

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 206号	学位授与年月日	平成 7年 3月23日
氏名	Jolanta Malyszko		
論文題目	FK506 AFFECTS PLATELET AGGREGATION IN VITRO (in vitro における FK506 による血小板凝集への影響)		

博士(医学) Jolanta Malyszko

論文題目

FK 506 AFFECTS PLATELET AGGREGATION IN VITRO.

(in vitro における FK506による血小板凝集への影響)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕近年多くの新しい免疫抑制剤が開発されてきている。その中でサイクロスポリンAは血小板凝集惹起物質に対する反応性を増強することによる易血栓形成性という副作用を持つことが知られている。FK506は日本で開発された新しい免疫抑制剤で臨床応用されているが副作用は少ないとされており、また動物実験に於ても、血小板機能には影響しないことが示されている。本研究に於て我々は、ヒト血小板に対するFK506の作用について検討した。

〔方法〕正常人ボランティア10名(29-37才)の肘静脈より採血し、最終濃度1mMのクエン酸ナトリウムを加えた。これを100Gで10分間遠心し、上清を多血小板血漿(PRП)とした。また更に1200Gで20分間遠心した上清を乏血小板血漿(PPP)とした。全血血小板凝集はChronolog社製凝集計によりWilsoncroftらの方法によりインピーダンス法にて測定した。PRПにおける血小板凝集はElma社製凝集計を用いてBornらの方法により測定した。即ち、PPPの光透過度を100%、またPRП(PPPにより血小板数を250,000/ μ lに調整)の光透過度を0%に調整し、凝集刺激物質投与3分以内の最大光透過度を血小板凝集値とした。FK506(藤沢薬品より供与された)を最終濃度1, 5, 10及び100ng/mlで全血あるいはPRПに加え、37度で2分間あるいは10分間インキュベートした後、各種凝集刺激物質の投与により凝集を測定した。凝集刺激物質はADP:10 μ M(全血)、5 μ M(PRП);コラーゲン:5 μ g/ml(全血)、2 μ g/ml(PRП);リストセチン:1.25mg/ml(全血);エピネフリン:10 μ M(PRП);セロトニン:1 μ M(PRП)の各濃度で使用した。各濃度のFK506単独投与では血小板凝集は認められなかった。統計処理はWilcoxon rank sum testにより行ない $p < 0.05$ を有意差とした。値はすべてMean \pm SDで示した。

〔結果〕全血血小板凝集では1, 5及び10ng/mlの濃度のFK506ではADP、コラーゲン及びリストセチンによる凝集に影響を及ぼさなかった。しかし50及び100ng/mlではADPとリストセチン、更に100ng/mlではコラーゲンによる凝集を有意に抑制した。PRП血小板凝集では1及び5ng/mlの濃度のFK506ではどの凝集惹起物質でも抑制を認めなかった。10, 50及び100ng/mlの濃度ではセロトニン凝集を有意に抑制した。またエピネフリン凝集では濃度依存性に抑制した。しかしコラーゲン及びADP凝集は100ng/mlの濃度で若干の抑制を認めただけであった。

〔考察〕in vitroの実験でFK506はヒト造血系細胞の種々の分泌過程を抑制し、好塩基球及び肥満細胞におけるプロスタグランジンD₂(PGD₂)の産生とインターロイキンC₄の遊離を抑えることが報告されている。従って本研究で示したFK506のヒト血小板凝集の抑制は、造血系細胞の共通した特徴としてFK506に対する感受性を持つことを示唆し興味深い。FK506はCa⁺⁺依存性のおそらく受容体(FKB)を介すると考えられる肥満細胞あるいは好塩基球からの脱顆粒、さらにこれらの細胞に於けるアラキドン酸代謝とセロトニン遊離機構を抑制することが知られている。従ってFK506のヒト血小板に対する作用も同様に、受容体(FKB)を介するCa⁺⁺依存性の機構を介するものと考えられる。しかしFK506の刺激により他の血球成分から遊離される凝集抑制物質(好中球由来弛緩物質等)の影響の可能性も否定できない。また血小板凝集の抑制はかなり高濃度のFK506により前処置したと

