

RSR、HR 80 bpm

心エコー：

A弁：3尖、弁尖軽度硬化あり、AS(-)、AR:trivial、その他の弁に器質的異常なし。MR trivial、TR trivial、PASP 28 mmHg。PH (-)。LV：内径異常なし、心尖部側は肉柱発達(+)、wall motion異常なし、明らかなasynergy(-)。LA拡大あり、(LAV 97.5 ml、LAVI 56 ml/m2)

呼吸機能検査：

FE1.0%；87.38(%)、%VC；103.4(%)、Shunt率；9(%)、DLCO；12.65(%)

血液ガス：

PO<sub>2</sub>：86.2,PCO<sub>2</sub>：33.3,pH：7.467, BE：0.8, SpO<sub>2</sub>：97.7,H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>：23.8 (Room air)

PO<sub>2</sub>：539.0,PCO<sub>2</sub>：29.8,pH：7.551,BE：3.9,SpO<sub>2</sub>：100,H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>：26.1 (FiO<sub>2</sub>=1.0)

胸部XP：

骨軟部陰影に異常なし。CPA: sharp,

CTR；46.3(%)

腹部XP：右上腹部に大きさ10 mm程度の円形の陰影を複数認め、胆嚢結石の所見です。異常腸管ガス(-)

腹部エコー：

肝表面は凹凸不整、辺縁は鈍化、右葉の萎縮あり、肝硬変の所見。肝実質内エコー輝度は不均一。肝内腫瘍なし。肝内胆管の拡張なし。脾臓は130.9 mm×49.3 mmで脾腫あり。胆嚢内に複数の結石像あり。胆嚢結石の所見。門脈は求肝性。門脈本幹14.6 mm。

腹部CT：

肝臓は著明に萎縮し、表面の凹凸不整、辺縁は鈍化し、肝硬変の所見。脂肪肝なし。肝内に明らかな腫瘍陰影を認めない。胆嚢内に大きさ19 mmを最大としたhigh densityな陰影を複数認め、胆嚢結石の所見。総胆管内には結石を示唆する所見を認めない。肝臓表面から、骨盤内まで広範囲にわたって腹水の貯

表8

		2012/1/17				
WBC	3700	3200 ↓	HBs Ag	(-)	AFP	3.1
RBC	3.24 ↓	2.64 ↓	HBs Ab	(-)	AFP-L3	
Hb	11.1 ↓	9.5 ↓	HBe Ag	0.6	CEA	10.9 ↑
HCT	32.1 ↓	26.3 ↓	HBe Ab	8.1	CA 19-9	26.5
PLT	4.8 ↓	4.0 ↓	HBc Ab	(-)	PIVKA-II	14
不規則抗体	-		HBc Ab 200倍希釈		DUPAN-II	
PMN/Lymph			HB-DNA		Fe	111
PT	17.4 ↑	19.9 ↑	HCV Ab	(-)	フェリチン	114
PT-INR	1.55 ↑	1.64 ↑	HCV-RNA(定量)		S-Cu	86
APTT	52.3 ↑	52.7 ↑	HCV-RNA(定性)		U-Cu	3
HPT			HCV genotype		セルロプラスミン	
AT-III	23 ↓	24 ↓	HTLV- I	(-)	Zn	30
Fibrinogen	86 ↓	102 ↓	HIV	(-)	α-1アンチトリプシン	
FDP	12.5 ↑	3.0	TPHA	(-)	抗核抗体	80 ↑
TP	7.0	7.7	ガラス板		AMA	1/25
ALB	2.3 ↓	2.8 ↓	CMV IgG	(+)	AMA-M2	1/25
T-Bil	4.2 ↑	6.1 ↑	CMV IgM	(-)	RF	(-)
D-Bil	0.9 ↑		EBV IgG	(+)	ASO	
TTT	8.9 ↑		EBV IgM	(-)	CRP	0.62 ↑
ZTT	34.6 ↑		VZV IgG	(+)	ツベルクリン反応	
GOT	51 ↑	42 ↑	VZV IgM	(-)	IgG	2544 ↑
GPT	33	26 ↓	HSV IgG	(+)	IgM	59
LDH	348 ↑	325 ↑	HSV IgM	(-)	IgA	602 ↑
g-GTP	53 ↑	27	トキソIgG	1/25	IgE	544.9 ↑
ALP	1828 ↑		トキソIgM	1/25	CH-50	27.4 ↓
LAP	102 ↑		カンジダ抗原	(-)	C3	52 ↓
Ch-E	63 ↓		β-D グルカン	(-)	C4	9 ↓
T-Cho	92 ↓		FT3	1.97 ↓	尿糖	2+
TG	73		FT4	1.37	尿蛋白	(-)
HDL-Cho	44		TSH	1.91	尿沈査	
CPK	213		TgAb	11.33	尿比重	1.017
NH <sub>4</sub>	128 ↑	184 ↑	TPOAb	<0.05	尿中WBC/視野	2. 8
BUN	7 ↓	22	TRAb	<0.1	尿中RBC/視野	10. 8
Cr	0.55 ↓	0.74	FBS	120	便潜血	
24-Cer	103.5		HbA1		オルトトリジン	
UA	3.6		HbA1c	5.0	グアヤック	
Na	133 ↓	131 ↓	prealbumin	2.9 ↓	ラテックス	(+)
K	3.4 ↓	4.6	RBP	0.2 ↓	骨塩定量(BMD)	0.981
Cl	102	101	transferrin	163 ↓	T-score(対若年成人)	-1%
Ca	7.7 ↓	9.2	renin	8.0 ↑	Z-score	0%
Mg	1.5	2.0	aldosterone	1/25	オステオカルシン	
P	2.7	3.4	B2mg	2.11 ↑	s-PTH	
T-Amy	126	211 ↑	NAG/Cr	93.4 ↑	尿中NTx	
U-Amy			ICG15%			
胆汁酸	70.8 ↑					

留を認める。脾臓は長径14 cmと脾腫を認める。

動脈は、腹腔動脈→総肝動脈→固有肝動脈と分岐し、肝門部で左右に分岐。中肝動脈は左右両方の肝動脈より分岐。固有肝動脈5.0 mm、左肝動脈：2.0 mm、右肝動脈：4.0 mm。

門脈は、上腸間膜静脈と脾静脈が合流し、門脈本幹を形成。肝門部から肝内に流入し左右に分岐する。本幹15.0 mm、左枝：17.0 mm、右枝：9.0 mm。臍静脈は怒張し、肝直上で12 mm。脾腎短絡路あり。食道静脈瘤ははっきりとはdetectされない。IMV：4 mm。

静脈：左と中肝動脈が共通幹を形成。右は独立してIVCに流入する。共通幹12 mm。右肝静脈径 5 mm。4 mmの右下肝静脈あり。

#### 上部消化管内視鏡：

慢性胃炎あり。胃食道静脈瘤なし。

#### 大腸ファイバー：

上行結腸に憩室あり、全体に易出血性あり。

#### 胸部CT：

両側肺野に腫瘤影なし。明らかなリン

パ節腫大なし。

#### 頭部MRI：

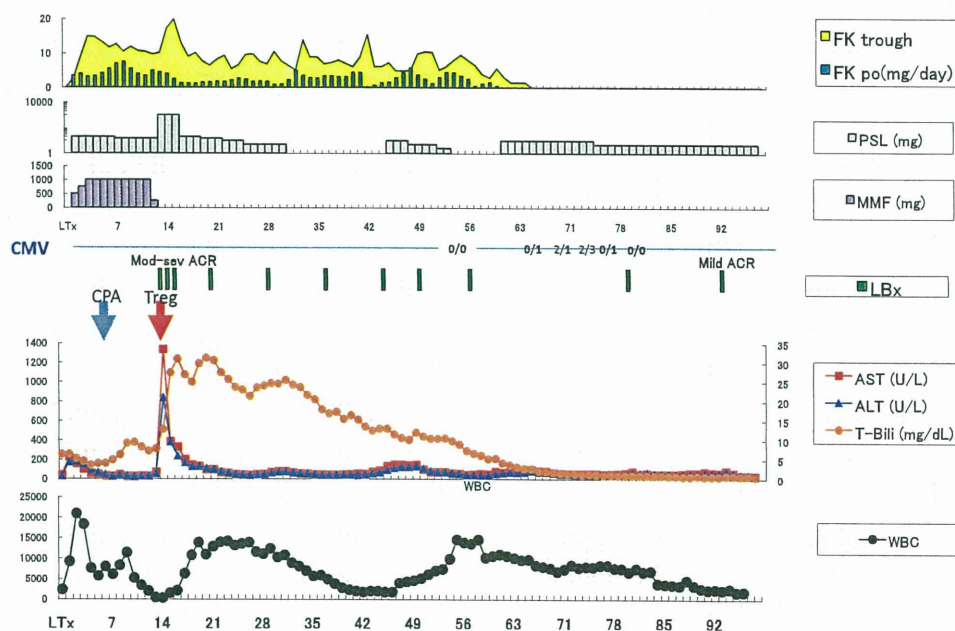
テント上の脳室及び脳溝の拡大あり。両側の淡蒼球・大脳脚、四丘体、中小脳脚にT1強調像にて信号の上昇を認め、慢性肝機能障害の所見。右放線冠、左側脳室体部外側、両側基底核に陳旧性脳梗塞の所見あり。左後部帯状回に陳旧性出血の所見あり。

移植手術：息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術（GV 520g、GV/SV = 42.7%）

術後経過：（図8）

術後はICUにて人工呼吸器下に全身管理を施行。呼吸・循環動態は安定し、グラフト機能は順調に回復。プロトコール通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始し、術後5日目にエンドキサン 40 mg/kg を投与した。プログラフは trough level 10-15 ng/ml で維持し、血清肝逸脱酵素値は順調に低下し、術後6日目にはほぼ正常値まで復した。エンドキサン投与により術後13日目にWBCは400 mm<sup>3</sup>まで低下し、セルセプトを中止

