

タリムス点眼液 0.1%

CTD 第2部 CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

千寿製薬株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価	1
2.4.1 非臨床試験計画概略	1
2.4.2 薬理試験	2
2.4.3 薬物動態試験	3
2.4.4 毒性試験	5
2.4.5 総括及び結論	8

2.4 非臨床試験の概括評価

本項で使用した用語及び略号を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1 用語及び略号一覧

用語及び略号	内容
BN	Brown Norway 系
^{14}C -	質量数 14 の炭素放射性同位元素標識体
Cmax	最高全血中濃度
AUC _{0-24h}	時間 0 から投与後 24 時間までの全血中濃度-時間曲線下面積
CHL/IU	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞株
IFN- γ	インターフェロン-ガンマ
IL-2	インターロイキン-2
IL-4	インターロイキン-4
IL-5	インターロイキン-5
M-I	タクロリムスの 13 位 O-脱メチル体代謝物
M-II	タクロリムスの 31 位 O-脱メチル体代謝物
M-III	タクロリムスの 15 位 O-脱メチル体代謝物
M-IV	タクロリムスの 12 位水酸化体代謝物
IgE	免疫グロブリン E
RBL 細胞	ラット好塩基球性白血病細胞
TNF- α	腫瘍壊死因子-アルファ

2.4.1 非臨床試験計画概略

効力を裏付ける試験： タクロリムス点眼剤の春季カタルにおける効果を予測する目的で、1) BN ラットの卵白アルブミン誘発遅発型 (I 型) アレルギー性結膜炎モデル、並びに 2) ウサギのツベルクリン誘発遅延型 (IV 型) アレルギー性結膜炎モデルを用いて、結膜炎の発症に対するタクロリムス点眼剤の作用をステロイド点眼剤のリン酸ベタメタゾンナトリウム液及びフルオロメトロン点眼液と比較検討した。また、その他として、3) モルモットの遅発型及び遅延型アレルギー性結膜炎モデル、並びにラットの遅延型アレルギー性結膜炎モデルでの有効性を検討した。

副次的薬理試験： 角膜の真菌感染症及び細菌感染症におよぼすタクロリムス点眼剤の影響をみる目的で、*C. albicans* 及び *S. epidermidis* によるウサギ角膜感染モデルにおける炎症反応を指標に検討した。

薬物動態試験： 薬理及び毒性試験で使用された動物種であるウサギを用いて、一連の *in vivo* 又は *in vitro* 試験によりその吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。すなわち、タクロリムスを点眼投与及び静脈内投与したときの全血中タクロリムス濃度を測定し、システミックアベイラビリ

ティ、薬物動態の投与量相関性及び反復投与による薬物動態への影響を検討した。また、¹⁴C-タクロリムスを静脈内投与したときの放射能の組織分布や尿及び糞中への排泄を調べることにより、薬物由来成分の体内動態、残留性あるいは蓄積性を検討した。更に、単回及び反復点眼投与したときの各眼組織内濃度を測定し、眼内におけるタクロリムスの移行性について検討した。ウサギの肝臓より調製したマイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝試験を実施して生成代謝物の検討を行い、既に同定されているラット及びヒトの代謝プロファイルと比較した。

毒性試験： タクロリムス点眼剤の非臨床における安全性に関しては、サルを用いた反復点眼投与毒性試験、ウサギを用いた局所刺激性試験、並びにその他の試験として白色ウサギ、有色ウサギ及びイヌを用いた反復点眼投与眼毒性試験、白色ウサギ、有色ウサギ、イヌ及びサルを用いた瞳孔への影響試験、ラットを用いた鼻腔への影響試験、ラットを用いた水晶体に与える影響試験、ウサギを用いた炎症結膜での疼痛性試験、並びにラット、細菌及び CHL/IU を用いた類縁物質の毒性試験を実施した。併せてウサギ及びラットを用いた幼若動物での毒性試験も実施した。

白色ウサギを用いた瞳孔への影響試験（網膜電位図）、タクロリムスのラット水晶体混濁の発症機序及び炎症結膜での疼痛性を検討した試験を除き、GLP に準拠して実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

1) BN ラットの卵白アルブミン誘発遅発型（I型）アレルギー性結膜炎モデルに対する作用

BN ラット遅発型アレルギー性結膜炎において、タクロリムス点眼剤は 1.0%の濃度でその発症を抑制した。また、ステロイド点眼剤（リン酸ベタメタゾンナトリウム液及びフルオロメトロン点眼液のいずれも 0.1%の濃度）と同様に、結膜炎発症に重要と考えられる好酸球及び T 細胞の結膜における増加をタクロリムス点眼剤は各々 0.3%以上及び 0.1%以上の濃度で抑制した(2.6.2.2.1)。

