

学位論文題名

Prolongation of Canine Liver Allograft Survival  
by a Novel Immunosuppressant, FTY720 ; Effect  
of Monotherapy and Combined Treatment  
with Conventional Drugs

(新しい免疫抑制剤 FTY720によるイヌ肝グラフトの生着延長：  
単独投与と従来薬剤との併用投与による効果)

学位論文内容の要旨

1. 研究の目的

新しい免疫抑制剤 FTY720 (以下 FTY) は、末梢血中の成熟リンパ球、特に Tリンパ球の選択的減少によって拒絶反応を抑制する従来薬剤とは違った機序を持つ免疫抑制剤である。FTY の免疫抑制効果は、今まで各種動物の主に肝臓以外の臓器移植を用いて評価されてきた。現在まで、FTY は大動物の肝移植に用いられたことはなく、またタクロリムス (FK) との併用効果も評価されていない。本研究において、我々はイヌに同所性肝移植を行い、FTY の単独療法と CsA 並びに FK との併用療法の効果を比較検討した。

2. 方法

実験では、9-10kg のビーグル犬を用いた。ドナーの手術では、肝臓を 1.5 リットルの乳酸リンゲル液で脾静脈並びに腹部大動脈より灌流、肝グラフトを摘出した。レシピエント手術では、肝グラフトを肝上部下大静脈、肝下部下大静脈、門脈の吻合を行った後、再灌流し動脈再建を行った。再灌流直前にメチルプレドニゾン 250mg を静注投与した。免疫抑制剤は術後 1 日目より投与開始し、術後 90 日目までの投与とした。

実験群：単独投与群と併用投与群の 2 つの実験群を作成した。単独投与群は、コントロール群 (無治療群)、FTY 0.1mg/kg/day 投与群、FTY 1.0mg/kg/day 投与群、FTY 5.0mg/kg/day 投与群の 4 群よりなる。実験群 1 の結果から、FTY 0.1mg/kg/day を選択し、CsA 5mg/kg/day および FK 0.5mg/kg/day をそれぞれと併用投与した群は、CsA 単独群、CsA・FTY 併用群、FK 単独群、FK・FTY 併用群の 4 群よりなる。これらの計 8 群について生存日数ならびに血液生化学的検査 (AST、ALT、総ビリルビン値、アミラーゼ、血糖、クリアチニン、BUN)、術前の末梢血リンパ球数 (PBL) に対する術後の末梢血リンパ球数 (%) を比較分析した。FTY の術後 3 日目、7 日目の FTY 血中濃度を HPLC 測定で、血中 CsA 濃度を RIA で、血中 FK 濃度を EIA にて測定した。動物が自然死するか犠牲死させた場合は即座に解剖して肝グラフトならびにそれ以外の臓器を病理標本として採取した。

3. 結果

コントロール群の平均生存日数は 13 日であったが、FTY 0.1mg/kg/day 投与群はこれを 51.3 日と有意に延長させた。1mg/kg/day 投与群の平均生存日数は 43.4 日と生存の延長を

認めたと、コントロール群との間に有意差はなく、5mg/kg/day 投与群の平均生存日数は13.7日で生存の延長を認めなかった。これら4群の動物の死因はすべて急性拒絶反応であり、5mg/kg/day 投与群に特に強い拒絶反応が見られた。

CsA 単独群の平均生存日数は49.6日であり、FTY・CyA 併用群の平均生存日数は64.8日と有意差はないもののわずかに延長がみられた。FK 単独群の平均生存日数は75.8日であったが、6頭中3頭が軽い瘦で死亡した。これに対し、FTY・FK 併用群の平均生存日数は39.7日と生存の延長はみられず6頭中3頭が腹腔内膿瘍で、3頭が軽い瘦で死亡した。

生化学検査では、コントロール群で6頭中5頭は術後5日目より急速な総ビリルビンの上昇をみた。生存の延長が得られた FTY 0.1mg/kg/day 投与群でも、術後早期より5・10mg/dl 程度の総ビリルビンの持続的上昇がみられた。FTY 5.0mg/kg/day 投与群については全例に総ビリルビンとASTの高度な上昇がみられた。CsA 単独群およびFTY・CsA 併用群のASTは比較的low値で推移したものの、総ビリルビンはFK 単独群やFTY・FK 併用群に比べやや高値をとる傾向にあった。FTYの肝以外の臓器への影響については、単独投与、併用投与いずれにおいても、膵機能（血糖値、アミラーゼ）、腎機能（BUN、クリアチニン）に異常は見られなかった。

