

新しい免疫抑制剤Cyclosporin Aの基礎的研究

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 塩原, 信太郎 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8994 |

新しい免疫抑制剤 Cyclosporin A の基礎的研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

塩 原 信 太 郎

(昭和57年7月23日受付)

新しい免疫抑制剤である cyclosporin A (CyA) の, 末梢リンパ球に対する免疫抑制効果と造血細胞に対する細胞毒性について研究した。CyA は, 直接細胞毒性がない濃度でリンパ球の増殖反応を濃度依存性に抑制した。CyA の最大の抑制効果は, CyA を phytohemagglutinin (PHA) 刺激リンパ球増殖反応の開始と同時に培養系に加えた場合に認められた。CyA をリンパ球増殖反応開始後 24 時間あるいは 48 時間後に加えた場合, 弱い抑制効果しか認めなかった。しかし, CyA と 72 時間, 前培養したリンパ球の PHA 増殖反応は, CyA を洗浄除去することによって回復した。CyA の T リンパ球 subsets に及ぼす抑制効果は, 実験に用いた T リンパ球の種類によって異なっていた。すなわち cytotoxic T 細胞の誘導に対しては, 非常に微量の CyA ($0.001 \mu\text{g/ml}$) を混合リンパ球培養系に加えることにより完全に抑制された。一方, 一旦誘導された cytotoxic T 細胞に対しては, CyA による抑制は認められなかった。concanavalin A (Con A) 刺激によって誘導される suppressor T 細胞に対しては, suppressor 活性を同種リンパ球の pokeweed mitogen (PWM) 誘導免疫グロブリン (Ig) 産生に対する抑制で検討すると, CyA は抑制効果を認めたが, 興味深いことに, 自己リンパ球の PWM 誘導 Ig 産生を抑制する自己リンパ球の suppressor T 細胞は, suppressor 活性が CyA によって抑制されず, CyA に抵抗性であった。in vitro Ig 産生で検討した helper T 細胞に対しても CyA は抑制効果を示した。T リンパ球 subset をこのように抑制する CyA の濃度は, それぞれの反応系で異なっていた。顆粒球系造血幹細胞に対する CyA の抑制効果は, リンパ球増殖反応を強く抑制する $8 \mu\text{g/ml}$ の濃度まで全く認められなかった。以上の成績から, CyA は, 可逆的な抑制効果を, リンパ球増殖反応の初期あるいは T リンパ球 subset の分化過程に発揮することが示唆される。さらに CyA は, 刺激されないリンパ球には作用せず又細胞毒性や骨髓毒性が少いと予想される。このように選択的でユニークな免疫抑制効果を有する CyA は臨床的臓器移植への応用にとって, 非常に有力で有望な薬剤と考えられる。

Key words Cyclosporin A, Immunosuppressive potential, Hematopoietic stem cell.

同種骨髄移植は, 急性白血病, 重症再生不良貧血に対する有力な治療法として既に確立されている¹⁾²⁾。同種骨髄移植は, 原則としてヒトの主要組織適合抗原である HLA の一致した同胞からの造血幹細胞の移植といえることができる。この場合, ドナーの造血幹細胞はただ生着するだけでは目的を達せず, 自己再生, 分化および増殖を行うことにより宿主の新しい造血機能を担うことになる。また造血幹細胞から分化するドナー由来の免疫担当細胞は, 拒絶を防ぐため移植前に施行された強力な免疫抑制療法によって破壊された宿主の免

疫系を再構築しなければならない。一方, 移植片 (graft) 中に含まれる成熟した免疫担当細胞, あるいは移植された造血幹細胞から宿主 (host) の環境下で分化成熟したドナー由来の免疫担当細胞が, 拒絶反応 (graft-rejection) とは逆に host の non-HLA 抗原を認識し, 細胞障害性 T 細胞となって惹き起こす移植免疫反応も生じ, これは graft-versus-host reaction (GVHR) と呼ばれる。ヒト同種骨髄移植後には種々の臓器を標的とする特異な症候が発現することが知られているが, これは移植免疫反応である GVHR によって惹き起される

In Vitro studies on the Immunosuppressive Activity of a New Agent, Cyclosporin A.
Shintaro Shiobara, Department of Medicine (III), Kanazawa University School of Medicine.

ものと理解されており、臨床的には graft-versus-host disease (GVHD) と呼ばれる⁹⁾⁴⁾。この GVHD は、それ自身が同種骨髄移植の重篤な合併症であるばかりではなく、移植後免疫不全状態を遷延化させる重要な原因と考えられている⁹⁾。したがって、この GVHD を予防ないし軽減するために、現在では methotrexate (以下 MTX と略す) の予防的投与が通常行われている。しかし MTX の予防的投与によっても GVHD は高頻度に生じ、また MTX の骨髄抑制作用による移植後の造血回復に及ぼす影響も無視できない。そこで、骨髄毒性が少なく、しかも GVHD を惹き起こす細胞障害性 T 細胞のみを選択的に抑制、あるいは除去する方法を見出すために、これまで種々の研究が行われてきた。

cyclosporin A (以下 CyA と略す) は *Cylindrocarpus lucidum* と *Trichoderma polysporum* の 2 種類の真菌から抽出された物質で、11 のアミノ酸からなる分子量 1202.6 の cyclic peptide である。Borel ら⁹⁾⁷⁾はこの物質がマウスの抗体産生機能を抑制することを見出し、その後臓器移植における拒絶反応に対しても著明な抑制効果を示すことを動物実験で明らかにした⁹⁾⁹⁾。ヒトにおいても腎移植の拒絶反応予防¹⁰⁾や、骨髄移植の GVHD 予防に試みられ¹¹⁾¹²⁾良好な成績が得られており、新しい免疫抑制剤として非常に注目されている。これまで行われた *in vitro* における基礎的検討の結果、CyA のリンパ球系細胞への作用選択性や抑制作用の可逆性が報告されてきたが¹³⁾¹⁴⁾、その作用機序や免疫抑制剤としての特徴はまだ充分に解明されたとはいえない。われわれは既に CyA の *in vitro* での基礎的検討を行い、造血幹細胞に対する抑制が全くみられない濃度で、CyA がリンパ球各種 mitogen 反応、および alloantigen に対する反応性を抑制する成績を得ており¹⁵⁾、その一部は本報告と重複することになるが、本論文では CyA の免疫抑制作用の特徴をさらに詳しく解明する目的で、CyA の T リンパ球 subset の各機能に及ぼす影響を検討したところ、各サブセットに対する抑制効果がそれぞれ異なるという成績を得たので、CyA の作用機序についての考察を加えて報告する。

材料及び方法

1) cyclosporin A

CyA は Sandoz 社 (Basel Switzerland) より基礎実験用に供与されたもので、以下の方法で溶解し実験に使用した。まず 2 mg の CyA を 0.1 ml のエタノールに溶解後、0.02 ml の tween 80 を加えよく攪拌しながら、ペニシリン G 100 μ /ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml を含む RPMI 1640 培養液 (GIBCO) を徐々に滴下し、2 mg/ml の濃度に調整し、使用時まで 4°C の冷暗

所に保存した。CyA を加えない溶媒を同様に調整し control 溶液とした。CyA の免疫抑制作用は、各種濃度の CyA を培養開始とともに培養系に添加することによって dose-dependency を、また一部の実験系では培養開始前後の一定時間添加培養することによって time-dependency を検討した。

2) 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) と T 細胞・B 細胞の分離

PBMC は健康成人から得たヘパリン加静脈血を、Ficoll-hypaque 法によって分離し、RPMI 1640 培養液で 3 回洗浄後、15% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) 加 RPMI 1640 培養液に 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させ、以下の実験に使用した。T 細胞 B 細胞の分離は、ノイラミダーゼ (ヘキスト社) 処理羊赤血球 (sheep red blood cells, SRBC) と前述の方法で得られた PBMC を、非動化した FCS にそれぞれ 1×10^8 /ml と 5×10^6 /ml の濃度に調整し、各々等量を加えて、200 g 5 分遠心し、4°C 60 分以上静置した。その後 pellet を静かに再浮遊し、Ficoll-hypaque に重層し、400 g 30 分遠心した。Ficoll-hypaque との境界にあたる E ロゼット非形成細胞を採取し、3 回洗浄してこれを B 細胞分画とし、一方採取した pellet は tris-NH₄Cl buffer で溶血させ 3 回洗浄して、これを T 細胞分画とした。それぞれの分画は、再度同様の操作で精製し T 細胞分画から精製 T 細胞分画を、又 B 細胞分画から精製 B 細胞分画を得た。こうして得られた精製 T 細胞分画は、E ロゼット形成細胞 (以下 E-RFC と略す) が 95% 以上で、EAC-ロゼット形成細胞 (以下 EAC-RFC と略す) の混入は 1% 以下であった。精製 B 細胞分画は、EAC-RFC が 50-60% で、E-RFC の混入は 5% 以内であった。

