

Cyclosporin A と Tacrolimus の T 細胞 サイトカイン 産生 に対する抑制効果の in vitro 解析

倉 崎 桃 里

新潟大学大学院医歯学総合研究科

機能再建医学講座血液学分野

(主任：相澤義房教授)

In vitro Analysis of the Differences between Cyclosporin A and Tacrolimus in the Inhibitory Potency for T-cell Cytokines Production

Tori KURASAKI

Division of Hematology, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

【背景】カルシニューリン阻害薬 (calcineurin inhibitor: CNI) である Cyclosporin A (CsA) と Tacrolimus (FK506) は、臓器移植に対する拒絶予防や同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) 後の graft-versus-host disease (GVHD) に対する予防・治療における薬剤として重要な役割を果たしており、主に T 細胞のサイトカイン産生を阻害することでその免疫抑制効果が発揮される。近年、特に臓器移植の分野においては CNI の薬物体内動態や薬効指標の研究が進んでいるが、allo-HSCT の分野においては、CNI の使用が標準化しているものの、その投与方法には施設間差があり、最適な投与方法が確立されていない。今回我々は、CsA, FK506 それぞれの薬剤の allo-HSCT における至適投与方法を考案する上で重要なサイトカイン産生抑制効果の特性を明らかにするために、フローサイトメトリーを用いて細胞内サイトカイン陽性細胞を検出し、in vitro における CNI のサイトカイン産生抑制効果について検討した。

【方法】健康人末梢血単核球 (MNC) を分離し、Phorbtor 12-Myristate 13-Acetate, ionomycin, brefeldin A 存在下に 37 °C, 4 時間共培養後、MNC の表面抗原 (CD4, CD8) を染色し、固定・膜透過処理を行った後、細胞内サイトカイン (IFN- γ , IL-2, IL-4) の染色を行い、フローサイトメトリーを用いて、CD4・CD8 リンパ球分画による細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の割合を測定・解析した。この方法を用いて CNI 暴露とサイトカイン陽性 T 細胞の割合、CNI 暴露解除後のサイトカイン陽性 T 細胞の回復、また CD3/CD28 beads 刺激により誘導した活性化 T 細胞を用いて、CNI が活性化 T 細胞へ及ぼす影響について検討した。

【結果】CNI 暴露後のサイトカイン陽性 T 細胞の非暴露 T 細胞との相対的割合は、CsA では 1-100ng/ml の濃度で濃度依存的に減少するが、FK506 では 1-10ng/ml と CsA に比し、より

Reprint requests to: Tori KURASAKI
Division of Hematology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再建医学講座
血液学分野 倉崎桃里

低濃度かつ狭い濃度域で急激に減少した。また CsA の活性化 T 細胞におけるサイトカイン抑制効果は、resting T 細胞における効果よりも減弱されることが確認された。一方 FK506 では、活性化 T 細胞と resting T 細胞とで抑制効果に差を認めなかった。さらに、CsA 暴露解除後の IL-2 産生は、暴露濃度が低い場合には回復が有意であるが、高濃度の CsA や FK506 では少なくとも 4 時間後までは抑制効果が持続することが in vitro で確認された。

【結語】今回の得られた免疫抑制の特性から、allo-HSCT 臨床における GVHD 予防における CNI 使用法を考察すると、CsA を用いる際は、一時的に高濃度（ピーク）を作る投与方法が CsA の特性を生かした投与方法ではないかと考えられ、一方 FK506 は、毒性との兼ね合いから 24 時間持続点滴による投与方法は許容される投与方法であることが示唆された。

Key words: cyclosporin A, tacrolimus, cyto - cytokine, flow cytometry

はじめに

カルシニューリン阻害薬（calcineurin inhibitor: CNI）である Cyclosporin A（CsA）と Tacrolimus（FK506）は、臓器移植に対する拒絶予防や同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）後の graft-versus-host disease（GVHD）に対する予防・治療における薬剤として重要な役割を果たしている¹⁾²⁾。これらの薬剤は、ともに T 細胞の活性化を抑制することにより免疫抑制効果を発揮する一方で、CNI はいずれもその薬効濃度域と、腎毒性や糖尿病発症などの副作用を発症する危険濃度域との差が狭いことから、適切な容量調節を必要とする薬剤として扱われ、使用に際しては薬物血中濃度モニタリングの重要性が指摘されている³⁾⁴⁾。近年、特に臓器移植の分野においては、CNI の薬物体内動態の研究が進展するとともに、薬効の指標の解析、さらにはそれら指標に基づく個別化された免疫抑制法の確立に向けた研究が進んでいる¹⁾⁵⁾。

Allo-HSCT 後は、前処置による消化管粘膜障害のために、GVHD 予防目的である移植後早期の CNI 投与は点滴静注が汎用されている。FK506 は 24 時間持続静注法で投与されているが、CsA は 24 時間持続静注法の施設だけではなく、一日 1 回の短時間点滴投与や一日 2 回分割による短時間点滴静注投与方法（点滴時間も様々）など施設間の多様性が認められ、最適な投与方法が確立されていない⁶⁾。また In vitro 試験においては FK506 の方が CsA に比べてより強力な免疫抑制剤とされて

いるが、両薬剤を比較した臨床試験では、対象患者の背景による移植後生存率の成績が一定せず、必ずしも強力な免疫抑制剤であることが移植成績向上に結びついていない^{7) - 9)}。この原因としては、造血幹細胞移植の分野においては免疫抑制効果と薬剤毒性¹⁰⁾の他に、抗白血病効果（Graft versus leukemia/lymphoma effect ; GVL 効果）を考慮する必要もあり¹¹⁾、過度な免疫抑制は移植後の再発につながる危険性が報告されていることが一因であると考えられる¹²⁾¹³⁾。また、GVHD 予防効果に関する比較についても、それぞれの薬剤の薬効に合った投与方法を利用した比較がなされていないことも重要な要因であると推察される¹⁴⁾。したがって Allo-HSCT の成績向上のためには、移植症例の背景を考慮して、それぞれの薬剤の薬効における特性を活かした投与方法を施行した上で、個別化された CNI の至適投与方法の開発が重要であると考えられる。

CNI による免疫抑制効果は、T 細胞のサイトカイン産生を阻害することで発揮される。T 細胞は活性化刺激を受けると Ca^{2+} とカルモジュリン（CalM）依存的にカルシニューリン（calcineurin: CN）活性化を誘導する。そして活性化された CN は IL-2 などのサイトカイン遺伝子の転写を制御する転写制御因子（nuclear factor of activated T cell cytoplasmic component: NF-ATc）の脱リン酸化を起こす。その結果、転写制御因子は細胞質から核内への移行が促進され、各種サイトカインの転写が増強されることで、T 細胞の活性化へと

結びついている。CNI である CsA と FK506 は、構造は異なるものの、ともに細胞内のイムノフィリン (CsA は cyclophilin, FK506 は FK506-binding protein (FKBP)) と結合する¹⁵⁾¹⁶⁾。それぞれのイムノフィリンと CNI の複合体は、活性化 CN に結合して NF-ATc の脱リン酸化を抑制、転写制御因子の核内移行を阻害してサイトカイン産生を抑制することで免疫抑制効果を発現する¹⁷⁾。そこで、CNI の薬効を定量する方法としては、CN のリン酸化活性の測定¹⁸⁾¹⁹⁾、サイトカイン mRNA 発現の測定²⁰⁾、さらにはフローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン陽性細胞を解析する方法^{21)–24)}などが開発され臨床成績との関連が報告されている。

今回我々は、CsA, FK506 それぞれの薬剤の同種造血幹細胞移植における至適投与法を考案する上で重要なサイトカイン産生抑制効果の特性を明らかにするために、フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン陽性細胞を検出する方法を用いて、*in vitro* でのそれぞれの薬剤のサイトカイン産生抑制効果について検討した。

材料と方法

1. 薬剤

CsA 溶液 (サンディミュン注射液, 50mg/ml) はノバルティスファーマ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入し、使用時に RPMI1640 medium で目的の濃度に希釈して用いた。FK506 は、アステラス製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より供与された原末を 1mg/ml にメタノール (WAKO, Osaka, Japan) で調整後、使用時に RPMI1640 medium で目的の濃度に希釈して使用した。

