

# ラット異系肝移植モデルにおける5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の免疫抑制機序に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9173">http://hdl.handle.net/2297/9173</a>

## 正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第104巻 第6号 732-741 (1995)

### ラット異系肝移植モデルにおける 5-リポキシゲナーゼ 代謝阻害剤の免疫抑制機序に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

福 島 亘

第104巻第6号 735頁 Fig. 4. 説明文

誤

Fig. 4. Microscopic view of the liver allografts harvested at 7 days after OLTx (HE staining). A. Control group. Severe endothelialitis and inflammatory cellular infiltration can be observed in the portal vein and the central vein. B. AA861-administered group. Mild inflammatory cellular infiltration and endothelialitis are seen. C. FK506-administered group. Minimal to mild inflammatory cellular infiltration can be seen, but the degree of cellular infiltration in this group is suppressed compared with that in the AA861-administered group.

正

Fig. 4. Microscopic view of the liver allografts harvested at 7 days after OLTx (HE staining). A. FK506-administered group. Minimal to mild inflammatory cellular infiltration can be seen, but the degree of cellular infiltration in this group is suppressed compared with that in the AA861-administered group. B. AA861-administered group. Mild inflammatory cellular infiltration and endothelialitis are seen. C. Control group. Severe endothelialitis and inflammatory cellular infiltration can be observed in the portal vein and the central vein.

## ラット異系肝移植モデルにおける 5-リポキシゲナーゼ 代謝阻害剤の免疫抑制機序に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

福 島 亘

肝移植後の急性拒絶における 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の免疫抑制機序を, アラキドン酸代謝産物の変動から検討するとともに, 新しい免疫抑制剤である FK506 の作用機序と比較することを目的に, ラット異系肝移植モデルを用いて実験を行った. 鎌田らの方法に従い同所性肝移植を行い, 対照 (薬剤非投与) 群, 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤 AA861 (2,3,5-trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone) 投与群, および FK506 投与群の 3 群に分け実験を行い, 移植後の平均生存日数, 血清グルタミンピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamic pyruvic transaminase, GPT) 値, 血中ロイコトリエン B<sub>4</sub> (leukotriene B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) 値, 血中プロスタグランディン E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 値, 移植肝の組織所見, 移植肝に浸潤する T 細胞数の変動について検討した. 移植後の平均生存日数は, 対照群で 11.6±2.9 日 (平均±標準偏差), AA861 投与群で 28.4±13.7 日, FK506 投与群で 108.2±36.4 日であり, 平均生存日数は AA861 投与群では対照群に比べ有意に ( $p < 0.05$ ), また FK506 投与群では対照群および AA861 投与群に比べ有意に ( $p < 0.01$ ) 長かった. 移植後 3, 7 日目の血中 LTB<sub>4</sub> 値は, AA861 投与群では対照群に比べ有意に ( $p < 0.01$ ) 低いが, FK506 投与群では LTB<sub>4</sub> 値の有意な低下は認められなかった. また移植後 3 日目において, AA861 投与群では対照群および FK506 投与群に比べ血中 PGE<sub>2</sub> 値の有意な ( $p < 0.01$ ) 上昇を認めた. 移植肝の組織所見において, 門脈周囲のリンパ球浸潤, 門脈および中心静脈の血管内皮炎, 胆管上皮障害は AA861 投与群では対照群に比べ軽度であり, また FK506 投与群では AA861 投与群および対照群よりも軽度であった. また移植肝に浸潤する T 細胞の免疫組織化学染色の結果からは, AA861 投与群および FK506 投与群では対照群に比べ浸潤 T 細胞数の低下が認められ, また FK506 投与群では AA861 投与群よりも低値であった. 以上より AA861 の免疫抑制効果は FK506 よりも劣るが, その免疫抑制機序は LTB<sub>4</sub> の産生抑制とこれにともなう PGE<sub>2</sub> の上昇による T 細胞増殖の抑制と推測され, FK506 とはアラキドン酸代謝では作用機序が異なることが示された.

**Key words** liver allotransplantation, acute rejection, 5-lipoxygenase inhibitor, leukotriene B<sub>4</sub>, FK506

近年臓器移植とくに移植免疫の分野において, プロスタグランディン (prostaglandin, PG) やロイコトリエン (leukotriene, LT) をはじめとするアラキドン酸代謝産物の関与が数多く報告されている. たとえば, シクロオキシゲナーゼ系代謝産物であるプロスタグランディン E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) が, リンパ球増殖やインターロイキン 2 (interleukin 2, IL<sub>2</sub>) 産生に影響を与え<sup>1-4</sup>, またリポキシゲナーゼ系代謝産物であるロイコトリエン B<sub>4</sub> (leukotriene B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) が, T 細胞の増殖<sup>5,6</sup> やインターロイキン 1 (interleukin 1, IL<sub>1</sub>), IL<sub>2</sub> 産生<sup>7,8</sup> などに関与し, 免疫促進作用を持つことが報告されている. またドナー血輸血 (donor-specific transfusion) の免疫抑制作用において, アラキドン酸代謝産物が重要な役割を演じており, アラキドン酸代謝産物を介した免疫抑制が可能であると報告されている<sup>9</sup>. また, ラット異系肝移植モデルを用いた実験で, 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の投与により移植後の生存日数の延長がもたらされることが報告されている<sup>10</sup>. 一方, 新しい免疫抑制剤で

ある FK506 は, 1984年に放線菌, *Streptomyces tsukubaensis* 9993 株の培養濾液から発見された免疫抑制剤であるが, 細胞障害性 T 細胞産生の抑制, IL<sub>2</sub> の産生抑制などの免疫抑制作用は, サイクロスポリン (Cyclosporin A, CyA) の約 100 倍と報告され<sup>11,12</sup>, 最近, 肝, 腎, 脾移植などに投与されたとの臨床報告がなされている<sup>13-15</sup>. その作用機序としては T 細胞レセプターからの IL<sub>2</sub> などのサイトカイン産生に至る情報伝達経路を遮断し, 主に初期の T 細胞活性化を阻害すると考えられている<sup>16</sup>. そこで, 今回肝移植後の急性拒絶における 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の免疫抑制機序および FK506 との作用機序の差異を, 特にアラキドン酸代謝産物の変動から検討することを目的に, ラット異系肝移植モデルを用いて実験を行った.

