腎移植における免疫学的研究

第4報 Cyclosporin A の作用形式に関する検討

近畿大学医学部泌尿器科学教室 松 浦 健
(主任: 栗田 孝教授)

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON RENAL TRANSPLANTATION

IV. Studies on the Mode of Action of Cyclosporin A

Takeshi Matsuura

Department of Urology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

(Director: Prof. T. Kurita)

Immunosuppressive mechanism of cyclosporin A (CsA) was studied using human lymphocytes in vitro. MLC was performed by responder cells cultured together with mitomycin treated stimulator cells for five days. Twenty hours before harvesting, ^3H -TdR was added and its uptake was counted. CML was assayed by incubating effector cells from MLC for four hours with 3-day-old PHA stimulated target cells labeled with ^{51}Cr (E/T=50/1).

A delay in adding CsA to the allogenic MLC resulted in a progressive increase of ^3H -TdR uptake and when added over 48 hours after the beginning of MLC, inhibition rate was low. On the contrary, removing CsA from the culture after 24 hours showed relatively strong inhibition. These results suggest that CsA acts at an early stage of lymphocyte stimulation. Although MLC performed in the absence of CsA resulted in the generation of specific cytotoxic effector cells, when CsA was added in the effector phase, it had no inhibitory effect on the action of cytotoxic T lymphocytes.

CsA was assessed for its effect on the production of interleukin 2 (IL 2) and the acquisition of responsiveness to IL 2. Supernatants from the CsA-treated MLC showed a dose-dependent decrease in the ability to support the proliferation of Con A stimulated lymphocytes, indicating the inhibitory effect of CsA on the production of IL 2. CsA showed a dose-dependent inhibition of MLC, but this inhibitory effect could not be reversed completely when exogenous IL 2 was added to the culture. When lymphocytes were stimulated by IL 2 after preincubation with Con A and/or CsA, proliferative activity of lymphocytes was reduced in the presence of CsA during the preincubation.

From the above results, it is concluded that CsA inhibits T cell activation both by blocking IL 2 production as well as by inhibiting the induction of IL 2 responsiveness.

要旨: 強力な免疫抑制作用により, 腎移植成績の向上をもたらした cyclosporin A の作用形式を, ヒト末梢血リンパ球を用いて in vitro で検討した。

MLC への cyclosporin A の経日的添加除去実験および CML による検討で, 抗原刺激初期における cyclosporin A の作用が重要であることを示す結果を得た。さらに, 一たん細胞障害性 T 細胞が誘導された後では, cyclosporin A の有効な作用を期待できないものと考えられた。

MLC 上清中の IL 2 活性は, cyclosporin A 添加により低下した。また, cyclosporin A 存在下 MLC への IL 2 添加実験ならびに cyclosporin A 前処理後の IL 2 刺激実験で, リンパ球の IL 2 に対する反応性は低下するものと考えられた。以上より, cyclosporin A は, リンパ球の IL 2 産生抑制および IL 2 反応性抑制により, 細胞障害性 T 細胞の増殖を抑制し, 免疫抑制作用を示すものと考えられた。

今回の成績から, cyclosporin A の臨床使用に際して, 腎移植手術時または術後早期に有効血中濃度に達していることが必要と考えられた。さらに, cyclosporin A は, 細胞障害性 T 細胞が一たん増殖を開始すると, これを抑制できないため, azathioprine から cyclosporin A への免疫抑制剤の変更は, 十分な免疫抑制作用を期待できない可能性があると考えられた。