3) CyA の細胞毒性

CyA の細胞に対する直接毒性を色素排泄試験によって検討した。PBMC 浮遊液 (1×10^6 /ml) を小試験管に 0.5 ml づつ分注し、これに各種濃度の CyA を加え、5% CO₂、37°C、100% 湿度の条件下で一定時間培養を行った。培養終了後、PBMC 浮遊液 3 容に 1% trypan blue 1 容を加え、色素排泄能の有無によって死細胞を算定した。

4) SRBC および補体レセプターに及ぼす CyA の影響

3) と同様の培養を行った後に、洗浄することなく PBMC の E ロゼット及び補体レセプターに対するロゼット形成を橘らの方法¹⁶⁾に拠って検討した。

5) mitogen および alloantigen に対する反応性に及ぼす影響

2) で得られた PBMC 浮遊液 (1×10^6 /ml) を、0.2

ml づつ microtiter plate (Nunc) に分注し、これにあらじめ検討して得た至適濃度の phytohemagglutinin - P (PHA - P, Difco) 0.5 μ l/well, concanavalin A (con A, Boehringer) 2.5 μ g/ml, pokeweed mitogen (PWN, Difco) 10 μ l/well をそれぞれ加え、5% CO₂, 37°C, 100%湿度の条件下で 96 時間培養を行った。培養終了 10 - 12 時間前に 1 μ Ci ³H - thymidine (³H - TdR, New England Nuclear, specific activity 5 ci/mM) を加え、培養終了後 DNA 合成を³H - TdR の取り込みによって液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。time - dependency の検討には洗浄操作が加わるため、通常の試験管法¹⁷⁾にて行った。すなわち、得られた PBMC 浮遊液を 0.5 ml づつ各試験管に分注し、4.0 μ g/ml 濃度に CyA を加え一定時間培養し、その後 3 回洗浄し、mitogen 反応を行った。CyA と mitogen とを同時に培養系に加えた場合は 3 回洗浄して CyA を除去し再び mitogen を含む培養液に PBMC を再浮遊させ培養を続けた。CyA の抑制効果は、CyA を含まない溶解液をコントロールとして加え同じ操作を加えて行った場合の反応性を 100% として、

$$\% \text{inhibition} = \frac{\text{cpm control} - \text{cpm test}}{\text{cpm control}} \times 100$$

として算定した。

6) 造血幹細胞に及ぼす影響

顆粒球・マクロファージ系造血幹細胞である colony - forming units in culture (CFU - C) の測定は、Pike & Robinson の方法¹⁸⁾で検討した。この場合 CyA は plating medium に加え、培養は triplicate で 7.5% CO₂, 37°C, 100%湿度の条件下で行い、50 個以上の細胞からなるコロニー数を算定した。

7) helper T 細胞および suppressor T 細胞の誘導に及ぼす影響

抗体産生系における helper T 細胞機能、および Con A 刺激 suppressor T 細胞の誘導過程に及ぼす影響を検討するため Hirano らの方法²⁰⁾に準じ、PWM 誘導免疫グロブリン産生系を利用して検討した。2) で作製した 1 \times 10⁵ の B 細胞に、4 \times 10⁵ の T 細胞を加え 15% FCS 加 RPMI 1640 培養液 1 ml に浮遊した。この培養系に PWM 10 μ g/ml を加え、5% CO₂, 37°C, 100%湿度の条件下で 7 日間培養し、培養終了後 Kearney らの方法¹⁹⁾に準じて胞体内免疫グロブリン産生細胞(以下 Ig 産生細胞と略す) 数を、回収された細胞数と胞体内免疫グロブリン産生細胞の百分率の積とで算定した。Ig 産生細胞は、蛍光抗体法で細胞質内免疫グロブリンを染色する事によって行った。すなわち、回収した細胞を PBS にて 2 回洗浄し、1 \times 10⁶ - 2 \times 10⁶/ml に調整

し無蛍光のスライドガラス上に塗沫乾燥し、その後 5% 水酢酸加エタノールで -20°C 15 分固定し、cold PBS で充分洗浄後 FITC 標識ヤギ抗ヒト免疫グロブリン (IgA, IgG, IgM) 血清 (日本臓器, 原液を PBS にて 40 倍に希釈して使用) で染色した。蛍光顕微鏡 (オリンパス落射蛍光顕微鏡, BHS - RFA 型) で 500 個以上の細胞数を観察し Ig 産生細胞の百分率を算定した。helper T 細胞機能は、組み合わせる細胞中の suppressor T 細胞機能を除去する目的で、1500 rad の X 線照射を行った後使用した。一方、抗体産生系における suppressor T 細胞の評価は、Con A で誘導される suppressor T 細胞を用いて検討した²¹⁾。細胞 1 \times 10⁶/ml に Con A 20 μ l を添加し、48 時間から 72 時間培養後、培養液にて 3 回洗浄して得られた suppressor T 細胞を新たに用意した PBMC 3 \times 10⁶ に 1 : 3 の細胞比で加え全量を 1 ml の細胞浮遊液として PWM 誘導 Ig 産生に対する抑制によって評価した。CyA は suppressor T 細胞を誘導する Con A 反応系に加え、その誘導に対する効果を検討した。

8) 同種抗原誘導細胞障害性 T 細胞に及ぼす影響

混合リンパ球培養 (mixed lymphocyte reaction, MLR) によって誘導される細胞障害性 T 細胞の測定は、Lightbody らの方法²²⁾に従って、⁵¹Cr release を利用する cell - mediated lympholysis (CML) に拠って行った。まず bulk MLR として反応細胞浮遊液 6 ml (1 \times 10⁶/ml) に 1500 rad の X 線照射刺激細胞 1 \times 10⁶/ml を等量加え 25 ml の tissue culture flask (Falcon 3013) に入れ 37°C, 5% CO₂, 100%湿度の条件下で 8 日間培養した。細胞障害性試験に用いる標的細胞は MLR の刺激細胞と同一人の PBMC を PHA と 3 日間培養して得られる PHA blast とし、この PHA blast を 3 回洗浄後、5 \times 10⁷/ml に調整し、その 0.2 ml に NaCr⁵¹O₄ (250 - 500 mCi/mg, RCC Amersham) 100 μ Ci を加え、60 分 water bath にて振とう混和した。このようにして得られた⁵¹Cr で標識した標的細胞は、培養液にて 3 回洗浄後、使用時まで 0°C の冷暗所に保存した。⁵¹Cr release assay による細胞障害性試験は、マイクロプレート法で行った。まず effector cells と target cells は 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1 の細胞比 (以下 E : T 比と略す) に調整し U 型のマイクロタイタープレート (Nunc) に最終容量 0.2 ml になるように加え、100 g 1 分遠心後 5% CO₂, 37°C, 100%湿度の培養器で 4 時間反応させ、反応終了後 500 g 5 分遠心し上清 100 μ l を採取した。培養液を加え全量を 1.1 ml としてからウエル型 γ - カウンター (アロカ) にて⁵¹Cr の放射活性を測定した。maximum release と spontaneous release は target cells に 1N HCL と培養液をそれぞれ 0.1 ml づつ加え、

同様の操作を行って測定した。CyA は effector を誘導する MLR の培養系と、effector cells と target cells を加えた細胞障害性の反応系に、それぞれ添加し抑制効果を検討した。

9) T 細胞の自己 non T 細胞を認識し増殖する autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) に及ぼす CyA の抑制効果

AMLR は Palacios らの方法²⁷⁾に準じて行った。つまり 2) で得られた T 細胞 1×10^5 と、1500 rad の X 線照射した自己 B 細胞 1×10^5 を 15% 非動化ヒトプール血清加 RPMI 1640 培養液 0.2 ml に加え、5% CO₂, 37°C, 100% 湿度の条件下で 7 日間培養した。各種濃度の CyA は培養開始と同時に添加し、その効果を培養終了 24 時間前に加えた ³H - TdR 取り込みによる DNA 合成で検討した。

成 績

1) CyA の細胞毒性 (図 1)

CyA の細胞毒性の検討では、培養 48 時間までは、CyA 50 μ g/ml の濃度でも PBMC のうち trypan blue に染まるのは 10% 以内であった。72 時間では、control の死細胞が 5% 以内であったのに比べ CyA 50 μ g/ml で 50%, 100 μ g/ml では 85% の死細胞が観察された。この結果から、以下の大部分の実験は、CyA の直接的な細胞毒性のみられない 10 μ g/ml 以下の濃度で行った。

2) CyA の E および EAC ロゼット形成能に及ぼす作用 (図 2, 3)

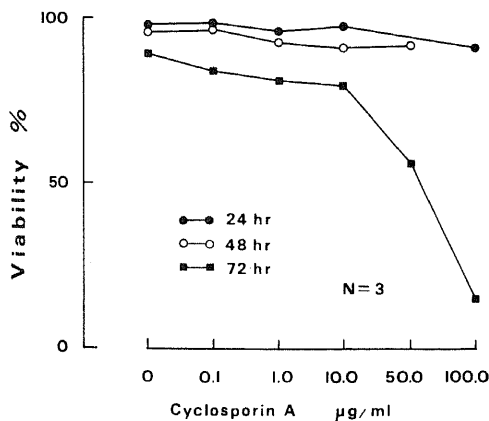


Fig. 1. Direct cytotoxicity of cyclosporin A (CyA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated with various concentrations of CyA for 24, 48 and 72 hr, respectively. Viability of the CyA treated cells was evaluated with trypan-blue dye exclusion test.