2. フローサイトメトリーによるサイトカイン陽性 T 細胞割合の測定

1) 末梢血単核球分離

インフォームドコンセントにて同意を得た健常人より、ヘパリン加採血した末梢血を Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) に重層し、比重遠心法で末梢血単核球分画を採取し単核球

(MNC) として用いた。

2) 細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の測定

1.5×10^6 MNC を 10 % FBS 加 RPMI1640 medium 5ml に浮遊し、Phorbtor 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (WAKO) 20mg/ml, ionomycin (SIGMA, St. Louis, MO, USA) $2 \mu\text{g/ml}$, brefeldin A (WAKO) $10 \mu\text{g/ml}$ 添加後に 37 °C, 5 % CO₂ 条件下で 4 時間反応させた。MNC を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、CD4・CD8 モノクローナル抗体をそれぞれ添加し、4 °C 暗所で 15 分間反応させて MNC 表面抗原を染色した。PBS で洗浄後の MNC ペレットに Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson: BD, Mountain View, CA) 500 μL 加え、4 °C, 20 分間反応させ固定・膜透過処理を行い、1 × Perm/Wash (BD) で洗浄後、MNC ペレットに蛍光標識抗サイトカイン抗体を添加し、4 °C 暗所で 15 分間反応させ細胞内サイトカイン染色を行った。最後に 1 × Perm/Wash で洗浄後、MNC ペレットを 1 × Perm/Wash で再浮遊させ、フローサイトメトリー (FACScan (BD)) を用いて測定を行った。リンパ球ゲート中の CD4 陽性ゲート、もしくはリンパ球ゲート中の CD8 陽性ゲートのイベント数 10,000 cells を測定し、測定時の陰性コントロールが 2 % 未満になるよう調整し、CD4 陽性 T 細胞中における IFN- γ 陽性 (IFN γ + CD4 T) 細胞の割合、IL-2 陽性 (IL2 + CD4 T) 細胞の割合、IL-4 陽性 (IL4 + CD4 T) 細胞の割合、また CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ 陽性 (IFN γ + CD8 T) 細胞の割合、IL-2 陽性 (IL2 + CD8 T) 細胞の割合、IL-4 陽性 (IL4 + CD8 T) 細胞の割合をそれぞれ測定した。解析には CELLQuest ソフトウェア (BD) を用いた。

3) CNI 暴露後の細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の測定

個人から採取した 1.5×10^6 MNC を 10 % FBS 加 RPMI1640 medium 5ml で浮遊させ、CsA・FK506 それぞれの薬剤を培養液中で目的の最終濃度になるように調整して添加し 37 °C, 5 % CO₂ 条件下で培養後に PBS で 3 回洗浄した。洗浄後の MNC を PMA, ionomycin, brefeldin A 添

加 10 % FBS 加 RPMI1640 medium に浮遊して 4 時間培養後に細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで測定した。細胞内サイトカイン陽性細胞の割合は、個体によるばらつきが大きいことから、CNI それぞれの薬剤による陽性細胞の低下は、それぞれの個人から採取した MNC 毎に、CNI に暴露されていない細胞におけるサイトカイン陽性細胞の割合をコントロールとして、その割合を 100 % とした相対的割合を使用して解析した。

4) T 細胞の活性化

MNC と Dynalbeads CD3/CD28 T Cell Expander (4×10^7 beads/ml) (Dynal Biotech, Oslo, Norway) を 2 : 1 で混合し、37 °C, 5 % CO₂ 条件下で培養した。培養した MNC 培養液から Dynal MPC-L (Dynal Biotech) を用いて beads を除去後、PBS で洗浄した細胞を活性化 T 細胞として使用した。

5) モノクローナル抗体

細胞表面抗原の染色には、PC5 標識抗ヒト CD4 抗体 (Immunotech, Marseille, France), PC5 標識抗ヒト CD8 抗体 (Immunotech) を、また細胞内サイトカイン染色には、Fastimmune コントロール FITC 標識 IgG2a/PE 標識 IgG1 抗体 (BD), Fastimmune FITC 標識抗 IFN- γ /PE 標識抗 IL-4 モノクローナル抗体 (BD), また Fastimmune FITC 標識抗 IL-2 モノクローナル抗体 (BD) を用いた。

T 細胞活性化の評価には、細胞表面 CD25, CD69 の発現を確認した²⁵⁾²⁶⁾。モノクローナル抗体は FITC 標識抗マウス IgG1 抗体 (BD), PE 標識抗マウス IgG1 抗体 (BD), FITC 標識抗ヒト CD3 抗体 (BD), PE 標識抗ヒト CD25 抗体 (BD), また PE 標識抗ヒト CD69 抗体 (BD) を使用した。

それぞれの抗体陽性細胞の割合を、フローサイトメトリー (FACScan) を用いて測定し、CELL Quest ソフトウェアを用いて解析した。

6) CNI 洗浄後のサイトカイン産生能回復の検討

CNI による抑制から解除された T 細胞のサイトカイン産生能の回復を検討するために、10 % FBS 加 RPMI1640 medium 5ml で細胞浮遊させた 1.5×10^6 MNC に、CsA 20mg/ml, 200ng/ml, ま

たは FK506 7.5ng/ml, 20ng/ml をそれぞれ添加して 20 分間培養後 PBS で 3 回洗浄した。再度 10 % FBS 加 RPMI1640 medium 5ml で再浮遊して 37 °C, 5 % CO₂ 条件下で 0, 1, 2, 4 時間培養した。培養後の MNC を PBS で洗浄後、PMA/ionomycin/brefeldin A との 4 時間反応、細胞表面抗原染色、固定・膜透過処理、細胞内サイトカイン染色を施行して、細胞内サイトカイン陽性 T 細胞を測定した。コントロールは、CNI に暴露されていない MNC を使用。CNI 無添加 MNC におけるサイトカイン陽性 T 細胞の割合を 100 % とし、その割合に対する相対的割合を測定した。

3. 統計解析

測定結果は平均±標準偏差で示した。2 群間の統計学的解析は、対応のある t 検定を用い、それぞれ $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. CD4 陽性 T 細胞, CD8 陽性 T 細胞の細胞内サイトカイン陽性細胞の割合

今回の我々の検討では、健常人末梢血 MNC における細胞内サイトカイン陽性細胞の割合は (平均±標準偏差, $n = 52$), IFN γ + CD4T 細胞が 4.25 % - 29.26 % (12.81 ± 4.45 %), IL2 + CD4T 細胞は 14.86 % - 72.63 % (47.97 ± 11.6 %), IL4 + CD4T 細胞は 0.63 % - 8.1 % (2.90 ± 1.68 %), IFN γ + CD8T 細胞は 6.5 % - 63.59 % (32.68 ± 12.6 %), IL2 + CD8T 細胞は 4.12 % - 33.55 % (14.55 ± 6.95 %), また IL4 + CD8T 細胞は 0.3 % - 2.52 % (0.99 ± 0.63 %) であった。

2. CNI 暴露時間の検討

まず、健常人 MNC を浮遊させた medium に CsA や FK506 を添加した場合、PMA/ionomycin/brefeldin A によるサイトカイン産生刺激を完全に抑制する暴露時間を検討した。CsA (200ng/ml) または FK506 (20ng/ml) を添加して 5 分, 10 分, 20 分培養。上清の CNI を洗浄後に、PMA/ionomycin/brefeldin A 刺激を加えてサイトカイン

ン産生 T 細胞を測定した。その結果 5 分間暴露後で既に産生抑制が認められたが、個人差も認められ、完全にサイトカイン産生を抑制するには 20 分間の暴露時間が十分であった (date not shown)。この結果から、以後の実験では CNI の暴露時間を 20 分間と設定して検討を行った。

