

第96回 日本眼科学会総会 宿題報告

免疫と眼

眼科領域における免疫療法

望 月 學

久留米大学医学部眼科学教室

共同研究者

安藤 一彦, 南 隆彦, Chan Chi-Chao, 森 茂郎, de Smet Marc
 Nishi Mauro, 藤野雄次郎, 沼賀 二郎, 藤東 祥子, Nussenblatt Robert B
 Gery Igal, 奥村 敦司, Herbot Carl P, 澤 健治郎, 疋田 直文
 嶋田 伸宏, 池田 英子, 白尾 真, 岩城 陽一, Yamamoto Joyce
 川島 秀俊, 吉村 浩一, Kuwabara Toichiro

要 約

免疫応答を調整することにより疾患を治療する手段のひとつとして、作用機序の異なるさまざまな免疫抑制剤を行い、眼科領域で免疫反応が関与する三つの病態、即ち、(1)ぶどう膜炎、(2)角膜移植片拒絶反応、(3)アレルギー性結膜炎に対する免疫薬理作用についての基礎的・臨床的研究を行った。用いた免疫抑制剤は、(1)デキサメサゾン、(2)シクロホスファミド(アルキル化剤)、(3)ミゾリビン(代謝拮抗剤)、(4)15-デオキシスパーガリン(制癌剤)、(5)ブシラミン(抗リウマチ薬、抗原提示細胞抑制)、(6)シクロスポリンとFK 506(immunophilin ligand)であった。ぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)における用量作用実験では、FK 506とデキサメサゾンが最も低用量で有効で、そのED₅₀は0.2 μmol/kg/日であり、ついでシクロスポリンとシクロホスファミド(3~4 μmol/kg/日)、15-DSG(11 μmol/kg/日)、ミゾリビン(58 μmol/kg/日)であった。immunophilin ligandは特異抗原に対する細胞性免疫反応を選択的に抑制したのに対し、他の薬剤は液性免疫反応も細胞性免疫反応も抑制しその作用は非選択的であった。更にimmunophilin ligandはその投与中止した後も長期間EAUの発症を抑制する作用が持続し、1次抗原に選択的な免疫寛容を誘導し、抗原特異的サブレッサー細胞を活性化する作用が認められた。FK 506の治療をラットやサルにおいてEAUが発症する直前あるいは発病後から開始してもEAUの抑制がみられたことから、治療効果があると考えられた。これらのデータに基づき、FK 506の難治性ぶどう膜炎に対する多施設オープン臨床試験をおこなった。ベーチェット病を中心とした難治性ぶどう膜炎40名がFK 506(0.05~0.2 mg/kg/日)で治療され、その平均観察期間は26.2±12.4週間であった。これらの症例のぶどう膜炎に対する改善率は70%であり、シクロスポリンの前治療が無効であった症例だけを見ても47%の改善率であった。ベーチェット病の眼炎症発作頻度に対しても有意の抑制効果が認められた。副作用としては腎機能異常が最も頻度が高く、治療中

別刷請求先: 830 久留米市旭町 67 久留米大学医学部眼科学教室 望月 學

(平成4年7月3日受付、受理)

Reprint requests to: Manabu Mochizuki, M.D. Department of Ophthalmology, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume 830, Japan.

(Received and accepted July 3, 1992)

に血中クレアチニン値が正常範囲を越えたものは22.5%に認められた。FK 506 全血中トラフレベルは、臨床効果と副作用の観点から15 ng/ml以上25 ng/ml以下に保つことが望ましいと考えられた。Fisher ラットの角膜をLewis ラットに移植する全層角膜移植術で術後2~3週間以内に100%を生じる移植片の拒絶反応に対し、シクロスポリン全身投与(10 mg/kg/日)、FK 506 全身投与(0.3, 1.0, 3.0 mg/kg/日)ならびに0.3% FK 506 点眼薬は抑制作用を示し移植片の延命効果が認められた。これらの治療は移植片への免疫細胞(CD4陽性細胞, マクロファージ, IL-2 R 陽性細胞, Ia 抗原陽性細胞)の浸潤を抑制し, 更に混合リンパ球反応(MLR)も抑制した。これらのことから, immunophilin ligand の全身投与あるいは点眼は角膜移植片の拒絶反応に対して有望な治療法と考えられる。Immunophilin ligand がTリンパ球受容体を介するIL-2産生に関するシグナル伝達(mRNA)を抑制することはよく知られているが, 最近, 好塩基球におけるIgE受容体を介する脱顆粒現象のシグナル伝達も抑制することが*in vitro* の系で報告された。そこで, ラットにおける受身型アレルギー性結膜炎のモデルで, FK 506 点眼薬の作用をを検討した結果, FK 506 点眼薬はアレルギー性結膜炎を有意に抑制し, 結膜下組織での肥満細胞の脱顆粒を抑制した。このことから, immunophilin ligand の局所投与は重症のアレルギー性結膜炎の治療法のひとつになりうる可能性が示唆された。(日眼会誌 96: 1608-1634, 1992)

キーワード: 免疫療法, シクロスポリン, FK 506, ぶどう膜炎, 角膜移植, アレルギー性結膜炎

Immunotherapy in Ocular Diseases

Manabu Mochizuki

Department of Ophthalmology, Kurume University School of Medicine

Abstract

Basic and clinical studies on immunotherapy in immune-mediated ocular disorders, i.e. uveitis, allograft rejection in corneal transplantation and allergic conjunctivitis, were carried out using a variety of immunosuppressants, including immunophilin ligands (FK506 and cyclosporine). 1. In an animal model for uveitis, experimental autoimmune uveitis (EAU), immunophilin ligands were demonstrated in the rat and monkey to have unique immunological activities: (1) intense and prolonged suppression of EAU development, (2) therapeutic effects by treating animals only after disease onset, (3) selective suppression on cellular immune response to S-antigen, (4) induction of immunological tolerance and activation of antigen specific suppressor cells. Combination therapy with low doses of immunophilin ligand and other immunosuppressant was tested to achieve better effects with less side effects. A low dose of cyclosporine (2 mg/kg/day) with bucillamine (20 mg/kg/day) which suppresses antigen-presenting activity by macrophages caused much stronger suppression of EAU than the therapy with either cyclosporine or bucillamine alone. Similarly, a low dose of FK506 (0.1 mg/kg/day) with dexamethasone (0.01 mg/kg/day) caused stronger suppression of EAU. A multi-center clinical open trial of FK506 in refractory uveitis was carried out in Japan. A total of 40 cases of active uveitis in the posterior segment of the eye were treated with FK506 (0.05, 0.1 or 0.2 mg/kg/day) and the mean observation period was 26.2 ± 12.4 weeks. FK506 therapy improved uveitis in 60% of all cases including 47% of patients resistant to previous therapy with cyclosporine. FK506 significantly suppressed the number of uveitis attacks in patients with Behçet's disease. As for the side effects, 22.5% of patients showed abnormal values of renal function on FK506. The trough level of FK506 in whole blood correlated with adverse side effects as well as with therapeutic effect on uveitis, and it should be maintained between 15 and 25 ng/ml. 2. Effects of immunophilin ligands on the allograft rejection in corneal transplantation was examined in the rat. Fisher rat were used as donors and Lewis rats as recipients. This combination caused 100% rejection by 2~3 weeks after surgery as indicated by (1)

edema, opacity and neovascularization in the graft, (2) infiltration of a variety of immune cells demonstrated by immunohistological examination and (3) high mixed leukocyte reaction (MLR). Systemic administration of cyclosporine (10 mg/kg/day) or FK506 (0.3, 1, 3 mg/kg/day) suppressed the allograft rejection. In addition, topical instillation of FK506 (0.3%) was effective to prolong the graft survival as long as the topical therapy continued. This data suggests that systemic or topical immunophilin ligands can be used for the treatment of allograft rejection in corneal transplantation. Recently, it was reported that immunophilin ligands suppress IgE receptor-mediated signal transduction which results in the exocytosis of secretory granules from basophils or mast cells. However, no studies have been carried out to test their *in vitro* effects on immediate hypersensitivity. Therefore, the effects of topical FK506 on passive allergic conjunctivitis were examined in the rat. Topical FK506 significantly suppressed allergic conjunctivitis as well a degranulation of mast cells in the subconjunctival tissues and the effect was stronger than that of 0.1% betamethasone or 2%DSCG. This data thus indicates that topical immunophilin ligands can be beneficial for the therapy of severe allergic conjunctivitis such as vernal conjunctivitis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1608-1634, 1992)

Key words: Immunotherapy, Cyclosporine, FK506, Uveitis, Corneal transplantation, Allergic conjunctivitis

I 緒 言

最近の免疫学の進歩によりさまざまな疾患の発症機構と病態形成に、免疫応答系が深く関与することが明らかにされてきている。これに伴い治療に免疫療法、即ち免疫応答を調整するさまざまな方法 (immunomodulation) の導入が試みられ、一部は臨床応用されて成果をあげている。一般に、免疫療法とは、多彩な免疫細胞 (T リンパ球, B リンパ球, マクロファージ, ナチュラル・キラー細胞, 肥満細胞, 好塩基球など) の分化・活性化過程, 抗原認識過程, 種々のサイトカインなどの活性物質の産生・分泌過程など, 免疫応答の比較的早い stage を抑制あるいは増強させることにより免疫応答を調整する方法である。古典的な免疫療法にはワクチン, 放射線照射, 細胞毒性剤, (cytotoxic agent) に代表される免疫抑制剤などがある。最近, 細胞融合法 (hybridization), 分子生物学, 免疫薬理学などの発展にともない, 免疫応答系の特定の stage に選択的に作用するさまざまな immunomodulation の方法が研究され, 眼科領域でも主に実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) の実験系で検討されている。例えば, (1) 主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス II 抗原に対するモノクローナル抗体を用いて, 抗原提示細胞のリンパ球への抗原提示を抑制する方法 (anti-Ia antibody therapy)¹⁾, (2) 細胞間接着分子に対するモノク

ローナル抗体を用いて, 抗原提示細胞とリンパ球の細胞間接着を阻害し抗原認識を抑制する方法 (anti-adhesion molecule antibody therapy)²⁾, (3) インターロイキン 2 (IL-2) と細菌毒素を融合させた物質 (IL-2 PE 40) を投与することで, IL-2 受容体 (IL-2 R) を発現している細胞, 例えば活性化 T リンパ球などを選択的に傷害する方法³⁾, (4) 網膜抗原特異的 T 細胞株を用いたワクチン療法⁴⁾, (5) 網膜抗原自体を経口投与することにより, 網膜抗原に対する免疫寛容を誘導する方法 (oral tolerance)⁵⁾, (6) 新しい世代の免疫抑制剤⁶⁾⁻¹¹⁾などがあげられる。この中で, 実験動物による前臨床試験がさらにすすんでヒトの疾患の治療まで検討がされているものは, 現時点では, 上記(5)の S 抗原に対してリンパ球増殖反応を示すぶどう膜炎患者に S 抗原を経口投与して, S 抗原に対する免疫寛容を誘導することによりぶどう膜炎を治療する試み (米国, NEI, Nussenblatt 博士ら) と, (6) のシクロスポリン, FK 506, ラバマイシンなどのイムノフィリン・リガンド (immunophilin ligands) と呼ばれる新しい世代の免疫抑制剤による治療の二つだけである。

シクロスポリンは T リンパ球細胞質内に存在するシクロフィリン (cyclophilin) と呼ばれるタンパクと結合し, シクロスポリン-シクロフィリン結合体が T リンパ球核内に移行して DNA に作用し, IL-2 などのリンフォカイン産物に関する messenger RNA (mRNA) の発現を抑制する¹²⁾¹³⁾。このために, シクロスポリンは T リンパ球機能を抑制する (図 1)。全く同

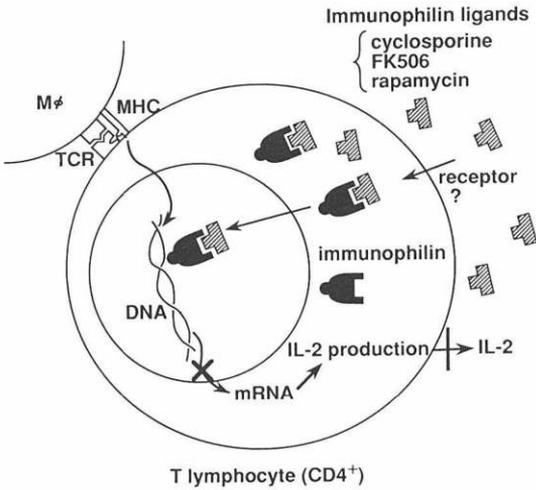


図1 イムノフィリン・リガンドのTリンパ球に対する作用。

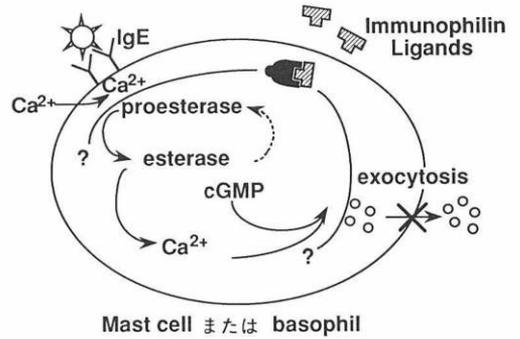


図2 イムノフィリン・リガンドの肥満細胞・好塩基球に対する作用。

様の機構がFK 506についても存在する。即ち、FK 506はTリンパ球細胞質内のFK結合タンパク (FK-binding protein, FKBP)と結合し、FK 506-FKBP 結合体がTリンパ球核内でIL-2産生に関するmRNAの発現を抑制する¹⁴⁾¹⁵⁾。CyclophilinとFKBPは分子量もアミノ酸配列も互いに異なるが、いずれもpeptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPI ase) 活性を有している¹⁶⁾¹⁷⁾。これら cyclophilin やFKBPはイムノフィリン (immunophilin) と呼ばれ、これに結合することにより免疫活性に生じるという意味でシクロスポリンやFK 506はimmunophilin ligandと呼ばれるようになった¹⁸⁾¹⁹⁾。これらのimmunophilin ligandは従来の免疫抑制剤にはみられなかった作用の選択性、即ち、CD 4陽性のヘルパー/インデューサーT細胞からのIL-2産生をすでに述べた機構により阻害して、Tリンパ球によりmediateされる細胞性免疫反応を選択的に抑制する特徴がある。このために、immunophilin ligandはTリンパ球が主な役割を演じる臓器移植片の拒絶反応の治療や種々の自己免疫病の治療に応用されつつある^{11)20)~23)}。

ごく最近、シクロスポリンやFK 506がIgE受容体を介して生じる肥満細胞や好塩基球からの脱顆粒現象を抑制することがin vitroの実験で相次いで報告され²⁴⁾²⁵⁾、immunophilin ligandは肥満細胞や好塩基球などにおいても脱顆粒に関するシグナル伝達を抑制する作用をもつと考えられている (図2)。このことは、immunophilin ligandは肥満細胞、好塩基球が関与す

