

Ciclosporin 投与におけるリンパ球中濃度及びNK活性

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

井 上 文 之

(平成3年6月6日受稿)

Key words: ciclosporin, NK活性, ラット皮膚細胞

諸 言

Ciclosporin は真菌 *Tolypocladium inflatum* の代謝産物で、分子量1202.6の cyclic undecapeptide であり、水あるいは n-hexane には不溶であるが、脂質あるいは有機溶媒には溶ける性質を有し、強力な免疫抑制効果を持つ新しい薬剤である¹⁻³⁾1978年 Calne ら⁴⁾により腎移植において免疫抑制剤として最初の臨床報告がなされて以来、腎臓⁵⁻⁸⁾だけでなく、心臓⁹⁾、肝臓¹⁰⁾、脾臓¹¹⁾、肺臓あるいは骨髄移植¹²⁻¹³⁾に広く欧米にて使用され、移植臓器生着の画期的な成績が報告されている。

わが国では、1982年より Ciclosporin が腎臓移植の臨床治療に導入され、多施設協同研究にてその著しい有効性が確認されている¹⁴⁾。

免疫抑制剤として Ciclosporin の投与量は、血清中の濃度により決定されているが、免疫担当細胞であるリンパ球への取込みによる評価も重要である。そこで、今回我々はラットを用いて血清中濃度とリンパ球中濃度との比較及びK562細胞とラット皮膚上皮細胞に対するNK活性への影響を検討した。

方 法

1. 使用動物

7~8週齢の近交系F344 (Rt1^{1V1}) ラットを日本チャールズ・リバー社より購入し、雌雄を一致させて使用した。

2. 培養液

PRMI 1640 培養液に25mM HEPES 緩衝液・10% ウシ胎児血清 (FCS, Grand Island Bio-

chemical Co., GIBCO, USA) 及び1% 抗生剤 (Penicillin-Streptomycin solution, GIBCO) を添加したものを培養に使用した。

3. 皮膚細胞および脾細胞浮遊液の作製

皮膚細胞の単離は田中および酒井の方法¹⁵⁾に従って行った図1の如く、F344ラット尾より採取した皮膚片を0.5% trypsin-リン酸緩衝生理食

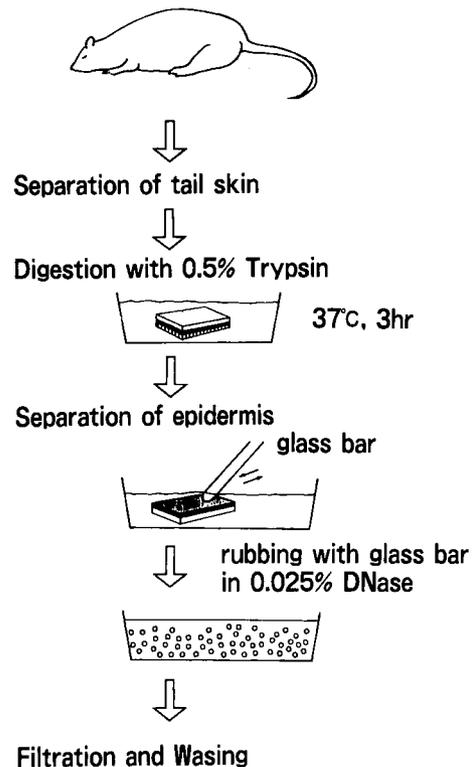


図1 Isolation of skin epidermal cells.

塩液 (PBS) 中にて消化した後, 0.025% DNase (deoxyribonuclease 1, SIGMA) - PBS 中にて遊出させた単離皮膚上皮細胞を150 μ メッシュフィルター (池本化学工業) にて濾過した後, 洗浄して使用した。単離皮膚上皮細胞の生存率は約90%であった。

F344ラットより脾を採取し, 粉碎して脾細胞を単離した。浮遊液中の赤血球は0.75% NH₄Cl トリス緩衝液処理にて破壊し, 150 μ メッシュフィルターにて濾過した後, 洗浄して使用した。

4. 試験管内殺細胞試験法 (図2)

