

及び用法・用量に関連する使用上の注意欄に注意して注意を喚起している。これらの点を考慮したとき、タクロリムス軟膏を使用する患者においてリンパ腫が発現する可能性はほとんどないものと推察する。

表ニ-34 アトピー性皮膚炎患者での血中濃度

領 域	剤 型	用法・用量	血中濃度 (ng/ml)	AUC (ng・h/ml)	備 考
アトピー性 皮膚炎	軟膏剤	最大1回10g 1日2回	3日後 $1.9 \pm 2.6^{1)}$ (n=131) 1週間後 $0.7 \pm 1.1^{1)}$ (n=501)	5g 単回塗布時* 27.4 ± 26.6 (n=3)	第Ⅲ相長期観察試験 *AUCは第2相広範囲 塗布安全性確認試 験の成績

1): アトピー性皮膚炎では外用後の採血時間は不定
(塗布後3～6時間後の最も高くなる時点で測定されている症例も含む)

7) 光 毒 性 試 験 追加資料10

タクロリムス軟膏の光関連毒性試験としてモルモット皮膚光感作性試験は実施しているがモルモット光毒性試験は実施していない。その理由は、本剤の光毒性についてはモルモット皮膚光感作性試験成績から類推できると判断したためである。すなわち、モルモット皮膚光感作性試験における誘発条件は光毒性試験と同じであり、もし陽性結果が得られれば光毒性を含む反応として評価可能と判断した。皮膚光感作性試験では軟膏基剤、0.1及び0.3%タクロリムス軟膏を塗布した紫外線照射誘発部に紅斑はみられず(評点:0)、このことから、タクロリムス軟膏には光感作性だけでなく光毒性を誘発する作用もないと判断した。モルモットとは別に、マウスでタクロリムス軟膏の光毒性の有無が調べられた。これは次頁に示すヘアレスマウスでの12か月塗布がん原性試験の用量設定の目的で行った(13週間光照射毒性試験)ものであるが、この試験でもタクロリムス軟膏には光毒性あるいは光防御作用のないことが確認された。すなわち、1群5匹の雄性ヘアレスマウスに軟膏基剤、0.03%、0.1%、0.3%、1%及び3%タクロリムス軟膏の100µl/mouseを体表の40%に塗布し、直径4mm穴のアルミホイルで覆い15分後に紫外線を照射した。紫外線は1.0MEDD(かろうじて識別できる皮膚反応を誘発する紫外線量)の0、0.5、1、1.4、2.0あるいは2.7倍量とした。対照群は2群設け、光毒性陽性物質として8-methoxy psoralen(8-MOP)を、光防御陽性対照物質としてSun Protection Factor 4の市販のサンクリーンを同様に塗布し紫外線照射した。その結果、軟膏基剤を含むいずれのタクロリムス軟膏塗布はMEDDに影響を与えなかった。したがって、タクロリムス軟膏は光毒性及び光防御作用を有さないと考えられた。これに対し、光毒性作用を有する8-MOPはMEDD値を減少(0.5MEDD)、光防御作用を有するサンスクリーンはMEDD値を増加(>2.7MEDD)させた(表ニ-35)。

表ニ-35. マウス光毒性試験成績

塗布物質	平均 MED		
	24時間 ¹⁾	48時間	72時間
軟膏基剤	1.6	1.0	1.0
0.03%タクロリムス軟膏	1.4	1.0	1.0
0.1%タクロリムス軟膏	1.2	1.0	0.9
0.3%タクロリムス軟膏	1.6	1.1	1.1
1%タクロリムス軟膏	1.6	1.2	1.0
3%タクロリムス軟膏	1.6	1.2	1.2
8-Mop ²⁾	0.5	0.5	0.5
SPF4 SS ³⁾	≥2.7	≥2.7	≥2.7

1)紫外線照射終了後の観察時間

2)8-methoxy psoralen

3)Sun protection factor 4のサンスクリーン

8) マウスでの12か月塗布光がん原性試験（紫外線によるアルビノ無毛マウスの皮膚腫瘍発生時期に対するタクロリムス軟膏の影響）^(注26) 添付資料ニ-16

本試験は、紫外線の長期曝露によりほぼすべての被験動物（アルビノ無毛マウス）に皮膚腫瘍を生じさせ、被験薬剤によりその発生時期が影響されるか否かを評価するものである。したがって、本試験は被験薬剤のがん原性の有無を調べるものではないとされている。

