ラパリムスゲル0.2%

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2）

2.4　非臨床試験の概括評価

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.2 副次的薬理作用試験 5
2.4.2.3 安全性薬理試験 5
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 5
2.4.3 薬物動態試験 5
2.4.3.1 吸収 5
2.4.3.2 分布 6
2.4.3.3 代謝 6
2.4.3.4 排泄 6
2.4.3.5 薬物動態的薬物相互作用 6
2.4.4 毒性試験 6
2.4.4.1 単回投与毒性 6
2.4.4.2 反復投与毒性 7
2.4.4.3 遺伝毒性試験 8
2.4.4.4 がん原性 8
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 9
2.4.4.6 局所刺激性 10
2.4.4.7 その他の毒性 10
2.4.5 総括及び結論 10
2.4.6 参考文献 16

略語・略号一覧

略語・略号	内容
A/G	アルブミン・グロブリン比
ALB	アルブミン
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ（GPT）
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（GOT）
AUC_{0-24h}	投与後 24 時間までの血液中濃度-時間曲線下面積
Ca	カルシウム
CHO	総コレステロール
CK	クレアチンキナーゼ
C_{max}	最高血液中濃度
CRE	クレアチニン
DMBA	7,12-dimethylbenz[a]anthracene
Hb	ヘモグロビン濃度
Ht	ヘマトクリット値
IP	無機リン
LD	乳酸デヒドロゲナーゼ
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mammalian target of rapamycin)
t_{max}	最高血液中濃度到達時間(C_{max} 到達時間)
TSC	結節性硬化症（tuberous sclerosis complex）
TP	総蛋白
UN	尿素窒素
UVA	長波長紫外線

試験製剤一覧

製剤	使用された試験（資料番号）	処方
ラパリムスゲル（本剤）	＜[redacted]にて製造＞ 4.2.3.1-1、4.2.3.2-1、4.2.3.2-3、4.2.3.2-4、4.2.3.4-1 参、4.2.3.4-2、4.2.3.5.4-1、4.2.3.6-1、4.2.3.6-2、 ＜[redacted]にて製造（最終製剤）＞ 4.2.2.2-1、4.2.3.6-3、4.2.3.7-7	シロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、トリエタノールアミン、精製水を含む。
	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.2-2、 4.2.3.5.4-2、4.2.3.7-2、4.2.3.7-3、 4.2.3.7-4、4.2.3.7-5 参、4.2.3.7-6 参	大阪大学が製造したシロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、[redacted]、精製水を含む。
シロリムス軟膏	＜研究者の施設にて製造＞ 4.2.1.1-1 参 ＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参、	シロリムス濃度 0～0.8%の軟膏。添加物として、ワセリンを含む。
その他のシロリムス外用剤	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参	シロリムス濃度 0～0.8%のイソプロピルアルコール製剤。

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ラパリムスゲル（以下、「本剤」）0.2%は、ゲル 1 g 中にシロリムス 2 mg を含み、添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、トリエタノールアミン及び精製水を含んだ無色透明の外用剤である。本剤の非臨床試験においては、ラパリムスゲル以外に本剤のプロトタイプ製剤として大阪大学薬剤部で製造されたゲル剤が用いられているが本項では特に区別せず、本剤とした。また、一部の試験では、シロリムスを有効成分とする軟膏等が用いられ、それらについてはその都度基剤を特定し、示した。

シロリムスはワイス社（現ファイザー社（米国））により免疫抑制剤として開発され、腎移植における免疫抑制を効能・効果として 1999 年 9 月米国で承認され、現在までに米国を含む海外 97 ヵ国・地域で承認されている。国内ではノーベルファーマ社が 2014 年 7 月に「ラパリムス錠 1 mg」の販売名でリンパ脈管筋腫症を効能・効果とする世界で初めての承認を取得している。

今般、本剤の申請にあたっての対象疾患は結節性硬化症（TSC）に伴う血管線維腫であるが、この疾患に対する効能・効果を取得した治療薬は国内外を問わず未だない。

血管線維腫は、TSC に伴う皮膚病変で過誤腫の一種であり、5 歳以上の結節性硬化症患者の 70～80%以上に認められている[1),2)]。TSC は、その原因遺伝子である TSC1 及び／又は TSC2 の異常により、下流の哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR：mammalian target of rapamycin）の活性化が起こり、細胞の増殖や分化が促進されて、全身に過誤腫が生じる疾患である。従って、mTOR 阻害作用を有するシロリムスを経口投与することにより過誤腫の一種である血管線維腫などの皮膚病変に対する治療効果が期待される。しかしながら、シロリムスを経口投与した場合、間質性肺炎をはじめとする重篤な副作用の発生が憂慮される。今般申請する本剤は皮膚透過性にすぐれた薬剤である。本剤は、結節性硬化症に伴う血管線維腫に対する有効な治療薬となることが期待される。