結 言

新しい免疫抑制剤である cyclosporin A (Cs A) は、強力な免疫抑制作用と、副作用として骨髄抑制がほとんどみられないことから、種々の臓器移植において良好な成績が得られ、最近の話題として注目されている。免疫抑制作用形式に関しても、欧米を中心に基礎的研究が多く施設で行われ、しだいに明らかになりつつある。In vitro の研究で、cyclosporin A は、抗原刺激初期に作用することが指摘されているが¹⁾、抗原認識、リンホカイン産生、T細胞増殖と続くT細胞活性化過程の、どの部位を抑制するかという点に関しては、種々の見解が発表され、未解決のままである。著者も、ラット抗体産生実験で、cyclosporin A の初期作用が重要であると思われる結果を得たが²⁾、今回は、抗原刺激から細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)誘導、標的細胞破壊に至る過程で、cyclosporin A の作用点を検討するとともに、リンパ球の interleukin 2 (IL 2) 産生、IL 2反応性獲得におよぼす cyclosporin A の作用を in vitro で検討したので報告する。

方 法

1. リンパ球混合培養 (mixed lymphocyte culture; MLC)

リンパ球の調整、マクロ培養、ミクロ培養は既報²⁾通りヒト末梢血リンパ球を用いて行った。Cyclosporin A の作用時期をみるため、MLC を行い、経日的に cyclosporin A $2\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、あるいは MLC 開始時より経日的に採取したリンパ球を3回洗浄して cyclosporin A を除去し、リンパ球数は $3.0 \times 10^5/\text{well}$ としてそれぞれ5日間培養した。セルハーベスト後 methyl- ^3H -thymidine (^3H -TdR; New England Nuclear) の取り込みを測定し、cyclosporin A を加えない培養に対する ^3H -TdR の取り込み抑制をパーセント抑制率として表わした。

2. Cell mediated lymphocytotoxicity (CML)

MLC、標的細胞の ^{51}Cr 標識、エフェクター細胞の調整、細胞障害試験は既報²⁾通り行った。また、エフェクター相における cyclosporin A の作用を検討するため、エフェクター相に cyclosporin A を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加して、cyclosporin A 非添加時のパーセント細胞障害率 (percent cytotoxicity) と比較した。

3. Cyclosporin A

サンド製薬株式会社より供与された静注用製剤 (50 mg/ml) を培養液 (RPMI-1640; Gibco Laboratories) で希釈して使った。

4. Interleukin 2 (IL 2)

Lectin free human T-cell growth factor (IL 2; Associated Biomedic Systems, Inc.) を使用した。

5. IL 2産生および活性測定法

MLC により産生される IL 2 が cyclosporin A により影響されるかどうかを知るため、cyclosporin A を 0, 0.08, 0.4, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 含むマクロ MLC を行い、培養開始36時間後に上清を採取した。リンパ球は $1,500\text{RPM}$, 10分間遠心して除いた。培養上清中の cyclosporin A 除去は、cyclosporin A, IL 2 の分子量がそれぞれ $1,202^3)$, $9,000 \sim 30,000^4)$ であることから、Diaflo ultrafiltration membranes YM 5 (Amicon Corporation, 分画分子量 5,000) を用いて、PBS (phosphate buffered saline) により、濾過圧 $3.5\text{kg}/\text{cm}^2$ (窒素ガス) で限外濾過した。上清は Microflow 25 ($0.45\mu\text{m}$, Flow Laboratories, Inc.) で濾過滅菌して使用するとともに、上清中の cyclosporin A 濃度を RIA キット⁵⁾で測定した。

IL 2測定は、Ichikawa ら (1984)⁶⁾の報告を参考に行った。ヒト末梢血リンパ球 1.5×10^5 個/well に Concanavalin A (Con A; Sigma Chemical Co.), IL 2 を添加し、炭酸ガス培養器で培養後 ^3H -TdR を $1\mu\text{Ci}/\text{well}$ 添加し、20時間後に DNA への取り込みを測定した。マウス胸腺細胞にかかわって、ヒトリンパ球を反応細胞として使用したので、Con A, IL 2濃度、培養日数について検討を行った。

6. Cyclosporin A の MLC 抑制に対する IL 2 の効果

Cyclosporin A を 0, 0.08, 0.4, 2, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む MLC で、培養開始時より IL 2 を 20% あるいは 40% (v/v) 添加し、5日間培養後 DNA への ^3H -TdR 取り込みを測定した。