1 群雌雄各36匹のアルビノ無毛マウスの体表20%に1日1回40週間（週5日）にわたって50μl/マウス/日（2μl/cm²）の軟膏基剤、0.03、0.1、0.3あるいは1%タクロリムス軟膏の塗布と、ヒトに紅斑を生じせしめる最小紫外線量（MED）の0.27倍（UVL：0.27MED）に相当する紫外線（波長290～400nm）を照射し、その間肉眼的に皮膚を観察した。さらにその後12週間は前述の処理をすることなく観察を続けた。また、これらとは別に0.27MEDの紫外線照射のみのUVL対照群と0.46MED紫外線照射のみのUVB対照群を設けた（表ニ-36）。なお、隔週ごとの直径測定で認められた1mm以上の皮膚腫瘍からPrevalence値（腫瘍をもつ動物数の割合を期間毎に示したもの）を求め、そのカーブからMT0値（Median Tumor Onset：50%のマウスに皮膚腫瘍が発生する時期）を算出し、これを評価の指標とした。

注26) この試験系は紫外線照射だけではほぼ100%のマウスに皮膚腫瘍を発生させる極めて高度なモデルであり、臨床での副作用との関係は明らかでないとの報告がある。さらに試験の実施を要求した米国においても試験法ガイドラインは制定されておらず、これまで医薬品の承認申請のために実施された前例もない。このモデルについての評価は今後提出されるデータの蓄積を待ってなされるものと思われたことから、本申請に必須とは考えず申請時の資料としなかった。ただし、本剤申請後に公表されたFDAの見解(Concept Paper on Photobiological Testing DRAFT 11/20/97)では「光がん原性試験成績は医薬品の許認可にかかわるものではなく、添付文書への記載の有無に関することである」と明記されていたことから、当該試験の成績次第では長時間の紫外線曝露を避けることとの注意喚起も必要になると考えた。