標的細胞として, ラット皮膚細胞およびK562継代腫瘍細胞を用いた。F344皮膚細胞 (10⁷個/0.3ml) の標識は, 田中¹⁶⁾の方法により, 300 μ Ci の Na⁵¹CrO₄ (科研化学) と plastic tube (Falcon 200, Falcon Plastics, USA) 中に混合し, 37 $^{\circ}$ C・5%CO₂の条件にて2時間標識した。標識後 RPMI 1640培養液にて3回洗浄し残存⁵¹Crを除去した。

K562細胞は, 当科で継代している株を用い, 同様に200 μ Ciの Na⁵¹CrO₄と plastic tube中に

混合し, 1時間標識した。

殺細胞試験は, U底マイクロプレート (Nunc-clon, A/S Nunc, Denmark) 中にて, F344ラット脾細胞とE T比100:1にて, 37 $^{\circ}$ C・5%CO₂の条件にて, 皮膚細胞は12時間, K562細胞は4時間培養の後, 遊出⁵¹Cr量を測定した。この時の皮膚細胞およびK562細胞よりの⁵¹Crのspontaneous releaseは, それぞれ全標識量の30%と10%であった。また, 活性は次式により算出した。

$$\text{NK活性} = \frac{\text{exp.release} - \text{spont.release}}{\text{total} - \text{spont.release}} \times 100$$

5. ラットへの Cyclosporin 投与方法

F344ラットの下腿に30mg/kgのCyclosporinを筋肉内投与し, 連日投与時は左右の下腿へ交互に投与した。

6. 脾細胞のCyclosporinによる試験管内処理

Cyclosporin濃度を5ng/ml~50 μ g/mlまでの5段階に調整して10⁷個の脾細胞と共に, 37 $^{\circ}$ C water bathにて1時間静置の後, 3回洗浄して溶液中Cyclosporinを除去し, 脾細胞の一部を

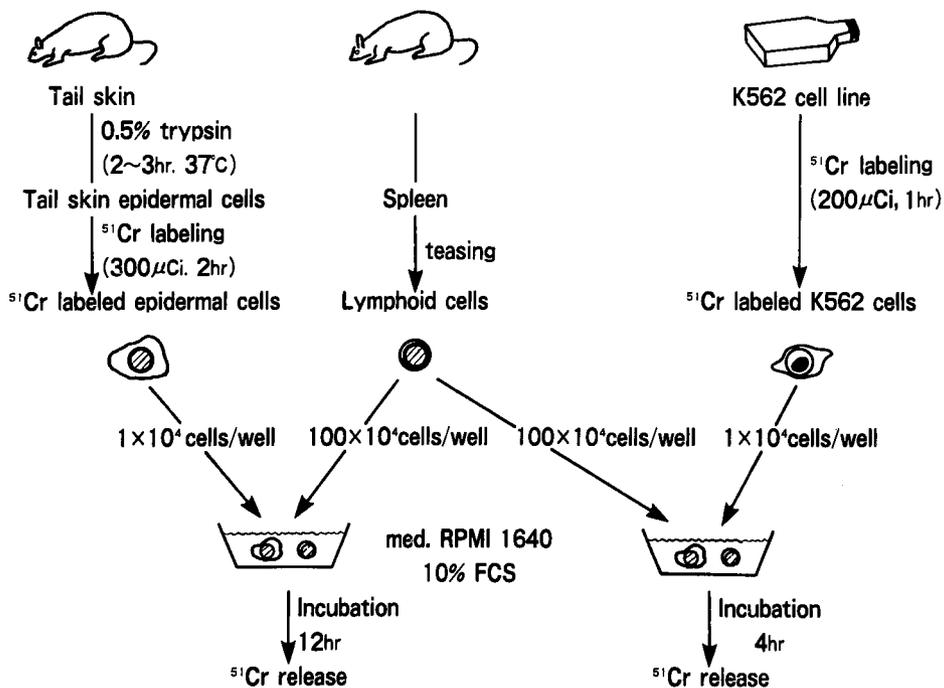


図2 Assay of Natural Cytotoxicity

北里ラボラトリーに測定を依頼し Cyclosporin 濃度を測定し、一部をNK活性測定における攻撃細胞として使用した。

7. 腎移植患者の Cyclosporin 濃度測定

岡山大学医学部附属病院第一外科に入院し、腎移植を施行された患者で、Cyclosporin 投与後採血し、血清中 Cyclosporin 濃度とリンパ球中 Cyclosporin 濃度を、北里ラボラトリーに依頼し、Radioimmunoassay (poly RIA) 法にて測定した。