7. Con A, cyclosporin A 前処理リンパ球の IL 2 反応性

リンパ球と Con A $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を cyclosporin A 非存在下あるいは $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下に12時間培養した。リンパ球を回収後、培養液で3回洗浄し、細胞数を 1.5×10^5 個/well に調整して IL 2 20% (v/v) を添加し、さらに3日間培養して ^3H -TdR の取り込みを測定した。

結 果

1. Cyclosporin A の経日的添加あるいは除去による MLC 抑制効果

Cyclosporin A を添加せずに5日間MLCを行うと、 ^3H -TdR の取り込みは $107,784 \pm 3,880$ CPM

(mean±SD)であった。これに対して、cyclosporin Aを培養開始時、1、2、3、4日目に添加した時の抑制率は、それぞれ73.4、48.5、26.9、14.6、11.3%であった。また、培養開始1、2、3、4日後にcyclosporin Aを除去した時の抑制率は、それぞれ55.9、66.3、71.7、79.8%であった (Fig. 1)。培養開始後2日目以降にcyclosporin Aを添加しても抑制率は低く、1日目以降にcyclosporin Aを除去しても効若化反応は比較的良好に抑制された。

2. CMLのエフェクター相における cyclosporin A の効果

Cyclosporin Aにより CTL の誘導が抑制されるこ

とは既に示したが²⁾。MLCでCTLを誘導した後、CMLのエフェクター相にcyclosporin A 2μg/mlを添加しても、パーセント細胞障害率は36.3%と抑制効果は認めなかった (Fig. 2)。

3. IL 2活性測定法に関する検討

リンパ球をCon A 10、20μg/ml、IL 2 20、40%の組み合わせで刺激して1～5日間培養し、³H-TdRの取り込みを測定した (Table 1)。反応のピークは、Con A刺激で4～5日目に認められたが、IL 2刺激では経時的に³H-TdR取り込みは増加するものの、比較的低値であった。IL 2 20%添加の方が40%添加時より、よく反応したが、これはIL 2添加量少量の方が培養液の組成変化への影響が少ないためと考えられる。Con A、IL

Fig. 1 Inhibition of allogenic MLC by delay in addition or sequential removal of cyclosporin A

Fig. 2 Effect of cyclosporin A on CML

Table 1 Lymphocyte stimulation by Con A and IL 2

Day	Con A		IL- 2		ConA 10 μg/ml		ConA 20 μg/ml	
	10 μg/ml	20 μg/ml	40 %	20 %	IL-2 40%	IL-2 20%	IL-2 40%	IL-2 20%
1 st	2157 ±1545	1174 ±461	2535 ±2387	843 ±147	1087 ±1061	1981 ±1642	1103 ±297	2295 ±1275
2 nd	49046 ±3033	63784 ±7819	1617 ±525	3046 ±853	11533 ±1185	48498 ±2717	11518 ±719	53446 ±2038
3 rd	57182 ±2506	71418 ±2698	2966 ±68	8843 ±195	34897 ±2274	65838 ±1375	41819 ±776	68431 ±7438
4 th	90077 ±1430	112056 ±5685	8629 ±386	18105 ±1331	65102 ±1871	138819 ±13787	76954 ±5855	160889 ±22145
5 th	87145 ±4802	96299 ±5554	13540 ±340	45852 ±8716	136904 ±8313	236179 ±26114	158848 ±3606	216770 ±4988

³H-thymidine uptake (CPM : Mean±SD)

2を同時に添加した時の ^3H -TdR 取り込みは、培養3日目までは Con A 刺激よりむしろ低値であるが、それ以降は急速に増加した。Con A $10\mu\text{g/ml}$, IL 2 20%を添加した時の培養5日目の ^3H -TdR 取り込みを Fig. 3に示す。Con A, IL 2を同時に添加すると、それぞれを単独に添加した時より、反応は著明に増強された。IL 2をPBSで希釈し、Con A $10\mu\text{g/ml}$, IL 2 20%でリンパ球を刺激して5日目の ^3H -TdR 取り込みを測定した。リンパ球を Con A 刺激した時の ^3H -TdR 取り込みは $55,946 \pm 4,663$ CPMで、Con A に加え IL 2原液, 1/2, 1/4, 1/8希釈液を添加した時は、それぞれ

