

Thesis

フローサイトメトリーを用いた新たな移植後
免疫モニタリング法に関する基礎研究

埼玉医科大学消化器・一般外科 (I)

(指導：小山 勇教授)

浅野 博

New Monitoring Method Using Flow Cytometry For Evaluating Immunosuppression in Transplant Patients with Multiple Combination Therapy

Hiroshi Asano (Division of Gastroenterological and General Surgery, Department of Surgery, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

The combination therapy of calcinurin inhibitor (CNI), and inhibitor of nucleic acid production, has been widely utilized in clinical kidney transplantation. Mycophenolate mofetil (MMF) has a strong immunosuppressive effect as compared with azathioprine. As a result, over immunosuppression is often experienced under the combination therapy of MMF and CNI. It is very difficult to adjust each immunosuppressive drug without knowing how much the immunosuppression and how much each drug affects the immunosuppression. The method of monitoring the immunosuppression has not yet become available for transplant patients under the combination therapy. We investigated the usefulness of flow cytometry of the lymphocyte stimulation test under the immunosuppressive drug in vitro. The peripheral blood from four healthy volunteers was separated by density gradient centrifugation. After lymphocytes were dyed with 5(and 6) -carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), cells were cultured with Staphylococcus enterotoxin B (SEB) for 4 days under the Mycophenolic acid (MPA) and/or Cyclosporine (CsA) in various concentrations. After cultured, Division Index (DI) was measured by FACS, and Stimulation Index (SI) was calculated using DI. From a series of multiple concentrations of MPA or CsA, SI 25, 50 and 75 of MPA groups were 54, 18 and 6 ng/ml, and SI 25, 50 and 75 of CsA groups were 250, 100 and 30 ng/ml. We defined the medium concentration of each drug as MPA 30 ng/ml and CsA 100 ng/ml, then 1/5 of these results as low concentration and concentration 5 times as high (setting up MPA: 6, 30 and 150 ng/ml, and CsA: 20, 100 and 500 ng/ml). The mean S.I. of MPA group was 71.27 ± 11.55 at 6 ng/ml, 23.63 ± 13.44 at 30 ng/ml and 4.87 ± 1.33 at 150 ng/ml. The mean S.I. of CsA group were 78.02 ± 9.05 at 20 ng/ml, 44.14 ± 4.89 at 100 ng/ml and 16.51 ± 5.17 at 500 ng/ml. At the combination of low doses of CsA and MPA, S.I. was 61.03 ± 8.03 . The addition of a medium dose of MPA to the low dose of CsA decreased S.I. to 12.23 ± 0.75 , which is almost the same result of the high dose of CsA group. These results have us conclude that the dose of CsA could be decreased when the medium dose of MMF is combined with CsA treatment. In addition, patterns of the histogram in Flow cytometry found that there were differences between CsA and MPA, leading to a better understanding as to which drug contributed to the over- immunosuppression.

Keywords: Flow cytometry, Monitoring of immunosuppression, Mycophenolic acid, cyclosporine A, CFSE

緒 言

臓器移植における免疫抑制はカルシニューリン阻
医学博士 甲第 853 号 平成 15 年 3 月 28 日 (埼玉医科大学)

害薬 (calcinurin inhibitor: CNI) を中心に、核酸合成阻
害薬などを併用する多剤併用療法が一般的である。
最近、核酸合成阻害剤であるミコフェノール酸誘導
体のミコフェノレート・モフェチル (Mycophenolate

mofetil: MMF) が新たに導入され、以前のアザチオプリンに代わって使用されるようになった。核酸合成阻害剤である MMF は Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) を選択的に抑制するため比較的副作用が少なく、十分な投与が可能になった。それにより強い免疫抑制効果が得られるようになり^{1, 2)}、拒絶反応の出現率は減少し、移植成績の向上が見られている (Table 1)³⁻⁵⁾。しかし、カルシニューリン阻害剤との併用によって、過剰な免疫抑制状態が惹起される例も少なくない。実際に、免疫過剰によると思われる感染症の出現率がアザニンと比較して多くなっている (Table 2)⁶⁾。

免疫状態のモニタリング法として、シクロスポリン (Cyclosporine: CsA) (Fig. 1A)⁷⁾ やタクロリムスなどの CNI では、血中薬物濃度 - 時間曲線下面積 (area under curve: AUC)、投与 2 時間後の薬物血中濃度 (C2) および投与前血中濃度 (トラフ値) などが利用されているが^{8, 9)}、これらは単に血中濃度を測定しているにすぎず、免疫状態を直接測定しているわけではない。また、核酸合成阻害剤としての MMF (Fig. 1B)¹⁰⁾ やアザチオプリンに関しては薬理動態の違いからモニタリングの指標がないのが現状である¹¹⁻¹⁶⁾。実際の診療においては MMF 投与量を固定し、CNI の血中濃度や、患者の臨床経過や移植臓器の生検などにより拒絶反応の有無をもって判断しているのが現状である。