結 果

1. NK活性における Cyclosporin の in vivo 投与の効果

in vivo における Cyclosporin 投与によるNK細胞への影響は、表1の如く、A群では30mg/kgの Cyclosporin を1回投与、B群では2回連日、C群では3回連日、D群では4回連日投与した。

図3は Cyclosporin in vivo 投与の典型的な結果であるが、上段の如くNK活性は、K562細胞に対しても、皮膚細胞に対しても同様に、投与回数に比例して抑制がみられ、4回投与のD群ではほとんどNK活性は消失した。下段は血清 Cyclosporin 濃度と脾細胞中の Cyclosporin 濃度であるが、血清濃度は投与回数に比例して増加した。脾細胞中の濃度においては、A群・B群で Cyclosporin 値は、測定限界濃度以下であったが、血清濃度の変化とほぼ同様に投与回数に比例して濃度の増加が認められた。

図4は同様の実験を4回施行した結果であるが、NK活性をコントロールに対する抑制率で

表1 Effect of in vivo administration of CyA on NK activity

DAY	-4	-3	-2	-1	0
A 群				↓	
B 群			↓	↓	
C 群		↓	↓	↓	
D 群	↓	↓	↓	↓	
control群					

assay

↓ = CyA30mg/kg

見ると、やはり投与回数に比例して抑制された。

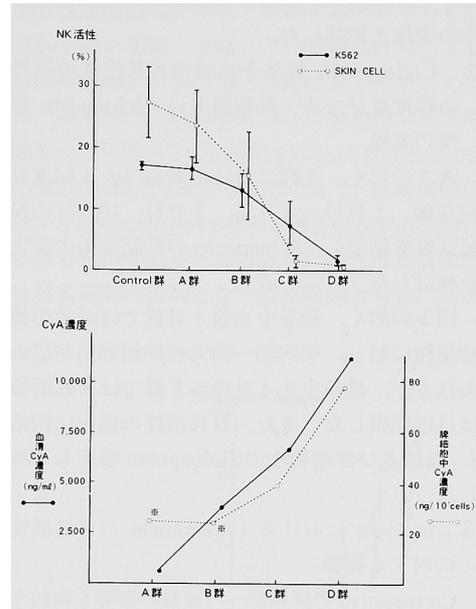


図3 Effect of in vivo administration of CyA on NK activity

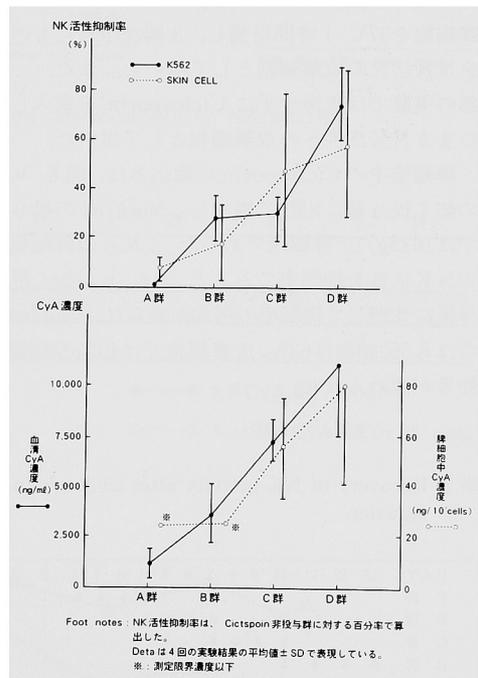


図4 Effect of in vivo administration of CyA on NK activity

更に、下段の如く血清 Cyclosporin 濃度、脾細胞中 Cyclosporin 濃度の変化はNK活性の抑制率の変化と相関した。

2. Cyclosporin 投与中止後のNK活性の回復の程度及び血清・脾細胞中の Cyclosporin 濃度の変動

表2の如く、4群に分けて30mg/kg 4回連日投与後、1日目、4日目、7日目、10日目のNK活性を測定し、Cyclosporinの抑制効果の変化を検討した。

図5の如く、投与中止後1日目では両者の標的細胞に対し、平均50~60%の抑制効果が認められるが、投与中止4日後のF群ではNK活性はほぼ回復した。また、NK活性の回復に相応し、血清及び脾細胞中のCyclosporin濃度も著減した。

3. in vitro における Cyclosporin のNK活性に対する影響

Cyclosporinの脾細胞への直接の影響を検討する目的で、脾細胞を試験管内で処理し、そのNK活性の変化を測定した。