非臨床試験において、薬理試験に係る効力を裏付ける試験は、シロリムスの局所投与に関して、文献検索をして得られた公表論文を主体にまとめた。安全性薬理試験は、ラパリムス錠の承認申請時に提出済みであることから新たな試験は実施しなかった。薬物動態試験については、安全性薬理試験と同様にラパリムス錠の申請時に経口及び静注投与したときの試験成績（分布、代謝、排泄、相互作用）は提出済みであることから、新たな試験として経皮投与後のシロリムスの血液中動態試験及びヒト皮膚を用いた in vitro 皮膚透過性試験を実施した。毒性試験については、本剤の皮膚への長期投与に対する影響に関する知見がないことから、ラットの 13 週間反復経皮投与毒性試験、サルの 13 週間及び 39 週間反復経皮投与毒性試験のほか、皮膚二段階発がんモデルによるがん原性試験を実施した。なお、ラットの 26 週間反復投与毒性試験については、ラットの 13 週間反復投与毒性試験で投与経路（経皮及び経口投与）の違いによる毒性プロファイルに差がないことから実施しなかった。また、本剤の対象患者には幼児、小児が含まれることから、幼若ラットを用いた試験を実施した。その他、局所刺激性試験、光毒性試験、皮膚感作性、皮膚光感作性試験、不純物の in silico 変異原性予測についても検討した。なお、毒性試験は検討試験を除いてすべて 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

（添付資料＜4.2.1.1-1 参＞）

ヌードマウスの結節性硬化症(TSC)モデルにおいてシロリムスの経皮投与(軟膏を局所塗布)は腫瘍増殖抑制作用を示した。このことから、シロリムス軟膏の局所塗布は結節性硬化症に伴う顔面血管線維腫の治療に対し有効性が期待される治療法と考えられた。

2.4.2.2 副次的薬理作用試験

該当試験を実施していない。

2.4.2.3 安全性薬理試験

該当試験を実施していない。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験を実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

（添付資料＜4.2.2.2-1＞＜4.2.3.2-1＞＜4.2.3.2-3＞＜4.2.3.2-4＞）

雌雄ラットの背部に本剤を 1 日 2 回、13 週（91 日）間反復経皮投与したときの投与 1 日目及び 91 日目の血液中シロリムス濃度を測定した。投与 1 日目では、雄の最高用量群（8.0 mg/kg）を除く雌雄各群において、血液中シロリムス濃度は定量下限未満であった。投与 91 日目では、血液中シロリムス濃度は投与 1 日目と比較して高値を示し、定量可能であった。雌雄ともに、投与 91 日目の C_{max} 及び AUC_{0-24h} はいずれも投与量の増加に伴い高値を示したが、その増加比は投与量比よりも小さかった。投与 91 日目の C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、雌と比較して雄でやや高値を示した。血液中濃度は、吸収相及び消失相に相当するような明らかな濃度変化（ピーク）を示さず、変動はあるものの 24 時間を通じておおむね一定した濃度レベルを推移した。

雌雄サルの背部に本剤を 1 日 2 回、13 週（93 日）間反復経皮投与したときの投与 1 日目及び 93 日目の血液中シロリムス濃度を測定した。投与 1 日目では、雄の最高用量群（4.0 mg/kg）を除く雌雄各群において、血液中シロリムス濃度は定量下限未満であった。投与 93 日目では、血液中シロリムス濃度は投与 1 日目と比較して高値を示し、定量可能であった。雌雄ともに、投与 93 日目の C_{max} 及び AUC_{0-24h} はいずれも投与量の増加に伴い高値を示したが、その増加比は投与量比よりも小さかった。投与 93 日目の C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、雌と比較して雄でやや高値を

示した。血液中濃度は、吸収相及び消失相に相当するような明らかな濃度変化（ピーク）を示さず、変動はあるものの 24 時間を通じて概ね一定した濃度レベルを推移した。

雌雄サルの背部に本剤を 1 日 2 回、39 週（272 日）間反復経皮投与したときの投与 27 日目、90 日目及び 272 日目の血液中シロリムス濃度を測定した。血液中シロリムス濃度は、投与 27 日目から 90 日目には定常状態に達したものと考えられた。ラット及びサルの 13 週反復投与試験と同様に、血液中シロリムス濃度は吸収相及び消失相に相当するような明らかな濃度変化(ピーク）を示さず、変動はあるものの 24 時間を通じて概ね一定した濃度レベルを推移した。

In vitro 皮膚透過性試験において、ヒト皮膚に本剤を適用後 24 時間までレセプター液中にシロリムスは検出されず、シロリムスの皮膚透過性は低いことが示された。一方、適用後 24 時間の角層下皮膚にはシロリムスが検出され、角質バリアをシロリムスが透過することが示された。角質層には、角層下皮膚と比較して高濃度のシロリムスが検出された。

2.4.3.2 分布

（添付資料＜4.2.3.4-1 参＞）

雌マウスの背部に本剤を 1 日 1 回、4 週間反復経皮投与したのちの皮膚中シロリムス濃度を測定した。皮膚中濃度は、投与量の増加に概ね比例して上昇した。また、皮膚中濃度は、ラット及びサルにおいて認められた血液中濃度と比較して非常に高濃度であった。