3. In vitro における CNI 濃度と細胞内サイトカイン陽性 T 細胞割合の関係

様々な濃度の CsA, FK506 をそれぞれ暴露させた MNC を用いて、細胞内サイトカイン陽性 T の割合を解析した ($n = 3$)。CsA 暴露群では、IFN γ + CD4T 細胞, IL2 + CD4T 細胞, IFN γ + CD8T 細胞, また IL2 + CD8T 細胞の相対的割合は濃度依存的に減少し, CsA 1ng/ml から 100ng/ml にかけて減少した (図 1)。IL-2 陽性細胞 (IL2 + CD4T 細胞, IL2 + CD8T 細胞) の相対的割合は, リンパ球の分画 (CD4T, CD8T) に関わらず同様な減少傾向を示し, CsA 100ng/ml 暴露後に 5 % 未満にまで減少した (図 1B, 1D)。一方, IFN- γ 陽性細胞 (IFN γ + CD4T 細胞, IFN γ + CD8T 細胞) の相対的割合もリンパ球の分画 (CD4T, CD8T) に関わらず同様な減少傾向を示したが, CsA 1000ng/ml 暴露後においても 20 % 以下には減少しなかった (図 1A, 1C)。FK506 暴露群では, IFN γ + CD4T 細胞, IL2 + CD4T 細胞, IFN γ + CD8T 細胞, また IL2 + CD8T 細胞の相対的割合は, FK506 1ng/ml から 10ng/ml にかけての狭い濃度域で, 濃度依存的に急激な減少を示した (図 1)。IL-2 陽性細胞 (IL2 + CD4T 細胞, IL2 + CD8T 細胞) の相対的割合は, リンパ球の分画 (CD4T, CD8T) に関わらず同様な減少傾向を示し, FK506 10ng/ml 暴露後に 5 % 未満に減少した (図 1B, 1D)。IFN- γ 陽性細胞 (IFN γ + CD4T 細胞, IFN γ + CD8T 細胞) の相対的割合もリンパ球の分画 (CD4T, CD8T) に関わらず同様な減少傾向を示したが, FK506 100ng/ml 暴露後においても 10 % 以下には減少しなかった (図 1A, 1C)。

4. 活性化 T 細胞の表面抗原, 細胞内サイトカイン陽性細胞の割合

T 細胞の活性化を評価するために, Dynalbeads CD3/CD28 T Cell Expander 添加後 16 時間, 20 時間, 48 時間後の MNC における活性化 T 細胞の表面マーカーとして, CD25, CD69 の発現を確認した (図 2)。その結果 16 時間培養後の T 細胞は CD25, CD69 いずれの抗原についても陽性率の増加を認め, さらに長時間の培養でも陽性率の増加は認めなかった (date not shown)。また Dynalbeads CD3/CD28 T Cell Expander 添加後 16 時間, 48 時間後の活性化 T 細胞のサイトカイン産生 T 細胞を測定した結果, 48 時間 beads 刺激後の活性化 T 細胞では, 16 時間 beads 刺激後の活性化 T 細胞に比しむしろサイトカイン陽性 T 細胞の割合は低下していた (date not shown)。そこで CNI による抑制効果を測定する活性化 T 細胞としては, Dynalbeads CD3/CD28 T Cell Expander 添加 16 時間後の T 細胞を使用した。

Dynalbeads CD3/CD28 T Cell Expander 添加 16 時間後の活性化 T 細胞におけるサイトカイン陽性細胞の割合 (平均 \pm 標準偏差, $n = 10$) は, IFN γ + CD4 T 細胞 (beads 刺激 (-) 14.43 ± 2.59 % vs. beads 刺激 (+) 14.54 ± 3.44 %, $p = 0.428$), IL2 + CD4 T 細胞 (beads 刺激 (-) 43.30 ± 10.72 % vs. beads 刺激 (+) 50.04 ± 10.89 %, $p = 0.180$), IFN γ + CD8 T 細胞 (beads 刺激 (-) 33.94 ± 9.21 % vs. beads 刺激 (+) 30.19 ± 10.34 %, $p = 0.402$) においては, beads 刺激なしの resting T 細胞に比して有意な増加を認めなかったが, IL2 + CD8 T 細胞の割合 (beads 刺激 (-) 13.57 ± 5.03 % vs. beads 刺激 (+) 21.29 ± 9.59 %, $p = 0.037$) は, 有意な増加を示した。

5. In vitro での CNI 暴露による活性化 T 細胞・resting T 細胞のサイトカイン産生抑制効果

次に Dynalbeads CD3/CD28 T Cell Expander 添加培養により活性化された T 細胞を用いて, 活性化 T 細胞が CNI 暴露後に受ける細胞内サイトカイン産生抑制効果について検討した。

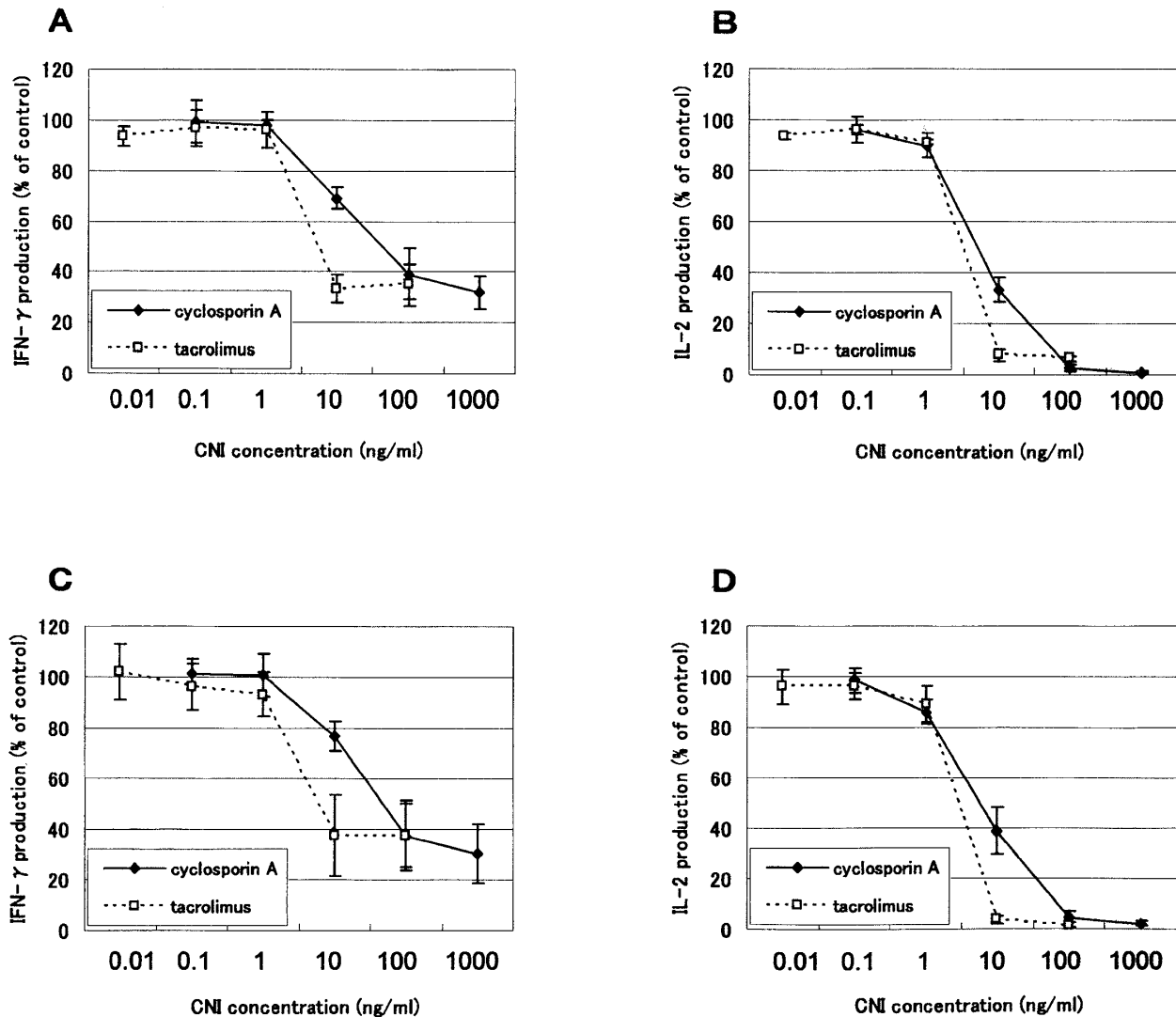


図1 In vitro における CNI 濃度と細胞内サイトカイン陽性 T 細胞割合の関係

CNI 暴露濃度と、細胞内サイトカイン陽性 T 細胞との関係を示した。CsA (◆) 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/ml, また FK506 (□) 0.01, 0.1, 1, 10, 100ng/ml で検討を行い、結果は、CNI 暴露されていない細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の割合を 100 % コントロールとした相対的割合で表し、平均値 ± 標準偏差 (n = 3) を示した (A : IFN γ + CD4T, B : IL2 + CD4T, C : IFN γ + CD8T, D : IL2 + CD8T)。CsA 暴露後、FK506 暴露後ともに、細胞内サイトカイン陽性 T 細胞割合は CNI 濃度依存的に減少するが、CsA 暴露群では 1ng/ml から 100ng/ml にかけて減少し、FK506 暴露群では、1ng/ml から 10ng/ml にかけて急激に減少した。