FTY 投与は、PBLの有意な減少をもたらした。FTY 0.1mg/kg/day 投与群では、術後3日目および7日目においてPBLが術前の10・30%までに低下したが、FTY 5.0mg/kg/day 投与群のPBLが、FTY 0.1mg/kg/day 投与群に比しかえって高値を示した。CsA 単独群では、PBLは術前の2倍から8倍に増加したが、FTYとの併用することにより、ほとんどの動物でPBLが100%以下に減少した。同様のことがFK 単独群とFTY・FK 併用群にもみられた。FTYおよびCsAやFKの血中濃度は、併用によっても変化はなかった。

肝グラフトの組織検査において、コントロール群およびFTY 単独群の多くに高度な拒絶反応が見られ、特にFTY 5.0mg/kg/day 投与群において大量の肝細胞壊死とグリソン領域から小葉全体にかけてのリンパ芽細胞の浸潤をみた。肝外臓器の組織所見では、FTY 単独群・併用群いずれにおいても心臓・肺・膵臓・腎臓に特別な病理組織学的所見はみられなかった。

#### 4. 考察

これは、イヌの同所性肝移植において、FTYの免疫抑制効果ならびにそれ以外の特性を示した最初の報告である。本実験で示すように、肝グラフト対してはFTY 0.1mg/kg/dayの投与が、末梢血中のPBL数の選択的減少をきたすと同時に、より高い免疫抑制効果を示した。これに対し、FTY 5mg/kg/dayの高用量の投与はかえって肝グラフトの拒絶反応を助長する結果となった。FTY・CsA 併用療法では、中等度の生存延長をみたが、他方、FTY・FK 併用療法では免疫抑制過剰となり、FKの副作用が前面に出る結果となった。なお、FTYをCsAまたはFKと併用することで特にFTYおよびCsA、FK双方の薬剤血中濃度の変化は認められなかった。また、FTYは肝以外の重要臓器に、機能的にも形態的にも何ら異常をきたすことはなかった。

FTYは冬中夏草から抽出されたISP-1を改良した合成薬である。FTYの免疫抑制効果は特殊であり、長期に及ぶ末梢リンパ球数の低下を特徴とする。このリンパ球の減少は、リンパ球のアポトーシスによるものか、またはリンパ節やバイエル板へのリンパ球のホーミングによるものと考えられている。

FTY 単独投与では、ラットにおいて、用量依存性に肝および心臓のグラフト生存を延長することが知られている。本実験においては、FTYは0.1mg/kg/dayで最も効果があったが、より高用量のFTY投与で逆に拒絶反応が悪化したのは、動物ならびに臓器特異性によるものと考えられる。従って、臨床の肝移植にFTYを用いる場合、投与量については注意が必要である。FTYとCsAの併用投与については、ラットの心移植、イヌおよびアカゲザルの腎移植において相乗効果による生存延長が認められている。しかし、本実験にお

いては、FTY を CsA や FK と併用投与しても生存を延長することはできず、逆に FTY と FK の併用投与で免疫抑制過剰となり、FK の副作用を悪化させる結果となった。本実験の結果は、FTY と FK を臨床で併用投与するときには注意深い FK 投与量の調節が必要であること示唆している。

FTY の免疫抑制剤として今までにない作用機序と副作用がほとんど皆無であることから、投与量を慎重に選べば今後臓器移植への臨床応用に有望な薬剤と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 小 柳 知 彦  
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

## Prolongation of Canine Liver Allograft Survival by a Novel Immunosuppressant, FTY720 ; Effect of Monotherapy and Combined Treatment with Conventional Drugs

(新しい免疫抑制剤 FTY720によるイヌ肝グラフトの生着延長：  
単独投与と従来の薬剤との併用投与による効果)