2.4.3.3 代謝

該当試験を実施していない。

2.4.3.4 排泄

該当試験を実施していない。

2.4.3.5 薬物動態的薬物相互作用

該当試験を実施していない。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性

（添付資料＜4.2.3.1-1＞）

ラットを用いて経皮投与による単回投与毒性を検討したとき、投与限界量である 8.0 mg/kg（0.8%）でも、死亡例や毒性症状、体重、剖検に異常は観察されなかった。

2.4.4.2 反復投与毒性

（添付資料＜4.2.3.2-1＞＜4.2.3.2-2＞＜4.2.3.2-3＞＜4.2.3.2-4＞＜4.2.3.5.4-1＞＜4.2.3.5.4-2＞）

反復投与毒性をラット（13 週間投与）及びサル（13 及び 39 週間投与）を用いて検討した。ラットの 13 週間反復経皮投与（0、0.1、0.5、2.0、8.0 mg/kg/day）では、死亡例はなく、一般状態や投与部位にも変化は観察されなかった。0. 5 mg/kg /day 以上の雄で体重の低値がみられたが、雌では変化はなかった。8.0 mg/kg/day の雌雄で肺重量の高値（又は高値傾向）がみられ、2.0 mg/kg/day 以上の雄及び 8.0 mg/kg/day の雌で肺胞マクロファージ集簇の程度が増強した。4 週間の休薬後では、体重、器官重量及び病理組織学的所見は回復又は回復傾向を示した。

HWY ヘアレスラットを用いた 13 週間反復経皮投与（0、0.5、2.0、8.0 mg/kg/day）では死亡例はなく、2.0 mg/kg/day 以上の雌雄で体重の低値、雄で摂餌量の低値がみられた。血液学的検査では、主に 2.0 mg/kg/day 以上の雌雄で好中球数及び好中球比の高値又は高値傾向がみられ、リンパ球比及び好酸球比が低値であった。また、網赤血球数及び血小板数の高値がみられ、8.0 mg/kg/day で APTT が延長した。血液生化学的検査では、0.5 mg/kg/day 以上の雄で ALT の高値が、2.0 mg/kg/day 以上の雌及び 8.0 mg/kg/day の雄で ALB 及び A/G の低値がみられた。他に 8.0 mg/kg/day では AST、LD、CK 及び UN の高値、CRE 、Ca 及び TP の低値がみられた。病理組織学的検査では、対照群を含む 0.5 mg/kg/day 以上の雌雄で顎下リンパ節及び腸間膜リンパ節で泡沫状マクロファージの増加、肺での肺胞マクロファージの集簇が認められ、8.0 mg/kg/day では高頻度であった。その他 8.0 mg/kg/day の雌雄の顎下リンパ節でラッセル小体、胸腺でマクロファージが増加したほか、副腎球状帯に微細空胞が認められた。7 週間の休薬後では、体重を除きいずれの検査値も回復又は回復傾向を示した。無毒性量は、雌雄とも 0.5 mg/kg/day 未満であった。

サルを用いた 13 週間反復経皮投与（0、0.05、0.25、1.0、4.0 mg/kg/day）では、死亡例はなく、一般状態や投与部位にも変化は観察されず、すべての検査において異常は認められなかった。サル 39 週間反復経皮投与（0、0.25、1.0、4.0 mg/kg/day）では、4.0 mg/kg/day の雄 1 例及び 1.0 mg/kg/day の雌 1 例で、投与 32 週以降に軟便、下痢、体重及び摂餌量の低値に加え、自発運動の減少、横臥位、刺激に対する反応性の低下あるいは体温低下がみられ、瀕死期屠殺した。病理組織学的検査では盲腸炎、結腸炎あるいは直腸炎が共通に認められ、雌では、盲腸及び結腸に多量のガスが貯留・拡張し、この物理的圧迫に起因すると考えられる消化管の変化もみられた。死因は、大腸障害による脱水、栄養不良等による全身状態の悪化によるものと考えられた。生存例では一部の動物に軟便が頻回にみられたほか、4.0 mg/kg/day で尿蛋白の高値、プロトロンビン時間の短縮、1.0 及び 4.0 mg/kg/day で腎臓の近位尿細管上皮の好酸性/褐色顆粒がみられた。

反復経皮投与毒性試験の無毒性量は、SD ラットの 13 週間投与の雄で 0.1 mg/kg/day、雌で 2.0 mg/kg/day、サル 13 週間投与で 4.0 mg/kg/day、39 週間投与で 0.25 mg/kg/day と判断された。無毒性量における最高血液中濃度(C_{max})は、臨床用量（医師主導第Ⅰ/Ⅱ相試験、0.2%製剤

投与時）における推定トラフ値（約 0.15 ng/mL）と比較すると、ラット（13 週間投与試験）の雄で 1.3 倍、雌で 3.3 倍、サル（39 週間投与試験）の雄で 2.7 倍、雌で 2.9 倍であった。