図 2 は各種濃度の CyA と 48 時間 preincubation を行った PBMC の E および EAC ロゼット形成能を検討した成績である。図 2 から明らかな様に 48 時間の preincubation では、50 μ g/ml の濃度まで CyA はロゼット形成能について control との差を認めなかった。またペルオキシダーゼ陽性細胞数も変動しなかった。図 3 は CyA 8 μ g/ml を添加培養し、E および EAC ロゼ

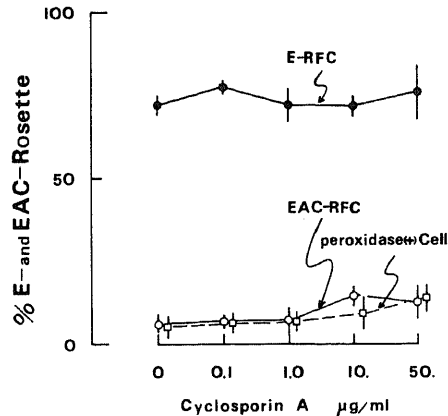


Fig. 2. Dose-dependent effect of CyA on sheep erythrocyte (E) and complement receptors of lymphocytes. After 48 hr incubation of PBMC with various concentrations of CyA, PBMC were tested for their E- and EAC(erythrocyte-antibody-complement)-rosette forming capacity. Each points represent mean \pm SD in 5 experiments. E-RFC, E. rosette forming cells; EAC-RFC, EAC rosette forming cells.

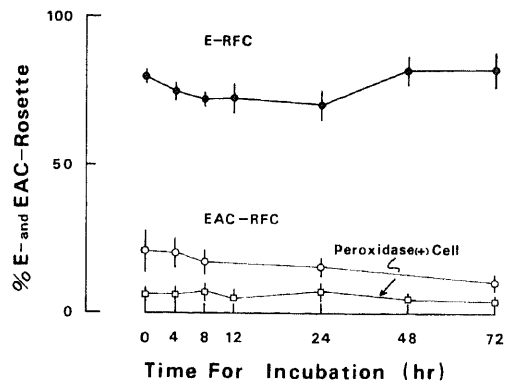


Fig. 3. Time-dependent effects of CyA on E and complement receptors. After incubation of PBMC with 8 μ g/ml of CyA for various duration of time, PBMC were tested for E and EAC-rosette formation. Each points represent mean \pm SD in 5 experiments.

ット形成能を経時的に測定した成績を示したものである。CyA 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、72 時間の incubation によって E・EAC ロゼット形成細胞の値は、やや動揺するもののロゼット形成能に有意の変化はみとめられなかった。このように CyA は非刺激リンパ球に添加培養しても、膜表面の補体レセプターや羊赤血球に対す

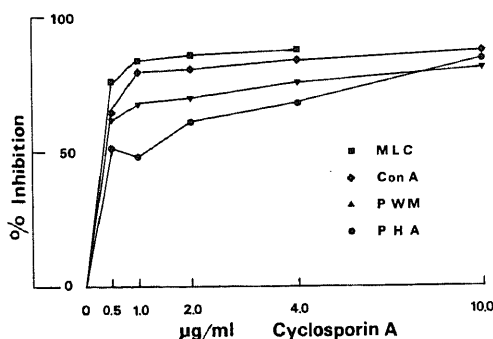


Fig. 4. Dose - dependent inhibitory effect of CyA on proliferation of PBMC when stimulated by mitogens and alloantigens. MLC, mixed lymphocyte culture; Con A, Concanavalin A; PWM, pokeweed mitogen; PHA, phytohemagglutinin.

% inhibition =

$$\frac{\text{cpm}(\text{control}) - \text{cpm}(\text{test})}{\text{cpm}(\text{control})} \times 100$$

Counts of incorporated [^3H] - thymidine per minute

るレセプターに変化を及ぼさなかった。

3) CyA の mitogen および alloantigen に対する反応性に及ぼす効果 (図 4, 表 1)

図 4 は各種濃度の CyA を培養開始と同時に培養系に加え、mitogen および alloantigen に対する反応抑制効果を検討したものである。抑制率は CyA を含まない溶媒添加培養における ^3H - TdR の取り込みを 100% として % inhibition で示した。まず、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではいずれの反応も 50% 以上の抑制がみられた。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度から 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度までは、各反応に対する CyA の抑制率に差が認められる傾向にあり alloantigen 反応に対しては、PHA 反応に対してより強い抑制が示された。しかし 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、それぞれの反応は何れも著明な抑制をうけ、抑制率は 85% - 95% で、各反応に対する CyA の抑制率に差を認めなかった。表 1 は CyA の PHA 反応に及ぼす影響を時間経過とともに検討した成績である。PHA 反応開始時から CyA 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、72 時間培養した場合 PHA 反応性に対する抑制率は 58% となり最も強い抑制が観察された。しかし PHA 反応開始 24 時間目に CyA を添加し、その後 48 時間培養した場合は 25%、48 時間後に添加した場合は、8.5% の抑制しか認められなかった。次に preincubation による抑制効果を検討すると、CyA 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 72 時間 preincubation し、3 回洗浄した後 PHA 反応を行うと 28% の抑制しか認められず、48 時間の preincubation では 29%、24 時間では 21% の抑制

Table 1. Time dependent effects of CyA on PHA response of lymphocytes. Minus time means preincubation period.

| Period of Incubation with CyA, hr | ^3H -TdR Incorporation cpm | | % Inhibition** |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------|
| | without CyA | with CyA | |
| -72 - 0* | 30,986 \pm 1,016 | 22,149 \pm 3,469 | 28% |
| -48 - 0 | 32,257 \pm ,773 | 22,746 \pm ,802 | 29% |
| -24 - 0 | 28,037 \pm ,225 | 21,978 \pm 1,198 | 21% |
| 0 - 72 | 19,783 \pm 1,078 | 8,160 \pm 2,016 | 58% |
| 24 - 72 | 23,708 \pm 1,634 | 17,559 \pm 1,099 | 25% |
| 48 - 72 | 22,480 \pm ,603 | 20,569 \pm 1,071 | 8.5% |

* 0 indicates the starting time of culture

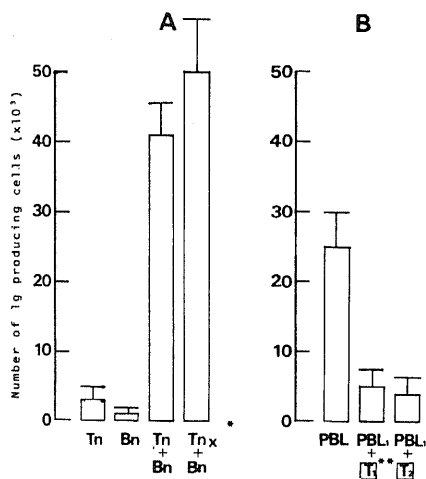
** % inhibition = $\frac{\text{cpm control} - \text{cpm CyA added}}{\text{cpm control}} \times 100$

Table 2. Effects of CyA on colony-forming units in culture (CFU-C).
CFU-C were assayed in the presence of various concentrations of
CyA in the semi-solid agar for colony growth.

| CyA Concentrations , $\mu\text{g/ml}$ | CFU-C/ 2×10^5 BM* Cells | % Inhibition** |
|--|-------------------------------------|----------------|
| 0 | 69 ± 19 | 0 |
| 0.25 | 73 ± 15 | -5.8% |
| 0.5 | 69 ± 9 | 0 |
| 1.0 | 68 ± 18 | 1.4% |
| 2.0 | 65 ± 10 | 5.8% |
| 4.0 | 63 ± 17 | 8.7% |
| 8.0 | 71 ± 12 | -2.9% |

* Bone marrow

$$\text{** \% Inhibition} = \frac{\text{CFU-C control} - \text{CFU-C CyA added}}{\text{CFU-C control}} \times 100$$



* x: 1500 rad X-ray treated ** □: Con-A treated

Fig. 5. A: Helper T and suppressor T cell activities in PWM-induced immunoglobulin (Ig) synthesis. Helper T cell function was assayed by counting increased Ig-producing cells in co-culture system of normal B cells (Bn) and 1,500rad irradiated normal T cells (Tnx). B: suppressor T cell function was assayed by counting decreased Ig-producing cells in co-culture system of peripheral blood lymphocyte (PBL) and Con A stimulated, autologous (T₁) or allogeneic (T₂) T cells. PBL₁ and T₁ were obtained from the same donor.