5 ng~50µg/mlのCyclosporinにて、10⁷個の脾細胞を37℃ 1時間培養し、3回洗浄したものをNK活性の攻撃細胞として用いた。また、一部の実験では洗浄せずに Cyclosporin を混入したままNK活性への攻撃細胞として用いた。

脾細胞中の Cyclosporin の取込みは、図6-aの如く投与量に応じて増加し、50µg/mlの投与では162ng/10⁷脾細胞であった。これらの脾細胞のNK活性を抑制率でみると、図6-bの如く投与量に比例して抑制率の増加が見られ、50µg/mlではK562細胞は63%、皮膚細胞では46%の抑制効果が認められた。

表2 Recovery of NK activity after CyA administration

DAY	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
E 群														
F 群								↓	↓	↓	↓	↓	↓	
G 群					↓	↓	↓	↓						
H 群	↓	↓	↓	↓										
control 群														

assay

↓ = CyA 30mg/kg

また、図6-cの如くNK活性測定中も継続して作用させると、NK活性の抑制率はさらに増強した。

4. 腎移植患者における血中及びリンパ球中 Cyclosporin 濃度

図7は、腎移植前後に Cyclosporin を投与した患者の血中Cyclosporin濃度とリンパ球中Cyclosporin濃度であるが、ほぼ比例した増減が認められた。

次に、同時期に血中、リンパ球中濃度が測定できた6名の腎移植患者において、横軸に血中濃度、縦軸にリンパ球中濃度をとって、表を作成したものが、図7である。血中濃度とリンパ球中濃度は、Correlation Coefficient 0.834で相関した。

考 察

過去、免疫生物学者たちは、異常な、あるいは非自己の標的細胞を直接に傷害あるいは溶解しうる細胞（キラー細胞）が、宿主の生体防御機構の中で極めて重要な役割を果たしているにちがいないと考えていた。1960年に近代的方法論によって、キラー細胞の存在が証明され、

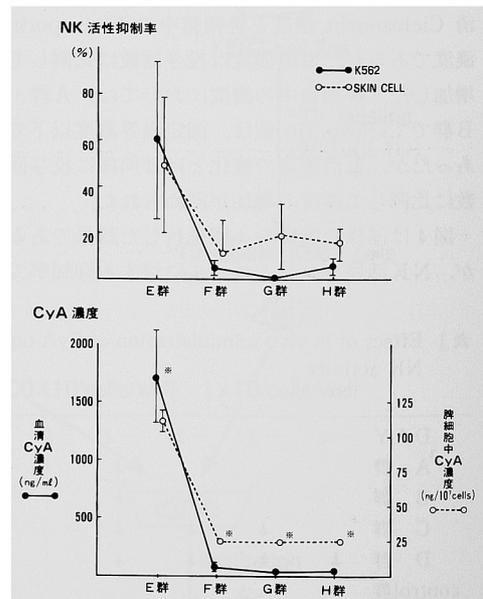


図5 Recovery of NK activity after CyA administration

外来抗原に対する生体特異免疫応答の明確な一形態であることが明らかとなった¹⁷⁾。そして、自己腫瘍や同じ組織型の腫瘍に対する特異的細胞障害反応を見出すことを期待し、実際にある種の癌患者やウイルスで誘導した腫瘍動物でその様な反応を観察した。つづいて、1975年に比較的幅広い種々の腫瘍細胞株に対して細胞障害活性を示し、しかも、特定の抗原刺激によらずして正常リンパ系組織に存在する Natural killer (NK) Cell が報告された¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに、近年

