セルセプトカプセル250
（ミコフェノール酸モフェチル）

適応症追加に関する資料

日本ロシュ株式会社

目　次

イ．起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

ホ-1．効力を裏付ける試験

ホ-2. 一般薬理

略 語 一 覧 表

イ. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

ALG	: antilymphocyte globulin 抗ヒトリンパ球ウマ免疫グロブリン
ATG	: antithymocyte globulin 抗胸腺細胞グロブリン
AZA	: azathioprine アザチオプリン
DNA	: deoxyribonucleic acid デオキシリボ核酸
IL-2	: interleukin-2 インターロイキン-2
MMF	: mycophenolate mofetil ミコフェノール酸モフェチル、RS-61443
OKT-3	: orthoclone OKT3 ムロモナブ-CD3
SCr	: serum creatinine 血清クレアチニン

ホ. 薬理作用に関する資料

ADO	: adenoshine アデノシン
AMP	: adenosine monophosphate アデノシンモノホスフェイト
ATP	: adenosine triphosphate アデノシントリホスフェイト
bFGF	: base fibroblast growth factor 塩基性線維芽細胞成長因子
Con A	: concanavalin A コンカナバリンA
CsA	: cyclosporine A シクロスポリンA
dADO	: deoxyadenosine デオキシアデノシン
dGTP	: deoxyguanosin triphosphate デオキシグアノシントリホスフェイト
dGUO	: deoxyguanosin デオキシグアノシン

DNA : deoxyribonucleic acid
デオキシリボ核酸

GMP : guanosin monophosphate
グアノシンモノホスフェイト

GMPS : guanosin monophosphate synthetase
グアノシンモノホスフェイトシンセターゼ(合成酵素)

GTP : guanosin triphosphate
グアノシントリホスフェイト

GUA : guanine
グアニン

GUO : guanosin
グアノシン

HGPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
ヒポキサンチンーグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ

HLA : human leukocyte antigen
ヒト白血球抗原

IgG : immunoglobulin G
免疫グロブリンG

IgM : immunoglobulin M
免疫グロブリンM

IL-1,-2 : interleukin-1,-2
インターロイキン-1,-2

IMP : inosine monophosphate
イノシンモノホスフェイト

IMPDH : inosine monophosphate dehydrogenase
イノシンモノホスフェイトデヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)

LPS : lipopolysaccharide
リポポリサッカライド

MMF : mycophenolate mofetil
ミコフェノール酸モフェチル、RS-61443

MP : methyl prednisolone
メチルプレドニゾロン

MPA : mycophenolic acid
ミコフェノール酸

PHA : phytohemagglutinin
フィトヘマグルチニン

PRPP : phospho ribosyl pyrophosphate
ホスホリボシルピロホスフェイト

PWM : pokeweed mitogen
ポークウィードマイトジェン

SPAS : staphylococcus protein A sepharose
スタフィロコッカスプロテインAセファロース

SRBC : sheep red blood cells
ヒツジ赤血球細胞

TdR : thymin deoxyriboside
チミジン

XMP : xanthine monophosphate
キサンチンモノホスフェイト

ト. 臨床試験の試験成績に関する資料

ATGAM : antithymocyte globulin
アンチチモサイトグロブリン

BL : border line
ボーダーライン

CMV : cytomegalovirus
サイトメガロウイルス

CRP : C reactive protein
補体反応性蛋白

CGN : chronic glomerulonephritis
慢性糸球体腎炎

FGS : focal glomerular sclerosis
巣状糸球体硬化症

IRB : institutional review board
インスティテューショナルレビューボード

IgG : immunoglobulin G
免疫グロブリンG

IgA : immunoglobulin A
免疫グロブリンA

IgM : immunoglobulin M
免疫グロブリンM

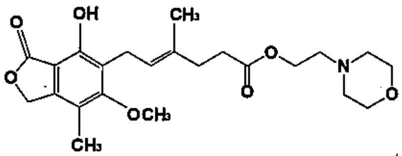
MMF : mycophenolate mofetil
ミコフェノール酸モフェチル、RS-61443

OKT-3 : orthoclone OKT3
ムロモナブ-CD3

PC : pneumocystis carinii pneumonia
カリニ肺炎

QOL : quality of life
クオリティーオブライフ

輸　入

	項　　目	既承認内容	一部変更申請内容 （下線部分が今回追加事項）
1	販　売　名	セルセプトカプセル250	変更なし
2	一　般　名	ミコフェノール酸モフェチル	変更なし
3	本質・構造式	 化学名：(*E*)-6-(1,3-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-6-メトキシ-7-メチル-3-オキソイソベンゾフラン-5-イル)-4-メチル-4-ヘキセン酸 2-モルホリノエチルエステル	変更なし
4	申請者名	日本ロシュ株式会社	変更なし
5	成分・分量	1カプセル（内容量302.11 mg）中 有効成分 ミコフェノール酸モフェチル 250 mg含有	変更なし
6	用法・用量	通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして1回1,500 mgを1日2回12時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減する。	<u>腎移植後の難治性拒絶反応の治療の場合</u> 通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして1回1,500 mgを1日2回12時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減する。 <u>腎移植後の拒絶反応の抑制の場合</u> <u>通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして1回1,000 mgを1日2回12時間毎に食後経口投与する。</u> <u>なお、年齢、症状により適宜増減するが、1日3,000 mgを上限とする。</u>
7	効能・効果	腎移植後の難治性拒絶反応の治療 （既存の治療薬が無効又は副作用のため投与できず、難治性拒絶反応と診断された場合）	腎移植後の難治性拒絶反応の治療 （既存の治療薬が無効又は副作用のため投与できず、難治性拒絶反応と診断された場合） <u>腎移植後の拒絶反応の抑制</u>
8	備　　考	希少疾病用医薬品	

イ．起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

イ．起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

1．本申請の概略

本申請は 1999 年 9 月 22 日付けにて、腎移植後の難治性拒絶反応の治療を効能・効果として承認を受けた「セルセプトカプセル 250」に、腎移植における拒絶反応の抑制を追加するための一部変更承認申請である。

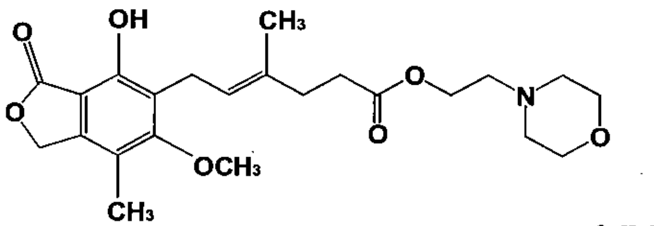
この効能追加のため、用法・用量の再検討を行い別に設定した。申請内容を以下にまとめる。

項目	既承認内容	一部変更申請内容
効能・効果	腎移植後の難治性拒絶反応の治療 （既存の治療薬が無効又は副作用等のため投与できず、難治性拒絶反応と診断された場合）	腎移植後の難治性拒絶反応の治療 （既存の治療薬が無効又は副作用等のため投与できず、難治性拒絶反応と診断された場合） 腎移植後の拒絶反応の抑制
用法・用量	通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして 1 回 1,500 mg を 1 日 2 回 12 時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減する。	○腎移植後の難治性拒絶反応の治療の場合 通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして 1 回 1,500 mg を 1 日 2 回 12 時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減する。 ○腎移植後の拒絶反応の抑制の場合 通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして 1 回 1,000 mg を 1 日 2 回 12 時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減するが、1 日 3,000 mg を上限とする。

下線部分が今回の追加申請部分

2. 起原又は発見の経緯

セルセプトカプセル 250 の有効成分である RS-61443（ミコフェノール酸モフェチル、図イ-1。以下 MMF という）はミコフェノール酸（以下 MPA という）のプロドラッグであり、MPA のバイオアベイラビリティーの改善を目的として米国シンテックス社（現ロシュ・バイオサイエンス社）にて合成された新規化合物である。MMF はリンパ球の増殖抑制を主作用とするアザチオプリン（以下 AZA という）やミゾリビン等と同様のいわゆる免疫抑制薬の代謝拮抗剤に位置づけられる薬剤である。MMF は、経口摂取後肝臓にて速やかにエステル結合が外れ MPA の薬効を発揮する。MPA は 1896 年に Penicillium 属の発酵生成物のひとつとして発見されて以来、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用及び免疫抑制作用等を有することが確認されている。細胞内の主要なプリン合成は *de novo* 系及び salvage 系であるが、T 及び B リンパ球における核酸合成はそのほとんどを *de novo* 系に依存している。MMF は特にこの *de novo* 系におけるグアノシン一燐酸(以下 GMP という)の産生を選択的、可逆的かつ非競合的に阻害する。従って、MMF は T 及び B リンパ球の核酸合成を抑制し、細胞傷害性 T 細胞の産生あるいは抗体産生能の抑制作用などの免疫抑制作用を発現する。



$C_{23}H_{31}NO_7$:433.50

図イ-1　MMF の構造式

3. 開発の経緯

3-1. 国内の腎移植事情

国内の慢性腎不全患者数は 1997 年現在 175,988 人であり、そのうち 14,986 人が慢性腎不全の根治療法である腎移植を希望しているとの報告がある[1]。1997 年 10 月、臓器移植法が施行され脳死による腎移植も可能となったが、腎移植療法が始められた 1964 年以来 1998 年までの 34 年間の総移植件数は 13,066 件[2]であり、年間 10,000 件を越える施行例があるアメリカと比較するとその数は格段に少ない。

1998 年の国内腎移植は、生体腎移植が 509 件（77.4%）、献腎移植が 149 件（22.6%）の合計 658 件であり、ドナー数の少ない国内では生体腎移植が圧倒的に多い[2]。移植腎機能が維持される限り、移植後患者は透析療法における様々な拘束及び危険性から解放され、通常の社会生活が可能となるばかりでなく、女性患者では妊娠・分娩が可能となる[3)~5)]。しかし、移植患者は生涯免疫抑制療法を継続する必要が有り、免疫抑制剤の調整不良による様々な副作用及び合併症並びに拒絶反応発現に伴なう移植腎機能の低下或いは機能廃絶等の問題を引き起こす可能性がある。国内における腎生着率及び生存率に関する 1983 年以降の集計では、腎移植後 5 年までに約 3 割以上の患者が移植腎機能喪失により透析療法に戻っており、そのうち約 1 割の患者が合併症等により死亡している[6]。また、生体腎移植では ABO 不適合移植を含め免疫学的にリスクが高い血縁間での腎移植が行われており、併用及び用量調整が容易な新たな免疫抑制剤の登場が待ち望まれている。

国内既存の腎移植における拒絶反応の抑制薬としては、ステロイド剤、AZA 及びミゾリビンなどの核酸合成阻害剤、シクロスポリン及びタクロリムスなどのサイトカイン（IL-2）産生阻害剤などがある。1986 年にシクロスポリンが登場した以降は急性拒絶反応の発現頻度が飛躍的に減少したものの、重大な副作用としてシクロスポリンの腎障害が確認され、その使用に際してはトラフレベルの血中濃度を参考

にして投与量を調節する必要がある。拒絶反応のカスケードに関する研究が進められる中、各薬剤の薬理学的特徴を生かし欠点を補う多剤併用による免疫抑制療法が行われている。今日では、サイトカイン（IL-2）産生阻害剤、核酸合成阻害剤及びステロイド剤の三剤併用療法が主流である。海外に比較し、国内では使用できる免疫抑制剤の種類は限定されるものの、主要な免疫抑制剤及び投与方法についての考え方は同様である。しかし、薬剤の使い方は同一ではなく、薬剤の種類、投与量、投与時期、投与期間等の細部については各腎移植実施医療機関において独自に工夫されており、各医療機関独自の投与指針を有している。

一方、急性拒絶反応の発現回数が移植腎の長期生着率を低下させる要件であるという報告[7)、8)]があり、移植腎機能喪失の主要因が急性拒絶反応の発現にあることが指摘[9)~11)]されている。急性拒絶反応は、移植後約1週間から3カ月に発現頻度が高く、その後経日的に減少することが報告[12)]されている。免疫学的には移植腎に対する移植後初期T細胞が関連する細胞性免疫反応に続き、その後活性化されたB細胞が関連する液性免疫反応が起こり拒絶反応が発現する[13)、14)]と考えられている。よって、移植後早期における急性拒絶反応の抑制は、移植患者のQOL向上及び移植腎の長期生着を目指す最も有効な手段であると位置づけられる。なお、急性拒絶反応の治療には、高用量のステロイドやムロモナブ CD3(OKT3)などが用いられているが、MMF は、それら薬剤が無効である難治性の拒絶反応に対する治療薬として1999年9月22日に承認されている。

以上より、急性拒絶反応を抑制し、慢性拒絶への移行を抑えることによる移植腎生着期間の更なる延長が期待されていることから、より効果が高く、腎機能や心血管系に影響の少ない安全な新規免疫抑制剤の開発が待ち望まれている。

引用文献
1) 日本腎臓移植ネットワーク News Letter May(2), p8, 1997.
2) 腎移植臨床登録集計報告(1998)：日本移植学会：移植 34(2)51, 1999.
3) 高橋公太・他：死体腎移植後、双生児を分娩した症例. 移植 16：80, 1981.
4) 高橋公太・他：腎移植患者における妊娠、分娩. 腎と透析 20：588, 1986.
5) 高橋公太・他：腎移植 1,000 例の統計. 奔流, 腎移植壱千例記念集, 東京女子医科大学壱千例記念集, 東京, 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター, p21, 1993.
6) 腎移植臨床登録集計報告：日本移植学会（1994, 中間報告）：移植 30(4)428, 1995.
7) Tesi RJ, Herry ML, Elkhammas EA, Ferguson RM：Predictors of long-term primary cadaveric renal transplant survival; Clin. Transplant. 7:345-352, 1993.
8) Pirsch JD, Ploeg RJ, Gange S, D'Alessandro AM, Knechtle SJ et al.：Determinants of graft survival after renal transplantation; Transplantation 61：1581-1586, 1996.
9) Bassadonna GP, et al., Early versus late acute renal allograft rejection: Impact on Chronic rejection; Transplantation (55)：993-995, 1993.
10) Naimark DMJ, et al., Determinants of long-term renal allograft survival; Transplantation Reviews(8)：93-113, 1994.
11) Cecka JM, Early Rejection：Determinating the fate of renal transplants; Transpl. Proc.(23)：1263-1264, 1991.
12) 永野俊介：拒絶反応（急性、慢性）；腎移植のすべて 臨床透析(6)別冊 p110, 1990.
13) 森田修司：移植腎慢性拒絶後の長期予後と問題点；移植(28)5：513, 1993.
14) 藤原大美（編著）.移植免疫学（中外医学社）.(9)東間紘;腎移植, p193-243, 1992.

3-2. 初回承認取得までの経緯

MMF の薬効薬理試験を含めた各種の動物実験成績より、その免疫抑制効果を確認し、臓器移植後の拒絶反応の抑制効果及び治療効果に関し欧米で臨床開発を進めた。

1990年4月、アメリカにて前臨床試験成績に基づくオープン試験法による臨床試験を開始し、腎移植後の急性拒絶反応に対する抑制効果の検討において MMF の安全性を確認した後、腎移植後の拒絶反応に対する治療及び抑制を適用とした臨床試験を開始した。

1990年12月、アメリカにて動物実験で MMF に急性拒絶反応に対する治療効果を認め、難治性拒絶反応に対する治療効果の検討を目的としたオープン試験法による第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験を実施し、MMF の難治

性拒絶反応治療薬としての有用性を確認した。

1991 年 6 月、アメリカにて腎移植後の難治性拒絶反応に対する治療効果を検討する目的で、ステロイド静脈内投与群を対照とした第Ⅲ相オープン比較試験を実施し、難治性拒絶反応治療に対する MMF の有用性を確認した。

1992 年 8 月、アメリカでの前臨床並びにオープン試験成績に基づき、国内において前期第Ⅱ相試験を実施した。その結果、腎移植後の急性拒絶反応の抑制に関する MMF3,000 mg までの有効性及び安全性を確認した。

1993 年 10 月、国内前期第Ⅱ相試験成績に基づき、腎移植後の難治性拒絶反応に対する治療効果を検討する目的で第Ⅱ相臨床試験を実施し、MMF の難治性拒絶反応に対する治療効果を確認した。

1994 年 7 月 1 日、難治性拒絶反応に対する治療薬としての希少疾病用医薬品の指定を受けた。

1997 年 3 月 19 日、第Ⅱ相臨床試験終了後、医薬品承認申請を行った。

1999 年 9 月 22 日、「腎移植後の難治性拒絶反応の治療」を効能・効果として承認された。

3-3. 追加申請する効能・効果に関する海外の開発経緯

1987 年 6 月、アメリカにおいて MMF の一般薬理、毒性、ADME 及び薬効薬理に関する検討を開始し、その結果、臓器移植後の拒絶反応の抑制に対する有用性が推察された。

1990 年 4 月、アメリカにおいて腎移植患者を対象として、シクロスポリン及びステロイド併用下における MMF の安全性と拒絶反応の抑制効果について検討した。一群 6～7 例の腎移植患者に、MMF100 ～3,500 mg/日を 4 ヶ月間服用させた結果、2,000 mg 以上の用量群において用量依存的な拒絶反応の抑制効果が認められた。一方、重篤な腎毒性、肝毒性、骨髄抑制は認められず、3,500 mg/日までの用量は安全性に優れていることが示唆された。

1992 年 7 月から 8 月にかけ、アメリカ、ヨーロッパ・カナダ・オーストラリア（以下三大陸という）及びヨーロッパを実施地域として、シクロスポリン及びステロイド併用下における MMF 2,000 mg（1,000 mg 1 日 2 回）及び 3,000 mg（1,500 mg 1 日 2 回）服用による腎移植後の急性拒絶反応の抑制効果を検討する目的で、既存薬の AZA を対照としたアメリカ試験（非劣性試験　　　　　　）及び三大陸試験（非劣性試験　　　　　　）、あるいはプラセボを対照としたヨーロッパ試験（優越性試験　　　　　　）の 3 つの二重盲検比較試験を実施した。各試験における一次評価項目は、治療失敗例（移植腎喪失及び死亡あるいはそれら以外の理由による中止例）の総発現率あるいは移植後 6 ヶ月以内の腎生検にて確認された初回急性拒絶反応の発現率であった。その結果、MMF 投与群は 2 つの非劣性試験（対照薬：AZA）及び 1 つの優越性試験（対照薬：プラセボ）の 3 試験において、有意に優れた急性拒絶反応の抑制効果を示した。すなわち、表イ-1 に示すよう MMF 投与群は全ての試験において対照群（AZA またはプラセボ）に比較し移植失敗率を有意($p<0.005$)に低下させた。また、腎生検で証明された急性拒絶反応発現率は、アメリカ、三大陸及びヨーロッパ試験それぞれにおいて、MMF 2,000 mg では 19.8%、19.7%、17.0%、MMF 3,000 mg では 17.5%、15.9%、13.8%であったのに対し、対照群では 38.0%、35.5%、46.4%であり、全ての試験において MMF 投与群は対照群に比較し高い急性拒絶反応抑制率を示した。また、MMF 投与群に比較し対照群では、拒絶反応の組織学的重症度が高く、急性拒絶反応の発現に対し抗リンパ球製剤あるいは高用量のステロイド療法を必要とする症例が多かった。

表イ-1　海外臨床試験主要評価項目の成績

治験の種類	症例数	評価項目	MMF 2,000 mg	MMF 3,000 mg	対照群（AZAまたはﾌﾟﾗｾﾎﾞ）
ｱﾒﾘｶ DBT	497例	症例数	167例	166例	166例
		移植失敗率	31.1%[a]	31.3%[b]	AZA:47.6%
		拒絶反応発現率（95%信頼区間）	19.8%（14.0%～22.6%）	17.5%（12.6%～24.1%）	AZA：38.0%（30.5%～45.8%）
ﾖｰﾛｯﾊﾟ ｶﾅﾀﾞ ｵｰｽﾄﾗﾘｱ DBT	503例	症例数	173例	164例	166例
		移植失敗率	38.2%[c]	34.8%[d]	AZA:50%
		拒絶反応発現率（95%信頼区間）	19.7%（14.0%～26.4%）	15.9%（10.6%～22.4%）	AZA：35.5%（28.3 %～43.3%）
ﾖｰﾛｯﾊﾟ DBT	492例	症例数	165例	160例	166例
		移植失敗率	30.3%[e]	38.8%[e]	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ：56.0%
		拒絶反応発現率（95%信頼区間）	17.0 %（11.6 %～23.6%）	13.8 %（8.8%～20.1%）	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ：46.4%（38.6%～54.3%）

a;p=0.0015 vs AZA, b;p=0.0021 vs AZA,　c;p=0.0287 vs AZA, d;p=0.0045 vs AZA,
e;p≦0.001 vs placebo by Cochran-Mantel-Haenzel test
DBT：二重盲検比較試験
AZA：ｱｻﾞﾁｵﾌﾟﾘﾝ 1～2 mg/kg/日

有害事象の発生率及び種類はいずれの試験においてもほぼ類似しており、リンパ腫／リンパ増殖性疾患は対照群を含めた全投与群に発現したが、消化管障害、白血球減少症及びサイトメガロウイルス感染症等の日和見感染症については、対照群に比較し MMF 投与群、特に 3,000 mg に多く発現していた。一方、全ての試験において MMF 投与群の死亡及び移植腎機能喪失例を除く中止症例が対照群に比較し多い傾向にあり、特に MMF 3,000 mg では有害事象の発現による中止例が多かった。

以上、海外 3 試験の成績より、シクロスポリン及びステロイドとの三剤併用療法における MMF 2,000 並びに 3,000 mg は、AZA 群及びプラセボ対照群に比較し急性拒絶反応の予防に対する有効性が高いことが示された。また、MMF 2,000 及び 3,000 mg に発現した有害事象のプロフィールは、既存療法のプロフィールと比較し十分許容できるものであったが、MMF の 3,000 mg は 2,000 mg に比較して有害事象の発現率が高くなる傾向があり、若干安全性に劣る用量であると考えられた。

1994 年 11 月、アメリカでは MMF に関する上記の 3 つの第Ⅲ相比較試験成績を基に、FDA に対する承認申請を行った結果、1995 年 5 月、同種腎移植患者における臓器拒絶反応の抑制薬として 2,000 mg（1,000 mg 1 日 2 回）を推奨用量として承認された。その後、海外諸国においても 2,000 mg を推奨用量とした腎移植後の臓器拒絶反応の抑制薬としての承認申請が行われ、1999 年 10 月までに世界 77 ヶ国において承認が得られている。

3-4. 追加申請する効能・効果に関する国内の開発経緯

3-4-1. 前期第Ⅱ相試験

1992 年 8 月、アメリカでの臨床試験成績を基に、シクロスポリン及びステロイド併用下における MMF 1,000 ～ 4,000 mg/日投与群、各群 10～12 例における腎移植後の急性拒絶反応に対する抑制効果の検討を目的とした前期第Ⅱ相試験が実施された。その結果、腎移植後の急性拒絶反応に対する抑制効果は MMF の 2,000 mg 以上の用量で認められ、4,000 mg での抑制率は 100%であった。安全性に関しては MMF の 3,000 mg までの用量で特に問題はなかったが、4,000 mg では約半数例が副作用等のため中止・休薬または減量を必要とした。以上、前期第Ⅱ相試験成績における MMF の有効性及び安全性を総合的に評価した結果、MMF の 4,000 mg は安全性にやや問題のある用量と考えられるが、3,000 mg の用量は安全性に特に問題がなく、免疫抑制効果が期待できる用量であると判断した。

3-4-2. 第Ⅲ相試験

1994 年 11 月、前期第Ⅱ相試験成績に基づき、国内での腎移植患者が少数であること及び疾患の重篤性を考慮して厳密な用量設定を行わず、臨床第Ⅲ相試験として、シクロスポリン及びステロイド併用下での MMF3,000 mg と対照薬 AZA とのダブルダミー法による二重盲検比較試験を実施した

。しかしこの試験は、継続投与用として準備したダブルダミー盲検薬剤の製剤試験結果において実薬とプラセボの組み合わせ過誤が判明し、1995 年 11 月に中止した。中止時点において登録されていた 111 例の患者のうち、組み合わせ過誤のあった薬剤が 2 例に使用されていたが、両症例とも臨床経過は良好であり、いずれの容態にも問題がない事を確認した。試験中止後、MMF 群の患者 56 例のうち、MMF を服薬中で予後が良好な患者については、所定の手続きによる治験外継続提供を行った。その後、1996 年 11 月、MMF 服用患者の安全性の確保と倫理的配慮から継続提供中の患者のうち、治験担当医師により MMF の服薬継続が望ましいと判断され、服薬継続を希望する患者について、継続投与時の安全性の検討を目的とした治験として、長期投与試験を開始した 。

1996 年 6 月、第Ⅲ相試験の再実施計画に関する試験実施計画書検討委員会を開催した。この時の海外における MMF 開発状況は、総症例数約 1,500 例を対象とした 3 つの二重盲検比較試験成績において、MMF の 2,000 及び 3,000 mg は両群間に有意差はなかったものの、アザチオプリン群及びプラセボ対照群に比較し急性拒絶反応の抑制に対する有効性が高いことが示されていた。また、発現した有害事象は、既存療法と比較し十分許容できるものであったが、MMF の 3,000 mg は 2,000 mg に比較して有害事象の発現率が高くなる傾向があり、安全性に若干劣る用量であると考えられた。これらの結果より、海外では 2,000 mg（1,000 mg 1 日 2 回）を推奨用量として申請し、アメリカにおいて 1995 年 5 月「同種腎移植患者における臓器拒絶反応の抑制」の適応として承認され発売するに至り、その後世界各国における承認・発売が進んでいた。従って、国内第Ⅲ相試験の再実施計画立案に際しては、中止した第Ⅲ相試験並びに海外第Ⅲ相試験成績を踏まえて検討した。