図8. 臨床経過(症例8)



した。同日、血清 AST/ALT 値が 1329/832 IU/L と急上昇し、肝生検を施行。Mod-severe ACR の所見に加え中心静脈周囲広汎の肝細胞脱落を認め、薬剤性肝障害も疑われた。予定通りに培養リンパ球を輸注したが、細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。Solumedrol 1g を 3 日間投与し、血漿交換を 3 日間行った。その後、血清肝逸脱酵素値は低下し、術後 3 週間日目にはほぼ正常値まで復した。ステロイドはプロトコールに従い漸減し、術後 30 日目に中止した。この間、免疫抑制はプログラフ単剤で trough 値 6-8 ng/ml で維持した。術後 39 日目に汎血球減少のため、GCV 予防投与を中止した。術後 41 日目より副腎不全の診断でステロイド MPS を 10 mg/day で再開し、症状軽快と共にステロイドを漸減した。術後 52 日目に中枢性無呼吸および不随意運動を認め MRI 施行。後頭頭頂葉に diffusion, FLAIR で高信号病変を指摘され PRES が疑われた。精査にて脳血管障害や感染症は否定的。FK 脳症は否定出来ない状況から、術後 60 日目にプログラフを中止し、ステロイド単剤 MPS 10 mg/day で免疫抑制を維持した。術後 65 日目に CMV antigenemia 陽性となり、GCV を再開、74 日目には MPS を 5 mg/day に減量した。CMV 感染は軽快傾向であったが、術後 78 日目に血清 AST/ALT 値が 54/45 IU/L と軽度上昇を認め肝生検を施行。Mild ACR の診断で solucortef 500 mg を投与し、ラパマイシン 1 mg/day を開始し、2 mg/day で維持した。術後 92 日目に cholangio-venus reflux による敗血症となりラパマイシンを中止、抗生剤・ $\gamma$ -globulin 投与を行い、感染は軽快した。現在、ラパマイシン 2 mg/day, MPS 10 mg/day で免疫抑制を維持しており、肝機能は安定している。神経症状も改善傾向に

あり、今後ネオーラルへのスイッチを考慮中である。

## D. 考察

昨年度より計 8 例の生体肝移植症例において本臨床試験を施行した。培養細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。周術期に 8 例中 3 例で急性拒絶反応が見られたが、2 例は免疫抑制剤を早期に完全中止していた際に拒絶を来しており、その程度も mild rejection で速やかにコントロール可能であり、以後は両症例とも拒絶反応を認めず肝機能は安定して推移し、プロトコールに則した免疫抑制剤の減量が可能となっている。もう 1 例は、術後 13 日目に非常に激しい肝障害を併発し、肝生検病理組織像で血管内皮炎を伴う炎症性細胞浸潤に加え、中心静脈周囲の広汎な肝細胞脱落が認められ、拒絶反応だけで無く薬剤性肝障害が疑われたが、原因薬剤の特定は困難であった。この症例では、PRES 脳症も併発し tacrolimus の関与が否定できない所見であったため、脳症出現以降には tacrolimus 中止ならびに sirolimus へ免疫抑制剤の変更を余儀なくされ、この間に mild ACR を来している。他の 5 例については全く拒絶反応を認めていない。

本プロトコールでは術後 6 ヶ月から積極的に tacrolimus または cyclosporine をウィーニングするものであるが、観察期間が 6 ヶ月以上経過した 6 症例の全例が、tacrolimus または cyclosporine 単剤で免疫抑制が維持されており、拒絶を認めることなくこれら CNI のウィーニングがプロトコール通りに進んでおり、肝機能も安定している。なかでも術後 1 年以上経過した 3 症例は、現在、tacrolimus または cyclosporine を少量かつ週 2 回のみ投与で肝機能は

良好に経過しており、免疫寛容誘導が期待される。

エンドキサンは先行する東京女子医大での腎移植症例のプロトコール同様の投与量および投与回数で症例1および2では投与を行ったが、これら症例ではWBC低下が著しく、症例2では連日G-CSF投与が必要となった。また、これらの症例ではWBC再上昇を認めたものの長期にわたりWBCは比較的low値で推移していたため(図9, 10)、症例3では、エンドキサンを30 mg/kgで1回投与とした。この症例

では、術後WBC値が高値で推移したこともあり、WBC値の底値が1700/mm<sup>3</sup>とやや不良であったことから、以降の症例では40 mg/kgの1回投与とし、比較的良好なdeletion効果が得られると共にWBC値も3-7日程度で再上昇が認められている(図9, 10)。WBC値は細胞輸注当日が底値とならず、数日遅れる症例があり、エンドキサンの投与日はまだ検討の余地があると考えられる。なお、エンドキサン投与に伴う副作用の出血性膀胱炎は全く認められなかったが、40

図9. WBCの推移(Case #1-#8)

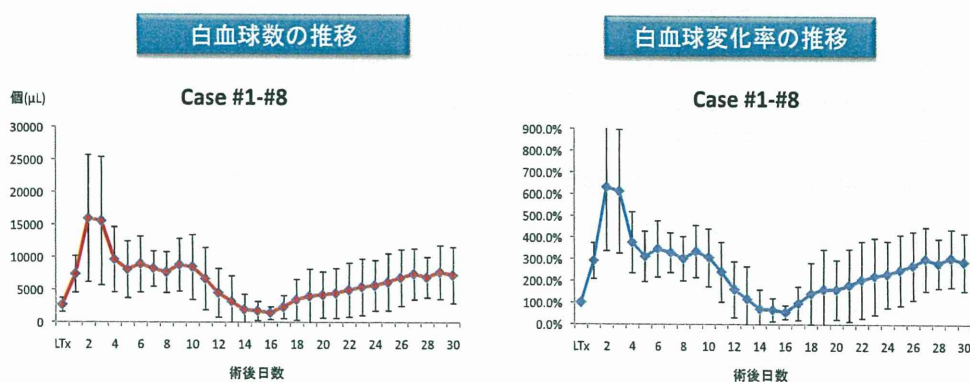
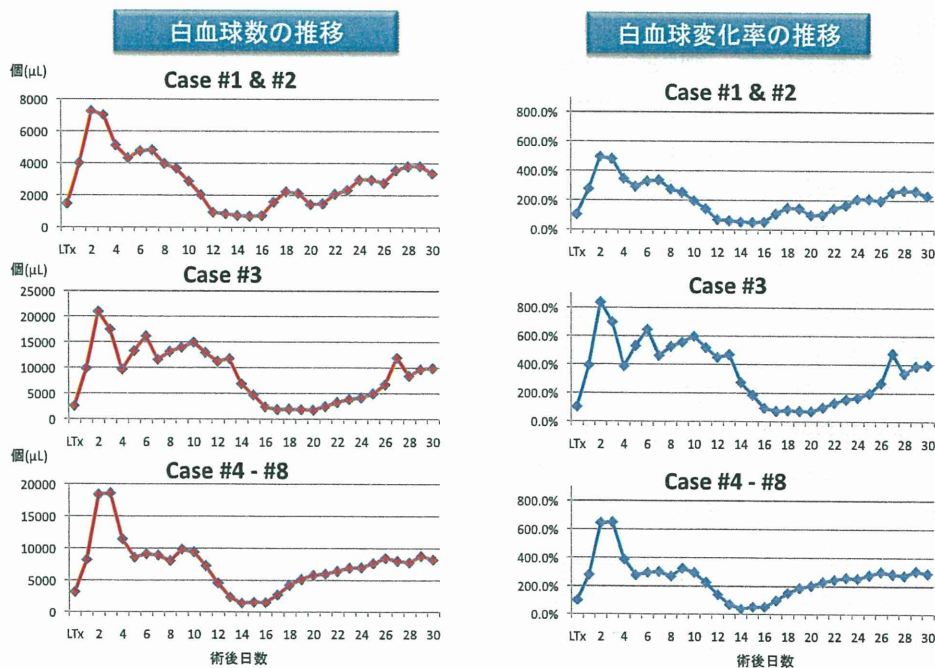


図10. WBCの推移(エンドキサン投与量別)



mg/kg を 1 回投与でも軽度から中等度脱毛が見られている。

症例 1 では、CMV 既感染ドナーから CMV 既感染レシピエントへの移植例にも関わらず CMV hepatitis を来したことから、以降の症例においてガンシクロビルもしくはヴァルガンシクロビルの予防的投与を行うこととした。予防的投与を行った症例でも CMV antigenemia は一過性に陽性となる症例が 3 例（症例 2, 3, 8）認められたが、CMV disease を発症することはなかった。したがって、エンドキサン投与が必要である本細胞治療プロトコルでは CMV 感染予防は必須であると考えられる。CMV 感染予防薬は術後 3 ヶ月まで行い、3 ヶ月以上経過した 7 症例中 6 例は以後も CMV 感染を認めていないが、1 例は 3 ヶ月以降に CMV antigenemia が陽性となり、CMV 感染の予防期間が 3 ヶ月で十分か 6 ヶ月まで延長すべきかは、今後さらなる検討が必要と考えられた。

## E. 結論

生体肝移植症例 8 例において、制御性 T 細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を施行した。細胞輸注に伴う副作用は認められず、安全に臨床試験を施行し得た。本細胞治療に使用するエンドキサン投与量・回数については 40 mg/kg, 1 回投与が妥当である。また、本細胞治療プロトコルは CMV 感染を来す可能性が高く、その予防薬投与が必須である。術後 3 ヶ月以内に 3 例で拒絶反応が認められたが、2 例は免疫抑制剤中止もしくは減量のさなかであり、拒絶も軽微であった。6 ヶ月以上経過した 6 症例中、全例が tacrolimus または cyclosporine 単剤で免疫抑制が維持されており、なかでも術後 1 年以上経過した 3 症例は、これら