Kiessling and Haller²⁰⁾が natural killer system は腫瘍細胞に対して作用するのみでなく、生物学的に増殖・分化している細胞に対しても homeostasis を保つ為に作用すると示唆している。1983年に教室の田中²¹⁾は、皮膚細胞が正常脾細胞により破壊される結果を示し、これは natural killer system に属する反応であり、皮膚細胞に対する spontaneous cell-mediated cytotoxicity によるものであると報告以来、我々は皮膚細胞はNK細胞の標的となり得る細胞と考え、同実

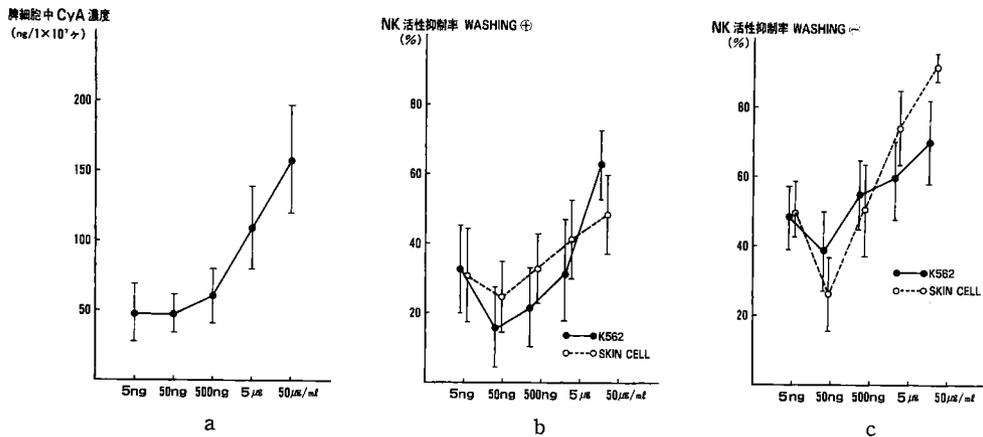


図 6 Effect of in vitro treatment of spleen cells with CyA on NK activity

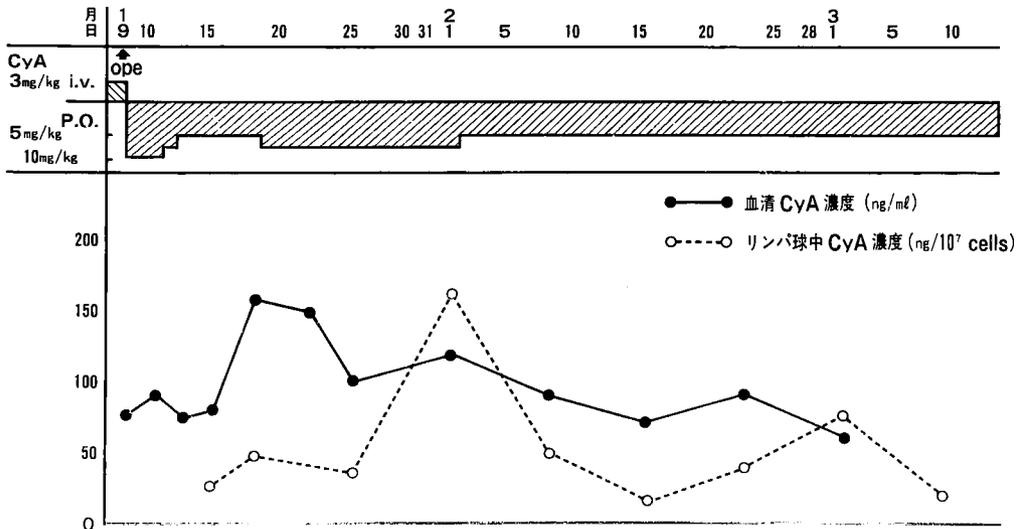


図 7 腎移植患者における血清及びリンパ球中 CyA 濃度

験系を用いてNK活性について研究してきた。

ここに述べた結果は、真菌の代謝産物である Cyclosporin は、用量依存性のNK活性の低下をおこすことを示した。Humanにおける腎移植患者では10mg/kg程が普通投与量とされているが、患者血清Cyclosporin濃度は当科では50~200ng/ml, Martinoら²³⁾によると、100~500ng/mlが普通であると報告されているが、今回のラットを使用したin vivo実験では、この程度ではほとんどNK活性の低下を認めず、30mg/kg, 3~4回投与にて、血清Cyclosporin濃度7~10μg/ml, リンパ球中Cyclosporin濃度50~100ng/10⁷cellsにて強いNK活性の低下を認めた。

M. Lefkowitz²³⁾らは、16人のCyclosporin処理した腎移植患者におけるNK活性を測定し、移植に続く初めの6ヵ月においてはNK活性は無傷のままであったと報告している。これらの結果は、M. Lefkowitzらの臨床データを支持するものと考えられる。

また、近年腎移植を行っている多施設において、Cyclosporin導入以来、移植後早期の感染症、特に重篤な細菌性肺炎や敗血症、種々のヒールズ感染症、特にCMVの頻度が減少しているという報告が多数なされている。リンパ球性のグロブリン製剤の使用頻度の増加、有効な抗生剤の進歩のような諸因子がからんでいることも確かであるが、NK活性の抑制が低いということが、移植後の種々のヒールズ疾患及び感染症発症の頻度減少に寄与している重要な因子であろうと考えている。