新生児の毒性試験に関し、幼若動物における反復経皮投与毒性を 2 系統のラット（SD 系、HWY 系）を用いて検討した。幼若 SD 系ラット（22 日齢）を用いた 4 週間反復経皮投与（0、0.1、0.5、2.0、8.0 mg/kg/day）では、血液学的検査では、2.0 mg/kg/day 以上の雌及び 8.0 mg/kg/day の雄で Hb 及び/又は Ht の高値がみられた。8.0 mg/kg/day の雌雄で血小板数の低値、雌で好中球比の高値及びリンパ球比の低値がみられた。血液生化学的検査では、2.0 mg/kg/day 以上の雌雄で AST 及び ALT の高値（高値傾向）がみられた。器官重量では、8.0 mg/kg/day の雌雄で胸腺重量の低値、2.0 mg/kg/day 以上の雌で肺重量の高値がみられた。病理組織学的検査では、2.0 mg/kg/day 以上の雌雄で肺胞マクロファージの集簇が、8.0 mg/kg/day の雄の胸腺で染色性マクロファージの増加が認められた。無毒性量は、雌雄とも 0.5 mg/kg/day であった。

幼若 HWY 系ラット（22 日齢）を用いた 7 週間反復経皮投与（0、0.5、2.0、8.0 mg/kg/day）では、0.5 mg/kg/day 以上の雌及び 2.0 mg/kg/day 以上の雄において摂餌量の低値に伴う体重の低値がみられた。血液学的検査では、2.0 mg/kg/day 以上の雄又は雌で血小板数の高値、白血球分類における数/比率の変動、APTT の延長がみられ、8.0 mg/kg/day の雌雄で網赤血球の高値がみられた。血液生化学的検査では、2.0 mg/kg/day 以上の雌雄で ALB 及び A/G の低値が、8.0 mg/kg/day の雌雄で TP の低値がみられた。その他、8.0 mg/kg/day の雌雄で CRE の低値、CHO の高値が、雌で AST、ALT、ALP 及び CK の高値、IP 及び Ca の低値がみられた。病理組織学的検査では、0.5 mg/kg/day 以上の雌及び 2.0 mg/kg/day 以上の雄で胸腺のマクロファージの増加、8.0 mg/kg/day の雌雄で顎下リンパ節及び腸間膜リンパ節のマクロファージの増加などが認められた。無毒性量は、雄で 0.5 mg/kg/day、雌では 0.5 mg/kg/day 未満であった。

幼若ラットでは毒性パラメータの変動が成獣ラットに比べやや強く発現する傾向にあったが、これらの所見はいずれも本剤の免疫抑制作用あるいはその二次的作用に基づくもので、幼若ラットにおいて特異な毒性発現はないと考えられた。また、幼若及び成獣ラットでの無毒性量には大きな差はなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

該当する試験を実施していない。

2.4.4.4 がん原性

（添付資料＜4.2.3.4-2＞）

マウスを用いて中期皮膚発がん性試験により皮膚腫瘍発生を検討した。イニシエーターである 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を事前に塗布した後、本剤（0.2、0.8%）を 19 週間、背部皮膚に経皮投与した。その結果、DMBA 処置の有無にかかわらず、いずれの被験物質投与群にも皮膚腫瘤の発生は認められず、本剤はマウス皮膚に対し発がん促進作用を示さないと判断された。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

シロリムスの経皮投与の毒性は経口投与と比較して弱く、また経皮及び経口投与での毒性プロファイルには差がなかった＜2.6.6.9 考察＞。従って、本剤の生殖発生毒性は、ラパリムス錠の承認申請に提出した経口投与による生殖発生毒性試験の成績で評価されていると考えられることから、生殖発生毒性試験は実施していない。

2.4.4.6 局所刺激性

（添付資料＜4.2.3.6-1＞＜4.2.3.6-2＞）

本剤（0.01、0.05、0.2%）をウサギの皮膚及び眼に適用した結果、いずれにおいても刺激性は認められなかった。また、最終製剤及びその劣化品を用いた皮膚刺激性も認められなかった。

2.4.4.7 その他の毒性

（添付資料＜4.2.3.7-1＞＜4.2.3.7-2＞＜4.2.3.7-3＞＜4.2.3.7-4＞＜4.2.3.7-5＞
＜4.2.3.7-6 参＞）

3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験で、シロリムスの光毒性は陰性であった。モルモットの皮膚感作性試験（Adjuvant and Patch Test 法）では、紅斑及び浮腫は認められず、本剤の皮膚感作性は陰性であった。

