抑制効果が RA 関節液添加により減少した。さらに, IL-6 産生, 細胞増殖ともに RA 血清, OA 血清, OA 関節液の添加でははっきりした作用を認めず, また, RA, OA 滑膜線維芽細胞間で結果に差を認めなかった。

3.3. 皮膚線維芽細胞

IL-6 産生に対するヒスタミンおよび H₁, H₂ 受容体作用薬による産生増加効果は RA 関節液添加により抑制された (Fig. 9)。しかし, RA 血清, OA 血清, OA 関節液の添加では明らかな変化は認められなかった。細胞増殖能に対しては, 各血清, 関節液ともに明らかな作用を示さなかった (Fig. 10)。

考 察

血管内皮細胞の機能は極めて多彩であり, 炎症巣における血管新生も二面性をもつ¹⁷。すなわち, 炎症巣への酸素供給, 炎症細胞動員により治癒機転を促進させる方向で働く場合と, RA をはじめとする原因不明の慢性炎症性疾患や肉芽腫性疾患の時のように, 持続性にマクロファージやリンパ球を局所へ動員させ炎症を遷延化させる場合である。特に, 関節滑膜における血管内皮細胞は有窓性であり, 関節液成分などの物質交換に関与している。慢性, 持続性の炎症である RA において, 小血管内皮細胞の透過性は著しく亢進し, しばしば関節液貯留をきたす。さらに, RA 関節液中の好中球, RA 滑膜内にみられる肥満細胞が産生するケミカルメディエーターの血管透過性を増加する。また, 血管内皮細胞は炎症反応に際し細胞接着分子とも深く関わっている¹⁸。細胞浸潤は血液中の炎症細胞やリンパ球が血管内皮細胞に結合することにより, 血管内皮細胞や炎症細胞やリンパ球の細胞膜に発現する細胞接着分子が重要な役割を果たす。血管内皮細胞に発現する代表的な細胞接着分子には, endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), や intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

が報告されている。この他, 血管内皮細胞の炎症および免疫反応に関わる機能として, 種々のサイトカインの産生などがあげられる。

これまで, 当教室において実験的関節炎のモデルとしてのコラーゲン関節炎マウス (CIA) や RA 患者のリンパ球, 骨髄細胞においてヒスタミン H₂ 受容体作用薬の刺激による cAMP 産生増加効果が正常マウスや健常者に比べて減少していること^{4,6}, 正常および CIA マウス脾リンパ球の IgG 産生に対し, H₂ 受容体は主に産生抑制に作用するが, CIA マウス脾リンパ球ではこの作用が減少していること⁷ を報告してきた。これらから, CIA マウスや RA ではヒスタミン H₂ 受容体機能の低下が存在し, 関節炎の慢性化に関与している可能性が示唆された。

一方, 血管内皮細胞におけるヒスタミン受容体については, H₁ 受容体の存在が報告されている¹⁹ が, H₂ 受容体の存在や各受容体の作用については明らかにされておらず, 今回の検討を行った血管内皮細胞からは恒常的に IL-6 産生がなされており²⁰, 今回の研究においてこの IL-6 産生は H₁ 受容体刺激により亢進し, H₂ 受容体刺激により抑制されることが明らかとなった。さらに, 細胞増殖に対しても H₁ 受容体刺激により促進に働き, H₂ 受容体刺激により抑制に働くことも明かとなった。ただし, 10⁻³ M の H₁ 受容体作用薬添加では IL-6 産生, 細胞増殖ともに抑制されていた。これは高濃度の薬剤による細胞障害によるものと考えられた。

滑膜線維芽細胞におけるヒスタミン受容体については, H₁ 受容体の存在が明らかにされていた²¹ が, 当教室の永田の研究により滑膜線維芽細胞には H₁, H₂ 受容体両者が存在し, ともにヒアルロン酸産生に関与していることがわかった²²。一方, 滑膜線維芽細胞からも IL-6 産生がなされており²³, 今回の研究においてこの IL-6 産生には H₁ 受容体刺激により亢進し, H₂ 受容体刺激により抑制されることが明らかとなった。さらに, RA 滑膜線維芽細胞と OA 滑膜線維芽細胞では IL-6 産生量に差はな

かったが、他の報告²⁴でも同様の結果が示されている。細胞増殖に対しても、IL-6産生と同様にH1受容体刺激にて促進し、H2受容体刺激にて抑制が認められた。

皮膚線維芽細胞については、H1、H2受容体刺激ともにIL-6産生、細胞増殖に対して促進に作用していた。この作用は滑膜線維芽細胞に対する作用と異なっており、同じ線維芽細胞でも部位によりヒスタミン受容体の作用が異なることが示唆された。

以上から、RAの関節炎局所の病態に深く関与している血管内皮細胞、滑膜線維芽細胞のIL-6産生、細胞増殖はともにH1受容体刺激により促進的に、H2受容体制刺激により抑制的に作用することが明らかとなり、関節炎に対してヒスタミンはH1受容体を介して促進的に、H2受容体を介して抑制的に働く可能性が示された。また、IL-6は滑膜細胞の増殖や血管新生を誘導する作用はないとされており⁸、今回の血管内皮細胞や滑膜細胞の増殖能の亢進はH1受容体刺激の直接的な作用と考えられた。