アメリカでの申請に使用された主な臨床試験は、MMF2,000 及び 3,000 mg の腎移植患者に対する既存薬の AZA を対照としたアメリカ（非劣性試験 ）及び三大陸試験（非劣性試験 ）並びにプラセボを対照としたヨーロッパ試験（優越性試験 ）の 3 つの海外第Ⅲ相二重盲検比較試験であり、何れの試験においても MMF 投与群は有意に優れた急性拒絶反応の抑制効果を示していた。そのため、試験実施計画書検討委員会では、MMF の有効性を検証する意味でのプラセボあるいは既存薬対照を用いる臨床試験を国内で再度実施する意味は少なく、また、欧米における MMF の承認用量が 2,000 mg であったのに対し、国内での前期第Ⅱ相試験成績における MMF の至適用量は 3,000 mg と推察されており、第Ⅲ相試験再実施計画としては、日本人の腎移植患者における MMF2,000 及び 3,000 mg の有効性、安全性及び有用性をより厳密に比較検討すべきであると判断した。

1996 年 11 月、これまでに蓄積された国内外での MMF に関する臨床試験成績を踏まえ、比較対照を設定しない二重盲検比較法（コントローラー： ）による臨床試験を第Ⅲ相臨床試験に位置付け、シクロスポリン及びステロイド併用下での日本人における MMF の 2,000 及び 3,000 mg の 24 週投与における有効性、安全性及び有用性を全国 34 施設にて比較検討した。

総登録症例 140 例のうち、有効性評価対象症例は 2,000 mg 63 例、3,000 mg 62 例の計 125 例であった。本試験の主要評価項目であった腎移植後 24 週間の急性拒絶反応の発現率（拒絶反応抑制効果）は、2,000 mg で 34.9%、3,000 mg で 27.4%であり、発現率としては 3,000 mg が 2,000 mg を上回っていたものの、群間に統計学的有意差は認められなかった。本試験では対照群を設定しなかったが、本試験で得られた拒絶反応発現率は、一般に 40%～50%と言われている腎移植後 1 年以内に発現する急性拒絶反応発現率を下回るものであり、MMF の優れた拒絶反応抑制効果が推察された。また、両群それぞれの生存率は 100%及び 98.4%、移植腎生着率は 98.4%及び 93.5%と良好な成績であったが、生存率、移植腎生着率ともに群間に統計学的有意差は認められなかった。移植腎機能を反映する血清クレアチニン（SCr）値の推移に関し、評価時に 1.5 mg/dL 以下を示した症例は 2,000 mg で 41/63 例(65.1%)、3,000 mg で 45/62 例(72.6%)

と、3,000 mg は僅かに良好な値を示したが、統計学的に有意な差は認めなかった。また、拒絶反応に関する重症度判定に Banff 分類を用いた腎生検標本に対する組織学的検討では、群間に統計学的有意差は認めなかったものの、血管病変を伴ったグレードⅡa 以上の拒絶反応が 2,000 mg では 7 例、3,000 mg では 2 例（いずれも移植腎早期機能不全；Primary non-function）と 3,000 mg では少数であった。安全性評価対象 133 例の評価期間における MMF との因果関係が否定できない有害事象発現数は、2,000 mg で 67 例中 54 例 203 件、3,000 mg で 66 例中 52 例 222 件あり、群間に有意差は認められなかったが、白血球減少に関する発現頻度が 2,000 mg で 18 件、3,000 mg で 29 件と、3,000 mg で高い傾向を示した。白血球減少を含め血球系臨床検査値の減少は MMF の作用機序から十分予測可能な事象であり、これらの事象は MMF の減量、休薬あるいは治療薬投与により速やかに回復しているが、MMF 使用時には、これら血球系の検査値の推移に十分注意する必要がある。また、臓器移植後の免疫抑制下における感染症の発現は十分に予測され、特にサイトメガロウイルス（CMV）感染症が高頻度に認められることが知られており、本試験でも CMV 感染症が多数認められたが、群間に有意な差は認められなかった。さらに、これまでの国内外の臨床成績において MMF は消化器系副作用が高頻度に発現することが報告されていたが、本試験における消化器系副作用は比較的少なく、また、肝機能障害についても特に問題となるような所見はなかった。なお、3,000 mg において突発的なクモ膜下出血による死亡が 1 例あり、その病態より MMF との因果関係は否定的ではあるものの、MMF 服用中の発現事象のため完全には否定する事はできず、「不明」と判定された。

以上、本試験において MMF2,000 及び 3,000 mg はいずれも高い有効性と安全性を認めたが、群間に統計学的有意差は認められなかった。海外第Ⅲ相試験結果では、2,000 mg に比較し 3,000 mg において下痢などの消化管障害、臨床的に重大な白血球減少症及び日和見感染症の発現が増加する傾向を認めたことから、より安全性の高い 2,000 mg を推奨用量としている。一方、国内での腎移植の実状は、生体腎移植が約 80%、死体腎移植が約 20%であり、ほとんどの死体腎移植では、ドナーの心臓停止後に摘出された腎臓が移植されている。海外の腎移植は死体腎移植が約 80%を占めているが、その多くは脳死下で摘出された腎臓が移植されることから、温阻血による細胞障害（生体内での血流停止による障害）を受けず、移植腎機能の発現・回復が早く、生体腎移植に近い状態での移植が行われていると言える。したがって、国内腎移植患者についても、先述の海外第Ⅲ相試験成績における判断と同様、より安全性の高い 2,000 mg を推奨用量と考える。しかしながら、有効性の評価項目として、拒絶反応発現率、Banff 分類による組織学的な拒絶反応の程度、拒絶反応発現による中止例数の有効率はいずれも 3,000 mg の方が上回っていたことから、より高い有効率を期待する場合における 3,000 mg は、白血球減少などの有害事象の発現頻度に傾注することにより、十分使用可能な価値ある用量であると考える。

なお、本試験実施計画書では 24 週間の評価期間終了後もフォローアップ期間として MMF の継続投与を可能とした。フォローアップは 24 週間の評価期間を終了した 105 例中 94 例が実施し、その成績については移植腎の予後及び安全性に関する情報を集計・検討した。フォローアップ期間は最長 952 日（約 2.6 年）であり、MMF の投与期間は 24 週間の評価期間も含め最長約 3 年であった。その結果、フォローアップ期間における移植腎の予後は良好であり、拒絶反応発現頻度も大きく低下しており、MMF の有効性が確認された。一方、フォローアップ期間中に新たに認められた有害事象 85 例 373 件はすべて既知の事象であり、その発現頻度は 24 週間の評価期間の成績と比較し、MMF に特徴的な事象を含めほとんどの事象において低下していた。また、治験担当医師による概括安全度判定は、24 週間の評価期間とほぼ同様の結果であった。このように、本フォローアップ期間の成績は、MMF を長期継続投与する上で容認できる範囲のものであったと判断され、腎移植後 24 週から約 3 年までの限られた期間での成績ではあるが、MMF の長期継続投与は拒絶反応の抑制ならびに移植腎の長期生着と患者の QOL の向上に貢献できると考える。

3-4-3. 長期投与試験

移植患者では、拒絶反応の抑制及び移植臓器を長期に生着させる目的で、免疫抑制剤を生涯服用する必要がある。一方、移植後安定した免疫抑制状態にある患者の薬剤を変更することは、免疫抑制のバランスを崩し、拒絶反応及び副作用を誘発するリスクがある。そこで 1992 年 9 月、MMF の長期投与時の安全性及び有効性を検討することを目的とした長期投与試験(MYCc26;J015293)を開始した。本試験には、急性拒絶反応の抑制に関する前期第Ⅱ相試験から 36 例（抑制群）、難治性拒絶反応の治療に関する臨床第Ⅱ相試験から 29 例（治療群）及び治験外提供から移行された 1 例の 66 例が登録された。MMF の投与量は原則として先行試験の用量を維持することとしたが、安全性と有効性を考慮し 1,000～4,000 mg/日の用量範囲内で変更可とした。これらの症例における試験終了日（1999 年 12 月 31 日）、すなわち MMF 投与開始後最長 8 年目までの長期成績について検討した。

症例取り扱い検討の結果、有効性（移植腎の予後）評価対象は 54 例、安全性評価対象は、治験外提供から移行された 1 例を除く 65 例であったが、先行試験における対象の投与前提条件が、移植直後から急性拒絶反応の抑制を目的として投与された群（抑制群）と、難治性拒絶反応の治療として投与が開始された群（治療群）と、対象の条件が異なる状況があった。よって、有効性については抑制群の 34 例及び治療群の 20 例に区分し、安全性については抑制群の 36 例及び治療群の 29 例に区分して検討した。

その結果、抑制群（先行試験で 1,000～4,000 mg/日群）では、3,000 及び 4,000 mg/日群において長期試験移行後の MMF の投与量が、投与開始後 1 年から 2 年にかけて徐々に減少する傾向があった。一方、1,000 mg 群では MMF の投与量は増加する傾向があったが、1,000、3,000 及び 4,000 mg/日群における 2 年目以後の MMF の投与量は、1,500～2,500 mg/日の範囲で維持されていた。2,000 mg 群では移行後の期間を通じて投与量の変動は小さく、移行後も平均 2,000 mg/日前後で維持されていた。最終評価時の生存率は 97.1%（33/34 例）、移植腎生着率は 91.2%（31/34 例）、Kaplan-Meier 法による累積生着率は 83.5%であった。各評価年での血清クレアチニン値平均値は 1.2～1.4 mg/dL であり、最終評価時に 3.0 mg/dL 未満だった症例は 34 例中 31 例(91.2%)と、多くの症例において良好な移植腎機能の維持が確認された。拒絶反応について、先行試験を含めた期間における拒絶反応発現率は 29.4%（10/34 例;15 件）であり、うち、本試験移行後の発現率は 8.8%（3/34 例;5 件）と移行後の拒絶反応発現率は減少を示し、MMF 長期投与における拒絶反応の抑制効果が確認された。基礎併用薬であるシクロスポリン及びステロイドの投与量について、シクロスポリンの平均投与量は、先行試験終了時で 244.3 mg/日、投与 5 年目では 138.1 mg/日、投与 7 年目では 125.0 mg/日と徐々に減少し、ステロイドの平均投与量についても同様に、先行試験終了時が 11.2 mg/日、投与 5 年目が 6.1 mg/日、投与 7 年目が 4.7 mg/日と徐々に減少する傾向があった。有害事象は 36 例全例に合計 597 件認められ、うち副作用（因果関係が否定できない有害事象）の発現率は 83.3%(30/36 例；454 件）であった。これらは全て予測可能な事象であり、ほとんどの事象で症状の回復（消失・軽快）が認められた。器官分類別の主な副作用として、代謝・栄養障害、消化管障害、皮膚・皮膚付属器障害、呼吸器系障害、一般全身障害、白血球・網内系障害、抵抗機構障害、泌尿器系障害、肝臓・胆管系障害、赤血球障害等の発現頻度が比較的高かった。また、副作用による投与中止は 22.2%（8/36 例）であった。

治療群（先行試験で 3,000 mg/日群）の MMF の投与量は試験期間を通じ変動は小さく、平均 2,000 mg 前後で維持される傾向を認めた。投与期間中の死亡例は認められず、生存率は 100%、最終評価時移植腎生着率は 85.0%（17/20 例）、Kaplan-Meier 法による移植腎の累積生着率は 72.7%であった。機能廃絶の原因は慢性拒絶反応及び原疾患の再発であった。最終評価時の血清クレアチニン値が 3.0 mg/dL 未満の症例は 13/20 例（65.0%）、3.0 mg/dL 以上の症例が 4 例、移植腎機能廃絶のため透析を必要とする症例が 3 例認められた。各評価年毎の血清クレアチニン平均値は 1.5～2.3 mg/dL であり、治療群は対象が既存の治療薬が無効である難治性拒絶反応の発現により移植腎の状態が一度悪化した症例であるが、その半数以上の症例において良好な移植腎機能が確認された。先行試験を含めた投与期間における拒絶

反応発現率は 50.0%（10/20 例；11 件）であり、11 件中 7 件（6 例）は慢性拒絶反応であった。本試験移行後の拒絶反応発現率は、40.0%（8/20 例）8 件であり、これら拒絶反応の Kaplan－Meier 法による初回拒絶反応累積発現率は 53.9%であった。併用薬であるシクロスポリン及びステロイドの投与量について、シクロスポリンの投与量は期間を通じてほぼ一定に推移していた。ステロイドの投与量は若干ではあるが減少傾向がみられた。有害事象は 29 例全例に合計 468 件認められ、うち副作用の発現率は 89.7%(26/29 例；428 件)であった。これらは全て予測可能な事象であり、ほとんどの事象で症状の回復（消失・軽快）が認められた。器官分類別の主な副作用として、代謝・栄養障害、抵抗機構障害、赤血球障害、消化管障害、一般全身障害、呼吸器系障害、白血球・網内系障害及び皮膚・皮膚付属器障害等の発現頻度が比較的高かった。また、副作用による投与中止は 6.9%（2/29 例）であった。

以上の成績より、長期試験移行後において特異な副作用もなく、また、移植直後から MMF を服用した場合の生着率並びに移植腎機能は良好に維持されており、長期使用における MMF の安全性及び有効性が確認された。

4. まとめ

国内前期第Ⅱ相試験成績において、MMF は用量依存的な有効性及び 3,000 mg までの安全性を示した。国内第Ⅲ相試験では、腎移植後の急性拒絶反応の抑制に関する MMF の有効性・安全性を考慮し、至適用量を 2,000 mg と推察し、さらに 3,000 mg の有効性も確認した。また国内長期試験では抑制群及び治療群における MMF の高い有効性・安全性が確認され、その長期使用での投与量は 1,500～2,500 mg の範囲に調整されていた。なお、表イ-2 に国内臨床試験における拒絶反応発現率を示した。

以上より、MMF は急性拒絶反応を十分抑制し長期移植腎生着を可能とする有用な薬剤であると考え、下記の内容にて効能・効果及び用法・用量につき追加承認申請を行うこととした。MMF の開発年譜表を表イ-3 に示す。

申 請 品 目：セルセプトカプセル 250
効能・効果：腎移植後における拒絶反応の抑制
用法・用量：腎移植後の拒絶反応の抑制の場合
通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして 1 回 1,000 mg を 1 日 2 回 12 時間毎に食後経口投与する。
なお、年齢、症状により適宜増減するが、1 日 3,000 mg を上限とする。

表イ-2　拒絶反応発現率の成績

治験の種類	症例数	拒絶反応発現率（95 %信頼区間）			
		MMF 投与群			
		1,000 mg	2,000 mg	3,000 mg	4,000 mg
国内前期第Ⅱ相オープン	38 例	75.0%（9/12 例） (42.8%～94.5%)	44.4%（4/9 例） (12.2%～73.8%)	20.0%（2/10 例） (2.5%～55.6%)	0%（0/7 例） (0 %～30.8%)
国内第Ⅲ相 DBT	125 例	—	34.9%（22/63 例） (23.3%～48.0%)	27.4%（17/62 例） (16.9%～40.2%)	—
国内長期投与オープン	54 例	抑制群：8.8%（3/34 例）、治療群：40.0%（8/20 例）			

表イ-3　RS-61443の開発年譜表

5. 追加申請する理由

MMF の免疫抑制作用については、希少疾病用医薬品として先に承認されている「腎移植後の難治性拒絶反応の治療」に関する申請資料によって確認されているが、急性拒絶反応の抑制薬として以下の医療上の有用性が認められる事により、追加申請するものである。

1）欧米で既に承認されている MMF の第Ⅲ相臨床試験における拒絶反応発現率は 13.8%（3,000 mg）～19.8%（2,000 mg）であり、対照群における拒絶反応発現率 35.5%（AZA）～46.4%（プラセボ）を有意に上回っていた。一方、国内臨床試験における拒絶反応発現率は 20.0%（3,000 mg）～34.9%（2,000 mg）であり、シクロスポリンをベースとした既存療法における拒絶反応発現率 52.4%[1)] に比較し、より有効性の高い免疫抑薬剤であると言える。

引用文献 1) 落合武徳 他：腎移植における FK506(tacrolimus)の第Ⅲ相比較試験成績 移植：29 (6) 650−681, 1994

2）急性拒絶反応の発現は、移植腎の長期成績に重大な悪影響を及ぼす事が報告されているが、MMF の最長 8 年目の投与例を含む国内長期投与試験（抑制群と治療群の総計）における最終評価時（最終年次の評価時あるいは投与中止時）の生存率は 98.1%（53/54 例）、生着率は 88.9%（48/54 例）であり、既存療法に比較しより有用性の高い免疫抑制薬剤であると言える。

3）MMF は多剤併用免疫抑制療法において血中濃度測定あるいは血中トラフ値測定などのモニタリングによる微妙な用量調節を必要とせず、また主な副作用である消化管障害及び CMV 感染症等は減量あるいは休薬により回復可能であり、かつ 1 回 4～6 カプセル経口服用のため減量が容易であることから、使用法が平易で安全性の高い薬剤であると言える。

4）MMF は、現在臨床で主流のシクロスポリン及びステロイド等との多剤併用免疫抑制療法において、それら免疫抑制剤の使用量の低減を可能とし、その低減によって併用薬剤特有の副作用である腎毒性及び心血管系障害の発現が軽減されることが予想されることから、有用性に優れた可能性を有する薬剤であると言える。

なお、既に承認を受けている難治性拒絶反応に対する治療の適応については、その投与量が抑制に用いる投与量を上回る事から、両適応における用法・用量の混乱を避けるため、そのまま残すこととした。

6. 特徴及び有用性

6-1. 薬理学的特徴

(1) T リンパ球及び B リンパ球の DNA 合成を選択的に阻害する

MMF は DNA 合成の *de novo* 系における律速酵素であるイノシンモノホスフェイト脱水素酵素とそれに続く反応ステップを触媒するグアノシンモノホスフェイト合成酵素を強力かつ可逆的、特異的に阻害する。その結果、DNA 合成を主として *de novo* 系に依存する T リンパ球及び B リンパ球の合成を選択的に阻害する。DNA 合成を salvage 系にも依存するとされる他の細胞系、例えば線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞、睾丸に対する作用は弱い。

(2) 急性拒絶反応に対する治療効果を有する

臓器移植後に発現した進行性急性拒絶反応（イヌ腎移植、ラット心移植）に対する治療効果が認められた。

(3) 急性拒絶反応に対する抑制効果を有する

イヌ腎臓同種移植において生着期間を延長し、それぞれ単独では効果のない用量のシクロスポリン、メチルプレドニゾロンとの三剤併用はMMFの免疫抑制作用を増強した。ラット心臓同種移植で生着期間の延長、マウス膵島同種移植で生着期間の延長とトレランスの誘導が認められた。

(4) 血管病変を予防する

各種脈管炎モデルで、冠状動脈炎、内膜増殖、内膜肥厚を抑制し、血管病変を予防した。

6-2. 臨床的特徴

6-2-1. 初回申請時の臨床試験成績から得られた特徴及び有用性

(1) 難治性拒絶反応に対する治療効果を有する

はじめ全国8施設で実施されたOKT-3またはALG等に無効又はこれらの薬剤が使用困難と判断された腎移植後のいわゆる難治性拒絶反応を有する患者 41 例に対する臨床試験で、血清クレアチニン値の推移を指標とした治療効果の評価において、難治性拒絶反応と診断され、有効性評価対象となった 26 例中 18 例 (69.2%) が著効または有効と判定された。アメリカで実施された難治性拒絶反応に対する第I/II相試験で 77 例中 52 例 (67.5%) に治療効果が認められた。第III相試験としてアメリカで実施されたステロイド静脈内投与を対照とした無作為割付オープン比較試験では、投与 28 日後の評価において MMF 群は 77 例中 53 例 (68.8%) に完全寛解または部分的寛解が認められ、有効率に有意差はなかったがステロイド静注群で認められた 73 例中 40 例 (57.2%) を上回った。

(2) 拒絶反応の再発を抑制し、移植腎の生着率を向上させる

国内で実施された臨床試験で 12 週間の投与期間中に拒絶反応の再発をきたした症例は 26 例中 4 例 (15.4%)、移植腎の機能廃絶に至った症例は 26 例中 3 例 (11.5%) であった。アメリカで実施された第III相臨床試験における移植腎喪失例または死亡例は、MMF 投与群で 77 例中 11 例 (14.3%)、ステロイド静注群で 73 例中 19 例 (26.0%) であり、群間に有意差は認められなかったが MMF 投与による移植腎生着率の向上が示唆された。

なお試験方法は異なるが、拒絶反応治療薬として使用されている OKT-3 はステロイドパルス療法等で寛解しない拒絶反応を対象とした臨床試験で、寛解率 94.8% (92/97 例) と優れた治療効果が認められているが、有効性評価判定後 2 週間以内及び 3 ヶ月以内の急性拒絶反応再発率がそれぞれ 37.0% (34/92 例)、53.3% (49/92 例) と高いことが報告されている。

(3) 類薬と比較して重篤な副作用が少ない

国内で実施された難治性拒絶反応の治療を対象とした臨床試験において 41 例中 21 例 (51.2%) に 41 件の副作用が発現した。主な症状は、下痢 13 例 (31.7%)、食欲不振 3 例 (7.3%) 等の消化器系障害及び貧血 10 例 (24.4%)、白血球減少 5 例 (12.2%) 等の血液障害であった。副作用のため投与を中止した症例はいずれも消化器系症状による 5 例で、中止後速やかに回復した。その他の症状は休薬または投与量の減量及び対症療法で回復した。また、アメリカの臨床試験において発現した副作用は主として消化器系障害及び血液障害であった。

MMF では、類薬と比較して消化器系症状の副作用が多くみられ、次に血液系障害が多く、肝障害、腎障害等の副作用は少なかった。

6-2-2. 今回の追加臨床試験成績より得られた特徴及び有用性

(1) MMF は腎移植後の急性拒絶反応の抑制効果を有する。

腎移植後の急性拒絶反応に対する抑制効果の検討を目的としたシクロスポリン及びステロイド併用による前期第Ⅱ相試験において、MMF は 2,000 mg 以上の用量で拒絶反応抑制効果を示し、4,000 mg では 10 例全例に急性拒絶反応の発現を認めなかった。また、シクロスポリン及びステロイド併用による第Ⅲ相二重盲検比較試験では、MMF 2,000 及び 3,000 mg の 24 週投与における急性拒絶反応発現率は、2,000 mg で 34.9%、3,000 mg で 27.4%であり、3,000 mg が、より強い抑制効果を示した。これら国内第Ⅲ相試験おける急性拒絶反応発現率は、海外の第Ⅲ相試験成績と同様の成績であり、海外第Ⅲ相試験成績では、MMF は対照群（AZA 及びプラセボ）に比較し有意な急性拒絶反応の抑制効果を示している。

(2) MMF の継続服用により生着率を向上する。

移植直後から MMF を長期に服用した抑制群における試験終了時(最長 7.4 年)の移植腎生着率は 91.2%（31/34 例）、Kaplan-Meier 法による累積生着率は 83.5%であり、既存薬の臨床試験成績[1)~3)]を上回る生着率の向上が確認された。

引用文献 1) 打田和治、他:腎移植における FK - 506(tacrolimus)の長期投与成績. 移植 29(6)632-649, 1994
2) シクロスポリン研究会：多施設共同研究による腎移植におけるシクロスポリンの臨床評価に関する研究. 移植 20:suppl.399-421、1985
3) 稲生綱政、他：腎移植における Bredinin の免疫抑制効果. 移植 17:suppl.547-561, 1982

(3) MMF は類薬と比較し肝、腎、神経系に対する副作用の発現は少ない。

今回の追加申請にかかわる国内臨床試験における主要な有害事象の発現状況は、表イ-4 に示すよう、下痢 23 例(9.6%)、食欲不振 9 例(3.8%)、、嘔吐または嘔気・嘔吐 8 例(3.3%)悪心または嘔気 2 例(0.8%)等の消化器系障害及び白血球減少(症)47 例(19.6%)、貧血 30 例(12.5%)、血小板減少 4 例(1.7%)顆粒球減少(症)1 例(0.4%)等の血液障害など、初回承認申請時とほぼ同様であり、肝機能障害は 2 例(0.8%)、腎障害は発現しなかった。また、これら MMF 投与群において発現した副作用は、減量あるいは休薬することにより更なる継続投与が可能であった。よって、本剤は他の免疫抑制剤と比較して消化器系症状の副作用、次いで血液系障害が多くみられたが、他の免疫抑制剤において見られる肝臓、腎臓あるいは神経系に対する重篤な有害事象は少なかった。

表イ-4 MMFの主な有害事象に関する類薬との発現率との比較

	MMF												アザチオプリン*
	治療適応（承認済み）		抑制適応										
			前期第Ⅱ相試験		第Ⅲ相試験		長期投与試験				合計		
							抑制群		治療群				
評価対象症例	41例		42例		133例		36例		29例		240例		270例
感染症発現症例	9	22.0%	4	9.5%	50	37.6%	21	58.3%	17	58.6%	92	38.3%	0.1～5%未満
消化器系障害 下痢	13	31.7%	1	2.4%	6	4.5%	6	16.7%	10	34.5%	23	9.6%	消化器系症状 5% 以上
食欲（食思）不振	3	7.3%	3	7.1%	4	3.0%	0	－	2	6.9%	9	3.8%	
悪心または嘔気	1	2.4%	1	2.4%	0	－	1	2.8%	0	－	2	0.8%	
嘔吐または嘔気・嘔吐	1	2.4%	2	4.8%	5	3.8%	1	2.8%	0	－	8	3.3%	
血液障害 貧血**	10	24.4%	3	7.1%	14	10.5%	4	11.1%	12	41.4%	30	12.5%	血液障害 5% 以上
白血球減少(症)	5	12.2%	2	4.8%	38	28.6%	5	13.9%	2	6.9%	47	19.6%	
顆粒球減少(症)	1	2.4%	0	－	0	－	0	－	1	3.4%	1	0.4%	
血小板減少	0	－	0	－	3	2.3%	1	2.8%	0	－	4	1.7%	
肝機能障害	1	2.4%	0	－	0	－	2	5.6%	0	－	2	0.8%	肝障害 0.1～5% 未満
GOT 上昇	1	2.4%	4	9.5%	6	4.5%	3	8.3%	0	－	13	5.4%	
GPT 上昇	1	2.4%	6	14.3%	14	10.5%	3	8.3%	0	－	23	9.6%	
腎障害 急性腎不全	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	0	0.0%	腎障害 －
腎盂炎	0	－	0	－	0	－	2	5.6%	1	3.4%	3	1.3%	
腎盂腎炎	0	－	0	－	0	－	1	2.8%	1	3.4%	2	0.8%	
血清尿酸値上昇	0	－	6	14.3%	24	18.0%	15	41.7%	11	37.9%	56	23.3%	
その他 発熱	3	7.3%	4	9.5%	1	0.8%	1	2.8%	1	3.4%	7	2.9%	0.1% 未満
振戦	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	0.1% 未満
呼吸困難	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	0.1% 未満
骨髄機能抑制	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－	重篤、頻度不明
間質性肺炎	0	－	0	－	1	0.8%	0	－	0	－	1	0.4%	0.1% 未満