活性化 T 細胞を浮遊させた medium 中に CsA を添加すると、IFN γ + CD4T 細胞, IL2 + CD4T 細胞, IFN γ + CD8T 細胞, また IL2 + CD8T 細胞の CsA 非暴露下の細胞に対する相対的割合は、beads 刺激 (－) の resting T 細胞と同様に、濃度依存的な低下を認め、サイトカイン産生の抑制が

確認された。しかし、いずれの T 細胞分画においても、活性化 T 細胞でのサイトカイン陽性細胞の相対的割合は、同じ CsA 濃度で暴露された resting T 細胞に比して高値を示し、resting T 細胞と同等の抑制を得るためにはより高濃度の CsA が必要で、活性化 T 細胞におけるサイトカイン産生

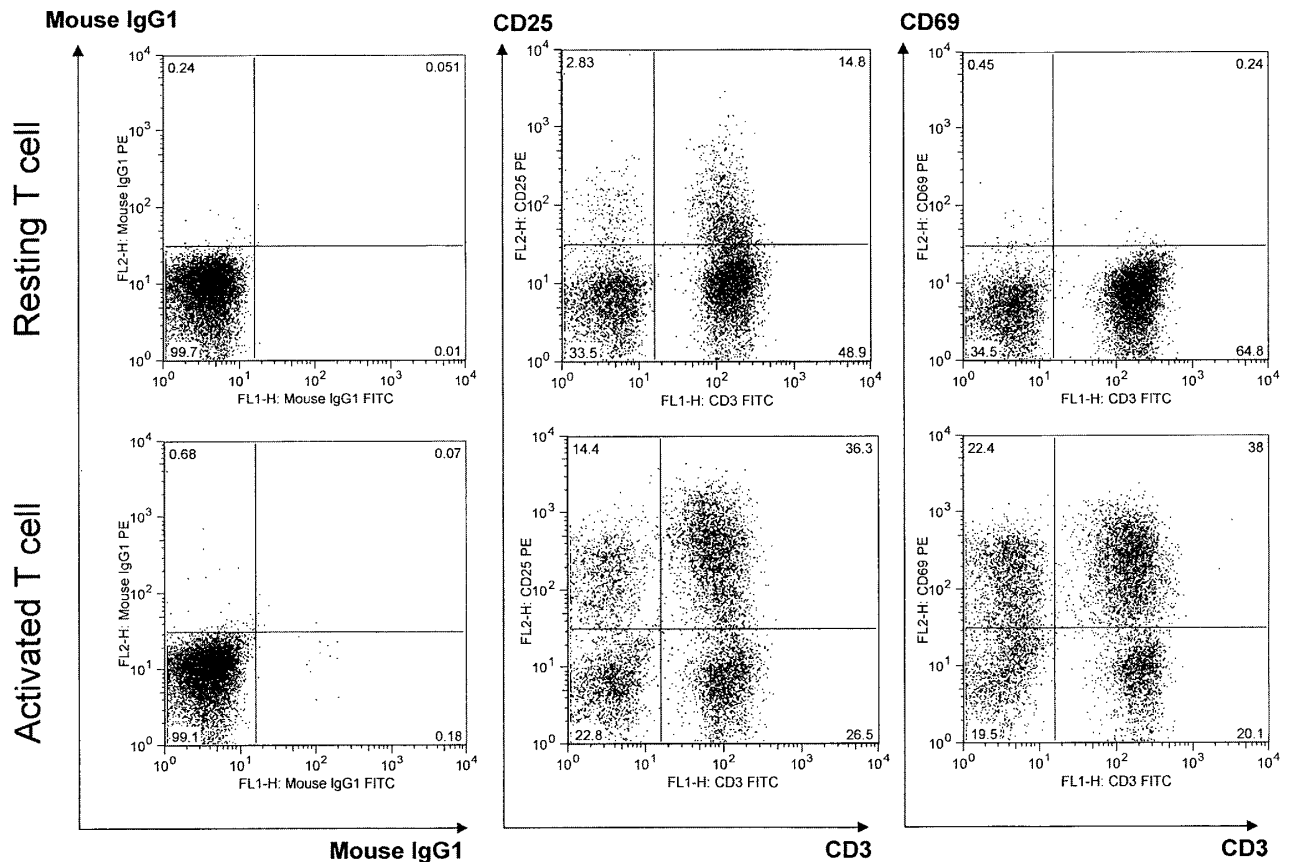


図2 Resting T細胞と活性化T細胞の活性化マーカーの発現

健康人末梢血単核球に Dynabeads CD3/CD28 T cell Expander を16時間共培養させた後のT細胞は、活性化マーカーであるCD25、CD69の高発現を認めた。今回我々は、この状態T細胞を活性化T細胞として使用した。

がCsAに対して抵抗性を有することが示唆された(図3)。

FK506添加による抑制効果も、活性化T細胞におけるサイトカイン陽性細胞のFK506非暴露下の細胞に対する相対的割合は、CD4、CD8いずれのT細胞分画においても濃度依存的に低下した(図3)。その低下の程度は活性化T細胞とresting T細胞とで有意差を認めず、ほぼ同一のFK506濃度でサイトカイン産生が抑制されることを示唆していた。

6. In vitroでのCNIによる抑制解除後の細胞内サイトカイン産生の回復

次にCNIによる抑制から解除されたT細胞の

サイトカイン産生能の回復に相違があるかどうかを検討するために、resting T細胞、活性化T細胞それぞれに、抑制効果が約50%程度であった濃度(低濃度)とほぼ完全に抑制した濃度(高濃度)の2種類の濃度のCNI添加後に培養mediumを洗浄、その後の細胞内サイトカイン陽性T細胞の割合の回復程度を4時間後まで測定した。

CsAではサイトカイン陽性T細胞の相対的割合が約50%程度に減少したCsA 20ng/mlと、十分にサイトカイン陽性T細胞の減少を認めたCsA 200ng/mlの2種類の濃度で添加した細胞の回復を測定した。その結果IFN γ +CD4 T細胞の割合は、20ng/ml、200ng/mlともにresting T細胞、活性化T細胞いずれにおいても、4時間後で