Fig. 3 Lymphocyte stimulation by Con A ($10\mu\text{g/ml}$) and IL 2 (20%)

Fig. 4 Lymphocyte stimulation by Con A and various concentration of IL 2

$146,800 \pm 12,632$, $98,211 \pm 10,977$, $78,445 \pm 2,271$, $77,524 \pm 2,969$ CPMであった (Fig. 4). IL 2添加量に応じて ^3H -TdR 取り込みは変化し、本法により IL 2活性は測定可能と考えられた。

4. Cyclosporin A の IL 2産生に対する効果

8倍量のPBSで限外濾過したMLC上清40%とCon A $20\mu\text{g/ml}$ でリンパ球を刺激し、3日間培養後の ^3H -TdR 取り込みは、MLCに cyclosporin A 非添加および0.08, 0.4, $2\mu\text{g/ml}$ 添加時に、それぞれ $39,308 \pm 1,714$, $45,401 \pm 5,876$, $37,419 \pm 6,103$, $22,643 \pm 1,917$ CPMであった (Fig. 5). また、18倍量のPBSで限外

Fig. 5 Assay of IL 2 produced by allogenic MLC (Con A; $20\mu\text{g/ml}$)

Fig. 6 Assay of IL 2 produced by allogenic MLC (Con A; $10\mu\text{g/ml}$)

濾過した MLC 上清 20% と Con A $10\mu\text{g/ml}$ で 5 日間培養した時の ^3H -TdR 取り込みは、同様に $190,466 \pm 23,056$, $214,257 \pm 3,192$, $166,495 \pm 10,625$, $151,547 \pm 10,196$ CPM であった (Fig. 6). MLC に添加した cyclosporin A の濃度が高い程反応は低くなり、また MLC に cyclosporin A 非添加時の ^3H -TdR 取り込みは、cyclosporin A $0.08\mu\text{g/ml}$ 添加時よりやや低い値を示した。RIA キットで測定した上清中の cyclosporin A 濃度は、測定限界 (30ng/ml) 以下であった。

5. Cyclosporin A の MLC 抑制作用に対する IL 2 の効果

MLC に cyclosporin A を非添加および 0.08 , 0.4 , 2 , $10\mu\text{g/ml}$ 添加時の ^3H -TdR 取り込みは、それぞれ $53,234 \pm 4,584$, $28,156 \pm 2,644$, $16,582 \pm 2,730$, $12,271 \pm 1,003$, $10,389 \pm 1,686$ CPM であった。これに IL 2 を 20% 加えると、 ^3H -TdR の取り込みは、それぞれ $67,846 \pm 2,216$, $45,203 \pm 1,709$, $31,453 \pm 623$, $32,208 \pm 1,365$, $26,374 \pm 514$ CPM であった (Fig. 7)。また、IL 2 添加量を 40% で検討しても、 ^3H -TdR の取り込みは、cyclosporin A 非添加および 0.08 , 0.4 , 2 , 10

Fig. 7 Incomplete recovery of allogenic MLC by exogenous IL 2 (IL 2; 20%)

Fig. 8 Incomplete recovery of allogenic MLC by exogenous IL 2 (IL 2; 40%)

Fig. 9 Stimulation of lymphocyte by IL 2 after preincubation with Con A and cyclosporin A