また、30mg/kg 4回投与で抑制されたNK活性も投与中止後1日目では、平均50~60%の抑制効果が認められるが、投与中止4日後では、NK活性はほぼ完全な回復が観察され、CyclosporinのNK活性に対する阻害作用は迅速に、可逆的に変化することがわかった。

KiesslingやHaller²⁰⁾が、NK活性は生体のHomeostasisを保つために作用すると示唆していると同様に、我々もNK活性は生体のbasicな活性であり、抑制されにくく、また抑制されてもすぐに回復しやすい活性であると考えている。臨床の場合において、腎移植後Cyclosporin使用し、抗原特異的キラーT細胞が抑制されてい

るにもかかわらず拒絶反応が進行する例があるが、このような例においてNK活性が抑制されていない事が拒絶反応の一因となっている可能性も考えられる。

in vitro実験においても、50ng/ml以上ではCyclosporin作用濃度に比例してNK活性の抑制を認めたが、50ng/mlと5ng/mlと比較すると5ng/mlの方が抑制率が高かった。in vivo実験においては25ng/10⁷脾細胞以下は測定限界濃度以下となった。5ng/mlの方が50ng/mlよりもNK活性の抑制率が高くなった理由は不明である。

また、in vivo実験において、Cyclosporinの投与量を増加させると血清中Cyclosporin濃度は比例して増加するが、リンパ球中濃度は血中濃度程増加せず、リンパ球中移行には限界があると考えられた。

Cyclosporinは強い免疫抑制効果を持ち、NK活性に関しては前述の如くであるが、非特異的な免疫抑制剤であることには従来の免疫抑制剤のAzathioprineと変わることはなく、治療域と中毒域とが接近し、いわゆる安全域が狭い事により、過剰な免疫抑制により重篤な合併症が出現する。

副作用としては、免疫抑制剤に不可避の易感染性に加えて、腎障害、肝障害、臍障害、高血圧、振戦、多毛、肉肉肥厚などが存在することが知られている。腎毒性は、Calneの報告⁴⁾以後、Cyclosporinの臨床応用上の最大の問題点である。臨床応用されている臓器移植のうち最も症例の多い腎移植においては、移植後の最大の難関である拒絶反応とCyclosporin腎毒性のいずれもが腎機能障害を示し、両者の治療法が全く反対であるため、この腎毒性の問題は非常に重大である。一般的に、薬が効果を発揮するためには、その作用部位における濃度がある濃度以上に達することが必要条件であり、作用部位濃度とその薬理作用の強さはある程度の相関があると推測される。しかし、実際には作用部位濃度の測定は困難であり、作用部位濃度と血中濃度はある程度の相関があるとの前提のもとにその代用として、測定の容易な血液内の濃度測定が現在行われているが、薬剤により、また組織