*：添付文書より引用、－：記載なし
**：貧血に関して抑制適応－第Ⅱ相試験及び第Ⅲ相試験では、赤血球減少、ヘモグロビン減少、ヘマトクリット値減少の何れかが認められた症例は貧血として集計した。

7. 外国における使用状況

7-1. 承認状況

1995 年 5 月にアメリカでの最初の承認に続き、1999 年（平成 11 年）10 月現在までの海外承認状況は以下の通りである。各国ともアメリカの申請に使用された臨床試験資料と同一の資料を用い「腎移植後の拒絶反応の抑制」及び「難治性拒絶反応の治療」に関する適応申請を行っていた。しかし「難治性拒絶反応の治療」に関する適応に対し治験の追加が示唆されたため、アメリカでは「治療」の適応審査に時間を要する事による「抑制」適応の承認の遅れを危惧し、「治療」の適応申請を取り下げたことにより、カナダ、ニュージーランド、欧州各国でも「難治性拒絶反応の治療」の適応を取り下げており、それらの国では「腎移植後の拒絶反応の抑制」のみが審査され承認に至っている。

なお、心臓移植後の拒絶反応の抑制についても1998年2月のアメリカでの承認を初めとして、世界26ヶ国で承認されている。

	国名	適応症		
		腎臓移植		心臓移植
		治療	予防	
1	ペルー	○	○	
2	バングラディシュ	○		
3	ブラジル	○	○	○
4	フィリピン	○	○	
5	アルゼンチン	○	○	
6	ブルガリア	○	○	
7	中国	○	○	
8	タイ	○	○	
9	キュラソー	○	○	
10	グアテマラ	○	○	
11	エストニア	○	○	
12	韓国		○	
13	米国		○	○
14	スイス		○	○
15	カナダ		○	○
16	オーストリア	○	○	○
17	ベルギー	○	○	○
18	デンマーク		○	○
19	フィンランド		○	○
20	フランス		○	○
21	ドイツ		○	○
22	ギリシャ		○	○
23	イタリア		○	○
24	ルクセンブルグ		○	○
25	オランダ		○	○
26	ポルトガル		○	○
27	スペイン		○	○
28	スウェーデン		○	○
29	英国		○	○
30	ニュージーランド		○	○
31	チェコ共和国		○	○
32	クウェート		○	
33	ハンガリー	○	○	○
34	アルバ	○	○	
35	オーストラリア	○	○	
36	バーレーン		○	
37	チリ	○	○	
38	コロンビア	○	○	

	国名	適応症		
		腎臓移植		心臓移植
		治療	予防	
39	コスタリカ	○	○	
40	キプロス	○	○	
41	ドミニカ共和国	○	○	
42	エジプト	○	○	
43	ホンジュラス	○	○	
44	ジャマイカ	○	○	
45	リトアニア	○	○	
46	ニカラグア	○	○	
47	ノルウェー		○	
48	ポーランド	○	○	
49	ルーマニア	○	○	
50	シンガポール	○	○	
51	スロバキア	○	○	
52	台湾	○	○	○
53	ウクライナ	○	○	
54	アラブ首長国連邦		○	
55	ウルグアイ	○	○	
56	ユーゴスラビア	○	○	
57	モルドバ共和国	○	○	
58	ロシア共和国	○	○	
59	クロアチア	○	○	
60	エクアドル	○	○	
61	エール		○	○
62	エルサルバドル	○	○	
63	香港	○	○	○
64	イラク		○	
65	イスラエル		○	
66	ラトビア	○	○	
67	マレーシア		○	
68	メキシコ	○	○	
69	グルジア	○	○	
70	パナマ	○	○	
71	南アフリカ共和国		○	
72	インドネシア	○	○	
73	ベラルーシ	○	○	
74	ヨーロッパ連合		○	○
75	インド	○	○	○
76	ネパール	○		
77	トルコ		○	

7-2. 海外添付文書との比較

項目	追加申請内容	米国添付文書骨子	欧州共用添付文書骨子
効能・効果	**腎移植後の難治性拒絶反応の治療** （既存の治療薬が無効又は副作用のため投与できず、難治性拒絶反応と診断された場合） **腎移植後の拒絶反応の抑制**	腎及び心臓移植：セルセプトの適応は同種腎移植患者及び同種心臓移植患者における臓器拒絶反応の予防である。セルセプトは cyclosporine 及び副腎皮質ステロイドと同時に使用する。	本剤は、シクロスポリン及びコルチコステロイドと併用し、同種腎移植または同種心臓移植を受けた患者の急性拒絶反応の予防に用いる。
用法・用量	**腎移植後の難治性拒絶反応の治療の場合** 通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして1回1,500mgを1日2回12時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減する。 **腎移植後の拒絶反応の抑制の場合** 通常成人にはミコフェノール酸モフェチルとして1回1,000 mgを1日2回12時間毎に食後経口投与する。 なお、年齢、症状により適宜増減するが、1日3,000 mgを上限とする。	セルセプトの初回投与は腎または心臓移植後可能な限り速やかに経口投与で行う。腎移植患者に投与する場合には，1,000 mgの1日2回投与(1日2,000 mg)が推奨される。臨床試験では1,500 mgの1日2回投与(1日3,000 mg)が用いられ，安全かつ有効であることが示されてはいるが，腎移植患者に対する1日2,000 mgより優れた有効性は立証されなかった。1日2,000 mgのセルセプトが投与された患者は，1日3,000 mg のセルセプトが投与された患者より良好な全般的な安全性を示した。 心臓移植患者に投与する場合には，1,500 mgの1日2回投与(1日3,000 mg)が推奨される。 食物は MPA の AUC に影響を与えなかったが，MPA の Cmax を 40％減少させることが明らかにされている。セルセプトは空腹時に投与することが望ましい。	<u>腎移植患者への投与</u>：本剤の初回投与は、移植術後72時間以内に経口により行うこと。腎移植患者の推奨用量は、1.0 g 1日2回（1日用量2 g）である。臨床試験により1日用量として2 g及び3 gが検討されたが、腎移植患者では3 gを投与した場合の有効性の利点は確立できなかった。腎移植では、本剤を1日2 g投与した患者が3 g投与した患者に比して、全般的に良好な安全性を示した。 <u>心臓移植患者への投与</u>：本剤の初回投与は、移植術後5日間以内に経口により行うこと。心臓移植患者の推奨用量は、1日2回1.5 g（1日用量3 g）である。 <u>小児への投与</u>：小児患者における安全性及び有効性は確立されていない。小児腎移植患者の薬物動態データはきわめて少ない。小児心臓移植患者のデータは報告されていない。 <u>高齢者への投与</u>：腎移植患者の推奨用量1.0 g 1日2回及び心臓移植患者の推奨用量1.5 g 1日2回は、高齢者にも適用される。主な腎移植試験（7％、n=73）及び心臓移植試験（7％、n=20）において本剤により治療した高齢患者は少数であるが、この推奨用量はこれらの治験結果に基づいている。この年齢群の患者は全般的に、中年・若年患者に比して有害事象のリスクが増大している可能性があり、多剤による免疫抑制療法の一部として本剤を投与する患者についてもリスクの増大が考えられる（「4.8望ましくない作用」の項参照）。 <u>腎障害患者への投与</u>：重度の慢性腎障害（糸球体濾過率<25 ml/min/1.73 m^2）を来した腎移植患者では、移植直後の投与は避け、1.0 g 1日2回を超える用量を投与しないこと。このような患者は慎重に経過を観察すること。術後の移植腎機能発現に遅延がみられる患者に対して、用量を調節する必要はない 重度の慢性腎障害を来した心臓移植患者のデータは報告されていない。 <u>重度肝障害患者への投与</u>：肝実質性疾患を来した腎移植患者に対して、用量を調節する必要はない。重度の肝実質性疾患を来した心臓移植患者のデータは報告されていない。 <u>その他の使用上の考慮</u>：好中球減少（絶対好中球数<$1.3\times10^3/\mu l$）がみられる場合は、医師は適切な診断テストを行い、患者を適切に管理し、本剤の中断を考慮すること。

8. 同種同効品一覧表

腎移植後の拒絶反応の抑制を適応症として承認されている同種・同効品を表イ-5に示す。

表イ-5　同種同効品一覧表

ホ．薬理作用に関する資料

薬効薬理試験成績一覧表

試験項目	サンプル (例数)	投与量 (mg/kg) 投与経路	成績
ミコフェノール酸（MPA）の作用機序			
IMPDH 活性抑制作用	リコンビナント IMPDH イソ酵素（n＝3）	In vitro MPA	イソ酵素　Ki（nM） Type I　33±0.8 Type II　7±0.6
ヒト末梢血リンパ球のグアニンヌクレオチド含量に対する作用	ヒト T、B リンパ球、単球	In vitro MPA 10^{-6}～5×10^{-5} M	GTP 含量を減少
リンパ球およびその他の細胞の増殖反応に対する MPA の選択的抑制作用	T 及び B リンパ球	In vitro MPA 10^{-8}～10^{-5} M	各種マイトジェンで刺激した細胞の増殖作用を MPA は IC_{50}=30～80nM と強力に抑制
	T 及び B リンパ球および単球	In vitro MPA 10^{-9}～10^{-6} M	T 及び B リンパ球および単球系細胞株に対し MPA は IC_{50}＝0.2～5.0 nM と強力に増殖抑制
	ヒト線維芽細胞、内皮細胞	In vitro MPA 10^{-8}～10^{-5} M	IL-1α/b FGF で刺激した線維芽細胞では 10^{-6}M 以上で抑制、臍帯静脈内皮細胞は IC_{50}＝560 nM
MPA の抗増殖作用に対するヌクレオシドによる抑制	ヒト T リンパ球細胞株（CCRF-CEM）	In vitro MPA 10^{-6}M	MPA 10^{-6}M で GTP/dGTP 含量減少、ATP/dATP 含量は不変 MPA 10^{-6}M ＋ d グアノシン 10^{-5}M の同時添加で抗増殖を抑制
MPA＋ヌクレオシド投与による GTP / ATP 枯渇の抑制	ヒト末梢血リンパ球	In vitro MPA 10^{-7}～10^{-6} M	MPA 5×10^{-7} M でリンパ球 DNA 合成を完全抑制 MPA 10^{-6} M＋グアノシン/d グアノシンで MPA の DNA 合成抑制作用を完全/部分的に阻害
MPA 投与による細胞傷害性 T リンパ球の誘導抑制作用	C57BL/6 マウスに P815 細胞を移植	In vivo MPA 50、100 mg/kg 10～11 日間 p.o.	T リンパ球の誘導抑制 ID_{50}=約 50 mg/kg/日
感作マウスのリンパ節および脾臓に及ぼす MPA の選択的作用	マウスを ovalbumin で感作	In vivo MPA 50 mg/kg 1 日 2 回 p.o.	鼠径部リンパ節=70.2%抑制 脾臓＝60.7%抑制 睾丸＝5.3%抑制
インターロイキン 2 レセプター（IL-2）発現に対する作用	ヒト末梢血単核球混合リンパ球反応	In vitro MPA 0.003～0.3μM タクロリムス 0.01～1.2 nM ミゾリビン 3.86～386μM	MPA 0.3 μM は溶媒群の 1/2 に抑制、タクロリムスの抑制作用は MPA 及びミゾリビンの 10～10000 倍以上

薬効薬理試験成績一覧表（続き）

試験項目	サンプル (例数)	投与量 (mg/kg) 投与経路	成績
ミコフェノール酸モフェチル（MMF）の作用機序			
腫瘍細胞株に対する抗増殖作用	CCRF-CEM JURKAT C-7 RPMI-8226 SKO-007	In vitro MMF 5×10^{-8}～5×10^{-7} M	腫瘍細胞株　IC$_{50}$（nM） CCRF-CEM　149.2 ± 10.8 JURKAT　132.1 ± 25.7 BUC-7　74.9 ± 8.2 RPMI-8226　287.4 ± 111.0 SKO-007　151.3 ± 31.9
ヒト脾臓細胞増殖反応に対する抑制作用	ヒト脾臓細胞	In vitro MMF 10^{-12}～10^{-5}M	MMF は細胞周期の後期に作用するため抑制作用は培養初日添加よりも 3 日目添加で一層効果的であり、一方 CsA は培養初日添加で強い抑制作用を示した。
混合リンパ球反応（MLR）に対する MMF の抑制作用	ヒトリンパ球（HLA-A、-B、-DR 抗原）	In vitro MMF Day0/3に 10^{-10}～10^{-5} M	同種抗原刺激応答である MLR を用量依存的に抑制し（IC$_{50}$ = 70 nM）、10^{-6} M 以上の濃度でほぼ完全に MLR を抑制した
リンパ球増殖反応抑制作用の可逆性	サル リンパ球	Ex vivo MMF 6、20 mg/kg 1日1回 3、6ケ月間 p.o.	MMF の作用は可逆的であった
MMF 投与による抗体産生抑制作用	非特異的抗体産生を ELISA 法により検討	In vitro MMF/CsA 10^{-12}～10^{-5} Mday 0, 3 に培養液中に添加	MMF：IgM／ IgG 産生抑制 IgM 産生抑制は day 0 で強い IgG 産生抑制は day 3 で効果的 CsA：IgM／IgG 産生抑制作用は day 0 でのみ有効
	ヒツジ赤血球を接種したマウス抗体産生モデル	In vivo MMF 10、20、40、60 mg/kg day 0～ day 4 p.o.	脾臓の WBC 数に影響することなく抗体産生抑制
	ラット自然抗体産生能	In vivo MMF 40 mg/kg (7日)→20 mg/kg（7 日）p.o.	脾臓摘出＋血漿交換により自然抗体の枯渇。術後直後より MMF 投与して抗体産生抑制。投与中止後、抗体価上昇
	ラット異種心臓移植モデル抗体産生	In vivo MMF25mg/kg（0～7 日）	タクロリムス 1 mg/kg（0～30 日）と併用し、途中で MMF は休薬。併用投与期間中は、IgG/IgM 産生は抑制されるが、MMF 休薬で徐々に抗体産生が増加し、TAC 投与中止後約 15 日で拒絶反応発現
ヒト末梢血単球/リンパ球の IL-1β/IL-2 産生に対する影響	ヒト末梢血単球/リンパ球	In vitro MMF 10^{-7}～10^{-5}M	影響なし

薬効薬理試験成績一覧表（続き）

試験項目	サンプル (例数)	投与量 (mg/kg) 投与経路	成績
各種臓器移植モデルに対する MMF の予防的投与の検討			
腎臓同種移植イヌに対する MMF 予防的投与の生存期間延長作用	イヌ腎臓同種移植モデル	単独投与： MMF 40 mg/kg 他剤併用： MMF 20 mg/kg + CsA 5 mg/kg + メチルプレドニゾロン 0.1 mg/kg day 0 から投与 1 日 1 回 p.o.	CsA + MP 併用群：生存日数が約 8 日間で、第 1 群（対照群）と差がなかった。 MMF 単独投与群：平均生存日数は 36 日間。移植 1 ケ月後から拒絶反応・副作用が出現 3 剤併用群：免疫抑制作用は増強、生存日数は 122 日間
同種骨髄移植モデルに対する MMF 及び CsA の併用投与の効果	イヌ骨髄細胞および末梢血白血球移植モデル	In vivo MMF：6→10mg/kg（28 日間投与） CsA ：5→15 など	MMF+CsA の投与により拒絶反応の発現が抑制され、移植骨髄の長期生着が 9 例中 5 例で見られた。
イヌ肝臓同種移植に対する MMF+CsA 予防的併用投与の効果	イヌ肝臓の同所移植モデル	MMF 0,10,20mg/kg + CsA 0,5,10mg/kg	MMF+CsA の投与により拒絶反応の発現が抑制され、特に MMF (20→10)＋CsA(5)投与群で全例が 50 日以上の移植肝臓の生着が見られた。
MMF の単独投与による心臓同種移植片生着期間延長作用	ラット心臓異所移植モデル	In vivo MMF 10、20、30、40 mg/kg を day0～50 経口投与	MMF 用量 / 例数 / 生着日数（中央値 日） 0 / 5 / 7 10 / 5 / 10[a] 20 / 5 / 50[a] 30 / 5 / 107[a] 40 / 7 / >200[a]
MMF＋CsA 予防的併用投与による生着期間延長作用	ラット心臓異所移植モデル	In vivo MMF 10mg/kg p.o. CsA 0.75mg/kg i.p. day 0～50 単独併用投与	両薬物単独投与：10～11 日の生着 両薬物併用投与：55 日生着
MMF、CsA 及び特殊飼料の併用投与による同種間心移植モデルの生着期間延長作用	ラット心臓移植モデル	MMF 45 mg/kg(0～6 日) CsA 2.5 mg/kg(0～6 日)	特殊飼料と MMF＋CsA の併用投与で移植心臓は平均生着期間が約 80 日。

薬効薬理試験成績一覧表（続き）

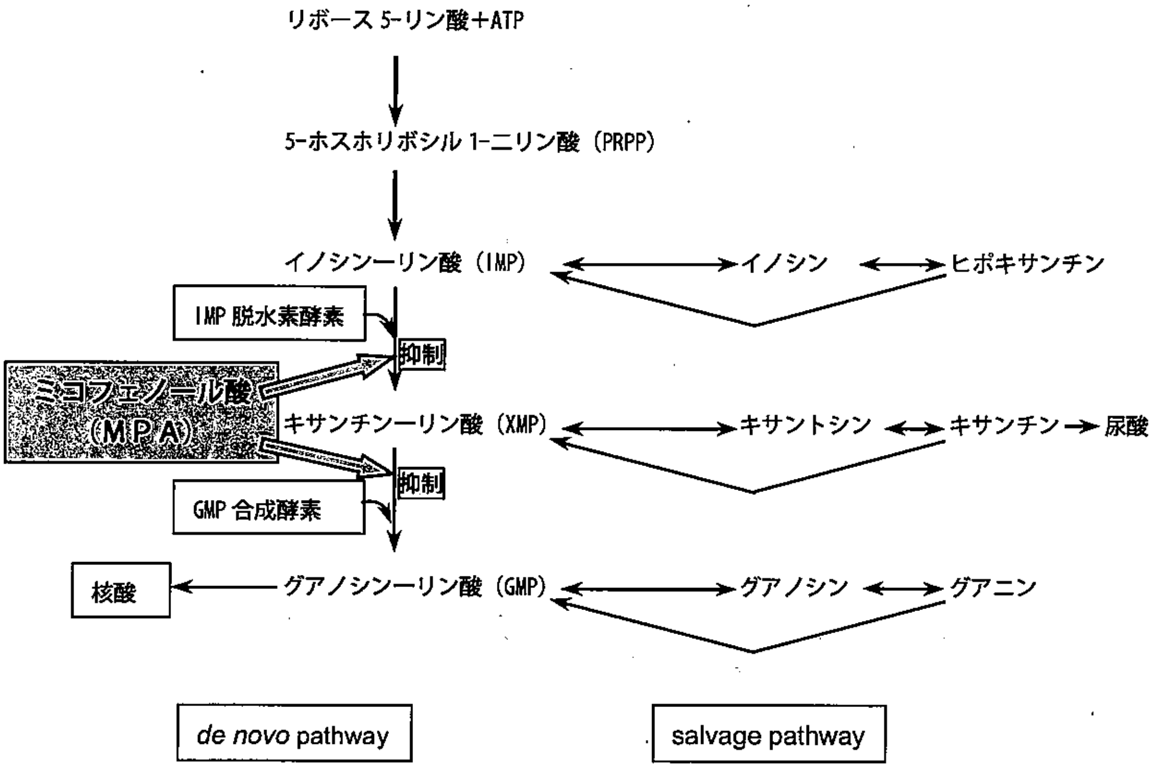
試験項目	サンプル(例数)	投与量(mg/kg)投与経路	成績
MMF の予防的及び治療的投与による進行性急性拒絶反応抑制効果	ラット心臓異所移植モデル	In vivo MMF 30 mg/kg day 4～day 50 1日1回 p.o.	MMF の予防的あるいは治療的投与は進行性急性拒絶反応の発現抑制に有効
MMF の予防的投与がラット移植心臓の増殖性冠動脈炎に及ぼす影響	ラット心臓異所移植モデル	In vivo MMF 30mg/kg(day0～50)→20mg/k g（day51～100）p.o.	MMF は冠動脈における脈管炎の発症を低下し重症度を軽減
ラット大動脈同種移植時の内膜増殖	ラット大動脈同所移植	In vivo MMF 40mg/kg（day14 から 30 mg/kg に減量）CsA 2.5mg/kg day0～90 p.o.	MMF は内膜増殖を抑制 中膜筋細胞数を維持 CsA には有意な改善作用は認められなかった
ラット頚動脈損傷モデルでの内膜肥厚	ラット総頚動脈損傷モデル	In vivo MMF 30mg/kg day-6～14 1日2回 p.o.	MMF 予防的投与は、ラット総頚動脈損傷モデルにおける内膜肥厚を著明に（約 50 %）抑制した
平滑筋細胞の accumulation に対する MPA の作用	血管平滑筋及び内皮細胞培養系	In vitro MMF 10^{-10}～10^{-4} M	MMF の IC_{50}：平滑筋/内皮細胞の抗増殖作用 10^{-6}～10^{-5} M CsA,TAC,プレドニゾロンも同様にあまり強い効果は見られなかった。
細胞接着因子に対する MMF の作用	ヒト臍帯静脈内皮細胞培養系	In vitro MMF 10 μM	ヒト臍帯静脈内皮細胞単層培養系に末梢血リンパ球を添加して、リンパ球の透通率・接着率を形態的に観察測定した。MMF 投与で、両パラメータは約 50%抑制された。
イヌ骨髄移植モデルに対する MMF+CsA 投与による免疫寛容誘導	イヌ骨髄移植モデル	In vivo MMF: 6, 10mg/kg CsA:2.5～15 mg/kg	MMF：6→10mg/kg（0～20 日） CsA：10～15 mg/kg（28 日間投与）で 420 日以上（中央値）の生存日数を記録した。
マウス移植膵島生着期間延長とトレランスの誘導	移植膵島が 100 日以上機能したマウス	In vivo MMF 80mg/kg 1日1回 p.o. day-1～30	MMF 投与群 11 例中 7 例の移植膵島が 100 日間以上機能 上記 7 例中 5 例で第 3 の系統の組織を移植したが拒絶した。

ホ-1.　効力を裏付ける試験

《要　約》

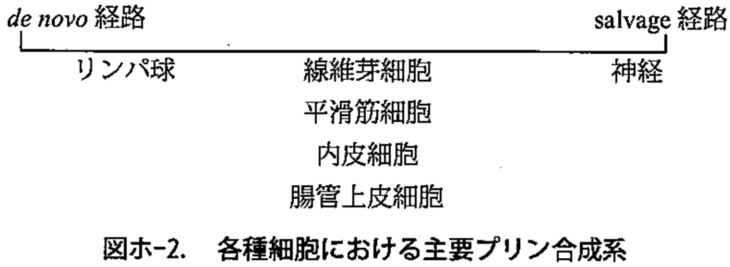
背　景

細胞内のプリン合成には *de novo* 系と salvage 系の 2 種類の主要経路があることが知られている。*De novo* 合成系は、リボース 5-リン酸とアデノシン三リン酸（ATP）から 5-ホスホリボシル 1-二リン酸（PRPP）、イノシン一リン酸（IMP）を一連の酵素反応により生成し、次いで IMP をアデノシン一リン酸（AMP）あるいはグアノシン一リン酸（GMP）に変換する。この GMP への変換過程は、イノシン一リン酸脱水素酵素及びグアノシン一リン酸合成酵素によって触媒される。他方、salvage 系はヒポキサンチン－グアニンリン酸－リボシル転換酵素（HGPRT）によりグアニン（GUA）から GMP を生成する。上皮細胞、内皮細胞、造血細胞あるいは線維芽細胞等はこれら 2 種類の合成経路を利用して核酸等の合成を行なっているが、T 及び B リンパ球における GMP 及び核酸合成は主として *de novo* 系に依存している（図ホ-1）。



図ホ-1　プリン代謝とミコフェノール酸（MPA）の作用点

各合成経路の相対的重要性は細胞の種類によって異なっており、多くの細胞は、これら両合成経路を介してグアノシン三リン酸（GTP）、デオキシ GTP（dGTP）及び核酸を生合成する（図ホ-2）。一方、ヒトリンパ球ではその核酸合成のほとんどを *de novo* 系に依存していることが、HGPRT を欠損した Lesch-Nyhan 症候群の患者で明らかにされている　　　。



図ホ-2.　各種細胞における主要プリン合成系

MPA と MMF

ミコフェノール酸（MPA）は真菌由来の化合物として同定され、現在までに抗ウイルス作用[1]、抗腫瘍作用[2]、あるいは免疫抑制作用[3]等が確認されている。米国シンテックス社（現ロシュ・バイオサイエンス社）ではMPAの薬理活性に着目し、そのbioavailability改善を目的としてmorpholinoethylを側鎖に導入した誘導体、ミコフェノール酸モフェチル（MMF）の合成に成功した。すなわちMMFはMPAのプロドラッグであり、経口投与した後、肝において速やかにエステル結合が外れMPAの薬効を発揮する。MPAはアザチオプリンやミゾリビン等と同様にリンパ球増殖抑制をメインの作用としたいわゆる代謝拮抗薬としての位置づけが考えられている。