2) ウサギのツベルクリン誘発遅延型（IV型）アレルギー性結膜炎モデルに対する作用

ウサギ遅延型アレルギー性結膜炎において、タクロリムス点眼剤は 0.01%以上の濃度で結膜の充血及び浮腫の発症を抑制した。0.01%以上の濃度での抑制作用の強さは、リン酸ベタメタゾンナトリウム液及びフルオロメトロン点眼液の 0.1%濃度と同程度であった（2.6.2.2.2）。

3) その他のアレルギー性結膜炎モデルでの検討

モルモットの遅発型及び遅延型アレルギー性結膜炎モデル、並びにラットの遅延型アレルギー性結膜炎モデルでの検討では、0.03%以上あるいは 0.1%以上の濃度にて有効性が得られた（2.6.2.2.3）。

2.4.2.2 副次的薬理試験

C. albicans, *S. epidermidis* によるウサギ角膜感染に対する影響

タクロリムス点眼剤の 0.1%及び 1.0%では、*C.albicans* 及び *S.epidermidis* によるウサギ角膜感染症を悪化させなかった（2.6.2.3.1）。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

全血中タクロリムスの定量は、ジクロロメタンあるいは酢酸エチル／ヘキサンで抽出した後、また眼組織内タクロリムスの定量は酢酸エチル／ヘキサンで抽出した後、いずれも抗タクロリムスマウスモノクローナル抗体及びタクロリムス標識パーオキシダーゼを用いた競合法による酵素免疫測定法で行った。各定量法のバリデーションの結果は、2.6.5 薬物動態試験概要表にまとめて掲載した（2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験）。

また、放射性標識体を用いた試験における生体試料中の放射能濃度は、試料に直接あるいは試料を可溶化又は燃焼処理した後、液体シンチレーターを加えて液体シンチレーションカウンターにより測定した。試料中の代謝物の定量は、試料を酢酸エチル抽出により前処理した後、UV 検出高速液体クロマトグラフィーにより分析し、代謝物に相当する画分の溶出液中の放射能濃度を測定することにより行った。

2.4.3.2 吸収

ウサギにタクロリムス点眼剤 0.1%、0.3%及び 1.0%の 1 滴（約 30 μ L）を単回点眼投与したとき、全血中タクロリムス濃度は点眼剤中タクロリムス濃度、すなわち投与量の増加とともに上昇し、システミックアベイラビリティは 11.1%～16.6%であった。また、ウサギにタクロリムスを 1 mg/kg 単回静脈内投与したときの全身クリアランスは 0.426 L/h/kg と低値を示し、一方、分布容積は 8.97 L/kg と高値であった（2.6.5.3 単回投与後の全血中濃度）。

ウサギにタクロリムス点眼剤 0.3%の 1 滴（約 30 μ L）を 3 時間ごとに 1 日 4 回 14 日間反復点眼投与したときの全血中タクロリムス濃度は 7 日目ではほぼ定常状態に達し、最終投与日から 7 日後には定量限界未満になった（2.6.5.4 反復点眼投与後の全血中濃度）。

2.4.3.3 分布

ウサギの *in vitro* 血漿蛋白結合率は、5 及び 50 ng/mL のいずれの濃度においても 98.4%以上と高値を示し、他の動物種（ラット、イヌ又はサル）あるいはヒトと比べて顕著な差は認められなかった（2.6.5.6 血漿蛋白との結合）¹⁾。

ウサギにタクロリムス点眼剤 0.1%、0.3%及び 1.0%の 1 滴（約 30 μ L）を単回点眼投与したとき、眼組織内タクロリムス濃度は投与量の増加とともに上昇する傾向を示し、房水及び水晶体を除く大部分の眼組織において全血中よりも高値を示した（2.6.5.5 単回点眼投与後の眼組織内濃度）。

ウサギにタクロリムス点眼剤 0.3%の 1 滴（約 30 μ L）を 3 時間ごとに 1 日 4 回 14 日間反復点眼投与したときの結膜、角膜、虹彩及び前強膜中タクロリムス濃度は、単回点眼投与時と同様に全血中濃度より非常に高値で推移した。房水ではいずれの時点においてもタクロリムスは検出されず、硝子体中濃度は全血中濃度と同程度であった。全血及び眼組織内タクロリムス濃度は、水晶体以外の組織では 7 日目にほぼ定常状態に達していると考えられた（2.6.5.5 反復点眼投与後の眼組織内濃度）。一方、水晶体中濃度は 14 日目でも上昇する傾向を示したが、ウサギにおける 6 か月間反復点眼投与試験の結果から、3 か月目には定常状態に達していると考えられた。