一方、直接に免疫状態を測定する方法として、移植後の患者リンパ球を用いたリンパ球刺激試験や混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction: MLR) がある。これらの検査は、多種の免疫抑制剤により影響を受けているリンパ球を分離して、その免疫反応をみているため、併用薬剤による免疫抑制の効果を総括的に知ることができる特徴がある。一般的には、³H thymidine uptake 法が行われている。これは、細胞周期の S 期 (DNA 合成期) において選択的に取り込まれることを利用し、最終的に分裂増殖した細胞に取り込まれた ³H の量を測定している。客観的量的評価方法として優れているが、培養後の細胞数を単純に測定しているため、実際にどの細胞が増加したのか (T cell・B cell・マクロファージなのか)、何回細胞分裂したのか、また、どの薬剤が直接作用した結果なのかは全く推測する事ができず、どの薬剤を増量もしくは減量すべきなのかを判断するのは難しい。

しかし、放射性同位元素の代わりに蛍光色素である CFSE (5 (and 6) -carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester) を用いたフローサイトメトリー¹⁷⁻¹⁹⁾ によるリンパ球培養試験は細胞分裂パターンを判定することができる。CFSE¹⁷⁻¹⁹⁾ の特徴は、細胞核内の plasmid に取り込まれ、細胞分裂の際に均等に分配される。同様に色素としての intensity も均等に分配される。これは、1 回目の細胞分裂で intensity

Table 1. MMF 及び AZA の急性拒絶反応出現率

	MMF				AZA
	1.0g群	2.0g群	3.0g群	4.0g群	1mg/kg
国内	75%	44.4%	20.3%	0%	
アメリカ		19.8%	17.5%		38.0%
ヨーロッパ		17.0%	13.8%		46.4%

Table 2. MMF 及び AZA の副作用出現率

	AZA	MMF2.0g	MMF3.0g
Infections(%)			
CMV	6	7	11
Herpes simplex	24	21	25
Hematologic(%)			
Leukopenia	30	19	35
Anemia	10	15	9
Gastrointestinal(%)			
Diarrhea	17	28	31
Nausea	20	14	20

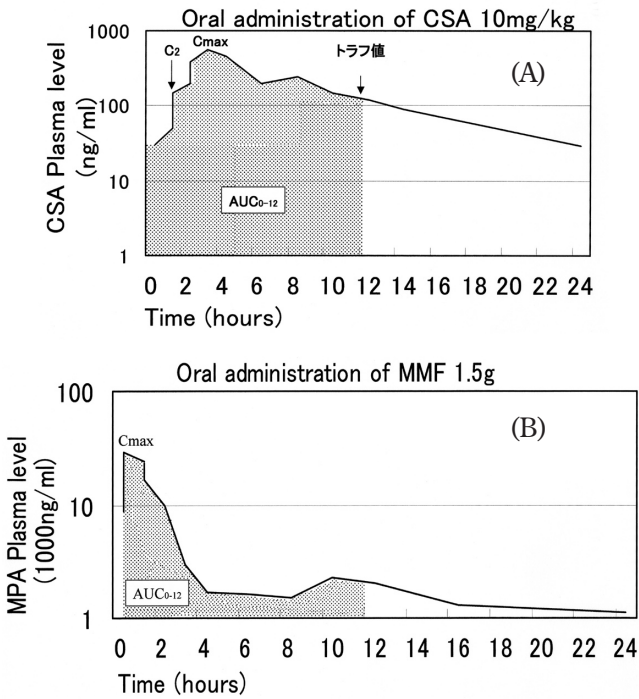


Fig. 1.(A)CsA10 mg/kg 経口投与時の血中濃度の変化。投与後約 2 時間で Cmax となりその後なだらかに低下する。(B)MMF1.5 g 経口投与時の血中濃度の変化。投与後速やかに Cmax となりその後急激に低下する。

は 1/2 に減少し、2 回分裂すれば intensity は 1/4, 3 回分裂で 1/8, 4 回で 1/16 にと順々に減少していく (Fig. 2). この特徴を利用するとフローサイトメトリーのヒストグラム から T cell の細胞分裂の回数と実際に分裂している細胞数を visual にて観察し、併用免疫抑制効果をより詳細に分析することが可能となりうる (Fig. 3). MMF はミコフェノール酸 (Mycophenolic acid:MPA) のプロドラッグであり、経口投与後速やかに加水分解され MPA として作用し、活性化 T cell を選択的に抑制する²⁾. 今回、併用投与時における免疫抑制効果を検討するにあたり、免疫抑制剤として MPA と CsA を使用し、マイトージェン刺激下のヒトリンパ球に対する薬剤濃度依存性の細胞分裂抑制状態をフローサイトメトリーで検討し、評価したので報告する.