モルモットの皮膚光感作性試験（Adjuvant and Strip 法）では、本剤 0.8%で 5 日間塗布（＋UVA 照射）して感作し、感作開始後 21 日目に本剤（基剤、0.05、0.2%）で惹起（＋UVA 照射）した。その結果、UVA の照射された本剤（基剤を含む）の塗布部位及びその周囲の非塗布部位で紅斑が認められた。これらの皮膚反応には Adjuvant の影響の可能性が考えられることから、Adjuvant を用いない Kochever 法で再度皮膚光感作性試験を実施した。その結果、本剤感作群に対して無処置、基剤又は本剤で惹起（＋UVA 照射）するといずれの条件でもごく軽度又は明らかな紅斑が認められた。本剤感作及び無処置惹起（UVA 照射のみ）で紅斑が認められたことから、本剤には皮膚光感作性はなく、光線過敏様皮膚反応の可能性が示唆された。なお、紅斑は惹起終了後 48 時間で減弱し、惹起終了後 6 日には消失した。紅斑が認められた感作濃度（投与量）は、0.2%及び 0.8%でその程度には用量依存性がみられた。また、基剤の種類（エタノール、イソプロピルアルコール、軟膏）による皮膚反応に差はなかった。また、感作時に遮光剤を使用した場合では紅斑の抑制効果はなかったが、惹起時に遮光剤を塗布した場合では紅斑はみられず、遮光剤の抑制効果が認められた。最終製剤を用いた皮膚光感作性試験（Kochever 法）では、本剤感作群に対して無処置、基剤又は本剤を惹起（＋UVA 照射）した場合、いずれの条件でも紅斑が認められ、先に実施した試験結果（Kochever 法）と差異はなかった。

また、本薬の原薬製造工程由来の不純物、製剤中に存在が予想される分解生成物など 10 物質の化学構造の in silico 変異原性予測では警告構造はなく、変異原性の懸念はなかった。

2.4.5 総括及び結論

血管線維腫は、結節性硬化症（TSC）に伴う皮膚病変で過誤腫の一種であり、TSC の原因は、その遺伝子である TSC1 又は TSC2 の遺伝子変異により、それぞれの遺伝子がコードするタンパク質である hamartin 又は tuberin が異常となり、下流の mammalian target of rapamycin（mTOR）というセリン・スレオニンキナーゼの抑制的制御が不能となることで起こる。すなわち TSC では mTOR が活性化され、その下流の p70 ribosomal protein S6 kinase（p70S6K）や ribosomal

protein S6（S6）などのリン酸化体が増加することで、細胞の増殖・分化が促進されて全身に過誤腫が生じる[3]。また、血管線維腫は血管と間質細胞から構成されており、これらの細胞では血管新生やリンパ管新生を誘導する血管内皮細胞増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor：VEGF）の発現が報告されていることから[4]、腫瘍の血管増生や転移に VEGF が寄与していると考えられる。シロリムスは FK506 結合蛋白質に結合して mTOR の活性を阻害することで TSC1 又は TSC2 遺伝子の異常により引き起こされる細胞の増殖を抑制する。さらにシロリムスの VEGF 産生抑制作用も腫瘍の縮小効果に寄与していると考えられる。

海外では TSC 患者の脳腫瘍、腎腫瘍及び肺病変に対し、シロリムスの内服治療が試みられ、良好な治療成績が得られているが、シロリムス投与の中止に伴い腫瘍の再燃が認められる。皮膚病変もこれら腫瘍と同様、mTOR 阻害剤の内服により縮小するが、服用を中止すると再発することが知られている[5]。従って、腫瘍の縮小化を維持するには継続してシロリムスを内服する必要がある。しかしながら、シロリムスの全身投与では免疫抑制作用に伴う種々の副作用が知られており、内服による長期投与は困難であるとされている[5]。

これらの経緯を踏まえると、結節性硬化症に伴う皮膚病変等に対しては、シロリムスの経皮投与が、有効かつ副作用が少ない投与方法であると考えられる。効力を裏付ける試験においてヌードマウスの結節性硬化症モデルを用いた試験では、シロリムス軟膏 0.4 及び 0.8%を経皮投与したとき、投与後 29 日目の腫瘍体積は有意に減少した。

薬物動態試験において、本剤を経皮投与したときのシロリムスの経皮吸収性につき、ラット及びサルを用いて検討した。ラット及びサル 13 週反復投与試験において、臨床適用濃度である本剤 0.2%を投与したとき、投与 1 日目ではいずれの動物においても血液中濃度は検出されず、本剤の経皮吸収性は低かったが、13 週間反復投与することにより、ラット及びサルの血液中にシロリムスが検出された。その濃度推移は 24 時間を通じておおむね一定に推移し、吸収相及び消失相に相当するような明らかな濃度変化（ピーク）は認められなかった。

サル 39 週反復投与試験において、雌の 1.0 及び 4.0 mg/kg/day 投与群で投与 27 日目から 90 日目にかけて血液中シロリムス濃度の上昇が認められたが、他の群では投与 27 日目以降の血液中濃度は投与期間に依存せずおおむね一定のレベルを維持した。このことから、本剤を反復投与したとき、投与 27 日目から 90 日目には定常状態に達したものと考えられる。さらに、ラット及びサル 13 週反復投与試験と同様に、吸収相及び消失相に相当するような濃度変化（ピーク）は認められなかったことから、経皮投与されたシロリムスの全身循環への移行は緩やかに進行するものと考えられた。

