

ヒト白血球からのヒスタミン遊離過程に おける Protein Kinase の意義

群馬大学医学部第一内科学教室

黒沢元博 根本俊和

田中哲治 笛木隆三 小林節雄

岐阜薬科大学薬理学教室

永井博弐 江田昭英

Key words: anti-IgE — histamine release — human leukocyte — protein kinase

(受付: 3月27日, 1981)

緒言

即時型アレルギー反応によるヒスタミン遊離過程については不明な点が多いが, cyclic nucleotides による modulation をうける¹⁾⁻³⁾ことは周知のことである. すなわち, β -adrenergic stimulating agent は target cell である basophil あるいは mast cell の細胞表面の adenylate cyclase を活性化し, 細胞内の cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) 量を増加し, その結果ヒスタミン遊離を抑制するといわれているが, cAMP がいかなる機序によりヒスタミン遊離を抑制するかは明らかではない.

cAMP は広範な作用を有し, 多種多様な生物反応を媒介することが知られているが, 1968年 Krebs ら⁴⁾は骨格筋の phosphorylase 系に cAMP によって活性化される protein kinase (PKase) が存在することを報告した. 以来, 本酵素が広く生物界に存在することが証明され, その作用としては細胞内に present された酵素や蛋白質のリン酸化を行うことにより, 細胞機能の調節に関与することが明らかにされつつある.

アレルギー関係ではアトピー性皮膚炎における Mier ら⁵⁾, Kumar ら⁶⁾の報告がみられ, また最近では Holgate

ら⁷⁾の rat serosal mast cell を用いた検討がみられる. われわれ⁸⁾も先に, rat peritoneal mast cell 中には cAMP dependent PKase が存在し, 即時型アレルギー反応によるヒスタミン遊離過程には PKase が関与し, ヒスタミンが遊離する際に活性が減少し, また抗原抗体反応後の mast cell の修復過程にも関与することを報告した.

本研究ではヒト白血球を用いて, ヒト白血球中の PKase の存在の有無を検討し, あわせて anti-IgE によるヒスタミン遊離過程における PKase の意義について検討した.

対象

血清総 IgE が 800-2150 IU/ml と高値を示し, 気管支喘息重症度委員会の判定基準で軽症の気管支喘息12例(男6例, 女6例, 年齢9-48才)で, 検査前3週間にわたり症状の無い者を対象とした.

方法

1. 採血

検査2日前より全ての薬剤の投与を中止し, 採血は早朝空腹時に行った.

2. 白血球浮遊液の作製 (Fig. 1)

先にわれわれの報告した方法⁹⁾に従った. すなわち 6% dextran を用い, 0.83% NH_4Cl で処理することによ

Abbreviations: ATP adenosine triphosphate; Bis(MSB) p-bis(o-methyl styryl)benzene; cAMP cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; DSCG disodium cromogylcate; EDTA ethylenediamine tetraacetic acid; N-5' N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid; PKase protein kinase; PPO 2,5-diphenyloxazole; TCA trichloroacetic acid