ウサギに ^{14}C -タクロリムス点眼剤 0.3% の 1 滴 (約 30 μL) を 5 分間隔で 3 回点眼投与し、眼マイクロオートラジオグラムを作製したとき、初回投与後 15 分では放射能は角膜に最も多く分布し、次いで結膜に多く認められた。虹彩及び強膜においても放射能はわずかに認められたが、網膜及び視神経には認められなかった。投与後 24 及び 48 時間では、角膜以外の部位に放射能はほとんど認められなかった。また、いずれの時間においても角膜上皮、角膜固有層及び角膜内皮への放射能の特異的な分布は認められなかった。眼マイクロオートラジオグラフィーにおける放射能の眼内分布は、先述の眼組織内タクロリムス濃度の測定結果とおおむね一致していた (2.6.4.4.2.3 点眼投与時の眼マイクロオートラジオグラフィー)。

ウサギに ^{14}C -タクロリムス点眼剤 0.3% の 1 滴 (約 30 μL) を 5 分間隔で 3 回点眼投与し、全身オートラジオグラムを作製したとき、初回投与後 15 分では放射能は鼻道に最も多く認められた。次いで鼻腔及び眼球に多く認められたが、食道及び胃内容物への分布はわずかであった。初回投与後 1 及び 4 時間では胃内容物に放射能は最も多く認められ、次いで食道に多く認められたが、眼球及び腸への分布はわずかであった。一方、投与後いずれの時点においても、脳、視神経及び気道に放射能は認められなかった。食道及び消化管内における放射能の経時的な移動が確認されたことから、点眼投与後のタクロリムスは主として鼻道、食道を経て消化管に移行し糞中に排泄されるものと考えられた (2.6.4.4.2.4 点眼投与時の全身オートラジオグラフィー)。また、一部循環血中へ移行したタクロリムスも、後述のように胆汁排泄を介して最終的に糞中へ排泄されるものと推察された (2.4.3.5 排泄)。

2.4.3.4 代謝

ウサギの肝マイクロゾームと ^{14}C -タクロリムスを NADPH 存在下で好氣的に反応させたとき、13 位 *O*-脱メチル体 (M-I) 及び 31 位 *O*-脱メチル体 (M-II) の生成が認められた (2.6.5.10 *In Vitro* での代謝)。M-I はラット及びヒト肝マイクロゾームにおいても生成され²⁾、ラットでは M-I 及び M-II のほかに 15 位 *O*-脱メチル体 (M-III) 及び 12 位水酸化体 (M-IV) の生成も確認されている (図 2.4-1)³⁾。いずれの種においても最も多く生成された代謝物は M-I であった。また、タクロリムスは主としてチトクローム P-450 3A により代謝されることも明らかにされている²⁾。

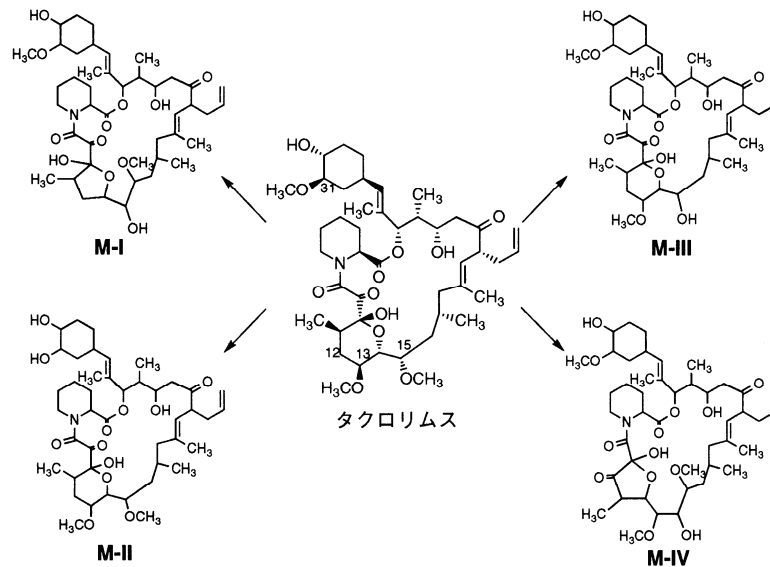


図 2.4-1 タクロリムスの肝ミクロゾームによる代謝

2.4.3.5 排泄

ウサギに ^{14}C -タクロリムスの 1 mg/kg を単回静脈内投与したとき、投与後 7 日までに投与放射能の 4.5% が尿中に、94.9% が糞中に排泄された (2.6.5.13 尿・糞中累積排泄)。一方、ラットに ^{14}C -タクロリムスの 1 mg/kg を単回静脈内投与したとき、投与後 3 日までに投与放射能の 7.7% が尿中に、95.2% が糞中に排泄されることが確認されており⁴⁾、いずれの動物種においても放射能の主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であると考えられた。