対象と方法

健常男性 4 人 (29~34 歳) を対象にインフォームドコンセントを得た後に計 50 回採血し検体ごとに培養実験を行った. ヘパリン下末梢血を各 20 ml 採取し HISTOPAQUE-1077 (SIGMA 社) を用いた比重遠心法により単核細胞を分離した. 抗 CD3 抗体 (SIGMA 社) を用いたフローサイトメトリー (Becton Dickenson 社, マッキントッシュ社 Cell Quest software) により T cell が 80~90% 含まれていることを確認した. 分離細胞を検体ごとに 5 nM CFSE (Molecular Probes, Eugene 社) 5 μ l/ 1×10^6 の濃度で 5 分間恒温槽で染色した後に 24 well の培養皿に 1 well 当たり 2×10^6 個の細胞を RPMI-1640 (ライフテックオリエンタル社), ヒト AB 型アルブミン (SIGMA 社) 300 μ l, リンパ球刺激剤および免疫抑制剤を加え計 2 ml に設定した. 37°C, 5% CO₂, 湿度 95% 条件下にて

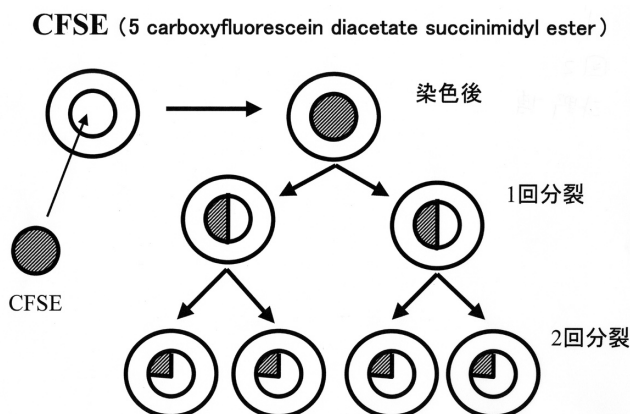


Fig. 2. FITC 蛍光色素である CFSE は、細胞核内の plasmid に取り込まれ、細胞分裂の際に均等に分配される. 同様に色素としての intensity も均等に分配される. 1 回目の細胞分裂で intensity は 1/2 に減少し、2 回分裂すれば intensity は 1/4 にと順々に減少していく.

4 日間細胞培養した. リンパ球刺激剤としては T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を選択的に刺激する Staphylococcus enterotoxin B (SEB) (SIGMA 社) を 100 ng/ml の濃度で使用した²⁰⁻²²⁾. 培養後の細胞を回収しフローサイトメトリーにより分裂細胞を測定した. 細胞増殖能の評価法は R. Angulo ら¹⁷⁾ の文献を参考に細胞分裂指数 (Division Index: DI) を測定することにより行った (Fig. 4). また、それぞれの細胞培養の条件を一定にするために刺激指数 (Stimulation Index: SI) を算出 (Fig. 5) した. SI は、SEB に加え各条件下におけ