各種血清、関節液添加の結果から、全ての細胞でRA関節液の添加によりIL-6産生、細胞増殖ともに亢進したことから、RA関節液中に存在する何らかの因子によりこれらの反応が直接活性化されることが示唆された。

さらに、ヒスタミン受容体の作用に対する効果をみると、血管内皮細胞と滑膜線維芽細胞ではやはりRAの関節液を添加することにより、H1受容体刺激によるIL-6産生増加は抑制され、H2受容体刺激によるIL-6産生抑制および細胞増殖抑制効果は減少した。皮膚線維芽細胞では、同様にRA関節液添加によりH1、H2受容体刺激によるIL-6産生増加は抑制された。これらのことから、RA関節液の添加によりいずれの細胞においてもヒスタミンH1、H2受容体の作用が抑制されたことになり、RA関節液中には何らかのヒスタミン受容体作用に拮抗する因子が存在することが示唆された。

このように、RA関節液の添加により血管内皮細胞、滑膜線維芽細胞のIL-6産生に対するヒスタミン受容体機能はH1、H2受容体ともに抑制されるが、細胞増殖能に対してはH2受容体機能のみを抑制した。一方、RA関節液は直接作用としてIL-6産生、細胞増殖ともに著明に亢進させる作用があり、全体としてはRA関節液中の因子により関節炎の慢性化が引き起こされているものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御検閲を賜りました恩師田中清介教授に深甚謝辞を捧げます。また、本研究を遂行するにあたり御指導、御助言を賜りました宗円聡講師に心から感謝致します。

本論文の要旨は第36回日本リウマチ学会（平成4年5月、東京）、第13回日本炎症学会（平成4年6月、京都）、第32回近畿大学医学会学術講演会（平成4年7月、大阪）、第7回日本整形外科学会基礎学術集会（平成4年10月、東京）において発表した。

文 献

1. Frewin DB, Cleland LG, Jonsson JR, Robertson PW. Histamine levels in human synovial fluid. *J Rheumatol* 1986; 13: 13-14.
2. Ash ASF, Schild HO. Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol* 1966; 27: 427-439.
3. Osband ME, Cohen EB, Miller BR, et al. Biochemical analysis of specific H₁ and H₂ receptors on lymphocytes. *Blood* 1981; 58: 87-90.
4. 山根敏彦. コラーゲン関節炎マウスにおけるヒスタミン受容体保有リンパ球の免疫統御機構. *近大医誌* 1990; 15: 119-129.
5. 神谷正人. 骨髄移植とコラーゲン関節炎マウスにおける抑制効果. *近大医誌* 1991; 16: 75-88.
6. 丹 彰浩. コラーゲン関節炎マウスおよび慢性関節リウマチ患者の骨髄細胞におけるヒスタミン H₂受容体機能. *近大医誌* 1991; 16: 563-571.
7. 藤原茂樹. ヒスタミン受容体作用薬のマウスリンパ球抗体産生及びコラーゲン関節炎に対する影響. *近大医誌* 1991; 16: 573-580.
8. 宮坂信之. 慢性関節リウマチとサイトカイン. *臨床科学* 1991; 27: 1083-1089.
9. William PA, Jean MD. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid

- arthritis. *Arthritis Rheum* 1990 ; 33 : 305-315.
10. Houssiau FA, Devogelaer JP, Damme JV, Deuchaisnes, Snick JV. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988 ; 31 : 784-788.
 11. Hirano T, Matsuda T, Turner M, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1988 ; 18 : 1797-1801.
 12. Muraguchi A, Hirano T, Tang B, et al. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988 ; 167 : 332-344.
 13. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 1990 ; 144 : 4226-4230.
 14. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988 ; 31 : 315-324.
 15. Dayer JM, Goldring SR, Robinson DR, Krane SM. Cell-cell interactions and collagenase production. Wiley, Chichester 1980 : 83-104.
 16. Matsubara T, Hirohata K. Suppression of human fibroblast proliferation by D-penicillamine and copper sulfate in vitro. *Arthritis Rheum* 1988 ; 31 : 964-971.
 17. 佐藤和人. 慢性炎症における血管内皮細胞. *臨床免疫* 1991 ; 23 : 58-65.
 18. 松原 司, 廣畑和志. 炎症における血管新生の調節. *臨床免疫* 1991 ; 23 : 46-57.
 19. 秀 道広. 血管内皮細胞のヒスタミン受容体. *西日皮膚* 1989 ; 51 : 574-575.
 20. Sironi M, Breviario F, Proserpio P, et al. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989 ; 142 : 549-553.
 21. Taylor DJ, Wooley DE. Histamine H₁ receptors on adherent rheumatoid synovial cells in culture: demonstration by radioligand binding and inhibition of histamine-stimulated prostaglandin E production by histamine H₁ antagonists. *Ann Rheum* 1987 ; 46 : 425-430.
 22. 永田行男. ヒト培養滑膜細胞におけるヒスタミンの役割. *近大医誌* 1991 ; 16 : 117-126.
 23. Miyasaka N, Sato K, Hashimoto J, et al. Constitutive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 from inflammatory synovium. *Clin Immunol Immunopathol* 1989 ; 52 : 238-247.
 24. Guerne PA, Zuraw BR, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. *J Clin Invest* 1989 ; 83 : 585-592.