CNI を少量かつ週 2 回のみでの投与で肝機能は良好に経過しており、免疫寛容誘導が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

「制御性T細胞を用いた肝移植症例の免疫モニタリング」

研究分担者：山下 健一郎  
北海道大学 大学院医学研究科 移植外科・准教授  
研究分担者：清野 研一郎  
北海道大学 遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野・教授  
研究分担者：垣生 園子  
順天堂大学医学部 免疫学講座・教授

研究要旨：臓器移植後は適切な免疫抑制（薬剤の種類や投与量）を施すことが肝要であるが、臨床的に宿主の免疫状態や拒絶反応を予知しうる確立されたバイオアッセイやマーカーは存在しない。本研究では、平成23年度に制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法を施行した生体肝移植症例8例において、種々のアッセイ法を用いて免疫モニタリングを試みた。Cylexは抗ドナー反応には非特異的だが、over immunosuppression、CMV感染やHCV再発など状態を判断する上で有用なアッセイと考えられた。MLR、IFN- $\gamma$  ELISPOT、抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>T細胞用いたドナー抗原に対する反応を総合的に判断することで、免疫抑制の適正化を図れる可能性が示唆された。培養制御性T細胞輸注後は6割以上の症例において末梢血液中のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞などの制御性T細胞の割合の増加が観察された。肝移植後、naïve T細胞は著減し、代わってmemory T細胞が増加する傾向がみられた。免疫モニタリングは個々の免疫状態を適切に判断し、安全な免疫抑制剤の減量、治療選択に有用であると考えられた。

## A. 目的

臓器移植後にはグラフト拒絶を予防するため免疫抑制剤の投与が必須である。しかし、今日臨床使用されている免疫抑制剤はすべて非特異的（汎）免疫抑制であり、これらはグラフトに対する拒絶反応を抑制するかわりに、さまざまな感染症や悪性腫瘍発生に対する宿主の免疫抵抗性を奪うことや、免疫抑制剤自体の副作用が問題となっている。免疫抑制中の免疫状態を把握し、適切な免疫抑制（薬剤の種類や投与量）を施すことが肝要であるが、現状では、臨床的に宿主の免疫状態や拒絶反応を予知しうるバイオアッセイやマ

ーカーは存在せず、免疫抑制剤の投与量は主に免疫抑制剤の血中トラフ値や血液生化学検査でグラフト機能をみながら調整し、拒絶反応が疑われる場合には臓器生検を行い病理学的診断よらざるを得ない。

制御性T細胞を用いた肝移植症例において、末梢血液を用い、種々の免疫アッセイを行うことで免疫状態をモニタリングする事を目的とした。

## B. 方法

### (1) 検討材料

- ① 生体肝移植後患者およびその生体ドナーから、診断あるいは治療目

的に採取された末梢血 10-20 ml の提供を受ける（ドナーおよびレシピエント共に、手術直後で入院中の場合は 1-2 回/週程度、外来の場合は 2-4 回/年程度の頻度）。

- ② 上記より得られた血液中の全血および分離した白血球分画 PBMC を使用し、免疫生物学的解析を行う。採血管は EDTA およびヘパリン（Cylex 用）を使用。比重遠心液は Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare)を用いた。培養液は RPMI-1640 (SIGMA) に 10%FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシン、50 μM の 2-メルカプトエタノールに調整して使用した。ヒト末梢血を 840 xg、20 分、室温で比重遠心を行い、中間層を回収。HANK'S Balance Salt Solution (SIGMA)で 2 回洗浄後、培養液に再懸濁した。

(2) 評価項目

① Immuknow (Cylex)

T細胞が活性化する際に細胞内で産生・蓄積される ATP 量を測定することで活性能を評価する。レシピエント末梢血液(4倍希釈)100 μl に PHA (25 μl)を加え、37°C・5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で16時間培養を行う。CD4 Dynabeads で CD4<sup>+</sup> T細胞を抽出・溶解し、ルミノメーターで ATP 濃度を測定した。

② リンパ球混合培養試験 (MLR)

Stimulator (ドナー および 3<sup>rd</sup> パーティー)は30 Gyで放射線照射をした細胞を使用した。Responder (レシピエント)およびStimulatorの細胞濃度は1x10<sup>5</sup>/wellで、これら細胞を7日間共培養した。培養終了16時間前にチミジンを1 μCi/well 加えβ線シンチレーションカウンタでチミジンと取り込みを評価

した。

③ IFN-γ ELISPOT

レシピエント末梢血リンパ球を Ficol 比重分離で抽出し、IFN-γ 補足抗体をコーティングした BDTM ELISPOT プレートにヒトリンパ球を放射線照射したドナーリンパ球と共に混合培養する。24-48 時間後に IFN-γ スポットをビオチン標識抗マウス IFN-γ 抗体にて反応させ HRP-streptavidin、3-amino-9-ethyl-carbasole substrate で視覚化し、ELISPOT リーダーにて spot を評価し定量化した。なお、本アッセイでは抗原にドナー末梢血リンパ球およびその lysate もしくは MHC class II の違いに応じたペプチドを使用することで、direct および indirect pathway の両反応を同時に検討した。Direct response は 24 時間培養、Indirect response は 48 時間培養後に評価した。

④ ドナー抗原特異的 CD40L<sup>+</sup>リンパ球

レシピエント末梢血リンパ球を放射線照射したドナーリンパ球と混合培養し、CD28 抗体にて刺激する。培養開始後 6 時間後に細胞を採取して Fixation Solution (BD Cytotfix/Cytoperm Buffer) および Permeabilization Buffer (BD Perm/Wash buffer) を用いて CD40L の細胞内染色を行う。抗体は BD Bioscience の PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE Anti-Human CD154 (TRAP1) を使い、細胞内染色のプロトコールに従って染色を行い、Flow cytometry で CD40L の発現を解析・検討する。

⑤ 制御性 T 細胞の染色

抗体は BD Bioscience の PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-

Human CD8 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD25 (M-A 251), FITC Mouse Anti-Human CD127 (hIL-7R-M21), FITC Mouse Anti-Human CD45RA (HI100), FITC Mouse Anti-Human CD28 (CD28.2), PE Mouse Anti-Human FoxP3 (259D/C7)を用いて FoxP3 染色推奨プロトコールに従って染色した。

⑥ Effector Memory T cell

抗体は BD Bioscience の PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), PE Mouse Anti-Human CD45RA (HI100), FITC Mouse Anti-Human CD62L (DREG-

56)を用いて細胞表面染色を行った。

⑦ 臨床データとの統合

当該患者の臨床データとの統合解析を行い、免疫状態の把握や拒絶反応などの予測に有用な方法・因子について検討する。なお、臨床データは下記診療情報を利用する。

- ・患者基本情報：年齢、性別、ID 番号
- ・疾患情報：臨床診断名、病理診断名、血液生化学検査所見、生検病理組織学的所見 など

図1. Cylex (症例1)

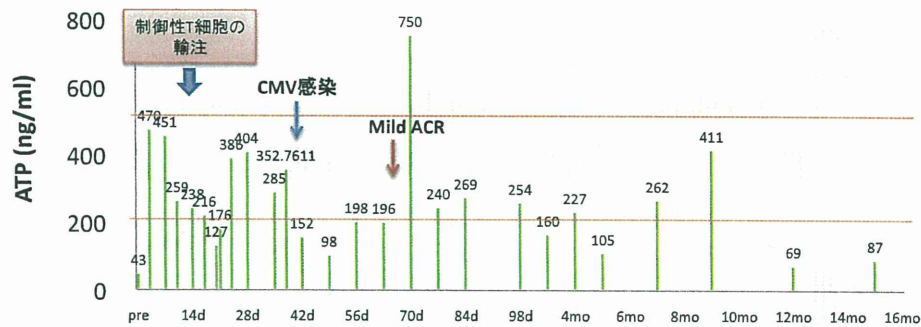
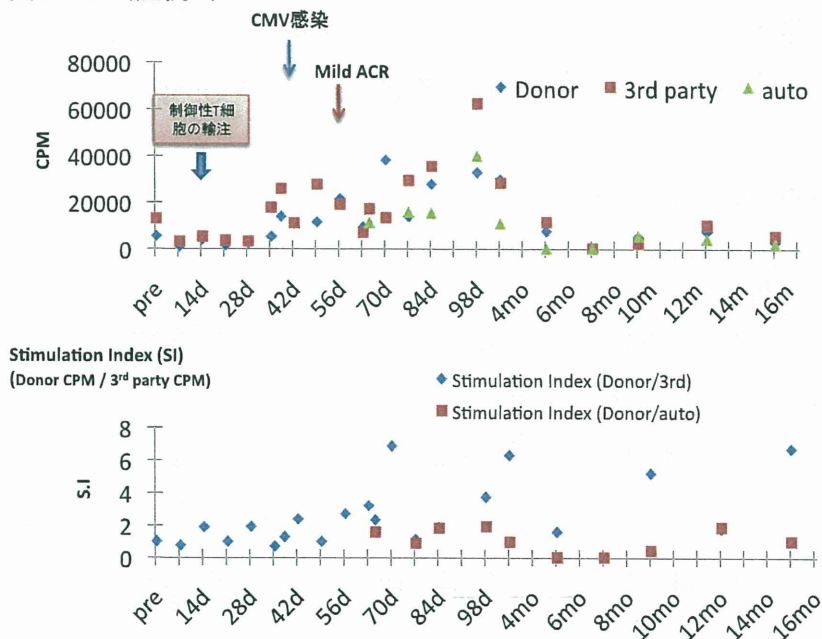


図2. MLR (症例1)