るアナフィラキシーやI型アレルギー疾患に対しても効果があることを示唆するものであるが、まだin vivoの研究はなされていない。

我々は、これらのimmunophilin ligandの免疫薬理作用について、眼科領域で免疫応答が関与する三つの主な病態、即ち、(1)ぶどう膜炎、(2)角膜移植片の拒絶反応、(3)アレルギー性結膜炎において基礎的・臨床的研究をおこない従来の免疫抑制剤と比較したことで報告する。

II 研究方法

1. 基礎的研究

1) 実験動物：近交系 Lewis ラットと近交系 Fisher ラット (日本チャールスリパー)、近交系 Brown Norway ラット (清和実験動物)、近交系 Wistar/ST ラット (九動)の雄または雌を用いた。使用時の週齢は8~12週齢であり、飼育は無菌飼育条件下であった。サルは、rhesus monkey (米国国立衛生研究所)の雄または雌を用いた。

2) 試薬：シクロスポリン (サンド社より提供)、FK 506 およびその点眼薬 (藤沢薬品工業より提供)、15デオキシスパーガリン (日本化薬より提供)、シクロホスファミド (塩野義)、ミゾリビン (旭化成工業より提供)、デキサメサゾン (萬有)、プシラミン (参天製薬より提供) 0.1%ベータメサゾン点眼薬 (塩野義)、2%グロモクリク酸ナトリウム (藤沢製薬)を動物実験あるいは細胞培養に用いた。

3) 抗原：ウシ網膜より藤野²⁶⁾の方法で分離精製した網膜可溶性抗原 (S抗原) と interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) を実験的自家免疫性ぶどう膜炎 (EAU) の惹起抗原として用いた。実験的

表1 免疫組織染色に用いた各種抗ラットモノクローナル抗体

抗体	特異性
OX 19	Tリンパ球
W 3/25	ヘルパー/インデューサーT細胞 (CD4)
OX 8	サブプレッサー/サイトトキニックT細胞 (CD8)
OX 39	IL-2受容体 (IL-2)
OX 6	主要組織適合抗原系クラスII (MHC class II)
OX 42	マクロファージ
OX 22	好中球

アレルギー性脳脊髄膜炎の惹起抗原としてはモルモット脊髄から分離精製した myelin basic protein (MBP) (国立精神神経センター, 田平武博士より提供)を用いた。

4) 抗体: 免疫組織染色は avidin-biotin-peroxidase complex 法を用いた。1次抗体に用いた抗ラットモノクローナル抗体とその特異性は表1のごとくである。2次抗体はビオチン標式ウマ抗マウス IgG と ABC キット (Vector, Burlingame, 米国)を用いた。

ラットにおける受身型アレルギー性結膜炎を惹起されるために用いた抗卵白アルブミン・ラット IgE 抗体は自家調精したものをを用いた。

5) 実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU)

i) EAU の発症方法とその評価: S 抗原あるいは IRBP と完全フロイドアジュバンド (complete Freund adjuvant, CFA) (結核死菌 H 37 Ra を 2.0 mg/ml 含有, 自家調整) を容積比 1:1 の割合で混合乳化し, ラットの足蹠に 0.1 ml (抗原 30 μ g/ラット含有) を注射した。この動物を, 生理食塩水または各種薬剤で治療し, 手術用顕微鏡下で EAU の発症と炎症の強さを観察し, また眼球摘出して病理像をヘマトキシレン・エオジン染色法にて検討した。サル免疫は, 結核死菌 1.25 mg/ml 含有する CFA を用い, 消毒したサルの背中に, 1 か所あたり 0.05 ml の S 抗原/CFA 混合液を 2~3 cm づつ離して数か所に注射し, 総量として S 抗原を 20 μ g/kg 免疫した。さらに最初の免疫から 14 日目に同様の免疫を追加した。

ii) S 抗原に対する免疫反応の測定: S 抗原に対する血清抗体価測定は酵素抗体法 (ELISA 法)²⁷⁾で行い, リンパ球増殖反応は, ³H-チミジン取り込み法⁶⁾により測定した。

iii) 抗原特異的サブプレッサー活性の測定: S 抗原ま

たは IRBP で免疫され EAU を発症したラットの脾臓リンパ球を responder cell とし, 一方, S 抗原免疫当日から 14 日目までのシクロスポリン (10 mg/kg/日) または FK 506 (1 mg/kg/日) で治療され EAU 発症が抑制されているラットから免疫後 30 日目に得た脾臓リンパ球の中の CD 8⁺細胞 (suppressor/cytotoxic T cells) を additional cells として用いた。抗原存在下の培養で起こる responder cells の抗原特異的リンパ球増殖反応が, additional cells を培養系に加えることにより抑制されるかどうかを測定してサブプレッサー活性を調べた。

6) 全層角膜移植術

i) 手術方法: 角膜移植片のドナーとして Fisher ラット (RT 1^{h1}) を用い, レシビエントとしては Lewis ラット (RT 1^{h6}) を用いた。手術前処置として, 1% 硫酸アトロピン点眼薬, 6.5% トロピカミド点眼薬, 5% 塩酸フェニレフリン点眼薬, 1% インドメサシン点眼薬を 10 分間隔で 3 回, ドナーとレシビエントに点眼した。手術は, 塩酸ケタミン (250 mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (80 mg/kg) の筋注によりラットを全身麻酔し, 手術用顕微鏡下で無菌的に行われた。ドナー角膜は直径 3.0 mm トレパンで角膜中央からずらして全層切除し, これを 2.5 mm トレパンで全層切除したレシビエントの角膜床に 10-0 ナイロン系 (CU-5 針, アルコン) にて 8 糸結紮縫合し, 手術終了時に空気より前房を形成した²⁸⁾。術後は, アトロピン眼軟膏とゲンタシン点眼薬を 1 週間用い, またゲンタシンの筋注 (5 mg/kg/日) を 4 日間行った。

ii) 治療: 全層角膜移植術の当日から, シクロスポリン (筋注) または FK 506 (腹腔注射) の全身投与を 14 日間毎日おこない, 対照のラットは生理食塩水を投与した。

FK 506 点眼薬治療は, 治療群と非治療群のいずれのラットも角膜移植術の当日から 6 日目まで 0.3 mg/kg/日の FK 506 全身投与をおこない, 第 7 日目から 0.3% FK 506 点眼薬あるいは基剤を術後 20 日目まで毎日 4 時間毎に点眼した。

iii) 拒絶反応の観察と評価法: 術後 1 週目から毎週 1 回手術用顕微鏡下で, 治療内容を知らされていない検者により移植角膜片の観察を次の三項目についておこなった。即ち, 移植片の混濁 (0: なし, 1: わずかな混濁あるが虹彩は明瞭に見える, 2: 虹彩の詳細が角膜混濁のために見にくい部分もある, 3: 強い混濁はあるが瞳孔は見える, 4: 完全な混濁), 移植片の浮

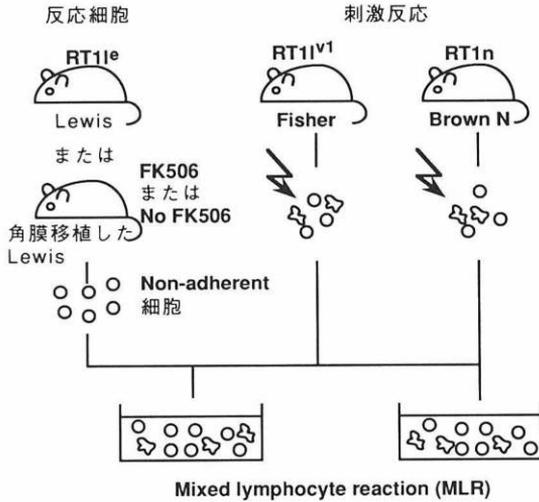


図3 全層角膜移植(ラット)のドナー・レシビエント間の混合リンパ球反応(MLR)の実験方法。

腫(0;なし, 1;軽度~中等度, 2;強度), 移植片内の新生血管(0;なし, 1;移植片の周辺部分に限局, 2;中間部に侵入, 3;移植片中央部分に侵入)の三項目についてスコアをつけた。手術操作による炎症が軽減する第2週以降で, スコアの合計が3以上は移植片が拒絶されたとした。

移植片における拒絶反応を病理学的に検討するために臨床的に拒絶されたと判断される数日前, 拒絶されたと判断された時期, その1週間後, 2週間後の4つの時期に眼球を摘出し, ヘマトキシレン・エオジン染色および各種モノクローナル抗体(表1)を用いた免疫組織染色を行った。

iv) リンパ球混合培養(mixed lymphocyte reaction, MLR)(図3): LewisラットあるいはFisherラットの角膜片を移植されたLewisラットの脾臓とそけい部リンパ節より分離したnonadherent cellを反応系の反応細胞として用いた。一方, 無処置のLewisラット, FisherラットあるいはBrown Norwayラットの脾細胞を放射線照射して反応系の刺激細胞とした。反応細胞(5×10^5 cells/well)と刺激細胞(5×10^6 cells/well)を96穴平底プレートでRPMI-1640 medium(加10%牛胎児血清)で4日間培養し最後の16時間は ^3H -チミジンを加えて, ^3H -チミジンの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定, MLRを検討した。

7) アレルギー性結膜炎

i) 受身型アレルギー性結膜炎の惹起方法と評価法: 卵白アルブミン(Sigma)をWistarラットに免疫して高力価の抗卵白アルブミンラットIgE血清を製した。Wistarラットの上眼瞼を翻転して上眼瞼結膜下に $50 \mu\text{l}$ の抗卵白アルブミン血清を注射し, 48時間後に抗原(1%卵白アルブミン)と0.5%エバンスブルーの混合液を3ml静脈注射して, 受身型アレルギー性結膜炎を惹起させた。抗原注射の30分後にラットを断頭し眼瞼と眼球を一塊にして摘出し抽出液で48時間色素を抽出した後に, 抽出液の吸光度(620nm)を測定した。

ii) 治療: 結膜嚢内に正確に $10 \mu\text{l}$ のFK506点眼薬(0.01%, 0.1%, 0.3%), 0.1%ベータメサゾン点眼液, 2%グロモクリク酸ナトリウム(DSCG)点眼薬あるいは基剤を点眼して, アレルギー性結膜炎に対する効果を検討した。点眼する時間は, 抗原の静注の15分前と5分前のスケジュールと, 6時間前, 4時間前, 2時間前のスケジュールの2通りについて検討した。

iii) 結膜肥満細胞の脱顆粒の測定: 抗卵白アルブミンラットIgE血清をラット眼瞼結膜下組織に注射し, 48時間後に抗原の卵白アルブミンを静脈内投与した。30分後の抗体注射部位における肥満細胞(mast cell)の脱顆粒の有無をギムザ染色により顕微鏡下(100倍)で観察し, 脱顆粒肥満細胞のパーセントを計測した。

2. 臨床的研究

ベーチェット病を中心とする難治性ぶどう膜炎に対するFK506の臨床試験

本臨床試験は, ベーチェット病を中心とする難治性ぶどう膜炎に対するFK506第II相臨床試験の中間成績をまとめたものである。試験は, FK506ベーチェット病を中心とする難治性ぶどう膜炎研究会により計画され下記の多施設でおこなわれている。

1) 施設: 東京大学医学部(眼科・物療内科), 東京女子医科大学(眼科・第四内科), 東京医科大学, 聖マリアンナ大学(第一内科), 横浜市立大学医学部(眼科), 七沢リハビリテーション病院(内科), 東京女子医科大学第二病院(眼科), 島根医科大学(第三内科・眼科), 久留米大学医学部(眼科・第一内科)

2) 対象: 16歳以上76歳未満の非感染症で, 眼底(硝子体を含む)に活動性病巣を有する下記の難治性ぶどう膜炎患者, 即ち, (a) ベーチェット病で発作期の視力が0.5以下, あるいは前12週間の眼発作が1回以上のもの, (b) ステロイドを使用できないか抵抗性の

フォークト・小柳・原田病, (c) ステロイドを使用できないか抵抗性のサルコイドーシス, (d) その他の非感染性の難治性ぶどう膜炎。

但し, 肝機能障害や腎機能障害のあるもの, 高カリウム血症を有するもの, 心疾患を合併するか心電図上異常をもつもの, 高血圧症を合併するもの, 肺炎または糖尿病を合併するものなどは対象から除外した。

3) 投与方法: 患者に十分な説明をし同意を得たのちに, 治療前の全身検査をおこない全体的に問題のないことを確認し FK 506 投与を開始した。開始直後の2週間は原則として入院しておこなった。FK 506 投与量は, 最初の 10 症例は 0.05 mg/kg/日, 次の 13 症例は 0.1 mg/kg/日, 次の 14 症例は 0.2 mg/kg/日と, 低い用量から安全性を確認しながら行った。但し, 投与開始後は, 各症例ごとに臨床効果と副作用をみながら用量の増減は主治医の判断でおこなった (0.3 mg/kg/日を上限)。薬剤は 12 時間毎に分 2 経口投与した。また投与期間は 12 週間としたが, 12 週後も投与を希望しかつ安全性に問題のない患者は治療を継続した。

4) 評価項目: (a) 眼症状の改善度 (視力, ぶどう膜炎の活動性ならびに眼炎症発作頻度), (b) 眼外症状の改善度, (c) 全般改善度, (d) 副作用と概括安全性, (e) 有用度, (f) 体内動態, これらについて, 治療開始前, 開始後の 1, 2, 4, 6, 8, 12 週目に検査をおこない, 12 週以後も治療が継続している症例では以後 4 週毎に検査をして経過観察した。

III 結 果

1. 基礎的研究

1) 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における各種免疫抑制剤の効果

i) EAU の発症抑制効果

ラットに S 抗原を免疫した当日から 14 日目まで毎日薬物を全身投与し, 無治療の対照ラットが全例 EAU を発病した日にラットを殺処分し病理学的に EAU の発症率を検討した。各薬剤の EAU 発症抑制 (予防効果) に関する dose-response を検討した結果を図 4 に示す。検討した薬剤は, (1) コルチコステロイドとしてデキサメサゾン, (2) 細胞毒性剤の免疫抑制剤としてアルキル化剤のシクロホスファミド, 代謝拮抗剤のミゾリビンと 15 デオキシスパーガリン (15-deoxyspergualin, 以下 15 DSG), そして, (3) immunophilin ligand としてシクロスポリンと FK 506 の 6 種類の薬物であった。この用量作用曲線から各薬剤の EAU に対する ED₅₀ を重量 (mg) とモル (μmol.) の 2 通りで算出した結果を表 2 に示す。ED₅₀ が重量比較で最も低用量であったのはデキサメサゾン, 次いで

表 2 各種免疫抑制剤の EAU に対する ED₅₀ 値

薬 剤	ED ₅₀	
	mg/Kg/日	μmol./Kg/日
dexamethasone	0.08	0.2
mizoribine	15.0	57.9
15-deoxyspergualin	5.6	11.3
cyclophosphamide	1.0	3.8
cyclosporine	3.2	2.7
FK 506	0.15	0.2