2.4.4 毒性試験

タクロリムス点眼剤の非臨床における安全性を評価するために、反復点眼投与毒性試験、局所刺激性試験、並びにその他の試験として反復点眼投与眼毒性試験、瞳孔、鼻腔及び水晶体に与える影響試験、炎症結膜での疼痛性及び類縁物質の毒性試験を実施した。併せて幼若動物を用いた毒性試験も実施した。

2.4.4.1 反復点眼投与毒性

カニクイザルに 0.03, 0.1 及び 0.5% タクロリムス点眼剤の 1 滴 (約 30 μL) を片眼に 1 日 4 回、13 週間投与し、本剤の眼及び全身に対する影響を調べた (2.6.7.7A)。濃度に依存した瞳孔径の低値が認められたが、0.5% 群の 1 例 1 時点を除き投与期間を通じて投与開始前の最小値を下回ることとはなかった。また、眼科学的検査及び眼球・眼瞼の病理組織学的検査に異常所見はなく、0.5% 群の縮瞳も軽度と判断した。尿検査、血液学的検査、血液化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織検査などの全身性の毒性検査では被験物質投与に起因する異常所見はなかった。0.5% 群の C_{max} は約 3.3 ng/mL、 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ は約 50 ng \cdot h/mL であり、血中濃度については性差及び蓄積性は認められなかった。これらの結果から、無毒性濃度は雌雄いずれも 0.5% と判断した。なお、0.1% 点眼剤を

体重 60kg の成人の両眼へ 1 日 4 回投与した場合の単位体重あたりのタクロリムス曝露量 (0.004mg/kg) に対して、サルの片眼への 0.5%点眼剤のそれは投与量ベースで 40 倍以上 (1 日 2 回投与では 80 倍以上) に相当する。

幼若ラットに 0.03, 0.1 及び 0.3%タクロリムス点眼剤の 5 μ L/回を片眼に 1 日 4 回, 4 週間投与し, 本剤の眼及び全身に対する影響を調べた (2.6.7.7B)。0.3%群において軽微な胸腺髄質の減少が観察されたほかは全身性毒性所見はなく, 加えて眼科学的及び病理組織学的に検査された眼球にも異常はなかった。0.1%点眼剤を体重 20kg の小児の両眼へ 1 日 4 回点眼した場合の単位体重あたりの曝露量 (0.012mg/kg) に対して幼若ラットの片眼への 0.1%点眼剤のそれは投与量ベースで 8 から 33 倍 (1 日 2 回点眼では 17 から 67 倍) に相当する。

2.4.4.2 局所刺激性

白色ウサギへの 0.1 及び 0.3%タクロリムス点眼剤の頻回点眼 (15 回/日, 2 日間) における眼粘膜刺激性試験において, 極めて軽度な結膜の充血及び虹彩のうっ血がみられたが, これら所見は速やかに回復した。これとは別に両群に瞳孔の縮小が認められた (2.6.7.16A)。

幼若白色ウサギへの 0.1 及び 0.3%タクロリムス点眼剤の同じ試験系においてみられた所見は, 成熟ウサギのそれとほぼ同じであり, 幼若動物に特有な眼刺激を起こさなかった (2.6.7.16B)。

2.4.4.3 その他の毒性

不純物の毒性

製造時には検出されないが長期保存による分解物として類縁物質 ■A*及び類縁物質 ■B*が検出され, それらの申請規格値はタクロリムス点眼剤 0.1%の表示濃度に対してそれぞれ ■%以下及び ■%以下である。両類縁物質を含め安全性の確認が必要とされる製剤中に含まれる分解物はない。しかし, 開発段階では安全性の確認が必要となる可能性を否定できなかったため両分解物の毒性試験を実施した。

熱劣化タクロリムス点眼剤を用いたラット 4 週間反復点眼投与毒性試験では毒性所見はみられず (2.6.7.17A), また遺伝毒性試験 (復帰突然変異及び染色体異常試験) においても遺伝毒性を示さなかった (2.6.7.17B, C)。申請規格上限値の類縁物質 ■A*及び類縁物質 ■B*を含有する 0.1%点眼剤を体重 60kg のヒトの両眼への 1 日 4 回投与する類縁物質 ■A*及び類縁物質 ■B*の曝露量に対して少なくともラット 4 週間試験では 24 倍相当 (1 日 2 回投与では 49 倍相当), 遺伝毒性試験では 300 倍相当 (1 日 2 回投与では 600 倍相当) まで評価された。