## C. 結果

### 症例 1

・ Immuknow (cylex) : 図 1

術前値は43 ng/mlと低値であった。移植後早期は400台まで上昇するもその後漸減し、それに伴いHCV-RNA値上昇が認められた。またCylexの値が100台と低下した際にはCMV罹患がみられた。CMV感染軽快後は約200-250 ng/mlで推移した。術後84日目以降Cylexは225 ng/ml以下で、12ヶ月目以降は100 ng/ml以下と低値を示し、HCV-RNAは6-7 logを推移している。

・ MLR : 図2

移植後約5週間は術前値に比し低値であったが、6-10週目までドナー抗原に対する反応は漸増した。6週目にover immunosuppressionからくるCMV感染症がみられたために免疫抑制剤は中止されており、臨床像と相関する結果であった。プログラム再開後は反応が一過性に低下したが、術後14週以降はCPM値、SI値ともに上昇している。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図 3

図3. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例1)

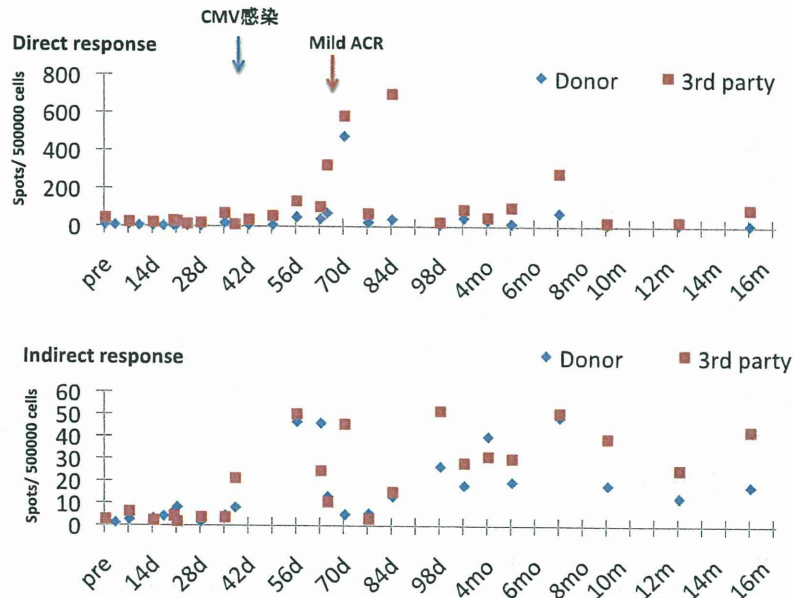


図4. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例1)

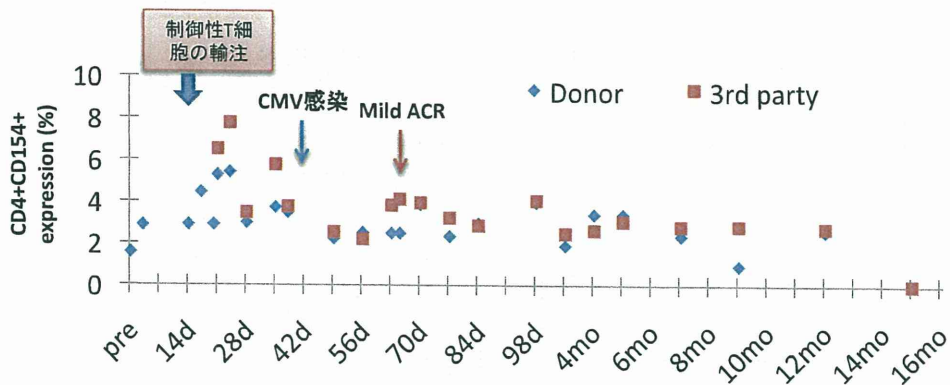


図5. 制御性T細胞(症例1)

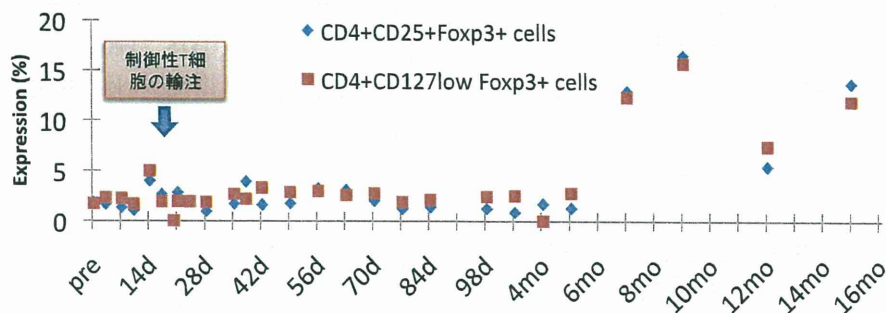
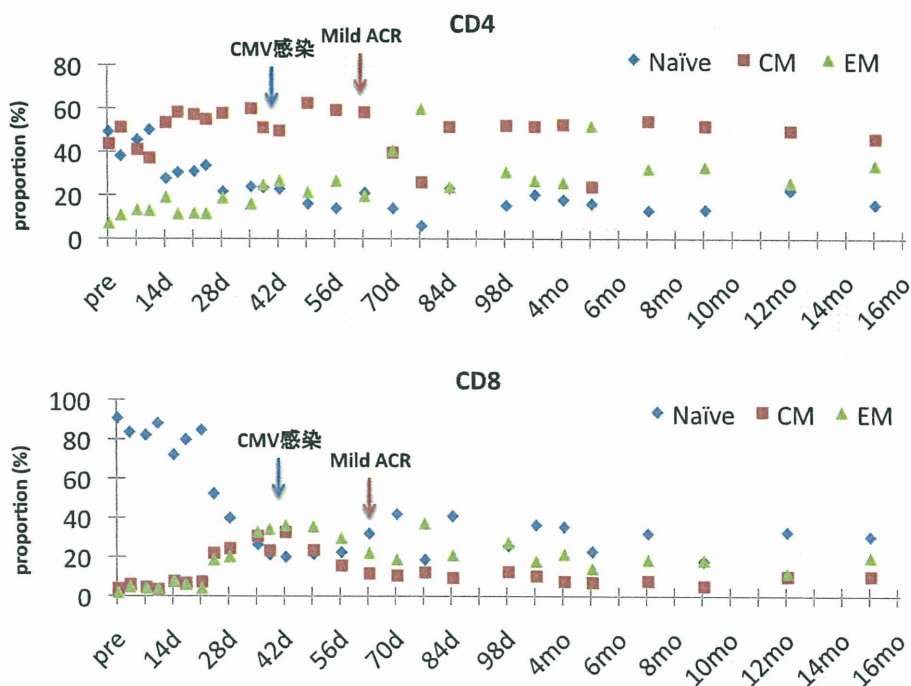


図6. Naïve/Memory T cells(症例1)



肝移植後は direct および indirect response とともに陰性であった。術後38日目にCMV感染が明らかになり、免疫抑制剤を減量し、56日目にはドナー抗原、3rd パーティーに対するIFN- $\gamma$ 産生上昇が見られた。65日目の肝生検でMildな急性細胞性拒絶反応と診断され、ELISPOTの発現が拒絶反応のモニタリングとして有用であったことが示唆された。なお、術後15ヶ月目には、direct および indirect response とともに軽度上昇傾向にある。

・末梢血中の抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>

T細胞：図4

術前値は約1.5%であり、術後は2-3%で推移した。IFN- $\gamma$  ELISPOTと同様に術後56日目に特に3rd パーティーに対する反応が増加した。その後、拒絶反応が認められた。今後3rd partyへの交差反応について検討が必要と考えられた。

・末梢血中の制御性T細胞：図5

制御性T細胞の phenotype として CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞 および CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞の割合を検討した。これら細胞の術前値は約2%

であったが、培養細胞輸注後は4-5%まで上昇し、その割合は次第に漸減したものの、約10週目まで術前値以上の割合が維持された。その後150日までの時点では、ほぼ前値に復している。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図6

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> Naïve T細胞は移植手術後10-21日目頃より漸減した。それとともにcentral memory CD4<sup>+</sup>T細胞、effector memory CD8<sup>+</sup>T細胞の増加がみられた。拒絶反応がみられた70日前後ではeffector memory CD4<sup>+</sup>T細胞の割合

が一過性に増加した。術後150日を経過した時点でもcentral memory CD4<sup>+</sup>T細胞は増加した状態であった。120日目以降、naïve CD8<sup>+</sup> T細胞は優位な集団に復したが、術前と比べその割合は低下した。

### 症例 2

・Immuknow (cylex)：図7

術前値は318 ng/ml、術後3日目には531 ng/mlと高値を示したが、その後は急速に低値となり、術後17日目には12 ng/mlまで低下した。この推移は

図7. Cylex (症例2)

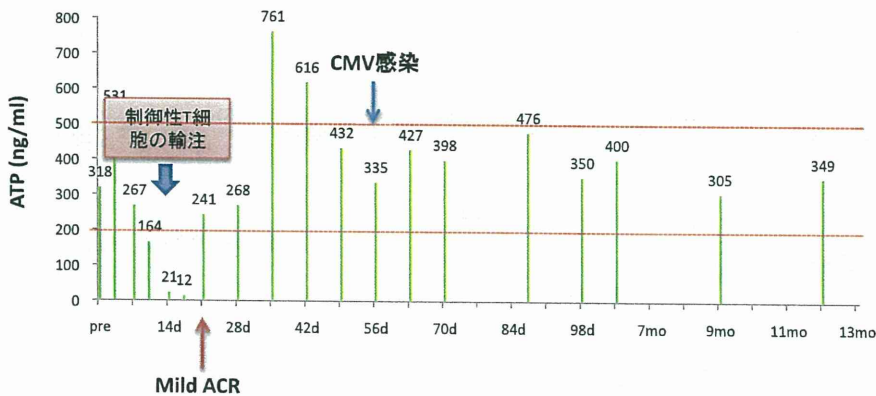


図8. MLR (症例2)