マウスに本剤を 4 週間反復投与し、最終投与後の皮膚中濃度を経時的に測定したとき、皮膚中濃度は、133.4～244.5 ng/mg tissue（本剤 0.2%投与時）及び 700.4～950.9 ng/mg tissue（本剤 0.8%投与時）のように百 ng/mg tissue のオーダーであった。これを、皮膚 1 g を 1 mL として換算すると皮膚中濃度は百μg/mL のオーダーとなり、これは、ラット及びサルにおいて認められた血液中シロリムス濃度（ng/mL のオーダー）の 10 万倍に相当する極めて高い濃度であった。

In vitro 皮膚透過性試験において、適用後 24 時間までレセプター液中にシロリムスは検出されず、トキシコキネティクス試験からも示唆されたように、シロリムスの皮膚透過性は低いことが示された。一方、適用後 24 時間の角層下皮膚にはシロリムスが検出され、角質バリアをシロリムスが透過することが示された。角質層から回収されたシロリムス量は角層下皮膚から回収されたシロリムス量のおよそ 7 倍であった＜表 2.6.4.3.1-1＞。今回使用した皮膚組織の厚みは 500 μm（設定値）であり、角質層の厚みはおおむね 10～20 μm[6)7)]であることから、25～50 倍程度の厚み（即ち容積）の違いがある。このように薄い角質層に 7 倍量のシロリムスが分布したことから、角質層のシロリムス濃度は、角層下皮膚と比較して、175～350 倍程度の高濃度であろうと推察される。このような顕著な濃度差は、脂溶性の高い（LogP = 4.02）シロリムスが角質層に高い親和性を有し、貯留するためと考えられる。角質層に貯留したステロイドが持続的に放出され、角質層が薬物のリザーバーとして機能することが報告されている[8)]。シロリムスも同様に、角質層から持続的に放出され、真皮層へと拡散し、真皮層の毛細血管から循環血へと吸収されるものと考えられる。その結果として、シロリムスはマウスにおいて認められたように高い皮膚中濃度を示し、明瞭なピークを示さずおおむね一定した、かつ低い血液中濃度レベルで推移するものと推察した。

毒性試験において、最初に投与経路の違いによるラット及びサルの反復投与毒性試験成績を比較検討した。ラットの経口投与では、雄の 0.5 mg/kg/day 以上で体重の低値、2 mg/kg/day 以上で摂餌量の高値傾向がみられ、白内障が観察された。また、2 mg/kg/day 以上で膵島細胞の空胞化に伴う糖尿病様症状（グルコースの高値と血液濃縮）、及び免疫抑制作用による好中球比の高値とリンパ球比の低値がみられた。剖検では、2 mg/kg/day 以上で精巣の小型化がみられた。病理組織学的検査では、2 mg/kg/day 以上の雄で精細管の萎縮、0.5 mg/kg/day 以上で肺胞マクロファージの集簇、心筋変性、腎臓のミネラル沈着が認められ、無毒性量は 0.5 mg/kg/day 未満であった。一方、ラットの経皮投与では、雄の 0.5 及び 2.0 mg/kg/day で体重の低値がみられたが、雌では変化はなかった。8.0 mg/kg/day で肺の重量の高値が認められ、病理組織学的検査では肺胞マクロファージの集簇（中等度）が 2.0 mg/kg/day 以上の雄及び 8.0 mg/kg/day の雌で認められた。無毒性量は雄で 0.1 mg/kg/day、雌で 2.0 mg/kg/day であった。

サルの経口投与では、0.5 mg/kg/day 以上で慢性的な下痢/軟便を伴う大腸炎/盲腸炎がみられ、体重の低値及び衰弱を呈し、死亡/瀕死状態がみられた。病理組織学的検査では脾臓、胸腺、リンパ節でのリンパ萎縮がみられ、無毒性量は 0.5 mg/kg/day 未満であった。これに対し、経皮投与では最高用量 4 mg/kg/day まで特記すべき異常は認められず、無毒性量は 4 mg/kg/day であった。以上のように、経口投与では、シロリムスの免疫抑制作用若しくは長期間の免疫抑制状態による二次的な変化が多様な組織・器官において観察されたが、経皮投与ではこれらは限定的であった。ラット及びサルの経皮投与の曝露量はいずれも経口投与より低値であった。シロリムスの経皮投与の毒性プロファイルは、経口投与と比較して毒性は弱く、また新たな毒性も認められなかった。従って、本剤の全身毒性は、ラパリムス錠の承認申請に提出した経口投与による一連の毒性試験の成績で評価されていると考えられる。

反復経皮投与毒性試験における無毒性量と臨床用量の関係について考察した。臨床試験（第Ⅲ相試験、0.2%製剤投与時）において測定された全血中シロリムス濃度は、投与開始 12 週後で 70%の患者で検出され、その平均濃度は 0.24 ng/mL であった＜2.7.2.2.3＞。これを反復投与毒性試験の無毒性量における最高血液中濃度（C_{max}）と比較すると、ラット 13 週間投与試験の雄及び雌の C_{max} はそれぞれ 0.20 及び 0.49 ng/mL であることから曝露量比はそれぞれ 0.8 及び 2.0 倍、サル 39 週間投与試験では雄及び雌の C_{max} はそれぞれ 0.41 及び 0.44 ng/mL であり、曝露量比はそれぞれ 1.7 及び 1.8 倍の安全域があるものと考えられた。