MPAはプリン生合成の *de novo* 系におけるGMP産生を選択的、可逆的かつ不競合的に阻害することが確認されている。特にT及びBリンパ球では、グアニジン・ヌクレオチドの供給を主として *de novo* 系に依存しているため、核酸合成抑制を来し、これらの細胞の増殖・活性化を選択的に阻害する。その結果、細胞傷害性T細胞産生の抑制あるいは抗体産生能の抑制等の免疫抑制作用が発現する。

他剤併用免疫抑制療法への応用

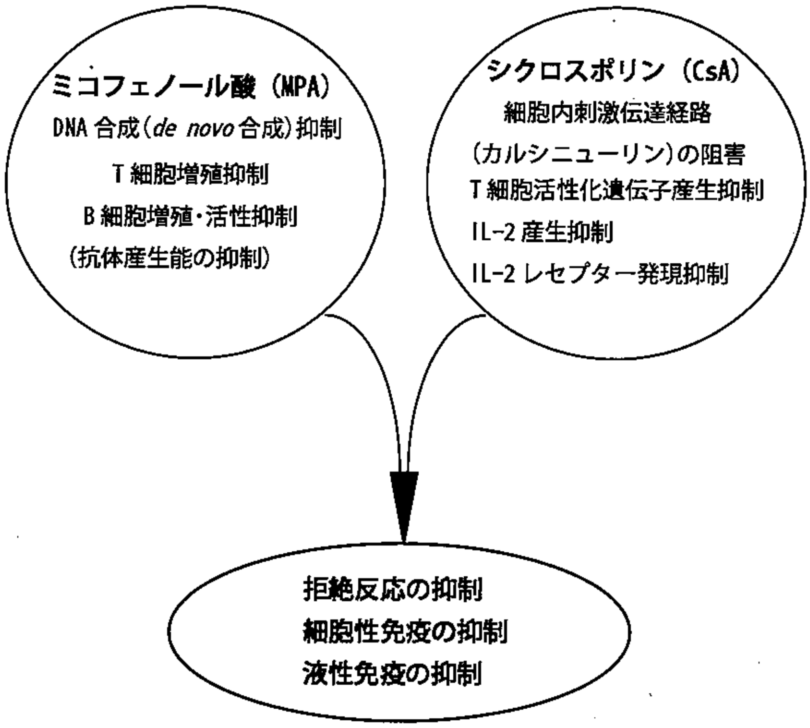
既に免疫抑制剤として市販されているシクロスポリン（CsA）・タクロリムスはいずれも土壌菌より発見された抗生物質でヘルパーT細胞に作用して、T細胞活性化遺伝子の産生抑制とそれに続くインターロイキン2(IL-2)等リンホカインの産生抑制あるいはIL-2レセプターの発現抑制から細胞性免疫機能の抑制作用を発揮する。しかし、サプレッサーT細胞の活性化あるいはB細胞の活性化(抗体産生)等は抑制しないとされている。

近年の臨床研究の成果をもとに、ステロイド+CsA+代謝拮抗剤といった多剤併用免疫抑制療法が臨床的に広く行われている。このうちステロイド剤は抗炎症あるいは広範な免疫抑制作用を持つことにより古くから基礎療法的に処方されてきたものである。この療法は、それぞれ単剤の投与では予防的効果が十分得られない、あるいは副作用が顕著に発現するといった従来の単剤治療の問題から提起されてきたものと考えられるが、それぞれの薬効をうまく組み合わせることで安全かつ効果的に急性拒絶反応の発現を抑制することが目標とされている。

CsAとMMFの併用を想定した場合、この2剤はそれぞれ作用点が異なるため（図ホ-3）、相補的な薬物療法が可能であると思われる。この併用効果についてはイヌ・ラットの臓器移植モデルにて実験的に確認されており、さらには単独投与で有効性を示す半分の投与量で拒絶反応の発症予防が可能であった。また、海外で実施されたCsA併用の臨床試験では、対照薬のアザチオプリン投与群に比較してMMF群で有意に高い拒絶反応抑制率を示した。アザチオプリンは6-メルカプトプリン（6MP）にイミダゾール基を配した誘導体で、薬効分類的には本薬と同様、プリン拮抗薬として位置づけられている。ただし、アザチオプリンは生体内でイミダゾール基がはずれて6MPに変換された後、プリン生合成salvage経路の律速酵素であるHGPRTの作用によりチオイノシン-1リン酸(TIMP)に変換される。このTIMPがIMPからXMPへの変換、IMPからSuccinyl AMP（SAMP）への変換、さらにSAMPからAMPへの変換を触媒する酵素反応を競合的に阻害する。また、HGPRTによる6MPからTIMPへの変換時には、PRPPが必要であり、このPRPPは *de novo* 経路のみならずヒポキサンチンからIMPあるいはグアニンからGMPが産生されるsalvage経路にも必要な酵素である。よって、アザチオプリン投与によりPRPPが競合されることで、この二つのプリン生合成経路が阻害されると考えられている。

一方、MMFは生体内で加水分解により速やかに活性体であるMPAに変換され、MPAは *de novo* 系のIMPDH酵素活性を特異的に阻害し、salvage系の酵素活性には影響を与えない。リンパ球では *de novo* 経路が細胞内の主要なプリン生合成系であるため、このMPAの作用は *de novo* 系を介するリンパ球の核酸生合成に対して特異的であると言える。

さらに、MMF の投与により慢性拒絶反応への進展の遅延、あるいはトレランスの誘導等が実験的に確認されている。その機序の詳細については未だ不明な部分が多いが、一つの可能性について後述する。いずれにせよ、本剤は急性拒絶反応の発症抑制のみならず、移植臓器の長期生着・機能維持に有効である可能性が高いことから、現在の移植医療においてきわめて有用性の高い薬剤になりうる可能性がある。



図ホ-3.　ミコフェノール酸（MPA）とシクロスポリン（CsA）の
併用投与による免疫抑制作用の作用発現

<u>MPA の薬物動態学的特徴</u>

MPA のヒト及び各種実験動物の薬物動態パラメータを投与用量で補正してみると、ラットはヒトに比べて AUC が大きく、ヒトとは異なった動態を示すことが明らかとなった。一方、イヌはヒトよりも低値を示し、サルは比較的ヒトに近似していた（表ホ-1）。

表ホ-1. MMF 単回投与時における MPA の薬物動態学的パラメータの比較（用量補正値）

動物種	投与用量 (mg/kg)	MPA AUC**	MPA Cmax***	MPA AUC/dose	MPA Cmax/dose
雄性ラット	6	52.4	10.4	8.73	1.73
	15	187	35.6	12.47	2.37
雄性イヌ	9	12.7	6.80	1.41	0.76
	30	41.4	29.5	1.38	0.98
雄性サル	6	11.2	8.70	1.87	1.45
	20	40.0	20.5	2.00	1.03
	70	150	31.0	2.14	0.44
健常成人	20*	57.9	24.0	2.90	1.20

* 体重 50 kg で換算
** ラット、イヌ、サルで AUC：μg eq. MPA·h/ml、健常成人：μg·h/ml
*** ラット、イヌ、サルで Cmax：μg eq. MPA /ml、健常成人：μg/ml

MPA はグルクロン酸抱合反応又は酸化を経て代謝される事がわかっている 。このグルクロン酸抱合活性を各動物種の肝ミクロソーム中（*in vitro*）で測定し、Vmax/Km 値を算出、比較すると、イヌ＞ヒト（イヌの約 1/2）≧サル＞ラット（イヌの約 1/10）の順であった。また *in vivo* 試験で、血漿及び尿中代謝物の組成を検討したところ、ヒト、サル及びラットでは MPAG が主に認められた。イヌの血漿及び尿中にはこのほかに 1 ヒドロキシ MPA(1-OH-MAP)及び MPA-Glu の生成も認められた。この 1-OH-MAP 及び MPA-Glu の生成はイヌに特異的であった。なお、イヌは主排泄経路が糞であり、ラット・サル・ヒトが尿中排泄であることと考え合わせると、イヌは本薬の代謝・排泄に関して種特異的な経路があるものと推察された。このことから、ラット及びイヌでは本薬の代謝あるいは排泄がヒトと比較して大きく異なるので、これらを用いた試験の用量を臨床用量に外挿することには注意が必要であると考えられた。一方、サルに関しては比較的ヒトの薬物動態と近似したデータが得られており、ヒトへの外挿は可能であろうと考えられた。このように、いくつかの点でヒトと用量の乖離はあるものの、対照群をおいた前臨床試験において薬効を比較し判定することは、医薬品の臨床的な有効性・有用性を想定するという観点から重要であろう。従って、薬物動態が異なりヒトへの外挿が困難と判断された動物種でも、得られたデータは臨床における有効性・有用性を評価する根拠となりうると考えられる。このため、本薬の申請ではマウス、ラット及びイヌを用いた試験の結果も有効性・有用性の判断材料としている。

臨床用量と薬効用量との比較一覧表

臨床用量：2000 mg/日 = 29～40 mg/kg/日（体重 50～70 kg）

試験項目		薬効用量 （mg/kg/日，経口投与）	投与期間 （日）
リンパ球増殖反応の抑制作用			
－感作マウスのリンパ節及び脾臓		MPA:100 → 50	3
－サルリンパ球		MMF:20	3 ヶ月又は 6 ヶ月
細胞傷害性Ｔリンパ球の誘導抑制作用			
－マウス脾臓		50，100	10 又は 11
抗体産生抑制作用			
－マウス及びラットの抗体産生		マウス：20～60	4
		ラット：9，30	30
－ラットの自然抗体産生		40→20	14
移植免疫抑制作用			
－イヌ腎臓同種移植	生存期間延長（予防投与）	40（単独），20（他剤併用）	全試験期間
	進行性拒絶反応(治療投与)	160	3（パルス）
－イヌ骨髄同種移植	生存期間延長（予防投与）	MMF:6→10	28
－イヌ肝臓同種移植	生存期間延長（予防投与）	MMF:10，20（他剤併用）	100
－ラット心臓同種移植	生着期間延長（予防投与）	10～40（単独），10（他剤併用）	50
	進行性拒絶反応(治療投与)	30	移植 4 日目～50 日目
－マウス膵島同種移植	生着期間延長（予防投与）	80	30
－ラット脈管炎	冠状動脈炎　（予防投与）	30→20	100
	内膜増殖　（予防投与）	40→30	3 ヶ月
	内膜肥厚　（予防投与）	30	手術 6 日前～14 日後

MPA 及び MMF の特徴

MPA 及び MMF の免疫薬理作用を、ヒト細胞、細胞株を用いた *in vitro* 試験系及びマウス、ラット及びサルを用いた *in vivo* 試験系にて検討し、以下の成績を得た。

〈*In vitro* 試験〉

1) MPA は、マイトジェン刺激したヒト末梢血リンパ球（T 及び B）、ヒト脾臓 B リンパ球の増殖を抑制した（IC_{50}=30～80 nM/末梢血リンパ球、61～314 nM/脾臓 B リンパ球）。
2) MPA は、ヒトリンパ球系細胞株の増殖を強力に抑制した。
3) MPA は、ヒト線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞の増殖に 100 nM では影響しなかった。
4) MMF は、ヒトリンパ球を用いた混合リンパ球反応を抑制した（IC_{50}=70 nM）。
5) MMF は、マイトジェン刺激したヒト末梢血リンパ球、ヒト脾臓 B リンパ球の抗体産生を抑制した（IC_{50}=26 nM/ 末梢血リンパ球、7～92 nM/脾臓 B リンパ球免疫グロブリン G）。

〈*In vivo* 試験〉

1) MPA は、マウスリンパ節、脾臓の DNA 合成を特異的に抑制した（MPA: 50 mg/kg×2/日 経口）。
2) MPA は、マウスで細胞傷害性 T リンパ球の誘導を抑制した（MPA: ID50=$_{50}$ mg/kg/日 経口）。
3) MMF を投与されたサルの血清は、マイトジェン刺激した末梢血リンパ球の増殖を血中濃度に依存して抑制した（MMF: 20 mg/kg/日 経口）。
4) MPA は、マウス及びラット脾臓での抗体産生を抑制した （MMF: マウス 10～60 mg/kg/日 経口、ラット 3～30 mg/kg/日 経口）。
5) MMF は、脾臓摘出ラットの自然抗体産生能を低下させた（MMF: 40→20 mg/kg/日 経口）。

また、臓器移植時の拒絶反応に対する MMF の移植免疫抑制作用を、腎臓、心臓、膵島、肝臓及び大動脈の移植片モデル（マウス、ラット、イヌ）を用いて経口的に検討した。

1) イヌ腎臓同種移植において、移植日からの MMF 単独投与は生存期間を延長し（40 mg/kg/日）、低用量の CsA、メチルプレドニゾロンとの 3 剤併用は、MMF の免疫抑制作用を増強した（20 mg/kg/日）。MMF 単独投与中、副作用として消化器系症状がみられたが、肝・腎毒性、骨髄抑制、重篤な感染症は認められず、他剤併用による MMF の減量は副作用を軽減した。また、ステロイド剤との併用投与と比較して MMF と CsA の併用投与は難治性の進行性急性拒絶反応に対する顕著な治療効果を認めた（初期投与量として MMF 80 mg/kg×2/日）。
2) MMF は、イヌ肝臓同種移植でも生着期間を延長し（20 mg/kg/日）、CsA との併用により更に延長した。MMF の耐容性は良好であり、副作用は認められなかった。
3) ラット心臓同種移植でも、急性拒絶反応の抑制試験において MMF の投与は生着期間を延長し（10～40 mg/kg/日）、MMF と CsA の併用は相加的もしくは相乗的延長効果を示した（10 mg/kg/日）。さらに、進行性急性拒絶反応の治療に有効性が認められた（30 mg/kg/日）。
4) MMF は、各種脈管炎モデルで、冠動脈炎（ラット心臓同種移植、30→20 mg/kg/日）、内膜増殖（ラット大動脈同種移植、40→30 mg/kg/日）ならびに内膜肥厚（ラット総頚動脈損傷、30 mg/kg/日）を抑制し、血管病変を予防した。一方、CsA は検討した用量では冠動脈炎に対して有効性を示さなかった。
5) MMF は、マウス膵島同種移植で生着期間を延長し、トレランスを誘導した（80 mg/kg/日）。

以上より、MMF 及び MPA の特徴は以下のごとく要約される。

また、MMF はプロドラッグであり、経口投与後急速に MPA に加水分解される。このため MMF の投与後、ヒト血漿中に MMF 未変化体は見い出されていないことから、MMF そのものの酵素抑制作用は検討されていない。

1) 本薬は、DNA の *de novo* 生合成系の選択的抑制を介して T 及び B リンパ球に特異的に作用し、細胞性及び液性免疫反応を効果的に抑制する新規代謝拮抗剤である。
2) 各種臓器移植モデルへの MMF 単独の予防的あるいは治療的投与は、進行性急性拒絶反応の予防及び治療、急性拒絶反応の発現抑制効果を示した。また、慢性拒絶反応への移行や血管性拒絶反応も有効に予防しうる可能性をもつ。
3) 低用量の CsA やプレドニゾロンとの併用投与により免疫抑制作用は増強され、他剤との併用基礎免疫抑制剤としても有用である。

引用文献

1） Cline, J. K. Et al.:In vitro antiviral activity of mycophenolic acid and its reversal by guanine-type compounds. Appl. Microbiol. 18:14, 1969
2） Sweeney, M. J. Et al. Experimental antitumore activity and preclinical toxicology of mycophenolic acid. Cancer Res. 32:1975, 1972
3） Eugui, E. M. Et al. Lymphocyte-selective anti-proliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. Scand. J. Immunol. 33:175, 1991

1. 作用機序

1-1. ミコフェノール酸（MPA）の作用機序

1-1-1. イノシンーリン酸脱水素酵素（IMPDH）活性抑制作用

MPA のイノシンーリン酸脱水素酵素（IMPDH）に対する抑制効果を検討した。マウス Landschutz 腹水症腫瘍細胞から精製した IMPDH に対する MPA の作用を検討したところ、IC_{50} 値（50% 阻害濃度)は 25 nM であった 。IMPDH はプリン生合成の *de novo* 系における律速酵素の一つで、GMP 合成に直接関わっている。ヒト IMPDH には 2 種類のイソ酵素（type I、 type II）があることが確認されている。このうち type II酵素は増殖細胞や抗原／マイトジェンで刺激されたリンパ球に著明に発現誘導され、細胞内 IMPDH 活性は 5～20 倍程度増加し、グアニンヌクレオチド増産に IMP 利用が切り替わる 。したがって、増殖性細胞や刺激細胞において type II 酵素を選択的に抑制すればデオキシ GTP 及び GTP 枯渇作用、細胞増殖の抑制等が発現するものと考えられる。表ホ-2 に示したように、MPA は type I 酵素に比べて type II酵素を約 5 倍強力に阻害する 。また、MPA の酵素阻害様式は不競合的であった 。この場合、不競合阻害とは IMPDH とその基質が結合した後に MPA が結合して阻害作用を示すことを意味しており、基質の濃度が増大しても阻害強度には影響しないと考えられた。さらに、この抑制はインキュベーション時間に依存せず、可逆的であることが示唆されている。

表ホ-2 ヒト IMPDH イソ酵素に対する MPA の抑制作用

イソ酵素	Ki（nM）*
Type I	33±0.8
Type II	7±0.6

*：平均値±標準誤差（n=3）

1-1-2. ヒト末梢血リンパ球のグアニンヌクレオチド含量に対する作用

活性したリンパ球系細胞を用いて、MPA による IMPDH 阻害作用がプリン産生系、特にグアニン及びアデニン・ヌクレオチド産生に及ぼす影響について検討した。ヒト末梢血から調整した単核球（T、B リンパ球及び単球）を concanavalin A（Con A、 5 μg/ml）で刺激し、10^{-6}～5×10^{-5} M の MPA を添加したところ GTP 含量は濃度依存的に減少した。一方、このとき 単核球の ATP 含量は不変であった。また、多形核白血球の GTP、ATP 含量は MPA 投与による影響は観察されなかった （表ホ-3）。このことから、MPA は T、B リンパ球及び単球における GTP 産生を特異的に抑制することが示唆された。

表ホ-3 非接着性及び接着性単核球と多形核白血球の GTP、ATP 含量に対する MPA の作用

	MPA 濃度（M）	GTP 含量（pmol/10^6細胞）	ATP 含量（pmol/10^6細胞）
非接着性単核球*（T、B リンパ球）	0	101.47、87.20	639.09、732.90
	10^{-6}	30.41、15.20	193.27、555.10
	10^{-5}	34.92、20.10	576.34、527.80
接着性単核球*（単球）	0	277.5、248.20	1159.52、1423.20
	10^{-6}	53.97、50.80	699.66、946.70
	10^{-5}	52.47、72.40	590.41、1047.00
多形核白血球	0	75.89、27.50	317.33、117.4
	10^{-6}	103.67、30.60	343.27、124.3
	10^{-5}	84.57、22.60	370.84、116.5

*：Concanavalin A(5 μg/ml)で刺激した細胞を使用

このように、MPA は IMPDH 活性を強力に阻害し、グアニンヌクレオチドプールを枯渇させるが、このとき IMPDH の基質である IMP 含量は 5～10 倍に増加することが報告されている 。そして、その結果 AMP 及び ADP 含量も増加する。この増加した AMP、ADP はアロステリック酵素であるリボースリン酸ピロホスホキナーゼ（IMP 前駆物質の PRPP を産生する酵素）の活性を抑制する。さらに、GMP、GDP、GTP の枯渇はこのリボースリン酸ピロホスホキナーゼの酵素活性促進を阻害し、結果として PRPP の産生抑制を増強する （図ホ-1）。さらに、これら一連の反応から IMP 合成は徐々に抑制されていくものと考えられる。なお、MPA はヒト IMPDH の不競合的阻害剤であるため、IMP 含量が増加しても酵素の抑制を減弱しない。

1-1-3. リンパ球及びその他の細胞の増殖反応に対する MPA の選択的抑制作用

① ヒト末梢血リンパ球に対する増殖反応抑制作用

リンパ球の増殖反応に対する MPA の作用を検討するため、各種のマイトジェンで刺激したリンパ球培養系に MPA を添加して ^{3}H-チミジンの取込みを指標に細胞増殖を検討した。

健常成人全血から調整したヒト末梢血リンパ球（T 及び B リンパ球）を PHA（10 μg/ml）、pokeweed マイトジェン（PWM、20 μg/ml）、*Staphylococcus* protein A-sepharose（SPAS、2 mg/ml）あるいは Con A（20 μg/ml）で 72 時間刺激培養し、10^{-8}～10^{-5} M の MPA の増殖反応に及ぼす影響を検討した。増殖反応は培養終了 6 時間前に ^{3}H-TdR を培養液に加え、DNA への ^{3}H-TdR の取り込みで測定された。

MPA は、各種マイトジェン刺激したヒト T 及び B リンパ球の増殖を濃度依存的（10^{-8}～10^{-6} M、Con A 刺激のみ 2.5×10^{-8}～10^{-6} M）に抑制し、その IC_{50} 値は 30～80 nM であった（表ホ-4）。

表ホ-4 ヒト末梢血リンパ球に対する MPA の増殖抑制作用

マイトジェン	IC_{50}（nM）
Phytohaemagglutinin	40～60
Pokeweed mitogen	30～50
Staphylococcus protien A-sepharose	40
Concanavalin A	80

n=1～2

② 各種ヒト細胞株に対する MPA の作用

T 細胞、B 細胞及び単球系の細胞株（MOLT-4、DAUDI、CESS、SKW、THP-1）をそれぞれ 3 日間培養し、10^{-9}～10^{-6} M の MPA の抗増殖作用を ^{3}H-TdR 取り込みにより検討した。

MPA は、T 細胞系の MOLT-4 の増殖反応を最も強力に抑制し（IC_{50}=0.2 nM）、他の 4 種類の B 細胞系、前単球細胞系細胞株も MPA に対して高い感受性を示した（表ホ-5）。これらの抑制活性は、マイトジェン刺激により活性化したリンパ球の増殖抑制作用と比較して、より強力であった。一方、細胞数計測にて判定した赤血球前駆細胞系の K-562 細胞株に対する MPA の抗増殖作用は、MOLT-4 や DAUDI と比較して 100 倍以上弱いものであった。

表ホ-5 各種ヒト細胞株における MPA の抗増殖作用

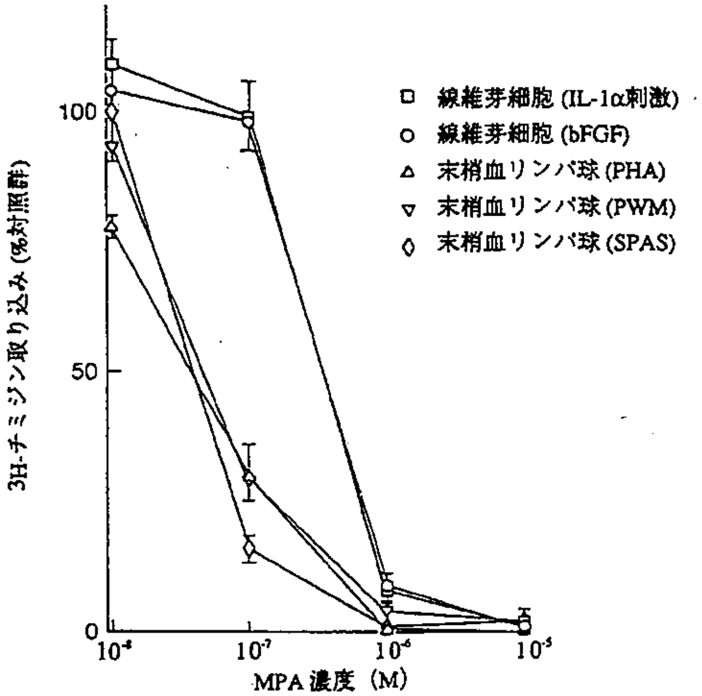
細胞株		IC_{50}（nM）
T 細胞系	MOLT-4	0.2 ± 0.05
B 細胞系	DAUDI	3.3 ± 0.67
	CESS	3.8 ± 2.61
	SKW	2.9 ± 0.47
全単球細胞系	THP-1	5.0 ± 0.77

平均値±標準誤差（n=3）

③ MPAのヒト線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞に対する増殖抑制反応

リンパ球以外の細胞増殖に及ぼすMPA 10^{-8}～10^{-5} Mの影響を、ヒト皮膚線維芽細胞及び臍帯静脈内皮細胞を用いて検討した。

IL-1α (1 ng/ml) 又は塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF、20 ng/ml) で活性化したヒト線維芽細胞の増殖に対して、MPAはリンパ球増殖反応を強力に抑制する 10^{-7} Mでも影響を与えず、10^{-6} M以上で顕著な抑制を示した (図ホ-4)。一方、bFGFで刺激したヒト臍帯静脈内皮細胞は IC_{50} 値が560 nMであった。

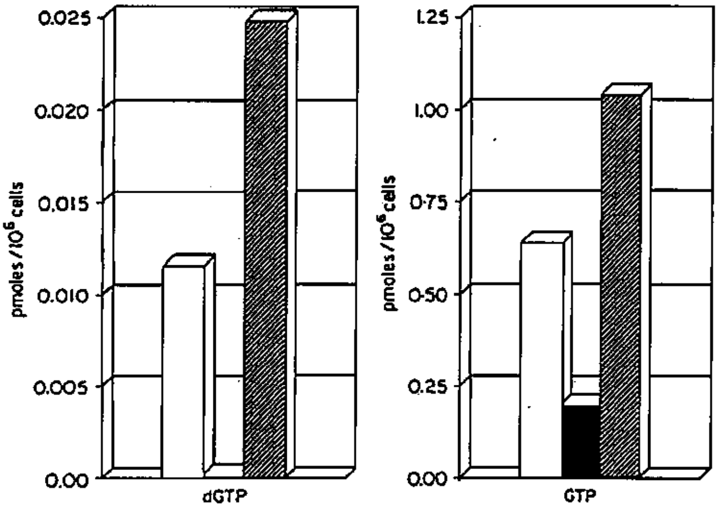


図ホ-4　ヒト線維芽細胞及びリンパ球の増殖に対するMPAの抑制作用

平均値±標準誤差 (n=4)