亜急性眼毒性

白色ウサギに 0.1, 0.3 及び 1.0%タクロリムス点眼剤の 1 滴 (約 30 μ L) を片眼に 1 日 4 回, 4 週間投与した試験の肉眼的観察において, 主として 0.3%以上で瞳孔の縮小が認められ, 1.0%では軽度な眼圧上昇 (2/5 例) もみられた。眼科学的検査及び眼球・眼瞼の病理組織学的検査では異常所見はなかった。なお, 全身への作用として 1.0%群に体重増加抑制が認められた (2.6.7.17 D)。

* : 新薬承認情報公開時に置き換えた

一方、イヌに 0.1, 0.3 及び 1.0%タクロリムス点眼剤を同様に 4 週間投与した試験では、1.0%群に軽度な眼圧上昇 (2/3 例) がみられた以外、特記すべき所見はなかった (2.6.7.17G)。

慢性眼毒性

白色ウサギに 0.1, 0.3 及び 1.0%タクロリムス点眼剤の 1 滴 (約 30 μ L) を片眼に 1 日 4 回、26 週間投与した試験の肉眼的観察において被験物質点眼群に縮瞳が認められた。投与後 26 週目に瞳孔径を実測したところ、縮瞳の程度は濃度に依存したものの 0.1%群のそれは軽度と判断された。眼科学的検査及び眼球・眼瞼の病理組織学的検査で異常所見はなかった。更に、4 週間点眼試験でみられた眼圧上昇も認められなかった。水晶体中濃度を投与 13 及び 26 週に測定したが、投与 13 週目で定常状態に達していると考えられた。なお、全身への作用として 1.0%群に体重増加抑制が認められた (2.6.7.17E)。

有色ウサギに 0.03, 0.1 及び 0.5%タクロリムス点眼剤の 1 滴 (約 30 μ L) を片眼に 1 日 4 回、26 週間反復投与してメラニン色素に関連する眼毒性の有無を調べた (2.6.7.17F)。眼科学的検査及び病理組織学的検査には異常所見はなかった。白色ウサギでもみられた瞳孔径の縮小がみられたが 0.1%以下の群のそれは軽度と判断された。メラニンに対する特有の眼毒性はなく、瞳孔に対する作用の増強もなかった。投与開始日、投与 13 及び 26 週の各日の投与 2, 3 あるいは 4 回目の点眼後の全血中濃度に大きな差はなく、また性差及び蓄積性も認められなかった。なお、全身への作用として体重増加抑制が 0.5%群において認められた。

瞳孔に与える影響

白色ウサギに 0.1 及び 0.3%タクロリムス点眼剤の 1 滴 (約 30 μ L) を片眼に 1 日 4 回、13 週間投与した後、4 週間休薬して経時的に瞳孔径を実測した (2.6.7.17H)。0.3%群の瞳孔径はプラセボ群のその最小値を下回る変化が観察されたが、0.1%群の瞳孔径はプラセボ群の変動幅内を推移したことから、ウサギへの点眼における瞳孔径に関する無毒性濃度は 0.1%と判断した。なお、0.3%群でみられた瞳孔径の縮小は休薬後、回復する所見であることが確認された。

白色及び有色ウサギ、イヌ及びサルに 0.1, 0.3 あるいは 1.0%タクロリムス点眼剤の 1 滴 (約 30 μ L) を片眼に 30 分間隔で連続 6 回投与したとき、ウサギは 0.1%以上、イヌは 1.0%で瞳孔径の縮小を起こし、サルは 1.0%でも縮小を示さなかった。したがって、瞳孔径に対する作用には種差がありウサギは感受性が高いと考えられた。なお、白色及び有色ウサギの間には本剤の縮瞳作用に対する差はなかった (2.6.7.17I, J, K)。これとは別に、ラットでは 1.0%タクロリムス点眼剤の 10 μ L を 1 日 3 回、13 週間点眼投与しても肉眼的に縮瞳は観察されなかった (2.6.7.17O)。

1.0%タクロリムス点眼剤を 30 分間隔で連続 6 回投与して縮瞳を起こさせた白色ウサギの眼における網膜電位図では、網膜機能の低下あるいは障害を示さなかった (2.6.7.17L)。また、0.1 及び 1.0%タクロリムス点眼剤の白色ウサギへの 1 日 4 回、4 週間点眼投与は角膜知覚に影響を及ぼさなかった (2.6.7.17M)。