$\mu\text{g/ml}$ 添加で、それぞれ $119,411 \pm 2,599$, $53,451 \pm 3,177$, $34,088 \pm 3,372$, $22,565 \pm 3,288$, $19,807 \pm 3,378$ CPM から IL 2 添加により $98,372 \pm 12,253$, $55,995 \pm 1,624$, $45,904 \pm 2,332$, $43,698 \pm 573$, $39,104 \pm 1,806$ CPM になった (Fig. 8). IL 2 添加量が 20%, 40% いずれにおいても、cyclosporin A で抑制された MLC は、IL 2 添加により完全には回復できず、部分的な回復にとどまった。

6. Con A, cyclosporin A 前処理リンパ球の IL 2 反応性

リンパ球を前処理しなかった時および Con A $10\mu\text{g/ml}$, Con A $10\mu\text{g/ml}$ · cyclosporin A $2\mu\text{g/ml}$, Con A $10\mu\text{g/ml}$ · cyclosporin A $0.4\mu\text{g/ml}$ で前処理後に IL 2 で刺激すると、 ^3H -TdR 取り込みは、それぞれ $54,931 \pm 2,494$, $90,567 \pm 2,835$, $47,963 \pm 2,793$, $43,361 \pm 2,439$ CPM であった (Fig. 9)。Con A 前処理後に IL 2 で刺激すると、反応は増強されたが、Con A · cyclosporin A で前処理すると、IL 2 で刺激しても反応は低かった。

考 察

腎移植後の免疫抑制剤として広く使用されている azathioprine, mizoribine は、DNA 合成を阻害することで、免疫抑制効果を生ずるとされ、著者らも flow cytometry による検討で同じ結果を得た⁷⁾。Cyclosporin A は、これらと全く異った機序で免疫抑制作用を発現し、多くの興味ある結果が明らかになりつつある。Wiesinger and Borel (1979)¹¹⁾により、cyclosporin A はリンパ球刺激の初期段階で作用することが示され、今回の検討でも同様の結果が得られた。

すなわち, MLC で cyclosporin A を経日的に添加あるいは除去した場合, 培養開始48時間以降に cyclosporin A を添加しても抑制率は低く, 24時間以降に cyclosporin A を除去しても, 比較的高い抑制率を示した。これは, 抗原刺激初期における cyclosporin A 存在の重要性を示すとともに, 抗原刺激後時間が経過してから cyclosporin A を添加しても, 有効な作用は期待できないことを示す結果と考えられる。さらに, CML のエフェクター相で cyclosporin A を添加しても, パーセント細胞障害率が抑制されなかったことは, CTL が誘導された後は, CTL の作用を抑制できず, CTL 誘導以前の cyclosporin A 存在が, 免疫抑制作用発現に必須であることを示していると考えられる。これは, Wagner (1983)⁹⁾が示した, MLC 開始48時間以降に cyclosporin A を加えても, CTL の誘導は抑制されないという成績を支持する結果で, 一たん CTL 前駆細胞が増殖を開始すると, cyclosporin A は CTL の誘導を阻止できないと考えることができる。

MLC 上清中の IL 2 活性は, 添加した cyclosporin A が高濃度になる程低下し, cyclosporin A の免疫抑制作用の1つとして, IL 2 産生抑制が考えられた。限外濾過後の上清中 cyclosporin A 濃度は30ng/ml 以下であったが, 予備実験で, 3.3~30ng/ml の cyclosporin A でも, リンパ球幼若化反応は20~30%抑制された。しかし, 今回の検討で, 8倍および18倍量の PBS で限外濾過した上清を用いて, 同様の結果が得られたことは, 少なくとも18倍量の PBS で限外濾過した上清中には cyclosporin A は含まれていないと結論してよいと考えられた。Cyclosporin A を含まない上清での³H-TdR 取り込み値がやや低くなったのは, 培養36時間後には, リンパ球による IL 2 消費がすでに始まっているためと考えられる。