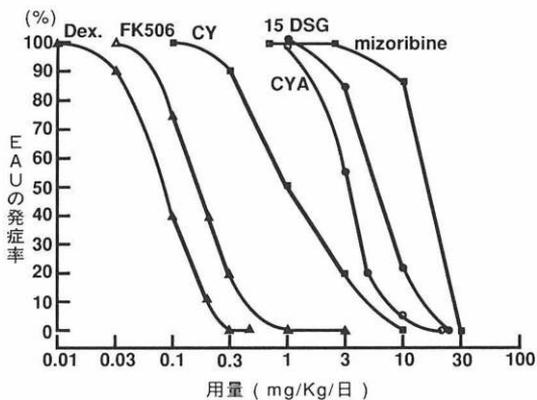


図 4 各種の免疫抑制剤の EAU 発症抑制作用の用量作用曲線。

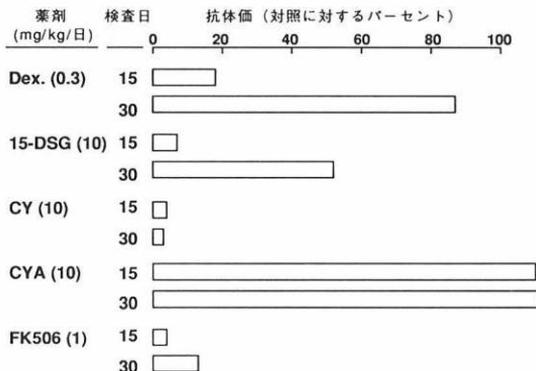


図 5 各種免疫抑制剤 (免疫当日 14 日目まで投与) の特異抗体価に対する効果。

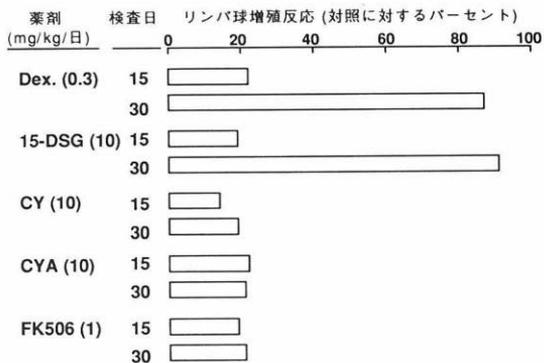


図 6 各種免疫抑制剤（免疫当日～14 日目まで投与）の抗原特異的リンパ球増殖反応に対する効果。

FK 506 であった。シクロスポリンと 15 DSG はほぼ同等の ED₅₀ 値であり、ミゾリピンが最も ED₅₀ が高く EAU の抑制作用が弱かった。

これらの各種薬剤の S 抗原に対する抗体産生とリンパ球増殖反応におよぼす作用を検討した結果を、それぞれ図 5 と図 6 に示す。薬物治療は S 抗原免疫後 14 日目で中止し、抗体価測定とリンパ球増殖反応は S 抗原免疫後 15 日目と 30 日目に行った。薬物投与中は、デキサメサゾン、15 DSG、シクロホスファミド、FK 506 は抗 S 抗原抗体価を強く抑制しているのに対しシクロスポリン(10 mg/kg/日)は抗体価を全く抑制しなかった。治療中に抗体価抑制作用のみられた薬剤のうち、デキサメサゾンと 15 DSSG は投与中止後 2 週間目（免疫後 30 日目）に測定すると、その抗体抑制作用はかなり弱くなっていた。一方、シクロホスファミドと FK 506 は中止した 2 週間後でもなお強く抗 S 抗原抗体価を抑制していた。

S 抗原に対するリンパ球増殖反応に対しては、いずれの薬物もその投与中には強い抑制作用を示した（図 6）。しかし、投与中止して 2 週間後までその抑制作用が持続していたのは、シクロホスファミド、シクロスポリン、FK 506 の三薬剤だけであった。

ii) 免疫病理所見

眼内の各組織における免疫病理所見をまとめたものを図 7 に示す。無治療の対照 EAU 発病ラットでは、EAU 発症後早期に前房、虹彩、硝子体、網脈絡膜に多数の CD 4 陽性の浸潤細胞がみられるが、CD 8 陽性細胞は少数であった。同様の部位に OX 42 陽性のマクロファージも多数認められ、また、CD 4 陽性細胞や OX 42 陽性細胞の多くは IL-2 R を発現していた。

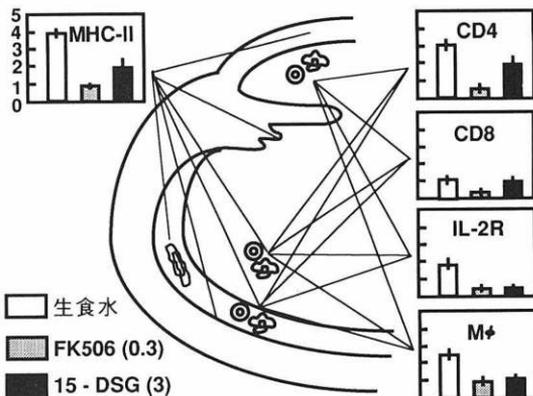


図 7 EAU 発症早期における眼内浸潤細胞に対する FK 506 と 15 デオキシスポーガリンの効果（発症後数日以内の EAU 早期のもの）。各グラフの縦軸は各陽性細胞の各部位での数を 0 から 5 までに程度分類したものである。Mφ；マクロファージ(CD 42 陽性細胞)

表 3 各種免疫抑制剤の実験的ぶどう膜炎の免疫病理への作用の比較

薬 剤	膜 抗 原			
	CD 4	CD 8	IL-2 R	MHC class II
CYA	++	++	++	++
FK 506	+++	+++	+++	+++
Dex.	+	+	+	+
15 DSG	+	+	+	+

MHC クラス II 抗原 (Ia 抗原) は、これらの眼内浸潤細胞と一部の眼内組織（角膜内皮細胞、毛様体上皮細胞、網膜血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞）にもその発現が認められた。

これに対し、シクロスポリン (3 mg/kg/日)、FK 506(0.3 mg/kg/日)は、CD 4 陽性細胞、OX 42 陽性細胞、IL-2 R 発現細胞を強く抑制し、更に、MHC-クラス II 抗原の発現も抑制した。デキサメサゾン、15 DSG とこれら immunophilin ligand との免疫病理所見への効果の比較を表 3 に示す。

iii) 薬剤投与中止後の長期抑制効果

前述の結果で、ある種の薬剤は投与中止後も免疫反応に対する抑制作用が長期間持続していたので、次に EAU 発症抑制効がどれだけ持続するかについて検討した。動物を S 抗原免疫し、最初の 14 日間だけ治療をおこない免疫後 15 日目を以降は無治療で観察した。図 8

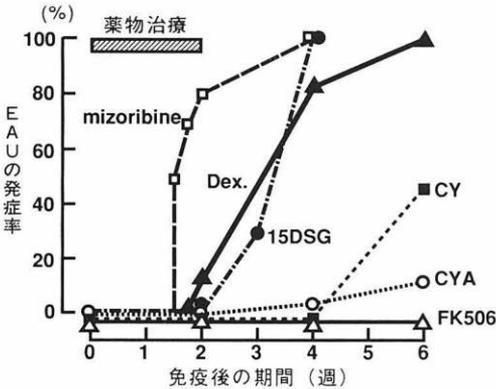


図8 投薬中止後のEAU発症抑制作用の持続.

に示す如く、ミゾリビン(20 mg/kg/日)、デキサメサゾン(0.3 mg/kg/日)、15DSG(10 mg/kg/日)は投与中はEAU発症を抑制しても投与を中止すると2週間以内にはほぼ全例がEAUを発症し抑制の持続作用はみられなかった。一方、シクロホスファミド(10 mg/kg/日)で治療されたラットは投与を中止して4週間後でも、その半数はEAUの発病は抑制されていた。シクロスポリン(10 mg/kg/日)とFK506(1 mg/kg/日)はさらに強いEAUの発度抑制の持続がみられた。即ち、投与を中止して4週間後でも、シクロスポリン治療を受けたラットの20%しかEAUを発病せず、FK506治療を受けたラットではEAUの発病は皆無であった。

iv) Immunophilin ligandの抗原特異的免疫不応答性(免疫寛容)の誘導

前述の実験結果より、シクロスポリンやFK506のimmunophilin ligandは投与を中止した後も、EAUの発症や免疫反応に対する抑制効果が長期間持続することが示された。そこで、この抑制効果が最初に用いた抗原に特異的な現象か、あるいは非特異的な抑制であるかを検討した。本実験では、S抗原免疫(1次免疫)後の14日間だけ、シクロホスファミド(10 mg/kg/日)、シクロスポリン(10 mg/kg/日)あるいはFK506(1 mg/kg/日)の治療をおこない、免疫後30日にEAUを発症していないラットにS抗原あるいは1次免疫の抗原とは異なる抗原(myelin basic protein, MBP)による2次免疫をおこない、2次免疫後のEAUあるいはアレルギー性脳炎(experimental allergic encephalitis, EAE)の発症について検討した。その結果を表4に示す。シクロスポリンあるいは

表4 二次免疫後の抗原特異的免疫抑制作用

群	1次免疫	治療 (14日目まで)	2次免疫 (30日目)	2次免疫後の発病率	
				EAU	EAE
A	S抗原	シクロホスファミド	S抗原	100%	
B			MBP		100%
C	S抗原	シクロスポリン	S抗原	27%	
D			MBP		100%
E	S抗原	FK506	S抗原	0%	
F			MBP		100%

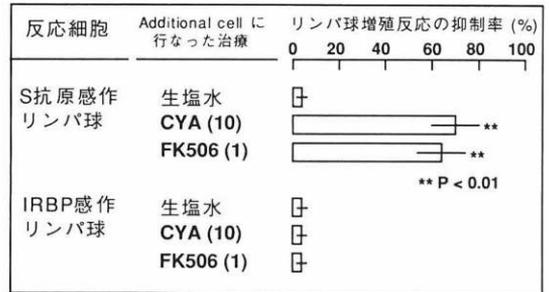


図9 イムノフィリン・リガンド治療による抗原特異的サブプレッサー細胞の誘導.

FK506で治療されたラットは、S抗原による2次免疫後もEAUを発症しないかしてもごくわずかであったのに対し、MBPによる2次免疫ではEAEを100%発病した。このことから、immunophilin ligandは1次抗原に特異的な免疫不応答性を誘導することが示された。一方、シクロホスファミドで治療されたラットは、S抗原による2次抗体でも100%EAUを発病し、この薬剤の免疫抑制作用はimmunophilin ligandのそれとは異なることが示された。

v) Immunophilin ligandの抗原特異的サブプレッサー活性の誘導

Immuophilin ligandによる治療が抗原特異的免疫不応答性を誘導することが前の実験で示されたが、さらにその機序について検討した。この実験は、S抗原免疫後シクロスポリン(10 mg/kg/日)またはFK506(1 mg/kg/日)で14日間治療し、30日目に脾細胞からCD4陽性T細胞またはCD8陽性T細胞を分離して、この細胞をS抗原感作リンパ球あるいはIRBP感作リンパ球に加え、それぞれのリンパ球の抗原特異的リンパ球増殖反応に対する抑制作用を検討した。その結果を図9に示す。S抗原免疫後にシクロスポリンあるいはFK506で治療されたラットのCD8陽性T細胞は、S抗原感作リンパ球のS抗原に対する増殖反応

表 5 EAU 発病当日より開始した FK 506 治療の効果

治療 (mg/Kg/日)	発病後の日数					
	0	1	2	3	4	5
生食液	1.0±0.2 ¹⁾	2.6±0.3	2.8±0.2	2.8±0.2	2.5±0.3	1.3±0.2
FK 506(1.0)	0.8±0.4	1.2±0.4	1.5±0.5	1.0±0.5	0.8±0.6	—
FK 506(3.0)	0.7±0.3	0.8±0.3	0.6±0.2	0.5±0.4	0.2±0.1	—

1) EAU の炎症の臨床スコア：0, 炎症なし, 1, 軽度 (虹彩の充血と前房中への滲出物出現), 2, 中等度 (小さい前房蓄膿), 3, 強度 (著しい前房蓄膿と眼球突出),

を強く抑制したのに対し, IRBP 感作リンパ球の IRBP に対する増殖反応に全く抑制しなかった. CD 4 陽性 T 細胞分画にはこのような抑制活性は認められなかった. このことから, immunophilin ligand は抗原特異的サプレッサー性を *in vivo* で誘導する作用があることが示された.

更に, この抗原特異的サプレッサー活性をもつ CD 8 陽性 T 細胞を S 抗原を免疫に Lewis ラットの腹腔に注射し EAU 発症の抑制効果を検討した. シクロスポリン治療により誘導したサプレッサー細胞による EAU の抑制率は 7/12 (58.3%) であり, FK 506 により誘導したサプレッサー細胞による EAU 発症抑制率は 3/9 (33.3%) であった. EAU が発病した場合も, その病理変化は対照に比較して軽度であった. このことより, シクロスポリンや FK 506 の immunophilin ligand の治療で誘導された抗原特異的サプレッサー活性をもつ細胞は, リンパ球増殖反応だけでなく発病も抑制することが示された.

vi) EAU 発病後の治療効果

S 抗原免疫後治療をせずに観察し, EAU が発症した当日から FK 506 の投与を開始して, EAU に対する治療効果を検討した. その結果を表 5 に示す. 治療を全くしなかった対照のラットは発病後急速に EAU の炎症スコアが高くなるのに対し, FK 506 治療を EAU 発病日から開始したラットは, FK 506 の用量に依存して炎症スコアが低くなり, FK 506 は治療効果をもつことが示された.

vii) 各種薬剤の併用による EAU 治療の試み

作用機序に異なる二種類の薬剤を低用量ずつ併用して単独療法の効果と比較した.

a) シクロスポリンとブシラミンの併用：免疫調節剤としてリウマチの治療に用いられているブシラミンは, 下記の実験によりマクロファージによる T リンパ球への抗原提示能を抑制することが示された. 即ち, 図 10 の如く, S 抗原感作ラットから分離し X 線照射

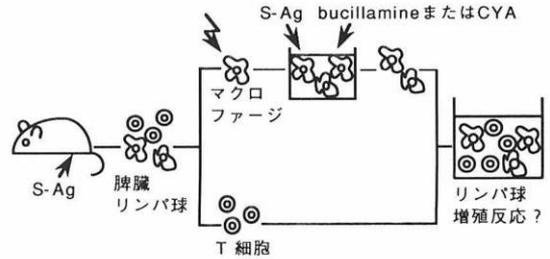


図 10 ブシラミンのマクロファージ抗原提示能に対する作用の測定法.

S 抗原を免疫したラットの脾細胞のマクロファージを放射線照射し, ブシラミン存在下で培養した後によく洗い, これを S 抗原感作 T リンパ球に加えて, リンパ球の増殖反応を測定した.

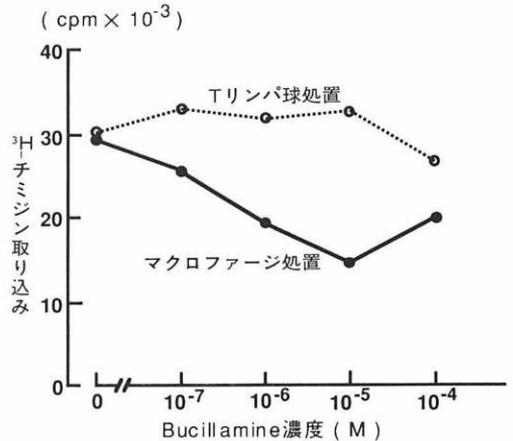


図 11 ブシラミンのマクロファージ抗原提示能抑制作用.