により、その薬剤の組織移行性はさまざまである。

Ciclosporin の至適投与量は、Ciclosporin の標的である免疫担当細胞への集積濃度と、免疫担当細胞の機能抑制効果により決定されるべきであるが、血清中 Ciclosporin 濃度測定による投与量決定の有用性を、NK活性の変動を指標に検討した。

血清中 Ciclosporin 濃度変化とリンパ球中 Ciclosporin 濃度変化とは、血清中約10,000ng/ml に対し、リンパ球中約100ng/10⁷ cells にて相関が認められた。また、NK活性も血清中、リンパ球中濃度と比例して抑制が認められ、血清中10,000ng/ml、リンパ球中100ng/10⁷ cells にてほとんど抑制された。

血清中 Ciclosporin 濃度とリンパ球中 Ciclosporin 濃度とは、ラットにおいて図4、図5、Humanにおいて図8の如く相関が認められ、NK活性も同様に相関が認められた。血清中 Ciclosporin 濃度測定は、リンパ球中 Ciclosporin 濃度の推測に有用と考えられ、また、腎移植患者においても、血清中 Ciclosporin 濃度とリンパ球中 Ciclosporin 濃度とは相関が認められ、血清中 Ciclosporin 濃度測定は、リンパ球中 Ciclosporin 濃度の推測に有用と考えられた。

結 論

免疫抑制剤としての Ciclosporin の至適投与

量は、Ciclosporin の標的である免疫担当細胞への集積濃度と、免疫担当細胞の機能抑制効果により決定されるべきであるが、血液中 Ciclosporin 濃度測定による投与量決定の有用性を、NK活性の変動を指標に検討した。

A) in vivo 投与

1. Ciclosporin 投与量に比例して、血清中及びリンパ球中 Ciclosporin 濃度は増加した。
2. NK活性抑制効果は、Ciclosporin 投与量に相関した。
3. NK活性抑制効果は、投与中止4日後には消失した。

B) in vitro 投与

1. Ciclosporin 投与量に比例してリンパ球中 Ciclosporin 濃度は増加した。
2. NK活性は、リンパ球中 Ciclosporin 濃度に相関して抑制された。

C) Ciclosporin によるNK活性の抑制は、K562細胞及び皮膚細胞のどちらの標的細胞に対しても有効であった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました岡山大学第1外科折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導、御校閲を賜りました田中信一郎先生に深謝いたします。

本論文の要旨は第23回日本移植学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Dreyfuss M, Hofmann A, Kobel H, Pache W and Tschertner H: Cyclosporin A and C: New metabolites from *Trichodermapolysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Europ. J Appl Microbiol* (1976) **3**, 125-133.
- 2) Borel JF, Feurer C, Magnee C and Stahelin H: Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* (1977) **32**, 1017-1025.
- 3) Wenger R: Chemistry of cyclosporin. Cyclosporin A, ed. by White DJG, Elsevier Biomedical Press (1982), 19-34.
- 4) Calne RY, White DJG, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* (1978) **2**, 1323.
- 5) Calne RY, Rolles K, White DJG, et. al.: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 32 kidneys, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet* (1979) **2**, 1033.