### 対象および方法

#### 1. 実験方法

体重 200g から 250g までの雄性 ACI ラットを供給者 (ド

平成 7 年 10 月 5 日受付, 平成 7 年 11 月 30 日受理

Abbreviations: CyA, Cyclosporine A; DMSO, dimethyl sulfoxide; GPT, glutamic pyruvic transaminase; IL<sub>1</sub>, interleukin 1; IL<sub>2</sub>, interleukin 2; LT, leukotriene; LTB<sub>4</sub>, leukotriene B<sub>4</sub>; OLTx, orthotopic liver transplantation; PG, prostaglandin; PGE<sub>1</sub>, prostaglandin E<sub>1</sub>; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>

ナー)に、ルイスラットを受容者(レシピエント)に用い、12時間絶食後エーテル麻酔下で同所性肝移植を Kamada ら<sup>17)</sup>の方法に従って行った。すなわち、肝上下大静脈は手縫い縫合にて行い、肝下大静脈、門脈吻合および胆管の再建はカフを用いて行った。また摂食および飲水は術直後より自由とした。

## II. 実験群

移植後投与薬剤の種類により以下の3群に分けた。

### 1. 対照(薬剤非投与)群(n=7)

同所性肝移植を行い、移植後より連日、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide, DMSO)(和光純薬, 大阪)<sup>18)</sup>0.1mlを死亡または犠牲死まで皮下注にて投与した。

### 2. AA861投与群(n=7)

移植後より連日、5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤 AA861(2,3,5-trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10,-dodecadiynyl)-1,4,-benzoquinone)(武田薬品工業, 東京), 20mg/kgを0.1mlのDMSOに溶解し、死亡または犠牲死まで皮下注にて投与した。

### 3. FK506投与群

移植後より連日 FK506 (FK900506, 藤沢薬品工業, 大阪),

0.3mg/kgを0.1mlの生理食塩水に溶解し、移植後14日目まで、または犠牲死まで筋注にて投与した。

## III. 検討項目

### 1. 生存日数

移植後から死亡までの生存日数を3群間で比較した。

2. 血清グルタミンピルビン酸トランスアミナーゼ(glutamic pyruvic transaminase, GPT), 血中LTB<sub>4</sub>, 血中PGE<sub>2</sub>の測定

移植後3, 7, 14日目にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血し、血清GPT, 血中LTB<sub>4</sub>およびPGE<sub>2</sub>を測定した。LTB<sub>4</sub>の測定はヘパリンを吸引した注射器にて採血した血液2mlに、8mlの冷却エタノールを加えて除蛋白後、冷却遠心機を用いて4℃, 2000rpmにて15分間の遠心を行い、上清をsep-pak C-18カラムで抽出後、高速液体クロマトグラフィーにて分離精製したのち、LTB<sub>4</sub>ラジオイムノアッセイキット(アマツカム・ジャパン 東京)にて測定した。PGE<sub>2</sub>の測定は採血後、血清をEDTA, インドメタシン, トラジロール入りの専用採血管に移し、LTB<sub>4</sub>と同様に冷却遠心を行った。遠心後、血清

Table 1. Histological grading scheme of acute rejection

Histological features assessed	Grade of histological feature	Score
I. Portal inflammatory infiltration	None	0
	Minimal	1
	Mild	2
	Moderate	3
	Severe	4
II. Sinusoidal inflammatory infiltration	None	0
	Minimal	1
	Mild	2
	Moderate	3
	Severe	4
III. Bile duct epithelial damage	Normal	0
	Minimal mononuclear inflammatory infiltration involved the bile duct epithelium	1
	Mild mononuclear inflammatory infiltration involved the bile duct, but the wall of the bile duct was preserved	2
	Pleomorphism of the bile duct epithelial cells with nuclear pyknosis or karyorrhexis	3
	Inflammatory disruption of the duct wall	4
IV. Central vein endothelialitis	No lymphocyte attached to the endothelium	0
	Some (1 to 3) lymphocytes attached to the endothelium	1
	More lymphocytes attached to the endothelium, but the perivenular inflammatory infiltration of the central vein was not observed	2
	Mild perivenular inflammatory infiltration of the central vein	3
	Severe perivenular inflammatory infiltration of the central vein	4
V. Portal vein endothelialitis	No lymphocyte attached to the endothelium	0
	Some (1 to 3) lymphocytes attached to the endothelium	1
	More lymphocytes attached to the endothelium, but the perivenular inflammatory infiltration of the portal vein was not observed	2
	Mild perivenular inflammatory infiltration of the portal vein	3
	Severe perivenular inflammatory infiltration of the portal vein	4
VI. Hepatocyte necrosis	None	0
	Minimal	1
	Mild	2
	Moderate	3
	Severe	4

Histological rejection score, total score of I to IV

にオクタデシルシリカ懸濁液を加えて吸着を行い、洗浄、脱脂後、酢酸エチルで抽出し、さらにケイ酸カラムを用いて分画を得たのち、PGE<sub>2</sub> ラジオイムノアッセイキット (New England Nuclear, Boston, USA) にて測定した。

### 3. 移植肝の病理組織学的検討

犠牲死の際に肝を摘出し、10%ホルマリン液にて固定後、HE染色を行い組織所見を比較した。その際、組織学的急性拒絶の程度を評価比較するために、Fennellら<sup>19)</sup>、Snoverら<sup>20-22)</sup>、Knodellら<sup>23)</sup>の分類を参考に、表1のごとく組織学的評価基準を作成した。すなわち、門脈領域の炎症性細胞浸潤、類洞域の炎症性細胞浸潤、胆管上皮障害、中心静脈の血管内皮炎、門脈の血管内皮炎、肝細胞壊死の6項目について、それぞれの項目を5段階に分けスコア化した。そして6項目のスコアの和を、組織学的急性拒絶スコア (histological rejection score) として3群間で比較した。

### 4. 肝組織内浸潤細胞の免疫組織学的検討

免疫組織化学染色は、ビオチン標識ストレプトアビジン (labelled streptavidin-biotin, LSAB) 法にて行った。すなわち、犠牲死の際に摘出した肝の一部をただちに5×5×2mmの大きさに細切し、O.C.Tコンパウンド (マイスル・三共、東京) で包埋した後、液体窒素にて凍結し使用時まで-80℃で保存した。凍結した標本をクリオスタットにて6μmに薄切し、ポリ-L-リジン (poly-L-lysine) を塗布したスライドガラス上に貼布した後30分間風乾し、パラホルムアルデヒド・リジン・ペリオデイト (paraformaldehyde-lysine-periodate) 固定液にて固定した。その後0.3%過酸化水素 (和光純薬) 加メタノール液にて処理後、10倍希釈の正常ヤギ血清 (ダコジャパン、京都) を20分間反応させた。次に一次抗体を4℃で1晩反応させた後、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) にて2時間、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO) にて1時間反応させた後、1%過酸化水素加0.03%ジアミノベンチジンテトラクロライド (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (和光純薬) で発色させた。また核染色にはメチルグリーンを使用した。一次抗体として全T細胞 (T cell receptor α/β chains, R73) (Serotec, Oxford, 英国)、リンパ球サブセットとしてCD4陽性T細胞に対する抗体であるW3/25 (Serotec)、CD8陽性T細胞に対する抗体であるOX-8 (Serotec) の3種類の抗体を使用した。

また、染色陽性細胞の算出法はHancockら<sup>24)</sup>の方法に準じて、染色後のプレパラートを400倍視野にて鏡検し、浸潤細胞における染色陽性細胞を1検体あたり20視野計測して、その平