1-1-4. MPAの抗増殖作用に対するヌクレオシドによる抑制

MPAのリンパ球増殖抑制作用が、細胞外より添加されたグアノシン/デオキシグアノシンによって抑制されるか否かを検討した。ヒトTリンパ球細胞株 (CCRF-CEM) の培養系に、リンパ球増殖能を完全に抑制する濃度であるMPA 10^{-6}Mを添加・培養するとリンパ球中のGTP及びデオキシGTP含量は著明に減少した (図ホ-5)。その作用はデオキシGTP含量に対してより著明であったが、ATP及びデオキシATP含量には影響を与えなかった。しかし、この培養系にMPA (10^{-6}M) とデオキシグアノシン (10^{-5} M) を同時に添加すると、MPAによるグアニンヌクレオチドプールの枯渇作用を抑制した。このことから、MPAはIMPDH及びGMPS (グアノシン一リン酸合成酵素) を特異的に阻害することで、グアニン・ヌクレオチドプールを枯渇させGTP及びデオキシGTP産生を抑制するが、この抑制効果はデオキシグアノシン添加で消失することからMPAの酵素阻害作用はIMPDH及びGMPSに特異的である事が示唆された。



図ホー5　ヒト CCRF-CEM 細胞における MPA のヌクレオチドプール枯渇作用とデオキシグアノシンによる抑制作用

対照群　MPA 10^{-6} M　MPA 10^{-6} M＋デオキシグアノシン 10^{-5}

1-1-5. MPA+ヌクレオシド投与による GTP/ATP 枯渇の抑制

リンパ球は抗原/マイトジェンで刺激すると、細胞増殖能が活性化されるが、このとき type II IMPDH が誘導されプリン生合成が促進される。MPA はこの type II IMPDH の特異的阻害薬であることは既に示したが、この作用が外因的に適用したヌクレオシドにより抑制されることを検討した。

Phytohaemagglutinin (PHA、10 μg/ml) 刺激したヒト末梢血リンパ球に、5～80 μg/ml のグアノシン、デオキシグアノシン、アデノシン及びデオキシアデノシンを 10^{-7}～10^{-6} M の MPA と同時に添加培養し、DNA 合成に及ぼす影響を ^{3}H-チミジン取り込み測定により検討した。MPA は 5×10^{-7} M 以上の添加で、PHA 刺激末梢血リンパ球の DNA 合成を完全に抑制した。また、10^{-6} M の MPA を添加した培養液にグアノシン又はデオキシグアノシンを添加したところ、MPA の DNA 合成抑制作用は完全あるいは部分的に阻害され、DNA 合成能は回復した。MPA はマイトジェン刺激細胞　　や増殖性細胞　　の GTP、デオキシ GTP 含量を著明に減少させたが、GMP 生合成の前駆物質であるグアノシン、デオキシグアノシンはこれら MPA 作用を抑制した。PHA 刺激したヒト末梢血リンパ球においてもグアノシン、デオキシグアノシンは同一の機序を介して MPA の抗増殖作用に抑制的に作用するが、デオキシ GTP プールは狭い濃度範囲で適正に調節されていることが必要と考えられるため　　、高濃度のデオキシグアノシンによるデオキシ GTP プールの過剰増量は DNA 合成を逆に抑制した。一方、アデノシン及びデオキシアデノシンは MPA の抗増殖作用に影響しなかった。(表ホ-6)。

表ホ-6　MPAのPHA刺激ヒトリンパ球反応性抑制作用に対する各種ヌクレオシドの効果

ヌクレオシド濃度 μg/ml	MPA (M)	リンパ球に取込まれた^{3}H-チミジン 平均cpm(×10^3)			
		グアノシン	デオキシグアノシン	アデノシン	デオキシアデノシン
0	0	85.0	96.7	104.1	89.7
0	1×10^{-6}	0.6	0.6	0.7	0.6
5	1×10^{-6}	1.0	1.2	0.6	0.3
10	1×10^{-6}	27.4	109.7	0.5	0.4
20	1×10^{-6}	69.5	97.0	0.5	0.6
40	1×10^{-6}	68.6	56.7	0.6	0.5
80	1×10^{-6}	61.3	16.1	0.6	0.5
0	1×10^{-7}	34.0	30.7	38.5	30.5
5	1×10^{-7}	21.0	32.5	34.0	19.0
10	1×10^{-7}	46.0	103.4	29.0	20.6
20	1×10^{-7}	88.2	93.4	29.7	22.7
40	1×10^{-7}	79.0	54.8	26.5	22.2
80	1×10^{-7}	63.8	14.4	20.9	23.6
5	—	85.0	89.4	90.5	102.5
10	—	65.8	107.4	95.1	105.4
20	—	80.4	110.9	92.2	108.7
40	—	75.7	55.6	94.6	109.7
80	—	63.1	16.6	100.3	111.4

すべての群でPHA(10 μg/ml)刺激を行った。数値は4重測定の平均値

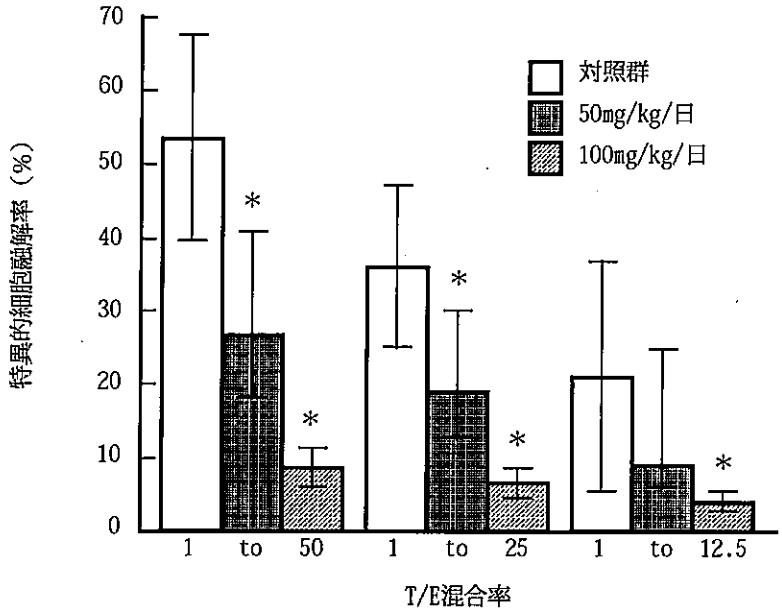
ここで示されたように、MPA による GMP の減少は GTP の産生低下を来たし、この GTP の減少は糖蛋白質の合成能不全や各種 GTP 結合蛋白質の生理的機能障害をひきおこす。特に、リンパ球の糖蛋白質合成能不全は、リンパ球と内皮細胞あるいは抗原提示細胞との接着を阻害し、慢性炎症反応や臓器移植時の拒絶反応の形成不全を誘導する。また、リンパ球（抗原活性化 B、 T 細胞）での デオキシ GTP の枯渇は核酸合成を抑制し、結果的にリンパ球の増殖を阻害する。リンパ球はプリン *de novo* 合成系に依存し、他の型の細胞は依存していないため、MPA の核酸合成阻害作用はリンパ球に対して選択的となる。他の細胞系、例えば線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞、多形核白血球等は *de novo* 合成系に加えて salvage 系にも依存しているため、本剤の阻害作用は低下する。また、MPA はマウスのリンパ腫細胞（S-49）において、salvage 系酵素の HGPRT 並びに GTP 生合成の最終段階を触媒する GMP キナーゼ、グアノシンジホスフェイトキナーゼ活性に対して、各々3×10^{-5} M あるいは 2.5×10^{-4} M で何ら影響を及ぼさなかった　　。

1-1-6.　MPA 投与による細胞傷害性 T リンパ球の誘導抑制作用

同種異系腫瘍細胞の移植により細胞傷害性 T リンパ球が誘導されるが、MPA の投与はこの誘導作用を抑制した。C57BL/6 マウス（H-2^{b}ハプロタイプ、5 例/群）に同種異系腫瘍細胞である P815 細胞（H-2^{d}ハプロタイプ）を移植し、MPA 50、100 mg/kg を 10 又は 11 日間経口投与後、脾臓を摘出し脾臓細胞を得た。^{51}Cr で標識した P815 標的細胞（T：Target cell）を脾臓細胞（E：Effector cell）と混合し（T:E=1:50、1:25、1:12.5）、遊離した ^{51}Cr 量より細胞融解率を算出し、細胞傷害性の指標とした。

P815 細胞（H-2^d）を異なるハプロタイプのマウスに移植すると、H-2^{d}に対する細胞傷害性 T リンパ球が誘導される。MPA は用量依存的にこの細胞傷害性 T リンパ球の誘導を抑制し、このときの ID$_{50}$値（50 %阻害用

量）は約 50 mg/kg/日であった（図ホ-6)。



図ホ-6 MPA 投与による細胞傷害性Tリンパ球の誘導抑制作用

平均値±標準誤差

*: 対照群と比較した有意差、P<0.001（分散分析及び Dunn の検定)

1-1-7. 感作マウスのリンパ節及び脾臓に及ぼす MPA の選択的作用

MPA の生体の免疫系組織に対する選択的な影響を検討するため、アルブミンで感作したマウスに MPA を連続投与した。

雄性マウスを ovalbumin（50 µg 皮下）で感作し、感作 10 又は 14 日目の追加感作直後から、MPA を 3 日間経口投与した（投与 1、2 日目は 50 mg/kg を 1 日 2 回、3 日目は 1 日 1 回)。薬物投与 2 日目の 2 回目及び 3 日目に ^{3}H-TdR を腹腔内投与し、その 6 時間後に各動物から腋窩、鼠径及び腸間膜のリンパ節、脾臓、睾丸、空腸を摘出した。各組織中 DNA への ^{3}H-TdR 取り込み量を、シンチレーションカウンター（リンパ組織、睾丸）又はオートラジオグラフィー（空腸）にて測定した。

MPA はリンパ節、脾臓での DNA 合成を、各々93.9 %、60.7 %抑制した（表ホ-7)。一方、睾丸での DNA 合成抑制は 5.3%であり、空腸では溶媒対照群との間に差を認めなかった 。

表ホ-7　マウス各種組織の ^{3}H-チミジン取り込みに対する MPA の作用

組織	対照群 (cpm)	MPA 50 mg/kg、1 日 2 回 (cpm)	抑制率 (%)	p 値
鼠径部リンパ節[a]	8765	528	93.9	0.000
脾臓[a]	2727	1070	60.7	0.019
睾丸[b]	7435	7043	5.3	0.726

a :10^7 細胞、 b :10 mg 組織

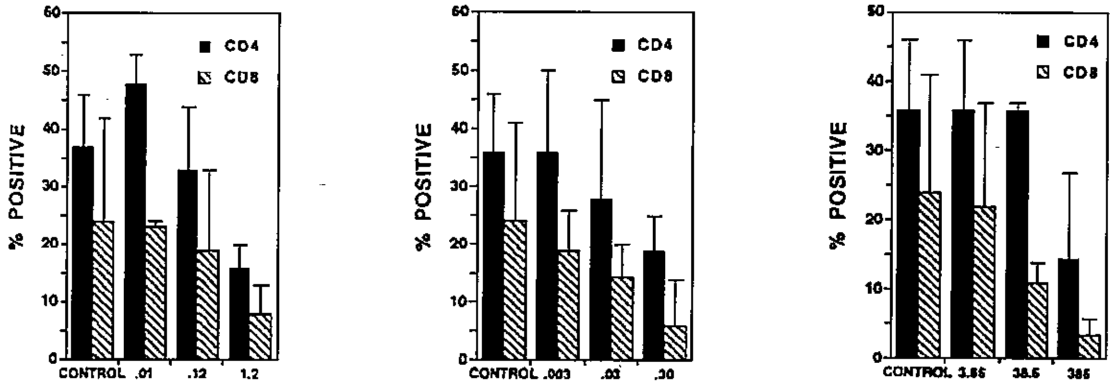
平均値±標準誤差 (n=7〜8)

p 値は分散分析及び Dunn 検定より求めた

1-1-8. インターロイキン 2 レセプター(IL-2R)発現に対する作用

インターロイキン 2 (IL-2) は、主に T 細胞から分泌されるサイトカインで、T 細胞自身の分化増殖に役割を果たしている。すなわち、静止期 (G_0 期) にある T 細胞が抗原刺激等、T 細胞受容体を介した刺激により活性化 (G_1 期) すると IL-2 が産生され始め、IL-1 の刺激により T 細胞に発現した IL-2R に結合し、DNA 合成が誘導され T 細胞自身の増殖 (S 期) が開始する。この細胞性免疫機構には欠かせない IL-2R 発現作用に対して MPA はどのような影響を及ぼすか検討した。対照薬としてタクロリムス(TAC)及びミゾリビンと比較検討した。

MLR(混合リンパ球反応)により活性化したヒト末梢血単核球 MLR 培養系に、TAC(0.01〜1.2 nM)、MPA(0.003〜0.3 μM)及びミゾリビン (3.86〜386 μM) を添加し、CD4+あるいは CD8+と、IL-2R(CD25)、HLA-DR 及びトレンスフェリンレセプターをそれぞれ PE あるいは FITC で標識した抗体で 2 重染色した後、flow cytometer で測定した。その結果、各薬物の作用は T 細胞における IL-2R の発現をそれぞれ用量依存的に抑制した。MPA は 0.3 μM の添加で溶媒投与群に比較して約 1/2 に抑制したが、TAC の IL-2R 発現抑制作用は、MPA 及びミゾリビンに比べて 10 から 10,000 倍強力であった (図ホ-7)。TAC は、カルシニューリンを特異的に阻害することで T 細胞受容体からのシグナル伝達を抑制し IL-2 遺伝子発現を阻害するという、細胞性免疫発現の初期の段階を阻害すると考えられている。したがって、TAC の作用は T 細胞に特異的である。一方、MPA あるいはイミダゾール系ヌクレオシドであるミゾリビンはシグナル伝達系を阻害することはないが、核酸合成阻害という細胞増殖に関わる生理作用を直接抑制することから、T 細胞のみならず B 細胞にも有効性を示す可能性、すなわち臨床的には細胞性免疫及び液性免疫を制御する可能性が期待される。



タクロリムス 濃度 (nM)　　MPA 濃度 (μM)　　ミゾリビン濃度 (μM)

図ホ-7　MLR により活性化させた CD4+及び CD8+陽性リンパ球に対する各種免疫抑制剤の IL-2R 発現抑制作用

1-2. ミコフェノール酸モフェチル（MMF）の作用機序

MMF は、MPA のバイオアベイラビリティを改善するためにモルフォリノエチル基を配する誘導体として合成された。MMF は血漿中では不安定であり、37℃の条件下でラット血漿中では速やかに（$t_{1/2}$=5 分以下）、イヌ、サル及びヒト血漿中では緩やかに（$t_{1/2}$=8～18 時間）加水分解された 。以下に示す一連の実験は、MMF を培養液中に添加し各種の試験をおこなっている。培養液には、主にウシ血清が添加されていることから、反応時間中に MPA に変換されるものと考えられるが、ウシ血清中での MMF の $t_{1/2}$ は検討されていない。

1-2-1. 腫瘍細胞株に対する抗増殖作用

ヒト由来各種細胞株での MPA の抗増殖作用を検討するとともに、ヌクレオシド添加による抑制効果も検討した。下記のリンパ腫及び骨髄腫細胞株を用い、5×10^{-8}～5×10^{-7} M の MMF の抗増殖作用を ^{3}H-TdR の取り込みを指標に検討した。また、10、20 μM のグアニン又はデオキシグアノシンを培養液中に添加し、MMF の抗増殖作用に及ぼす影響を検討した。なお、培養時間は 24、48 及び 72 時間とした。

腫瘍細胞株：CCRF-CEM ---ヒトリンパ芽球細胞、T 細胞由来
JURKAT ---ヒト急性リンパ球白血病、T 細胞由来
BUC-7 ---HGPRT 欠損 CCRF 細胞
RPMI-8226 ---ヒト骨髄腫
SKO-007 ---HGPRT 欠損クローン、J3-ヒト骨髄腫

MMF は培養 24 時間で既に検討した細胞株の増殖を抑制し、48 及び 72 時間の培養で作用の増強が認められた。各細胞株の MMF に対する感受性は異なっており、24 時間培養では HGPRT を欠損した T 細胞系の BUC-7 が最も高感度であった（表ホ-8）。24 時間培養後の MMF の抗増殖作用は、グアニン及びデオキシグアノシン添加により CCRF、JURKAT 及び RPMI-8226 細胞株で著明に抑制された（表ホ-9）。一方、HGPRT を欠損した BUC-7 及び SKO-007 細胞株では、抑制作用は認められなかった。以上より、MMF のリンパ腫及び骨髄腫由来細胞の増殖抑制作用には、細胞内グアニン及びデオキシグアノシンの枯渇が重要であるものと考えられた。

表ホ-8 各種腫瘍細胞株に対する MMF の抗増殖効果

腫瘍細胞株	IC_{50}（nM）*
CCRF-CEM	149.2 ± 10.8
JURKAT	132.1 ± 25.7
BUC-7	74.9 ± 8.2
RPMI-8226	287.4 ± 111.0
SKO-007	151.3 ± 31.9

*：平均値±標準誤差（n=3～4）

IC_{50}値は、MMF を 0～500 nM の用量で各腫瘍細胞株の培養液中に添加して24 時間培養後、^{3}H-チミジンの取込みを測定し算出した。

表ホ-9　各種腫瘍細胞株に対するMMFの抗増殖効果とグアニン及びデオキシグアノシンの抑制作用

腫瘍細胞株	MMF 250 nM		
	None	グアニン 10 μM	デオキシグアノシン 10 μM
CCRF-CEM	15.5 ± 2.4	102.3 ± 37.5[a]	115.4 ± 12.3a
JURKAT	10.3 ± 1.3	100.8 ± 28.1[a]	110.0 ± 13.1[a]
BUC-7	4.3 ± 0.9	4.5 ± 0.9	4.5 ± 1.1
RPMI-8226	58.4 ± 25.2	94.2 ± 19.1	103.7 ± 23.8
SKO-007	20.2 ± 6.5	25.2 ± 10.3	18.3 ± 2.9

*：平均値±標準誤差（n=3～4）

a：MMF 単独処置群と比較した有意差、P＜0.02（一元配置分散分析）

1-2-2. ヒト脾臓細胞増殖反応に対する抑制作用

MMF の免疫系細胞に対する影響を検討する目的で、Pokeweed Mitogen（PWM）で刺激したヒト脾臓細胞培養系に MMF を添加して細胞増殖抑制活性を検討した。

PWM（10 μg/ml）添加ヒト脾臓細胞培養系に、10^{-12}～10^{-5} M の MMF あるいはシクロスポリン A（CsA）を培養初日又は 3 日目に添加し 6 日間培養した。培養終了後、DNA への ^{3}H-TdR の取り込みを測定し、MMF あるいは CsA の増殖に及ぼす作用を検討した。

MMF 及び CsA は、PWM 刺激ヒト脾臓 B リンパ球の増殖を抑制した。培養開始時に CsA を添加した場合、細胞増殖効果が明確であったが、これはおそらく T 細胞のリンホカイン産生抑制によるものと考えられた。一方、MMF は培養初日の添加で CsA と同等の増殖抑制効果を示し、更に 3 日目添加では一層効果的であった（表ホ-10）。MMF は IL-1 産生あるいは T 細胞の IL-2 産生あるいは IL-2 受容体発現に対して影響は及ぼさない、すなわちシグナル伝達系には影響しないが、DNA 合成の後期である G1→S 期の過程を阻害すると考えられている。このことから、MMF と CsA は細胞増殖過程において、それぞれの作用部位の違いが効果の違いになって現れたものと考えられた。

また、MPA は PHA（5 あるいは 25 μg/ml）、Con A（2.5 μg/ml）あるいは LPS（25 μg/ml）で刺激したマウス及びラット脾臓細胞の増殖を抑制した（IC_{50}=12～60 nM）　。

表ホ-10　ヒト脾臓 B リンパ球における増殖抑制作用

薬物	添加日	
	0 日	3 日
MMF	314	61
CsA	287	807

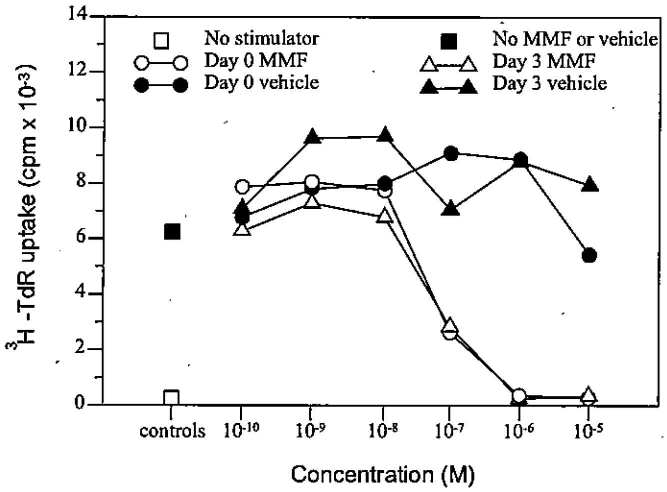
数値は IC_{50} 値（nM）を示す

1-2-3. 混合リンパ球反応（MLR）に対する MMF の抑制作用

ヒト白血球抗原（HLA）の異なるヒトリンパ球（HLA-A、-B、-DR 抗原）培養系を用い、混合リンパ球反応（MLR）に対する MMF の抑制作用を検討した。

HLA の異なるヒトリンパ球（HLA-A、-B、-DR 抗原）培養系に対して、培養初日あるいは 3 日目に 10^{-10}～10^{-5} M の MMF を共存培養した後、6 日目に ^{3}H-TdR 取り込みを検討した。

培養初日及び 3 日目に添加した MMF は、同種抗原刺激応答である MLR を用量依存的に抑制し（IC_{50} = 70 nM）、10^{-6} M 以上の濃度でほぼ完全に MLR を抑制した（図ホ-8）。



図ホ-8　混合リンパ球反応に対する MMF の抑制作用

同様の試験系で、MPA の混合リンパ球反応の抑制作用を検討したところ、培養初日及び3日目の添加で MMF とほぼ同等の抑制（IC_{50}=30～70 nM）を認めた　　。

1-2-4. リンパ球増殖反応抑制作用の

MMF 投与が生体の免疫系に及ぼす影響を検討するため、MMF を長期経口投与し ^{3}H-チミジンの細胞内への取込みを測定した。

サル（雄7例、雌7例/群）に MMF 6 及び 20 mg/kg を1日1回3ケ月間又は6ケ月間経口投与した。各々の初回投与前、投与終了時（最終投与の 24 時間後）及び回復期間（投与終了1ケ月間）後に採血し、末梢血リンパ球を得た。このリンパ球を各種マイトジェン（PHA:20 μg/ml、Con A:2.5 μg/ml、SPAS:1 mg/ml）で刺激し、増殖反応性の差異を検討した。また、MMF の最終投与1時間後に採取した血清を、MMF 投与群及び対照群から得たリンパ球へ添加培養し、Con A 刺激リンパ球反応に及ぼす影響を検討した。MMF 投与群から得たリンパ球は、各種マイトジェン刺激反応において、対照群との間に有意な差を認めなかった（表ホ-11)。3又は6ケ月間本剤を投与したサルから採取した血清は、対照群及び MMF 投与群の Con A 刺激リンパ球の増殖反応を用量依存的（0～20 mg/kg/日）に抑制し（表ホ-12)、その作用は MPA の血清中濃度と相関性を示した（表ホ-13)。また、回復期間後の血清（MPA 濃度は検出限界以下）には抑制作用が認められなかったことより、その作用は可逆的であることが示された。雌性サルでもほぼ同様な結果が認められた。

表ホ-11　サル末梢血リンパ球増殖反応に対する MMF 長期投与の影響

MMF 用量 (mg/kg/日)	マイトジェン	投与期間（月）			
		0	3	6	投与終了 1 ケ月後
		^{3}H-チミジン取込み（×10^{4} cpm）			
0	PHA	5.6 ± 2.1	6.2 ± 1.8	5.7 ± 1.5	4.8、9.2
	Con A	11.2 ± 3.5	7.0 ± 1.0[a]	9.1 ± 2.0	7.0、14.6
	SPAS	3.1 ± 0.75	2.6 ± 0.72	4.4 ± 0.63[b]	3.3、4.3
6	PHA	6.5 ± 2.7	5.6 ± 1.6	6.1 ± 0.91	7.8、6.2
	Con A	12.9 ± 2.4	7.0 ± 1.0[a]	10.8 ± 2.1	15.1、8.3
	SPAS	3.5 ± 0.7	2.2 ± 0.55[b]	4.4 ± 0.54[a]	6.2、5.4
20	PHA	4.0 ± 2.2	4.4 ± 1.4	5.3 ± 1.5	7.6、6.9
	Con A	9.5 ± 2.7	6.0 ± 1.8[a]	8.9 ± 2.3	9.5、14.4
	SPAS	3.2 ± 1.0	1.9 ± 0.84[a]	4.1 ± 0.80	5.1、5.3

a：対照群と比較した有意差、$p<0.05$　b：$p<0.01$（分散分析及び Dunn の検定）　平均値±標準偏差（n=7、雄）

表ホ-12　MMF を長期投与したサルの末梢血リンパ球増殖反応（Con A 刺激）に及ぼす作用

MMF 用量 (mg/kg/日)	投与期間 (月)	血清採取群（2%血清を添加）		
		0 mg/kg/日	6 mg/kg/日	20 mg/kg/日
		^{3}H-チミジン取り込み（×10^{4} cpm）		
0	3	7.2 ± 1.3	2.2 ± 1.2[a]	0.10 ± 0.037[a]
	6	9.2 ± 3.3	1.5 ± 1.6[a]	0.035 ± 0.011[a]
	回復後	8.2 ± 10.8	12.0 ± 12.9	8.5 ± 13.8
6	3	7.6 ± 1.6	3.0 ± 2.3[a]	NT
	6	10.7 ± 2.0	1.4 ± 0.67[a]	NT
	回復後	12.2、11.5	8.6、8.0	NT
20	3	7.6 ± 1.1	NT	0.064 ± 0.016[a]
	6	9.5 ± 2.8	NT	0.42 ± 0.18[a]
	回復後	17.4 ± 17.8	NT	10.7、14.1

a：対照群との比較、$P<0.01$（三元配置分散分析）　平均値±標準偏差（n=7、雄）、NT: 未測定

表ホ-13　MMF 長期投与後（最終投与 1 時間後）のサル血漿中 MPA 濃度

用量 (mg/kg/日)	投与期間（月）		
	1	3	6
	MPA 濃度（μg/ml）		
0	<0.40	<0.40	<0.40
6	1.65 ± 0.66	1.05 ± 0.68	1.58 ± 0.49
20	9.40 ± 3.16	7.10 ± 1.85	12.4 ± 3.40