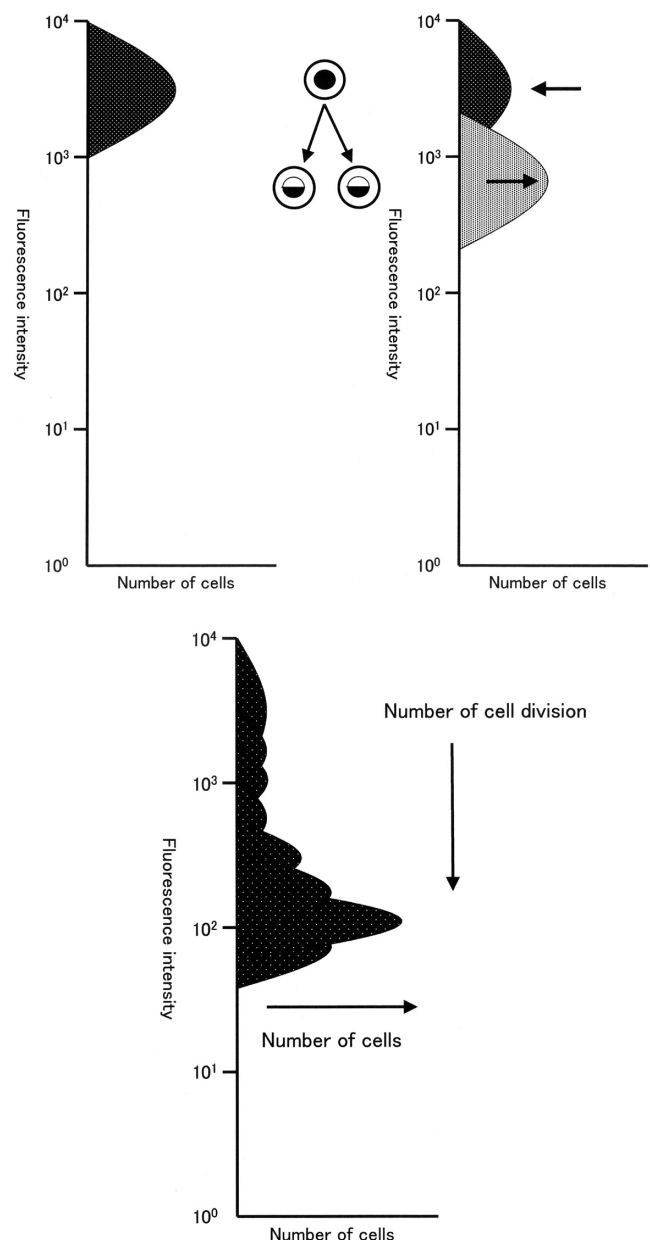


Fig. 3. (A) 左の図は分裂前のヒストグラムである. リンパ球が分裂すると intensity の低いピークが形成され、分裂前のピークは低くなる. (B) 更に分裂が進むとピークの位置が intensity の低い方向に変移していく. ピークの高さは細胞数を示し、ピークの数分裂回数を示している.

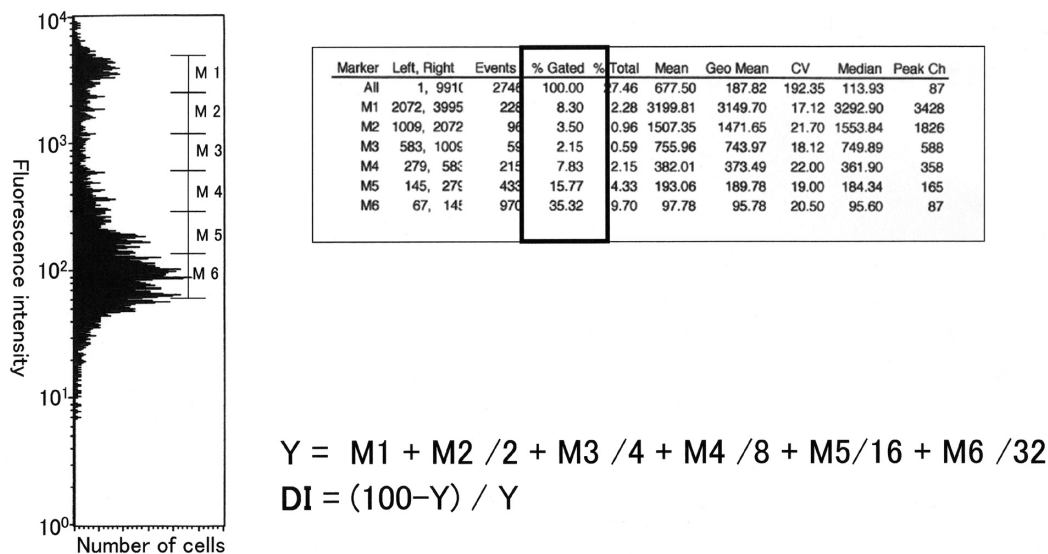


Fig. 4. それぞれのピークを図のようにマーキングしその範囲に含まれる細胞数の割合を M1～6 とし分裂指数 (Division Index: DI) を算出した。

$$SI = \frac{DI (MPA+CsA+SEB)}{DI (SEB \text{ only})} \times 100$$

Fig. 5. 刺激指数 (Stimulation Index: SI).

る免疫抑制剤添加培養時の DI を, SEB 単独刺激時の DI で除し, その結果の百分率と定義した. SI は T cell の分裂能を表している. この SI を指標として MPA, CsA の単独および併用培養時の細胞分裂抑制の状態を評価した.

薬剤投与の効果は以下の群に分けて検討した.

対照群: 薬剤を投与しない群.

SEB 単独群: 免疫抑制剤を添加せず SEB 100 ng/ml のみによる刺激培養をした群.

MPA 群: 文献上では MPA の T cell に対する 50 % 抑制濃度は 6 ~ 30 ng/ml であること^{2, 10, 16, 23, 24)} から, MPA 単剤による有効薬剤抑制濃度を 30 ng/ml と設定し, これを中等濃度とした. これを基準とし 2 倍, 4 倍, 5 倍, 8 倍, 10 倍と濃度設定を行ったところ 5 倍以上で細胞分裂の差が認められたため, 中等濃度の 1/5 の MPA 濃度を低濃度, 5 倍の MPA 濃度を高濃度と設定した. すなわち MPA の低濃度は 6 ng/ml, 高濃度は 150 ng/ml である.

CsA 群: CsA の臨床的トラフ値が 100 ng/ml であること, また T cell に対する 50 % 抑制濃度は 50 ng/ml 前後であることから, CsA 単剤による有効薬剤抑制濃度を 100 ng/ml と設定^{7-9, 25)} しこれを中等濃度とした. MPA の場合と同様に中等濃度の 1/5 の CsA の濃度を低濃度, 5 倍を高濃度と設定した. すなわち CsA の低濃度は 20 ng/ml, 高濃度は 500 ng/ml である.