マイトゲン刺激, アロ抗原刺激による CTL 活性化過程で, ヘルパー T 細胞 (helper T cell; Th) により IL 2 が産生され, 同時に CTL 前駆細胞に IL 2 受容体が誘導されて CTL のクローン増殖がはじまる⁹⁾¹⁰⁾。Cyclosporin A の IL 2 産生に対する影響は, 未だ解決されていない点であるが, 今回の検討では IL 2 の産生抑制が認められた。著者と同じ成績⁸⁾¹²⁾¹³⁾と IL 2 産生に何ら影響しないという意見¹¹⁾がみられる。しかし, 今回の成績と, cyclosporin A が CTL 活性化過程において, HLA-DR 受容体のブロック⁸⁾¹⁴⁾, IL 1 産生抑制¹⁵⁾, Th 活性化抑制または Th の IL 1 無反応化を起こす¹³⁾という報告を考え合わせると, cyclosporin A

の直接作用か間接作用かは, はっきりと結論が出ていないが, cyclosporin A が IL 2 産生を抑制することはほぼ確実であると思われる。

Cyclosporin A のもう一つの免疫抑制機序として, CTL 前駆細胞の IL 2 反応性に対する影響が示唆されているが, この点に関しても, 未だ結論は得られていない。今回の検討では, cyclosporin A を含む MLC に, 培養開始時から IL 2 を加えたところ, 十分量の IL 2 が存在すると考えられるにもかかわらず, すべての濃度の cyclosporin A で, MLC は部分的にしか反応を回復できなかった。さらに, Con A 刺激で T 細胞に IL 2 受容体が出現することから, Con A と cyclosporin A でリンパ球を前処理後に IL 2 で刺激すると, Con A で処理したリンパ球は IL 2 によく反応したが, Con A と cyclosporin A で前処理すると, IL 2 に対する反応は抑制された。以上の成績から, cyclosporin A は, CTL 前駆細胞の IL 2 に対する反応性を低下させると考えられ, 諸家の報告でも, cyclosporin A は IL 2 反応性獲得に影響しないという意見⁸⁾¹²⁾があるものの, 著者の成績を支持する報告¹¹⁾¹⁶⁾も認められる。

今回の実験結果は, cyclosporin A の作用形式から, 臨床応用に際しての重要な点を示していると思われる。今回の検討で, cyclosporin A は, 抗原刺激時または遅くとも抗原刺激後早期に存在していることが, 免疫抑制作用発現に必要であった。さらにくわしく検討した結果, cyclosporin A は Th の IL 2 産生を抑制し, CTL 前駆細胞の IL 2 反応性も抑制することで CTL のクローン増殖を抑制し, 免疫抑制作用を示すものと考えられた。すなわち, 臨床使用に際して, cyclosporin A は腎移植手術時あるいは術後早期に, 有効血中濃度を保っていることが必要と思われる。

Keown ら(1983)¹⁷⁾は, cyclosporin A の治療域として, 移植後 2~3 週間は血中濃度~150~300ng/ml, 移植後 3 カ月で 50~150ng/ml に減量すると述べている。既に報告したように, cyclosporin A により, 免疫抑制性細胞は生じていると考えられる²⁾が, 腎移植後の cyclosporin A の減量あるいは中止には, 注意を要するものと思われる。有効血中濃度以下の状態が続くと, 移植腎に存在する抗原により, 免疫反応, すなわち IL 2 産生および CTL の増殖が惹起され, 一たん CTL 増殖が始まると, cyclosporin A の抑制効果は期待できないため, 拒絶反応を生じてくる可能性があると考えられる。腎移植後血清クレアチニン値が上昇して, 免疫抑制剤を cyclosporin A から azathioprine に