- 6) Starzl TE, Weil III R, Iwatsuki S, Klintmalm G, Schroter GPJ, Koep LJ, Iwaki r, Terasaki PI, Porter KA : The use of cyclosporin A and predonisolone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol & Obstet* (1980) **151**, 17.
- 7) Carpenter BJ, Tileny NL, Strom TB, Carovoy MR, Lagaris JM : Cyclosporin A in cadaver renal allografts. *Kidney Int* (1981) **19**, 265.
- 8) European multicentre trial : Cyclosporin A a sole immunosuppressive agent in recipients of kidney allografts from cadaver donors. *Lancet* (1982) **2**, 57.
- 9) Oyer PE, Stinson EB, Reitz BA, Bieber CP, Jamieson SW, Shumway NE : Cardiac transplantation. *Transpl Proc* (1981) **13**, 199.
- 10) Starzl TE, Klintmalm G B G, Porter K A, Iwatsuki S, Schroter G P J : Liver transplantation with use of cyclosporin A and predonisone. *N Engl J Med* (1981) **305**, 266.
- 11) Rynasiewicz JJ, Sutherland DER, Goetz FC, Elick BA, Najarian JS : Clinical pancreas transplantation with cyclosporin A at the university of Minnesota. *Cyclosporin A. Elsevier Biomedical* (1982) pp 437—452.
- 12) Powles R L, et al. : Cyclosporin for the prevention of Graft versus Host Disease in 72 patients with acute mycloblastic leukemia in first remission receiving matched sibling bone marrow transplantation. *Transplant Proc* (1983) **15** (suppl. 1) : 2624.
- 13) Storb R, et al. : Preliminary results of prospective randmised trails comparing methotexate and cyclosporin for prophylaxis of Graft-vs-Host-Disease after HLA-identical marrow transplantation. *Transplant Proc* (1983) **15** (suppl. 1), 2620
- 14) シクロスポリン研究会 : 多施設協同研究による腎移植におけるシクロスポリンの臨床評価に関する研究. 移植 (1985) **20** (suppl), 399—421.
- 15) Tanaka S, Sakai A : Stimulation of allogeneic lymphocytes by skin epidermal cells in the rat. *Transplantation* (1979) **27**, 194.
- 16) 田中信一郎 : 同種皮膚移植における皮膚上皮細胞に対する免疫能の変動 — リンパ球依存性抗体 (LDA) の測定 —, *岡山医誌* (1983) **26**, 1159—1167.
- 17) Govaerts A : Cellular antibodies in kidney homotransplantation. *J Immunol* (1960) **85**, 516.
- 18) Herberman RB, Nunn ME, Laurin DH : Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* (1975) **16**, 216—229.
- 19) Kiessling R, Klein E, Wigzell H : "Natural killer" cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to the genotype. *Eur J Immunol* (1975) **5**, 112—117.
- 20) Kiessling R, Haller O : Natural killer cells in the mouse : an alternative immune surveillance mechanism? *Contemp Top Immunobiol* (1978) **8**, 171.
- 21) Tanaka S, Ota T, Amamiya S, Kobatake T, Orita K : Spontaneous cell-mediated cytotoxicity (SCMC) against rat skin epidermal cells. *Transplant Proc* (1983) **15**, 1662—1663.
- 22) Martino I, Paola A, Federico S, Alberto M : Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A. *Transplantation* (1981) **31**, 113—116.
- 23) Lefkowitz M, Kornbluth JE, Tomaszewski, Jorkasky DK. : Natural killer-cell activity in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *J Clin Immunol* (1988) **8**, 121—127.

**Comparison of Ciclosporin dosage in serum and lymphocytes
and suppressive effect on NK activity**

Fumiyuki INOUE

**First Department of Surgery,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. K. Orita)

Ciclosporin is an effective immunosuppressant for kidney transplantation, although it has the side effect of nephrotoxicity. Ordinarily, the optimal dosage of Ciclosporin is determined by the serum trough level. However, it might be better to make the determination from the concentration in immunocompetent cells.

In this report, the serum level of Ciclosporin was compared with the lymphocyte concentration along with the inhibiting activity to NK cells.

In *in vivo* administration, Ciclosporin levels in serum and lymphocytes increased in proportion to the dosage. The suppression of NK activity correlated with the dosage. The suppression of NK activity ceased within 4 days after cessation of administration.

In *in vitro* administration, the Ciclosporin level in lymphocytes increased in proportion to the dosage. The suppression of NK activity correlated with its level in the lymphocytes. Ciclosporin successfully suppressed NK activity against both K562 cells and skin cells.