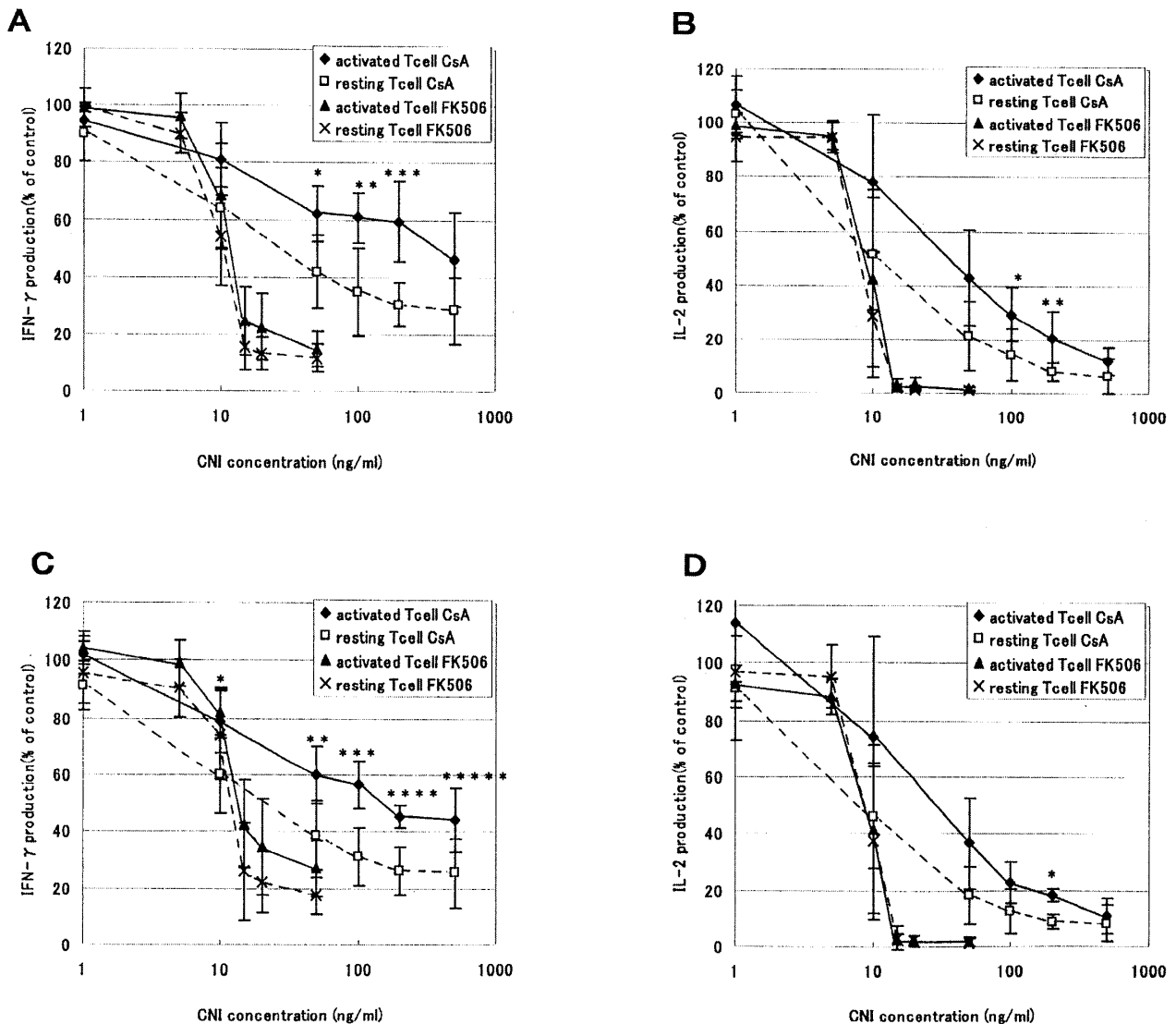


図3 CNI 暴露による活性化 T 細胞・resting T 細胞のサイトカイン産生抑制効果

CNI 暴露濃度と、活性化 T 細胞・resting T 細胞それぞれのサイトカイン陽性細胞の相対的割合の関係を示した。CsA 1, 10, 50, 100, 200, 500ng/ml, また FK506 1, 5, 10, 15, 20, 50ng/ml で検討を行い、結果は、CNI に暴露されていない細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の割合を 100 %コントロールとした相対的割合で表し、平均値±標準偏差 (n = 5) を示した (A : IFN γ + CD4T, B : IL2 + CD4T, C : IFN γ + CD8T, D : IL2 + CD8T)。A ~ D それぞれにおいて、活性化 T 細胞へ CsA 暴露 (◆), resting T 細胞へ CsA 暴露 (□), 活性化 T 細胞へ FK506 暴露 (▲), また resting T 細胞へ FK506 暴露 (×) の結果を表した。p<0.05 を有意差ありとした。

CsA 暴露後の活性化 T 細胞におけるサイトカイン陽性細胞の相対的割合 (◆) は、同 CsA 濃度暴露後の resting T 細胞 (□) と比して有意に高値を示した (A : * p = 0.023, ** p = 0.010, *** p = 0.03, B : * p = 0.041, ** p = 0.021, C : * p = 0.048, ** p = 0.017, *** p = 0.002, **** p = 0.002, ***** p = 0.035, D : * p = 0.001)。FK506 暴露後の活性化 T 細胞でのサイトカイン陽性細胞の相対的割合 (▲) は、resting T 細胞 (×) と比して有意差は認めなかった。

も有意な回復を認めなかった(図4A, 4C)。しかしIL2 + CD4T細胞の割合(図4B, 4D)は4時間後で有意な回復を認め、特に低濃度20ng/ml暴露解除後の活性化T細胞では回復率が有意に高く(暴露直後30.72 ± 3.48 %から4時間後51.38 ± 6.09 %へ増加, * $p = 0.007$)、4時間後には測定したCD4T細胞の約半数にIL-2産生の回復が観察された(図4B)。この傾向はCD8においても全く同様でIL2 + CD8T細胞の割合は有意に増加していた(data not shown)。

一方FK506ではサイトカイン陽性細胞の相対的割合が約50 %程度に低下した7.5ng/mlと、十分にサイトカイン陽性T細胞の低下を認めた20ng/mlの2種類の濃度で添加した細胞の洗浄後のサイトカイン産生の回復を測定した。その結果IFN γ + CD4 T細胞, IL2 + CD4 T細胞の陽性率の回復は7.5ng/ml, 20ng/mlの両者の濃度ともに全く産生細胞の有意な産生回復は観察されなかった(図5A-D)。この傾向はCD8 T細胞でも同様であった(data not shown)。

考 察

今回我々は、フローサイトメトリーを用いて、健常人末梢血T細胞分画におけるIFN- γ , IL-2, IL-4陽性細胞の割合を測定する方法を用いて、CsAとFK506それぞれの薬剤によるサイトカイン産生抑制効果の特性をin vitroの系で検討した。その結果から主要な特性として以下の3点を明らかにした。まず第1点目としてはCsAでは1ng/mlから100ng/mlの濃度において濃度依存的に抑制が認められ、FK506では1ng/mlから10ng/mlとCsAに比して1/10の濃度かつ濃度域でサイトカイン産生抑制が認められた。第2点目としては、CD3/CD28 beadsでのリンパ球活性化法を用いた活性化MNCにおけるCNIのサイトカイン産生抑制効果を、resting MNCとの比較で検討を加えた結果、CsAの活性化T細胞におけるサイトカイン抑制効果はresting T細胞における効果よりも減弱され、活性化T細胞で十分なサイトカイン抑制効果を得るには高濃度のCsAが必

要になることが確認された。一方FK506では、活性化T細胞とresting T細胞とで抑制効果に差を認めなかった。さらに第3点目としては、CNI暴露を解除した後のサイトカイン産生抑制の回復を測定した結果から、CsA暴露解除後のIL2産生においては、低濃度で暴露されたT細胞では有意なサイトカイン産生の回復が認められた。一方、高濃度CsAやFK506に暴露されたT細胞では、少なくとも4時間後までは抑制効果が持続することがin vitroの系では確認された。

Jung Tら²²⁾は、フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン測定法を用い、リンパ球分画でのIFN- γ 陽性細胞は約30 %, IL-2陽性細胞は約50 %, IL-4陽性細胞は1-3 %と報告している。今回、我々の検討では、CD4陽性・CD8陽性細胞それぞれにおける細胞内サイトカイン陽性細胞割合を測定し、CD4陽性細胞ではIFN- γ 陽性細胞よりIL-2陽性細胞の割合が多く、またCD8陽性細胞ではIL-2陽性細胞よりIFN- γ 陽性細胞の割合が多いことが明らかとなった。一方、検出されたIL-4陽性細胞(IL4 + CD4T細胞, IL4 + CD8T細胞)の割合は非常に低く、解析を行う上で、フローサイトメトリー測定時の陰性コントロールを2 %未満になるよう設定したため、検出されたIL-4陽性細胞の割合は非特異的なバックグラウンドとの区別が難しく、評価不十分と判断し、今回の検討は、IFN γ + CD4T細胞, IL2 + CD4T細胞, IFN γ + CD8T細胞, IL2 + CD8T細胞について行った。また、今回の結果からサイトカイン陽性のT細胞の割合は、非常に個体差が大きいことが示された。Hartel Cら²⁰⁾は、IL-2のmRNA発現量に個体差があることを示しており、mRNAレベルだけでなく、タンパクレベルにおいても個体差があることが確認された。そこで今回、健常人の細胞内サイトカイン陽性T細胞の割合とCNIの関係を検討するにあたり、この個体差を考慮し、それぞれ個々のサンプルについて、CNI暴露されていない細胞内サイトカイン陽性T細胞の割合を100 %コントロールとした相対的割合を用いて解析した。