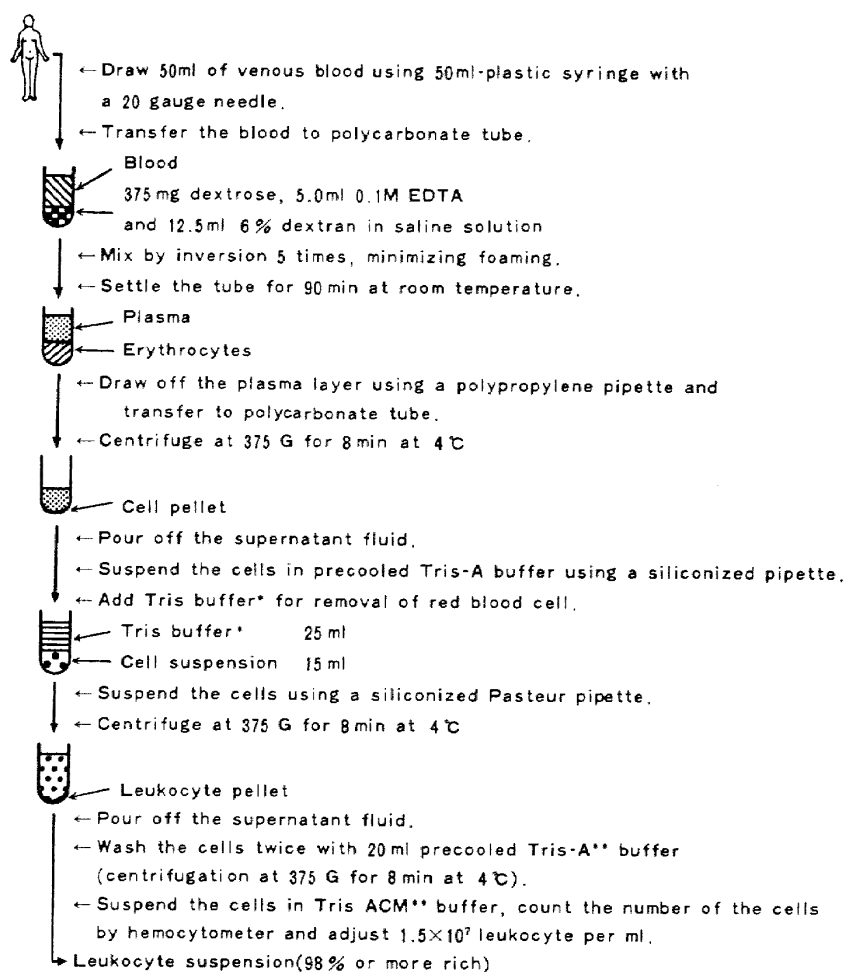


Fig. 1. Schematic diagram of method for human leukocyte preparation.

* : 0.017M Tris-HCl buffer, pH 7.65, containing 0.75% NH_4Cl . ** : 0.3% human serum albumin.

り赤血球をほぼ完全に除去し、 1.5×10^7 個/ml の白血球浮遊液を得た。

3. 反応系

2×10^6 個の白血球を 37°C で5分間 preincubation した後、所定濃度の anti-IgE を45分間作用させた。また、0.83% NH_4Cl 処理後の白血球を2回洗浄した後に、5単位 heparin を含む0.02M・ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) および2倍希釈の患者血清と60分間 incubation し、2回洗浄した後に同様に諸濃度の anti-IgE を作用させた。薬剤の影響をみる際は、anti-IgE を作用させる30秒前に添加した。

4. ヒスタミン遊離量の測定

ヒスタミン量は May ら¹⁰⁾の方法に準拠して、蛍光光度計(日立203型)を用いて測定した。なお、標準液は 4°C で保存した 10^{-2}g/ml ヒスタミン(塩基として)原液を用時希釈して用いた。総ヒスタミン量は cell suspension に、最終濃度が2%となるように HClO_4 を加え、

室温で約1時間放置後、1000 G、10分間遠心して得られた上清を用いて測定した。anti-IgE によるヒスタミン遊離量は次式により求めた。

ヒスタミン遊離率 (%) =

$$\frac{\text{anti-IgE によるヒスタミン遊離量} - \text{blank 量}}{\text{総ヒスタミン量} - \text{blank 量}} \times 100$$

5. crude enzyme (PKase) の作製

Corbin ら¹¹⁾の方法に準じた。すなわち、 1.5×10^7 個/ml の cell suspension 1ml に等量の buffer solution (10 mM・potassium phosphate, 10mM・EDTA・2Na, 0.5 mM・theophylline および0.5M・NaCl, pH 6.5) を加えて2回洗浄後0.5ml に再浮遊し、アセトン・ドライアイスで瞬間凍結を行い、 -80°C で保存した。後日測定日に 37°C で融解し、測定に供した。なお、予備実験の結果より、1検体あたりの酵素活性が比較的良かったため、別個の同一条件下の2検体を1つにプールして実験を行

った。4°C, 180 Gで10分間遠心し, 上清0.5ml を除去した後 homogenize し, 4°Cで50000 G, 5分間遠心して得られた上清を酵素液とした。

6. PKase 活性の測定

PKase 活性は, γ - ^{32} P-ATP の ^{32} P を酵素反応により histone に結合させ, これを millipore filter 上に trap させて計測する Tsung ら¹²⁾の方法に従った。すなわち, 400mM・NaF 5 μ l および histone 基質溶液 (19mM・potassium phosphate, 20mM・magnesium acetate, 3.3 mM・theophylline, 3.3×10^{-6} M・cAMP および1.1% histone を含む) と3.3mM・ γ - ^{32} P-ATP (specific activity 30cpm/pmol ATP) の9対1の混液 (用時調製) 50 μ l をとり, これに酵素液20 μ l を加えて30°Cで20分間 incubation した。50% trichloroacetic acid (TCA) 2mlを加えて反応を停止し, 沈殿物を millipore filter (MF-Millipore, 80 μ m) 上に吸引濾取した。さらに, 反応試験管を5% TCA 5回洗浄し, 洗浄液を同様に吸引濾取した。millipore filter を vial 瓶に入れ, 液体シンチレーター12mlを加えて液体シンチレーションカウンター (Aloka L.S.C.—651) を用いて放射活性を計測した。なお, 液体シンチレーターは液体シンチレーション用2.5-diphenyloxazole (PPO) 11.76g および液体シンチレーション用 P-bis (o-methyl styryl) benzene [Bis (MSB)] 0.24g をトルエン 2l および Triton X-100 1l の混液に溶かしたものであり, 冷暗所に保存した。PKase 活性は1分間あたりの ^{32} P の count 数 (cpm) により示した。