均を算出し比較を行った。

なお、対照群においては移植後14日目までの生存例が少ないため、血清GPT、血中LTB<sub>4</sub>およびPGE<sub>2</sub>の測定、移植肝の病理組織学的検討、肝組織内浸潤細胞の免疫組織学的検討の項目では、対照群における14日目のデータは検討対象から除外した。

### 5. 統計学的検討

測定値はすべて平均値±標準偏差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) で示した。各群間の生存日数、血清GPT値、血中LTB<sub>4</sub>値およびPGE<sub>2</sub>値の比較にはStudent's-t検定を用い、組織学的急性拒絶スコア (histological rejection score) の比較には、Wilcoxon rank-sum検定を用いた。いずれも危険度5%未満をもって有意差ありと判定した。

## 成 績

### I. 生存日数の比較

移植後の平均生存日数は、対照群が11.6±2.9日であったのに対して、AA861投与群では28.4±13.7日と有意な延長が認められた ( $p < 0.05$ )。またFK506投与群では平均生存日数は108.2±36.4日であり、対照群およびAA861投与群に対して有意な ( $p < 0.01$ ) 延長が認められた (表2)。

### II. 移植後血清GPT、血中LTB<sub>4</sub>、血中PGE<sub>2</sub>値の推移

血清GPT値は、対照群に比べAA861投与群およびFK506投与群では移植後は低値で推移した。特に移植後7日目では対照群のGPT値が668.8±152.7IU/lであったのに対して、AA861投与群では312.5±151.0IU/lと有意に ( $p < 0.05$ ) 低く、またFK506投与群では203.6±123.4IU/lと有意に ( $p < 0.01$ ) 低かった (図1)。

血中LTB<sub>4</sub>値は、AA861投与群では移植後3日目が1703±764pg/ml、移植後7日目が241±134pg/mlと他の2群と比べ低値を示し、移植後3日目において対照群の4358±1255pg/mlに比べ有意に ( $p < 0.01$ ) 低かった。また移植後7日目においては、AA861投与群では対照群の3025±955pg/mlに比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 低く、またFK506投与群の1413±667pg/mlに比べて有意な ( $p < 0.05$ ) 低下が認められた (図2)。

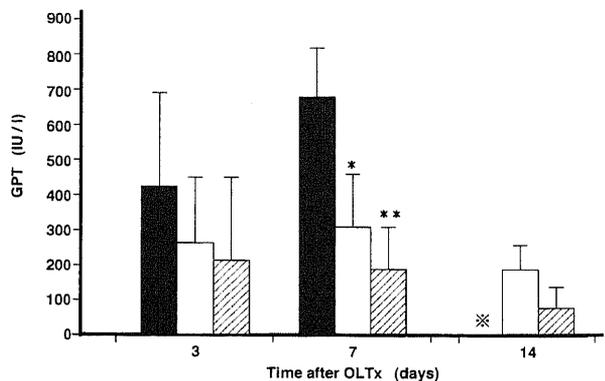


Fig. 1. Changes in the serum GPT concentration after OLTx. ■, control group; □, AA861-administered group; ▨, FK506-administered group. Each value represents  $\bar{x} \pm SD$ . \*Data of the control group on 14 post-operative day are absent. \* $p < 0.05$  vs. control group. \*\* $p < 0.01$  vs. control group.

Table 2. Summary of survival times

Group <sup>a)</sup>	Number of rats used	Survival time (day)	
		Range	$\bar{x} \pm SD$
Control	7	9-16	11.6 ± 2.9
AA861	7	16-52	28.4 ± 13.7*
FK506	5	70-163	108.2 ± 36.4**

a) Control, control group; AA861, AA861-administered group; FK506, FK506-administered group.

\*  $p < 0.05$  vs. control group.

\*\*  $p < 0.01$  vs. control group and AA861-administered group.

血中 PGE<sub>2</sub> 値は、移植後 3 日目において AA861 投与群では 44.0±4.8pg/ml と対照群の 26.3±6.8pg/ml, FK506 投与群の 12.8±9.8pg/ml に比べ有意な ( $p<0.01$ ) 上昇を認めた。また FK506 投与群は対照群に比べ有意に ( $p<0.05$ ) 低かった。しかし移植後 7 日目, 14 日目においては 3 群間で差は認められなかった (図 3)。

### Ⅲ. 移植肝の病理組織学的検討

移植後 7 日目において、対照群では門脈や中心静脈周囲の炎症細胞浸潤や血管内皮炎が高度に認められた。しかし、AA861 投与群では炎症細胞浸潤や血管内皮炎は対照群に比べ軽度であり、さらに FK506 投与群では炎症細胞浸潤が一部に認められるのみであった (図 4)。移植後 14 日目においては、FK506 投与群では炎症細胞浸潤などの急性拒絶の所見は移植後 7 日目とはほぼ変わらなかったが、AA861 投与群では炎症細胞浸潤や血管内皮炎は移植後 7 日目と比べ高度であり、また広い範囲に認められた (図 5)。

表 1 の基準に従って算出した組織学的急性拒絶スコア (histological rejection score) で比較すると、移植後 3 日目では

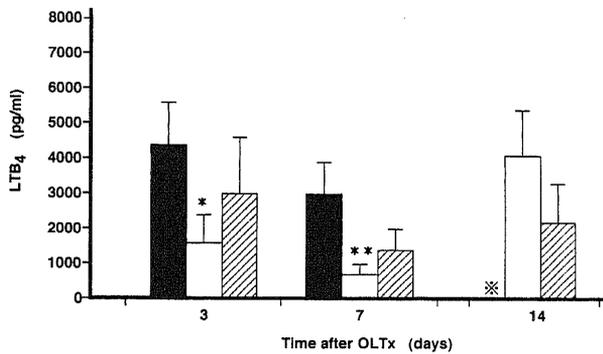


Fig. 2. Changes in the blood LTB<sub>4</sub> concentration after OLTx. ■, control group; □, AA861-administered group; ▨, FK506-administered group. Each value represents  $\bar{x} \pm SD$ . ※Data of the control group on 14 post-operative day are absent. \* $p<0.01$  vs. control group. \*\* $p<0.01$  vs. control group and  $p<0.05$  vs. FK506-administered group.

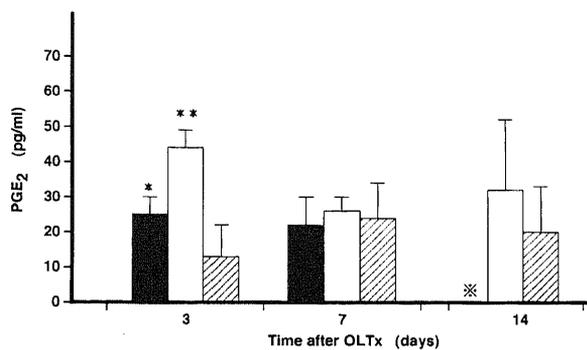


Fig. 3. Changes in the blood PGE<sub>2</sub> concentration after OLTx. ■, control group; □, AA861-administered group; ▨, FK506-administered group. Each value represents  $\bar{x} \pm SD$ . ※Data of control group on 14 post-operative day are absent. \* $p<0.05$  vs. FK506-administered group. \*\* $p<0.01$  vs. control group and FK506-administered group.