マクロファージに作用させたブシラミンの濃度依存してリンパ球増殖反応は低下した (○). しかし, T リンパ球にブシラミンを作用させてもリンパ球増殖反応は低下しなかった (●).

したマクロファージをブシラミン存在下で 4 時間培養してからブシラミンをよく wash out した後に, S 抗原

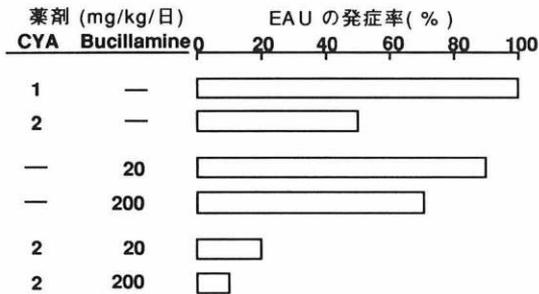


図 12 シクロスポリンとブシラミンのEAU発症抑制に対する併用効果。

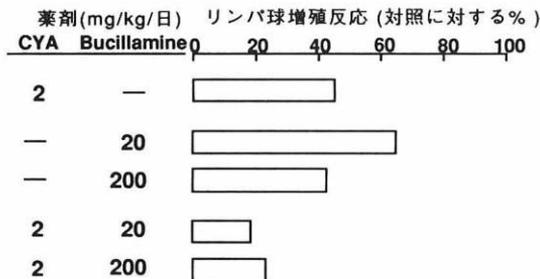


図 13 シクロスポリンとブシラミンのリンパ球増殖反応に対する併用効果。

感作 T リンパ球と一緒に培養した。図 11 に示すように、マクロファージに処置したブシラミンの濃度に依存して、この S 抗原感作 T リンパ球の増殖反応は抑制された。このことからブシラミンはマクロファージによる T リンパ球への抗原提示を抑制すると考えられる。一方、S 抗原感作リンパ球をブシラミンで処置してもリンパ球増殖反応は全く抑制されず、ブシラミンは T リンパ球に対しては作用しないことが示された。

このように、マクロファージに作用するブシラミンと、T リンパ球に作用するシクロスポリンを併用した結果を図 12 に示す。シクロスポリン 2 mg/kg/日の単独療法でEAU発症率が5/10 (50%)、ブシラミン 20 mg/kg/日単独投与でのEAU発症率が9/10 (90%)であったが、両者の併用でのEAU発症率は2/10 (20%)と明らかに併用効果が認められた。二者の併用効果はEAUの発病抑制だけでなく、S抗原に対するリンパ球増殖反応に対しても認められた(図13)が、抗S抗体価に対しては認められなかった。

b) FK 506 とデキサメサゾンの併用：図 14 にデキサメサゾンの併用の結果を示す。FK 506 (0.1 mg/kg/日) の単独投与でのEAU発症率は23/24 (95%)、デ

表 6 サルの実験的ぶどう膜炎に対するFK 506の治療効果

動物番号	FK 506 治療* (mg/kg/日)	EAU (発症日)
1	なし	33
2	なし	33
3	0.25 → 0.125	33
4	0.25 → 0.125	—
5	0.25 → 0.125	—
6	0.25 → stop	53
7	0.125 → 0.063	—
8	0.125 → 0.063	60
9	0.125	—
10	0.125	—

*FK 506 は免疫後 23 日目から開始した。サルの体重減少が著しいものは表中で示すごとく途中で半量で減量あるいは中止した。

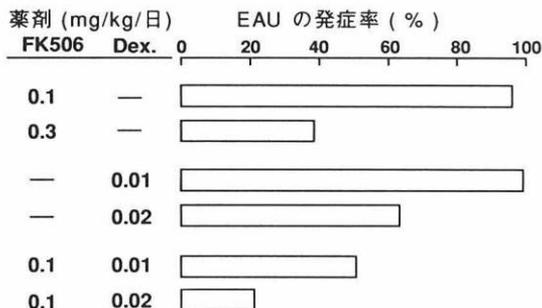


図 14 FK 506 とデキサメサゾンのEAU発症抑制に対する併用効果。

キサメサゾンの0.01 mg/kg/日、0.02 mg/kg/日でのEAU発症率はそれぞれ16/16 (100%)、20/32 (63%)であった。FK 506 (0.1) とデキサメサゾン (0.01) の併用では4/8 (50%)、FK 506 (0.1) とデキサメサゾン (0.02) の併用では6/28 (21%)のEAU発症率となり、各薬剤の低用量単独投与に比べて発症率が抑制され併用効果が認められた。

viii) サルにおけるEAUに対するFK 506の作用
表 6 に rhesus monkey におけるFK 506の治療結果を示す。治療群ではFK 506をS抗原免疫後23日目から開始し対照は生食液投与した。対照の2匹は33日目に強いEAUが発症したが、FK 506の0.25 mg/kg/日または0.125 mg/kg/日が免疫後23日目から開始したサルでは、EAUが発症しないか、発病してもその発病日が対照に比べて大幅に遅延した。対照のサルとFK 506 (0.25 mg/kg/日) 治療をうけたサルの眼底写

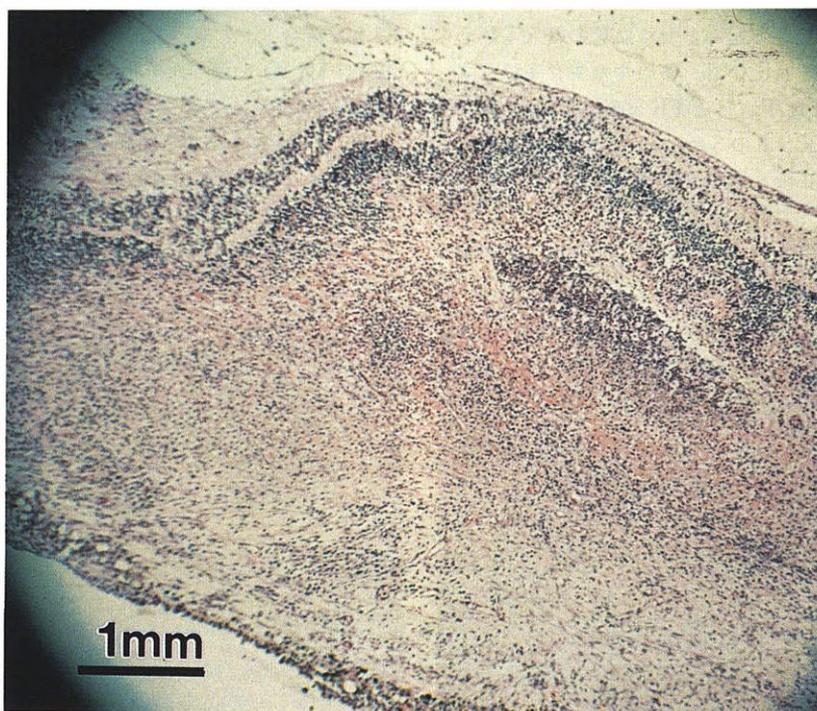
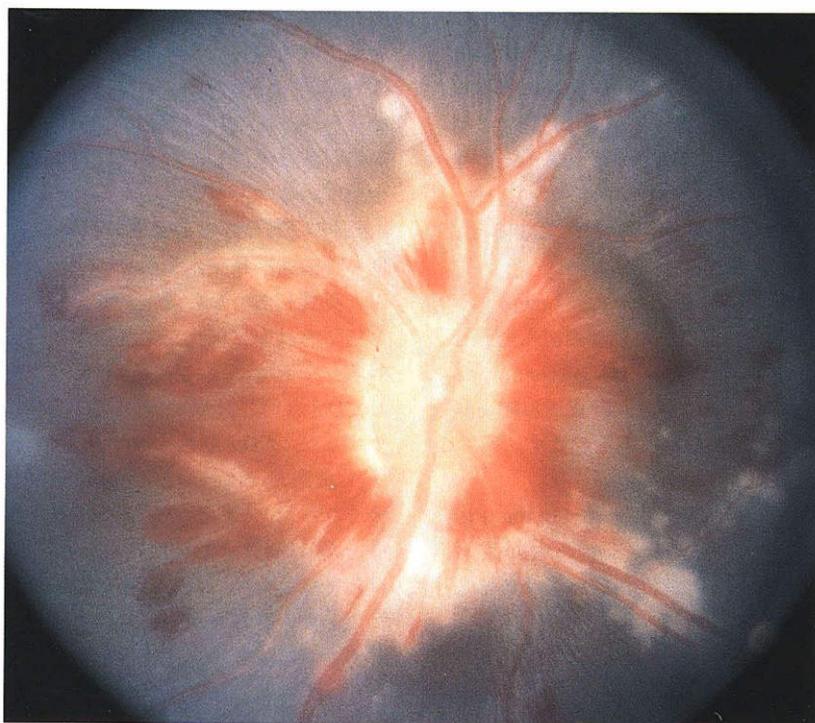


図15 S抗原免疫によるサル EAU の眼底写真(上)と病理像(下).

真と病理写真を示す(図 15)。対照のサルでは、激しい網膜血管炎と血管に沿った網膜出血がみられ、病理像でも網膜壊死病巣と炎症細胞の浸潤が脈絡膜にもみられる。一方、FK 506 治療をうけたサルでは、軽度の硝子体混濁と網膜血管の拡張蛇行は認められるがその程度は軽く、病理像も網脈絡膜は正常構築が保っていた。

2) ラット全層角膜移植術後拒絶反応に対する immunophilin ligand の作用

Fisher ラット (RT^l) をドナーに、Lewis ラット (RT^{l^e}) をレシピエントに用いた。この組み合わせは、MHC が同じで minor と medial histocompatibility antigen が異なるだけであるが、皮膚移植と角膜移植ではそれぞれ 100% の拒絶反応を起こす。

i) Immunophilin ligand 全身投与

a) 移植片の生存率：シクロスポリン (10 mg/kg/日) あるいは FK 506 (0.3, 1, 3 mg/kg/日) を角膜移植当日から術後 14 日目まで毎日投与し以後は無治療で観察し、移植片の生存率をまとめた結果を図 16 に示す。無治療対照ラットは術後 3 週目までに図 17 に示すような移植角膜片の浮腫、混濁、血管侵入を生じ全例が拒絶され生存率 0 となった。一方、図 18 には FK 506 (1 mg/kg/日) 投与ラットの移植片が示すが、移植片は浮腫も混濁もほとんどなく血管の侵入も認められずきれいに生着している。移植片の生存率はシクロスポリンの 10 mg/kg/日と FK 506 の 1 mg/kg/日がほぼ同等で、FK 506 の 3 mg/kg/日が最も有効であったが、投与中止後 6 週目 (術後 8 週目) までに全例が拒絶反応を生じた。

b) 移植角膜片における免疫病理：図 19 に無治療

のレシピエントラットの拒絶反応を生じた移植角膜片を免疫病理学的に検討した結果を示す。移植片には、CD 4 陽性のヘルパー/インデューサー-T 細胞、マクロファージ、IL-2 R 陽性細胞、MHC-クラス II 抗原陽性細胞が多数浸潤しており、移植片に激しい免疫反応が生じていることがうかがえる。一方、図 20 には 1 mg/kg/日の FK 506 で治療されたレシピエントの同じ時期の移植角膜片を示すが、いずれの免疫細胞にもほとんど浸潤していない。

経時的にも移植片が免疫組織染色とすると、無治療対照ラットでは、拒絶反応の時期に各種の免疫細胞(但し CD 8 は例外)が最も多く認められ、以後 1 週毎に減少するが、CD 8 陽性のサブプレッサー/サイトトキック T 細胞だけは、拒絶反応の 1 週間後にその数が最も多くなった。ところで、FK 506 やシクロスポリンの治療を 14 日間受けていたレシピエントでは、拒絶反応は遅れて生じた。しかし、その拒絶反応の発症した時期においても各種の免疫反応の移植片内の数は対照に比して有意に少なく、免疫反応が強く抑制されていることが示された (図 21)。

c) リンパ球混合培養：ラット角膜移植における免疫反応をさらに詳しく検討するために、図 3 に示したような混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction, MLR) を調べた。その結果を表 7 に示す。無処置の Lewis ラットのリンパ球は、Fisher ラットのリンパ球では刺激されず MLR を生じなかったが、MHC の異なる Brown Norway ラットのリンパ球により高い増殖反応を起こし MLR を生じた。しかし、Fisher ラットの角膜を移植された Lewis ラットのリンパ球