サル 39 週間反復経皮投与における瀕死例（大腸炎）について、4.0 mg/kg/day の雄 1 例及び 1.0 mg/kg/day の雌 1 例で、それぞれ投与 36 週及び 32 週以降に軟便、下痢及び体重・摂餌量の低値がみられた。その後、自発運動の減少、横臥位、刺激に対する反応性の低下あるいは体温低下を呈したため瀕死期屠殺した。 病理組織学的検査では、盲腸炎、結腸炎あるいは直腸炎が共通して認められた。さらに雌では、盲腸及び結腸に多量のガスが貯留・拡張し、この物理的圧迫に起因すると考えられる消化管の変化（うっ血、線維素様血栓、出血、粘膜上皮の単細胞壊死及び剥離など）もみられた。そのため大腸炎が契機となり、軟便・下痢に伴う脱水、栄養不良及び腸内細菌叢の内毒素などの障害により、瀕死状態を招いたものと推察された。死亡・瀕死例の発現に投与量との関連性は明らかではなかったが、別に実施されたシロリムスのサルの 13 週及び 26 週反復経口投与毒性試験[9)10)]においても、経皮投与の場合と同様に投与期間中に軟便、下痢及び大腸炎がみられ、＜表 2.6.6-10＞に示す死亡・瀕死動物が認められた。経口投与の場合にも個体差がみられたが、高用量群では死亡・瀕死動物が増加する傾向にあり、シロリムス投与との関連があるものと考えられる。個体差の要因は明らかではないが、須藤は各種実験動物のストレスによる腸内細菌叢の変化について概説[11)]しており、サルでは胎生期・幼若期のストレス（母動物への驚愕性音響、親サルとの分離）が腸内細菌叢を変動させることが報告[12)13)]されている。大腸炎の発現にはこのような腸内細菌叢の個体差が関与したとも考えられる。

大腸炎はマウス、ラットの反復経口投与毒性試験では認められず、ヒトにおいても外国での臓器移植患者を対象とした臨床試験では 0.2%（8/3,416 例）と、頻度は極めて低い。本剤の第Ⅲ相試験においても大腸炎などの消化器症状は認められていない＜2.7.4.2.1＞。また、類似構造のテムシロリムス[14)]、エベロリムス[15)]などに大腸炎に対する注意喚起はみられないことから、サルではシロリムスに対する感受性が大腸で高いものと考えられ、ヒトでのリスクが強く懸念される所見ではないと判断した。

幼若動物に対する影響については、幼若ラット（SD 系 4 週齢）を用いた 4 週間反復経皮投与毒性試験（用量：0、0.1、0.5、2、8 mg/kg/day）において、2 mg/kg/day 以上において血液学的検査（Hb 及び Ht の高値、好中球比の高値とリンパ球比の低値、血小板数の低値）、血液生化学的検査（AST 及び ALT の高値）、並びに病理組織学的検査（肺胞マクロファージの集簇）に影響が認められた。無毒性量は、雌雄とも 0.5 mg/kg/day と判断された。

ラット（SD 系 6 週齢）13 週間反復経皮投与毒性試験（用量：0、0.1、0.5、2、8 mg/kg/day）では、0.5 mg/kg/day 以上の雄で体重及び摂餌量の低値、2 mg/kg/day 以上の雄及び 8 mg/kg/day の雌で肺胞マクロファージの集簇が認められ、8 mg/kg/day の雌雄で肺重量の高値がみられた。

無毒性量は、雄で 0.1 mg/kg/day、雌で 2.0 mg/kg/day と判断された。成獣ラットに比べ幼若ラットでは毒性パラメータの変動がやや強く発現する傾向にあったが、これらの所見はいずれも本剤の免疫抑制作用あるいはその二次的作用に基づくもので、両者の無毒性量には大差のないことから（幼若：0.5 mg/kg/day、成獣：雄 0.1、雌 2.0 mg/kg/day ）、幼若ラットにおいて特異な毒性発現はないと考えられる。

なお、HWY ヘアレスラットを用いた幼若（4 週齢）及び成獣（6 週齢）ラットの毒性試験成績は、両者とも体重・摂餌量の低値、血液学的検査（白血球系の変動など）、血液生化学的検査（肝酵素活性の上昇など）に影響がみられ、病理組織学的変化（胸腺又は肺胞のマクロファージの増加など）が観察され、各種毒性パラメータの変動には大きな差異はなく、また、両者の無毒性量（幼若：雄 0.5 mg/kg/day、雌 0.5 mg/kg/day 未満、成獣：0.5 mg/kg/day 未満 ）にも差はないと考えられた。

経皮投与による発がん性について、先に承認申請したラパリムス錠の添付資料における経口投与によるがん原性試験では、マウスでリンパ腫、肝細胞癌（雄）及び顆粒球性白血病（雌）の増加、ラットで精巣間細胞腺腫の増加が認められた。これらの腫瘍の増加は、自然発生腫瘍として知られた腫瘍がシロリムスの免疫抑制作用により増強されたものと考えられた。シロリムスには、遺伝毒性がないことからも、これらの腫瘍の増加はヒトへの外挿性を有する所見ではないと考えられた。