3 群間に差は認められなかったが、移植後 7 日目では対照群で 15.8±2.3, AA861 投与群で 11.2±2.4, FK506 投与群で 4.2±1.6 であり、AA861 投与群は対照群に比べ有意に ( $P<0.05$ ) 低値を示し、FK506 投与群では対照群および AA861 投与群に比べ有意な ( $P<0.0001$ ) 低値を示した。また、移植後 14 日目では FK506 投与群では 4.2±1.6 と、移植後 3, 7 日目と比較して変化はなかったが、AA861 投与群では 13.5±1.7 と移植後 7 日目より高値を示し、FK506 投与群に比べ有意な ( $P<0.05$ ) 高値を示した (図 6)。

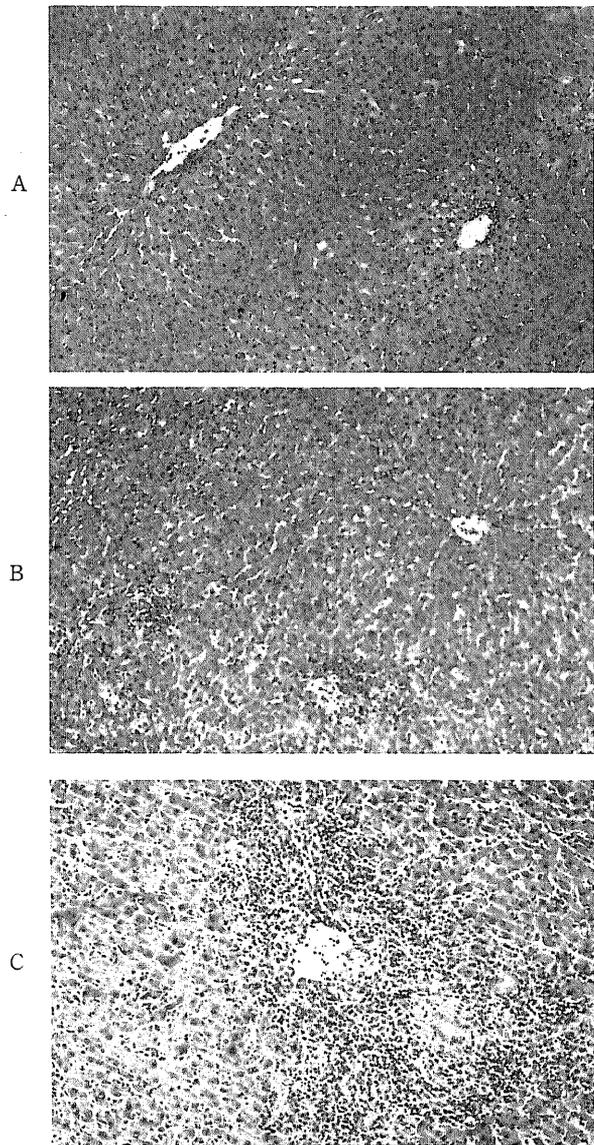


Fig. 4. Microscopic view of the liver allografts harvested at 7 days after OLTx (HE staining). A. Control group. Severe endotheliatits and inflammatory cellular infiltration can be observed in the portal vein and the central vein. B. AA861-administered group. Mild inflammatory cellular infiltration and endothelialitis are seen. C. FK506-administered group. Minimal to mild inflammatory cellular infiltration can be seen, but the degree of cellular infiltration in this group is suppressed compared with that in the AA861-administered group.

## IV. 移植肝組織内浸潤細胞の検討

移植後7日目において、全T細胞は対照群の  $22.6 \pm 3.7$  に比べ AA861 投与群では  $11.2 \pm 2.8$  と有意な減少が認められ、FK506 投与群では  $5.0 \pm 1.0$  と対照群、AA861 投与群に比べ有意な減少が認められた。移植後14日目においても同様に、

FK506 投与群では AA861 投与群に比べ全T細胞の有意な減少が認められた。W3/25 (CD4) 陽性T細胞の比較では移植後7、14日目とも3群間で差は認められなかったが、OX8 (CD8) 陽性T細胞は、FK506 投与群では移植後14日目において AA861 投与群に比べ増加を認め、これにともない FK506 投与群の W3/

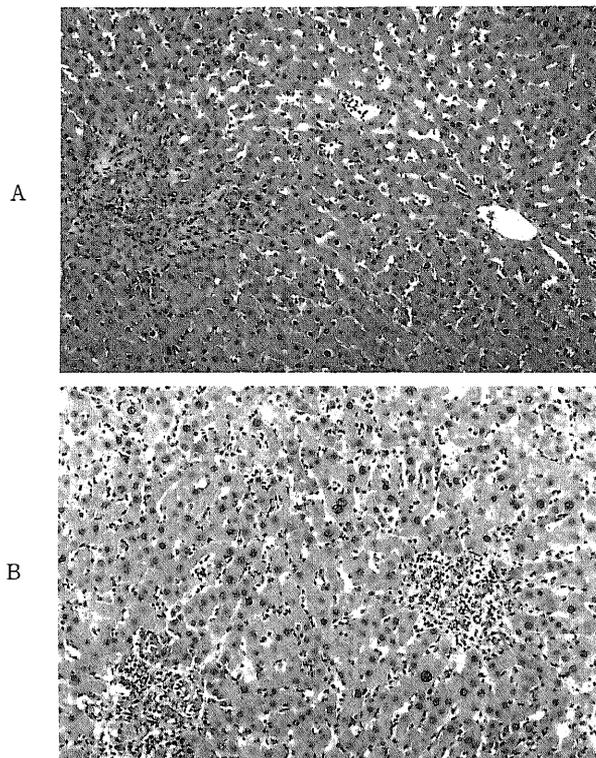


Fig. 5. Microscopic view of the liver allografts harvested at 14 days after OLTx (HE staining). A. FK506-administered group. B. AA861-administered group. In the AA861-administered group, inflammatory cellular infiltration and endothelialitis at 14 days after OLTx is more severe than that at 7 days after OLTx. But in the FK506-administered group, histological findings at 14 days after OLTx are almost same as that at 7 days after OLTx.