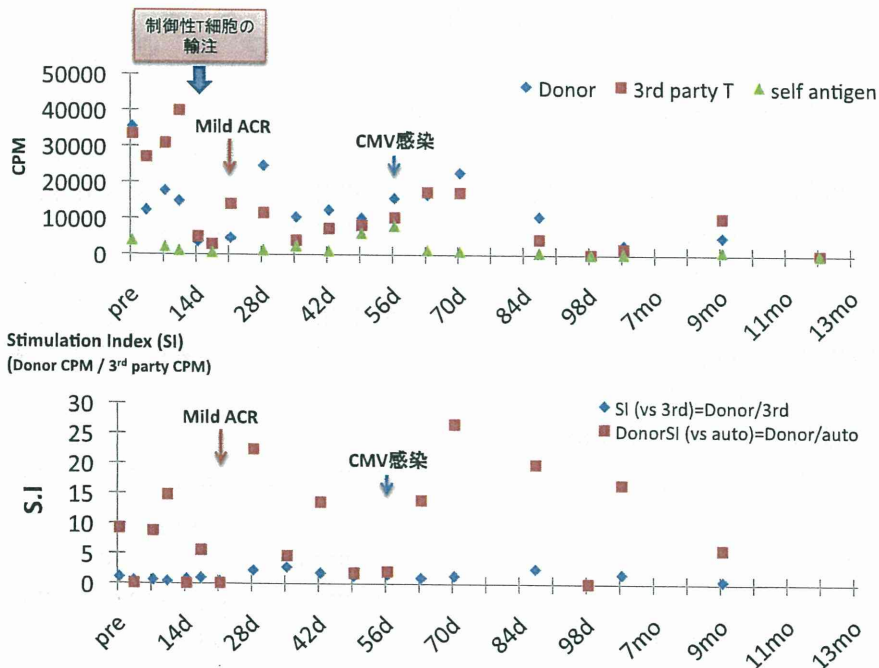


図9. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例2)

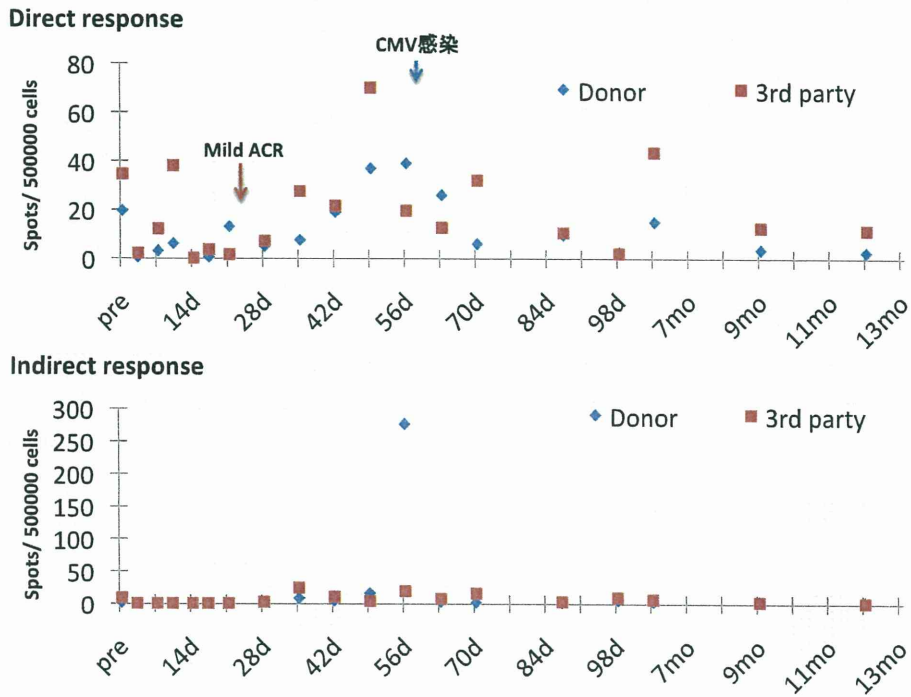
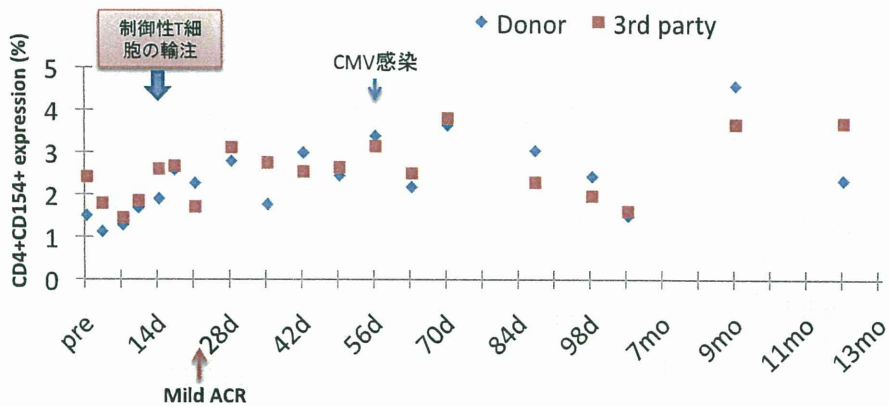


図10. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例2)



WBCのそれとほぼ並行していた。術後3週目に mild ACR を来したが、Immuknow値は200 ng/ml台であった。全身状態回復とともに、その値は上昇し、現在に至るまで300-400 ng/ml台を推移している。

・ MLR : 図 8

移植前MLRではドナーおよび3rd パーティー抗原に対する反応は約35000cpmと高値であったが、術後はこの値を超えることなく経過した。術

後10日から21日目までは特に低値であった。20日目に臨床 mild rejection が認められたが、それ以前にドナー抗原への反応の増加は認めず、むしろ、28日、35日目に上昇を認めた。自己抗原に対する反応をベースとしたSIで見ると術後4-5週目にSI値は約2まで上昇したが、その後SI値はほぼ1で経過している。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図 9

術後4週目まで direct ・ indirect

responseともに陰性であった。Direct responseは7-8週目で軽度上昇した。この際、臨床上、拒絶反応は認められず、CMV感染症がみられている。術後9週目以降、direct responseは低下し、現在は術前値を下回っている。Indirect responseは5週目以降で上昇したが、direct responseと同様に8週目をピークに低下し、その後は反応が出ていない。術後10週目のdonor抗原に対するdirectおよびindirect responseは認められなかったが、3<sup>rd</sup> partyに対する反応がみられた。

・末梢血中の抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞：図10

術前値は約1.5%であり、経過中のイベントによらず術後10週目まで末梢血中CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞は2-3%で推移した。術後6ヶ月目までは約1%まで漸減したが、以降は再上昇し、2-3%で推移している。

・末梢血中の制御性T細胞：図11

本症例では制御性T細胞のphenotypeとしてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞、

図11. 制御性T細胞(症例2)

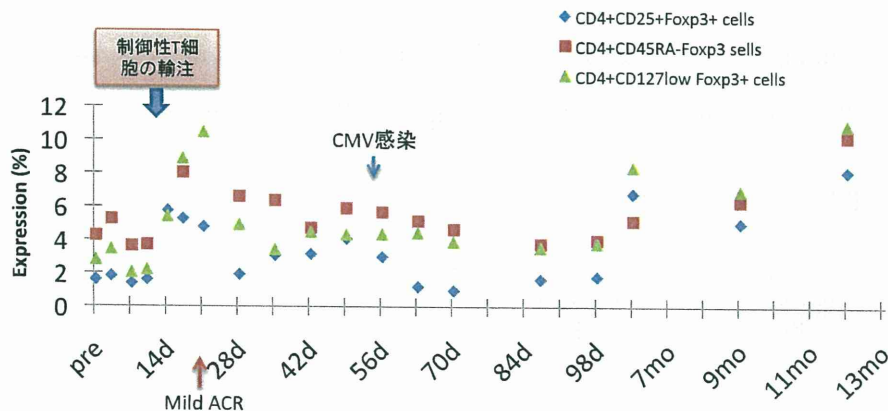
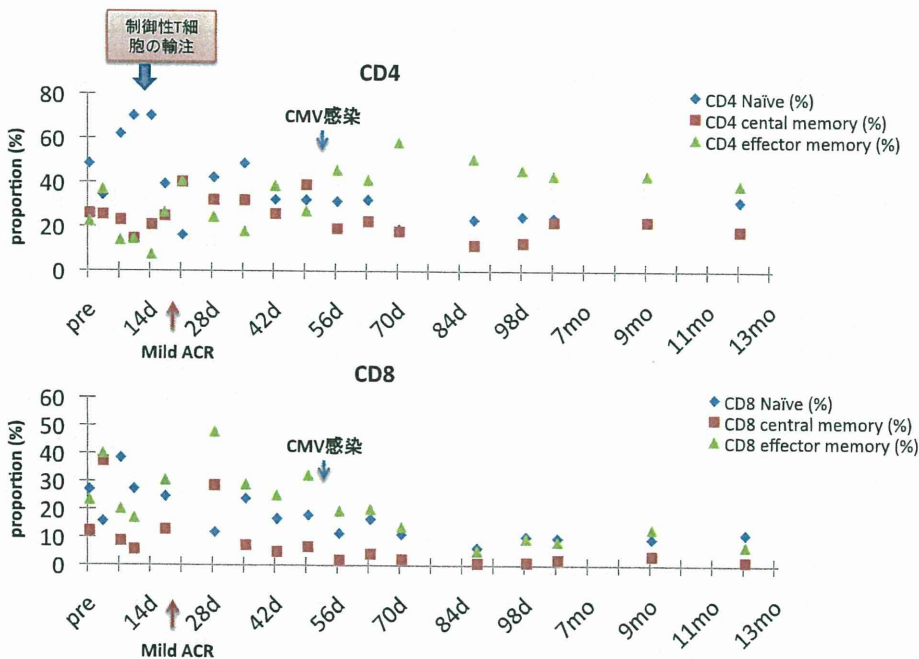