本試験の最終報告書が1998年4月に終了したので追加資料として記載した。

表二-36 マウスでの12か月塗布光がん原性試験条件

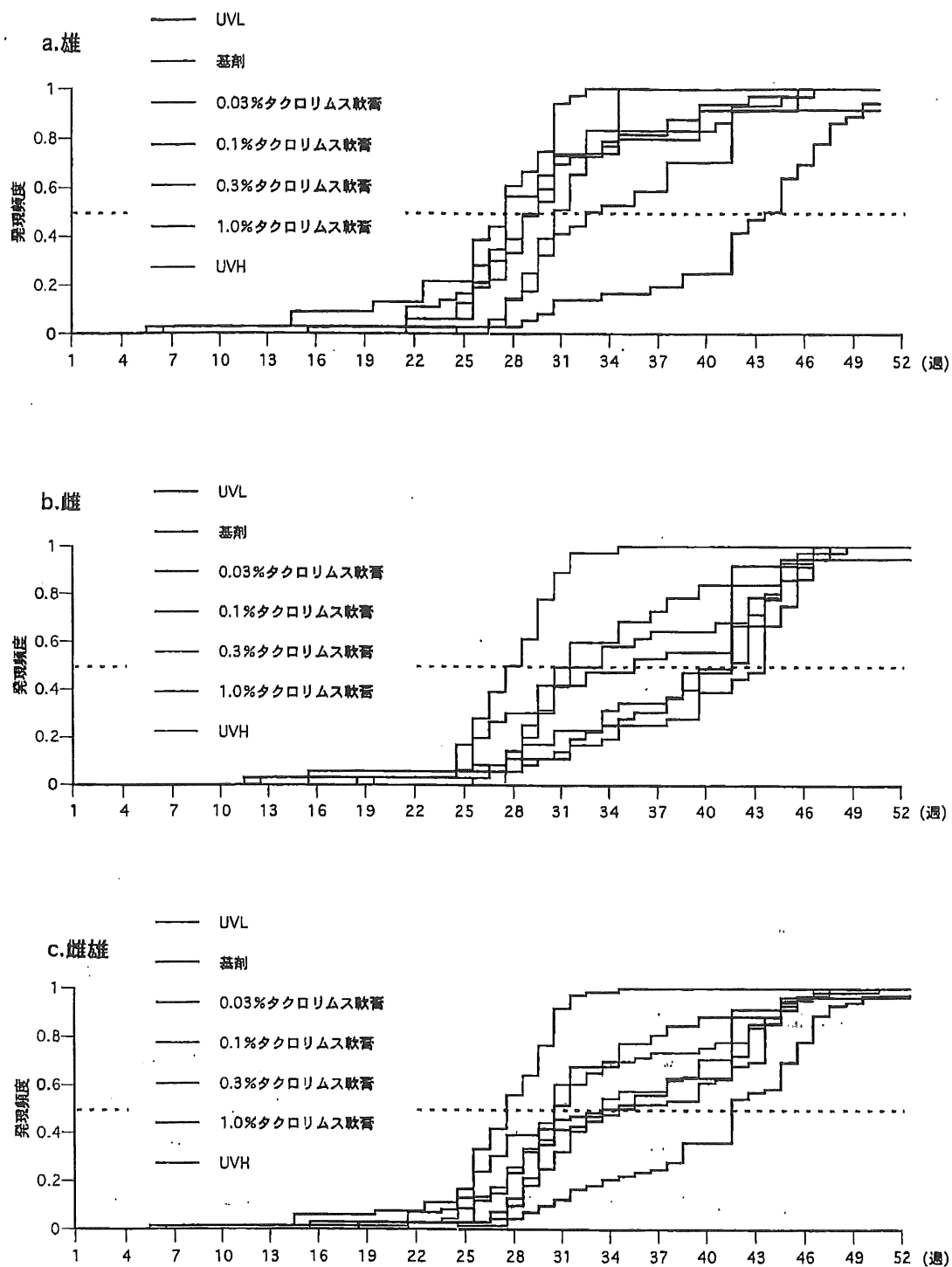
動物: Albino hairless mouse (Cr1:SKH1-hrBR) 1群♂36+♀36
紫外線: 290~400nm (UVA+UVB)
光源: 6.5KW xenon long arc water cooled burner (Atlas Model RM-65)
処置群: ① UVL (対照群) ② UVL+基剤
③ UVL+0.03%軟膏 ④ UVL+0.1%軟膏
⑤ UVL+0.3%軟膏 ⑥ UVL+1%軟膏
⑦ UVH (対照: 0.46MED)
軟膏塗布量: 50 μ l/マウス/日 (総体表面積の約20%, 厚さ約2 μ l/cm²)

MED : Human Minimum Erythema Dose ($1\text{ MED} \approx 20\text{ mJ/cm}^2$)

図二-5に示すように、紫外線(UV)照射だけではほぼ100%の動物に皮膚腫瘍がみられ、その期間はUVLの単独照射では45~50週、またUVB単独照射ではほぼ30週とその発生時期は紫外線照射量に依存して早まった。

紫外線による皮膚腫瘍発生モデルにおける指標には MTO 値が用いられるが、雌雄合わせて計算した場合、軟膏基剤群の皮膚腫瘍発生時期は単独照射群 (MTO: 42 週) に比べて短かった (表二-37)。タクロリムス軟膏塗布群の MTO についてみると 0.03% 群は 35 週, 0.1% 群は 34 週, 0.3% は 30.75 週, そして 1% 群では 30.5 週であった。これら MTO について UVL 単独照射群を対照に群間比較をしたところ、軟膏基剤群を含むすべての塗布群に皮膚腫瘍発生時期の有意な短縮が認められた (表二-37)。一方、軟膏基剤群を対照にすると 1% 群のみ有意な短縮を示した。