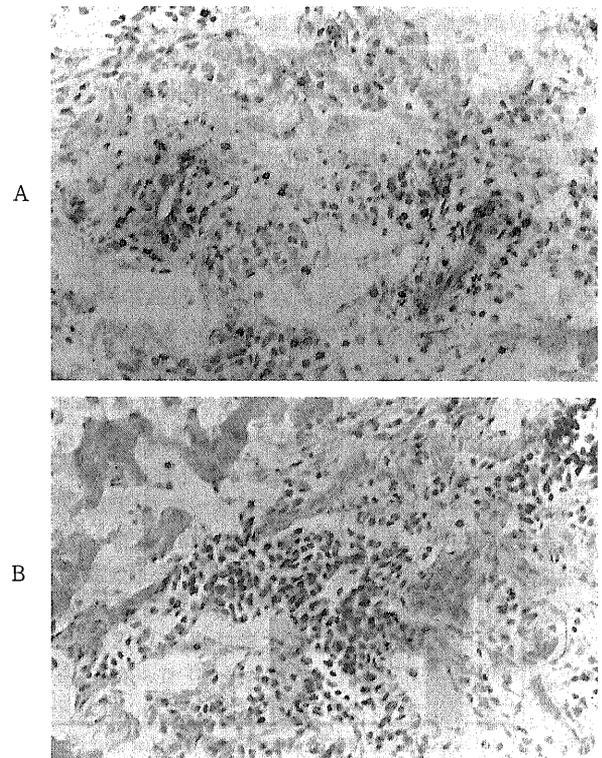


Fig. 6. Immunohistochemical staining of the liver allografts at 7 days after OLTx using an antibody against T cell receptor  $\alpha/\beta$  chain. A. Control group. B. FK506-administered group. The number of the positive cells in the FK506-administered group is less than that in the control group.

Table 3. Subset of the cells infiltrated in transplanted liver at day 7 and 14 after OLTx

Days after transplantation	Group <sup>a)</sup>	Number ( $\bar{x} \pm SD$ ) of the cells per HPF <sup>b)</sup>			W3/25/OX8 ratio
		Total T cell	W3/25-positive	OX8-positive	
7	Control	$22.6 \pm 3.7$	$8.6 \pm 1.0$	$15.5 \pm 4.7$	$0.6 \pm 0.6$
	AA861	$11.2 \pm 2.8^*$	$4.6 \pm 2.0$	$7.8 \pm 3.2$	$0.7 \pm 0.4$
	FK506	$5.0 \pm 1.0^{**}$	$2.7 \pm 1.0$	$4.6 \pm 1.2$	$0.6 \pm 0.3$
14	AA861	$11.7 \pm 5.9$	$6.9 \pm 1.9$	$5.5 \pm 1.7$	$1.3 \pm 0.2$
	FK506	$9.4 \pm 3.0^{\#}$	$5.1 \pm 1.7$	$8.7 \pm 0.9$	$0.5 \pm 0.2^{**}$

a) Control, control group; AA861-administered group; FK506, FK506-administered group.

b) High power field ( $\times 400$ ).

\*  $p < 0.001$  vs. control group at day 7

\*\*  $p < 0.001$  vs. control group,  $p < 0.01$  vs. AA861-administered group at day 7

$\#$   $p < 0.05$  vs. AA861-administered group at day 14

\*\*  $p < 0.01$  vs. AA861-administered group at day 14

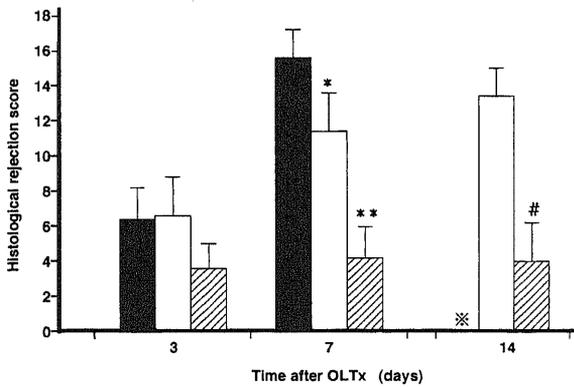


Fig. 7. Histological rejection scores of three groups after OLTx. Each value represents  $\bar{x} \pm SD$ . ■, control group; □, AA861-administered group; ▨, FK506-administered group. ※Data of the control group on 14 post-operative day are absent. \* $p < 0.05$  vs. control group. \*\* $p < 0.0001$  vs. control group and AA861-administered group. # $p < 0.05$  vs. AA861-administered group.

25 陽性 T 細胞と OX8 陽性 T 細胞との比 (W3/25/OX8) は AA861 投与群より有意に低下していた (表 3)。

### 考 察

アラキドン酸カスケードの代謝産物が移植免疫におよぼす影響については、シクロオキシゲナーゼ系代謝産物である  $PGE_2$  が、ヘルパー T 細胞の増殖および遊走の抑制<sup>125)20)28)</sup>、細胞障害性 T 細胞活性の障害<sup>27)</sup>、 $IL_2$  産生の抑制<sup>28)</sup>、マクロファージにおける Ia 抗原発現の抑制<sup>30)</sup>をおこなうことが報告されており、ラット心移植およびマウス皮膚移植で、 $PGE_2$  同族体 (16,16-dimethyl  $PGE_2$ ) が移植臓器の拒絶反応を抑制し、生着日数の延長をもたらすことが報告されている<sup>31)32)</sup>。また、リポキシングナーゼ系代謝産物も炎症<sup>33)~36)</sup>や免疫制御に関与しており、その代謝産物の 1 つである  $LTB_4$  が、白血球の遊走促進作用<sup>33)</sup>、T リンパ球の増殖促進作用<sup>36)38)</sup>、 $IL_1$  や  $IL_2$  などのサイトカインの産生亢進作用<sup>39)</sup>、ナチュラル細胞障害性 T 細胞の活性増強作用<sup>37)</sup>を有することが示されている。また、肝移植において 5-リポキシングナーゼ代謝阻害剤の投与が  $LTB_4$  の生成を抑制し、肝移植後の急性拒絶を軽減することが報告されている<sup>39)40)</sup>。今回の実験では、対照群では移植後早期から血中  $LTB_4$  の上昇を認め、全例移植後 16 日以内に死亡したのに対して、AA861 投与群では血中  $LTB_4$  の上昇は抑制され、対照群に比べ有意な生存日数の延長が認められた。さらに GPT 値の推移、肝組織所見からみても、AA861 投与群では対照群に比べ急性拒絶反応は抑制されていることより、 $LTB_4$  が急性拒絶に関与し、 $LTB_4$  産生の抑制が急性拒絶の抑制につながることを示された。しかし、FK506 投与群との比較では、FK506 投与群の平均生存日数が 108.2 日であるのに対して、AA861 投与群では 28.6 日と有意に短いことから、AA861 の免疫抑制効果は FK506 に比べ不十分であり、移植片の永久的生着を誘導するほど強力でないことは明らかである。

AA861 の免疫抑制機序を血中  $PGE_2$  および  $LTB_4$  の変動からみると、AA861 投与群では移植後早期において、 $LTB_4$  が対照群や FK506 投与群に比べ有意に低値であるとともに  $PGE_2$  の上昇が認められた。アラキドン酸カスケード内でのシクロオキ