図12. Naïve/Memory T cells(症例2)



CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞に加え、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞の割合を検討した。いずれの制御性T細胞も術後10日目までは術前値とほぼ同等の割合であったが、培養細胞輸注後はすべてのphenotypeでその割合が一過性に上昇し、術後8-10週目まで術前値以上の割合が維持され、術後6ヶ月以降は更にこれら細胞の割合が増加している。

の割合が漸増した。CD4<sup>+</sup> central memory T細胞の割合は術後3-7週目までは上昇した後に漸減したが、CD4<sup>+</sup> effector memory T細胞の割合は術後10週目まで増加し、以降は緩やかに減少傾向である。CD8<sup>+</sup> centralおよびeffector memory T細胞の割合は術後4週目以降低下し、現在これらは低値となっている。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図12

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> Naïve T細胞は移植手術後10-14日目頃より漸減し、代わりにCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>ともにmemory T細胞

### 症例 3

・Immuknow (cylex)：図13

症例1と同様に本症例でも術前値は98 ng/mlと低値であった。移植後

図13. Cylex (症例3)

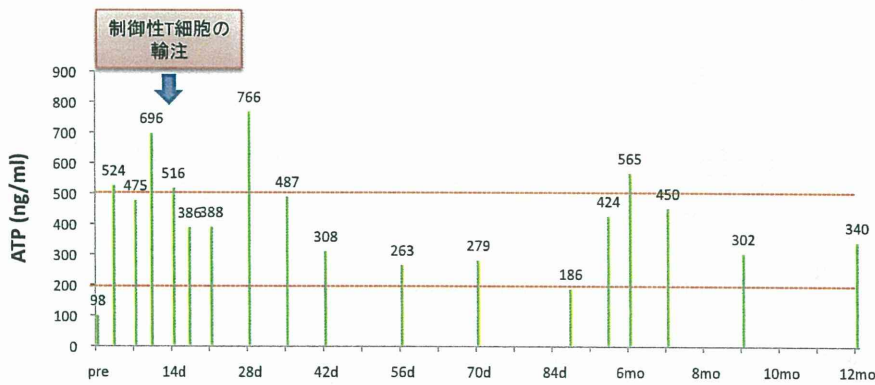


図14. MLR (症例3)

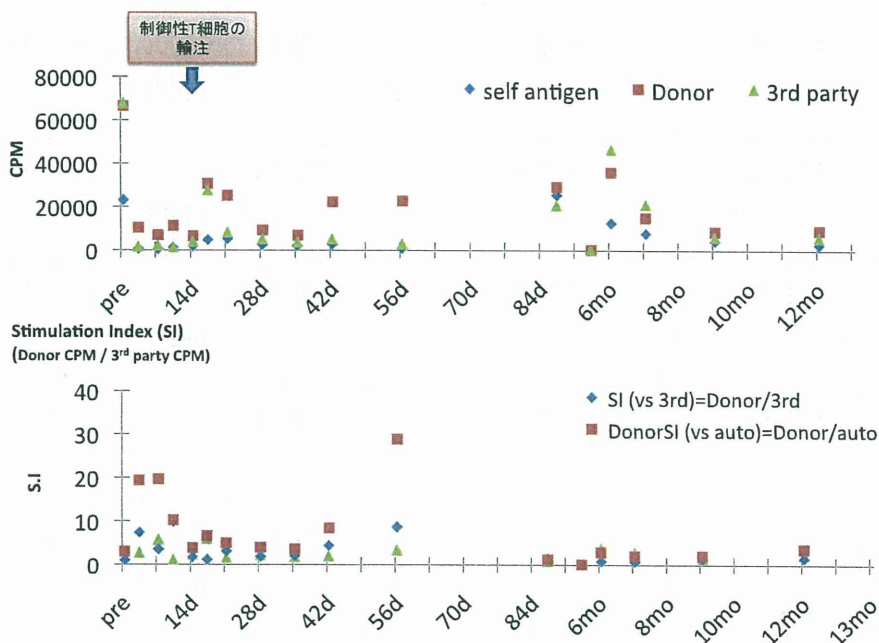


図15. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例3)

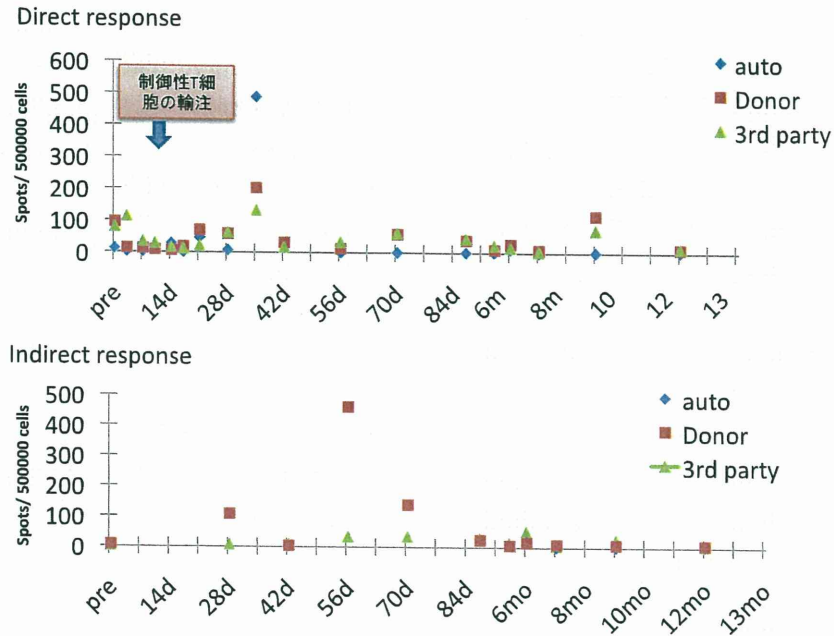
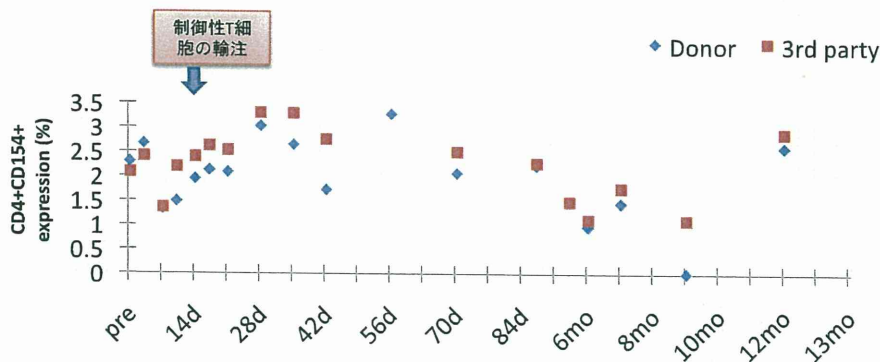


図16. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>(症例3)



Immuknow値は上昇し、10日目には約700 ng/mlとなったが、WBC低下と平行してその後は漸減し3週目には300 ng/ml台まで減少した。プログラムおよびセルセプトを中止していた術後28日目には一過性にImmuknow値は766 ng/mlまで上昇したが、その後は漸減し約250-300 ng/mlで推移、術後6ヶ月目には一過性に565 ng/mlと上昇したが、現在は300 ng/ml台で推移している。

・MLR：図14

本症例も症例2と同様に、移植前MLRではdonorおよび3rd party抗原に

対する反応は約70000 cpmと非常に高値であったが、術後はこの値を超えることなく経過した。術後17日から21日目まではMLRは軽度上昇したが、28日目以降は再び低値となった。donorおよび3rd party抗原に対する反応に差異を認めなかった。術後6ヶ月目にはcylexと同様にcpm値の上昇を認めたが、SI値では低値であり、グラフト生検(protocol biopsy)の結果明らかな拒絶を認めなかったことから、MLR-SI値がより臨床像を反映していると考えられた。なお、1年経過時のdonor抗原に対するMLR-SI値では低値で推移している。

図17. 制御性T細胞(症例3)