平均値±標準偏差（n=7、雄）

1-2-5. MMF 投与による抗体産生抑制作用

① *In vitro* におけるヒト脾臓細胞の抗体産生能に対する MMF の作用

10^{-12}～10^{-5} M の MMF あるいは CsA を添加して 6 日間培養するにあたり、各々培養開始日及び 3 日目に被験薬を添加し、培養開始日添加群では被験薬添加後 6 日目、3 日目添加群では被験薬添加後 3 日目に測定を行

った。Pokeweed Mitogen で刺激したヒト脾臓 B リンパ球の非特異的抗体産生に及ぼす影響は ELISA 法により検討した。また、tetanus toxoid 抗原特異的な免疫グロブリン G（IgG）反応に及ぼす影響も ELISA 法により検討した。PWM 刺激したヒト脾臓 B 細胞への MMF 添加により、免疫グロブリン M（IgM）及び IgG 産生の抑制が認められた。IgM 産生抑制作用は培養初日添加で強く、一方、IgG 産生抑制作用は 3 日目添加で一層効果的であった。CsA の IgM 及び IgG 産生抑制作用は、共に培養初日添加でのみ有効であった（表ホ-14)。

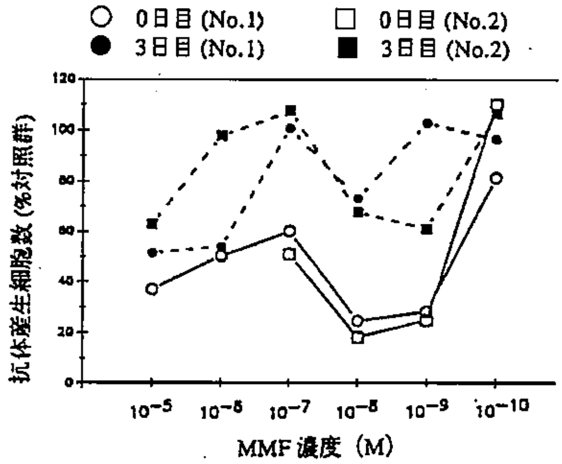
表ホ-14　ヒト脾臓 B リンパ球の抗体産生抑制作用

被験薬		ID_{50}値（50%抑制用量：nM）			
		IgM		IgG	
	添加日	0 日	3 日	0 日	3 日
MMF		325	752	92	7
CsA		35	875	6	>1000

またMMF は、tetanus toxoid 特異的な IgG 抗原記憶細胞の増殖を培養初日、3 日目添加のいずれでも有意に抑制し、その作用は培養初日添加で最も効果的であった（図ホ-9)。これらのことから、CsA は免疫グロブリン産生応答を低下させることよりも、Ig 産生のシグナル伝達を阻害する化合物であることが示唆された。一方 MMF は、細胞増殖を抑制することで Ig 産生を制御することが示唆された。

また、MPA の抗体産生抑制作用をマイトジェン（*Staphylococcus aureus* Cowen 1）刺激したヒト末梢血リンパ球を用いて検討したところ、低濃度で抑制した（IC_{50}=26nM）　　。

MPA はマイトジェン刺激で誘導した T あるいは B リンパ球の増殖及びリンパ球混合反応（MLR）を阻害することは示したが　　、MPA は刺激に対する反応過程の比較的後期、すなわち細胞増殖を阻害する。そのため、MLR 開始後 72 時間に MPA 添加しても強力な阻害効果が認められた。一方、CsA あるいは TAC は T リンパ球の活性阻害、IL-2 産生抑制等、刺激に対する反応過程の早期に抑制をかける薬物であり、MPA とは全く異なった経路を阻害することで効果を示す。一般に、IgM は一次抗原刺激によって早期に分泌型 IgM として出現し、その後二次抗原刺激（T 細胞依存抗原の刺激、T 細胞のヘルプ等）により IgG、IgA あるいは IgE 等にクラススイッチしていく。この時、IgM 産生には IL-2、またクラススイッチには IL-4 の関与がそれぞれ必要であることが分かっている。別の報告では、phytohemagglutinin 刺激したヒト末梢血由来単核球培養系に MPA 0.001～10 μM を適応した時、IL-2 産生には何ら影響しなかったことが示されている。したがって、MPA は抗原刺激後の比較的早期に産生される IgM に対する抑制作用は強くないものの、二次抗原刺激後の反応過程で産生される IgG に対する抑制作用は明確なものとなって現れたのではないかと推察された。



図ホ-9　Tetanus toxoid 特異的 IgG 反応に対する MMF の抑制作用

② In vivo におけるマウス及びラットの抗体産生能に対する MMF 投与の効果

MMF の投与が *in vivo* における抗体産生能に及ぼす影響をマウス及びラットを用いて検討した。

C57BL/6 Bkl 雄性マウスにヒツジ赤血球 (SRBC : 1×10^8 細胞) を腹腔内に接種すると同時に、MMF 10、20、40、60 mg/kg を感作初日から 4 日間経口投与し、5 日目に脾臓を摘出した。脾細胞を SRBC 及びモルモット補体と 2 時間培養し、脾臓当たりの総プラーク形成細胞数 (PFC/脾臓)、有核細胞 10^6 個当たりのプラーク形成細胞数 (PFC/10^6 WBC) 及び脾臓当たりの有核細胞数 (WBC/脾臓) を測定し、抗体産生に及ぼす影響を検討した　。

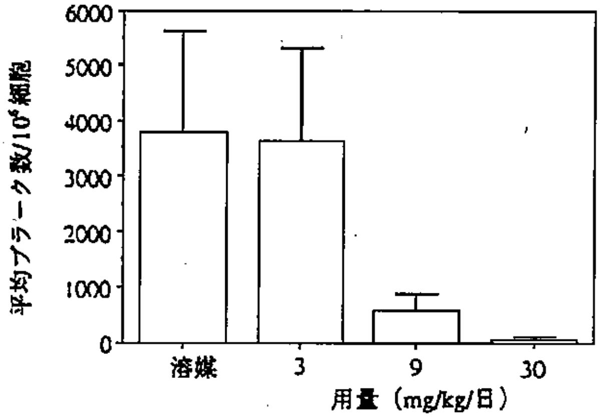
マウスを用いた 4 日間投与試験において、MMF 20～60 mg/kg 投与群の PFC/脾臓及び PFC/106　WBC は、対照群に比し有意に減少した (40～88%)。一方、WBC/脾臓への影響は認められず、MMF は脾臓の WBC 数に影響することなく抗体産生抑制作用を示した (表ホ-15)。

表ホ-15　MMF (4 日間経口投与) によるマウス SRBC 抗体反応の抑制作用

用量 (mg/kg/日)	例数	PFC/脾臓	抑制率 (%)	PFC/10^6WBC	抑制率 (%)	WBC/脾臓 ($\times10^6$)
0 (対照)	8	107,438±39,742	0	731±266	0	147±16
10	6	85,667±19,439	20	650±178	11	134±13
20	6	62,167±22,255^b	42	438±147^a	40	141±10
40	6	20,667±19,044^b	81	146±130^b	80	138±7
60	6	13,417±15,396	88	90±100^b	88	131±30

a : 対照群と比較した有意差, $p<0.05$　　b: $p\leq0.001$ (分散分析及び Dunn の検定)
平均値±標準偏差

また、ラットに MMF 3、9、30 mg/kg を 30 日間経口投与したときの SRBC (脾臓摘出の 4 日前に腹腔内投与) 抗体産生に及ぼす影響を、同様な方法で検討した　。ラットの 30 日間投与試験では、抗体産生を 9 mg/kg 投与群で 84%、30 mg/kg 投与群ではほぼ完全に抑制した (図ホ-10)。



図ホ-10　MMF（30日間経口投与）によるラットSRBC抗体反応の抑制作用

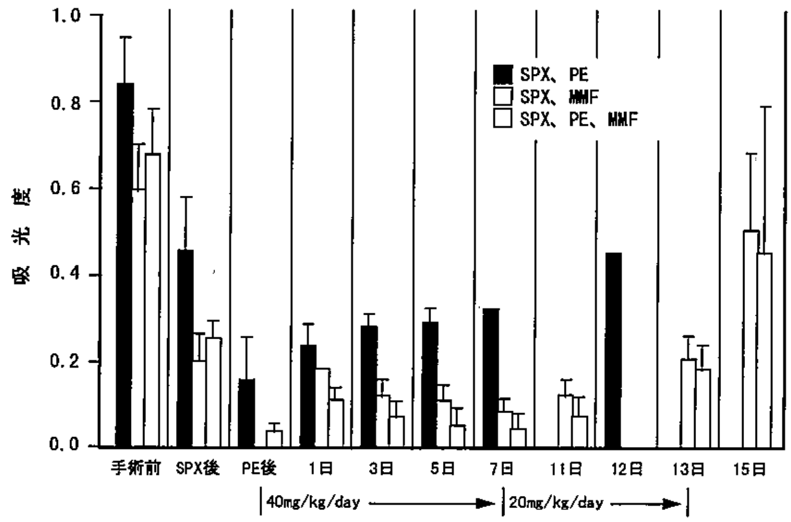
平均値±標準偏差（n=5）

③ ラットの自然抗体産生能に対するMMFの効果

自然抗体は不適合異種移植の超急性拒絶反応のトリガーとして重要な因子と考えられている。この自然抗体を枯渇することで、不適合異種移植片の生着を延長する可能性が示唆されている。脾臓摘出ラットを用いて、自然抗体産生能に対するMMFの影響を検討した。

9例の雄性Brown Norway系ラットに脾臓摘出術（SPX）を施行し、このうち6例に同種ラットの血漿4mlの交換を9回実施し（SPX/PE）、自然抗体を枯渇させた。その直後よりMMF 0あるいは40 mg/kgを7日間、その後20 mg/kgに減量して更に7日間連続経口投与した。術後より再び産生された血中の自然抗体価の経時変動をELISA法にて測定した。

脾臓摘出（SPX群）により自然抗体価は低下し、その後の血漿交換（SPX/PE群）により更に減少した。MMF非投与群の抗体価は血漿交換後緩徐に上昇し、12日目には血漿交換前値にまで回復した。SPX群へのMMF投与は、投与前値に比較して低い抗体価が1週間以上に亘って持続し、MMFを投与したSPX/PE群とほぼ同レベルを維持した（図ホ-11）。投与中止後には速やかに脾臓摘出術前値のレベルに復した。



図ホ-11　脾臓摘出ラットにおける自然抗体産生の抑制作用

平均値±標準偏差、n=3

④ ラット異種心臓移植モデルにおける拒絶反応発現と抗体産生

ハムスターの心臓をラットに移植した異種移植モデルを用いて、タクロリムス(TAC)とMMFあるいはシクロホスファミド(CyP)の併用投与、特に薬剤投与の中止が移植片に及ぼす影響を拒絶反応の発現と経時的な抗体産生レベルについて検討した。

雄性Golden Syrian系ハムスター(ドナー)の心臓を雄性Lewis系ラット(レシピエント)の腹部に異種移植した。CyP投与群(n=8)として移植術直後(0日)から7日までCyP 10 mg/kg/日及び0日から30日までTAC 1 mg/kg/日を投与した。 また、MMF投与群(n=8)として、同じく0〜7日までMMF 25 mg/kg/日及び0〜30日までTAC 1 mg/kg/日を投与した。移植片の生着とラット抗ハムスター抗体の産生をIgG及びIgM分画を測定することで検討し薬物投与の効果を評価した。

移植片の生着は、CyP群で45.3±1.9日(平均±標準偏差)、MMF群で46.1±2.2日であった。TAC投与終了後、それぞれ15.3±1.9日、16.1±2.2日後に拒絶反応が発現した。抗ハムスターIgG及びIgMを測定した結果を表ホ-16に示した。ここでは、それぞれの投与群で7日まで、すなわちCyPあるいはMMFを投与している期間では抗体産生は維持・抑制され30日でも上昇はしたが、IgG産生は拒絶反応発現時でもTAC投与中止時とほぼ同等のレベルに維持した。一方、IgMレベルはMMF/CyP投与中止後から徐々に上昇し始め、TAC投与中止時後、さらに急激に上昇したと考えられた 。

表ホ-16 ラット抗ハムスター抗体の産生

		IgG(中央値)	p値(vs. 0日)	IgM(中央値)	p値(vs. 0日)
CyP	0日	48	-	38.5	-
	7日	36.5	0.04	30.5	NS
	30日	75	NS	77	NS
	拒絶反応発現時	70	NS	242	0.002
MMF	0日	49.5	-	41.5	-
	7日	41.5	NS	38	NS
	30日	91	0.02	158	0.01
	拒絶反応発現時	99	0.07	231.5	0.001

別のグループは、この異種移植モデルに対してMMFとTACを30日間併用投与したところ移植心臓が100日以上生着したと報告した 。このように投与レジメによっては免疫寛容(トレランス)の導入も可能であることが示唆されているが、これには抗体産生抑制及びリンパ球活性抑制が重要な要因であると考えられる。この実験では、TACをベースに、リンパ球増殖抑制作用を持つ薬剤であるCyPあるいはMMFを併用投与している。処置後一週間はMMFあるいはCyPの投与によって抗体産生には大きな変化は観察されなかったものの、これら薬物の投与を中止した後の30日では抗体産生レベル、とくにIgM産生レベルが明らかに上昇しており、TACの単独投与だけでは抗体産生を抑制しきれないことが推測された。従って、MMFあるいはCyPといったリンパ球機能に抑制作用を示す薬剤を移植術後早期に投与中止することは、移植片の長期生着に重大な影響を及ぼすものと考えられる。

1-2-6. ヒト末梢血単球/リンパ球のIL-1β/IL-2産生に対する影響

Lipopolysaccaride(LPS、20 μg/ml)で刺激したヒト末梢血単球のIL-1β産生、あるいはPHA(40 μg/ml)刺激したヒト末梢血単核球(リンパ球)のIL-2産生に及ぼすMMFの影響を検討した。

10^{-7}〜10^{-5}MのMMFはELISA法にて測定したIL-1β量に(表ホ-17)、また10^{-9}〜10^{-5}MではIL-2依存性ラット細胞傷害性T−リンパ球細胞株(TLL-2)への^{3}H-TdR取り込み量(IL-2量、表ホ-18)に、何ら影響を与えなかった。

表ホ-17 ヒト末梢血単球のIL-1β産生に対するMMFの影響

MMF（M）	IL-1β量（ng/ml）
0	2.35 ± 0.23
1×10^{-7}	3.34 ± 0.09
1×10^{-6}	2.93 ± 0.09
1×10^{-5}	3.11 ± 0.04

*：平均値±標準偏差

（対照群は 3 回の繰り返し試験より、MMF処置群は単回試験より求めた）

表ホ-18 ヒト末梢血リンパ球のIL-2産生に及ぼすMMFの影響

MMF（M）	^{3}H-チミジン取込み（cpm）*
0（PHA非刺激）	1,272 ± 70
0（PHA 40 μg/ml）	23,005 ± 182
1×10^{-9}	25,341 ± 644
1×10^{-8}	24,355 ± 199
1×10^{-7}	26,480 ± 635
1×10^{-6}	23,547 ± 601
1×10^{-5}	21,403 ± 488

*：平均値±標準誤差（n=4）

2. 各種臓器移植モデルに対するMMFの予防的投与の検討

2-1. イヌ

2-1-1. 腎臓同種移植イヌに対するMMF予防的投与の生存期間延長作用

雌性イヌ（20～25 kg）を用いて、イヌ腎同種移植におけるMMFの予防的投与による拒絶反応の出現抑制作用を検討した。ドナーからの腎臓をレシピエントの右腸骨窩に移植し、直後にレシピエントの両腎を摘出した。MMF（単独40 mg/kg：臨床用量にほぼ相当、他剤併用20 mg/kg）、CsA（5 mg/kg）、メチルプレドニゾロン（MP、0.1 mg/kg）を、移植日から試験期間中、1日1回経口投与した。血清クレアチニンが8 mg/dl以上、又は瀕死の状態が確認された動物は、切迫屠殺した。血液生化学的検査を移植後100日目までは毎日行い、その後は週に1回行った。

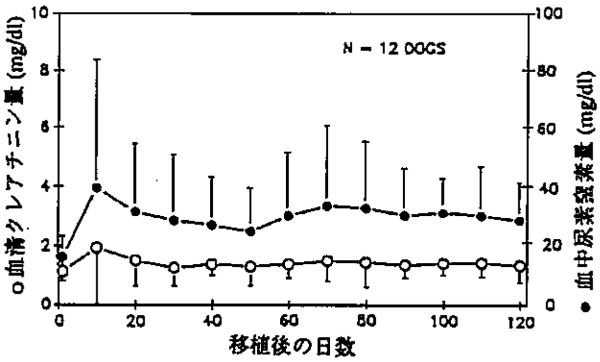
第2群（CsA + MP併用群）では生存日数が約8日間で、第1群（対照群）と差がなかった。第3群（MMF単独投与群）での平均生存日数は、36日間と有意に延長した。しかし、移植1ケ月後から拒絶反応が出現した他、副作用として悪心、嘔吐、下痢、胃炎、食欲不振等の消化器系症状が認められた。第4群（3剤併用群）では免疫抑制作用は増強され、生存日数が著しく延長（122日間）した（表ホ-19）。

表ホ-19 イヌ同種腎移植後の生存期間延長作用

群	例数	投与（mg/kg経口）	生存日数（日）
1	5	—	8.1 ± 1.2
2	6	CsA(5)+MP（0.1）	8.5 ± 1.7
3	6	MMF(40)	36.0 ± 9.6^a
4	16	MMF(20)+CsA(5)+MP（80.1）	122.4 ± 38.75^b

平均値±標準偏差

a：第1群と比較した有意差、$p<0.05$　b：$p<0.002$（χ^2検定）



図ホ-12　3剤併用処置群における血清クレアチニン及び血中尿素窒素の変動

平均値±標準偏差

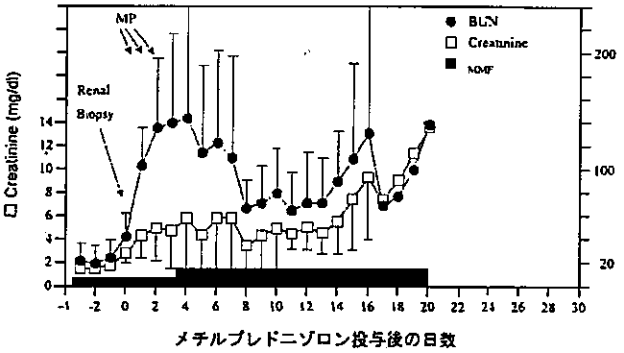
第3群及び第4群では、肝障害、腎障害、骨髄抑制及び重篤な感染症は認められなかった。第4群における血液生化学的検査も、血清クレアチニン、血中尿素窒素及び電解質は拒絶反応が発生するまでは正常であった（図ホ-12）。アルカリホスファターゼ活性の軽度の上昇を除き、薬物に起因した血液学的障害は認められず、白血球減少症、血小板減少症、貧血は試験期間を通して観察されなかった。

また、この同種異所性腎移植モデルイヌを用いて、進行性急性拒絶反応に対する MMF の治療作用を検討した。腎移植後、MMF（10 mg/kg: 臨床用量の約 1/4 量）、CsA（5 mg/kg: 臨床維持量）ならびに MP（0.1 mg/kg: 臨床維持量）を基礎免疫抑制剤として経口投与した。これら用量での 3 剤併用療法は、イヌ腎臓同種移植における急性拒絶反応を、阻止できないことが既に判明している。この併用療法中に急性拒絶反応が確認された場合、以下の処置を実施し，急性拒絶反応に対する作用を検討した。なお、拒絶反応の発生は、血清クレアチニン値が術後 1 週間以内に測定した最低値を 50% 以上上回っていることとし、腎生検結果と合わせて確定した。

第 1 群（11 例）：拒絶反応確認後、MP（14, 7, 3.5 mg/kg =成人の 1.0, 0.5, 0.25 g に相当するパルス療法時の投与用量）を高用量から順に 3 日間連続静脈内投与。その後、併用基礎療法剤の MMF のみを倍量の 20 mg/kg に増量。

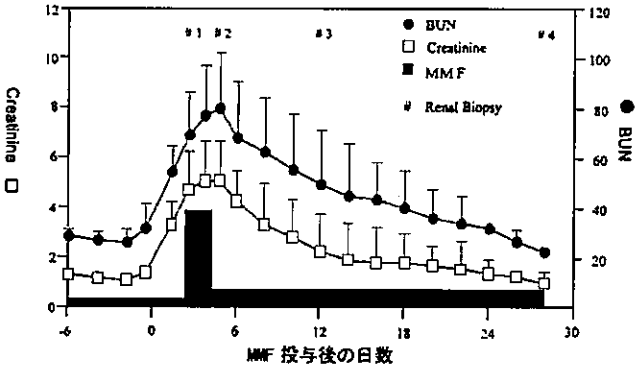
第 2 群（16 例）：拒絶反応確認後、MMF（80 mg/kg 1 日 2 回，臨床用量の約 4 倍量）を 3 日間連続経口投与。その後、併用療法剤の MMF のみを 20 mg/kg に増量。

移植 7.5～8.8 日後の全例に、血清クレアチニンの上昇及び腎生検より急性拒絶反応が認められたため、併用療法の他に上記の処置を行った。第 1 群の 11 例中 5 例は、ステロイド投与及び基礎免疫療法の MMF 倍量投与という処置だけでは拒絶反応を抑制できず死亡した。残りの 6 例では同様の処置で一時的に拒絶反応の進行を遅延させたが、最終的に拒絶反応確認後から 20 日以内にすべて尿毒症で死亡した（図ホ-13)。拒絶反応確認後の平均生存日数は 9.4 日であった。一方、第 2 群では，16 例中 14 例（87.5%）に急性拒絶反応が抑制された（図ホ-14 ）。このように、イヌで検討した進行性急性拒絶反応発生後の治療には、MMF のパルス的な投与が有効であるが、極めて高用量の投与が必要である。この試験の場合は、治療投与で認可されている推定臨床用量の約 4 倍量を 3 日間経口投与されているが、忍容性は良好であったとされている。また、本薬を含む代謝拮抗剤によるパルス療法は確立されていないため、現実的な治療法ではなく臨床的に推奨されるものではない。



図ホ-13 イヌ同種腎移植の拒絶反応に対するステロイド処置

平均値±標準偏差



図ホ-14 イヌ同種腎移植の拒絶反応に対する MMF の治療効果

平均値±標準偏差

一般に、一次同種移植片の移植初期における急性拒絶反応の殆どはT細胞及びその産生物により仲介され、B細胞及びB細胞が産生する抗体は、超急性期拒絶反応及び後期における慢性拒絶反応に関連した血管系の変化に重要な役割を果たしている [1]。このことから、急性拒絶反応発現後の治療には、T 細胞及びその産生物の作用を抑制する薬剤が要求されるが、予防的に投与される免疫抑制剤は細胞性及び液性免疫反応の両方を抑制できることが望ましい。CsA、TAC 等は、T細胞に作用する免疫抑制剤として知られているが、記憶B細胞の応答性がこの種の薬剤に対し抵抗性を示すことがわかっている。一方、MMF はその作用機序から、T及びB リンパ球系細胞に対し選択的に作用することが示されている。また、超急性期拒絶反応に関与していると考えられている自然抗体及び抗体産生能に対する効果が示されている。

2-1-2. 同種骨髄移植モデルに対する MMF 及びシクロスポリン A の併用投与の効果

骨髄移植の際に発現する移植片対宿主病 (GVHD) に対する発症抑制効果を検討するため、ドナー動物の末梢血から採取・調整した骨髄細胞及び末梢血白血球 (Buffy Coat 細胞) を、全身を放射線照射した DLA (Dog Leukocyte Antigen) の異なるレシピエント・イヌに移植した骨髄移植モデルを作成した。移植直後より MMF 及び CsA 併用投与し、その効果は各レシピエントの臨床症状、病理所見、生存日数、体重減少率で評価した (表ホ-20)。

この試験において、Group 2 では MMF 20 mg/kg/日と CsA 20 mg/kg/日投与により薬物起因性と思われる毒性が発現したことから、Group 3 で MMF 導入時の投与量を 12 mg/kg/日に下げたところ、安全性を確保しつつ有効性を示すことができた。また、4 週間という比較的短期間の MMF 及び CsA 併用反復投与で DLA の異なる

個体間の骨髄移植モデルに高率に拒絶反応の抑制効果を示すことができたと考えられた。

以上のことから、移植片の長期生着には抗体産生抑制等生体の防御機構を抑制することが重要であり、拒絶反応の抑制には移植術の直前直後から予防的な投与をすることが必要であることが示唆された。