きのみ認められており、この薬剤が *in vivo* で血小板凝集を抑制するかどうかに関しては今後の研究が待たれる。

論文審査の結果の要旨

代表的な免疫抑制剤の一つ、シクロスポリンA (Cyclosporin A, CyA) は臓器移植の臨床成績を飛躍的に改善したが、血小板凝集惹起物質に対する反応性を増強することによる易血栓形成性という副作用を持つことが知られている。一方、日本で開発され、すでに臨床応用も行われている新しい免疫抑制剤、FK506にはこのような副作用は少ないとされている。イヌでは脈管炎を引き起こしたという報告があるが、これは動物種特異的な反応ではないかと考えられる。申請者は学位申請論文とした研究においては、ヒト血小板の凝集に対する FK506 の作用を *in vitro* の系で検討した。

全血 (0.5ml citrated whole blood + 0.5ml 0.9% NaCl) または多血小板血漿 (PRP、血小板数 250,000 / μ l) を FK506 (0, 1, 5, 10, 50, 100ng/ml) と 37°C で 10 分間 (全血の場合) あるいは 2 分間 (PRP の場合) プレインキュベートした後、凝集惹起物質を加え、3 分後の血小板の凝集が測定された。血小板凝集惹起物質としては、ADP、コラーゲン、リストセチン、ノルアドレナリンおよびセロトニン (5 HT) が用いられた。

実験の結果、FK506 単独では、上記いずれの濃度でも血小板凝集は認められなかった。また、各種血小板凝集惹起物質により誘発される血小板凝集に対しても、実際に臨床で用いられる濃度の FK506 (1 - 10ng/ml) はほとんど影響を及ぼさなかった。50ng/ml、100ng/ml という高濃度の FK506 は、いずれの凝集惹起物質を用いた場合にも、CyA とは逆に血小板凝集を抑制した。以上より、少なくとも易血栓形成性という CyA の副作用は、CyA の代わりに FK506 を用いることにより回避されることが示唆された。

論文委員会では、以上の主論文の内容についての発表と合わせて、CyA と FK506 を両方用いて行った解析の結果、及び免疫抑制剤として CyA (CyA 3.3 ± 1.0mg/kg bw) - プレドニゾン (2.5mg) あるいはアザチオプリン (100 - 150mg) - プレドニゾン (5 - 12.5mg) を用いた計 46 名の腎移植患者の線維素溶解系とセロトニン系の変動の解析の結果も報告された。審査委員会では、この臨床の場での解析の結果も議論の対象とし、次のような質疑、試問を行った。

- 1) FK506 とのプレインキュベーションの時間が全血と PRP で異なる理由
- 2) リストセチンの作用機序
- 3) FK506 共存下では CyA の血小板凝集増強作用が認められないことの原因は、FK506 と CyA の拮抗、FK506 による CyA の作用の抑制、FK506 と CyA の作用の相殺のいずれか
- 4) FK506 による血小板凝集抑制の機序
- 5) FK506 を結合する細胞内蛋白質の有無、あるとすればその蛋白質の機能
- 6) CyA による全血 5 HT 上昇の機構
- 7) CyA 投与患者の血小板にみられる 5 HT レベル及び放出の低下、取り込みの上昇と CyA 投与による全血 5 HT の上昇、CyA の血小板凝集増強作用との関連
- 8) CyA の血小板凝集増強作用の機構及び *in vitro* での CyA、FK506 の血小板凝集に対する作用に及ぼす血管内皮細胞共存の影響
- 9) 統計処理にノンパラメトリック法を用いた理由

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、また研究そのものも、臨床家としての観点から基

礎的実験を行い、免疫抑制剤としての FK506 の適切性評価における一つの懸念を解消した点で有意義と評価された。以上により、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山	新				
	副査	教授	大野	龍三	副査	教授	寺尾	俊彦
	副査	教授	中原	大一郎	副査	講師	田港	朝彦