MPA・CsA 併用群: 上記設定における CsA および MPA の低・中等・高濃度を各濃度別に組み合わせ, 9 通りの併用投与を設定した.

結 果

1) MPA および CsA の各濃度における DI の測定と SI の計測

両薬剤の単剤による濃度別 DI を測定し, グラフ化した (Fig. 6). SEB 単独刺激時の DI の平均は 7.2 であった. このグラフより MPA および CsA 単剤抑制時の SI 25・SI 50・SI 75 を計測したところ, MPA では 54・18・6 ng/ml, CsA では 250・100・30 ng/ml であった.

2) MPA および CsA 投与群における各濃度別ヒストグラム

両薬剤の濃度別細胞分裂像を実際のヒストグラムにて表す. ヒストグラムでは横軸は細胞数, 縦軸は intensity を表しており, 細胞分裂に伴いヒストグラムのピークは下方に変移する. 細胞分裂の回数ピークの数で表され, 分裂した細胞数はピークの高さで表される. CsA 投与群では高濃度になるほど分裂した細胞数が減少している (Fig. 7). また逆に MPA 投与群では高濃度になるほど分裂回数が減少している. これによって結果的にそれぞれ DI が減少している (Fig. 8).

3) MPA, CsA の混合投与下における SI とヒストグラムによる免疫抑制剤の効果判定

SEB 単独群, MPA 群, CsA 群および MPA と CsA の併用群における各濃度別 SI を Table 3 に示す. CsA 単独投与では 20 ng/ml は 78.02 ± 9.05 , 100 ng/ml は 44.14 ± 4.89 , 500 ng/ml は 16.51 ± 5.17 であった. MPA を併用することにより CsA 低濃度でも MPA 低濃度併用により 61.03 ± 8.03 , MPA 中等濃度併用で 12.23 ± 0.75 まで低下した. これは CsA 高濃度単独よりさらに

強く抑制されていることを示す結果であった。これらの1例をヒストグラムで示す (Fig. 9)。低濃度のMPA 6 ng/ml と中等濃度のCsA 100 ng/ml の組み合わせではSIは40.25であるが同じMPA 6 ng/ml に高濃度のCsA 500 ng/ml を組み合わせると細胞分裂の回数は変化せず細胞数が減少しSIは19.26に低下した。一方、低濃度のCsA 20 ng/ml に中等度のMPA 30 ng/ml を組み合わせると各ピークの細胞数は減少せず分裂回数が減少し、SIは14.22まで低下した。これらの結果よりCsAを増量するのに比べMPAの増量により確実にSIが低下し、細胞分裂能は抑制されていることが確認できる。またヒストグラムより細胞分裂能の抑制にMPAがより強く

関与していると判断できる結果であった。

考 察

臓器移植後の維持免疫抑制療法は、IL-2産生を抑制するCNIとT cellおよびB cellの両者の細胞分裂を抑制する核酸合成抑制剤、およびステロイドの3剤による併用療法が一般的である。免疫状態を測定する方法として、移植後の患者リンパ球を用いたリンパ球刺激試験や混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction: MLR) があり、一般的には、 $[^3\text{H}]$ thymidine uptake法が行われている。これは、客観的量的評価方法として優れているが、どの薬剤が直接作用した結果なのか

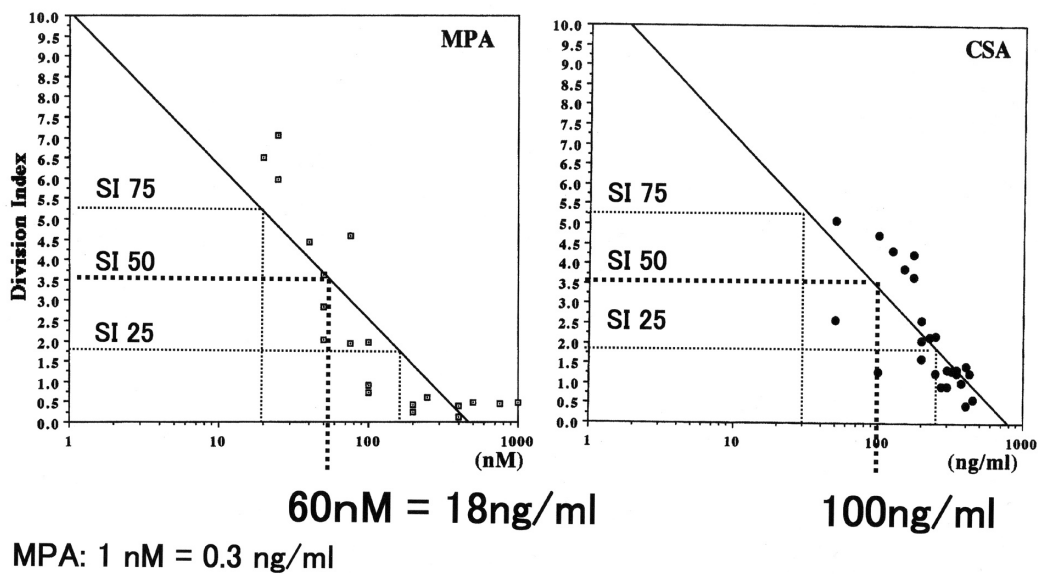


Fig. 6. 両薬剤の単剤による濃度別DIを測定し、グラフ化した。SEB単独刺激時のDIの平均は7.2であった。このグラフよりMPAおよびCsA単剤抑制時のSI 25・SI 50・SI 75を計測したところ、MPAでは54・18・6 ng/ml, CsAでは250・100・30 ng/mlであり、SI50は文献上の数値と一致した。