表ホ-20 イヌ同種骨髄移植モデルに対するMMF及びCsA投与の効果

Dog No.	GVHD 臨床症状 急性	GVHD 臨床症状 慢性	GVHD 病理所見	生存日数 (日)	体重減少率 (%)	死因
Group 1						
D876	S, G	NA	S, L, G	20	28	GVHD、ET1
D935	S, L, G	NA	S, L, G	23	33	GVHD、ET1
D954	—	NA	—	8	25	ET1
D957	S, G	NA	S, L, G	28	33	GVHD、ET1
D958	S, G	NA	S, L, G	18	36	肺炎
D972	—	NA	—	12	17	感染症、腸管出血
Group 2						
D868	—	NA	—	6	15	MMFとCsAの毒性、ET1
D910	G	NA	S±, L±, G	28	40	体重減少、ET1
D911	—	NA	S±, L±, G	98	22	心筋炎
D936	—	NA	—	8	15	MMFとCsAの毒性、ET1
Group 3						
D823	—	S	S, L, G±	106	34	Skin GVHD、ET1
D960	—	NA	S, L, G	72	25	肺炎及び髄膜炎
D962	—	NA	—	7	17	腸重積及び敗血症、ET1
D967	S, G	NA	S, L, G	48	38	肺炎、ET1
D988	—	—	(chronic)G	>540	30	ET2
D992	—	—	S, L, (chronic)G±	>420	19	ET2
E071	—	—	L, G±	>420	38	ET2
E072	—	—	S, L, (chronic)G±	>510	29	ET2
E223	—	S±	S, L, (chronic)G	>420	26	ET2
Group 4						
E119	—	—	S±, L, (chronic)G	>316	23	ET2
E168	—	S	S, L,	119	18	Skin GVHD、ET1
E171	—	S	S, L, G±	>224	8	ET2
E207	—	S±	S, L, (chonic)G	>216	21	ET2
E210	L	NA	S, L, (chronic)g	95	41	感染症、GVHD、腎不全
E211	—	NA	S±, G	38	25	髄膜炎、ET1

Group 1：MMF 10 mg/kg s.c. bid (20 mg/kg/日) 0～27 日
Group 2：MMF 10 mg/kg s.c. bid (20 mg/kg/日) 0～27 日
CsA 10 mg/kg i.v. bid (20 mg/kg/日) 0～9 日→ 15 mg/kg p.o. bid (30 mg/kg/日) 10～27 日
Group 3：MMF 6 mg/kg s.c. bid (12 mg/kg/日) 0～2 日 → 10 mg/kg s.c. bid (20 mg/kg/日) 3～27 日
CsA 10 mg/kg i.v. bid (20 mg/kg/日) 0～9 日 →15 mg/kg p.o. bid (30 mg/kg/日) 10～27 日
Group 4：MMF 6 mg/kg s.c. bid (12 mg/kg/日) 0～2 日 → 10 mg/kg s.c. bid (20 mg/kg/日) 3～20 日
CsA 5 mg/kg i.v. bid (10 mg/kg/日) 0～5 日 → 15 mg/kg p.o. bid (30 mg/kg/日) 5～20 日→ 7.5 mg/kg p.o. bid (15 mg/kg/日) 21～45 日 → 5 mg/kg p.o. bid (10 mg/kg/日) 46～75 日 → 3 mg/kg p.o. bid (6 mg/kg/日 76～100 日
臨床症状／病理所見 S：結膜及び皮膚の紅斑、G：GVHD起因性の下痢（重度）、L：肝酵素及びビリルビンの上昇、ET1：全身症状悪化により安楽死、ET2：実験終了のため安楽死

2-1-3. イヌ肝臓同種移植に対するMMF+CsA予防的併用投与の効果

雌性イヌ（15～28 kg、 5～7 例/群）にドナーから摘出した肝臓を同所移植し、MMF 20 mg/kg 及びCsA 5、10 mg/kg の単独又は併用投与による移植片生着に及ぼす影響を検討した。MMF 及びCsA を移植日から 100 日間連日経口投与した。また、対照群を除いた全レシピエントにプレドニゾロン 0.1 mg/kg を移植翌日から 14

日間投与した。

MMF 単独投与群は、対照群より生存期間を有意に延長し、ステロイドの長期投与を含まない CsA との併用投与により、更に 5〜6 倍に延長した。特に第 7 群では全例が 50 日以上生存し、6 週間目まで肝機能は正常であった（表ホ-21)。全般的に MMF の耐容性は良好であり、下痢や嘔吐は認められなかった。

表ホ-21　イヌ同種肝移植後の生存期間延長に及ぼす MMF と CsA の影響

群	薬物（mg/kg 経口）	例数	生存日数（日）個別値（下線は中央値）	平均±標準偏差
1	対照	5	6, 6, <u>7</u>, 8, 9	7±1
2	プレドニゾロン（0.1）	5	6, 8, <u>9</u>, 11, 11	9±2
3	MMF（20）	5	9, 9, <u>10</u>, 11, 24	13±6[a]
4	CsA（5）	6	7, 17, 22, 35, 105, 120	51±49[a]
5	CsA（5）＋MMF（20）	5	27, 36, <u>68</u>, 90,110	66±35[a]
6	CsA（10）	5	8, 22, <u>44</u>,119,126	64±55[a]
7	CsA（5）＋MMF（20）※	7	52, 57, 65, <u>70</u>,110,125,126	86±33[b]

a：対照群と比較した有意差，$p<0.05$　b：$p<0.01$（Mann-Whitney U-検定）

※、6 週目以降 10 mg/kg に減量

2-2. ラット

2-2-1. MMF の単独投与による心臓同種移植片生着期間延長作用

Brown Norway 系ラット（ドナー）の心臓を Lewis ラット（レシピエント）の腹部に異所移植（ドナーの大動脈をレシピエントの腹部大動脈に、肺動脈を下行大静脈に吻合）した。移植日から 50 日間 MMF10、20、30、40 mg/kg を連日経口投与し、移植片生着に対する本薬の作用を検討した。MMF 単独投与で 40 mg/kg は臨床用量にほぼ相当する。また、移植片生着は腹壁からの触診により確認した。

MMF は、用量依存的かつ有意に生着期間を延長した（表ホ-22)。

表ホ-22　MMF 予防的投与のラット心臓移植片生着期間延長に及ぼす影響

MMF 用量（mg/kg 経口）	例数	生着日数（中央値、日）
0	5	7
10	5	10[a]
20	5	50[a]
30	5	107[a]
40	7	>200[a]

a：対照群と比較した有意差、$p<0.01$（対数順位検定）

また、同様のモデルラットを用いて移植術実施時期と MMF の投与のタイミングについて以下のような検討をした。

① 移植 1 日後（day 1）から 14 日間（day 14）まで、MMF 30 mg/kg を連日経口投与
② 移植術前 5 日（day −5）から術前 1 日（day −1）の 5 日間だけ、MMF 50 mg/kg を経口投与

以上の投与スケジュールで投与した場合の生着日数の中央値は、各々① 18 日、② 7 日となり、移植術後の継続的な投与が拒絶反応発現の抑制には必要であり、本薬の拒絶反応抑制作用は、移植日から投与した場合、最も効果的であることが推測された。

以上の検討より、MMF の予防的投与では、用量依存的に生着期間が延長し、また臓器移植後に継続的な投与を行う事が必要とされた。

2-2-2. MMF＋CsA 予防的併用投与による生着期間延長作用

Brown Norway 系ラットの心臓を Lewis ラットに上記と同様な方法で異所移植後、移植日から 50 日間にわたり MMF（10 mg/kg 経口）及び CsA（0.75 mg/kg 腹腔内）をそれぞれ単独又は併用投与し、移植片の生着期間におよぼす影響を検討した。

MMF 又は CsA を単独投与した時の生着日数は、各々10 日又は 11 日であった。それに対して、両薬物併用投与時の生着期間は単独投与時の 5 倍に延長し、相加的もしくは相乗的効果が認められた（表ホ-23)。

表ホ-23　ラット心臓移植片の生着期間に及ぼす MMF と CsA の併用効果

薬物	用量（mg/kg）投与経路	例数	生着日数（中央値、日）
MMF	10、経口	5	10
CsA	0.75、腹腔内	5	11[a]
MMF + CsA	10 + 0.75	5	55[a]

a：各単独投与群と比較した有意差、$p<0.01$（対数順位検定）

2-2-3. MMF、CsA 及び特殊飼料の併用投与による同種間心移植モデルの生着期間延長作用

ラット心臓同種間移植モデルに、MMF、CsA 及び免疫調節作用に関連した物質を強化した飼料を組み合わせて投与し、移植片の生着に及ぼす影響を検討した。

ACI 系雄性ラットの心臓を Lewis 系雄性ラットの腹部に移植し、MMF 45mg/kg/日（p.o.）あるいは CsA 2.5 mg/kg/日（s.c.）を単独あるいは併用で 7 日間投与した。レシピエント・ラットには、予め移植術施行前日に CsA 10 mg/kg s.c.及びドナー・ラットの全血 1ml i.v.を投与した（DST：ドナー特異的移植前輸血)。また、アルギニン、RNA、魚油（ω3 不飽和脂肪酸）等を強化した飼料を自由摂取させた。移植心臓の生着期間は表ホ-24 にまとめた。

表ホ-24　移植心臓生着期間のまとめ

群	投与	移植心臓生着期間	平均生着期間±SEM	P<0.05
1	MMF, SC	7,7,9,10,10,10,11,11	9.4±0.6	NS
2	MMF, DST, SC	10,11,11,12,12,12,14,14	12.0±0.5	vs. 1
3	MMF, I	11,11,11,12,12,13,13,45	16.0±4.2	vs. 1
4	MMF, DST, I	12,12,14,16,16,17,17,18	15.3±0.8	vs. 1, 2
5	MMF, CsA, SC	11,12,12,12,13,14,19	13.3±1.0	vs. 1
6	MMF, CsA, I	9,14,15,16,18,21,21,22	17.0±1.6	vs. 1, 2, 5
7	MMF, CsA, DST, SC	8,10,13,20,29,33,34,69	27.0±7.0	vs. 1
8	MMF, CsA, DST, I	23,26,31,41,44,52,180,235*	79.0±28.7	vs. 1, 2, 3, 4, 5, 6

SC：標準飼料（市販品）　I：強化飼料、いずれの飼料も自由摂取　MMF：45 mg/kg/日 経口投与（day 0～6）
CsA：10 mg/kg 皮下投与（移植前日）及び 2.5 mg/kg/日 皮下投与（移植後 0～6 日）
DST：ACI 系ラット（ドナー）の全血 1 ml を Lewis 系ラット（レシピエント）に静脈内投与（移植前日）
*：この症例は、論文投稿時にも生着していた。

MMF 単独投与では薬物の投与を終了後 4 日で全ての症例で移植心臓は拒絶された。一方、DST あるいは強化飼料摂取といった処置により臓器生着期間が延長した。さらに、CsA との併用でも有用であった。

2-2-4. MMF の予防的及び治療的投与による進行性急性拒絶反応抑制効果

Brown Norway 系ラット（ドナー）の心臓を Lewis ラット（レシピエント）の腹部に上記と同様な方法で移植した。予備的検討では、移植後に無処置の動物では移植 4 日目に既に重篤な拒絶反応を起していることが確認されていたため、MMF30 mg/kg を移植 4 日目から 50 日目まで連日経口投与し、進行性急性拒絶反応に対する治療作用を検討した。

対照群と比較して、MMF 投与群に移植片生着日数の有意な延長が認められ、薬剤投与の開始時期（移植 1 日目と 4 日目）による差は観察されなかった。これにより MMF の予防的あるいは治療的投与は、進行性急性拒絶反応の発現抑制に有効であることが示された（表ホ-25）。

表ホ-25 MMF 投与開始時期がラット心臓移植片の拒絶反応発現に及ぼす影響

MMF 用量（mg/kg 経口）	例数	投与期間（移植後日数）	生着日数（中央値、日）
0	5	1〜50	7
30	5	1〜50	107[a]
30	5	4〜50	105[a]

a：対照群と比較した有意差、$p<0.01$（対数順位検定）

2-2-5. ラット脈管炎

① MMF の予防的投与がラット移植心臓の増殖性冠動脈炎に及ぼす影響

同種移植片拒絶反応の発生要因の一つとして、同種抗原に対する抗体産生による増殖性血管炎が考えられている。この病変は血管内膜の傷害と血管壁の増殖により、結果として慢性拒絶反応の中核を構成すると考えられている。MMF は T 細胞活性抑制に加えて、B 細胞の機能抑制も示されていることから増殖性の血管炎に対する有用性を検討する試験を行った。

Brown Norway 系ラット（ドナー）の心臓を Lewis ラット（レシピエント、4 例/群）に移植し、移植術施行日から 50 日間にわたり MMF 30 mg/kg を、51 日目から 100 日目まで 20 mg/kg に減量して経口投与した。投与終了後、10 日間以内に移植心臓を摘出し、冠動脈に認められる増殖性・閉塞性脈管炎に及ぼす MMF の影響を組織学的に検討した。

移植心臓の拒絶反応の強さは、冠動脈の血管病変の重症度と相関した。心筋にリンパ球とマクロファージの重篤な浸潤が認められた 1 例では、冠動脈の多くに内膜増殖と内膜内へのリンパ球浸潤を伴う中等度の増殖性冠動脈炎を認めた。MMF は、冠動脈における脈管炎の発症を低下させ、重症度を軽減させた。

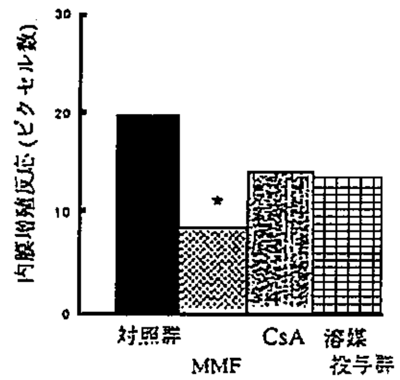
② ラット大動脈同種移植時の内膜増殖

ACI ラットの腎臓下大動脈（1 cm）を Lewis ラットに同所移植し、ヒトでの慢性拒絶反応の徴候を示す大動脈の移植片モデルを作製した。移植日の早朝から MMF 40 mg/kg（14 日間投与後に 30 mg/kg に減量）あるいは CsA 2.5 mg/kg を 3 ケ月間に亘って連日経口投与し、移植 1、2 週並びに 1、3、6、9、12 ケ月後の移植大動脈片に対するこれら薬物の影響を組織学的に検討した。MMF 40 及び 30 mg/kg は、ラット心臓同種移植試験で用いられた用量で（表ホ-22）、MMF 単独の予防的投与によってラット同種異系心臓移植の移植片生着を有意（$p<0.01$）に延長した用量である。

慢性拒絶反応に伴う増殖性・閉塞性脈管炎モデルで観察された種々の血管病変（表ホ-26）に対して、MMF は内膜増殖を有意に抑制し（図ホ-15）、中膜筋細胞数を維持した。一方、CsA 投与群では他の報告で ED_{50} 値付近として推測された用量で試験を実施したが、統計学的に有意な改善作用は認められなかった。

表ホ-26　慢性拒絶反応における増殖性・閉塞性脈管炎

移植術後期間（月）	発現した血管病変のまとめ
1	軽微な内膜増殖、著明な外膜炎症
3	著明な内膜増殖、中膜筋細胞数の著しい減少
6	著明な内膜増殖、中膜筋細胞の消失、中膜硬化
9	著明な内膜増殖、中膜筋細胞の消失、中膜硬化
12	中膜筋細胞の消失、中膜の硬化、全例に閉塞



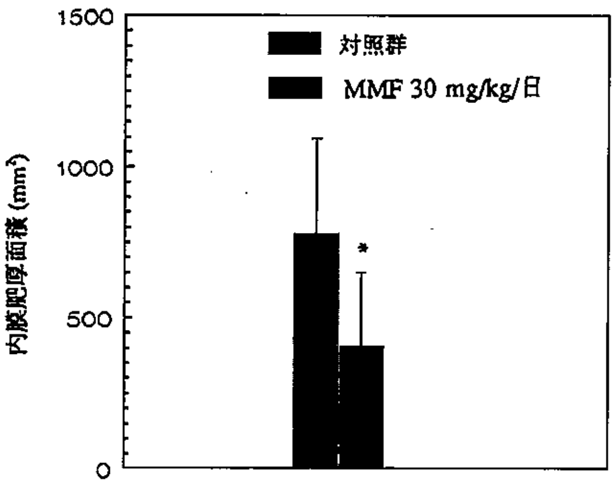
図ホ-15　移植3ヶ月後の内膜増殖のMMFによる抑制作用

*：対照群と比較した有意差、P=0.01

2-2-6. ラット頚動脈損傷モデルでの内膜肥厚

血管肥厚のモデルとして実験的に血管内膜を剥離したラットを作成しMMFの内膜肥厚抑制効果を検討した。ラット（30例/群）の左総頚動脈の一部（1 cm）に空気灌流することで内皮細胞を剥離し、内膜から中膜にかけて損傷させた。MMF 30 mg/kgを、この処置の6日前から14日後まで1日2回（6時間間隔）に分割して経口投与した。処置をした14日後に左右総頚動脈を摘出し、内膜肥厚に及ぼす本薬の影響を検討した。

MMFの予防的投与は、ラット総頚動脈損傷モデルにおける内膜肥厚を著明に（約50%）抑制した（図ホ-16）。



図ホ-16　ラット総頚動脈内膜肥厚モデルに対するMMFの予防効果

*: 対照群と比較した有意差、p＜0.001（t-検定及びMann-Whitney U-検定）

平均値±標準偏差

◎内膜増殖抑制作用に対するMPAの作用についての考察

臓器移植術実施時に移植臓器の血管及びその周辺の血管がダメージを受けること、それに引き続き起きる生体反応がさらに術後の予後を悪くしていると考えられている。主要な機序としては、以下の二点が指摘されている。

① 平滑筋細胞のaccumulation

② 内皮細胞の活性化と細胞接着因子の活性化

MMFあるいはMPAの投与は、これら生体反応を抑制することが示唆されている。

① 平滑筋細胞のaccumulationに対するMPAの作用

ヒト及びラットの大動脈から調整した平滑筋細胞及び内皮細胞培養系に、それぞれリコンビナントの血小板成長因子及び内皮細胞成長因子を添加して細胞増殖を促進した。これらに、表ホ-27に示す各種免疫抑制薬を共培養し^{3}H-チミジンの取込みを指標として細胞増殖活性の抑制作用を検討した。

表ホ-27　成長因子により細胞増殖を誘発した血管由来細胞培養系に対する各種免疫抑制剤の抑制作用

試料	薬物	投与用量（mol/L）	IC_{50}（mol/L）
ヒト平滑筋細胞	MPA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	$1\times10^{-6}\sim1\times10^{-5}$
	CsA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	1×10^{-6}*
	FK506	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-5}$	1×10^{-6}
	MP	$1\times10^{-9}\sim1\times10^{-5}$	$1\times10^{-5}\sim1\times10^{-5}$
ラット平滑筋細胞	MPA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	1×10^{-6}
	CsA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	$1\times10^{-6}\sim1\times10^{-5}$*
	FK506	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-5}$	no inhibition*
	MP	$1\times10^{-9}\sim1\times10^{-5}$	1×10^{-5}
ヒト内皮細胞	MPA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	1×10^{-6}
	CsA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-5}$	$1\times10^{-6}\sim1\times10^{-5}$*
	FK506	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-5}$	$1\times10^{-6}\sim1\times10^{-5}$
	MP	$1\times10^{-9}\sim1\times10^{-5}$	no inhibition
ラット内皮細胞	MPA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	1×10^{-6}
	CsA	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	1×10^{-5}*
	FK506	$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-4}$	no inhibition
	MP	$1\times10^{-9}\sim1\times10^{-3}$	1×10^{-5}

MPA：mycophenolic acid、　CsA：Cyclosporine A、　MP：methylpredonisolone

*：　適応濃度が100 μmol/Lで毒性発現した

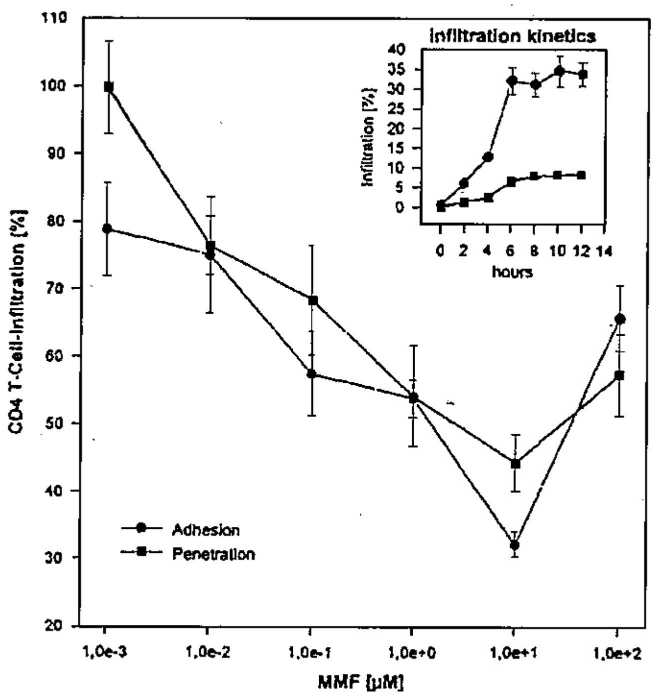
この結果から、MPAは成長因子で刺激したヒト及びラットの大動脈由来平滑筋細胞及び内皮細胞に対して細胞増殖活性を抑制した（表ホ-26、$IC_{50}=1\times10^{-6}\sim1\times10^{-5}$ mol/L）。この報告では、血管組織由来の細胞においてMPAがプリン生合成を特異的に抑制することで作用発現したと考察している。また、この時のIC_{50}値は別の研究グループの結果によるリンパ球の増殖抑制作用に比較して弱いものであった。

一方、CsA、タクロリムス及びMPはヒト及びラット由来の試料によって、^{3}H-チミジンの取込みに対して、同じ結果が示されなかった。

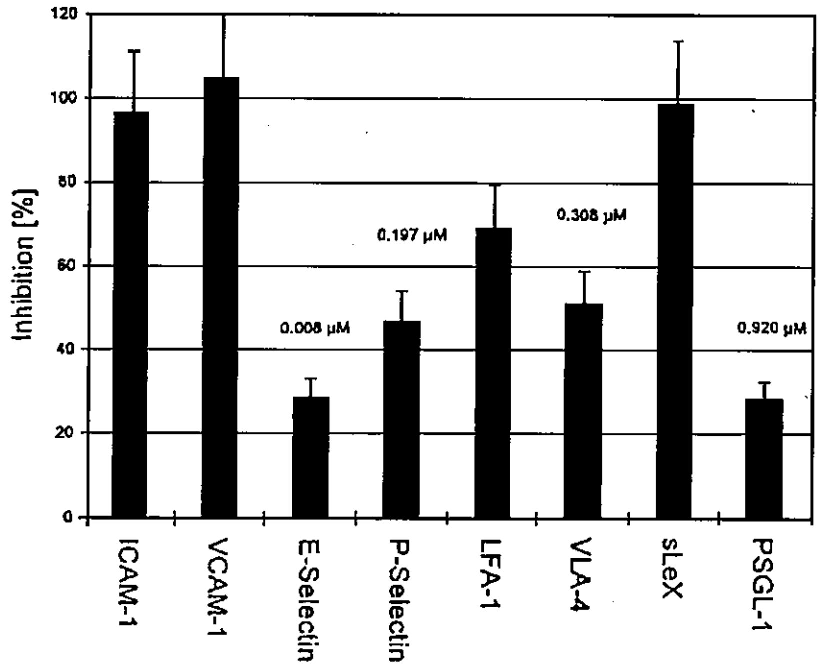
② 細胞接着因子に対するMMFの作用

炎症反応等の際に、活性化したリンパ球が標的臓器に浸潤することは知られているが、MMFはこのCD4^{+}及びCD8^{+}リンパ球の血管組織への浸潤を抑制する。Blaheta et al.は内皮細胞培養系を用いてin vitroで血管傷害モデルを作成した。すなわち、ヒト末梢血リンパ球から調整したCD4^{+}及びCD8^{+}リンパ球をヒト臍帯静脈由来内皮細胞の単層培養系に添加し、位相差顕微鏡によりリンパ球の接着率（adhesion）を、また微分干渉顕微鏡によりリンパ球の透通率（penetration）を観察した。リンパ球と共培養した内皮細胞にγ INF及び

IL-1 を添加し刺激したところ、6 時間の培養でリンパ球の adhesion がプラトーに達した（接着率＝32.1±4.1%）。一方、penetrasion は大きな変化を示さなかった（図ホ-17 右上）。この試験系で、10^{-9}～10^{-4} M の MMF を添加培養すると、10^{-6} M の適用でリンパ球の adhesion 及び penetration は約 50%抑制された（図ホ-17）。



図ホ-17　CD4＋細胞の adhession 及び penetration に対する MMF の影響



図ホ-18　内皮細胞及びリンパ球に存在する接着因子レセプターに対する MMF（10 μM）投与の作用

数字は ID_{50} 値（50%抑制用量）、平均値±標準偏差

また、この培養系で内皮細胞に存在する接着因子レセプター（ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-selectin）及びリンパ球に存在する接着因子リガンド（LFA-1、VLA-4、sLeX、PSGL－1）に対するMMFの効果をそれぞれのモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色により定量化して検討した。図ホ-18に示す通り、E-selectinのID_{50}値は0.008 μM、P-selectinのID_{50}値は0.197 μM、VLA-4は0.308 μM、PSGL－1は0.92 μMであった。その他のレセプター、リガンドについてはほとんど効果を示さなかった。しかしリンパ球のVLA-4及びPSGL－1は接着因子レセプターのVCAM-1及びP-selectinの特異的なリガンドである事から、MMFはリンパ球の細胞表面タンパクの発現を抑制することで活性化したリンパ球の情報伝達を阻害する事が示唆された。すなわち、リンパ球は血管内皮細胞に接着する際に、偽足を伸ばして細胞間情報伝達を行う。この偽足の先端にVLA－4あるいはPSGL-1が発現しており、内皮細胞の細胞膜上に存在するレセプターに結合することでシグナルが伝達される。MMF存在下で共焦点顕微鏡下に形態学的観察をすると、この偽足にVLA-4及びPSGL－1の反応が観察されなくなる事が確認された[1]。

以上のことから、MMFは移植臓器及び血管に発生する炎症反応を調節する可能性が示された。一般に、血管の炎症はリンパ球が血管内をローリングし、内皮細胞と接触することがトリガーとなることが知られているが、ここではICAM-1/VCAM-1といった接着因子が重要な役割を演じている。従って、MMFあるいはMPAがIMP産生の特異的に抑制されて、リンパ球等プリン生合成が抑えられ、それにより細胞表面タンパクの産生が低下するため、炎症の情報伝達が抑制され生体の反応を調節することが考えられる。これにより、MMFの拒絶反応抑制の作用機序の一つとして移植臓器の血管炎抑制作用が示唆された。