シゲナーゼ系代謝産物とリポキシングナーゼ系代謝産物との相互関係について、Ham ら<sup>41)</sup>はプロスタグランジン  $E_1$  (prostaglandin  $E_1$ ,  $PGE_1$ ) や  $PGE_2$  が好中球からの  $LTB_4$  の産生を抑制することを報告している。また、Perez ら<sup>9)</sup>はドナー血輸血 (donor-specific transfusion) における免疫抑制効果がリポキシングナーゼ経路の遮断により増強されることを報告し、その原因としてアラキドン酸カスケード内のシクロオキシゲナーゼ系とリポキシングナーゼ系間の短絡が 1 つの要因であると推測している。従って AA861 の免疫抑制機序としては  $LTB_4$  の産生が抑制されることによって、 $LTB_4$  の T リンパ球増殖作用や  $IL_1$  および  $IL_2$  産生作用が抑制され、移植臓器に対しては免疫抑制的に働くとともに、さらに増加した  $PGE_2$  が免疫抑制的に働くことが推測された。FK506 投与群においては、 $LTB_4$  は AA861 投与群ほど抑制されないものの対照群に比べ低値を示したが、 $PGE_2$  は移植後 3 日目では他の 2 群に比べ有意に低値を示した。FK506 のアラキドン酸代謝への影響について検討した報告はないが、Schultze ら<sup>42)</sup>は末梢リンパ球を用いた CyA 投与における  $PGE_2$  産生を検討した実験で、低濃度の CyA の投与下では  $PGE_2$  の産生は増加するものの、投与量の増加にともない  $PGE_2$  の産生は抑制されることを報告している。CyA と同様な免疫抑制機序をもつ FK506 投与群においても、移植肝の急性拒絶が十分に抑制される FK506 0.3mg/kg の投与量では、 $PGE_2$  の産生が抑制されていると推測される。FK506 と AA861 の免疫抑制機序について比較すると、AA861 はアラキドン酸代謝に影響して  $LTB_4$  の産生を低下させ、また  $PGE_2$  の産生を増加させることによって免疫抑制効果をもたらすと考えられるのに対して、FK506 はアラキドン酸代謝に対する影響は少なく、両薬剤の免疫抑制効果は異なる機序によると推測された。

肝移植後における急性拒絶の病理組織学的所見として、Snover ら<sup>22)</sup>は動脈炎、胆管の減少、門脈および小葉内の炎症細胞浸潤、中心静脈の血管内皮炎、肝細胞壊死などを検討し、急性拒絶の診断において門脈領域のリンパ球および多核白血球の浸潤、胆管障害、血管内皮炎がその 3 主徴となることを報告している。また、それぞれの項目で炎症および障害の程度についてグレード分類を行い、急性拒絶の程度を半定量化する試みがなされている<sup>30)</sup>。今回、各群間の組織学的急性拒絶の程度を数量的に比較検討するために、急性拒絶の組織所見の中で重要とされる、門脈領域の炎症細胞浸潤、中心静脈領域の炎症細胞浸潤、胆管上皮障害、門脈の血管内皮炎、中心静脈の血管内皮炎、肝細胞壊死の 6 項目を選定し、それぞれの項目を 5 段階にスコア化して比較検討を行った。今回の成績では、FK506 投与群では移植後 3, 7, 14 日目とも組織学的急性拒絶スコアはほぼ同値で推移しており、FK506 0.3mg/kg の投与により急性拒絶は十分に抑制されたものと思われる。これに対して、AA861 投与群では組織学的急性拒絶スコアは対照群に比べ有意に低値を示していたものの FK506 投与群に比べ高値であり、急性拒絶の抑制効果は組織学的にも不十分であると思われる。このことが移植後の生存日数の差に反映していたものと思われる。

FK506 のリンパ球サブセット (W3/25 陽性 T 細胞, OX8 陽性 T 細胞) に及ぼす影響について、Stephen ら<sup>43)</sup>は、羊赤血球にて免疫したラット脾臓内のリンパ球サブセットの検討で、FK506 の投与により非投与群に比べ CD8 陽性 T 細胞は増加

し、これにともなって CD4/CD8 比が減少することを報告している。Thompson ら<sup>40</sup> は、羊赤血球にて免疫したラット末梢血リンパ球サブセットの検討で、FK506 投与群では非投与群に比べ CD4 陽性 T 細胞数に差はないが、CD8 陽性 T 細胞が有意に増加することを報告している。また Ochiai ら<sup>41</sup> はラット心移植で、FK506 の投与により長期生存が得られたラットのリンパ球の投与により、移植心の長期生着が認められたことから、FK506 の投与により受容者のリンパ球内に供給者に特異的な抑制細胞の誘導がなされていると推測している。今回の実験では、FK506 投与群において移植後14日目の CD8 陽性 T 細胞の増加と CD4/CD8 比の減少が認められており、これらの報告と一致する所見がえられた。一方、LTB<sub>4</sub> のリンパ球サブセットに対する作用としては、LTB<sub>4</sub> は単球やシクロオキシングナーゼ代謝産物の存在下ではサプレッサー細胞の活性を誘導するが、インドメタシンによりシクロオキシングナーゼ経路が抑制された時にはヘルパー細胞活性が誘導され<sup>7</sup>、また LTB<sub>4</sub> により誘導されるサプレッサー細胞は OKT8 (+) T 細胞であることなどが報告されている<sup>40</sup>。また Jordan らは細胞レベルの実験で、PGE<sub>2</sub> はヘルパー T 細胞の増殖を抑制するが細胞障害性 T 細胞の増殖には影響を及ぼさないことを報告している<sup>3</sup>。しかし、これらの報告はいずれも細胞レベルでの検討であり、複雑な相互作用の存在が推測される生態内において、LTB<sub>4</sub> がリンパ球サブセットにおいてどのような影響を与えるかについてはこれまでに報告がなく詳細は不明である。今回の研究においては、AA861 投与群では薬剤非投与群に比べて移植肝に浸潤する T 細胞数は有意に減少しているが、FK506 投与群ほどには抑制されていない。また、リンパ球サブセットの検討においても移植後14日目の FK506 投与群にみられた CD8 陽性 T 細胞の増加と CD4/CD8 比の減少は認められなかった。すなわち、AA861 の投与のみでは、FK506 により十分な急性拒絶の抑制がなされた際の T 細胞増殖の抑制や CD8 陽性細胞の誘導は行われず、移植肝の組織学的所見や生存日数の比較において、FK506 投与群と AA861 投与群との差となって現われたと推測される。

FK506 は1989年に初めて臨床応用されて以来、多くの臨床での移植において使用されその有効性が報告される一方、CyA の場合と同様に腎毒性、精神障害、リンパ増殖症候群の合併などの副作用が報告されている<sup>47-49</sup>。これらの副作用は投与量に依存しており、副作用を軽減するためには投与量の減量が必要となる。今回の研究では、5-リポキシングナーゼ代謝阻害剤 (AA861) は免疫抑制効果においては FK506 ほどの効果を持たないが、FK506 とは異なるメカニズムにより免疫抑制効果を発揮すると推測された。従って、移植後の急性拒絶反応に対して FK506 に AA861 を併用投与することにより FK506 の投与量を減量し、FK506 の副作用を軽減できる可能性が推測された。

## 結 論

5-リポキシングナーゼ代謝阻害剤 (AA861) の移植後急性拒絶における免疫抑制機序を、アラキドン酸代謝産物の変動から検討し、さらに FK506 の作用機序と比較することを目的に、ラット異系肝移植モデルを用いて研究し以下の知見を得た。