雌雄別にみると、雄では UVL 単独照射群を対照にすると軟膏基剤を含むすべての塗布群において皮膚腫瘍発生時期の有意な短縮がみられた。一方、基剤群を対照にすると 0.03% 軟膏群では有意差を示さず、0.1、0.3 及び 1% 群で有意な短縮が認められた。これに対し、雌では軟膏基剤群と比べたとき、最高濃度の 1% でも有意な短縮はなく、0.03 及び 0.1% 軟膏は軟膏基剤群のそれよりむしろ遅延した。このように雌雄における皮膚腫瘍発生時期の成績は基剤を含む本剤の作用に性差のあることを窺わせたが、この件に関しては機序を含め明らかではない。ただ、UVL 単独照射群の皮膚腫瘍時期が 44.5 週であったのに対し、雄の場合でも軟膏基剤群及び 0.1% 群の MT0 がそれぞれ 33.5 週及び 30 週と両者に大きな差はなかったことから、タクロリムス軟膏による短縮の大部分は軟膏基剤によるものと考えられた。皮膚腫瘍を発生した動物の一部について、皮膚の病理検査を実施したところ、腫瘍タイプは扁平上皮癌、乳頭腫及び角化棘細胞腫であり、群間に腫瘍タイプの偏りはみられなかった。



図二-5 紫外線による無毛マウスの皮膚腫瘍発生時期に対するタクロリムス軟膏の影響試験

表ニ一37 紫外線による無毛マウスの皮膚腫瘍発生時期に対するタクロリムス軟膏の影響試験成績

被験物質	対照 I	軟膏基剤	0.03%軟膏	0.1%軟膏	0.3%軟膏	1%軟膏	対照 II
紫外線量 (MED) ¹⁾	UVL (0.27)	UVL (0.27)	UVL (0.27)	UVL (0.27)	UVL (0.27)	UVL (0.27)	UVH (0.46)
動物数 (匹/性/群)	36	36	36	36	36	36	36
MTO (週) (50%のマウスに腫瘍がみられる時期)							
雌雄合体	42	33.75	35	34	30.75	30.5	28
雄	44.5	33.5	31.5	30	30	30.5	28
雌	42	36	44	42	34	32	28.5
統計計算 ²⁾	雌雄合体	C	≡	≡	≡	≡	≡
		/	C	N.S.	N.S.	N.S.	≡
	雄	C	≡	≡	≡	≡	≡
		/	C	N.S.	+	++	≡
	雌	C	+	N.S.	N.S.	(+)	≡
		/	C	--	-	N.S.	≡

MTO: Median Tumor Onset UVL: 低紫外線量 UVH: 高紫外線量

1) Minimum Erythema Dose (ヒト1日当たりの最小紅斑誘発量)

2) C: 統計学的検定の対照 N.S.: 有意差なし

+ ~ ≡: 短縮

-- ~ -: 遅延

≡: p<0.001 ++ or --: p<0.01 + or -: p<0.05 (+): p<0.1 (Peto analysis)

〔光がん原性試験の考察〕

光がん原性試験成績は紫外線誘発皮膚腫瘍の発生時期短縮が主としてタクロリムス軟膏の基剤に起因していることを示唆している。タクロリムス軟膏の基剤は白色ワセリン、流動パラフィン、炭酸プロピレン、サラシミツロウ及びパラフィンから成るが、このうち流動パラフィンには光がん原性試験において皮膚腫瘍の発生時期を短縮する作用のあることが Kligmanらにより既に報告されており^{注27)}、その作用機序は皮膚の光学的性質を変化させ、紫外線の皮膚透過性を亢進するためと推定されている。この実験事実を勘案すると、タクロリムス軟膏による紫外線皮膚腫瘍の発生時期短縮作用には流動パラフィンが深く関与している可能性が高い。しかしながら、流動パラフィンをはじめとする本剤の基剤成分はいずれも長い使用実績があり、安全性面で問題とされているものはない。

注27) L.H. Kligman et al., J. Dermatological Treatment 3, 3 (1992)

本試験では、発生した腫瘍の種類を調べるために各群3例ずつ病理検査（皮膚）を実施しているが、診断された腫瘍タイプは悪性腫瘍（癌）に分類される扁平上皮癌、良性腫瘍に分類される乳頭腫及び角化棘細胞腫であり、これらは各群に混在してみられタクロリムス軟膏群にのみ発生する腫瘍はなかった。このことは基剤を含むタクロリムス軟膏群の腫瘍の原因が紫外線であることをうかがわせた。また、本ヘアレスマウスの光がん原性モデルは紫外線照射だけで100%の動物に皮膚腫瘍を発生せしめることから、極めて感度の高いモデルといえる。この点も考慮すると、臨床の場において本剤の使用により皮膚腫瘍発生リスクが高まることはないものと推察される。