成績

まずヒト白血球中の PKase 活性を測定した。その結果 Fig. 2 に示すごとく, ヒト白血球中には明らかな PKase 活性を認めたが, cAMP を添加して測定しても活性の有意な増加はみられなかった。

つぎに, 10^{-1} - 10^{-3} μ gAb/ml の種々の濃度の anti-IgE を作用させ, ヒスタミン遊離量を測定すると, Fig. 3 の破線のごとく anti-IgE により明らかなヒスタミンの遊離が認められたが, 遊離量は anti-IgE の濃度に依存し, 5×10^{-2} μ gAb/mlの際に総ヒスタミン量の 31.1 ± 5.9 (M $\pm$ SE) %の最大のヒスタミンが遊離した。また, EDTA, heparin および患者血清と incubation した後に anti-IgE を作用させると Fig. 3 の実線のごとくヒスタミン遊離量は増加し, EDTA, heparin および患者血清の処理を施

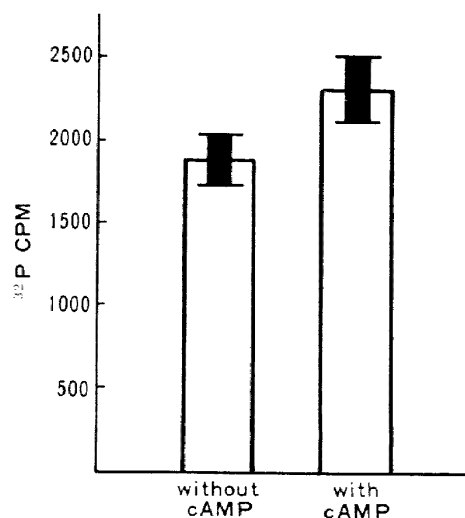


Fig. 2. Protein kinase activity of peripheral blood leukocytes of asthmatic patients. Enzyme reaction was carried out at 30°C for 20min. Each column represents the mean $\pm$ SE of 4 experiments.

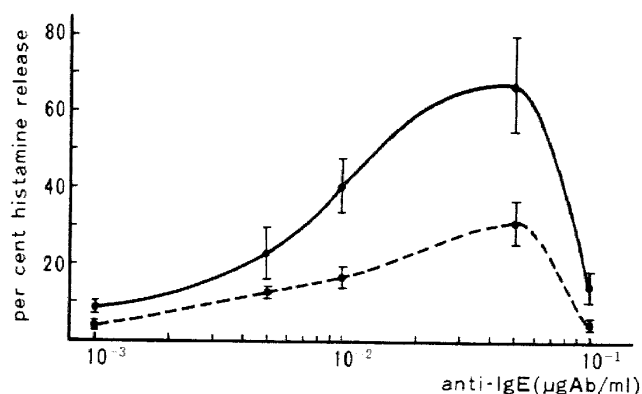


Fig. 3. Enhanced anti-IgE induced histamine release from leukocytes of asthmatic patients incubated with EDTA-heparin solution and reagenic serum from the patients.

—○: Leukocytes were incubated for 1 hour with 0.02M EDTA containing 5 unit heparin solution and two-fold dilution of reagenic serum. The cells were then washed twice and the amount of histamine at 45min after challenge with different concentration of anti-IgE was determined. ---○: Leukocytes not treated. Each point represents the mean of 4 experiments and vertical bars indicate standard error.

行しない際と同様に, anti-IgE の濃度が 5×10^{-2} μ gAb/mlの際に総ヒスタミン量の 67.2 ± 12.3 %の最大の遊離が認められた。ヒスタミン遊離に伴う PKase 活性の変動は Fig. 4 のごとくである。すなわち, EDTA, heparin および患者血清無処理白血球および処理白血球のいずれの

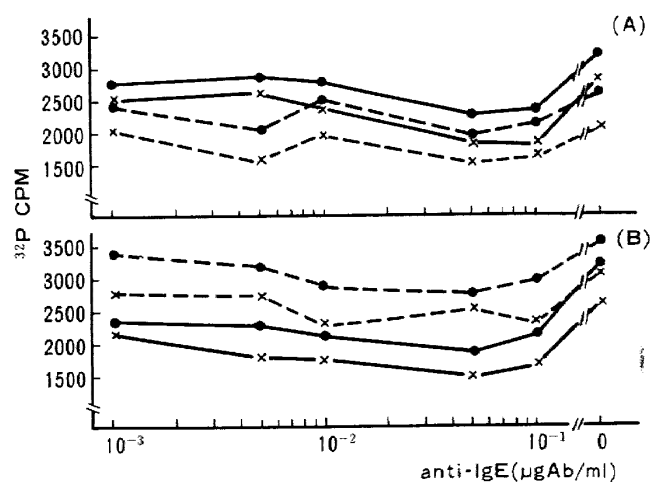


Fig. 4. Changes of protein kinase activity in peripheral blood leukocytes of asthmatic patients at 45min after challenge with different concentration of anti-IgE. Enzyme solution was obtained by a mixture of 2 individual samples. (A) : Leukocytes not treated with EDTA, heparin and reaginic serum. (B) : Leukocytes treated with EDTA, heparin and reaginic serum from the patients. × : without cAMP. ● : with cAMP. Dotted line and solid line indicate individual samples.