同種造血幹細胞移植後に生じるGVHDは、ド

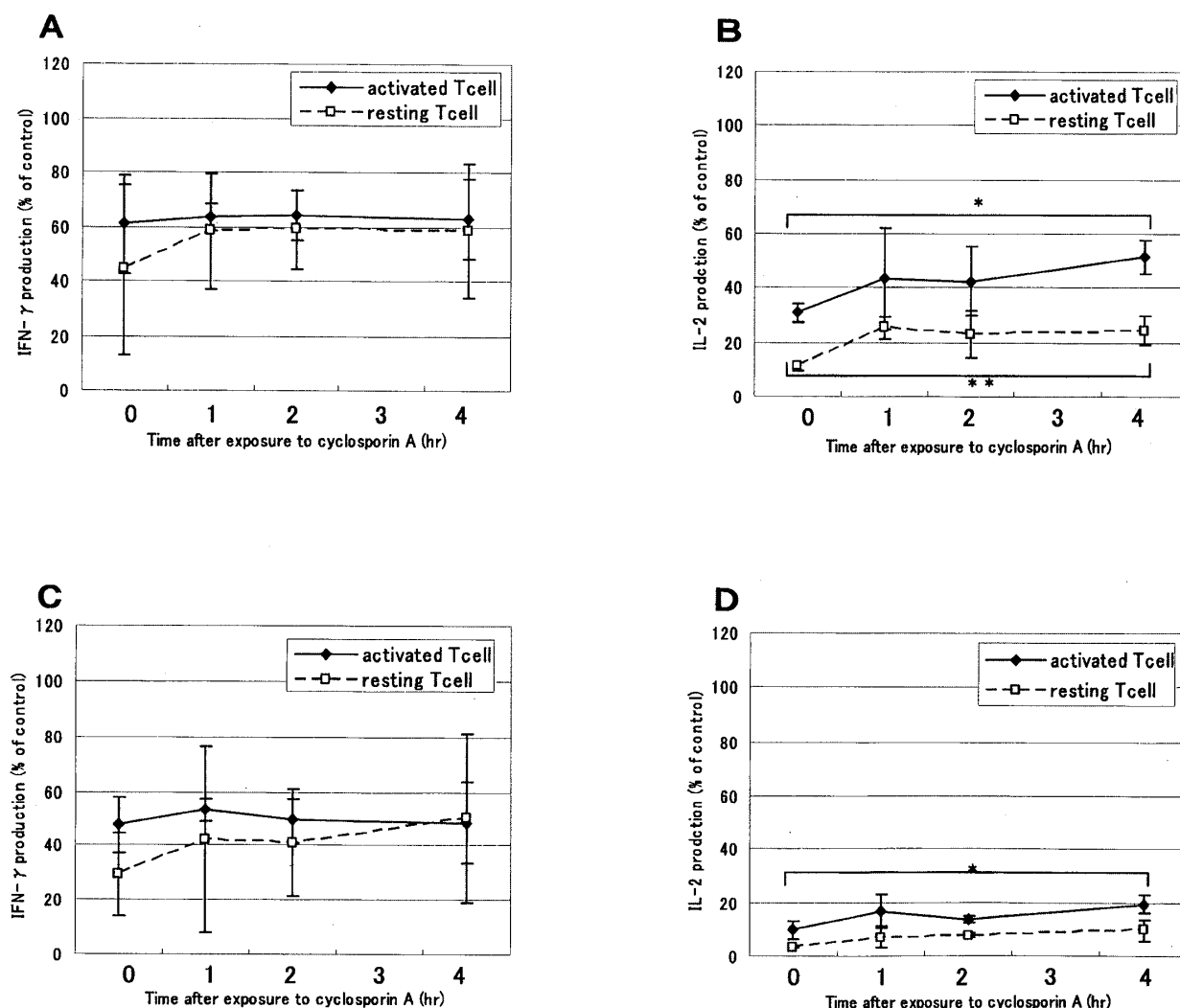


図4 In vitro での CsA による抑制解除後の細胞内サイトカイン産生の回復

活性化 T 細胞 (◆), resting T 細胞 (□) それぞれに, 抑制効果が約 50 % 程度であった CsA 20ng/ml (A, B) と, 十分なサイトカイン陽性 T 細胞の減少を認めた CsA 200ng/ml (C, D) の 2 種類の濃度の CsA 添加後に上清を洗浄, その後の細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の割合の回復程度を 4 時間まで測定した. 結果は平均値 ± 標準偏差で, CsA に暴露されていない細胞の細胞内サイトカイン陽性 T 細胞割合を 100 % コントロールとした相対的割合で示した ($n = 3$). $p < 0.05$ を有意差ありとした. 検討は, CD4T 細胞, CD8T 細胞について行ったが, T 細胞分画に関わらず同様の傾向を示したため, IFN γ + CD4T 細胞 (A, C), IL2 + CD4T 細胞 (B, D) の相対的割合について示した.

IFN- γ 陽性 T 細胞の相対的割合 (A, C) は, 活性化 T 細胞, resting T 細胞また CsA 濃度に関わらず, 暴露解除後 4 時間で有意な回復を認めなかった. しかし IL-2 陽性 T 細胞の割合 (B, D) は, 特に活性化 T 細胞の低濃度 20ng/ml 暴露解除後の回復が有意に高くみられた (B). 暴露解除直後から 4 時間後の IL2 + CD4T 細胞の相対的割合のは, CsA 20ng/ml 暴露 (B) の活性化 T 細胞 (◆) では 30.72 ± 3.48 から 51.38 ± 6.09 へ (* $p = 0.007$), resting T 細胞 (□) では 10.98 ± 1.43 から 24.24 ± 5.25 へ (** $p = 0.013$), また CsA 200ng/ml 暴露 (D) の活性化 T 細胞 (◆) では 9.65 ± 3.64 から 19.43 ± 3.64 へ (* $p = 0.030$), resting T 細胞 (□) では 3.35 ± 0.29 から 9.68 ± 4.10 へ ($p = 0.056$) それぞれ回復した.