図 17 無治療ラットの術後 2 週間目の移植片。

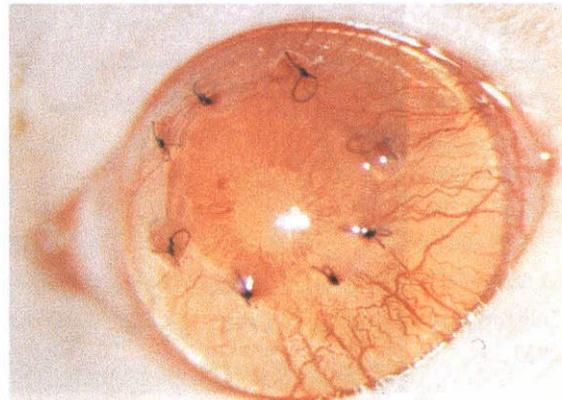


図 18 FK 506 (1 mg/kg/日) 治療をうけたラットの術後 3 週間目の移植片。

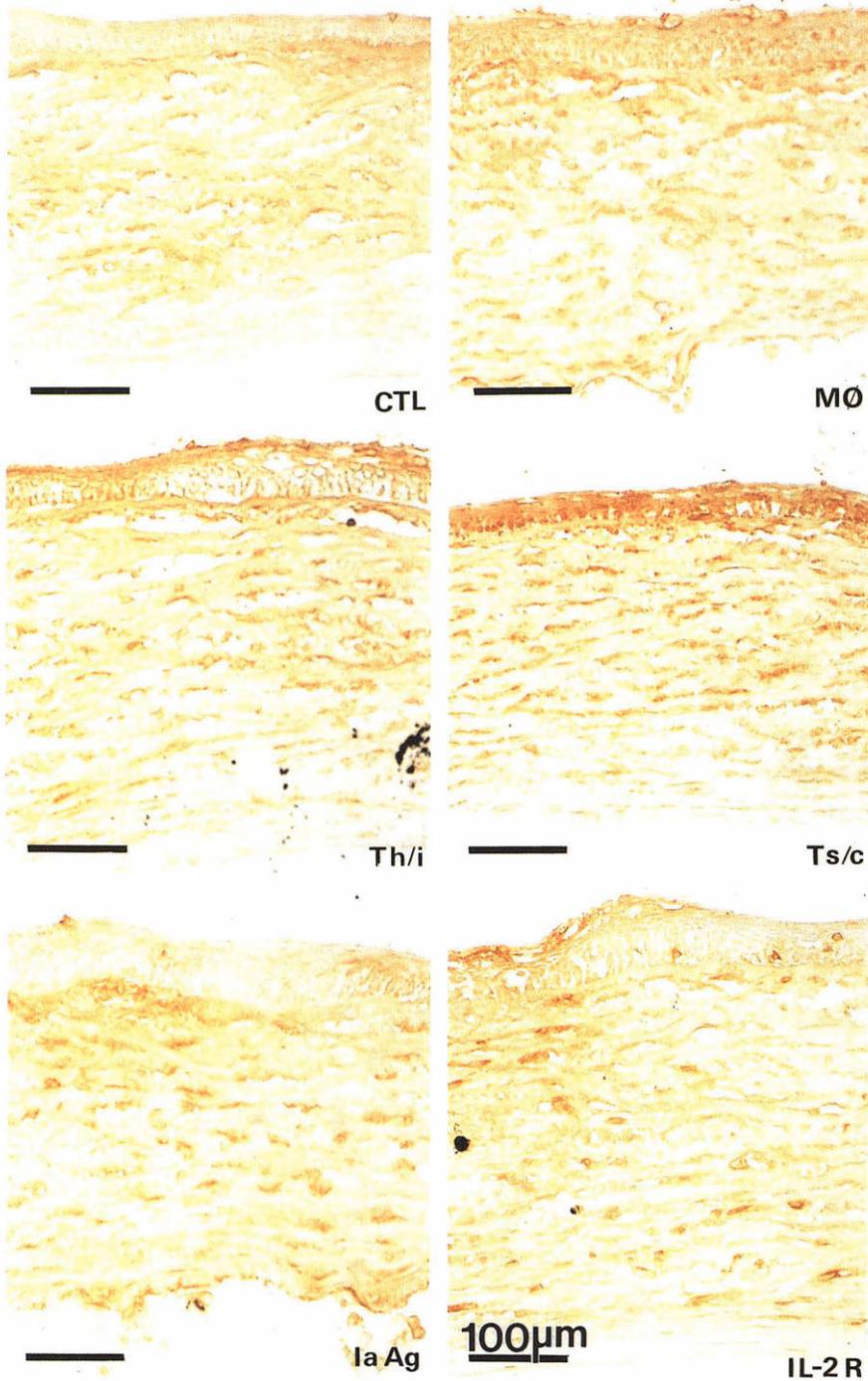


図19 無治療ラットの術後2週目の移植片の免疫病理所見。

CTL; 陰性対照, Mφ; マクロファージ, Th/i; ヘルパー/インデューサーT細胞,
Ts/c; サプレッサー/サイトトキニックT細胞, IaBA; MHCクラスII抗原陽性細胞,
IL-2 R; IL-2 receptor 陽性細胞。

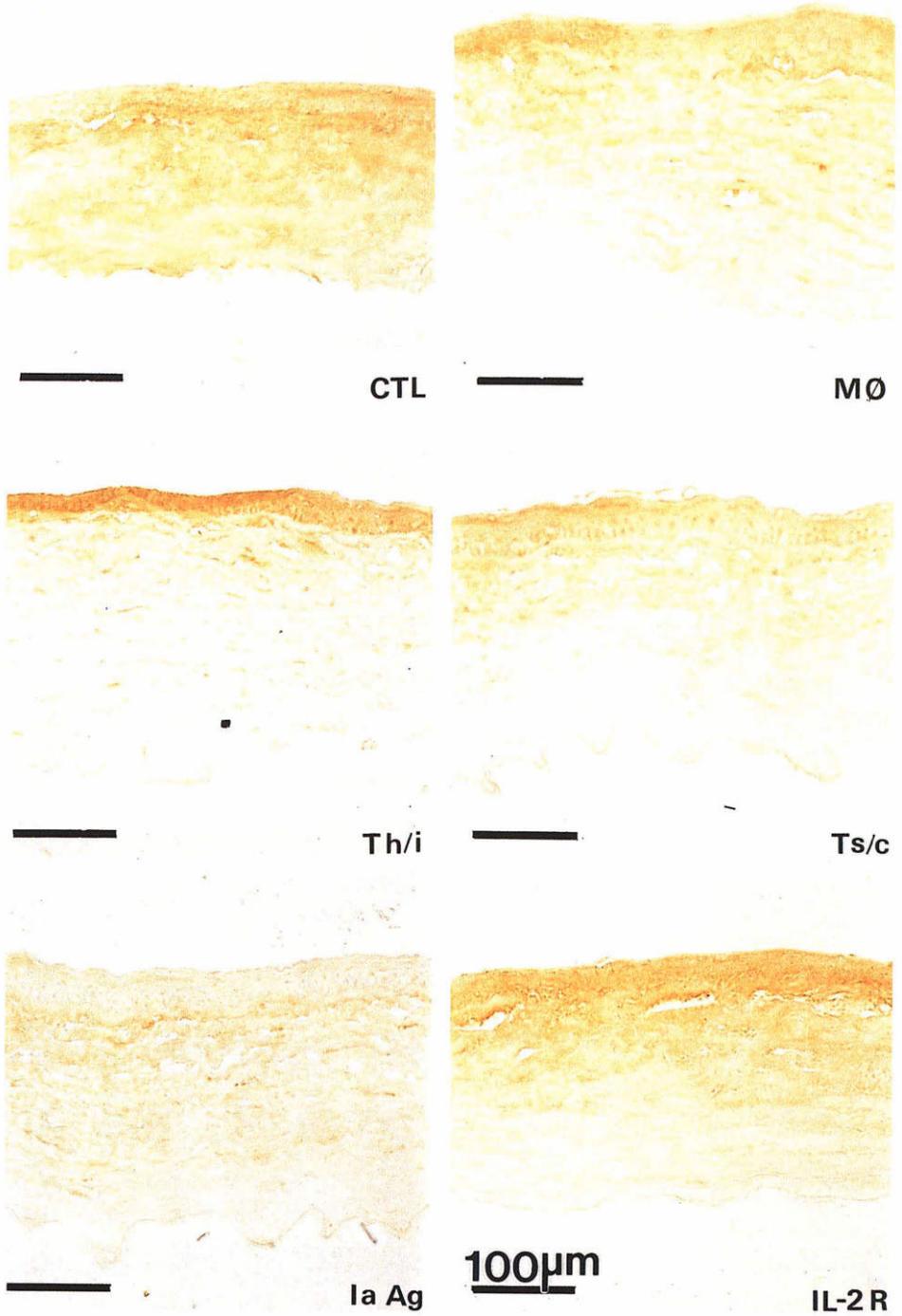


図20 FK 506 (1 mg/kg/日) 治療されたレシビエントラットの術後2週間目の移植片の免疫病理所見。
略号は図19と同じ。

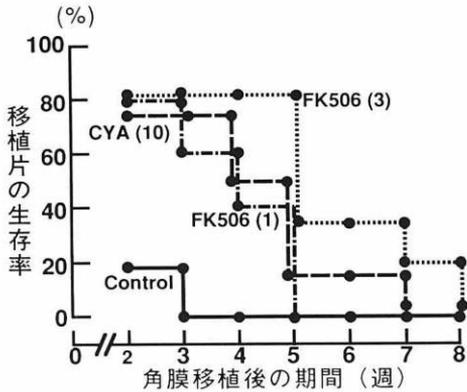


図 16 イムノフィリン・リガンド全身投与の角膜移植片の生存率への効果。

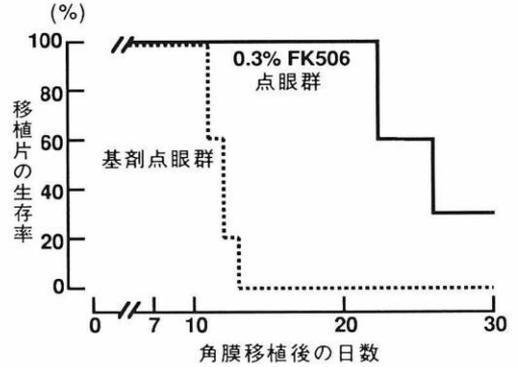


図 22 FK 506 点眼の角膜移植片の生存率への効果。---対照，—0.3%FK 506 点眼薬

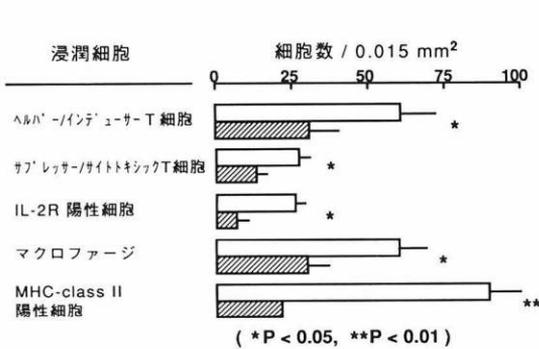


図 21 角膜移植片における免疫細胞に対する FK 506 (全身投与) の作用。
□対照，■FK 506 (1 mg/kg/日) 治療群

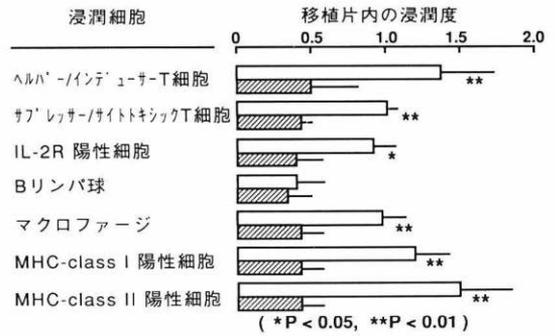


図 23 角膜移植片における免疫細胞に対する FK 506 (局所点眼) の作用。
□対照，■FK 506 点眼群

は、Fisher ラットのリンパ球により刺激され MLR が生じ、その強さは Brown Norway ラットのリンパ球により生じた MLR と同程度であった。そして、レシピエント (Fisher ラット→Lewis ラット) への FK 506 治療は、これらの MLR が強く抑制した (表 7)。

ii) FK 506 点眼薬による角膜移植片拒絶反応の抑制

全層角膜移植後 (7 日目～20 日目)、基剤点眼をうけたレシピエントの移植片は術後 10 日目から拒絶反応を生じるものが現われ術後 14 日目までに全例が拒絶された。一方、0.3%FK 506 点眼薬を 4 時間毎にうけたレシピエントの移植片は点眼が行われている間は全て生存しており、術後 24 日目頃から拒絶反応を生じはじめ術後 28 日目に全例が拒絶された (図 22)。このように、0.3%FK 506 点眼薬は全層角膜移植の allograft

表 7 ラット全層角膜移植における混合リンパ球反応

Lewis ラットからの反応細胞		刺 激 細 胞	
角膜移植	FK 506 治療	Fisher ラット	Brown N.ラット
(-)	(-)	1.0±0.1*	3.8±0.9
Fisher->Lewis	(-)	5.6±1.5	5.6±1.3
Fisher->Lewis	(+)	1.0±0.1	1.1±0.2

*Stimulation index (4 回の実験の平均値±標準誤差)

に対する延命効果が認められた。

図 23 には、臨床的に拒絶反応を生じたと判断された時期の角膜移植片に対する各種の免疫細胞を免疫組織学的に検討した結果を示す。基剤治療群では、CD 4 陽性細胞、CD 8 陽性細胞、IL-2 R 陽性細胞、マクロファージ、MHC クラス I 抗原陽性細胞、MHC クラス II 抗原陽性細胞が角膜実質から内皮細胞近くに多数認められ、これは前項(全身投与)で記したと同様であった。これらの所見と B リンパ球は極めて少なかったことから、移植片で生じている炎症反応が遅延型の免疫

反応を主体とする病変であると考えられた。これらに対して、0.3%FK 506 点眼治療は、B リンパ球を全く他の全ての免疫細胞および MHC クラス I 抗原とクラス II 抗原の発現を有意に抑制した。

3) ラット受身型アレルギー性結膜炎に対する FK 506 点眼薬の効果

ラット抗卵白アルブミン IgE 血清を無治療のラット眼瞼結膜下に注射し、その後抗原(卵白アルブミン)とエバンスブルーの混合液を注射し眼瞼結膜下に生じた受身型アナフィラキシー反応の強さ(漏出色素量を

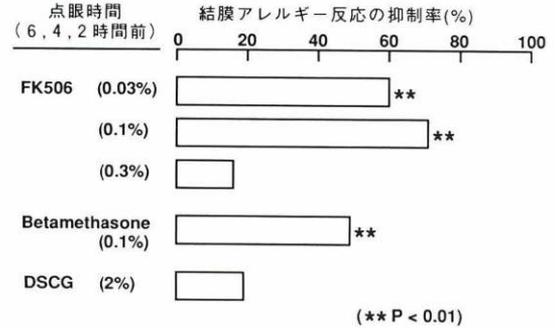
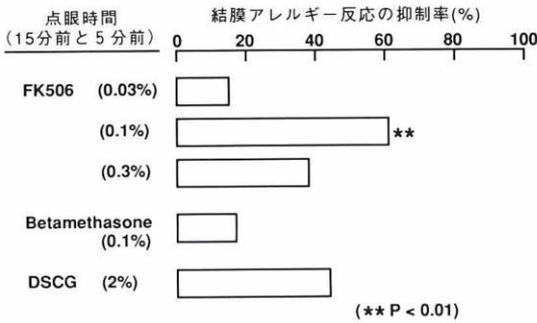


図 24 受身型アレルギー性結膜炎に対する FK 506 点眼薬の作用 (抗原静注の 15 分前と 5 分前に点眼)

図 25 受身型アレルギー性結膜炎に対する FK 506 点眼薬の作用 (抗原静注の 6, 4, 2 時間前に点眼).

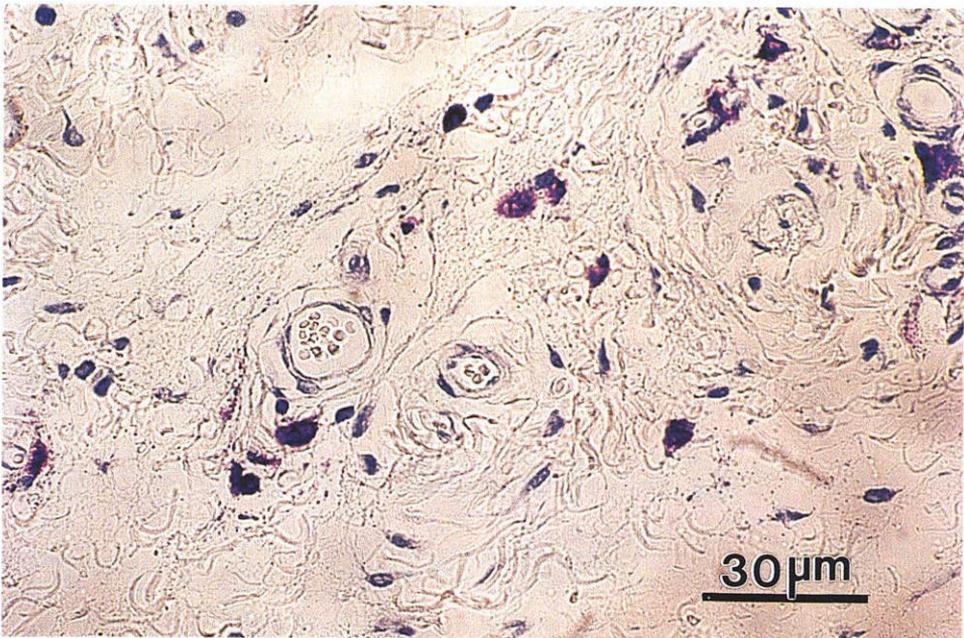


図 26 受身型アレルギー性結膜炎における結膜下組織中の肥満細胞の脱顆粒(無治療の対照ラットにおける脱顆粒した肥満細胞).