このように、安全性評価システムとして本試験は成熟したものではなく、その成績の臨床的意義は必ずしも明確ではないとされているが、本剤と同様の作用をもつことが知られている米国の既承認医薬品の添付文書を参考に、「長時間の紫外線照射及び日焼けランプや紫外線ランプの使用を避けること」を本剤の使用上の注意の一つに加え、さらに「PUVA療法等の紫外線治療を実施中の患者は禁忌」とした。

次に、タクロリムス軟膏の「紫外線誘発皮膚腫瘍発生の短縮」作用についての機序を以下に考察する。

既に述べたように、タクロリムス軟膏による紫外線皮膚腫瘍の発生時期短縮作用には流動パラフィンが深く関与している可能性が高いが、1%軟膏群のMTDは基剤群を対照としたとき有意な短縮を示しており、これについてはタクロリムス自身の関与も否定できない。ただ光がん原性試験が一般化されていないこともあって全体のデータ量が少ないことやそれらの試験法が定まったものではないことから、光がん時期の短縮作用を有する化学物質の作用機序については明確にされているとは言えない。このような状況下ではあるがFDAは最近その機序として次のような作用が考えられるとしている^{注28, 29)}。すなわち、①光感作性（光毒性）、②刺激性、③皮膚の菲薄化ないし皮膚の光学的特性を変える作用、④脱分化作用及び⑤免疫抑制作用である。

そこでこれら仮説を踏まえて、タクロリムスの毒性試験成績及び公表文献等からタクロリムスの紫外線誘発皮膚腫瘍の発生時期短縮作用の機序を以下のように考察する。

①光感作性（光毒性）

フルオロキノロン^{注30)}及び8-メトキシソラレン(8-MOP)^{注31)}はマウス光がんを亢進させることが知られている。これらの物質は光感作性及び光毒性物質でもある^{注32, 33)}が、光がん原性を含めた発症機序はUV活性化により生ずるフリーラジカルとする説が広く受け入れられている^{注34)}。

注28) R.E. Osterberg et al., Photochemistry and photobiology, 63, 362 (1996)

注29) Concept Paper on Photobiological Testing DRAFT-FDA-(11/20/97)

注30) G.Klecek et al., J.Photochemistry and Photobiology B: Biology, 37, 174 (1997)

注31) J.K.Dunnick et al., Fundamental and Applied Toxicology, 16, 92 (1991)

注32) T.Horio et al., Drugs, 49, (sup.2) 283 (1995)

注33) T.Ogawa et al., 香粧会誌, 16, 86 (1992)

注34) K.S.Loveday, Photochemistry and Photobiology, 63, 369 (1996)

一方、タクロリムス軟膏には光感作性及び光毒性のないことがモルモット皮膚光感作性試験において示されている（表ニ-27）。また、マウス光がん原性試験の予備として実施した試験においても本剤に光毒性のないことが確認されている（表ニ-35）。これらの試験成績はタクロリムスによる作用機序がフルオロキノロンや 8-MOP と異なること、すなわちラジカルを介した作用機序とは異なることを示唆する。

②刺激性

タクロリムス軟膏のウサギ累積刺激性試験（表ニ-16）では軟膏基剤を含むすべての塗布群で紅斑等の皮膚所見がみられている。しかしこれらの所見に濃度相関性はなく、むしろ高濃度群の方が軽度と言える刺激性所見が得られている。この理由は明らかではないが、本成績を考慮すると1%軟膏群でみられた有意な皮膚腫瘍発生時期の短縮にタクロリムス自身の刺激性が関与している可能性は乏しいと考えられる。

光がん原性試験陽性物質の中で、刺激性が主要因と考えられているものとして既承認医薬品であるレチノイド外用剤（商品名：RENOVA）がある^{注35)}。本剤（市販濃度 0.05%）を13週間ウサギ皮膚に塗布した試験では、浮腫から痂皮形成に至る強い刺激性がみられている^{注36)}が、仮にこの所見を Draize のスコアで表すと 5.0 を超える値になると推定される。ちなみに、タクロリムス軟膏の累積刺激性試験成績から同様にスコアを算出すると最高値でも 3.4 であり（表ニ-39）、刺激性に関してはタクロリムス軟膏は RENOVA に比べると弱いと考えられる。