であった。成績は示さなかったが、preincubation後の洗浄回数と CyA の除去される程度を検討した予備実験では、CyA の抑制効果は、3 回の洗浄までは回数につれて減少したが、それ以上の洗浄は、抑制効果に影響がみられなかった。

4) CyA の CFU - C に及ぼす影響 (表 2)

mitogen および alloantigen 反応が著明に抑制される CyA 8 $\mu\text{g/ml}$ 以下の種々の濃度で、CFU - C に及ぼす影響を検討した。表 2 から明かなように、CFU - C は少なくとも検討した範囲では CyA によって全く抑制をうけなかった。

5) CyA の helper T 細胞機能と suppressor T 細胞の誘導に及ぼす抑制効果 (図 5, 6, 7, 8)

図 5 - A は PWM で誘導される Ig 産生細胞数を示したものである。まず正常 T 細胞 (Tn) のみでは Ig 産生細胞は $3.2 \pm 2 \times 10^3$ (n=10) で、B 細胞 (Bn) のみでは Ig 産生細胞は 1.0 ± 0.5 (n=10) であった。一方、(Tn+Bn) の組み合わせでは、 $41 \pm 4.3 \times 10^3$ (n=10) の Ig 産生細胞が誘導され、さらに放射線照射した T 細胞 (Tnx) を加えた Tnx+Bn の組み合わせでは Ig 産生細胞数は $49 \pm 8 \times 10^3$ (n=10) であった。このように Tnx+Bn によって出現する Ig 産生細胞数を helper T 細胞機能の指標とした。加える T 細胞が自己のでも、他人の T 細胞でも差が認められず、この helper T 細胞機能は、helper T 細胞と Ig 産生細胞の間の HLA の

差異による影響をうけなかった。suppressor T 細胞機能は、図 5-B に示すように Con A 誘導 suppressor T 細胞 1×10^5 を T, B 細胞に分離する前の PBMC 3×10^5 に加え、7 日間培養することによって Ig 産生細胞数は $25 \pm 5 \times 10^3$ ($n=10$) から $5 \pm 2.5 \times 10^3$ (T_1 , $n=5$) または $4 \pm 3 \times 10^3$ (T_2 , $n=5$) へと減少した。この減少した Ig 産生細胞数 $21 \pm 4 \times 10^3$ ($n=10$) を suppressor T 細胞機能の指標とした。加える T 細胞が自己のもの (T_1) でも、あるいは又他人のもので (T_2) でも抑制の程度は変化しなかった。したがってこの実験系では suppressor T 細胞機能も helper T 細胞機能と同

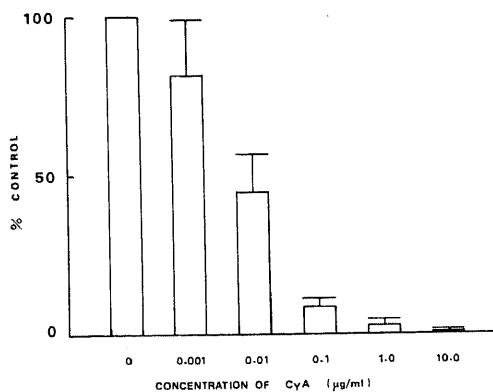


Fig. 6. Dose - dependent inhibitory effects of CyA on helper T cell function in PWM - induced Ig synthesis. PWM induced Ig producing cells were assayed in the presence of various concentrations of CyA.

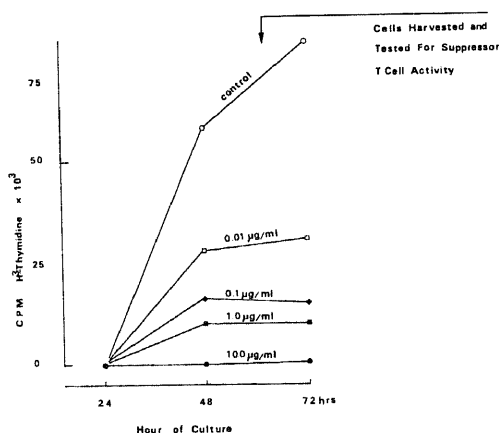


Fig. 7. Dose - dependent inhibitory effects of CyA on proliferation of concanavalin A (ConA) stimulated T cells.

様に HLA の一致を必要としないと考えられた。図 6 は helper T 細胞に及ぼす各濃度別の CyA の抑制を示したものである。図から明かなように、helper T 細胞機能は CyA によって dose - dependent に抑制され 0.01 μg/ml ではほぼ 50%, 0.1 μg/ml で 90% 以上の抑制が認められた。このさい B 細胞と組み合わせた X 線照射 T 細胞は、B 細胞と同種の場合も、自己の場合も、CyA の抑制率に差はなかった。図 7 は suppressor T 細胞を誘導する Con A 刺激培養系に各種濃度の CyA を加え、T 細胞の Con A による増殖反応に対する CyA の抑制効果を示したものである。Con A 刺激 T 細胞の DNA 合成に対する抑制率は、培養 48 時間目では CyA の 0.01 μg/ml 添加で control の約 50%, 0.1 μg/ml で 70%, 1.0 μg/ml で 80%, 10.0 μg/ml ではほぼ 100% であった。この CyA の Con A 反応に及ぼす影響は 72 時間目でも 48 時間培養の場合に比べて抑制はやや強くなったがほぼ同様の傾向を示し、CyA の各濃度に依りて Con A 刺激 T 細胞の増殖反応は抑制された。そこで、CyA と 48 - 72 時間培養した T 細胞を採取し、3 回洗浄後新たに用意した PBMC の PWM 誘導 Ig 産生の系に加えその suppressor T 細胞機能を測定した。図 8 は、そのような方法で、CyA とともに培養した Con A 誘導 suppressor T 細胞の PWM 誘導 Ig 産生に及ぼす影響を検討した成績を示したものである。control 溶液 (CyA 0 μg/ml) を加えて得た Con A 刺激 suppressor T 細胞の自己 PWM 誘導 Ig 産生に対する抑制を

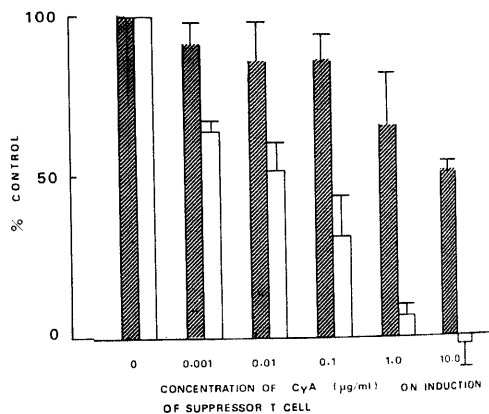


Fig. 8. Effects of CyA on induction of suppressor T cells by ConA. T cells stimulated by Con A in the presence of CyA (Fig. 7) were added to PWM induced Ig synthesis systems. Hatched column, suppressor activity of Con A stimulated autochthonous T cells (T_1); open column, suppressor activity of Con A stimulated allogeneic T cells (T_2).

100%とすると、0.001, 0.01, および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では、CyA 添加にも拘らず ConA 誘導 suppressor T 細胞の Ig 産生抑制は、コントロールの 80%以上認められ、1.0 $\mu\text{g/ml}$ でも約 70%の、また Con A 刺激 T 細胞の増殖が 100%抑制される 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも Ig 産生抑制はコントロールの 50%しか認められなかった。このように CyA は Con A による T 細胞の増殖と suppressor T 細胞の誘導に対して異なる抑制効果を示し、少なくとも自己 PBMC の Ig 産生系に対する suppressor T 細胞の誘導には、抑制効果は少ないという結果が得られた。一方、同種の PBMC の PWM 誘導 Ig 産生に対する suppressor T 細胞の誘導に及ぼす CyA の影響を検討すると、CyA 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で Ig 産生抑制は 50%の、1.0 $\mu\text{g/ml}$ で 10%、10 $\mu\text{g/ml}$ では Ig 産生抑制はコントロールにくらべてほぼ消失し、少なくとも同種 PBMC の Ig 産生に対する suppressor T 細胞機能は CyA によって dose-dependent に抑制されるという成績が得られた。Con A による T 細胞増殖に対する抑制効果と suppressor T 細胞の誘導に対する抑制効果とは、自己 PBMC の Ig 産生の場合と異りほぼ平行する傾向がみられた。このように Con A で誘導される suppressor T 細胞は、誘導の過程で CyA で処理することにより、自己と同種の PBMC の Ig 産生に対する抑制効果に差が認められ、また自己 PBMC の Ig 産生を抑制する Con A 誘導 suppressor T 細胞は ConA によって増殖する T 細胞に比べ CyA に対する感受性が低いことが示された。

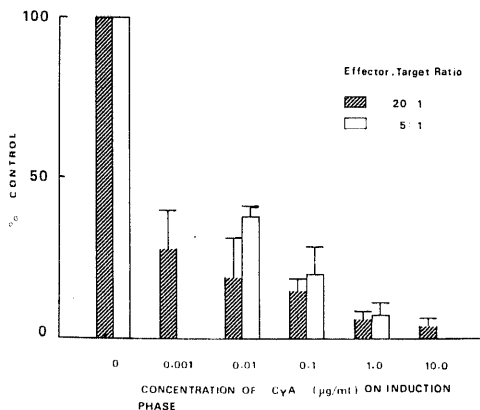


Fig. 9. Effects of CyA on induction of cytotoxic T cells in mixed lymphocyte reaction (MLR). Responder cells stimulated by alloantigens in the presence of CyA used as effector cells in cytotoxic assays. Alloantigens used as stimulator cells in the induction of cytotoxic T cells, and target cells in cytotoxic assays were obtained from the same donor.