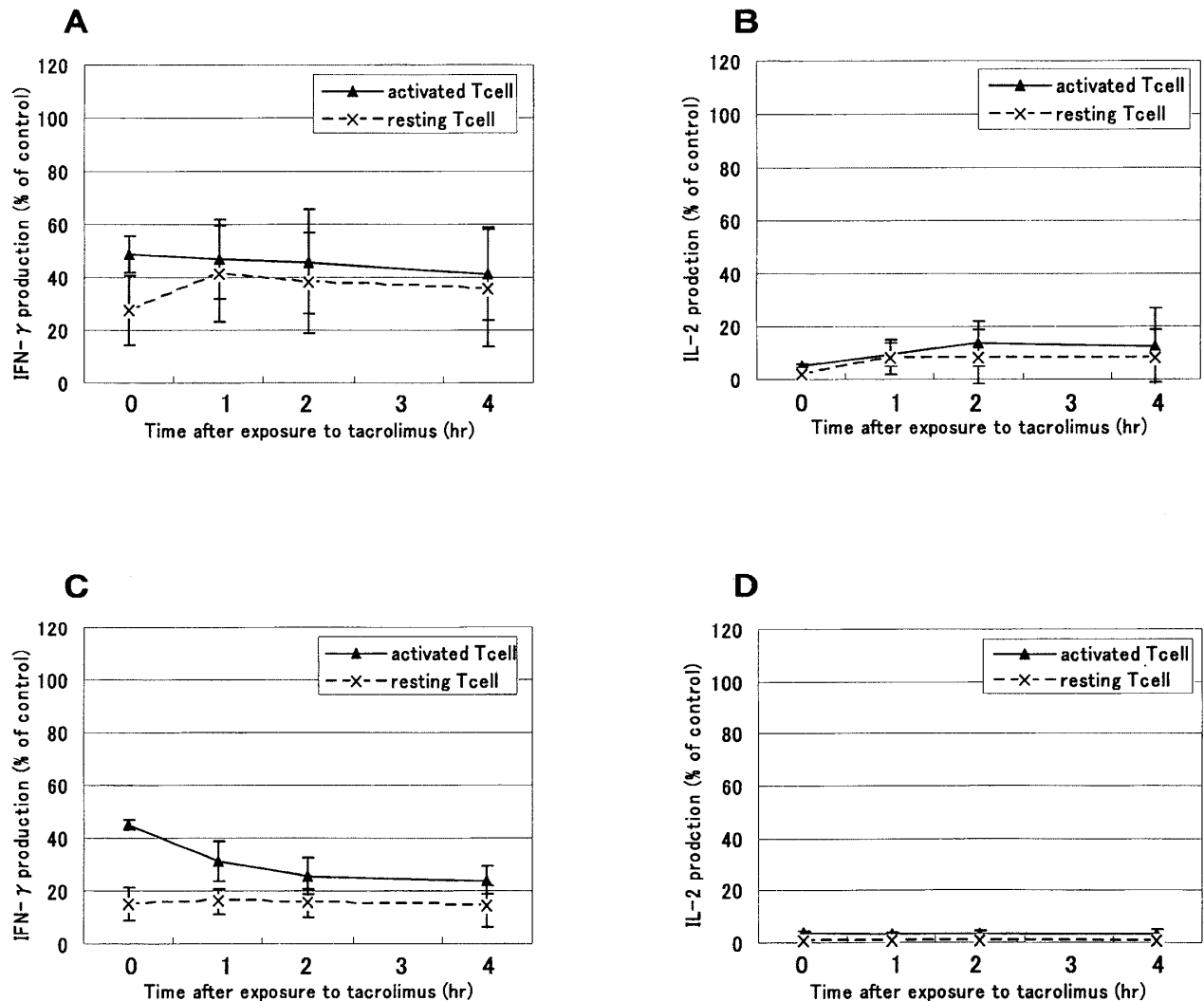


図5 In vitro での FK506 による抑制解除後の細胞内サイトカイン産生の回復

活性化 T 細胞 (▲), resting T 細胞 (×) それぞれに, 抑制効果が約 50 % 程度であった FK506 7.5ng/ml (A, B) と, 十分なサイトカイン陽性 T 細胞の減少を認めた FK506 20ng/ml (C, D) の 2 種類の濃度の FK506 添加後に上清を洗浄, その後の細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の割合の回復程度を 4 時間まで測定した. 結果は平均値±標準偏差で, FK506 に暴露されていない細胞の細胞内サイトカイン陽性 T 細胞割合を 100 % コントロールとした相対的割合で示した ($n = 3$). $p < 0.05$ を有意差ありとした. 検討は, CD4T 細胞, CD8T 細胞について行ったが, T 細胞分画に関わらず同様の傾向を示したため, IFN γ + CD4T 細胞 (A, C), IL2 + CD4T 細胞 (B, D) の相対的割合について示した.

IFN- γ 陽性 T 細胞 (A, C), IL-2 陽性 T 細胞 (B, D) とともに, FK506 7.5ng/ml, 20ng/ml 添加洗浄後 4 時間では, 有意な産生回復は観察されなかった.

ナー由来の T 細胞がレシピエントの各種臓器を攻撃する反応と考えられている²⁵⁾. T 細胞が活性化してサイトカインを放出するためには, 抗原提示細胞からの抗原提示と T 細胞受容体 (TCR)

/CD3 シグナルの他に, costimulatory signal が必要であり, T 細胞上の CD28 分子と B7 family との相互作用が重要であるとされている²⁶⁾. そこで我々は, CD3/CD28 beads 刺激によって活性化

された T 細胞を用いて、活性化 T 細胞と resting T 細胞の CNi 暴露による影響の相違点を検討した。その結果、T 細胞は、resting T 細胞に比し IFN- γ や IL-2 産生細胞の割合の増加を認めないものの、特に CsA 暴露によるサイトカイン産生抑制効果が減弱することが示された。このことは、活性化 T 細胞を抑制するためには、resting T 細胞に比して、高濃度の CsA 暴露が必要であることを示唆する結果であると考えられる。June CH らは、CD3 刺激後の細胞増殖また IL-2 遺伝子発現は、CsA により抑制を受けるが、CD28 + PMA 刺激後の細胞増殖や IL-2 遺伝子発現は、CsA により抑制を受けないと報告している²⁷⁾。今回の測定方法を用いた場合、活性化 T 細胞の測定は、結果的に CD3/CD28 刺激と PMA + ionomycin すべての刺激を受けた細胞の検討となっているが、CsA を高濃度にするすることで、これらの経路を介した活性化 T 細胞でも IL-2 産生を抑制することを示唆している。

一方 FK506 は CsA に比して、低い濃度でも強い活性を持ち、臨床的に我々が調整可能な濃度域が狭いことが確認された。また、FK506 暴露解除後 4 時間経過した IFN- γ 陽性 T 細胞、IL-2 陽性 T 細胞は、ともに有意な回復を認めなかった。このことは、FK506 と FKBP の強く長時間にわたる結合に起因していると考えられる²⁸⁾。さらに FK506 は resting T 細胞のサイトカイン産生を抑制するのと同程度の濃度で、活性化 T 細胞の IFN- γ 、IL-2 産生をも抑制できると考えられる。これらの結果から、FK506 は CsA に比して低い濃度でも強いサイトカイン産生抑制活性を持つことから、HLA 不一致 allo-HSCT など、GVHD 効果を強力に必要な症例では効果を発揮することが期待される。一方、再発率の高い症例など、GVL 効果を期待したい allo-HSCT 症例の様な、免疫抑制を調整する必要があるような例では、その調節可能な濃度域が狭く投与法の設定が難しい可能性が示唆された。

CsA 投与中の移植症例の全血サンプルにおける検討で、CsA による CN 活性の抑制は、迅速に回復すると報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾²⁹⁾³⁰⁾。今回、我々の

検討では、低濃度 CsA 暴露後の IL-2 陽性 T 細胞は、その後 4 時間で有意な回復を示した (図 4B)。しかし一方で高濃度の CsA 曝露後の T 細胞では洗浄後 4 時間では IL-2 産生抑制が継続しており、T 細胞の IL-2 産生を十分に、長時間抑制するには、高濃度の CsA 暴露が必要であるといえる。今回の in vitro での洗浄後 4 時間という時間は、さらに 4 時間の PMA + ionomycin 刺激を追加した検査であることから約 8 時間にわたって抑制が持続していることを示唆しており、臨床的にも 3-4 時間点滴静注による 1 日 2 回投与における CsA 薬物動態の妥当性を示唆するものと考えられる。

ところで我々は、van den Berg AP ら²⁴⁾ が報告している方法を用いて、allo-HSCT 後の症例における血中 CsA 濃度と CD4 陽性 T 細胞内サイトカイン陽性細胞の In vivo プロファイルも検討した。In vivo のプロファイルでは、CsA 血中濃度上昇に伴い、T 細胞内サイトカイン陽性細胞の割合は減少し、そして CsA 血中濃度の低下に伴い、T 細胞内サイトカイン陽性細胞の割合は増加し、トラフでのレベルにまで戻っていた³¹⁾。しかし、今回の in vitro の検討では、低濃度 CsA 暴露解除 4 時間後の T 細胞内サイトカイン陽性細胞の割合でさえ、CsA 無添加のコントロールの約 60 % にまでしか回復を認めなかった。CsA 暴露解除後 8 時間後の T 細胞内サイトカイン陽性細胞の回復も検討したが、十分な回復は認めなかった (data not shown)。十分な回復が得られなかった原因として、CsA 暴露により、T 細胞がアポトーシスに陥った可能性を考えて Annexin V を利用した apoptosis 細胞の検出を確認したが、明らかな apoptosis 細胞の増加は観察されなかった (data not shown)。Batiuk TD らは、CsA で抑制された末梢血リンパ球の CN リン酸化活性は、in vivo では迅速に回復するが、in vitro においては緩徐にそして十分な回復が得られないことを報告している³²⁾。彼らは、in vitro において回復が遅く、十分な回復が得られない理由として、培養液中のリンパ球では P 糖蛋白活性が低く、CsA の流出には CsA が均衡状態になるための細胞外結合部位が必要となること、また、培養液中の細胞外結合部位は十分な回復を