鼻、咽頭及び喉頭に対する影響

点眼剤は主に結膜、角膜より吸収されるが、一部は鼻涙管を経て鼻腔から鼻咽頭管、更に咽頭及び喉頭へ移行する。そこで、鼻（鼻腔粘膜、副鼻腔、鼻涙管及び鼻咽頭管）、咽頭及び喉頭への影響を検討した。ラットに0.1及び1.0%タクロリムス点眼剤の5 μ Lを1日4回、13週間投与し、鼻、咽頭及び喉頭に対する影響を検討したところ、点眼剤投与に起因したと考えられる病理組織学的変化は認められなかった(2.6.7.17N)。

水晶体に与える影響

ラットにタクロリムスを長期間経口投与すると水晶体混濁が起こることが知られている。そこで0.3及び1.0%タクロリムス点眼剤の10 μ Lを片眼に1日3回あるいはタクロリムス経口製剤の3.2mg/kg/日をそれぞれラットに13週間投与し水晶体混濁を調べたところ、経口投与では水晶体混濁がみられたのに対し、点眼投与ではいずれの濃度でも水晶体は正常像を示した。これらの動物から得られた糖代謝パラメーターの測定成績及びタクロリムス経口剤にアルドースリダクターゼ阻害剤を併用投与すると水晶体混濁発症率が抑制されることから、水晶体混濁の発症機序は全身性の糖尿病原性を介した血糖の上昇と、その後の水晶体ソルビトールの蓄積であると推定された(2.6.7.17O)。

なお、前述した白色ウサギの26週間反復点眼眼毒性試験では、水晶体の眼科学的検査及び病理組織学的検査で異常所見はなく、また水晶体中薬物濃度は13週目には定常状態に達しているものと考えられた。

以上より、点眼投与では全身に対する曝露量が経口投与に比べ少ないことから、糖代謝異常を起こす可能性は少なく、水晶体に異常を与えることはないと考えられる。

炎症結膜での疼痛性

5mg ラウリル硫酸ナトリウムの点眼投与により結膜に炎症を惹起したウサギに、0.1%及び1.0%タクロリムス点眼剤の1滴(約30 μ L)を単回点眼し、点眼後1分間に認められる瞬目回数を指標にその疼痛性を検討した(2.6.7.17P)。プラセボ及び0.1%タクロリムス点眼剤の炎症眼における疼痛性は生理食塩液と同等とみなされ、1.0%タクロリムス点眼剤のそれは若干痛みを惹起する可能性が示唆された。

2.4.5 総括及び結論

タクロリムスはT細胞の活性化を特異的に阻害する強力な免疫抑制剤として、既に移植領域、重症筋無力症、アトピー性皮膚炎及び関節リウマチにおいて適応を取得しており、実験動物を用いた全身投与(経口及び静脈内)及び皮膚への局所適用における薬効、薬物動態並びに毒性に関する報告がなされている。

今回は、眼疾患である春季カタルへの点眼投与による臨床応用の可能性を示す目的で、1)アレルギー性結膜炎モデルでの有効性、2)点眼投与における薬物動態並びに毒性、を明らかにするための種々の非臨床試験を実施した。本剤の薬効及び毒性評価にウサギを用いたことから、薬物動態についてもウサギを用いて検討した。

タクロリムスの点眼投与は、薬剤が疾患部位である結膜及び角膜へ高濃度に推移することによる高い有効性と、眼局所への適用による全身性毒性の回避を期待したものである。¹⁴C-タクロリムス点眼剤をウサギに点眼投与したときの眼組織内分布試験において、タクロリムス由来成分は結膜及び角膜へ高濃度で分布するのに対し、網膜及び視神経には認められなかった。一方、ウサギへの単回点眼投与時のシステミックアベイラビリティは11.1%~16.6%であり、点眼局所、鼻粘膜又は、鼻道・食道を経た消化管からの血液中への移行が確認され、点眼投与量に依存した全血中タクロリムス濃度が認められた。しかしながら、臨床での0.1%の濃度の一日1~2回の使用における全身曝露量は、自己免疫疾患領域におけるタクロリムス経口剤の投与量(関節リウマチ;3 mg/日)の1/20から1/10以下の少量であり、感染防御機能を低下させたり、腎毒性、糖代謝異常等の全身毒性を発現させたりする濃度には至らないと考えられる。