620 nm で測定した値)を、各種の点眼薬がどの程度抑制するか検討した。抗原投与の 15 分前と 5 分前に点眼治療した実験(図 24)では、0.01%FK 506 点眼薬はわずかししかアナフィラキシー反応を抑制しなかったが、0.01%FK 506 点眼薬は 61%の抑制率を示し、これは 0.1%ベータメサゾン点眼薬や 2%DSCG 点眼薬よりも強い抑制であった。一方、抗原チャレンジの 6, 4, 2 時間前に点眼治療した実験(図 25)では、0.03%FK 506 点眼薬でも 60%の高い抑制を生じ、0.1%FK 506 では 71%の抑制であり、やはり 0.1%ベータメサゾンや 2%DSCG よりも強い抑制を示した。

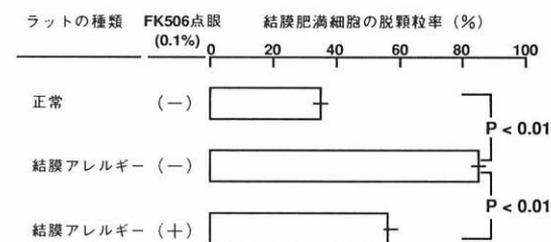


図 27 結膜下組織の肥満細胞の脱顆粒に対する FK 506 点眼薬の効果。

表 8 難治性ぶどう膜炎に対する FK 506 治療の対象症例の内訳

原 疾 患	症 例 数
ベーチェット病	34 (男 24, 女 10)
フォークト-小柳-原田病	2 (男 2, 女 0)
特発性網膜血管炎	3 (男 3, 女 0)
原因不明のぶどう膜炎	1 (男 0, 女 1)
計	40 (男 29, 女 11)

安全性については 40 例全例で検討

有効性は早期中止例など 3 例を除く 37 例で検討

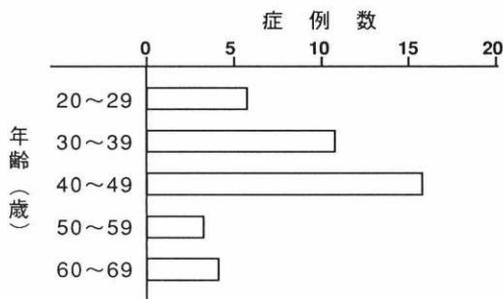


図 28 FK 506 治療を受けた難治性ぶどう膜炎の年齢構成。

眼瞼結膜下組織の肥満細胞 (mast cell) を組織学的に観察し、全肥満細胞中の脱顆粒肥満細胞の割合を測定した。無処置のラットでは脱顆粒率が 33.7 ± 1.2%、受身型アナフィラキシー群は図 26 に示すような脱顆粒をおこした肥満細胞が 84.4 ± 1.2%、一方、0.1%FK 506 を抗原チャレンジの 15 分前と 5 分前に点眼した群での脱顆粒率は 56.8 ± 1.4%であり、後二者の間には統計的に有意差を認めた (p < 0.01) (図 27)。即ち、0.1%FK 506 点眼薬はラット眼瞼結膜の受身型アレルギー眼結膜炎で生じる肥満細胞の脱顆粒を有意に抑制する作用を示した。

2. 臨床的研究

FK 506 の難治性ぶどう膜炎に対する臨床試験

本試験の適応基準に合致し試験に組み込まれた症例は平成 3 年 12 月末現在で 40 症例(男性 29 例, 女性 11 例)で、その内訳と年齢構成をそれぞれ表 8 と図 28 に示す。このうち、FK 506 投与開始時からステロイド内服をしていた 1 例、腎機能異常を生じ早期に中止した 1 例、骨髄球上昇のため投与直後に中止した 1 例を除く 37 症例についての有効性の検討をおこない、安全性の検討は全症例を対象に解析した。37 症例の FK 506 開始前に用いられていた主な薬剤は、コルチコステロイド 17 例、コルヒチン 24 例、シクロスポリン 17 例、シクロホスファミド 3 例、そして、前治療なしが 5 例であった。前治療が行われていた 32 例はいずれも前治療が無効であったかあるいは副作用のために FK 506 治療をおこなったものである。表 9 には、初期投与量剤の症例数と投与期間を示す。全体での FK 506 の平均投与期間は 26.2 ± 12.4 (平均値 ± 標準偏差) 週間であった。

1) 症例報告 (44 歳・男性・ベーチェット病)

1987 年にぶどう膜炎を発症した不全型ベーチェット病であるが、1988 年 2 月末までは他医で加療され経過詳細は不明である。1988 年 3 月よりコルヒチン(1.5

表 9 初期投与量別症例数と全投与期間

初期投与量 (mg/Kg/日)	症例数	FK 506 投与期間 (平均値 ± 標準偏差)
0.05	10	8~52 週 (33.2 ± 6.6)
0.1	13	12~44 週 (27.8 ± 10.3)
0.2	14	9~29 週 (19.7 ± 7.1)
計	37	8~52 週 (26.2 ± 12.4)

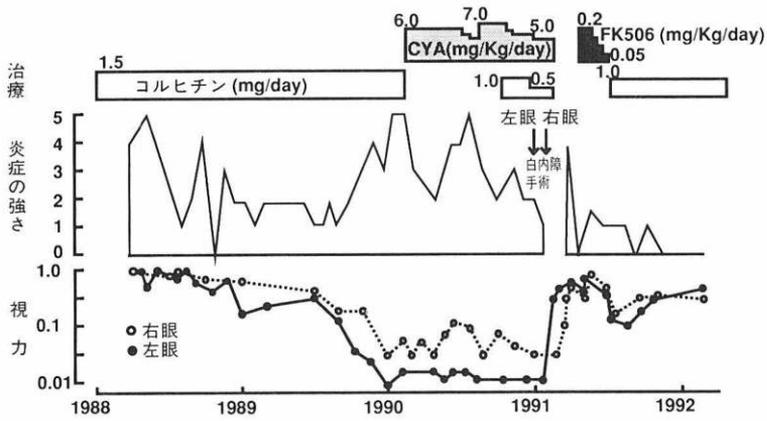


図 29 FK 506 治療が奏効したベーチェット病患者の臨床経過(45 歳・男性)。

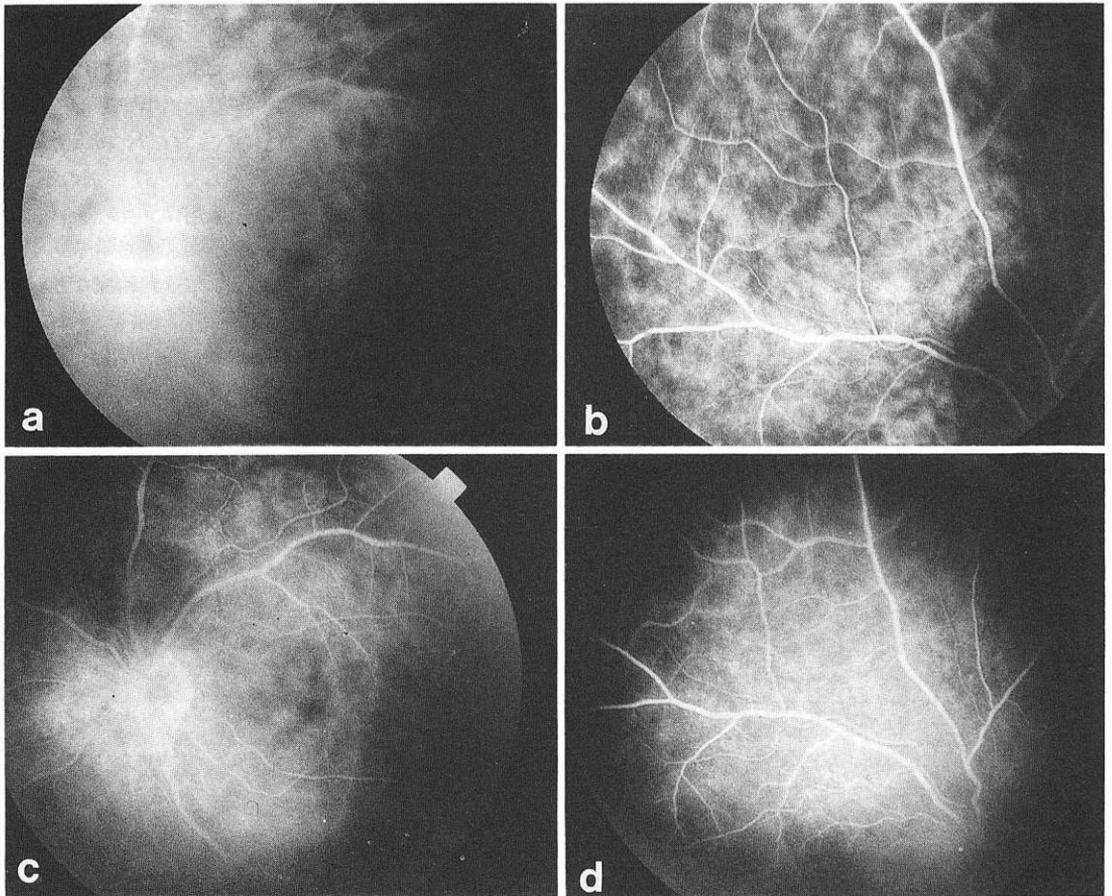


図 30 同症例の蛍光眼底写真。

a, b; FK 506 開始直前 (視力 0.2)。c, d; FK 506 開始 4 週間後 (視力 0.7)。

mg/日)を2年間投与されていたが図29に示すごとく両眼にぶどう膜炎発作を繰り返していた。1990年2月からシクロスポリン(6mg/kg/日)に変更したが眼炎症発作は相変わらず頻発していた。一時、血清クレアチニン値がbase lineの150%を越えたため、シクロスポリンを4mg/kg/日まで下げたところ更にぶどう膜炎発作が頻発したためにシクロスポリンを7mg/kg/日まで増量しコルヒチンも併用していたが、図29のごとく眼炎症発作はおさまらず、併発白内障が出現した視力は右0.1(矯正不能)、左0.01(矯正不能)となった。さらに、過熟白内障となったため1991年2月と3月に水晶体乳化吸引術をおこなったが、術後炎症が遷延したため1991年4月にFK506臨床試験に組み込まれた。0.2mg/kg/日のFK506を投与された直後から眼炎症は鎮静化し、眼底所見も図30に示すごとく網膜血管炎の所見も改善し、FK506開始後4週間で視力も両眼0.7まで回復した。しかし、本症例ではFK506の全血中トラフレベルが第1週目で26ng/ml、第2週目で

35ng/ml、第3週目で43ng/mlと高くなり、血清クレアチニン値も当初1.3mg/dlであったものが2.3mg/dlまで上昇した。このためにFK506の用量を漸減し、また、ぶどう膜炎発作が皆無となったのでFK506投与8週目にFK506治療を中止してコルヒチン(1.0mg/日)に変更して経過を観察した。コルヒチン単独になってから軽い炎症を数回生じたが、現在まで10か月間順調に経過し腎機能も正常に回復した。

2) 眼症状改善度

FK506の単独治療が個々の症例の治療前と比較して、(1)ぶどう膜炎の活動性、(2)ベーチェット病の眼炎症発作頻度、(3)視力を改善したか否かを総合的に判定した結果を図31に示す。治療開始12週目での判定で改善例が全体の45.9%(著明改善10.8%、中等度改善24.3%、軽度改善10.8%)、不変37.8%、悪化16.2%であり、平均26週間の最終判定では改善率は更によく(70.0%)、悪化例は8.1%に減少していた。こ

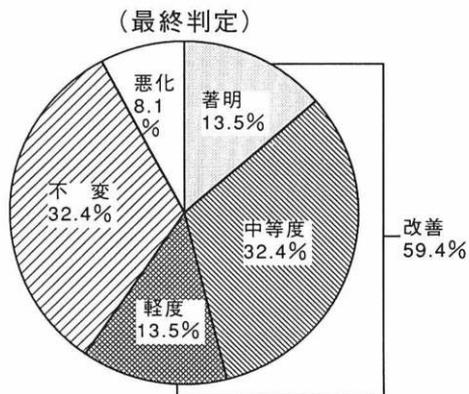
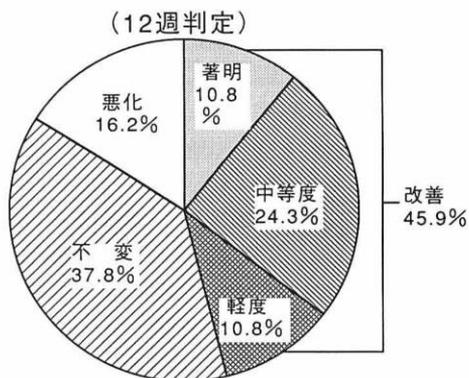


図31 FK506療法の難治性ぶどう膜炎に対する改善度。

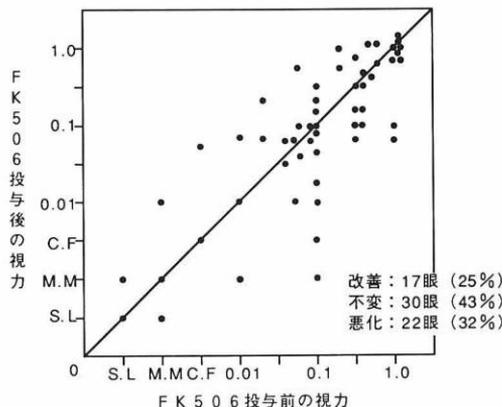


図32 FK506治療前後の矯正視力。

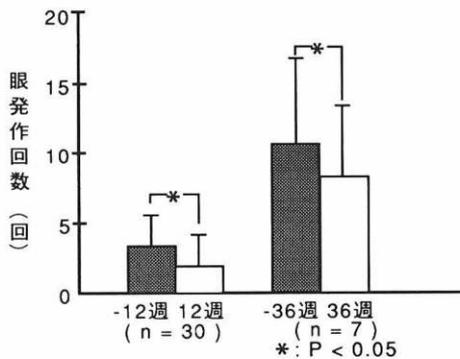


図33 FK506治療前後のベーチェット病眼炎症発作回数。

の37例の中でシクロスポリンによる前治療が無効であった17症例について検討しても、12週判定、最終判定それぞれ改善率は35.3%と47.0%であり、シクロスポリンの無効例にも一定の治療効果が認められた。

3) 視力に対する効果

図32にFK506治療前と投与開始後の最近の視力を示す。FK506投与前に比較し視力が向上したものは17眼(25%)、不変30眼(43%)、悪化22眼(32%)であった。

4) ベーチェット病の眼炎症発作頻度に対する効果

図33にFK506治療前12週間と開始後12週間の眼発作回数、ならびに前36週間と開始後36週間のそれを比較した結果を示す。いずれの時期においても、FK506治療はベーチェット病の眼炎症発作を有意に減少させた($p < 0.05$)。