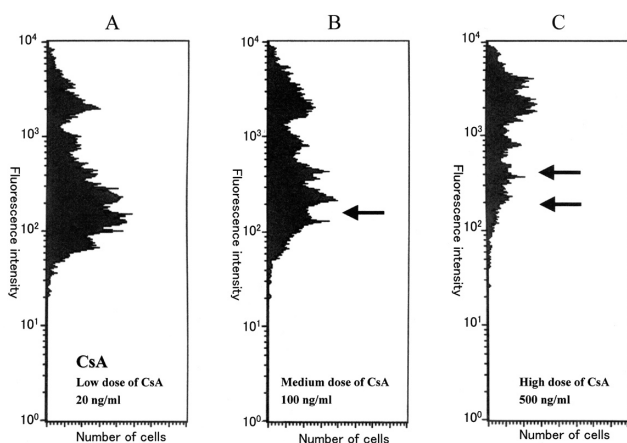


Fig. 7. CsA濃度別細胞分裂像のヒストグラム。(A) 低濃度CsA。(B) 中濃度CsA。細胞数の減少を認める。(C) 高濃度CsA。さらに細胞数が減少しておりこれによって、それぞれDIが減少している。

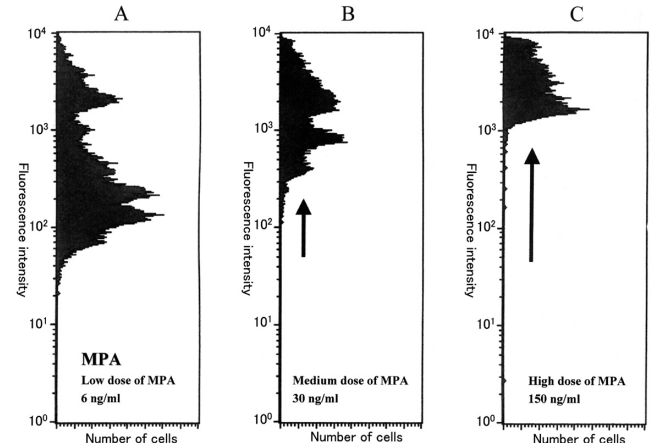


Fig. 8. MPA濃度別細胞分裂像のヒストグラム。(A) 低濃度MPA。(B) 中濃度MPA。分裂回数の減少を認める。(C) 高濃度MPA。さらに分裂回数が減少しておりこれによって、それぞれDIが減少している。

Table 3. SEB 単独群, MPA 群, CsA 群および MPA と CsA の併用群における各濃度別 SI

		MPA (ng/ml)			
		0	6	30	150
CsA (ng/ml)	0	100 ± 0	71.27 ± 11.55	23.63 ± 13.44	4.87 ± 1.33
	20	78.02 ± 9.05	61.03 ± 8.03	12.23 ± 0.75	4.03 ± 1.44
	100	44.14 ± 4.89	39.41 ± 2.43	8.23 ± 2.66	3.97 ± 1.33
	500	16.51 ± 5.17	16.37 ± 6.66	7.03 ± 1.12	3.57 ± 1.33

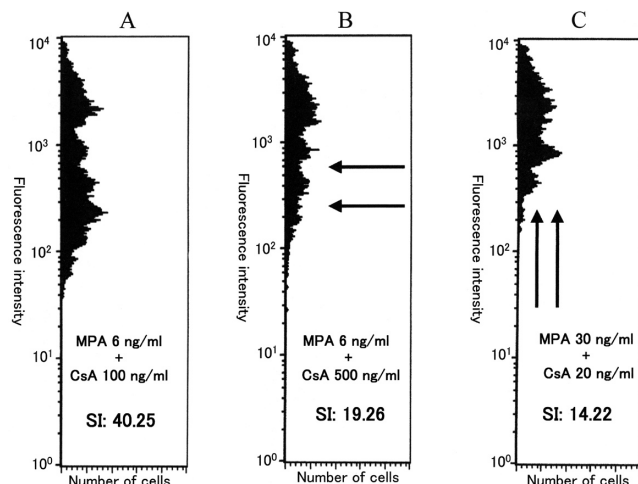


Fig. 9. (A) 低濃度 MPA と中等濃度 CsA の組み合わせでは SI は 40.25 であるが, (B) 同じ低濃度 MPA に高濃度 CsA を組み合わせると細胞分裂の回数は変化せず細胞数が減少し SI は 19.26 に低下した. (C) 一方, 低濃度 CsA に中等度 MPA を組み合わせると細胞数は減少せず分裂回数が減少し, SI は 14.22 まで低下した.