1. AA861 の投与により移植後生存日数の延長が認められた。しかし、FK506 を投与した場合の移植後生存日数よりは有意に短かく、AA861 の投与のみでは移植肝の十分な免疫学的長期生着は誘導できなかった。

2. AA861 投与群では、薬剤非投与群に比べ有意な移植後血中 LTB<sub>4</sub> 値の低下と血中 PGE<sub>2</sub> 値の上昇が認められたが、FK506 投与群では AA861 投与群で認められた有意な血中 LTB<sub>4</sub> 値の低下および血中 PGE<sub>2</sub> 値の上昇は認められなかった。

3. 移植肝の組織学的所見の比較では、FK506 投与群では移植後 7, 14 日目を通じて急性拒絶反応は軽度であったが、AA861 投与群では薬剤非投与群に比べ拒絶反応は抑制されているものの移植後の経過とともに増悪する所見が認められた。これを門脈および類洞域の炎症性細胞浸潤、胆管上皮障害、中心静脈および門脈の血管内炎、肝細胞壊死の 6 項目についてスコア化した組織学的急性拒絶スコア (histological rejection score) で比較すると、FK506 投与群では薬剤非投与群や AA861 投与群に比べ有意に低値を示した。一方、AA861 投与群では移植後 7 日目では薬剤非投与群に比べ有意に低値であったが、移植後の経過とともに次第に増加を認め、組織学的所見からも AA861 の免疫抑制効果は不十分であった。

4. 肝組織内浸潤細胞の免疫組織学的検討では、AA861 投与群では全 T 細胞数は薬剤非投与群に比べ有意に減少していたが、FK506 投与群よりは高値であった。また FK506 投与群では AA861 投与群に比べ移植後14日目において CD8 陽性 T 細胞数の増加および CD4/CD8 比の有意な低下が認められた。

以上より AA861 の免疫抑制効果は FK506 に比べ不十分であるが、AA861 の免疫抑制機序としては LTB<sub>4</sub> の産生抑制とこれにともなう PGE<sub>2</sub> の上昇による T 細胞増殖の抑制が推測され、FK506 とは免疫抑制機序が異なることが示された。このことより移植後の急性拒絶反応において FK506 と AA861 を併用投与することによって FK506 の投与量を減量し、FK506 の副作用を軽減できる可能性が示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導および御教示をいただきました金沢大学医学部附属病院病理部野々村昭孝助教授および金沢大学医学部外科学第二講座 泉 良平講師に深謝致します。また御指導とご協力を頂きました教室の諸兄に深く感謝の意を表わします。

なお、本論文の要旨の一部は、第30回日本移植学会総会 (1994 年、広島) において発表した。

## 文 献

- 1) Jordan, M. L., Hoffman, R. A., Debe, E. F., West, M. A. & Simmons, R. L.: Prostaglandin E<sub>2</sub> mediates subset-specific effects on the functional responses of allosensitized T lymphocyte clones. *Transplantation*, 43, 117-123 (1987).
- 2) Rappaport, R. S. & Dodge, G. R.: Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 155, 943-948 (1982).
- 3) Jordan, M. L., Hoffman, R. A. & Simmons, R. L.: Further characterization of the subset-specific effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on T lymphocyte clone function. *Transplant. Proc.*, 19, 307-309 (1987).
- 4) Stobo, J. D., Kennedy, M. S. & Goldyne, M. E.: Prostaglandin E modulation of the mitogenic response of human T cells. Differential response of T-cell subpopulations. *J. Clin. Invest.*, 64, 1188-1195 (1979).

- 5) Jordan, M. L., Hoffman, R. A. & Simmon, R. L.: Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) augments IL<sub>2</sub>-dependent proliferation of T lymphocyte clones. *Transplant. Proc.*, 18, 224-227 (1986).
- 6) Atluru, D. & Goodwin, J. S.: Leukotriene B<sub>4</sub> causes proliferation of interleukin 2-dependent T cells in the presence of suboptimal levels of interleukin 2. *Cell. Immunol.*, 99, 444-452 (1986).
- 7) Pleszczynski, M. R. & Lemaire, I.: Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J. Immunol.*, 135, 3958-3961 (1985).
- 8) Pleszczynski, M. R., Chavallaz, P. A. & Lemaire, I.: Stimulation of interleukin 2 and interferon gamma production by leukotriene B<sub>4</sub> in human lymphocyte cultures. *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, 23, 207-210 (1986).
- 9) Perez, R. V., Babcock, G. F. & Alexander, J. W.: Immunoregulation of transfusion-induced immunosuppression with inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Transplantation*, 48, 85-87 (1989).
- 10) Iyobe, T., Izumi, R. & Shimizu, K.: The immunosuppressive effect of 5-lipoxygenase inhibitor on liver allotransplantation in rats. *Transplantation*, 56, 518-523 (1993).
- 11) Goto, T., Kino, T., Hatanaka, H., Nishiyama, M., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, M. & Imanaka, H.: Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant. Proc.*, 19 (suppl. 6), 4-8 (1987).
- 12) Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, M., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. & Ochiai, T.: FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces* II. Immunosuppressive effect of FK506 in vitro. *J. Antibiot.*, 40, 1256-1265 (1987).
- 13) Starzl, T. E., Todo, S., Fung, J., Demetris, A. J., Venkataramman, R. & Jain, A.: FK506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*, 28, 1000-1004 (1989).
- 14) Todo, S., Fung, J. J., Starzl, T. E., Tzakis, A., Demetris, A. J., Kormos, R., Jain, A., Alessiani, M., Takaya, S. & Shapiro, R.: Liver, kidney, and thoracic organ transplantation under FK506. *Ann. Surg.*, 212, 295-305 (1990).
- 15) Todo, S., Fung, J. J., Demetris, A. J., Jain, A., Venkataramanan, R. & Starzl, T. E.: Early trials with FK506 as primary treatment in liver transplantation. *Transplant. Proc.*, 22 (Suppl. 1), 13-16 (1990).
- 16) Wang, S. C., Morel, P. A., Wang, Q., Jordan, M. L., Simmons, R. L. & Tweardy, D. J.: A dual mechanism of immunosuppression by FK-506. Differential suppression of IL-4 and IL-10 levels in T helper 2 cells. *Transplantation*, 56, 978-985 (1993).
- 17) Kamada, N. & Calne, R. Y.: Orthotopic liver transplantation in the rat: Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*, 28, 47-50 (1979).
- 18) David, N. A.: The pharmacology of dimethyl sulfoxide 6544. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 12, 353-374 (1972).
- 19) Fennell, R. H., Shikes, R. H. & Vierling, J. M.: Relationship of pretransplant hepatobiliary disease to bile duct damage occurring in the liver allograft. *Hepatology*, 3, 84-89 (1983).
- 20) Snover, D. C., Sibley, R. K., Freese, D. K., Sharp, H. L., Bloomer, J. R., Najarian, J. S. & Ascher, N. L.: Orthotopic liver transplantation: A pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection. *Hepatology*, 4, 1212-1222 (1984).
- 21) Snover, D. C., Weisdorf, S. A., Ramsay, N. K., McGlave, P. & Kersey, J. H.: Hepatic graft versus host disease: A study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. *Hepatology*, 4, 123-130 (1984).
- 22) Snover, D. C., Freese, D. K., Sharp, H. L., Bloomer, J. R., Najarian, J. S. & Ascher, N. L.: Liver allograft rejection -An analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection. *Am. J. Surg. Pathol.*, 11, 1-10 (1987).
- 23) Knodell, R. G., Ishak, K. G., Black, W. C., Chen, T. S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T. W. & Wollman, J.: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1, 431-435 (1981).
- 24) Hancock, W. W., Sayegh, M. H., Sablinski, T., Kut, J. P., Weglinski, J. W. & Milford, E. L.: Blocking of mononuclear cell accumulation, cytokine production, and endothelial activation within rat cardiac allografts by CD4 monoclonal antibody therapy. *Transplantation*, 53, 1276-1280 (1992).
- 25) Goodwin, J. S., Bankhurst, A. D. & Messner, R. P.: Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. *J. Exp. Med.*, 146, 1719-1734 (1977).
- 26) Goodwin, J. S., Messner, R. P. & Peake, G. T.: Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro. *J. Clin. Invest.*, 62, 753-760 (1978).
- 27) Plaut, M., Marone, G. & Gillespie.: The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes: II. Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP active agents. *J. Immunol.*, 131, 2945-2952 (1983).
- 28) Baker, P. E., Fahey, J. V. & Munck, A.: Prostaglandin inhibition of T-cell proliferation is mediated at two levels. *Cell. Immunol.*, 61, 52-61 (1981).
- 29) Chouaib, S. & Fradelizi, D.: The mechanism of inhibition of human IL2 production. *J. Immunol.*, 129, 2463-2468 (1982).
- 30) Snyder, D. S., Beller, D. I. & Unanue, E. R.: Prostaglandins modulate macrophage I a expression. *Nature*, 299, 163-165 (1982).
- 31) Kamei, T., Callery, M. P. & Flye, M. W.: Intragastric delivery of 16, 16-dimethyl PGE<sub>2</sub> induces donor-specific