6) CyA の細胞障害性 T 細胞機能に及ぼす効果 (図 9, 10)

基礎的検討では、 2×10^4 の PHA blast を標的細胞とした場合、maximum release 1723 ± 162 cpm, spontaneous release 133 ± 41 cpm で、spontaneous release は、maximum release の 10%を超えることはなかった。E:T 比を 5:1, 10:1, 20:1, と増加させた場合、細胞障害性はそれぞれ $13 \pm 4\%$, $24 \pm 2.2\%$, $35 \pm 2\%$ となり細胞障害性は、加える cytotoxic T 細胞に dose-dependency を示した。図 9 は、cytotoxic T 細胞を誘導する MLR に CyA を加え、8 日間培養後 3 回洗浄して標的細胞に対する細胞障害性を ^{51}Cr release assay で検討した結果である。CyA 添加により cytotoxic T 細胞の誘導は dose-dependent に抑制された。CyA の抑制効果を effector 細胞の数を変えて検討すると、E:T 比 20:1 の場合、斜線入りの棒で示すように CyA 0.001 $\mu\text{g/ml}$ で 75%, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で 90%以上の抑制が認められた。E:T 比 5:1 では白い棒で示すように 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で 60%と抑制の低下がみられたが、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では E:T 比 20:1 の場合と同程度の抑制が認められた。このように、CyA は cytotoxic T 細胞の誘導に対し強い抑制を示した。そこで次に一旦誘導された cytotoxic T 細胞に対する CyA の抑制効果をみる為に、CyA を ^{51}Cr release assay の系に加えその効果を検討した。図 10 は、MLR によって誘導した cytotoxic T 細胞と標的細胞の比を 20:1 とし、培養液に CyA を加え、CyA が cytotoxic T 細胞の標的細胞に対する傷害性を抑制するかどうか検討した成績を示したものである。図 10 に示されるように、CyA はそ

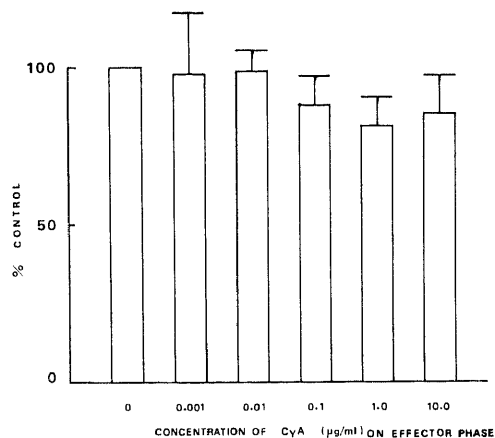


Fig. 10. No effects of CyA on cytotoxic T cells, generated by allogeneic stimulator cells in MLR. Cytotoxic T cells were assayed an effector to target ratio of 20:1 in ^{51}Cr release assays.

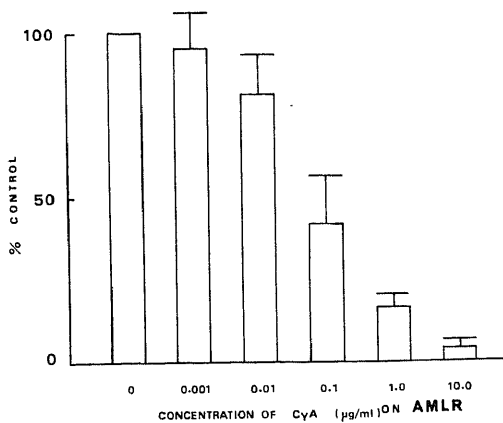


Fig. 11. Effects of CyA on autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR). Various concentrations of CyA were added to the culture medium of T cells with autologous B cells.

の濃度を 10 $\mu\text{g/ml}$ まで増加させても全く抑制効果が認められなかった。また E:T 比を 5:1 にしても同様の成績が得られた。このように誘導されるべき cytotoxic T 細胞の前駆細胞と、一旦誘導された cytotoxic T 細胞に対する CyA の抑制効果は全く異なる結果が得られた。

7) AMLR に及ぼす CyA の抑制効果

図 11 は AMLR の反応系に培養開始と同時に各種濃度の CyA を加え、自己の DR 抗原に反応して増殖する T 細胞に対する CyA の抑制効果を示したものである。図から明らかなように、CyA は dose-dependent な抑制効果を示し抑制の程度は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で 50%, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 90% の抑制率であり、これは CyA の MLR に対する抑制率とほぼ一致する成績であった。

考 察

本研究から、CyA は種々の in vitro における免疫学的反応性に対して強力な抑制作用を有することが明らかとなったが、その抑制作用や抑制の程度は検討対象である免疫反応の種類や CyA を作用させるタイミングによって大きく左右される。これは骨髓毒性を示さない点とともに従来の免疫抑制剤とは大きく異なる点であり、CyA は抑制作用にある程度選択性を有する新しい型の免疫抑制剤といえよう。

CyA は各種 mitogen および alloantigen によって刺激された PBMC の増殖反応に対し、直接細胞毒性が認められない濃度で dose-dependent な抑制効果が認められた。dose-dependent な抑制効果は、他の研究者¹³⁾¹⁴⁾²³⁾³⁴⁾³⁹⁾⁴⁰⁾によっても報告されている。しかし、そ

の抑制の程度は各研究者間で必ずしも一致していないようである。たとえば PHA 反応性を 50% 抑制する CyA の濃度で比較すると、われわれの成績は 0.5 $\mu\text{g/ml}$ から 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 50% 抑制が得られたが、これは 1.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度とする Hess らの報告²³⁾と類似した成績であった。しかし White らの報告¹³⁾では CyA 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 、Deeg らの報告³⁹⁾では 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 50% 抑制が得られており、われわれの得た成績の 1/10~1/20 の低濃度であった。このように同じ PHA 反応に対して同程度の増殖抑制効果を得るのに必要な CyA の濃度が異なる理由は明らかではないが、各研究者によって培養条件がそれぞれ異なること、CyA を溶解する溶媒の差異以外に、各々の研究者が実験に使用した PBMC の種による差異にもあるのではないかとと思われる。Hess ら²³⁾はヒトの PBMC を使用し、われわれの得た成績と似かよった成績を示しているが、Deeg ら³⁹⁾は犬の、White ら¹³⁾はサル PBMC を使用して検討している。

つぎに、CyA の抑制作用が CyA を作用させる時期によって異なるかどうかを PHA 反応で検討した。その結果 (表 1)、CyA を PHA 添加と同時に培養系に加え CyA の存在下で PHA 反応を行った場合に、最も強い抑制が認められ、培養開始 24 時間以降に CyA を添加しても CyA の PHA 反応に対する抑制作用は効果的ではなかった。同様の成績は Leoni ら¹⁴⁾White ら¹³⁾Hess ら²²⁾によっても報告されており、CyA の抑制作用は mitogen 刺激によって惹き起される PHA 反応性細胞の増殖の初期に発揮されるものと考えられる。また DNA 合成がピークに達する培養 48~72 時間に CyA を添加しても抑制がほとんどみられないことから、CyA は DNA 合成を阻害する作用を有しないと考えられる。Hess ら²³⁾も PHA 反応および ConA 反応において CyA 添加時期と抑制効果との関係を詳細に検討し、培養開始 2 時間以内に CyA を添加した場合に最も強い抑制が得られたという。Deeg ら³⁹⁾も犬のリンパ球を用いてほぼ同様の成績を報告している。さらに、増殖反応に特別な刺激を必要としない T 細胞白血病の継代培養株に対しても CyA が抑制効果を示す成績⁴²⁾を考えあわせると、CyA は PHA 刺激が細胞に伝達される過程ではなく、PHA 刺激を受けとった反応細胞が増殖を開始するための変化をおこす時期を選択的に抑制する可能性が示唆される。このように CyA の抑制効果が mitogen 刺激後の増殖反応のごく初期に作用することは、従来の免疫抑制剤ではみられない点であり、CyA のもつ免疫抑制剤としてのユニークな特徴といえる。さらに注目されることは、PHA 添加前に CyA を作用させる、即ち CyA と preincubation を行った後洗浄して、PHA

反応を行うと PHA 反応が約 70% まで回復しうる成績が得られることである (表 1)。この成績は CyA の作用が可逆的であることを示しておりこれは¹²⁵I でラベルされた CyA が徐々にリンパ球膜表面から遊離するという Leoni ら¹⁴⁾の観察によっても支持される。mitogen や alloantigen 刺激によって増殖反応を示すのは主として T リンパ球であるが、近年めざましい進歩を遂げた免疫学の成果から、T リンパ球はその表面形質や機能の異なる種々の T リンパ球によって構成されていることが明かになっている²¹⁾⁴⁴⁾。そこで T リンパ球 subset 機能に及ぼす CyA の影響を検討したところ、CyA は T リンパ球の増殖反応に対する効果とは異なり、以下に述べるようにきわめて興味ある抑制効果を有することが明らかになった。