場合においても、測定時の cAMP 添加の有無にかかわらず、Fig. 4 の実線および破線のいずれにおいても、anti-IgE を作用させた際の PKase 活性は減少の傾向を示した。しかし、anti-IgE の濃度による有意差は認められなかった。

つぎに最大のヒスタミン遊離が認められた $5 \times 10^{-2} \mu\text{g Ab/ml}$ の anti-IgE によるヒスタミン遊離に対する $10^{-4} \text{M} \cdot \text{N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5')}$, $10^{-4} \text{M} \cdot \text{disodium cromoglycate (DSCG)}$, $10^{-6} \text{M} \cdot \text{isoproterenol}$ および $10^{-3} \text{M} \cdot \text{theophylline}$ の影響について検討した。Fig. 5 に示すごとく、control のヒスタミン遊離量 $27.9 \pm 1.9\%$ に対し、各薬剤作用時はそれぞれ 20.9 ± 1.3 , 24.6 ± 1.6 , 15.7 ± 1.4 および $9.0 \pm 1.8\%$ で、DSCG を除く全ての薬剤によりヒスタミン遊離は有意に抑制された。その際の PKase 活性の変動は Fig. 6 のごとくである。Fig. の上段および下段のいずれの場合においても、測定時の cAMP 添加の有無にかかわらず、anti-IgE を作用させた control 群の活性は anti-IgE を作用させない normal 群の活性より減少し、薬剤を作用させるといずれによっても活性は control 群に比して増加した。

EDTA, heparin および患者血清と incubation した後

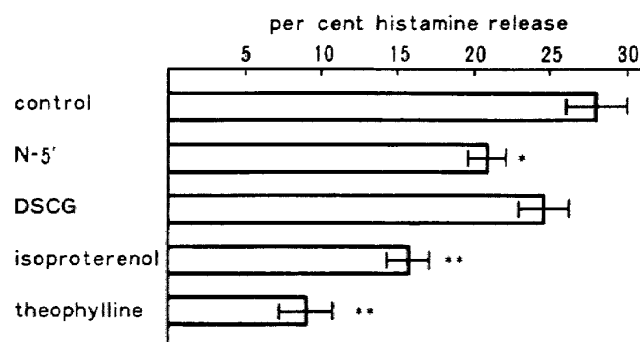


Fig. 5. Effect of N-5', DSCG, isoproterenol and theophylline on anti-IgE-induced histamine release from leukocytes of asthmatic patients at 45min after challenge with anti-IgE ($5 \times 10^{-2} \mu\text{gAb/ml}$). Drugs were treated 30sec prior to challenge. Each column represents the mean $\pm$ SE of 4 experiments. Each value with drug was tested the statistical significance from control at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

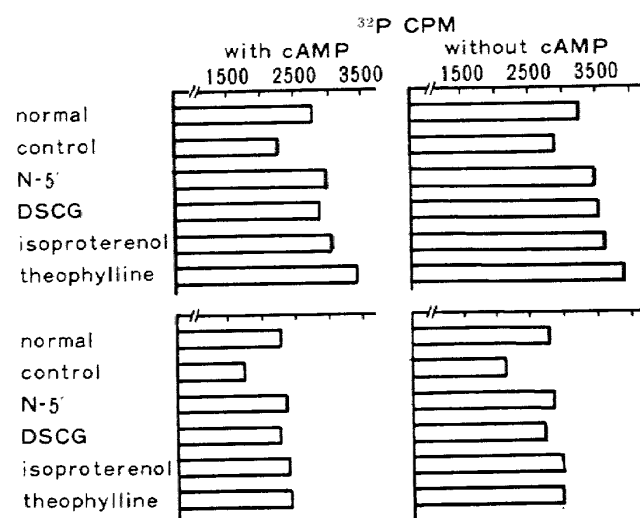


Fig. 6. Effect of N-5', DSCG, isoproterenol and theophylline on anti-IgE-induced changes of protein kinase activity in peripheral blood leukocytes of asthmatic patients at 45min after challenge. Enzyme solution was obtained by a mixture of 2 individual samples.