2-3. MMFの単独及び併用投与によるトレランスの誘導

2-3-1. イヌ骨髄移植モデルに対するMMF＋CsA投与による免疫寛容誘導

実験的に作成したGVHDモデルに対し、MMFあるいはCsAの投与による免疫寛容の誘導の可能性について検討した。成犬から採取・調整した骨髄細胞及び末梢血白血球（Buffy Coat細胞）を、全身を放射線照射したDLA（Dog Leukocyte Antigen)の異なる別のイヌに移植した骨髄移植モデルを作成した。薬剤の投与方法は表ホ-28に示した。なお、この論文では著者らが以前に実施したCsA単独投与、及びmethotrexate（MTX）＋CsA併用投与例も参考データとして提示している。

---

[1] Dustin ML. Et al. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness throug LFA-1 Nature、 341:619-624、 1989

表ホ-28　実験的 GVHD モデル・イヌにおける MMF 及び CsA の投与方法

投与群	例数	投与日数	MMF 投与期間（用量）		CsA 投与期間（用量）
第 1 群**	72	—	—		—
第 2 群***	19	26～28	—	n =13	0～7 日（10～12.5 mg/kg、 bid* i.m.） →8～25 日（10～12.5 mg/kg、 bid p.o.）
				n =6	0～9 日（10 mg/kg、 bid i.v.） →10～27 日（15 mg/kg、 bid p.o.）
第 3 群***	16	100	MTX $	n=10	0～7 日（7.5 mg/kg、 bid i.m.） →8～26 日（7.5 mg/kg、 bid p.o.） →27～50 日（5 mg/kg、 bid p.o.） →51～75 日（2.5 mg/kg、 bid p.o.） →76～100 日（2.5 mg/kg、 bid p.o.）
				n=6	0～6 日（10 mg/kg、 bid p.o.） →7～45 日（15 mg/kg、 bid p.o.）
第 4 群	6	28	0～27 日（10 mg/kg、 bid s.c.）		—
第 5 群	4	28	0～27 日（10 mg/kg、 bid s.c.）		0～9 日（10 mg/kg、 bid i.v.） →10～27 日（15 mg/kg、 bid p.o.）
第 6 群	9	28	0～2 日（6 mg/kg、 bid s.c.） →3～27 日（10 mg/kg、 bid s.c.）		0～9 日（10 mg/kg、 bid i.v.） →10～27 日（15 mg/kg、 bid p.o.）
第 7 群	6	100	0～2 日（6 mg/kg、 bid s.c.） →3～20 日（10 mg/kg、 bid s.c.）		0～5 日（5 mg/kg、 bid i.v.） →6～20 日（15 mg/kg、 bid p.o.） →21～45 日（7.5 mg/kg、 bid p.o.） →46～75 日（5 mg/kg、 bid p.o.） →76～100 日（3 mg/kg、 bid p.o.）

*：bid、1 日 2 回投与（1 日投与量はそれぞれの値を 2 倍した用量）
**： データの出典は Annals of the New York Academy of Science 1995、 p.145.、Transplantation 60:384、1995.
***：データの出典は Transplantation 34:30、1982.
$：methotrexate 0.4 mg/kg/日を 1、 3、 6、 11 日に静脈内投与

試験の結果を表ホ-29 に、移植後の生存曲線を図ホ-19 に示す。

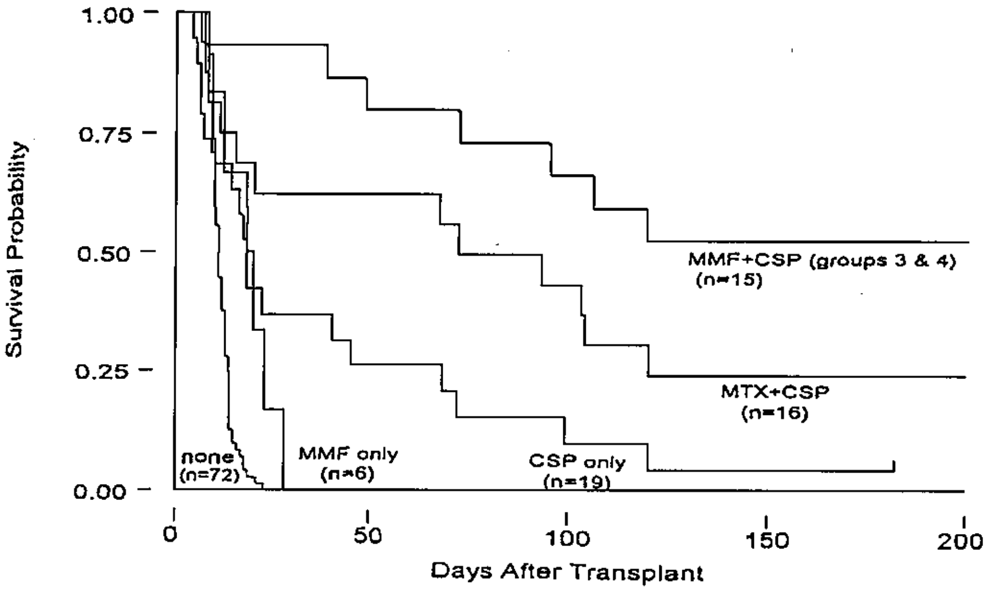
造血細胞の移植を行い治療を行わなかった第 1 群では、200 日以上生存した例はなく、術後 7～23 日（中央値＝11 日）で 72 例全例が死亡した。第 2 群（CsA 投与）では、術後 28 日間の投与で 19 例中 1 例が 182 日で以上生存した（著者らは、182 日目に安楽死させたが 200 日以上生存したと認定している）。一方、第 4 群（MMF 単独投与群）では、術後 8～28 日（中央値＝18 日）及びで 6 例全例が死亡した。また、第 5 群（MMF＋CsA）では MMF と CsA の導入時の用量（MMF：10 mg/kg s.c. bid、CsA：10 mg/kg i.v. bid）が原因と考えられる毒性の発現により 4 例中 3 例を安楽死させたが 1 例は 98 日まで生存した。第 6 群（MMF＋CsA、28 日間投与）では MMF 導入用量を 6 mg/kg bid にした事から毒性発現は抑制された。この投与レジメでは 9 例中 5 例に 420 日以上の生存が確認された。第 7 群（MMF＋CsA、長期投与）でも、6 例中 3 例に 200 日以上の長期生存例が確認された。

以上のことから、大動物を用いた GVHD モデルで、MMF あるいは CsA は単独投与では拒絶反応発現を抑制する事は困難ではあったものの、両者を併用して一定期間投与すると、投与中止後も長期にわたり約半数の動物が生存した。両薬物の併用により GVHD 発現抑制及びトレランス導入の可能性が示唆された。

表ホ-29　実験的 GVHD モデル・イヌに対する MMF 及び CsA の効果

投与群	例数	移植失敗例	生存日数		200 日以上
			中央値	Range	生存例
第 1 群	72	6	11	7～23	0
第 2 群	19	8	18	4～ >182	1/19*
第 3 群	16	1	88	5～ >372	4/16
第 4 群	6	2	18	8～28	0
第 5 群	4	0	8	6～98	0
第 6 群	9	0	>420	7～ >540	5/9
第 7 群	6	0	>119	38～ >316	3/6

*:投与後 182 日で安楽死させたが、200 日以上は生存したと考えられる。

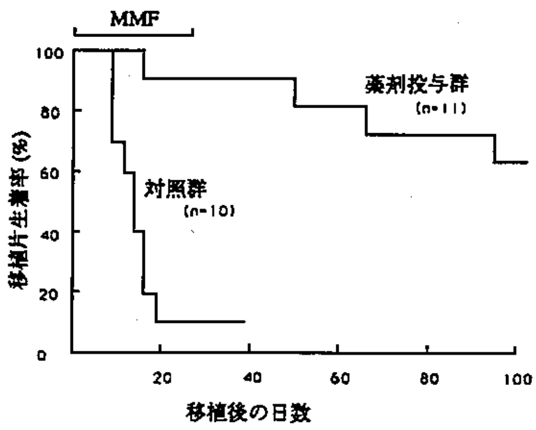


図ホ-19　骨髄移植モデルイヌに対する MMF、CsA 及び MTX の治療効果

2-3-2. マウス移植膵島生着期間延長とトレランスの誘導

BALB/c マウス（ドナー）の膵島（400 個）を、streptozotocin で糖尿病を誘発した CBA マウス（レシピエント、10～11 例/群）の腎臓被膜内に移植した。レシピエントマウスへは、移植前日から MMF 80 mg/kg 又は溶媒を 1 日 1 回、30 日間連日経口投与した。

膵島移植の結果、溶媒投与群には 10 例中 9 例に移植後 14～20 日で拒絶反応が出現したが、MMF 投与群では 11 例中 7 例の移植膵島が 100 日間以上機能した（図ホ-20）。MMF 投与期間中、マウスの体重増加抑制あるいは毒性症状は観察されなかった。



図ホ-20　MMF の予防的投与がマウス移植膵島の生着期間延長に及ぼす影響

この 100 日以上膵島移植片が生着･機能している 7 例のレシピエントに、BALB/c マウス（ドナー）の脾臓細胞を腹腔内に接種し、膵島移植片の機能状態は血糖値を測定することにより確認した。

脾臓細胞接種後に 7 例中 1 例で明らかな移植膵島の拒絶反応がみられたが、残りの 6 例は移植片生着を維持した。その後の組織学的検査において、これら 6 例中 1 例に拒絶反応の徴候が観察されたが、残りの 5 例では MMF 投与がトレランスを誘導し、長期に亘って生理機能を保持しているものと考えられた。

また、この 5 例のレシピエントマウスに BALB/c マウス及び B6 マウス（第 3 の系統）の新鮮甲状腺組織を膵島移植側の対側腎皮膜下に移植した。各動物の血糖値を引き続きモニターし、移植甲状腺の機能は移植術 30 日後に ^{125}I 取込みを指標として評価した。その結果、BALB/c 膵島組織に対し寛容が成立した動物では BALB/c 甲状腺移植片にも寛容であるが、B6 甲状腺は完全に拒絶した（表ホ-30）。

表ホ-30　MMF 投与マウスの免疫寛容誘導の特異性

Group	甲状腺移植術		例数	移植甲状腺機能（^{125}I 取込、cpm）**	
	ドナー	レシピエント		移植側腎	対側腎
同系移植対照群	BALB/c	BALB/c	2	2358	84
同系移植対照群	B6	B6	2	5274	120
異系移植対照群	BALB/c	CBA	4	189	171
免疫寛容誘導群* (MMF 投与)	BALB/c +B6	CBA	5	2370 100	192

*:免疫寛容群（MMF 投与）は、BALB/c 脾臓細胞接種試験で寛容を示した 5 例のマウスに、BALB/c 及び B6 マウスの甲状腺組織を腎に移植した。

**:甲状腺移植術施行 30 日後に、0.25 μCi ^{125}I を投与し、その 24 時間後に移植側及び対側の腎を採取して ^{125}I の取込みを測定した。

一般に、免疫寛容の主なメカニズムは、以下の三点であると考えられている。

① クローンの消失、② クローンのアネルギー（不活性化）、③ 自己反応に対する抑制

この試験での、免疫寛容が誘導されたメカニズムをリンパ系細胞培養系を用いて検討した。

寛容が成立した 5 例の CBA マウス（レシピエント）から、リンパ節細胞を採取し培養した。対照群として、同週齢の CBA マウス由来リンパ節細胞を同一条件で培養した。これら培養系にガンマ線照射した BALB/c マウス胸腺細胞を混合培養し、細胞障害性細胞の産生を検討したところ、寛容が成立した CBA マウスと対照動物の間で細胞産生活性は何ら変化が無かった（表ホ-31）。すなわち、寛容が成立した組織の MHC 抗原（主要組織適合遺伝子複合体、H-2^{d}）に対する細胞障害性細胞の産生は抑制されていないことを意味している。

このことから、本試験で誘導されたマウスの免疫寛容は、クローンの除去あるいは不活性化ではなく、自己反応に対する抑制であることが示唆された。

表ホ-31　免疫寛容誘導マウスのドナー特異的細胞障害性細胞産生活性

実験	細胞傷害活性（Log CU/培養）*	
	対照群	免疫寛容群
1	6.2	6.8
2	6.2	6.0
3	6.2	6.3
4	6.2	6.3
5	6.2	6.4
平均±SE	6.2±0.08	6.2±0.25

*:細胞は寛容誘導した CBA マウスと、同週齢の CBA マウスより採取し、ガンマ線(2000 rad）照射した BALB/c マウスの胸腺細胞と 5 日間混合培養した。このリンパ球を回収して、^{51}Cr でラベルした p 815 細胞（H-2^{d}）と共存培養し、培養上清中に放出される ^{51}Cr の放射活性を測定し細胞障害性を求めた。

ホ-2. 一般薬理

《要 約》

ミコフェノール酸モフェチル（MMF）の一般薬理作用を，マウス，ラット，モルモット，ウサギならびにイヌを使用し，経口もしくは胃内投与による中枢神経系，体性神経系，自律神経系，呼吸・循環器系（一部，静脈内投与），消化器系，腎機能におよぼす影響について検討した。また，ラット，モルモット，ウサギ，ヒトより摘出／採取した組織，細胞，血液を用いた試験系でも，自律神経系・平滑筋，血液系ならびに造血系に及ぼす影響を検討した。

一般行動・症状の観察において，MMF は 11 mg/kg 経口投与以上でマウスに活動性の低下と姿勢・歩行異常を認めたが，用量依存性は無かった。また，33 mg/kg 経口投与でのみ，観察期間の後期に 1 例の死亡を認めたが，他の異常症状は何ら観察されなかった。中枢神経系への作用は，本薬剤の高用量 109 mg/kg をマウスに経口投与後，自発運動量の低下を認めたのみであり，他の試験項目（麻酔作用，抗痙攣作用，鎮痛作用，体温）には何の影響も観察されなかった。体性神経系，自律神経系，摘出平滑筋標本に対する作用は，高濃度のミコフェノール酸（MPA）適用で一部平滑筋の収縮能に影響が認められた。麻酔イヌの呼吸器・循環器系に対しては，MMF の胃内投与で何ら作用はみられなかったが，高用量の MPA 62.5 mg/kg の静脈内投与は大腿動脈血流量を減少させた。消化器系に対しては，MMF の 100 mg/kg 経口投与でラットの胃腸管内輸送が軽度抑制された他は，ウサギの生体位胃運動，ラットの胃酸分泌に影響を与えなかった。ラット腎機能の有意な変化はなく，ヒト血液系での凝固作用や溶血作用も観察されなかった。ヒト造血系に対しては，MMF 並びに MPA 10^{-9}～10^{-4} M は単核性前駆細胞のコロニーへの分化・増殖を用量依存的に抑制した。

以上，本剤の安全性を一般薬理学的観点から検討した結果，予想臨床用量の約 2 倍量の MMF あるいは MPA 投与は，マウスの活動性やラットの胃腸管内輸送を抑制し，イヌの血流量を減少させることが判明した。また *in vitro* において，MPA は到達可能な血中濃度範囲でヒト骨髄機能に影響を与えた。これらの作用の一部は，臨床副作用（消化器系症状，骨髄抑制）と類似していた。

1. 中枢神経系に及ぼす影響

1-1. 一般行動・症状

マウスに MMF 1.1，3.3，11，33，109，327，1090 mg/kg を経口投与し，一般行動・症状観察を行なった。11 mg/kg 以上で活動性の低下と姿勢・歩行異常を認めたが，用量依存性はなかった。なお，33 mg/kg でのみ，6 例中 1 例の死亡が観察期間の後期に認められた。

1-2. 自発運動量

マウスに MMF 1.1，11，109 mg/kg を経口投与し自発運動量を調べたところ，高用量の 109 mg/kg においてのみ自発運動量の低下が認められた（Mann-Whitney U-検定）。

1-3. 麻酔作用

マウスに MMF 3.3，11，33，109 mg/kg を経口投与し，麻酔作用を試験した。Hexobarbital（80 mg/kg 腹腔内）投与後にみられる正向反射消失の発現ならびに持続時間に影響を及ぼさなかった。

1-4. 抗痙攣作用

マウスにおける pentylenetetrazol 痙攣 （80 mg/kg 皮内投与）と電撃痙攣 （50 mA，0.2 sec）に対する MMF の影響を，各々 3.3，33，109 mg/kg あるいは 3.3，11，33，109 mg/kg の経口投与用量で検討したが，何ら作用は認められなかった。

1-5. 鎮痛作用

マウスに MPA 100，400 mg/kg を経口投与し，酢酸 writhing（0.6%，0.1 ml/10 g 腹腔内投与）に及ぼす影響を検討したが，痛覚レベルに変化は認められなかった。

1-6. 体温

マウスの正常体温（直腸温）に対して，MMF 1.1，3.3，11，33，109，327，1090 mg/kg の経口投与は何ら影響しなかった。

2. 体性神経系に及ぼす影響

2-1. 協調運動

銅線（16 ゲージ）上でのマウスの滞留時間に対する MMF 3.3，11，33，109 mg/kg 経口投与後の影響を観察した。溶媒処置群は水処置群の滞留時間を 40 % 短縮したが，本剤によるそれ以上の悪化はなく，11 mg/kg を除く 3 用量で用量非依存的に持続時間を正常化した。

2-2. 局所麻酔作用

モルモットの角膜に MPA の 1 % 溶液を滴下し，角膜反射試験を行なったが，反射回数に変化は認められなかった。

3. 自律神経系並びに平滑筋に及ぼす影響

3-1. 腸管収縮能

モルモットより摘出した回腸標本の acetylcholine，histamine，barium の累積適用による収縮反応に対して，MPA 10^{-4}～10^{-3} M の影響を検討した。MPA 10^{-4} M は何ら作用を示さなかったが，
10^{-3} M は各アゴニストに対する反応性に軽度影響した。

3-2. 気管筋拡張能

モルモットより摘出した気管平滑筋標本を histamine 3×10^{-5} M で収縮後，累積適用した isoproterenol の弛緩反応に対して，MPA 10^{-4} M は影響を及ぼさなかった。

3-3. 輸精管収縮能

ラットの摘出輸精管を noradrenaline で累積的に収縮させ，MPA 10^{-4}，3×10^{-4} M の影響を検討した。試験した両用量は，軽度ではあるが用量に依存した非競合的抑制を示した。

3-4. 瞳孔径

マウスに MPA 340 mg/kg を経口投与し，瞳孔径に及ぼす作用を検討したが，何ら影響は認められなかった。

3-5. 受容体親和性

凍結組織から調製したホモジネートを用いて，MMF 並びに MPA の各種受容体への影響を受容体結合実験より検討した。試験された受容体は，アドレナリン性の α_{1A}（ラット下顎腺），α_{1B}（ラット肝臓），α_{2A}（ウサギ脾臓），α_{2B}（ラット腎臓），β_1（ウサギ肺），β_2（ラット肺），ムスカリン性の M_1（ラット大脳皮質），M_2（ラット心臓），M_3（ラット下顎腺）であった。これら受容体に対して，両薬剤は低親和性を示したのみであった。

4. 呼吸・循環器系に及ぼす影響

4-1. 呼吸動態

Pentobarbital 麻酔したイヌに MMF 0.3，1，3，10，30 mg/kg を胃内投与し，呼吸器系に及ぼす影響を検討したが，呼吸数，呼吸流速，呼吸流量ならびに血中 pO_2，pCO_2，pH の変化は何ら認められなかった。

4-2. 循環動態

Pentobarbital 麻酔し，開胸したイヌに MMF 0.32，1，3.2，10，32 mg/kg を胃内投与，もしくは麻酔のみ施したイヌに MPA 2.5，12.5，62.5 mg/kg を静脈内投与し，循環器系に及ぼす影響を検討した。MMF は血圧，心拍数，心収縮力並びに心電図に影響しなかったが，MPA 12.5 mg/kg は大腿動脈血流量を一過性に上昇させ，高用量の 62.5 mg/kg は逆にこれを減少させた。

5. 消化器系に及ぼす影響

5-1. 胃腸管内輸送

ラットに MMF 30，100 mg/kg を経口投与し，非吸収性赤色色素の胃腸管内輸送に対する影響を検討した。高用量の 100 mg/kg は，色素の腸管内輸送を軽度に抑制した（t-検定による分散分析）。

5-2. 生体位胃運動

ウサギの幽門部括約筋内に植え込まれた微小 balloon を介して記録した胃運動に対して，MPA 500，1000 mg/kg 胃内投与は影響を与えなかった。

5-3. 胃酸分泌

幽門結紮（Shay）ラットに MMF 25，50，100 mg/kg を経口投与し，histamine（40 mg/kg 皮内投与）誘発性胃酸分泌反応を検討したが，胃酸分泌量，水素イオン濃度，pH への影響は何ら認められなかった。

6. 腎機能に及ぼす影響

ラットに MMF 25，250 mg/kg を経口投与し，0.9 % 生理食塩液（20 ml/kg 経口投与）負荷後の 0-5，5-24 時間の尿量，尿中電解質（Na^+，K^+，Cl^-）排泄への影響を検討した。K^+ 排泄量が 0-5 時間尿で増加傾向を示したが（Jonckheere 検定および Mann-Whitney 検定），5-24 時間尿および 0-24 時間尿での変化は認められなかった。

7. 血液系に及ぼす影響

7-1. 溶血作用

ヒト全血における MMF 0.5，2，5，20 mg/ml の溶血作用を検討したが，何ら影響は認められなかった。

7-2. 血液凝固作用

ヒト血漿を用いて MMF 0.5，2，5，20 mg/ml の血液凝固作用を検討したが，沈殿物や凝塊の形成を何ら認めなかった。

8. 造血系に及ぼす影響

ヒトの末梢血と骨髄中に含有される，単核性前駆細胞（顆粒球-マクロファージ，赤血球，リンパ球）のコロニー形成に及ぼす MMF ならびに MPA 10^{-9}～10^{-4} M の影響を検討した。両薬剤は，マイトジェン刺激したこれら前駆細胞のコロニーへの分化・増殖をほぼ同等の効力で強力に抑制した（多重比較検定）。T-リンパ様細胞での抑制作用は比較的弱いものであった。

一般薬理試験一覧表

試験項目	実験方法	動物(例数)	投与量(mg/kg) 投与経路	成績
1．中枢神経系に及ぼす影響				
1)一般行動・症状	Irwin法	マウス(3-6)	1.1-1090 経口	11 mg/kg 以上で活動性低下と姿勢及び歩行の異常を認めたが用量依存的ではなく，33 mg/kg の1例に遅発性死亡がみられた
2)自発運動量	scoring法	マウス(9-10)	1.1-109 経口	109 mg/kg で自発運動量の低下が認められた
3)麻酔作用	hexobarbital 睡眠	マウス(9-10)	3.3-109 経口	影響なし
4)抗痙攣作用	pentylenetetrazol 痙攣 最大電撃痙攣	マウス(9-16) マウス(20)	3.3-109 経口 3.3-109 経口	影響なし 影響なし
5)鎮痛作用	酢酸 writhing法	マウス(25)	MPA 100，400 経口	影響なし
6)体温	直腸温の測定	マウス(6)	1.1-1090 経口	影響なし
2．体性神経系に及ぼす影響				
1)協調運動	水平棒法	マウス(20)	3.3-109 経口	溶媒の神経障害作用を改善
2)局所麻酔作用	浸潤麻酔法	モルモット	MPA 1 % 溶液	影響なし
3．自律神経系並びに平滑筋に及ぼす影響				
1)腸管収縮能	acetylcholine，histamine 及び barium収縮	モルモット 回腸	MPA 10^{-4}-10^{-3} M	10^{-3} M でのみ ACh，His，Ba に対する反応性に影響を及ぼした
2)気管筋拡張能	isoproterenol 弛緩	モルモット 気管筋	MPA 10^{-4} M	影響なし
3)輸精管収縮能	noradrenaline 収縮	ラット 輸精管	MPA 10^{-4}，3×10^{-4} M	NA の用量作用曲線を軽度に抑制した
4)瞳孔径	瞳孔径の測定	マウス(10)	MPA 340 経口	影響なし
5)受容体親和性	*in vitro*	ウサギ ラット組織	MMF ならびに MPA	α-受容体(pKi=4.5-5) β-受容体(pKi<4) ムスカリン受容体(pKi<4)

試験項目	実験方法	動物(例数)	投与量(mg/kg) 投与経路	成績
4. 呼吸・循環器系に及ぼす影響				
1)呼吸動態	麻酔下の呼吸数,呼吸流速,呼吸流量を観察	イヌ(3)	0.3-30 胃内	影響なし
2)循環動態	麻酔下の血圧,心拍数,心収縮力並びに心電図を観察 麻酔下の血流量を観察	イヌ(3-6) イヌ	0.32-32 胃内 MPA 2.5,12.5,62.5 静脈内	影響なし 12.5 mg/ml で一過性の上昇, 62.5 mg/kg で減少
5. 消化器系に及ぼす影響				
1)胃腸管内輸送	色素移動法	ラット(5-10)	30,100 経口	100 mg/kg で軽度な抑制が認められた
2)生体位胃運動	無麻酔balloon法	ウサギ	MPA 500,1000 胃内	影響なし
3)胃酸分泌作用	幽門結紮(Shay) histamine刺激	ラット(5-7)	25-100 経口	影響なし
6. 腎機能に及ぼす影響				
尿量・尿中電解質	生理食塩液負荷	ラット(10)	25,250 経口	0-5 時間で K^+ 排泄量の増加傾向が認められた
7. 血液系に及ぼす影響				
1)溶血作用	ヘモグロビンの測定	ヒト全血	0.5-20 mg/ml	影響なし
2)血液凝固作用	顕微鏡観察	ヒト血漿	0.5-20 mg/ml	影響なし
8. 造血系に及ぼす影響				
分化・増殖	*in vitro*	ヒト末梢血・骨髄単核細胞	MMF ならびに MPA 10^{-9}-10^{-4} M	前駆細胞(顆粒球-マクロファージ,赤血球,リンパ球)のコロニーへの分化・増殖を用量依存的に抑制した