は全く推測する事ができず, どの薬剤を増量もしくは減量すべきなのかを判断するのは難しい. そのため, 多くの場合は薬剤血中濃度モニタリングの可能な CNI の投与量を調節する以外に方法はなく, 患者の臨床経過や移植臓器の生検などにより拒絶反応の有無をもって判断しているのが現状である.

今回の実験の目的は, 移植免疫の主役である T cell の分裂増殖状態が免疫抑制剤併用投与下における CNI としての CsA の影響なのか, それとも核酸合成阻害剤である MMF の影響なのかを判断し, どちらの免疫抑制剤を増減させるかの目安となる検査方法を確立することである. 本研究では刺激として特異的ドナー抗原刺激が理想的であるが, 献腎移植のようにドナーがすでに存在しない場合を想定し, 同種特異的刺激に代わり T cell の表面受容体を選択的に刺激する SEB²⁰⁻²²⁾ を使用した. また細胞分裂能を測定する方法として本来癌細胞の悪性度を判定する際に使われる蛍光色素の CFSE を使用し, フローサイトメトリーのヒストグラムから T cell の細胞分裂の回数と実際に分

裂している細胞数を visual にて観察することが可能となった. また, 実用的にも [³H] ではなく CFSE を使用することにより放射性同位元素による被爆を避ける事が出来る. 細胞分裂指数としての Division index および Stimulation index を算出した. SI の結果だけでは [³H] thymidine uptake 法と同様に薬剤の特徴を確認することができないが, 実際に行われているヒストグラムを同時に比較することにより MMF と CsA の特徴を確認することができた. すなわち, MMF では細胞分裂自体が阻害されるために, ヒストグラムでは分裂回数を示すピークの数が増加する. 一方, CsA では, 細胞分裂自体が阻害されることはなく, IL-2 の阻害による増殖が抑えられるために, ヒストグラムでは, M1 から M7 まで幅広くひろがり, ピークの高さが低くなる. このことから MMF と CsA の作用をどちらが有意であるかを判断することが出来る. しかし, 今回の研究では, ヒストグラムのパターンを数量化して比較検討することまでは至らず今後の課題として残された.

今回の研究の結果から, 臨床での CsA のトラフ値を 100 ng/ml と考えると MPA : 6~30 ng/ml の範囲内に有効治療域があると推測される. 一方, MPA 30 ng/ml に匹敵する量の MMF 併用時では CsA の血中濃度を低下させても十分な免疫抑制効果が得られることが推測された. 国内³⁾の第 II 相試験データでは MMF の一日投与量を 1.0 g・2.0 g・3.0 g とし, 比較したところ急性拒絶反応の出現率は用量依存的に低下することが示された. また, 海外⁴⁻⁶⁾の二重盲検試験の結果でも同様に 2.0 g 以上で有意に拒絶反応が低下することが判明している. しかし, MMF 2.0 g と 3.0 g の MMF の比較では有意差は認められなかったことから, 臨床では MMF の投与は 2.0 g 前後で行われている. 現在, MMF の血中濃度のモニタリングは一般的に行われていないが, MMF 2.0 g 投与の血中の MPA トラフ値は 2~3 μg/ml 程度と報告されている. 従って, 臨床で投与されている MMF 濃度は, 本研究で行われた MPA 30 ng/ml の濃度よりかなり高いレベルであることが推測され, このような状況では, CsA の投与量をかなり減量することが可能とな

りうることが示唆された。CNIにMMFを併用することにより、確かに拒絶反応が減少したという報告は多いが、同時に感染症の合併が多くなっている。これはover immunosuppressionによるものであり、本研究により裏付けられたように、CsAの減量が必要であったと思われる。現在、CsAの投与量は血中濃度のモニタリングの結果により調節されているが、最適な血中濃度の指標はなく、経験的に投与量の調節が行われているのが現状である。本研究で示されたフローサイトメトリーによるリンパ球刺激試験の導入により、多剤併用を行っている個々の患者の免疫抑制状態がより詳細に評価でき、CyAの減量がより適切に行われるようになることが期待される。

今回の研究は、in vitroにおける実験であり、また健常人のT cellに対する刺激試験であるため、臨床での移植患者の生体内における免疫反応を正確に反映している訳ではなく、実験モデルとしての眼界がある。実際には多剤併用下でのTh1およびTh2サイトカインが関与することにより様々な免疫状態が起こり臓器移植が成立している。今後、培養液およびT cell中のメッセンジャーRNAとしてのサイトカインの測定やT cell以外の免疫担当細胞の関与についての検討が必要であると考えられた。