の $5 \times 10^{-2} \mu\text{gAb/ml}$ anti-IgE によるヒスタミン遊離におよぼす薬剤の影響は Fig. 7 のごとくである。control のヒスタミン遊離量 $64.1 \pm 11.3\%$ に対し、 $10^{-4} \text{M} \cdot \text{N-5'}$, $10^{-4} \text{M} \cdot \text{DSCG}$, $10^{-6} \text{M} \cdot \text{isoproterenol}$ および $10^{-3} \text{M} \cdot \text{theophylline}$ 作用時の遊離量は、それぞれ 61.5 ± 11.8 , 62.5 ± 10.9 , 50.3 ± 6.7 および $32.4 \pm 9.1\%$ で、isoproterenol および theophylline によりヒスタミン遊離は抑制

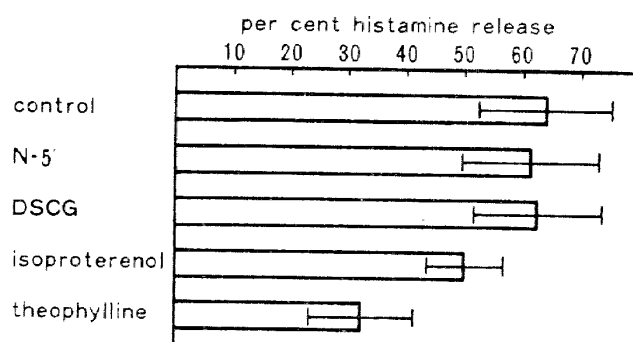


Fig. 7. Effect of N-5', DSCG, isoproterenol and theophylline on anti-IgE-induced histamine release from leukocytes of asthmatic patients at 45min after challenge with anti-IgE ($5 \times 10^{-2} \mu\text{gAb/ml}$). Leukocytes were incubated for 1 hour with 0.02M EDTA containing 5 unit heparin solution and two-fold dilution of reaginic serum from the patients. The cells were then washed twice and drugs were treated 30 sec prior to challenge. Each column represents the mean $\pm$ SE of 4 experiments.

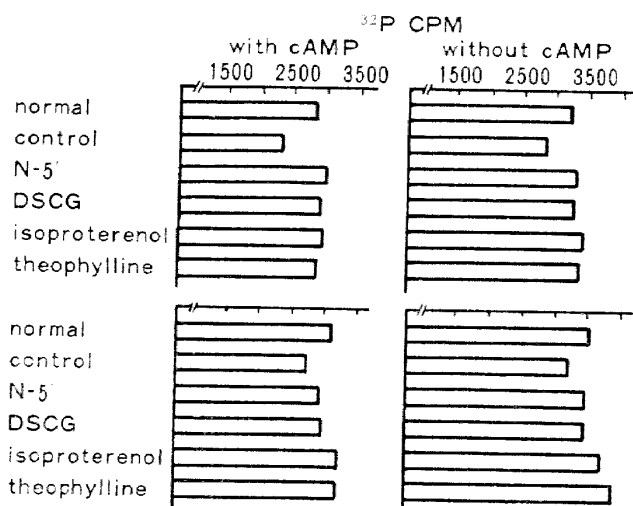


Fig. 8. Effect of N-5', DSCG, isoproterenol and theophylline on anti-IgE-induced changes of protein kinase activity in peripheral blood leukocytes of asthmatic patients at 45min after challenge. Leukocytes were incubated for 1 hour with 0.02M EDTA containing 5 unit heparin solution and two-fold dilution of reaginic serum from the patients. The cells were washed twice and then challenged. Enzyme solution was obtained by a mixture of 2 individual samples.

されたが、有意ではなかった。その際の PKase 活性の変動は Fig. 8 のごとくである。Fig. の上段および下段のいずれの場合においても、測定時の cAMP 添加の有

無にかかわらず、anti-IgE を作用させた control 群の活性は anti-IgE を作用させない normal 群の活性より減少し、薬剤を作用させるといずれによっても活性は control 群に比して増加した。

考 案

即時型アレルギー反応における mediator 遊離過程については不明な点が多いが、現在までに判明している主要な点としては、1) cyclic nucleotides による modulation をうけること¹¹⁻¹³、2) SH 酵素を含む酵素系および energy requiring process が存在すること¹³⁻¹⁵、3) 細胞内小器官が関与すること¹⁶⁻¹⁷、4) ヒト白血球からのヒスタミン遊離過程は、antigen-dependent で Ca^{++} -independent の 1st stage と、antigen-independent で Ca^{++} -dependent の 2nd stage に分離しうること¹⁵などがあげられる。このうち cAMP が即時型アレルギー反応の調節因子として働くことは周知であるが、その作用様式については不明である。