変更した後に良好な経過となった症例中には、cyclosporin A の腎毒性¹⁸⁾による血清クレアチニン値上昇例が多いと思われるが、CTL の増殖をきたして cyclosporin A で抑制できなかった症例も含まれている可能性がある。さらに、MacDonald ら (1983)¹⁹⁾によると、azathioprine, prednisolone による免疫抑制法で拒絶反応を抑制できなかった11例を、cyclosporin A で治療した結果、5 例で移植腎喪失、2 例の移植腎機能は悪化し、4 例で機能は改善したが、過半数の予後は不良であった。今回の実験結果からも、azathioprine で拒絶反応を抑制できない場合、cyclosporin A へ免疫抑制法を変更しても、移植腎機能予後に対してはあまり期待がもてないものと推察できる。しかし、Thompson ら (1983)²⁰⁾は、azathioprine, prednisolone による合併症のため、免疫抑制法を cyclosporin A に変更した7例を検討し、急性拒絶反応がみられなかったことより、cyclosporin A への免疫抑制剤変更は安全に行えると述べている。しかし、血清クレアチニン値は薬剤変更後3カ月で平均70%上昇し、単クローン抗体によるリンパ球サブポピュレーションの検討から、OKT 8陽性細胞 (suppressor-cytotoxic) の増加による OKT 4/OKT 8比の低下が示された。Cyclosporin A は免疫抑制性細胞の誘導を抑制しないため、ある程度の免疫抑制効果が期待できると思われるが、CTL の誘導は不可避であると考えられ、cyclosporin A に免疫抑制法を変更する場合、腎機能悪化はやはり覚悟しておくべきであろう。また、Kahan ら (1983)²¹⁾の報告によると、prednisone を併用した cyclosporin A と azathioprine の腎移植成績を比較した結果、low responder では両群に差はみられないが、high responder では azathioprine 使用例の成績が悪いのに対し、cyclosporin A 使用症例では良好な成績が得られている。Cyclosporin A は、免疫反応の初期で作用するため、high responder 例で CTL が増殖してくる過程を抑制することによって、より有効な免疫抑制効果が得られたためと推察できる。

また、cyclosporin A は、抗原認識から IL 1, IL 2 産生を経て CTL 増殖に至る CTL 活性化過程を、その初期段階で抑制するため、未だ完全に明らかにされていない CTL 活性化機構の解明にも利用できるものと考えられる。さらに、既報の成績²⁾と今回の結果から、CTL 活性化と、抑制性 T 細胞の活性化は、異った機序によるものと考えられた。

結 語

新しい免疫抑制剤として、臓器移植臨床で期待されている cyclosporin A の作用形式について基礎的検討を行った。MLC, CML による検討で、cyclosporin A は培養開始初期の作用が重要と考えられ、CTL が誘導された後では、何ら抑制効果は認められなかった。この免疫抑制作用は、CTL 活性化過程で、IL 2 産生抑制および CTL 前駆細胞の IL 2 反応性低下によると考えられた。以上の実験成績から、臨床使用上の問題点について考察を加えた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師栗田孝教授ならびに大阪大学医学部泌尿器科学教室園田孝夫教授に深く感謝致します。また、直接の御指導をいただいた本教室秋山隆弘助教授に深謝致します。

本論文の一部は、第33回泌尿器科中部連合総会（浜松、1983. 11.）および第20回日本移植学会総会（東京、1984. 9.）で発表した。

文 献

- 1) Wiesinger, D. and Borel, J.F.: Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. *Immunobiol.*, 156, 454—463, 1979.
- 2) 松浦 健: 腎移植における免疫学的研究. 第3報. Cyclosporin A の免疫抑制作用に関する基礎的検討. *日泌尿会誌*, 75, 1857—1865, 1984.
- 3) Wenger, R.: Synthesis of cyclosporine and analogues: Structure, activity, relationship of new cyclosporine derivatives. *Transplant. Proc.*, 15(Suppl. 1), 2230—2241, 1983.
- 4) 寺西 強, 平野俊夫: インターロイキン 2. *臨床免疫*, 14, 210—220, 1982.
- 5) Donatsch, P., Abisch, M., Hömberger, M., Traber, R., Trapp, M. and Voges, R.: A radioimmunoassay to measure cyclosporin A in plasma and serum samples. *J. Immunoassay*, 2, 19—23, 1981.
- 6) Ichikawa, Y., Ihara, H., Takada, K., Ishibashi, M. and Sagawa, S.: Effect of mizoribine on interleukin 2 synthesis. *Transplant. Proc.*, 16, 322—324, 1984.
- 7) 松浦 健, 国方聖司, 神田英憲, 井口正典, 秋山隆弘, 栗田 孝: 腎移植における免疫学的研究. 第1報. Azathioprine, mizoribine 併用による免疫抑制法の基礎的ならびに臨床的検討. *日泌尿会誌*, 75, 255—262, 1984.
- 8) Wagner, H.: Cyclosporin A: Mechanism of action. *Transplant. Proc.*, 15, 523—526, 1983.
- 9) Smith, K.A.: T-cell growth factor. *Immunological Rev.*, 51, 337—357, 1980.
- 10) Wagner, H., Hardt, C., Stockinger, H.,