MLR によって誘導される cytotoxic T 細胞は拒絶反応を惹き起す細胞として注目され、MLR-CML という免疫反応系は拒絶反応の in vitro モデルと考えられている。この系を利用して cytotoxic T 細胞を誘導する場合の CyA の抑制効果を検討してみると、CyA は 0.001 $\mu\text{g/ml}$ というきわめて低い濃度で 50% の抑制を示した。しかし、一旦誘導された cytotoxic T 細胞には、10,000 倍の濃度の 10 $\mu\text{g/ml}$ でも全く抑制効果が認められなかった。cytotoxic T 細胞の誘導を 50% 抑制する CyA の濃度は、Hess ら²⁴⁾によれば 0.016 $\mu\text{g/ml}$ から 0.064 $\mu\text{g/ml}$ 、Keown ら²⁸⁾によれば 0.0975 $\mu\text{g/ml}$ と、各研究者間で成績が異っているが、一旦誘導された cytotoxic T 細胞に対しては、われわれの成績と同様に、Hess ら²³⁾は 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで、Keown ら²⁸⁾は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで検討し、全く抑制が認められない成績を報告している。従って CyA は cytotoxic T 細胞の誘導過程にのみ、非常に微量で抑制効果を発揮すると考えられた。この CyA の特徴は、拒絶反応の予防のために使用する免疫抑制剤としては、好都合な点であり、実験動物^{8,9)}やヒトの臓器移植^{10)~12)45)46)}においてすぐれた免疫抑制効果を示す in vitro での根拠といえよう。MLR の増殖過程に対する CyA の抑制効果と cytotoxic T 細胞誘導に対する抑制効果を相互に比較してみると、われわれの得た成績では Wang ら⁴⁰⁾や Keown ら²⁸⁾の成績とは異なり、cytotoxic T 細胞誘導を 50% 抑制するのに必要な CyA の濃度は、MLR を同程度抑制するのに必要な CyA の濃度の 1/50~1/100 の濃度であった。Hess ら²²⁾もわれわれと同じ実験系で、CyA の MLR に対する抑制効果と、cytotoxic T 細胞誘導に対する抑制効果を検討しており、その結果 MLR を 50% 抑制する CyA の濃度 0.064 $\mu\text{g/ml}$ では、cytotoxic T 細胞誘導を 70~80% 以上抑制する成績を得ている。以上の結果から CyA は、MLR の増殖過程に対

して抑制効果を及ぼす濃度よりも低濃度で cytotoxic T 細胞の誘導過程に抑制効果を示すと考えられる。AMLR に対しても CyA は MLR に対してと同程度の抑制を示す成績 (図 11) が得られたが、同様の成績は Palacios ら²⁷⁾⁴¹⁾によっても報告されている。彼らは、B 細胞の膜表面上の DR 抗原を認識する、T 細胞膜表面上のレセプターを CyA が阻害することによって AMLR が抑制されると報告しているが、この考えによれば、DR 抗原と SD 抗原の相違を認識して誘導される cytotoxic T 細胞⁴⁸⁾に微量で抑制効果を示した成績をよく説明できるように思われる。

次に CyA の suppressor T 細胞誘導に及ぼす効果を検討してみると、Con A 添加培養における T 細胞の増殖反応は、Con A 10 $\mu\text{g/ml}$ で 100% 抑制された (図 7) が、この増殖抑制をうけた T 細胞は自己の PBMC の Ig 産生を 50% 抑制する suppressor T 機能を有していた (図 8)。これらの成績から、ConA に反応して増殖する T 細胞と Con A によって誘導される Ig 産生抑制 T 細胞が CyA に対して異なる感受性を持つことが示唆される。CyA が T リンパ球に直接作用して suppressor 機能を有する報告⁴⁹⁾も認められるが添加する CyA を増加させるにつれて、誘導される抑制 T 細胞による Ig 産生抑制効果が漸減することにより、CyA の直接的な抑制機能亢進作用は否定できる。また使用した T 細胞中に単球の混入は 0.5% 以下であることから、単球による Ig 産生抑制の可能性はほとんど考えられない。したがって自己の Ig 産生を抑制する suppressor T 細胞の ConA による誘導は、CyA で抑制されにくいものと思われる。Con A 刺激によって誘導される suppressor T T 細胞機能に対する CyA の抑制効果を Ig 産生系で検討した報告は、これまで全くみられないが Leapman ら²⁹⁾³⁰⁾は、PHA, Con A, PWM の各 mitogen 反応系と MLR を利用して CyA の Con A 刺激 suppressor 機能に及ぼす効果を検討し、CyA 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、Con A による増殖反応は 90% 抑制されるにもかかわらず、suppressor 機能に対しては全く抑制が及ばない成績を示している。同様の成績は、動物実験でも報告されている³¹⁾。Sakane ら³²⁾は、Con A によって刺激される T 細胞の中で、DNA 合成を認めない分画にも、mitogen 反応と MLR を抑制する suppressor 機能を有する T リンパ球が含まれる成績を報告しているが、このことは、われわれや、又 Leapman ら²⁹⁾³⁰⁾の検討した Con A 誘導 suppressor T 細胞が Con A に反応して増殖する T 細胞の population に含まれず、したがって CyA の影響をあまり受けないとすれば矛盾しないと考えられる。しかしさらに注目すべきは、このように CyA の存在下で Con A とともに培養された T 細胞が、自己の抗体

産生には弱い抑制作用しか示さないにもかかわらず、他人の PBMC による Ig 産生系に対しては, suppressor 機能が認められない強い抑制効果を示した。つまり CyA は Con A に反応して増殖する T 細胞を抑制するのと同じ程度に、同種リンパ球の抗体産生を抑制する suppressor T 細胞の Con A による誘導を効果的に抑制するということである。これらの成績から、CyA は、Con A 刺激によって活性化される T 細胞のうち、自己リンパ球の抗体産生抑制 T 細胞の分化には効果的な抑制を示さないものと考えられる。われわれの検討した Con A 刺激 suppressor T 細胞には heterogeneity の存在することが知られているが³²⁾、CyA の作用が既に述べたように活性化された T リンパ球の増殖反応における初期過程を抑制すると考えれば、増殖反応を必要とする suppressor T 細胞は、CyA によって抑制されるが、増殖反応を必要としない suppressor T 細胞は CyA の抑制効果をまぬかれる結果とも考えられ、CyA の作用機序を知る上で非常に興味深い点と思われる。

helper T 細胞機能に対する CyA の作用は、Palacios ら²⁷⁾や Paavonen ら³⁴⁾³⁵⁾によって示された報告と同様に濃度依存性の抑制効果が認められた。又 HLA の差異による抑制効果の差異は認めなかった。われわれの検討した T 細胞分画は、すでに含まれる suppressor T 細胞を除去する目的で 1500 rad の X 線照射を行っているので、得られた結果に対する suppressor T 細胞の関与は除外できる。又同じ理由で DNA 合成はおこらない。したがって CyA の作用は、T 細胞が PWM の刺激をうけて helper T 細胞に分化する過程に作用している可能性が示唆される。

最近、mitogen や alloantigen の添加によって開始されるリンパ球増殖反応の初期反応には mitogen あるいは、alloantigen によって活性化された T cell growth factor (以下 TCGF と略す) 産生 T 細胞と、TCGF に対する反応性を獲得した T 細胞が必要であることが解明されてきた^{36,37)}。また T リンパ球各機能の分化過程にも TCGF が必要とされている³⁷⁾。CyA は TCGF に反応する receptor を阻止するとする Larsson らの成績³⁸⁾や、CyA が DR 抗原に対する receptor を阻害する結果、TCGF に反応する receptor の出現が阻止されるとする Palacios らの成績⁴¹⁾は、われわれのこれまでの成績を支持するばかりではなく、CyA の作用機序を知る上で極めて示唆に富む成績といえよう。

免疫抑制剤として使用する場合、造血幹細胞に及ぼす作用は重大である。この目的で、顆粒球とマクロファージの造血幹細胞である CFU-C に対する作用を検討したが (表 2)、CyA は各種 mitogen 反応を著明に抑制する濃度 (8 $\mu\text{g/ml}$) でも CFU-C に対して全く

抑制を示さなかった。ほぼ同様の成績は Hellman ら²⁵⁾や Gordon ら³³⁾によっても報告されている。これらの in vitro での成績は実験動物における in vivo の検討⁶¹⁾でも確められており、このような low mylotoxicity は CyA の特徴であり、また免疫抑制剤として非常に有利な点であろう。一方 CyA は、白血球遊走能¹³⁾や、マクロファージ貪食能²⁴⁾に対しても全く抑制効果を示さないという成績も報告されている。したがって CyA はリンパ球、とくに T リンパ球にある程度選択性を有する免疫抑制剤といえるかも知れない。