眼局所における安全性については、ウサギでの頻回点眼、ウサギ、イヌあるいはサルでの亜急性あるいは慢性反復点眼投与にて検討された。瞳孔径の縮小及び眼圧上昇を除いて、眼科学的検査、病理組織学的検査及び網膜電位等の機能検査のいずれにおいても異常所見は認められなかった。瞳孔への影響については変動の程度から0.1%は毒性学的意義に乏しいと判断した。眼圧については1.0%で軽度な眼圧上昇がみられたが、0.3%あるいは0.5%は影響を与えなかった。これら試験はメラニン色素を有する有色ウサギ及びサルを用いても検討されたがメラニン色素の関与は認められなかった。また、点眼投与による全身性毒性はサルへの13週間点眼及び幼若ラットへの4週間投与により調べられた。サルでは全身性毒性はみられなかった。幼若ラットへの0.3%点眼では軽微な胸腺髄質の減少がみられたが、影響がなかった0.1%点眼の単位体重換算曝露量は体重20kgの小児に1日4回点眼の8~33倍(1日2回点眼では17~67倍)に相当する。眼部刺激感に関連し、ウサギ炎症惹起眼に投与して瞬目回数を指標に感覚的痛みを評価したが、0.1%点眼剤は生理食塩液と同程度であった。

ウサギにタクロリムスを点眼投与したとき、疾患部位において高濃度に推移しており、また、*in vitro* 代謝試験及び静脈内投与試験の結果より、循環血中へ移行後の肝における主要な一次代謝物の生成や排泄挙動にヒトあるいはラットと顕著な差異はないものと推察され、ウサギは薬理試験及び毒性試験において使用した動物種として妥当であると考えられた。

以上のように、非臨床試験においては、タクロリムス点眼剤の濃度及び点眼回数に依存した全血中濃度の上昇が認められたものの、臨床での0.1%の濃度の適切な使用においては、眼局所及び全身毒性発現の可能性は低いものと推察された。

薬理試験としては、タクロリムス点眼剤の作用機作を明らかにし、且つ、春季カタル治療に用いられるステロイド点眼剤と比較する目的で、BNラットの遅発型アレルギー性結膜炎モデル、並びにウサギの遅延型アレルギー性結膜炎モデルを用いた検討を実施した。その他としてモルモットの遅発型・遅延型及びラットの遅延型アレルギー性結膜炎モデルでの検討を実施した。また、副次的薬理試験として、タクロリムス点眼剤の角膜感染におよぼす影響を *C. albicans* 及び *S. epidermidis* によるウサギ角膜感染モデルにて検討した。その結果、タクロリムス点眼剤は下記に示す特徴を有することが明らかとなった。

- BN ラット遅発型アレルギー性結膜炎において、タクロリムス点眼剤はその発症を 1.0%の濃度で抑制した。ステロイド点眼剤（リン酸ベタメタゾンナトリウム液及びフルオロメトロン点眼液のいずれも 0.1%の濃度）と同様に、結膜炎発症に重要と考えられる好酸球及び T 細胞の結膜における増加をタクロリムス点眼剤は各々 0.3%以上及び 0.1%以上の濃度で抑制した。
- ウサギ遅延型アレルギー性結膜炎において、タクロリムス点眼剤は結膜の充血及び浮腫の発症を抑制した。0.01%以上の濃度での抑制作用の強さは、リン酸ベタメタゾンナトリウム液及びフルオロメトロン点眼液の 0.1%濃度と同程度であった。
- モルモットの遅発型及び遅延型アレルギー性結膜炎モデル、並びにラット遅延型アレルギー性結膜炎モデルでの検討では、タクロリムス点眼剤の 0.03%以上あるいは 0.1%以上の濃度にて有効性が得られた。
- タクロリムス点眼剤の 0.1%及び 1.0%濃度では、*C.albicans* 及び *S.epidermidis* によるウサギ角膜感染症を悪化させなかった。

図 2.4.5-1 に、春季カタルにおいて想定される発症機序⁵⁻⁸⁾とタクロリムス点眼剤の作用点を示す。従来、アレルギー性結膜炎の病態形成機序に関しては IgE 介在性にマスト細胞が誘発する即時型 (I 型) アレルギー反応の関与に主眼が置かれていた。一方、最近の研究によれば、春季カタルでは、IgE 介在性にマスト細胞、好酸球、Th2 細胞が誘発する遅発型 (I 型) アレルギー反応に、Th1 細胞が誘発する遅延型 (IV 型) アレルギー反応の関与が加わり、結膜に増加するマスト細胞、好酸球、Th2 細胞、Th1 細胞、マクロファージ等の炎症性細胞並びに各種サイトカインやケモカインの複雑な相互作用によって病態が重症化、慢性化していると考えられている。臨床的にも、春季カタルには抗アレルギー剤のみでは効果不十分の場合も多く、広範な作用を有する一方で眼圧上昇等の副作用が懸念されるステロイド点眼剤が広く用いられている。