結 論

(1) フローサイトメトリーを用いたリンパ球刺激試験により、免疫抑制状態がより詳細に評価できるのみならず、そのパターンを調べることにより、MMFとCsAのどちらの薬剤がより免疫抑制効果に寄与しているかをある程度知ることが可能となった。

(2) 臨床において、MMFを十分量投与された症例ではCsAは少量でも十分な免疫抑制効果が期待できることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御助力を賜りました埼玉医科大学消化器・一般外科学教室：小川展二講師および、同教室：小山 勇教授に深謝致します。並びに、実験に御協力頂いた埼玉医科大学中央研究施設形態部門：大島 晋先生に感謝致します。

参考文献

- 1) Allison AC, Kowalski WJ, Muller CD, Eugui EM. Mechanism of action of mycophenolic acid. *Ann NY Acad of Sci* 1993;696: 63-87.
- 2) Bullingham RES, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of Mycophenolate mofetil. *J Clin Pharmacol* 1998; 34: 429-55.
- 3) 高橋公太, 落合武徳, 打田和治. 腎移植患者におけるRS-61443 (Mycophenolate mofetil) の急性拒絶

反応抑制効果および安全性の検討 - 前期第Ⅱ相試験 -. 移植 1997; 32: 135-46.

- 4) Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995; 60: 225-32.
- 5) European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 345: 1321-5.
- 6) The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1029-37.
- 7) Gupta SK, Monfro RC, Tomlanovich SJ, Gambertoglio JG, Garovoy MR, Benet LZ. Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1990; 30: 643-53.
- 8) Adams DH, Wang LF, Neuberger JM, Elias E. Inhibition of leukocyte chemotaxis by immunosuppressive agents. Specific inhibition of lymphocyte chemotaxis by cyclosporine. *Transplantation* 1990; 50: 845-50.
- 9) Aweeka FT, Tomlanovich SJ, Prueksaritanont T, Gupta SK, Benet LZ. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered cyclosporine in pre-kidney transplant patients. *Transplantation* 1994; 34: 60-7.
- 10) Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 315-24.
- 11) Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of Mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 62: 666-72.
- 12) Shaw LM, Mick R, Nowak I, Korecka M, Brayman KL. Pharmacokinetics of Mycophenolic acid in renal transplant patients with delayed graft function. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 268-75.
- 13) Bullingham RES, Nicholls AJ, Hale M. Pharmacokinetics of Mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant Proc* 1996; 28: 925-9.
- 14) Shaw LM, Korecka M, Breeman RV, Nowak I,

- Brayman KL. Analysis, pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of Mycophenolic acid. 1998; 31: 323-8.
- 15) Nicholls AJ. Opportunities for therapeutic monitoring of Mycophenolate mofetil dose in renal transplantation suggested by the pharmacokinetic / pharmacodynamic relationship for Mycophenolic acid suppression of rejection. Clin Biochem 1998; 33: 329-33.
- 16) 今村 亮一, 客野 宮治, 中村 隆幸, 細坪 秀夫, 矢澤 浩治, 田中 俊之, 他. 腎移植後ミコフェノール酸モフェチル (MMF) 使用症例における TDM の有用性に関する検討 (第 1 報). 今日の移植 2001; 14: 492-7.
- 17) Angulo R, Fulcher DA. Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling of T cell, Thymidine incorporation and CD69 expression. Cytometry 1998; 34: 143-51.
- 18) Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cell and induction of peripheral allograft tolerance. Nat Med 1999; 5: 1298-302.
- 19) Nitta Y, Nelson K, Andrews RG, Thomas R, Gaur LK, Allen MD. CFSE dye dilution mixed lymphocyte reactions quantify donor-specific alloreactive precursors in non-human primate cardiac graft rejection. Transplant Proceed 2001; 33: 326-39.
- 20) Pham-Huy C, Galons H, Voisin J, Zhu J, Righenzi S, Warnet JM, et al. In vitro and in vivo immunosuppressive potential of thalidomide and its derivative, N-hydroxythalidomide, alone and in combination with cyclosporine A. Int J Immunopharmac 1997; 19: 289-96.
- 21) McLeod JD, Walker LSK, Patel YI, Boulougouris G, Sansom DM. Activation of human T cells with superantigen (Staphylococcal enterotoxin B). J Immunol 1998; 160: 2072-9.
- 22) Sano S, Matsui Y, Itami S, Yoshikawa K. Immunological study on CD3 defective cutaneous T cell lymphoma cells from a patient with Sezary syndrome. Clin Exp Immunol 1998; 113: 19-97.
- 23) Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. Scand J Immunol 1991; 33: 161-73.
- 24) Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. Clin Chem. 1995; 41: 1011-7.
- 25) Vathsala A, Chou TC, Kahan BD. Analysis of the interactions of immunosuppressive drugs with cyclosporine in inhibiting DNA proliferation Transplantation 1990; 49: 463-72.