われわれ⁸⁾は先に、cAMP は PKase を介して作用を発現するのではないかと考え、mast cell を用いて、ヒスタミン遊離過程における PKase の意義について検討した。その結果、mast cell 中には cAMP dependent PKase が存在し、即時型アレルギー反応によるヒスタミン遊離に際し、その活性が減少することを報告した。

ヒスタミンは basophil あるいは mast cell から遊離するので、本研究では basophil に関する検討を行った。実験材料としては本来分離 basophil を用いるべきであるが、純粋に basophil を分離することは困難であるので、今回は約 1% の basophil を含むヒト白血球浮遊液を用いた。この際、赤血球中には PKase が存在することが報告されている¹⁹⁾ので、0.83% NH_4Cl で処理することにより赤血球をほぼ完全に除去した。また、特異的抗原によるヒスタミン遊離は個体差が大きいとされているので、血清総 IgE が高値を示した気管支喘息患者を対象とし、anti-IgE によるヒスタミン遊離量を測定し、PKase 活性の変動を観察した。

その結果、ヒト白血球中には明らかに PKase が存在することを認めたが、この活性がいずれの細胞に由来するかは不明である。多形核白血球を用いた実験においても本酵素の存在が報告¹²⁾されている。細胞内においても PKase によりリン酸化される基質蛋白質としては

histone²⁰⁾, 細胞膜²¹⁾およびマイクロテュブルス²²⁾などがあげられているが, unicellular endocrine gland ともよばれる basophil 中にはこれらが存在し, また後述のごとく, anti-IgE によるヒスタミン遊離の際に PKase 活性の変動が認められたことを考え合わせると, basophil 中には PKase が存在することは明らかと思われる。しかし, この点に関しては, さらに分離 basophil を用いた検討を行う必要がある。また, 今回の検討では, PKase 活性の cAMP による有意の活性増加は認められなかった。この点に関し, cAMP は細胞膜の透過性が悪く, したがって透過性のよい dibutyryl cAMP を用いて検討を行うことも必要と思われるが, rat serosal mast cell に関する検討⁷⁾, あるいは rat peritoneal mast cell に関する検討⁸⁾では, これら細胞中の PKase 活性は cAMP 添加により明らかに増加しており, 今回は cAMP を用いた。本研究における白血球浮遊液中の basophil の割合はわずかであり, 本細胞中の活性の変化が, 他細胞中の PKase 活性に mask されたことも考えられる。事実われわれは, 特異的 IgE 抗体によるヒスタミン遊離反応に関する実験において rat peritoneal exudate cell 中の PKase 活性は cAMP を添加しても有意の活性の増加を認めない²³⁾が, rat purified peritoneal mast cell 中の PKase 活性は cAMP 添加により明らかに増加する⁸⁾という結果を得ている。また, PKase は cAMP dependent PKase と cAMP independent PKase が存在する²⁴⁾ことも知られており, 果たして basophil 中の PKase が cAMP dependent PKase か, cAMP independent PKase であるかは不明である。

つぎに, 10^{-1} – 10^{-3} μ gAb/ml の種々の濃度の anti-IgE を白血球に作用させたところ, 明らかなヒスタミンの遊離が認められたが, ヒスタミン遊離量は anti-IgE の濃度に依存した。これは Ishizaka ら²⁵⁾, Lichtenstein ら²⁶⁾の報告と一致するところで, anti-IgE によるヒト白血球よりのヒスタミン遊離には anti-IgE の至適濃度が存在することが明らかである。なお, 本研究における anti-IgE による最大ヒスタミン遊離量は総ヒスタミン量の約22–42%であり, anti-IgE によるヒスタミン遊離にも, 特異的 IgE 抗体による際と同様に, 個体差の存在することが示唆された。

1967年 Levy and Osler²⁷⁾ は, ブタクサ抗体による白血球感作が EDTA および heparin により増強されることを報告したが, われわれはこれらの物質がレアギンによる標的細胞の感作状態を高め, anti-IgE によるヒスタ

ミン遊離を促進するとすれば, その状態で PKase 活性を測定することにより, より明らかな酵素活性の変動をつかめるのではないかと考えた。その結果, EDTA, heparin および患者血清の処理により, ヒト白血球よりの anti-IgE によるヒスタミン遊離量は増加した。しかし, PKase 活性はこれらの物質で処理した白血球および無処理白血球のいずれの場合においても, 測定時の cAMP 添加の有無にかかわらず, anti-IgE を作用させると減少の傾向を示したが, EDTA, heparin および患者血清の処理を行っても, PKase 活性の変動は増強されなかった。また, これらの物質の処理の有無および測定時の cAMP 添加の有無にかかわらず, anti-IgE を作用させた際の PKase 活性の減少の程度は anti-IgE の濃度に依存しなかった。ヒスタミン遊離量を増加させる処理および諸種濃度の anti-IgE を用いたのにもかかわらず, PKase 活性の変動に有意差が認められなかったことは, 本研究に用いた白血球浮遊液中の basophil の割合がわずかで, Tsung ら¹²⁾の報告と考えあわせても, basophil 中の活性の変化が他の多形核白血球中の PKase 活性に mask されたためとも考えられる。