タクロリムス点眼剤は、春季カタル治療に用いられるステロイド点眼剤と同様に、BN ラット遅発型及びウサギ遅延型アレルギー性結膜炎の発症を抑制した。タクロリムスのこれらの抑制作用を説明する *in vitro* の作用として、活性化 T 細胞からの Th1 及び Th2 サイトカイン産生抑制^{4.2.1.1-6, 7}、RBL 細胞からの TNF- α 産生抑制^{4.2.1.1-8} 並びに好酸球脱顆粒抑制^{4.2.1.1-9} がある。したがって、タクロリムス点眼剤は、春季カタル患者の結膜において、Th1 細胞、Th2 細胞、マスト細胞、好酸球等の炎症性細胞の活性化並びにこれらの細胞のサイトカイン産生を抑制することで、遅発型及び遅延型アレルギー反応を抑え、角結膜炎の進展を抑制するものと推察される。T 細胞からのサイトカイン産生を抑制するタクロリムス濃度は RBL 細胞からの TNF- α 産生や好酸球の脱顆粒を抑制する濃度より明らかに低い。このことから、春季カタルの抑制にかかわるタクロリムス点眼剤の主たる作用機序は T 細胞からのサイトカイン産生抑制にあると考えられる。

また、タクロリムス点眼剤は、角膜真菌感染症及び角膜細菌感染症を悪化させる可能性は低いと考えられた。

以上より、タクロリムス点眼剤は春季カタルの治療において有効性を示し、かつ適切な使用においては安全に使用し得る薬剤であると考えられた。

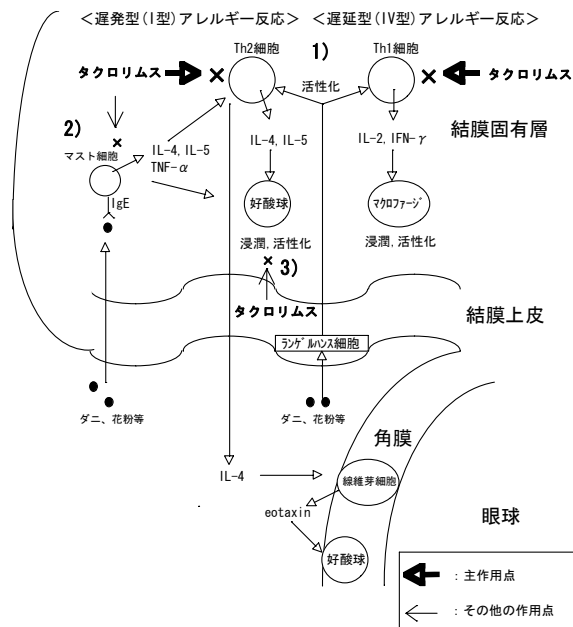


図 2.4.5-1 想定される春季カタルの発症機序及びタクロリムス点眼剤の作用点
(参考文献 5 及び 6 より作図)

タクロリムス点眼剤の作用点 (×印で示す) ;

- 1) T細胞からのサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ) 産生抑制
- 2) マスト細胞からの TNF- α 産生抑制
- 3) 好酸球活性化抑制

参考文献

- 1) Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, Noda K. Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. J Pharm Pharmacol. 1994;46:113-117.
- 2) Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Iwasaki K, Noda K, Yamazaki H, et al. Metabolism of FK506, a potent immunosuppressive agent, by cytochrome P450 3A enzymes in rat, dog and human liver microsomes. Biochem Pharmacol. 1994;47(4):727-735.
- 3) Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, Sakuma S, et al. Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. Drug Metab Dispos. 1993;21(6):971-977.

- 4) Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Teramura Y, Kawamura A, Hata T, et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of tacrolimus (FK506) in the rat. 薬物動態. 1998;13(3):259-265.
- 5) 深川和己. 眼アレルギー-春季カタルを中心に-. あたらしい眼科. 1996;13(6):853-861.
- 6) 石崎道治. 春季カタル. 眼科. 1995;37:1263-1269.
- 7) 石崎道治. 春季カタル. あたらしい眼科. 1993;10(11):1821-1830.
- 8) 庄司純. 眼科アレルギー性角結膜疾患の病理. アレルギー性眼疾患. NEW MOOK 眼科. 東京: 金原出版; 2003;6:10-20.