このような特徴を有する CyA の臨床応用は、初め腎臓移植の拒絶反応を予防する目的で試みられた。中でも Cambridge 大学の Calne らは 45 例の同種屍体腎移植に使用し¹⁹⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾、1 年以上の生着率が 70% という成績を得ている。このうち 32 例に対しては拒絶反応時以外は、他の免疫抑制剤を使用せず、CyA のみで治療を行っているが、その生着率は 1 年後に 86% と良好な成績が得られている⁴⁶⁾。注目すべきことは、この 32 例のうち他の免疫抑制剤の投与が必要でない例が 11 例、急性拒絶反応時のみステロイドを使用した例が 13 例にすぎない点であろう。これらの成績は、CyA が単独でも良好な免疫抑制効果を示すことを示している。一方副作用としては、腎毒性、感染、悪性リンパ腫の合併が認められている。悪性リンパ腫の合併は、免疫抑制療法の合併症として、臓器移植のさいによく認められており、CyA によって誘発されたのではなく免疫抑制作用の結果、免疫監視機構の破綻によって合併したと考えられるが、その頻度は 6% とあまり高くない。致死的な感染症の合併例は、他の免疫抑制剤との併用例であり、CyA が原因とは考えにくい。腎毒性は GVHD の予防や治療を目的化したヒトの骨髄移植症例に対する CyA の投与によっても認められており¹¹⁾⁴⁷⁾、CyA の作用と考えられる。このメカニズムについては不明だが、Calne ら⁴⁶⁾は腎生検の結果、光顕レベルでは異常を認めない成績を示している。またこの場合、CyA をステロイドやアザチオプリンに変更することにより、腎障害が軽快した成績が報告されており in viro においても CyA の作用は可逆的と考えられる。

同種骨髄移植に対する CyA の臨床応用は、Powles ら¹¹⁾⁴⁷⁾によって精力的に試みられている。彼らは始め GVHD の治療を目的として使用したため、GVHD が出現してから、それまで継続してきた MTX に変え、CyA 1000 mg から 2100 mg を経口的に投与した。結果は 5 例中 4 例が移植後 34 日から 52 日の間に、肝障害、心不全、壊死性大腸炎、ウイルス感染症で死亡している。GVHD が死因と強く関係する例が 3 例認められることからすると、CyA の GVHD に対する治療効果は

全く不十分であると考えられる。また経過中、血清尿酸素の変動は、CyA の投与と正の関係が認められており、この点は、CyA の量をこれ以上増加することは困難であると同時に CyA の腎毒性の可能性も示唆している。しかしながら、GVHD の予防を目的として CyA を、移植前 2 日から 25 mg/kg を投与した 23 例の成績¹¹⁾をみると、使用量が治療量に比べ少ないにもかかわらず、GVHD の発生頻度は 5 % に抑えられた。この発生頻度を、MTX のみで GVHD を予防している Seattle グループの成績¹²⁾のうち、特に Powles ら¹¹⁾と同様に白血病に施行した場合の発生頻度と比べてみると Powles ら¹¹⁾の 5 % に比べ Seattle グループでは 19 例中 12 例 (63%) に GVHD が発生しており、CyA の GVHD 予防効果は非常に良いと考えられる。しかし、Hows ら¹²⁾は再生不良性貧血に対する骨髄移植例に CyA を使用し、拒絶反応と GVHD に対する効果を検討した結果、これまでの成績と発生頻度や重症度に差異が認められなかったと報告している。このように各施設によって得られる成績に差が認められる理由は不明で、今後の control study が期待されるが、CyA の特徴を生かした投与量や、投与時期の検討も今後必要であろう。

結 論

2 種類の真菌から抽出された物質である cyclosporin A の免疫抑制剤としての特徴を知る目的で、各種免疫反応系におけるヒトリンパ球と、ヒト造血幹細胞に及ぼす CyA の作用を検討し、以下の結論を得た。

1) CyA は直接細胞毒性が認められない濃度で、ヒトリンパ球の各種増殖反応を濃度依存性に抑制する。

2) この抑制作用は、mitogen 増殖反応開始と同時に培養系に添加することによって最大の効果が得られるので、CyA は増殖反応の初期に最も強く作用すると考えられる。また、この抑制効果は、細胞の洗浄操作によって消失するので、CyA の作用は可逆的である。

3) T リンパ球の各 subset の機能に対する抑制作用の程度は、検討に用いた免疫反応によってそれぞれ異なっている。cytotoxic T 細胞機能に対しては、誘導過程にのみ抑制効果が認められるが、一旦誘導された cytotoxic T 細胞には全く抑制効果は認められない。Con A によって誘導される suppressor T 細胞機能は、同種リンパ球の免疫グロブリン産生を抑制する機能は、CyA によって濃度依存性に抑制されるが、自己リンパ球の免疫グロブリン産生を抑制する機能は、CyA による抑制効果をうけにくい。

4) 顆粒球とマクロファージ系の造血幹細胞である CFU-C に対しては、リンパ球増殖反応を著明に抑制する濃度でも全く抑制が認められない。

以上の成績から、CyA は、これまでの免疫抑制剤にみられない多くの特徴を有し、臓器移植の拒絶予防や、骨髄移植の GVHD 予防に非常に有望な薬剤であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師服部絢一教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導、御援助を戴いた輸血部講師原田実根博士、ならびに多大な協力を戴いた金沢大学第 3 内科学教室 2 研グループの諸先生および教室員に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Thomas, E. D., Strob, R., Clift, R. A., Feffer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. & Buckner, C. D.: Bone - marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **292**, 832 - 843, 985 - 902 (1975).
- 2) Thomas, E. D.: Current status of bone marrow transplantation for aplastic anemia and acute leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, **72**, 887 - 892 (1979).
- 3) Van Bekkum, D. W.: Immunological basis of graft - versus - host disease, p 175 - 193. In R. P. Gale & C. F. Fox(ed.), *Biology of bone marrow transplantation*, Academic press inc., New York, 1980.
- 4) Elkins, W. L.: An immunogenetic approach to the graft vs. host reaction and secondary disease, p 195 - 207. In R. P. Gale & C. F. Fox(ed.), *Biology of bone marrow transplantation*, Academic press inc., New York, 1980.
- 5) Noel, D. R., Withersopp, R. P., Storb, R., Atkinson, K., Doney, K., & Mickelson, E. M., Ochs, H. D., Warren, R. P., Weiden, P. L. & Thomas, E. D.: Does graft - versus - host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation of on 56 longterm survivors. *Blood*, **51**, 1087 - 1105 (1978).
- 6) Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U. & Stähelin, H.: Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents and Actions*, **6/4**, 468 - 475 (1976).
- 7) Borel, J. F., Feurer, C., Magnée, C. & Stähelin, H.: Effects of the new anti - lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*, **32**, 1017 - 1025 (1977).

- 8) Green, C. J. & Allison, A. C.: Extensive prolongation of rabbit kidney allograft survival after short-term cyclosporin A treatment. *Lancet*, 3, 1182 - 1183 (1978).
- 9) Calne, R. Y., White, D. J. G., Riles, K. & Smith, D. P.: Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A. *Lancet*, 3, 1183 - 1185 (1978).
- 10) Calne, R. Y., White, D. J. G., Thiru, S., McMaster, E. P., Dunn, D. C., Craddock, G. N. & Pentlow, B. D.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2, 1323 - 1327 (1978).
- 11) Powles, R. L., Clink, H. M., Spence, D., Morgenstern, G., Watson, J. G., Selby, P. J., Kay, H. E. M., Lawson, D., McElwain, T. J. & Alexander, P.: Cyclosporin A to prevent graft-versus-host disease in man after allogeneic bone marrow transplantation. *Lancet*, 2, 327 - 330 (1980).
- 12) Hows, J., Harris, R., Palmer, S. & Gordon-Smith, E. C.: immunosuppression with cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: Preliminary studies. *Brit. J. Hematol.*, 48, 227 - 236 (1981).
- 13) White, D. J. G., Plumb, A. M., Pawelec, G. & Brons, C.: Cyclosporin A: An immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. *transplantation*, 21, 55 - 58 (1979).
- 14) Leoni, P., Garcia, R. C. & Allison, A. C.: Effects of cyclosporin A on human lymphocytes in culture. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 1, 67 - 72 (1978).
- 15) 塩原信太郎・石野千津子・末永孝生・尾高和亮・幸道秀樹・森孝夫・原田実根・服部絢一: 新しい免疫抑制剤 cyclosporin A の基礎的検討. 臨床免疫 印刷中
- 16) 橋武彦・吉田明子: ヒトの T 細胞 B 細胞の微量測定法, 455 - 462 頁, 免疫実験操作法 A (右田編), 金沢, 日本免疫学会, 1975.
- 17) Harada, M., Ishino, C., Mori, T. & Hattori, K.: Active rosette forming cells as a possible functional subpopulation of human peripheral blood lymphocytes. *Jpn. J. Exp. Med.*, 47, 489 - 494 (1977).
- 18) Pike, B. L. & Robinson, W. A.: Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. Cell Physiol.*, 76, 77 - 84 (1970).
- 19) Kearney, J. F. & Lawton, A. R.: B-lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharides. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, 115, 671 - 676 (1975).
- 20) Hirano, T., Kuritani, T., Kishimoto, T. & Yamamura, Y.: *In vitro* immune response of human peripheral lymphocytes. I. The mechanism(s) involved in T cell helper functions in the pokeweed mitogen-induced differentiation and proliferation of B cells. *J. Immunol.*, 119, 1235 - 1241 (1977).
- 21) Kuritani, T., Hirano, T., Kishimoto, T. & Yamamura, Y.: *In vitro* immune response of human peripheral lymphocytes. II. Properties and functions of concanavalin A-induced suppressor T cells. *Microbiol. Immunol.*, 23, 185 - 195 (1979).
- 22) Lightbody, J.: Use of the cell-mediated lymphocytes test in transplantation immunity, p851 - 857. In N. R. Rose & H. Freedmann(ed.), *Manual of clinical immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1976.
- 23) Hess, A. D. & Tutchka, P. J.: Effect of cyclosporin A on human lymphocytes response in vitro - CsA allows for the expression of alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. *J. Immunol.*, 124, 2601 - 2608 (1980).
- 24) Hess, A. D., Tutchka, P. J. & Santos, G. W.: II. Induction of specific alloantigen unresponsiveness mediated by a nylon wool adherent suppressor cells. *J. Immunol.*, 126, 961 - 968 (1982).
- 25) Hellman, A. & Goldmann, J. M.: Effects of cyclosporin A on human granulopoiesis in vitro. *Transplantation*, 30, 386 - 387 (1980).
- 26) McIntosh, L. C. & Thomson, A. W.: Activity of the mononuclear phagocytes system in cyclosporin A treated mice. *Transplantation*, 30, 384 - 386 (1980).
- 27) Palacios, R.: Cyclosporin A inhibits the proliferative response and the generation of helper, suppressor and cytotoxic T cell function in the autologous mixed lymphocytes reaction. *Cell. Immunol.*, 61, 453 - 462 (1981).
- 28) Keown, P. A., Essery, G. L., Stiller, C. R., Sinclair, N. R., Mullen, R. & Ulan, P. A.: Mechanisms of immunosuppression by cyclosporin.