また, 最大のヒスタミン遊離が認められた 5×10^{-2} μ g Ab/ml の anti-IgE によるヒスタミン遊離は, EDTA, heparin および患者血清無処理白血球の際に N-5', isoproterenol および theophylline により有意に抑制され, 処理白血球の際には有意ではなかったが isoproterenol および theophylline により抑制された。その際の PKase 活性は, EDTA, heparin および患者血清の処理, さらに測定時の cAMP 添加の有無にかかわらず, anti-IgE を作用させると減少したが, 薬剤を添加するといずれの場合においても活性の減少は抑制された。

以上より, ヒト白血球中には PKase が存在し, ヒスタミンが遊離する際にその活性が減少し, また, ヒスタミン遊離抑制剤は, この PKase 活性の減少を抑制することにより, ヒスタミンの遊離を抑制するものと思われる。この結果は mast cell を用いた先の実験成績⁸⁾と一致するところであるが, 今回の検討は anti-IgE を用いたいわゆる reversed anaphylaxis 反応であるため, 特異的抗原を用いた検討も必要と思われる。

結 語

6% dextran を用いて血清総 IgE が高値を示した気

管支喘息患者の白血球を分離し、0.83% NH_4Cl 処理により赤血球をほぼ完全に除去した後に anti-IgE を作用させ、ヒスタミン遊離量を測定した。同時に白血球中の PKase 活性の変動を観察し、以下の結果を得た。

1. ヒト白血球中には PKase が証明されたが、cAMP 添加による明らかな活性の増加は認められなかった。

2. anti-IgE によるヒト白血球よりのヒスタミン遊離は anti-IgE の濃度に依存し、EDTA, heparin および患者血清との preincubation により増加した。

3. ヒスタミンが遊離した際の PKase 活性は、EDTA, heparin および患者血清との前処理、また、測定時の cAMP 添加の有無にかかわらず減少した。

4. ヒスタミン遊離は DSCG を除く N-5', isoproterenol および theophylline により抑制され、その際の PKase 活性はすべての薬剤により増加した。

以上より、ヒト白血球よりのヒスタミン遊離過程には PKase が関与し、また、ヒスタミン遊離抑制剤は PKase 活性の減少を抑制することにより、ヒスタミン遊離を抑制するものと思われる。

本論文の要旨は、第30回日本アレルギー学会総会において発表した。

文 献

- 1) Lichtenstein, L.M. and Margolis, S.: Histamine release in vitro: Inhibition by catecholamines and methylxanthines. *Science* **161**, 902-903, 1968.
- 2) Ishizaka, T., Ishizaka, K., Orange, R.P. and Austen, K.F.: Pharmacologic inhibition of the antigen-induced release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey lung tissues mediated by human IgE. *J. Immunol.* **106**, 1267-1273, 1971.
- 3) Lichtenstein, L.M. and DeBernardo, R.: The immediate allergy response: In vitro action of cyclic AMP-active and other drugs on the two stages of histamine release. *J. Immunol.* **107**, 1131-1136, 1971.
- 4) Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G.: An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763-3774, 1968.

- 5) Mier, P.D., Van der Hurk, J., Holla, S.W., Hollman, E.P., Porters, J. and Weemers, M.: Cyclic AMP-dependent protein kinase of skin. II. Levels in atopic dermatitis and psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **87**, 577-579, 1972.
- 6) Kumar, R., Solomon, L.M., Schreckenberger, A. and Cobb, J.C.: An evaluation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase activity in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **65**, 522-524, 1975.
- 7) Holgate, S.T., Lewis, R.A. and Austen, K.F.: 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase of the rat serosal mast cell and its immunologic activation. *J. Immunol.* **124**, 2093-2099, 1980.
- 8) Kurosawa, M. and Koda, A.: Role of protein kinase on allergic histamine release from rat peritoneal mast cell. In "Advances in Allergy and Applied Immunology" (Ed. by A. Oehling, I. Glazer, E. Mathov and C. Arbesman), Pergamon Press, Oxford, pp. 731-732, 1980.
- 9) 黒沢元博, 根本俊和, 田中哲治, 笛木隆三, 小林節雄, 柳原行義, 信太隆夫: こんにちは喘息患者末梢白血球からのヒスタミン遊離試験と臨床的意義に関する検討. *アレルギー* **30**, 151-159, 1981.
- 10) May, C.D., Lyman, M., Alberto, R. and Cheng, J.: Procedures for immunochemical study of histamine release from leukocytes with small volume of blood. *J. Allergy* **46**, 12-20, 1970.
- 11) Corbin, J.D., Soderling, T.R. and Park, C.R.: Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J. Biol. Chem.* **248**, 1813-1821, 1973.
- 12) Tsung, P.K., Hermine, N. and Weissman, G.: Inosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from human PMN leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 1657-1662, 1972.
- 13) Mongar, J.L. and Schild, H.O.: Effect of temperature on the anaphylactic reaction. *J. Physiol.* **135**, 320-338, 1957.
- 14) Uvnäs, B. and Thon, I.-L.: Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cell. *Exp. Cell Research* **23**, 45-57, 1961.
- 15) Mongar, J.L., Schild, H.O. and Edman, K.A.P.: Role of SH and S-S groups and oxygen in the anaphylactic reaction of chopped guinea pig lung. *J. Physiol. (Lond.)* **170**, 124-137, 1964.
- 16) Orr, T.S.C., Hall, D.E. and Allison, A.C.:

- Role of contractile microfilaments in the release of histamine from mast cell. *Nature* **236**, 350-351, 1972.
- 17) Gillespie, E. and Lichtenstein, L.M.: Histamine release from human leukocytes: Studies with deuterium oxide, colchicine and cytochalasin B. *J. Clin. Invest.* **51**, 2941-2947, 1972.
 - 18) Lichtenstein, L.M.: The immediate allergic response: In vitro separation of antigen activation, decay and histamine release. *J. Immunol.* **107**, 1122-1130, 1971.
 - 19) Kabat, D.: Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. Characterization and regulatory aspects. *Biochemistry* **9**, 4160-4175, 1970.
 - 20) Langan, T.A.: Histone phosphorylation: Stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **162**, 579-580, 1968.
 - 21) Weller, M. and Rodnight, R.: Stimulation by cyclic AMP of intrinsic protein kinase activity in ox brain membrane preparations. *Nature* **225**, 187-188, 1970.
 - 22) Goodman, D.B.P., Rassmussen, H.R., DiBella, F. and Guthrow, C.E. Jr.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated phosphorylation of isolated neurotubule subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 652-659, 1970.
 - 23) 黒沢元博, 今村記明, 中田勝彦, 江田昭英: 即時型アレルギー反応における protein kinase (PKase) の意義 (第1報). peritoneal exudate cell (PEC) の PKase と脳および肝臓の PKase との比較, ならびに histamine 遊離との関係についての検討. *アレルギー* **30**, 266-273, 1981.
 - 24) Yamamura, H., Takeda, M., Kumon, A. and Nishizuka, Y.: Adenosine 3',5'-cyclic phosphate-dependent and independent histone kinases from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 675-682, 1970.
 - 25) Ishizaka, T., Ishizaka, K., Johansson, S.G.O. and Bennich, H.: Histamine release from human leukocytes by anti- γ E antibodies. *J. Immunol.* **102**, 884-892, 1969.
 - 26) Lichtenstein, L.M., Levy, D.A. and Ishizaka, K.: In vitro reversed anaphylaxis; characteristics of anti-IgE mediated histamine release. *Immunology* **19**, 831-842, 1970.
 - 27) Levy, D.A. and Osler, A.G.: Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena. XV. Enhancement of passive sensitization of human leukocytes by heparin. *J. Immunol.* **99**, 1062-1077, 1967.

ROLE OF PROTEIN KINASE ON HISTAMINE RELEASE FROM HUMAN LEUKOCYTES BY ANTI-IgE

Motohiro Kurosawa, Toshikazu Nemoto, Tetsuji Tanaka, Ryūzo Fueki and
Setsuo Kobayashi

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Gunma University

Hiroichi Nagai and Akihide Koda

Department of Pharmacology, Gifu College of Pharmacy

Protein kinase (PKase) activity in human leukocytes was measured and the relation between anti-IgE-mediated histamine release and PKase was investigated. Leukocyte preparation was obtained with a 6% dextran solution and red blood cells were removed with 0.83% NH_4Cl treatment. The following results were obtained.

1. PKase activity was observed in human leukocytes, but there was no significant elevation of the activity with administration of cyclic AMP (cAMP).
2. The amount of histamine release was dependent upon the concentration of anti-IgE and was enhanced by incubation with EDTA-heparin solution and reaginic serum from the patient.
3. When histamine release was observed, it was found that PKase activity, measured with cAMP or without cAMP, was reduced irrespective of EDTA, heparin and reaginic serum treatment.
4. Histamine release and the decrease of PKase activity were inhibited by the addition of N-5', isoproterenol and theophylline to incubation mixture.

From the above results, it is clear that PKase exists in human leukocytes, and it seems that PKase may play an important role in the mechanism of histamine release from human leukocytes.