投与部位である皮膚への長期投与に対する影響を、マウス中期皮膚がん原性試験（皮膚二段階発がんモデル）により検討した。その結果、本剤 0.8%（臨床投与量の 4 倍）までの投与で皮膚の過形成あるいは腫瘍性病変は観察されず、皮膚に対し発がん促進作用を示さないことが確認された。また、サル 39 週間経皮投与毒性試験の経皮投与部位においても異常は認められなかった。このため本剤の投与部位である皮膚局所におけるがん原性の懸念は少ないものと考えられた。

皮膚光感作性については、モルモットの皮膚光感作性試験（Adjuvant and Strip 法）において、本剤の感作及び惹起（＋UVA 照射）により UVA の照射された塗布部位及びその周囲の非塗布部位で紅斑が認められた。アジュバントを使用しない Kochever 法においても同様の紅斑が認められ、また、惹起時に本剤を塗布せず UVA 照射のみでも紅斑が認められた。このように本剤には再接触と UVA によって皮膚炎が惹起されるような皮膚光感作性はないものの、光線過敏を誘発する作用が認められた。本剤のウサギ皮膚刺激性及びモルモットの皮膚感作性はともに陰性で、光毒性試験（3T3 細胞による in vitro 光毒性及びウサギ経口投与後の皮膚の UVA 照射）においても光毒性反応は認められなかった。

感作後に皮膚反応が UVA 照射のみで発現する点では、ヒトにおける慢性光線過敏性皮膚炎（CAD）が類似している。CAD では、光接触性皮膚炎や薬剤性光線過敏症が引き金となり、光抗原が除去されても皮膚の光に対する特性が存続する。こうした光抗原無くして光線過敏が起こる機序は未だ明瞭ではないが、UV が表皮細胞の表面に何らかの物質を誘導し、それを自己反応性 T 細胞が認識して皮膚炎を起こす可能性が考えられている[16)]。本剤の臨床試験において光感作性あるいは光線過敏を強く疑わせる有害事象は報告されていないが＜2.7.4.2.1＞、タクロリムス軟膏など免疫抑制作用を有する薬剤では、UV 曝露の制限などの注意喚起がなされている。

本剤では投与部位である皮膚での曝露量が高くなることも考えられるので、臨床使用に際しては紫外線の曝露を避ける等の対策が必要であることを情報提供する必要がある。

以上の結果をまとめると、本剤は、比較的安全性が高く結節性硬化症に伴う皮膚病変の一種である過誤腫（顔面血管線維腫）に対し、有効性が期待される外用治療薬であると考えられる。

2.4.6 参考文献

1) 金田眞理, 吉田雄一, 久保田由美子 他.　結節性硬化症の診断基準および治療ガイドライン. 日皮会誌. 2008;118:1667-1676
2) Schwartz RA, Fernández G, Kotulska K, Jóźwiak S. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. J Am Acad Dermatol. 2007;57:189-202
3) Chan JY, Wang KH, Fang CL, Chen WY. Fibrous papule of the face, similar to tuberous sclerosis complex-associated angiofibroma, shows activation of the mammalian target of rapamycin pathway: evidence for a novel therapeutic strategy? PLOS ONE. 2014;9(2):e89467
4) Hofbauer GF, Marcollo-Pini A, Corsenca A, et al. The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patiant with tuberous sclerosis. Brit J Dermatol. 2008;159:473-475
5) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC) : a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. Brit J Dermatol. 2011;165:912-916
6) 高橋元次. 化粧品講座 (第 II 講) 基礎化粧品と皮膚 (I). 色材協会誌. 1989;62(7):430-8
7) 小幡誉子. 皮膚の角層構造と製剤開発. ファルマシア. 2013;49(5):405-9
8) Vickers CF. Existence of reservoir in the stratum corneum. Experimental proof. Arch Dermatol 1963;88:20-3
9) [redacted]: Rapamycin three month oral (gavage) toxicity study with one month interim sacrifice - monkey. [redacted] 社内資料. 1991 年
10) Rapamycin: six month oral (gav) toxicity study with recovery - monkey. [redacted] 社内資料. 1993 年
11) 須藤信行. ストレスと腸内フローラ. 腸内細菌学雑誌. 2005;19:25-9
12) Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. Dev Psychobiol. 1999 ;35:146-55.
13) Bailey MT, Lubach GR, Coe CL. Prenatal stress alters bacterial colonization of the gut in infant monkeys.　J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004 ;38:414-21.
14) トーリセル点滴静注液 25 mg (テムシロリムス点滴静注液), 添付文書, 2015 年 6 月改訂 (第 4 版), ファイザー株式会社
15) アフィニトール錠 2.5 mg, 5 mg (エベロリムス錠), 添付文書, 2016 年 8 月改訂 (第 11 版), ノバルティスファーマ株式会社
16) 戸倉新樹. 光アレルギーの発症機序と対策. 日内科会誌. 2007;96:146-52