5) ベーチェット病の眼外症状に対する効果

表10にベーチェット病の主な眼外症状に対するFK506治療の効果について示す。口腔内アフタ、毛嚢

表10 ベーチェット病の眼外症状に対するFK506の効果

眼外症状	改善度 (%)
口腔内アフタ	7/25(28%)
外陰部潰瘍	3/5 (60%)
結節性紅斑	5/8 (63%)
毛嚢炎様皮疹	3/14(21%)
関節炎	2/5 (40%)

表11 FK506治療でみられた随伴症状

随伴症状	随伴発現件数
なし	24例(60.0%)
あり	16例(40.0%)
随伴症状	随伴発現件数
悪心・嘔吐	6(15.0%)
下痢	2(5.0%)
食欲低下	2(5.0%)
体重減少	2(5.0%)
咽頭潰瘍	1
発熱	1
熱感	4(10.0%)
発疹	3(7.5%)
胸部不快感	2(5.0%)
ベーチェット様神経症状	1
振戦	4(10.0%)
外眼筋麻痺	1
頭痛	2(5.0%)
不眠	1
口唇しびれ感	1

炎様皮疹、関節炎に対しては余り効果が認められなかったが、症例数は少ないものの外陰部潰瘍、結節性紅斑には有効な症例が多かった。

6) FK506の随伴症状と臨床検査値異常

表11にFK506投与中に認められた全ての随伴症状を示す。随伴症状が全くなかった症例は40例中24例(60%)であり、16例(40%)は表10に示すような随伴症状を認めた。頻度が高かったものは悪心・嘔吐の消化器症状と、熱感、振戦であった。咽頭潰瘍を生じた症例はFK506を0.1 mg/kg/日投与中22週目に扁桃腺炎の後に中咽頭潰瘍を生じ食事が困難となり体重が約8 kg減少し最終的に31週目に投与を中止した。FK506と咽頭潰瘍や体重減少との因果関係は不明であった。

表12にFK506投与により生じたと考えられる臨床検査値異常を示す。検査値が全経過を通じて異常なかったものは40例中24例(60%)であり、16例(40%)が何らかの異常値を示した。最も頻度が高かったものは腎機能異常(血清クレアチニン、BUNが正常範囲を

表12 FK506治療でみられた臨床検査値異常

検査値異常	随伴発現件数
なし	24例(60.0%)
あり	16例(40.0%)
検査値異常	随伴発現件数
貧血	2(5.0%)
骨髄球増加	1
腎機能異常	9(22.5%)
肝機能異常	1
耐糖能異常	2(5.0%)
中性脂肪増加	2(5.0%)
血清K値上昇	5(12.5%)
血清Mg値上昇	1

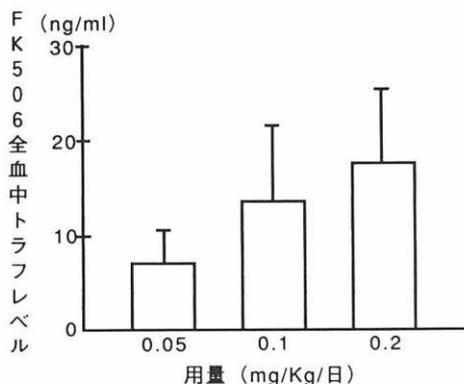


図34 FK506初期投与量と全血中トラフレベル。

越えたものの22.5%で、次いで血清 K 上昇(12.5%)であった。耐糖能異常は2例(5%)に認められた。

7) FK 506 全血中トラフレベル

図 34 に FK 506 の初期用量 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg/日の全血中のトラフレベルを示す。用量に依存してトラフレベルも高くなった。このトラフレベルと眼症状の改善度との関係を検討すると、眼症状が中等度以上に改善した症例の全血中トラフレベルの平均は 17.3±6.9 ng/ml であり、一方、眼症状が不変か悪化した症例のそれは 12.3±5.6 ng/ml で両者の間に統計的有意差 (p<0.05) が認められた。即ち、眼症状改善のためには FK 506 の全血中トラフレベルは 15 ng/ml より高く保つことが必要と考えられた。

一方、全血中トラフレベルと副作用との関係は、副作用が全くなかった症例の全血中トラフレベルの平均は 12.8 ng/ml であり、最も頻度の高かった腎機能障害を生じた症例の全血中トラフレベルは 25.0±10.8 ng/ml で両者間に有意差を認めた (p<0.05)。このことから、副作用の点からは FK 506 の全血中トラフレベルを 25 ng/ml 以下に保つ必要があると考えられた。

8) FK 506 の臨床免疫学的検査値への作用

FK 506 投与前と投与開始 12 週目とで、種々の臨床免疫学的パラメーター (IgG, IgA, IgM, IgD, 免疫複合体, リンパ球サブセット, リンパ球増殖反応) について FK 506 治療前が無治療かコルヒチンであった 9 症例で検討した。末梢血中の T リンパ球と CD4 陽性細胞の比率、ならびにコンカナバリン A に対するリンパ球増殖反応が FK 506 投与前に比べて有意に減少 (p<0.05) したが、他の項目は全て有意の変動は認められなかった。

IV 考 按

本研究で用いられた各薬剤の構造式と分子量を図 35 で示す。デキサメサゾン は膜安定化作用による広範な抗炎症作用とともにリンパ球抑制作用、即ち、ヒトではリンパ球減少症 (lymphopenia) をおこし、ラットではさらに感受性が高くリンパ球傷害 (lympholysis) を生じ²⁹⁾、免疫応答系に強い抑制作用をもつ。アルキル化剤のシクロホスファミド、代謝拮抗剤のミゾリビン、抗腫瘍薬の 15 DSG は、いずれも細胞分裂過程を阻害する細胞毒性作用をもち、腫瘍細胞、骨髄細胞や活性化リンパ球をはじめ細胞分裂を活発におこなう細胞を非選択的に抑制する。この作用により、免疫反応も非

薬剤名	分子量	構造式
デキサメサゾン (dexamethasone)	392.4	
シクロホスファミド (cyclophosphamide)	261.1	
ミゾリビン (mizoribine)	259.2	
15デオキシスパーガリン (15-deoxyspergualin)	496.9	
ブシラミン (bucillamine)	223.3	
シクロスポリン (cyclosporine)	1202.6	
FK506	822.1	

図 35 本研究に用いられた免疫抑制剤とその構造式。

選択的に抑制される。ブシラミンは免疫調節剤として開発され抗リウマチ作用があるために慢性関節リウマチに対して臨床応用されているが、その作用機序には不明の点が多かった。今回、我々が検討した結果 (図 10, 11) ブシラミンはマクロファージの T リンパ球への抗原提示を抑制する作用のあること、一方、T リンパ球に対する抑制作用はないことが明らかにされ、本研究では抗原提示細胞の抑制剤として用いた。シクロスポリンと FK 506 は、すでに緒言で記したように、T リンパ球 (特にヘルパー/インデューサー T 細胞) の IL-2 産生に関するシグナル伝達の抑制、即ち mRNA の発現を抑制し細胞性免疫反応を選択的に抑制する¹²⁾¹³⁾。ごく最近になり、これらの immunophilin ligand は肥満細胞や好塩基球における IgE-IgE 受容体の反応後生じる脱顆粒現象に関する細胞内 (あるいは核内) のシグナル伝達も抑制することが報告されており²⁴⁾²⁵⁾、I 型アレルギー反応に対しても抑制作用のあ

ることが示唆されている。免疫応答系のさまざまな部位に作用するこれらの薬物を用いて、眼科領域の代表的な病態のモデルあるいは疾患においてその免疫薬理作用を解析した。

1. ぶどう膜炎

ぶどう膜炎の発症機構にはさまざまな病原微生物の関与とともに、免疫反応と自己免疫機序が深くかかわっている。ぶどう膜炎の動物モデルとして、我々は網膜特異抗原 (S 抗原と IRBP) により惹起する EAU を用い、先に記した各種の免疫抑制剤の作用を検討した。用量作用実験 (図 4, 表 2) で、EAU 発症抑制効果の ED₅₀ を重量比較 (mg/kg) でみるとデキサメサゾン、FK 506、シクロホスファミド、シクロスポリン、15 DSG、ミゾリビンの順に低用量で抑制しており、デキサメサゾンが最も効果が強くみえる。しかし、デキサメサゾンの分子量は FK 506 の約 1/2 であり、モルで比較すると二者の ED₅₀ はほぼ同等 (0.2 μmol/kg/日) となり、次いでシクロスポリンとシクロホスファミドの ED₅₀ がほぼ同じ (3~4 μmol/kg/日) で、FK 506 のその 15~20 倍高用量であった。発病の抑制効果は、各薬剤のもつ免疫抑制作用の最終結果をみているので、次に、個々の薬剤の免疫応答系に対する作用様式を検討した。デキサメサゾンと一連の細胞毒性剤 (シクロホスファミド、15 DSG、ミゾリビン) は、S 抗原に対する抗体産生とリンパ球増殖反応の両方を抑制し (図 5, 図 6)、一方、immunophilin ligand (シクロスポリン) は抗原特異的リンパ球増殖反応は抑制するが抗体産生に対する抑制効果はなかった。即ち、従来の免疫抑制剤は体液性免疫も細胞性免疫も非選択的に抑制したのに対し、immunophilin ligand は細胞性免疫反応を選択的に抑制した。さらに、免疫抑制作用の持続についても差異が認められた。デキサメサゾン、15 DSG などは薬剤投与中は免疫反応をよく抑制するが、休薬するとまもなくその免疫抑制効果は減弱消失してしまう (図 5, 図 6, 図 8)。一方、immunophilin ligand は、投与中のみならず長期間休薬してもその免疫抑制作用は持続した。シクロホスファミドにも、やや弱いが同様の効果がみられた。この休薬後の長期免疫抑制効果が免疫学的に特異性のあるものかどうか、即ち、免疫寛容かどうかについて検討した (表 4)。Immunophilin ligand で治療されたラットは治療開始時に免疫された 1 次抗原に対しては 2 次免疫においても不応答であったが別の抗原に対しては応答性を示し、immunophilin ligand は免疫寛容を誘導するこ

とが示唆された。一方、シクロホスファミドにはこのような免疫寛容を誘導する作用は全く認められず、細胞毒性効果がやや長く持続しただけと考えられた。シクロスポリンや FK 506 の治療により 1 次抗原に対して免疫寛容状態となったラットには、抗原特異的サブレッサー細胞が誘導されており (図 9)、この細胞は S 抗原感作リンパ球の抗原特異的増殖反応を抑制するとともに EAU の発症抑制作用も示した。どのような機序で immunophilin ligand が抗原特異的サブレッサー T 細胞を誘導するのかは不明であるが、2 つの機序が推察される。即ち、immunophilin ligand は CD 4 陽性細胞を抑制するので相対的に CD 8 陽性のサブレッサー細胞の活性が増強した可能性と、もうひとつは、immunophilin ligand が CD 8 陽性細胞に直接作用した可能性である。現在まで、CD 8 陽性細胞が immunophilin ligand に対して感受性があるという報告はないが、今後検討を要する課題と考える。

Immunophilin ligand 特に FK 506 は、ラットが EAU を発病してから投与を開始しても炎症の増悪を抑制する治療効果が認められた (表 5)。サルにおいては、発病前ではあるが免疫後 23 日目から治療を開始しても十分に EAU の発病を抑制した (表 6)。これらのことは、immunophilin ligand は免疫反応の efferent limb に対して有効であることを示すものである。我々がヒトのぶどう膜炎を治療開始できるのは常に efferent limb であり、臨床的観点からもこれらの薬剤の有用性を示すものと言える。

ぶどう膜炎の発病には、多くの種類の免疫細胞が関与し炎症の局所に出現する。これらの現象をとらえるには、細胞膜抗原に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色をおこない、各種の免疫細胞を識別する方法が用いられる。本研究においても、表 1 に示したような免疫細胞に特異的なモノクローナル抗体を用い、EAU の病態形成に関与する免疫細胞の解析と、各種免疫抑制剤の免疫細胞に対する効果を検討した。EAU の発病早期には、ヘルパー/インデューサー T 細胞 (CD 4 陽性細胞)、マクロファージ (OX 42 陽性細胞)、好中球 (OX 22 陽性細胞) が前部ぶどう膜、房水、硝子体、網脈絡膜に多数浸潤して、更に CD 4 陽性細胞やマクロファージの多くは IL-2 R を発現していた。また、眼内の resident cell の一部 (角膜内皮細胞、毛様体上皮細胞、網膜血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞) は MHC クラス II 抗原 (Ia 抗原) の発現もみられた。このような免疫病理所見から、T リンパ球を中心とす

る免疫反応が局所の病態形成に関与していることがうかがえる。FK 506 やシクロスポリンは、これらの免疫細胞の出現数を全て抑制したが、特にヘルパー/インデューサーT細胞、マクロファージ、IL-2 R 陽性細胞、Ia 抗原陽性細胞の抑制が他の免疫抑制剤に比較して強く認められた。

強力かつ特異な免疫抑制作用をもつ immunophilin ligand は、同時に腎機能障害などの重篤な副作用をもつことも、シクロスポリンの臨床経験から明らかにされた。そこで、これらの immunophilin の低用量と、作用機序の異なる他の免疫抑制剤の低用量とを併用して、副作用がなくかつ十分な免疫抑制効果を期待して、いくつかの併用療法を検討した。単独ではEAU をほとんど抑制しない低用量のシクロスポリンとブシラミンの併用は、EAU の発症率と抗原特異的リンパ球増殖反応を強く抑制し有意の併用効果を生じた。これは、ブシラミンがマクロファージに作用して、そのTリンパ球への抗原提示を抑制することと、シクロスポリンがT細胞受容体を介するシグナル伝達を阻害してIL-2産生を抑制することの2つが相重なって生じた効果と考えられ、単独では不十分な用量でも免疫反応の異なる2つのstageが独立して抑制されるためにEAUに対する抑制効果が生じたものと考えられる。FK 506 とデキサメサゾンの低用量ずつの併用も、EAU 発症に対して併用効果が認められた。組み合わせた2つの薬剤の副作用は異なっており、このような低用量ではそれぞれの副作用の出現も少ないと考えられ、今後、難治性ぶどう膜炎で単独では無効な症例に対して試みられる可能性があるものとする。FK 506 とミゾリピンの併用も多少の併用効果はあるが、これについては今後もう少し用量の点で検討する余地がある。一方、immunophilin ligand 同志、即ちシクロスポリンとFK 506 の併用も検討し、低用量ずつで明確な併用効果は認められたが、作用機序が同一でかつ副作用も類似している薬剤の併用は臨床的にあまり意義がないものとする。

最後に、FK 506 の難治性ぶどう膜炎に対する臨床試験の結果について考察する。ペーチェット病を中心とする難治性ぶどう膜炎の症例に対し多施設オープン試験で検討され、安全性を考慮して低用量(0.05 mg/kg/日)から0.1, 0.2 mg/kg/日と用量の高い方へと症例を導入していった。シクロスポリン、コルヒチンあるいはコルチコステロイドなどの前治療が無効であった症例が対象の大半であったにもかかわらず、FK 506 治