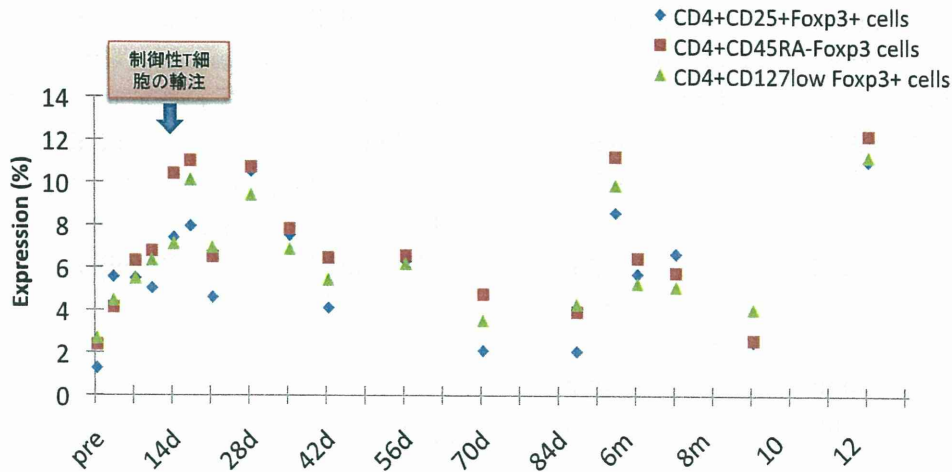
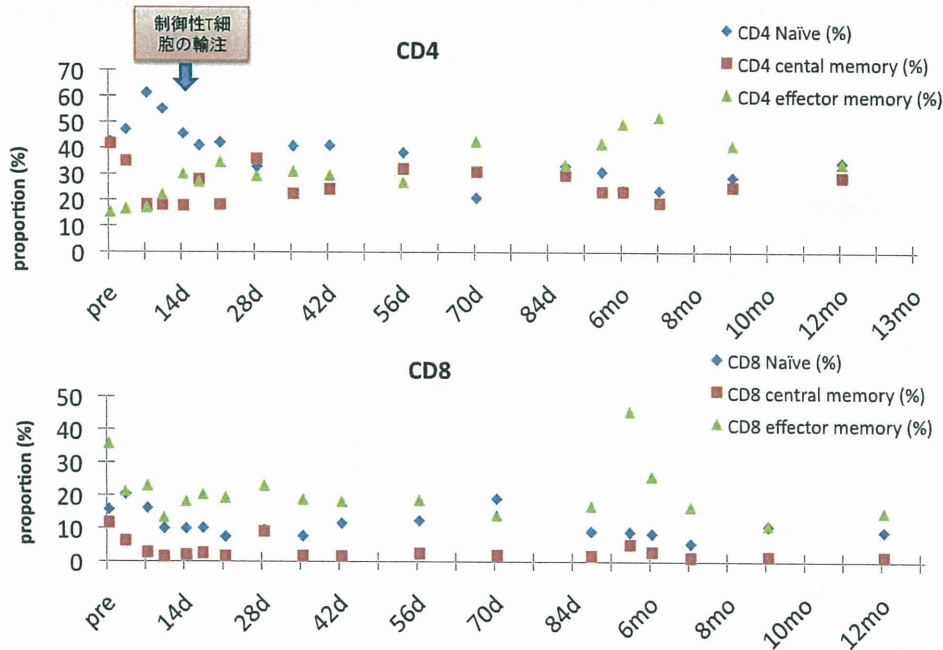


図18. Naïve/Memory T cells(症例3)



・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図15

肝移植後のdirect responseは35日目を除き、すべての検討日で術前値に比べて低値であった。この35日目の検討では自己抗原に対する反応が最も高かった。44日目には肺感染症が疑われたが、その前後ではドナー抗原に対する反応はみられず、臨床像のモニタリングとして有用であった。術後9ヶ月目にIFN- $\gamma$ 産生細胞数がほぼ術前値まで復したが、グラフト生検では明らかな拒絶像を認めなかった。indirect response

は術後4週目および8週目には上昇していたが、その後は漸減し、術後12ヶ月目の時点ではIFN- $\gamma$ 産生細胞は末梢血中にほとんど認められていない。

・ 末梢血中の抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞 : 図16

術前値は約2%であり、術後は2- 3%で推移した。術後56日目を境に末梢血中のCD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞の割合は減少傾向となったが、術後12ヶ月目は約3%まで再上昇している。



・末梢血中の制御性T細胞：図17

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞の割合は移植直後から上昇し、培養細胞輸注後は更に5-7倍まで増加した。術後8週目でも、これら細胞の割合は高く、6ヶ月、12ヶ月後の時点でも術前値の約3-5倍の割合が維持されていた。この時点でのプロトコール肝生検でも拒絶を疑う所見はなく、制御性T細胞の高値が免疫抑制状態を反映していると考えられた。

末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図18

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> Naïve T細胞は移植手術後7日目頃より漸減し、代わりにCD4<sup>+</sup>ではeffector memory T細胞の割合が漸増した。CD4<sup>+</sup> central memory T細胞の割合は術後7日目までは減少したが、その後緩やかに術前値に復した。CD8<sup>+</sup> T細胞では、naïve およびmemoryの割合に術後大きな変化を認めなかった。

#### 症例4

・Immuknow (cylex)：図19

本症例の術前値は245 ng/mlであり、移植後他症例と同様に一過性の上昇を認めた。その後WBC数低下に伴い128

図19. Cylex (症例4)

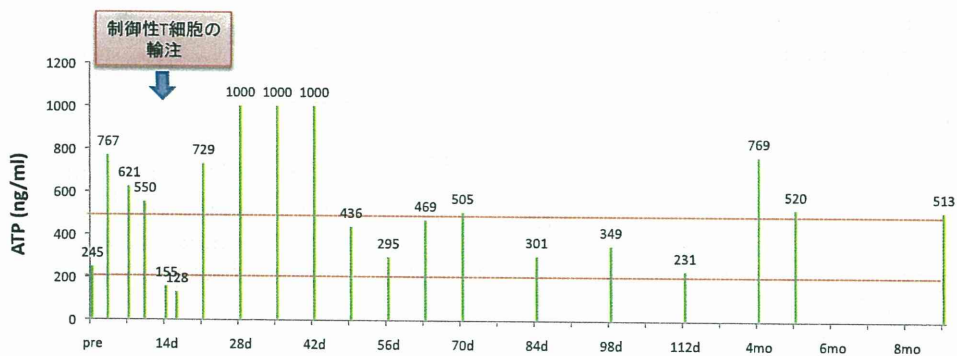


図20. MLR (症例4)

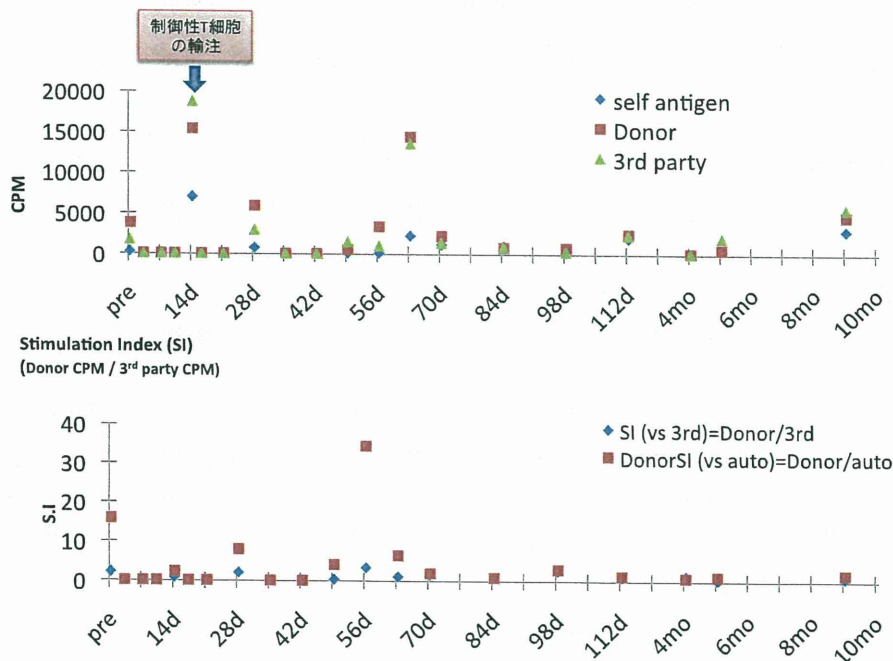


図21. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例4)

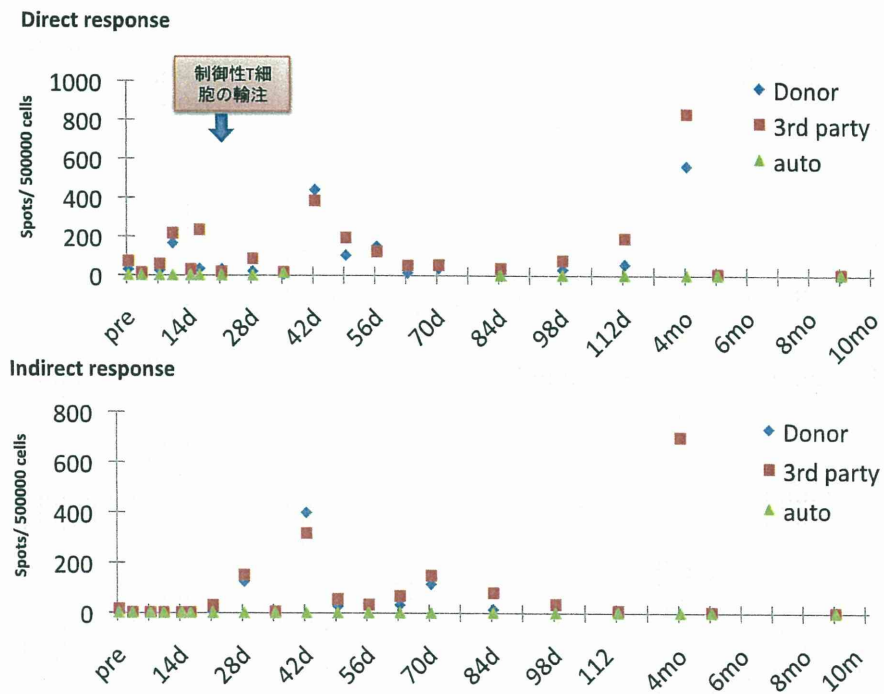
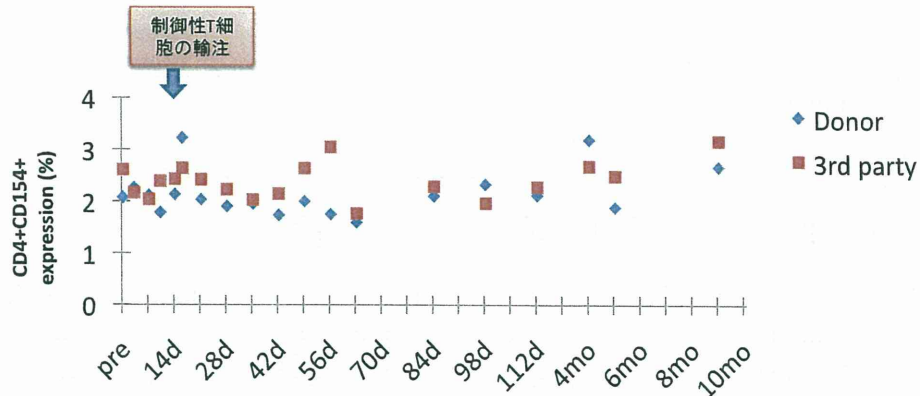