促進するには不十分であり、回復を促進するためには細胞外の疎水性結合部位が必要であると述べている。しかしながら、培養液中に赤血球を添加し、*in vivo* で存在している疎水性環境を模倣すると、*in vitro* で得られる回復の程度は増すが、*in vivo* で得られる十分な回復を得るまでには至らないとも報告している。我々の検討でも、培養液中に浮遊させたリンパ球を用いて CsA による抑制からの回復を *in vitro* で検討したために、十分な回復が得られなかったと考えられる。

今回の結果から得られた CsA や FK506 それぞれの免疫抑制の特性をふまえて、今後の allo-HSCT における GVHD 予防における使用法を考察してみると、CsA を用いる際は、活性化 T 細胞を含めたドナーリンパ球を十分に抑制するためには、ある程度高濃度の CsA 暴露が必要であると考えられる。CsA は低濃度暴露に限らず高濃度暴露後でも、測定系を含めて 8 時間後になると IL-2 産生 T 細胞の回復傾向を認める。そこで、1 日に 2 分割で一時的な高濃度（ピーク）を作る投与方法が CsA の特性を生かした投与方法ではないかと考えられた。一方 FK506 は、有効濃度域が低濃度で狭い一方、活性化 T 細胞でのサイトカイン産生も低濃度かつ狭い濃度域で抑制されることから、毒性との兼ね合いから 24 時間持続点滴による投与方法は許容される投与方法であることが示唆された。なお、今回我々が行った *in vitro* での検討では、すべて medium 濃度を用いた検討であり、medium 中には赤血球やリポ蛋白は含まれていないため、*in vivo* での血中濃度とは同等とはいえず、臨床症例における免疫抑制の薬効動態との関係を確認することで臨床での目標血中濃度を再検討する必要である。

謝 辞

最後に、本研究において御指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科の相澤義房教授、新潟大学大学院医歯学総合病院高密度無菌治療部の古川達雄准教授、増子正義助教、新潟大学医歯学総合研究科の塚田信弘先生、井藤ヒロミ技官に深謝します。

文 献

- 1) Masuda S and Inui K: An up - date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 112: 184 - 198, 2006.
- 2) Anasetti C: Advances in the prevention of graft - versus - host disease after hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 15; 77 (9 Suppl): S79 - 83, 2004.
- 3) Kuypers DR: Immunosuppressive drug monitoring - what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome. *Transpl Int* 18: 140 - 150, Review, 2005.
- 4) Citterio F: Evolution of the therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc* 36 (2 Suppl) : 420S - 425S, Review, 2004.
- 5) Knight SR and Morris PJ: The clinical benefits of cyclosporine C2 - level monitoring: a systematic review. *Transplantation* 83: 1525 - 1535, Review, 2007.
- 6) Ruutu T, Niederwiser D, Gratwohl A and Apperley JF on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT: A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone marrow Transplant* 19: 759 - 764, 1997.
- 7) Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der Jagt R, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE and Wingard JR: Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft - versus - host disease prophylaxis after HLA - identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 92: 2303 - 2314, 1998.
- 8) Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, Przepiorka D, Davies S, Petersen FB, Bartels P, Buell D, Fitzsimmons W, Anasetti C, Storb R and Ratanatharathorn V:

- Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft - versus - host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 96: 2062 - 2068, 2000.
- 9) Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Takahashi S, Hirabayashi N, Hiraoka A, Kanda Y, Tanosaki R, Okamoto S, Iwato K, Atsuta Y, Hamajima N, Tanimoto M and Kato S: Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft - versus - host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA - identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transplant* 34: 331 - 337, 2004.
 - 10) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE and Bortin MM: Graft - versus - leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555 - 562, 1990.
 - 11) Woo M, Przepiorka D, Ippoliti C, Warkentin D, Khouri I and Fritsche HK: Toxicities of tacrolimus and cyclosporin A after allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 20: 1095 - 1098, Review, 1997.
 - 12) Bacigalupo A, Van Lint MT, Occhini D, Gualandi F, Lamparelli T, Sogno G, Tedone E, Frassonni F, Tong J and Marmont AM: Increased risk of leukemia relapse with high - dose cyclosporine A after allogeneic marrow transplantation for acute leukemia. *Blood* 77: 1423 - 1428, 1991.
 - 13) Hiraoka A, Ohashi Y, Okamoto S, Moriyama Y, Nagao T, Kadera Y, Kanamaru A, Dohy H and Masaoka T: Japanese FK506 BMT (Bone Marrow Transplantation) Study Group. Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft - versus - host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28: 181 - 185, 2001.
 - 14) Duncan N and Craddock C: Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 38: 169 - 174, Review, 2006.
 - 15) Clipstone NA and Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T - lymphocyte activation. *Nature* 357: 695 - 697, 1992.
 - 16) Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I and Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin - cyclosporin A and FKBP - FK506 complexes. *Cell* Aug 66: 807 - 815, 1991.
 - 17) Jorgensen KA, Koefoed Nielsen PB and Karamperis N: Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporine A and tacrolimus. *Scand J Immunol* 57: 93 - 98, 2005.
 - 18) Halloran PF, Helms LMH, Kung L and Noujaim J: The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 15: 1356 - 1361, 1999.
 - 19) Fukudo M, Yano I, Matsuda S, Okuda M and Inui K: Distinct Inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporine phosphatase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 816 - 825, 2005.
 - 20) Hartel C, Schumacher N, Fricks L, Ebel B, Kirchner H and Muller - Steinhardt M: Sensitivity of whole - blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK506): Impact of interleukin - 2 mRNA expression as surrogate measure of immunosuppressive effect. *Clin Chem* 50: 141 - 151, 2004.
 - 21) Sander B, Andersson J and Andersson U: Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde - saponin procedure. *Immunol Rev* 119: 65 - 93, 1991.
 - 22) Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C and Rieger C: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Immunol Methods* 159: 197 - 207, 1993.
 - 23) Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR and Maino VC: Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T

- cells by flow cytometry. *Blood* 86: 1408 - 1419, 1995.
- 24) van den Berg AP, Twilhaar WN, Mesander G, van son WJ, van der Bij W, Klompmaker IJ, Slooff MJ, The TH and de Leij LH: Quantitation of immuno - suppression by flow cytometric measurement of the capacity of T cells for interleukin - 2 produc - tion. *Transplantation* 65: 1066 - 1071, 1998.
- 25) Ferrara JLH: Paradigm shift for graft - versus - host disease. *Bone Marrow Transplant* 14: 183 - 184, 1994.
- 26) Schultze J, Nadler LM and Gribben JG: B7 - mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev* 10: 111 - 127, 1996.
- 27) June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T and Thompson CB: T - cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine - resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7: 4472 - 4481, 1987.
- 28) Kay JE, Sampare - Kwateng E, Geraghty F and Morgan GY: Uptake of FK506 by lymphocytes and erythrocytes. *Transplant Proc* 23: 2760 - 2762, 1991.
- 29) Koefoed - Nielsen PB, Karamperis N and Jorgensen KA: Comparison of the temporal pro - file of calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus in renal transplant patients. *Transplant Proc* 37: 1736 - 1738, 2005.
- 30) Koefoed - Nielsen PB, Karamperis N, Højskov C, Poulsen JH and Jørgensen KA: The calcineurin activity profiles of cyclosporine and tacrolimus are different in stable renal transplantat patients. *Transplant Int* 19: 821 - 827, 2006.
- 31) 倉崎桃里, 増子正義, 塚田信弘, 古川達雄, 相澤義房: 同種造血幹細胞移植における免疫抑制療法. *今日の移植*. 20: 609 - 611, 2007.
- 32) Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, DeCastro L and Halloran PF: Cyclosporine inhibition of cal - cineurin activity in human leukocytes in vitro is rapidly reversible. *J Clin Invest* 96: 1254 - 1260, 1995.

(平成20年1月8日受付)