- Pfizenmaier, K., Bartlett, R. and Röllinghoff, M.: Impact of thymus on the generation of immunocompetence and diversity of antigen-specific MHC-restricted cytotoxic T-lymphocyte precursors. *Immunological Rev.*, 58, 95—129, 1981.
- 11) Larsson, E.L.: Cyclosporin A and dexamethasone suppress T cell responses by selectively acting at distinct sites of the triggering process. *J. Immunol.*, 124, 2828—2833, 1980.
 - 12) Dos Reis, G.A. and Shevach, E.M.: Effect of cyclosporin A on T cell function in vitro: The mechanism of suppression of T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell. *J. Immunol.*, 129, 2360—2367, 1982.
 - 13) Hess, A.D., Tutschka, P.J. and Santos, G.W.: Effect of cyclosporine on the induction of cytotoxic T lymphocytes: Role of interleukin-1 and interleukin-2. *Transplant. Proc.*, 15 (Suppl. 1), 2248—2285, 1983.
 - 14) Palacios, R. and Möller, G.: Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigens on T cells. *Nature*, 290, 729—794, 1981.
 - 15) Bunjes, D., Hardt, C., Röllinghoff, M. and Wagner, H.: Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur. J. Immunol.*, 11, 657—661, 1981.
 - 16) Hess, A.D., Tutschka, P.J., Pu, Z. and Santos, G.W.: Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. IV. Production of T cell stimulatory growth factors and development of responsiveness to these growth factors in CsA-treated primary MLR cultures. *J. Immunol.*, 128, 360—367, 1982.
 - 17) Keown, P.A., Stiller, C.R., Sinclair, N.R., Caruthers, G., Howson, W., Stawicki, M., Michael, J., Koegler, J., McKenzie, N. and Wall, W.: The clinical relevance of cyclosporine blood levels as measured by radioimmunoassay. *Transplant. Proc.*, 15 (Suppl. 1), 2438—2441, 1983.
 - 18) Calne, R.Y., Thiru, S., McMaster, P., Craddock, G.N., White, D.J.G., Evans, D.B., Dunn, D.C. and Pentlow, B.D.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2, 1323—1331, 1978.
 - 19) MacDonald, A.S., Belitsky, P., Cohen, A., Crocker, J., Gupta, R., Lannon, S.G. and White, J.: Cyclosporine for steroid-resistant rejection in azathioprine-treated renal graft recipients. *Transplant. Proc.*, 15 (Suppl. 1), 2535—2537, 1983.
 - 20) Thompson, J.F., Chalmers, D.H.K., Carter, N.P., Wood, R.F.M. and Morris, P.J.: Clinical and immunologic effects of conversion to cyclosporin-A therapy in long-term renal allograft recipients. *Transplant. proc.*, 15, 1930—1932, 1983.
 - 21) Kahan, B.D., Van Buren, C.T., Flechner, S.M., Payne, W.D., Boileau, M. and Kerman, R.H.: Cyclosporine immunosuppression mitigates immunologic risk factors in renal allotransplantation. *Transplant. Proc.*, 15, (Suppl. 1), 2469—2478, 1983.

(1984年5月10日受付, 特別掲載)