療のぶどう膜炎改善率は12週目で45.9%、最も最近の判定(治療開始後の平均26週目)では70.0%であり、すぐれた臨床効果があると考えられた。シクロスポリンが無効であった症例だけを検討しても、約半数がFK 506 の治療によりぶどう膜炎が改善されており、シクロスポリン無効症例に対する治療としても有用と考えられる。ペーチェット病のぶどう膜炎眼発作頻度も有意に減少する効果がみられ、視力の保持にも有効と考えられた。一方、副作用もみられ、FK 506 投与にともなう何らかの随伴症状と臨床検査値異常が40%の症例に認められた。随伴症状の多くは消化器症状と、振戦や頭痛などの軽度の神経症状であった。中咽頭潰瘍の痛みのため体重減少を来した1例を除いて随伴症状のために投薬を中止した症例はなく、薬剤のコンプライアンスは比較的良好と考えられた。臨床検査値異常は、腎機能異常(血清クレアチニン、BUNが正常範囲を越えたもの)が全症例の22.5%に生じ最も高頻度であり、次いで血清K上昇であった。米国ピッツバーグ大学の肝臓移植患者370症例の副作用報告³⁰⁾では、血清クレアチニン値が2.0 mg/dl をこす腎機能障害が31.1%、高血糖が35.5%(うち12%が長期間のインシュリン投与が必要であった)、神経症状が8.4%、移植後リンパ球増殖症(悪性腫瘍も含む)が1.4%、サイトメガロウイルス感染症が20%に出現している。これらの数値は同施設でシクロスポリン治療をした肝移植症例での副作用の頻度とほぼ同じであるという。この移植例でのFK 506 の投与量は我々のそれよりも高く、最初の3日間は点滴静注(0.15 mg/kg/日)により血中濃度を急速に高くし4日目から経口投与(0.3 mg/kg/日)している³¹⁾。肝移植症例は全身状態が悪く多くの合併症を有する患者でしかも投与量と投与方法も異なるので単純な比較はできないが、これらに比べるとぶどう膜炎に対するFK 506 治療は副作用が少ない。また、現在までにFK 506 治療による悪性腫瘍やサイトメガロウイルス感染症の発症は1例もない。しかし、今後も長期にわたり十分な経過観察が必要である。

ぶどう膜炎患者に対するFK 506 治療の有効性と安全性については、FK 506 の全血中トラフレベルが参考となる。今回のデータでは、有効性の点からは15 ng/ml 以上、副作用の点からは25 ng/ml 以下が望ましいと考えられた。FK 506 の投与量とトラフレベルは相関が高いが、個々の症例をみると同じ用量でも患者によりトラフレベルに差があるので、モニターリングには

臨床検査値と全血中トラフレベルの両者が必要と思われる。初期投与量は、0.05 mg/kg/日の群では大半が用量増加を要しており、0.2 mg/kg/日の群では腎機能障害などで減量する例が多く、0.1~0.15 mg/kg/日が適当な初期投与量と考えられる。今後、長期にわたる臨床効果と副作用の検討をつづけ、更に、シクロスポリンなどとの比較試験が必要と考える。

2. 角膜移植片の拒絶反応

Fisher ラット (RT 1^l) の角膜を Lewis ラット (RT 1^o) に全層移植すると術後 2~3 週間で移植片 (allograft) は浮腫、混濁、血管侵入が著明となる。これを我々が臨床的に拒絶反応と判断した根拠は、(1) Lewis ラットから Lewis ラットへの syngenic graft はこのような所見を呈さずに透明性が保たれていること、(2) allograft の免疫病理所見で CD 4 陽性細胞、マクロファージ、IL-2 R 陽性細胞が多数移植片に浸潤しており、更に、MHC クラス II 抗原が浸潤細胞の一部 (T リンパ球とマクロファージ) と角膜内皮細胞ならびに keratocyte に発現されており、激しい免疫反応が allograft に生じていると考えられる、などによる。ところで、Lewis ラットと Fisher ラットは MHC が同じで、minor と medial histocompatibility antigen が異なるだけで、これらの所見を拒絶反応と言うために、更に、混合リンパ球反応 (MLR) を調べた。角膜移植をされていない無処置の Lewis ラットのリンパ球は、Fisher ラットのリンパ球に対しては MLR を生じなかったが MHC の異なる Brown Norway ラットのリンパ球に対して強い MLR を生じた。従って、MHC が同一の Lewis ラットと Fisher ラットは通常の状態では MLR を生じないことがわかる。しかし、Fisher ラットの角膜片を移植されている Lewis ラットのリンパ球は、Fisher ラットのリンパ球に対して強い MLR を生じた (表 7)。このことは、Fisher ラットからの移植角膜片の alloantigen により、Lewis ラットのリンパ球が初回抗原刺激 (priming) を受け、Fisher ラットのリンパ球に対して MLR をおこすようになったと解釈される。即ち、MHC が同一であっても minor または medial histocompatibility antigen が異なれば、角膜移植という priming は MLR を引き起こすにたりる同種異系抗原刺激であることを示しており、Fisher ラットから Lewis ラットへの角膜移植後に臨床的に観察された移植片の混濁などの所見は allograft rejection (拒絶反応) と判断してよいものと考えられる。

シクロスポリンあるいは FK 506 を手術直後からレシピエントに全身投与する治療は、この拒絶反応を抑制し移植片を延命する効果が認められた (図 16)。このことは臨床効果のみならず、免疫病理学的にも観察され移植片での免疫細胞の浸潤がこれらの immunophilin ligand により抑制された (図 20, 21)。更に、FK 506 治療は Fisher ラットから Lewis ラットへの角膜移植をうけた Lewis ラットのリンパ球の、Fisher ラットリンパ球に対する MLR を強く抑制し、拒絶反応の延命効果が alloantigen に対する免疫反応の抑制に基づくものであることが示された。しかし、FK 506 のこの免疫抑制作用は、priming に用いられた alloantigen (この場合は Fisher のリンパ球) に対してだけでなく第三の alloantigen (Brown Norway ラットのリンパ球) に対しても認められ (表 7) たことから、非特異的な抑制作用と判断される。実験的自己免疫性ぶどう膜炎の実験系では、immunophilin ligand は priming antigen に特異的な免疫抑制作用を示した (表 4, 図 9) のに対し、全層角膜移植では非特異的であったことの原因は不明である。恐らく、抗原の種類が異なることと関係があるのかもしれない。また、角膜移植では、EAU の系でみられたような休薬後の長期にわたる抑制効果の持続はなく、休薬後 4~6 週間以内に全ての移植片が拒絶されたが、これも実験系と抗原の違いに起因するものと推察される。

FK 506 点眼薬 (0.3%) の 1 日 6 回点眼治療は、allograft の拒絶反応をよく抑制した。この実験では術後の 6 日間は低用量の FK 506 の全身治療を全てのラットに行い、7 日目から対照群は placebo 点眼を治療群は FK 506 点眼をおこなったが、対照群では術後 14 日目までに全例が拒絶されたのに対し、FK 506 点眼群は点眼期間中 (21 日目まで) は 1 例も拒絶反応を生じず、点眼を中止してから次第に拒絶される移植片が生じた。FK 506 点眼群の血中 FK 506 濃度も一部測定しているが全身投与例に比べて低く、点眼という局所療法が角膜移植片における免疫反応を抑制したと考えられる。免疫病理学的所見でも、全身投与の場合と同様の、局所の免疫細胞の浸潤抑制効果と MHC クラス I, II 抗原の発現抑制効果が認められた。興味深いことに、FK 506 点眼治療は allograft の B リンパ球にはほとんど作用しなかった (図 23)。これらのことから、今後、FK 506 の点眼薬の毒性について十分な検討を要するが、角膜移植片の拒絶反応に対する新しい治療法のひとつになる可能性があると考えられる。

3. アレルギー性結膜炎

アレルギー性結膜炎は、アレルゲンとIgEそして肥満細胞や好塩基球が関与するI型(即時型)アレルギー反応により生じ、花粉症、通年性アレルギー性結膜炎、春季カタルなどがこれに含まれる。現在までこの病態に対する局所療法としては、ステロイド点眼の他には、肥満細胞の脱顆粒を抑制するものとしてグロモクリク酸ナトリウム、あるいは抗ヒスタミン作用のある点眼薬などが用いられている。最近、immunophilin ligandに図2に示すような作用、即ち、ラットのbasophilic leukemia cell lineにおけるIgE receptorを介するシグナル伝達を阻害し脱顆粒を抑制し、ヒスタミンやセトロニンの分泌を抑制する作用が発見され²⁴⁾²⁵⁾、その*in vivo*の効果にも関心が集まりつつある。我々の今回の受身型アレルギー性結膜炎モデルを用いた研究は、immunophilin ligandがI型アレルギー反応を*in vivo*でも抑制することを示した最初の報告である。FK 506点眼治療は、ラットのアレルギー性結膜炎の臨床所見を抑制し、局所での肥満細胞の脱顆粒も抑制する効果がみられ、これらの作用はベータメサゾン点眼薬やDSCG点眼薬よりも強力であり、臨床応用できる薬理効果はあるものと考えられる。毒性、安全性が十分に検討されれば、immunophilin ligandの点眼は重症のアレルギー性結膜炎、特に春季カタルなどに対して臨床用いられる可能性があるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、三島濟一東京大学名誉教授、増田寛次郎東京大学教授、Igal Gery博士(米国国立眼研究所、NEI)、Robert B. Nussenblatt博士(NEI, Clinical Director)、Jin H. Kinoshita博士(元NEI, Scientific Director)の恩師の先生方の長年にわたるご指導とはげましに心から感謝の意を表します。また、研究の遂行にあたり協力していただいた多くの方々、特に、小竹三津子、石井康男、嘉村ゆかり、内藤雅子、古賀公子の諸氏の協力を謝意を表します。

文 献

- 1) Werzig R, Hooks JJ, Percopo CM, Nussenblatt RB, Chao-Chan C: Anti-Ia antibody diminishes ocular inflammation in experimental autoimmune uveitis. *Curr Eye Res* 7: 809-818, 1988.
- 2) Whitecup SM, Wakefield D, Li Q, Nussenblatt RB, Chao-Chan C: Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in endotoxin induced. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2626, 1992.
- 3) Roberge FG, Lorberboum-Galski H, Le Hoang P, de Smet M, Chao-Chan C, Fitzgerald D, et al: Selective immunosuppression of activated

T cells with the chimeric toxin IL-PE40. *J Immunol* 143: 3498-3502, 1989.

- 4) Beraud E, Kotake S, Caspi RR, Oddo SM, Chao-Chan C, Gery I, et al: Control of experimental autoimmune uveitis by low dose T cell vaccination. *Cell Immunol* 140: 112, 1992.
- 5) Nussenblatt RB, Caspi RR, Mahdi R, Chao-Chan C, Roberge F, Lider O, et al: Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J Immunol* 144: 1689-1695, 1990.
- 6) Mochizuki M, Nussenblatt RB, Kuwabara T, Gery I: Effects of cyclosporine and other immunosuppressive drugs on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 226-232, 1985.
- 7) Fujino Y, Okumura A, Nussenblatt RB, Gery I, Mochizuki M: Cyclosporine-induced specific unresponsiveness to retinal soluble antigen in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Immunol Immunopathol* 46: 234-248, 1988.
- 8) Kawashima H, Fujino Y, Mochizuki M: Effects of a new immunosuppressive agent, FK506, on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1265-1271, 1988.
- 9) Mochizuki M, Kawashima H: Effects of FK506, 15-deoxyspergualin, and cyclosporine on experimental autoimmune uveoretinitis in the rat. *Autoimmunity* 8: 37-41, 1990.
- 10) Kawashima H, Mochizuki M: Effects of a new immunosuppressive agent, FK506, on the efferent limb of the immune responses. *Exp Eye Res* 51: 565-572, 1990.
- 11) Mochizuki M, Masuda M, Sakane T, Inada G, Ito K, Kogure M, et al: A multicenter clinical open trial of FK506 in refractory uveitis, including Behçet's disease. *Transpl Proc* 23: 3343-3346, 1991.
- 12) Handshumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ: Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547, 1984.
- 13) Gunter KC, Irving SG, Zipfel PF, Siebenlist U, Kelly K: Cyclosporin A-mediated inhibition of mitogen-included gene transcription is specific for the mitogenic stimulus and cell type. *J Immunol* 142: 3286-3291, 1989.
- 14) Siekierka JJ, Staruch MJ, Hung SHY, Sigal NH: FK506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is

- distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin. *J Immunol* 143: 1580—1583, 1989.
- 15) **Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, Kwok P, Dumont F, Lin S, et al:** The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 143: 718—726, 1989.
 - 16) **Siekierka JJ, Hung SHY, Poe M, Lin CS, Sigal NH:** A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341: 755—757, 1989.
 - 17) **Fisher G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX:** Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical protein. *Nature* 337: 476—478, 1989.
 - 18) **Bierer BE, Somers PK, Wandless TJ, Burakoff SJ, Schreiber SL:** Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligands. *Science* 250: 556—559, 1990.
 - 19) **Schreiber SL:** Chemistry and biology of the immunophilin and their immunosuppressive ligands. *Science* 251: 283—287, 1991.
 - 20) **Kahan BD:** Renal transplantation. In: Kahan BD (Ed): *Cyclosporine*. Grune & Stratton, Orlando, 297—310, 1988.
 - 21) **Bach JF:** Cyclosporine in autoimmunity. In: Kahan BD (Ed): *Cyclosporine. Applications in Autoimmune Diseases*. Grune & Stratton, Orlando, 379—381, 1988.
 - 22) **Fung J, Abu-Elmagd K, Jain A, Gordon R, Tzakis A, Todo S, et al:** A randomized trial of primary liver transplantation under immunosuppression with FK506 vs cyclosporine. *Transpl Proc* 23: 2977—2983, 1991.
 - 23) **Shapiro R, Jordon M, Scantleburg V, Fung J, Jensen C, Tzakis A, et al:** FK506 in clinical kidney transplantation. *Transpl Proc* 23: 3065—3067, 1991.
 - 24) **Hultsch T, Albers MW, Shreiber SL, Hohman RJ:** Immunophilin ligands demonstrate common features of signal transduction leading to exocytosis or transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6229—6233, 1991.
 - 25) **de Paulis A, Cirillo R, Ciccarelli A, Condorelli M, Marone G:** FK506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human Fce RT⁺ cells. *J Immunol* 146: 2374—2381, 1991.
 - 26) 藤野雄次郎, 川島秀俊, 奥村敦司, 望月 學: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(その1). 網膜抗原の分離精製法と病原性について. *日眼会誌* 91: 498—508, 1987.
 - 27) **Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, Nussenblatt RB, Gery I:** Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1—9, 1985.
 - 28) **Herbort CP, Matsubara M, Nishi M, Mochizuki M:** Penetrating keratoplasty in the rat: A model for the study of immunosuppressive treatment of graft rejection. *Jpn J Ophthalmol* 33: 212—220, 1989.
 - 29) **Claman NH:** Corticosteroids and lymphoid cells. *New Engl J Med* 287: 388—397, 1972.
 - 30) **Fung JJ, Alessiani M, Abi-Elmadg, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, et al:** Adverse effects associated with the use of FK506. *Transpl Proc* 23: 3105—3108, 1991.
 - 31) **Jain AB, Fung JJ, Venkataramanan RV, Todo S, Alessiani M, Starzl TE:** FK506 dosage in human organ transplantation. *Transpl Proc* 22: 23—24, 1990.