新しい免疫抑制剤 F T Y 7 2 0 (以下 FTY) は、末梢血中の成熟リンパ球、特に T リンパ球の選択的減少によって拒絶反応を抑制する今までの免疫抑制剤とは異なる機序を示す薬剤である。申請者は、イヌに同所性肝移植を行い、F T Y の単独療法とシクロスポリン(CsA)並びにタクロリムス(FK)との併用療法の効果を比較検討した。実験では、ビーグル犬を用いて同所性肝移植を行い、免疫抑制剤は術後 1 日目より投与開始し、術後 90 日目までの投与とした。コントロール群、FTY 0.1mg/kg/day 投与群、FTY 1.0mg/kg/day 投与群、FTY 5.0mg/kg/day 投与群の 4 群よりなる単独投与の実験と、FTY 0.1mg/kg/day と CsA 5mg/kg/day および FK 0.5mg/kg/day を組み合わせた CsA 単独群、CsA・FTY 併用群、FK 単独群、FK・FTY 併用群計よりなる 4 群の併用投与の実験を行った。これらの計 8 群について生存日数ならびに血液生化学的検査、末梢血リンパ球数(PBL)、FTY・CsA・FK それぞれの血中濃度、動物のグラフト肝ならびにそれ以外の臓器について病理組織を検討した。結果としては、FTY は末梢血中のリンパ球数を有意に減少させた。FTY 単独療法では、0.1mg/kg/day の投与が最も効果的であったが、FTY5mg/kg/day の単独投与は、拒絶反応を亢進する結果となった。FTY と CsA の併用療法では、CsA 単独療法に比し生存の延長をみた。これに対し、FTY と FK の併用療法では、過剰な免疫抑制によると思われる感染症やるい瘦のため、FK 単独投与に比し生存率は低下した。F T Y によると思われる明らかな副作用は認められなかった。F T Y はおよび F K の血中濃度に影響を与えず、またこれらの薬剤により F T Y の血中濃度は影響を受けなかった。

審査にあたって、小柳教授から本実験において FK の投与量が適正であったか、臨床に用い

る際の FTY による副作用の可能性、FTY の臨床における使い方と将来期待されること、長期投与の危険性について質問があった。申請者は、FTY に関する文献、タクロリムスに関する文献、申請者自身の実験データを用いて、本実験の併用療法に用いた FK の投与量が適正であったこと、現在まで FTY の明らかな副作用は認められていないこと、FTY の投与方法としては、手術当日より用いる導入療法が適当で、拒絶反応の救済療法には不適であること、将来的には慢性拒絶反応の治療にも威力を発揮することが期待されること、長期投与についてはまだ追跡が短いものの、現在まで発癌などの副作用は認められないことを回答した。ついで、藤堂教授より、FTY の作用機序は何であるか、また臨床に応用する場合の用量設定につき質問があった。申請者は、FTY に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、作用機序はリンパ球のホーミングが主体で、アポトーシスによる機序は考えにくいこと、FTY の投与量は、本実験で FTY の増量が拒絶反応を亢進させた事実から 0.1mg/kg の少量から開始すべきであることを回答した。ついで、上出教授より、本実験において経時的肝生検の施行の有無、薬剤の排泄・代謝経路、高ビリルビン血症が起こった原因としての胆管炎の可能性、FTY と CsA・FK の作用機序の違いにつき質問があった。申請者は、FTY に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、経時的肝生検は行っておらず動物の死亡時のみ病理組織を採取したこと、排泄経路は、肝臓で代謝された後、尿と便に排泄されること、イヌの腎移植の実験で 0.1mg/kg/day から 30mg/kg/day まで投与量を増加させても肝機能に影響を及ぼさなかったことより高ビリルビン血症の原因は薬剤の影響というより拒絶反応のためとする方が妥当であること、FTY が接着分子に作用しホーミングをおこすのに対し、CsA・FK は T リンパ球の IL2 および IL2 リセプターを増加させる作用が主であることを回答した。

この論文は独創的で、新しい免疫抑制剤 FTY がイヌの同所性肝移植に用いられた最初の実験であり、きわめて示唆に富む結果を得たことで高く評価され、今後 FTY の臨床応用に向けてのさらなる検討が期待される。

審査委員一同は、イヌの同所性肝移植における FTY の免疫抑制剤として効果を明らかにした本研究の成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。