③皮膚菲薄化作用ないし皮膚の光学的特性を変える作用

基剤成分に関する Kligman からの成績から導かれた考察がこの仮説を導いていると思われるが、タクロリムス軟膏の場合、21日間の反復塗布でもラットに対する皮膚萎縮作用はみられていない（表ホ-11）。この点を踏まえると、本剤による刺激性というよりむしろ前述した基剤中の流動パラフィンによる皮膚の光学的特性の変化が紫外線誘発皮膚の発生時期短縮に寄与しているものと考えられる。

④脱分化

混餌投与によるがん原性試験及び塗布によるがん原性試験のいずれにおいても脱分化作用を示唆する成績は得られていない。後者の試験ではリンパ腫をもつ動物数の増加がみられているが、これについては、マウスが潜在的に保有しているウイルスの発現を本剤が助長しリンパ腫への発現に至ったものと推察され（p. 128~129）、がん化への直接作用はウイルスにあると考えられる。

注35) Ortho社の RENOVA® の添付書

注36) M. S. Christian et al., J. Amer. Acad. Dermatology, 36, S87 (1997)

注37) G. E. Kelly et al., Transplantation, 44, 429 (1987)

注38) R. B. Nathanson et al., Cancer Letter, 1, 243 (1976)

⑤免疫抑制作用

アザチオプリン^(注27)、抗リンパ球抗体^(注28)、シクロスポリン^(注29)はマウス光発がんモデルで皮膚腫瘍の発生を早めることが報告されている。すなわち、これら免疫抑制剤による作用は腹腔内あるいは経口といった全身投与でなされているが、このうちアザチオプリン及びシクロスポリンの試験では免疫学的パラメーターも測定しており、その低下が確認されている。これらの結果は全身的免疫抑制状態も紫外線誘発皮膚腫瘍の発生時期短縮に関与していることをうかがわせる。タクロリムスの薬理作用がシクロスポリンと類似している点、また、一般的にマウスの経皮吸収性はヒトに比べはるかに高い点を考慮すると(表ニ-51)、1%タクロリムス軟膏群でみられた当該所見が血中に移行したタクロリムスの免疫抑制作用に起因した可能性は否定できない。ちなみに、経皮移行に関しては、光がん原性試験と同条件で4週間にわたりアルビノ無毛マウスに0.03、0.1及び0.3%軟膏を塗布及び紫外線照射した試験における0.3%軟膏の26日目血中濃度(C_{max}, ♂+♀)を例にとった場合89.57ng/mlであり(表ニ-48)、このことからマウスは高い経皮移行性を示していることが窺われる。

以上、マウス光発がん時期を短縮させるタクロリムス軟膏の作用機序の主たるところは、その基剤(流動パラフィン)により皮膚の光学的特性が変化することにより、高濃度のタクロリムス軟膏の場合には免疫抑制も関与していると考えられる。これに対し、フルオロキノロンや8-MOPの場合にはラジカル発生が主たる作用機序と考えられている。タクロリムス軟膏は光毒性及び光感作性をもたないことから、ラジカルが関与する可能性は低いと思われるが、この点についてはラジカル生成の関与を確認しているわけではなく、光変異原性試験がそれを補完するための手だてとなると思われるのでPhase IV試験の一つとして光変異原性試験を実施する計画である。

3. 旧製剤と新製剤の刺激性の比較

1) 皮膚刺激性物質の検索 添付資料ロー3

タクロリムス軟膏(旧)の前期第Ⅱ相試験において、灼熱感、熱感等の皮膚刺激感がタクロリムス軟膏(旧)群と軟膏基剤(旧)群で同程度みられた(表ト-14, p. 272)ことから基剤成分である[]に着目して刺激性を評価した。

50%ラウリル硫酸ナトリウムを24時間塗布することで炎症を惹起した1群3匹のNew Zealand White種雄性ウサギの耳介に、1%タクロリムス軟膏(旧)、[]あるいは[]を開放塗布し、塗布後30分間の一般状態を指標に疼痛を評価した。[]塗布動物はジャンプ、耳垂れなど比較的重篤な疼痛あるいは灼熱感を窺わせる激しい症状を起こした。これに対し、[]及び1%タクロリムス軟膏(旧)塗布動物には特記すべき症状はみられなかった(表ニ-38)。