図22. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例4)



ng/mlまで漸減した。術後21日からは急上昇し>700 ng/mlとなったが、臨床的に拒絶反応は認められなかった。術後7週以降は低下傾向となり、12-16週には200-350 ng/mlへ減少したが、その後は500-800 ng/mlとやや高めで推移している。

56日目にドナー抗原に対するMLR SI値に一過性の上昇を認めたが、この時点でプログラフ血中濃度は低値であったものの、拒絶反応を疑う臨床所見は認められなかった。その後、ドナー抗原に対するMLRは術前値以下で推移している。

・ MLR : 図20

移植14日目にドナー抗原に対するMLR cpm値の上昇がみられたが、SIでは上昇とはとらえられず、拒絶反応を疑う所見も認めなかった。一方、術後

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図21

Cylexと同様に術後43日目に上昇が認められた。Directとindirectの反応で同様の傾向がみられた。

図23. 制御性T細胞(症例4)

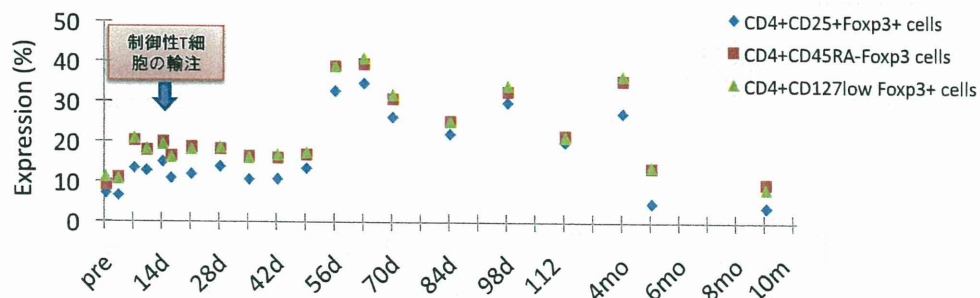
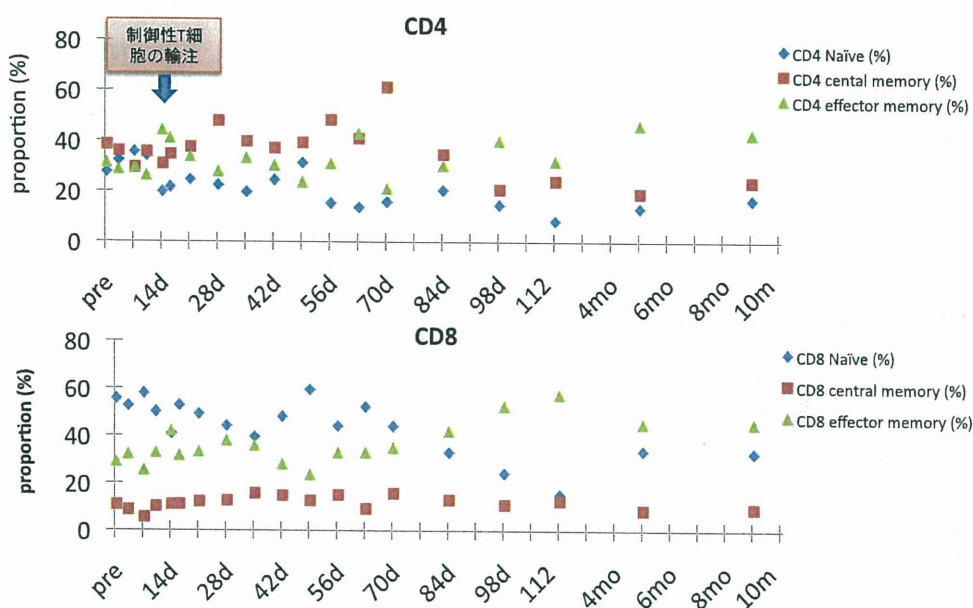


図24. Naïve/Memory T cells(症例4)



・末梢血中のドナー抗原特異的 CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞：図22

術前と変わらない2-3%の値を推移した。

・末梢血中の制御性T細胞：図23

制御性T細胞の割合は移植後7日目から上昇し、以後高めで推移した。特にラパマイシンを投与し、その後プログラブに切り替える前後の56日目、63日目に高値を認めた。10ヶ月目の時点ではほぼ術前値に復した。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図24、

CD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> naïve T細胞は術後

14日目、84日目以降にそれぞれ緩やかに漸減した。一方CD4<sup>+</sup> central memory T細胞は術後70日目あたりから徐々に減少した。逆にCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> effector memory T細胞は術後80日前後で優位なpopulationに変化した。

### 症例 5

・Immuknow (cylex)：図25

本症例の術前値は193 ng/mlとやや低値であったものの、これまでの症例と同様に一過性の上昇とWBC数に比例した減少がみられた。セルセプト中止後(21, 28日後)と49日目に上昇が

図25. Cylex (症例5)

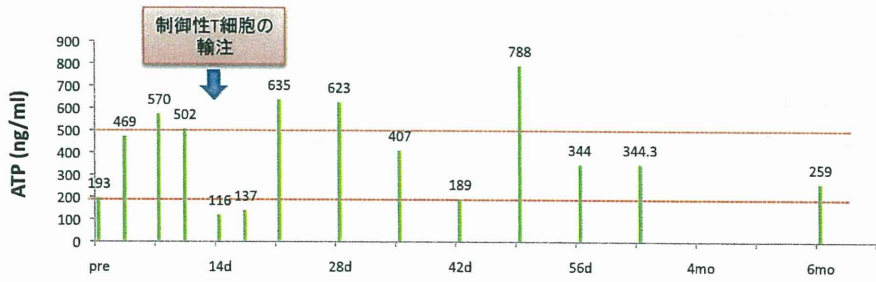
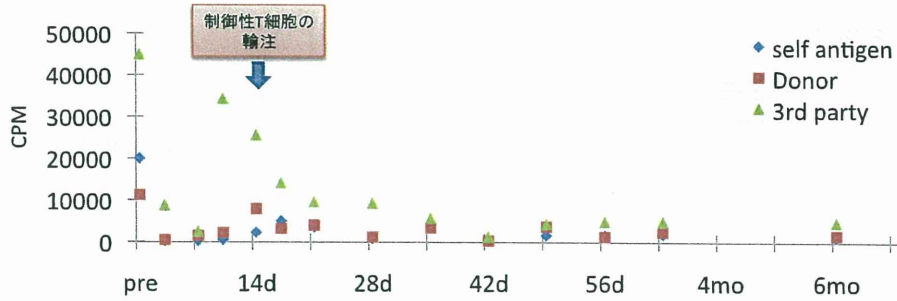


図26. MLR (症例5)



Stimulation Index (SI)  
(Donor CPM / 3<sup>rd</sup> party CPM)

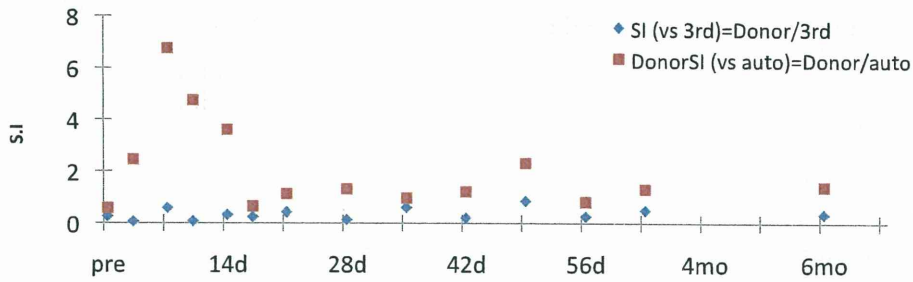
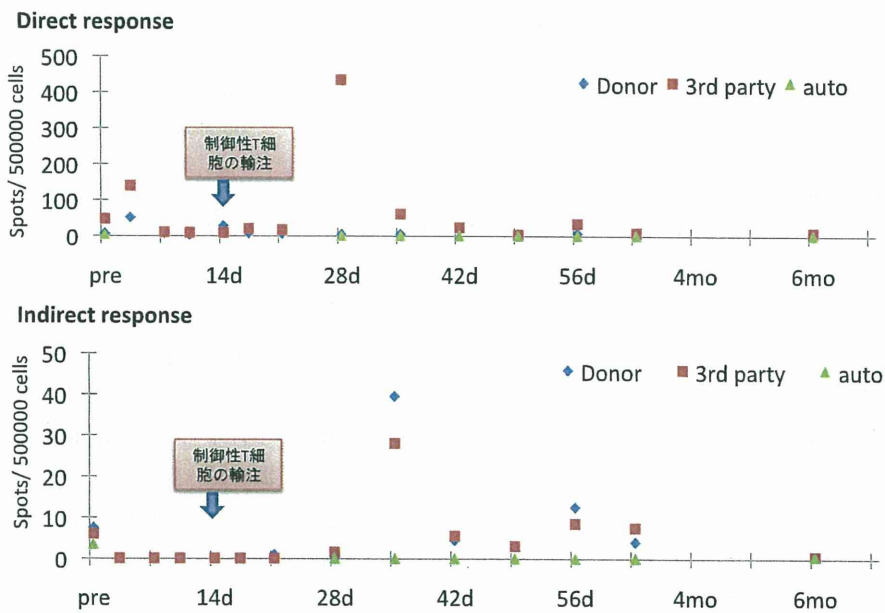


図27. IFN-γ ELISPOT (症例5)



みられたが、以後低値を推移した。