- Transplant. Proc., 13, 386 - 389 (1981).
- 29) Leapman, S. B., Filo, R. S., Smith, E. J. & Smith, P. G.: *In vitro* effects of cyclosporin A of lymphocyte subpopulations. Transplantation, 30, 404 - 408 (1980).
- 30) Leapman, S. B., Filo, R. S., Smith, E. J. & Smith, P. G.: Differential states of CyA on lymphocyte subpopulation. Transplant. Proc., 13, 405 - 409 (1981).
- 31) Gunn, H. C., Varey, A. & Cooke, A.: Effect of cyclosporin A on the function of T cells: Transplantation, 32, 338 - 340 (1981)
- 32) Sakane, T. & Green, I.: Human suppressor T cells induced by concanavalin A, suppressor T cells belong to distinctive T cell subclasses. J. Immunol., 119, 1169 - 1178 (1977).
- 33) Gordon, M. I. & Singer, J. W.: Selective effects of cyclosporin A on colony-forming lymphoid and myeloid cells in man. Nature, 279, 433 - 434 (1979).
- 34) Paavonen, T., Järvelain, H., Kontiainen, S. & Häyry, P.: Effects of cyclosporin A on *in vitro* proliferative activity and immunoglobulin synthesis of isolated human lymphoid cell subpopulation. Clin. Exp. Immunol., 43, 342 - 350 (1981).
- 35) Paavonen, T. & Häyry, P.: Effects of cyclosporin A on T-dependent and T-independent immunoglobulin synthesis *in vitro*. Nature, 287, 542 - 544 (1980).
- 36) Larson, E.: The role of mitogenetic lectins in T-cell triggering. Nature, 280, 239 - 241 (1979).
- 37) Smith, K. A.: T-cell growth factor. Immunol. Rev., 51, 337 - 357 (1980).
- 38) Larson, E.: Cyclosporin A and dexamethasone suppress T cell responses by selectively acting at distinct sites of the triggering process. J. Immunol., 124, 2828 - 2833 (1980).
- 39) Deeg, H. J., Storb, R., Miller, L. G., Shulman, H., Weiden, P. L. & Thomas, E. D.: Cyclosporin A, a powerful immunosuppressant *in vivo* and *in vitro* in the dog, fails to induce tolerance. Transplantation, 29, 230 - 235 (1979).
- 40) Wang, B. S., Heacock, E. H., Collins, K. H., Huthinson, I. F., Tiney, N. L. & Mannick, J. A.: suppressive effect of cyclosporin A on the induction of alloreactivity *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol., 127, 89 - 93 (1981).
- 41) Pnalacios, r. & Möller, G.: Cyclosporin A blocks for HLA - DR antigens on T cells. Nature, 290, 792 - 794 (1981).
- 42) Foa, P., Maiolo, A. T., Baldini, L., Maisto, A., Spand, M., Starace, G., Palo, F. G. & Polli, E. E.: Anti proliferative activity of cyclosporin A on human T-lymphoblastic leukemia cell line. Lancet, 2, 838 (1981).
- 43) Hess, A. D., Tutschka, P. J. & Santos, G. W.: Effect of cyclosporin A on human lymphocyte response *in vitro* - induction of tolerance to alloantigen. Transplant. Proc., 13, 374 - 378 (1981).
- 44) Moretta, L., Wabb, S. R., Grossi, C. E., Lydyard, P. M. & Cooper, M. D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations - help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM and IgG. J. Exp. Med., 146, 184 - 200 (1977).
- 45) Calne, R. Y., Rolles, K., White, D. J. G., Thiru, S., Evaos, D. B., Henderson, R., Hamilton, D. L., Boone, N., McMaster, P., Gibby, O. & Williams, R.: Cyclosporin A in clinical organ grafting. Transplant. proc., 13, 349 - 358 (1981).
- 46) Calne, R. Y., Rolles, K., White, D. J. G., Thiru, S., Evans, D. B., McMaster, P., Dunn, D. C., Craddock, G. N., Henderson, R. G., Asis, S. & Lewis, P.: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs; 32 kidneys; 2 pancreas; and 2 livers. Lancet, 2, 1033 - 1036 (1979).
- 47) Powles, R. L., Barret, A. J., Clink, H., Kay, H. E. M., Sloane, J. & Mcelwain, T. J.: Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. Lancet, 2, 1327 - 1331 (1978).
- 48) Bach, F. H., Bach, M. L. & Sordel, P. M.: Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. Nature, 259, 273 - 281 (1976).
- 49) Tutschka, P. J., Beschorner, W. E., Allison, A. C., Burns, W. H. & Santos, G. W.: Use of cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation in the rat. Nature, 280, 148 - 151 (1979).

***In Vitro* Studies on the Immunosuppressive Activity of a New Agent, Cyclosporin A** Shintaro Shiobara, Department of Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., **91**, 546—560 (1982)

Key words: Cyclosporin A, Immunosuppressive potential, Hematopoietic stem cell

Abstract

A new immunosuppressive agent, cyclosporin A (CyA), was studied *in vitro* concerning its immunosuppressive effects on peripheral blood lymphocytes and myelotoxicity to bone marrow cells. CyA showed a dose-dependent suppressive effect on lymphocyte proliferation at concentrations showing no direct cytotoxicity. The maximum suppression of phytohemagglutinin (PHA) response by CyA was observed when the culture was begun in the presence of CyA. If CyA was added to the medium at 24 or 48 hr after the beginning of culture, it caused a very mild suppression. However, the PHA response of lymphocytes, preincubated with CyA for 72 hr, recovered after they had been washed. Effects of CyA on T cell subsets were variable in degree depending upon the types of T cells used. Induction of cytotoxic T cells by alloantigen stimulation was completely inhibited when a minute amount of CyA (0.001 $\mu\text{g/ml}$) was added to mixed lymphocyte culture. On the contrary, cytotoxic T cells, once generated, were not affected by CyA. Induction of suppressor T cells by concanavalin A (ConA) was also suppressed markedly by the presence of CyA, when their suppressor activity was measured by means of pokeweed mitogen-induced immunoglobulin (Ig) synthesis with allogeneic lymphocytes. Interestingly, ConA-inducible suppressor T cells were considerably resistant to CyA when their function was tested with autologous lymphocytes, because suppressor T cell induction was not hindered in this setting. Function of helper T cells was also suppressed by CyA when tested by an *in vitro* Ig production system. Furthermore, the effective concentrations of CyA were varying in suppressing each of the T cell-mediated reactivities stated above. In addition, CyA did not show any suppressive effects on myeloid hematopoietic stem cells at concentrations up to 8 $\mu\text{g/ml}$, which caused a substantial suppression of lymphocyte proliferation. From these observations, it is suggested that CyA may exert its reversible immunosuppressive activity in an early stage of lymphocyte proliferation or in an induction phase of T cell-mediated immune responses. It is also suggested that CyA does not affect unstimulated or resting lymphocytes. Furthermore, CyA shows neither cytotoxicity nor myelotoxicity at the concentrations tested. Because of such a selective and unique immunosuppressive effect, CyA appears to be a potent and beneficial agent in the application to clinical transplantation.