- tolerance in rat cardiac allograft recipients. *Transplantation*, 51, 242-246 (1991).
- 32) Anderson, C. B., Jaffee, B. M. & Graff R. J.: Prolongation of murine skin allografts by prostaglandin E. *Transplantation*, 23, 444-447 (1977).
- 33) Dahlen, S. E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Hammarstrom, S., Lindgren, J. A. & Samuelsson, B.: Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 3887-3891 (1981).
- 34) Hagmann, W., Steffan, A. M., Kirn, A. & Keppler, D.: Leukotrienes as mediators in frog virus 3-induced hepatitis in rats. *Hepatology*, 7, 732-736 (1987).
- 35) Keppler, D., Hagmann, W., Rapp, S., Denzlinger, C. & Koch, H. K.: The relation of leukotrienes to liver injury. *Hepatology*, 5, 883-891 (1985).
- 36) Trudell, J. R., Bendix, M. & Bosterling, B.: Hypoxia potentiates killing of hepatocyte monolayers by leukotrienes, hydroperoxyeicosatetraenoic acids, or calcium ionophore A23187. *Biochim. Biophys. Acta*, 803, 338-341 (1984).
- 37) Pleszczynski, M. R., Gagnon, L. & Sirois, P.: Leukotriene B<sub>4</sub> augments human natural cytotoxic cell activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113, 531-537 (1983).
- 38) Pleszczynski, M. R., Borgeat, P. & Sirois, P.: Leukotriene B<sub>4</sub> induces human suppressor lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108, 1531-1537 (1982).
- 39) Konishi, K., Watanabe, T., Yabushita, K., Hirosawa, H., Izumi, R. & Miyazaki, I.: Effect of lipooxygenase inhibitor (Nordihydroguaiaretic acid, NDGA) on canine pancreatic allografts. *Transplant. Proc.*, 23, 1681-1682 (1991).
- 40) Horichi, H., Izumi, R., Shimizu, K., Konishi, K., Kitabayashi, K., Watanabe, T. & Miyazaki, I.: Effect of 5-lipoxygenase inhibitor on canine pancreatic allotransplantation. *Transplant. Proc.*, 23, 1679-1680 (1991).
- 41) Ham, E. A., Soderman, D. D., Zanetti, M. E., Dougherty, H. W., McCauley, E. & Kuehl, F. A.: Inhibition by prostaglandins of leukotriene B<sub>4</sub> release from activated neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4349-4353 (1983).
- 42) Schultze, G., Stahl, P., Nigam, S., Sieber, G., Offermann, G. & Molzahn, M.: Effect of cyclosporine on the generation of prostanoids by cultured peripheral lymphocytes. *Transplant. Proc.*, 16, 1214-1217 (1984).
- 43) Stephen, M., Woo, J., Hasan, N. U., Whiting, P. H. & Thomson, A. W.: Immunosuppressive activity, lymphocyte subset analysis, and acute toxicity of FK-506 in the rat. *Transplantation*, 47, 60-65 (1989).
- 44) Thompson, A. W., Stephen, J., Woo, J., Hasan, N. U. & Whiting, P. H.: Immunosuppressive activity, T-cell subset analysis, and acute toxicity of FK-506 in rats. *Transplant. Proc.*, 21, 1048-1049 (1989).
- 45) Ochiai, T., Nakajima, K., Nagata, M., Hori, S., Asano, T. & Isono, K.: Studies on the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation*, 44, 734-738 (1987).
- 46) Atluru, D. & Goodwin, J. S.: Control of polyclonal immunoglobulin production from human lymphocytes by leukotrienes; Leukotriene B<sub>4</sub> induces an OKT8 (+), radiosensitive suppressor cell from resting, human OKT8 (-) T cells. *J. Clin. Invest.*, 74, 1444-1450 (1984).
- 47) Fung, J. J., Alessiani, M., Abu-Elmagd, K., Todo, S., Shapiro, R., Tzakis, A., Thiel, D. V., Armitage, J., McCauley, J. J., Selby, R. & Starzl, T. E.: Adverse effects associated with the use of FK506. *Transplant. Proc.*, 23, 3105-3108 (1991).
- 48) Nalesnik, M. A., Demetris, A. J., Fung, J. J. & Starzl, T. E.: Lymphoproliferative disorders arising under immunosuppression with FK506: Initial observations in a large transplant population. *Transplant. Proc.*, 23, 1108-1110 (1991).
- 49) Eidelman, B. H., Abu-Elmagd, K., Wilson, J., Fung, J. J., Alessiani, M., Jain, A., Takaya, S., Todo, S., Tzakis, A., Thiel, D. V., Shannon, W. & Starzl, T. E.: Neurologic complications of FK506. *Transplant. Proc.*, 23, 3175-3178 (1991).

