

学位論文要旨

タクロリムス軟膏の安全な使用を志向した皮膚状態が異なる部位に適用した場合の
全身および皮膚局所移行動態の解析

間 祐太朗

アトピー性皮膚炎（AD）の治療薬であるタクロリムス（TL）軟膏は、皮膚適用後、皮膚局所における作用発現が期待され、副作用の観点からその全身移行は望ましくない。TL軟膏の適用部位となる炎症皮膚では、その皮膚状態は多様に変化している。例えば、角層バリア能の障害や血流量の変化、血管透過性の亢進とそれに伴う血漿成分の漏出などが挙げられる。この多様な変化がTLの全身および局所移行動態に影響を及ぼすことが予想される。しかしながら、皮膚生理状態の変化が、TLの全身および皮膚局所移行性にどのような影響を及ぼすのか詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、炎症を有する皮膚におけるTLの全身および皮膚局所移行性を明らかにし、それに影響を及ぼす因子を解明することを目的とした。

1. タクロリムス全身移行動態に及ぼす種々皮膚生理状態の影響に関するヘアレスラットを用いた検討

TL軟膏皮膚適用後のTLの全身移行性における影響因子を特定するためには、複合事象である炎症反応を素過程に分離して評価する必要がある。本章では、ヘアレスラットを用いて、構造的もしくは生理的に変化した種々皮膚モデルを作成し、経皮水分蒸散量（TEWL）および皮膚血流値（PU）を測定することで、種々皮膚モデルの皮膚状態を定量的に評価した。そして、TL軟膏の *in vivo* 皮膚適用試験により得た全血中TL濃度からTL全身移行性の変化を評価し、TEWLおよびPU値、血中濃度を各モデル間で比較することで、TL全身移行性に影響する因子を考察した。その結果、ヘアレスラット正常皮膚からはTLは全身へ吸収されにくく、角層バリア能の低下に依存してTLの全身移行量が増加した。さらに、角層を完全に除去した皮膚からのTLの全身移行量が、軟膏の塗布面積および軟膏中TL濃度に比例し、皮膚適用後のTLの全身への吸収は基本的な経皮吸収理論に従うことが明らかとなった。角層除去皮膚において、PU値とTL全身移行量の間には正の相関関係があった。起炎剤の皮内投与により浮腫が生じた角層除去皮膚では、起炎剤を投与していない角層除去皮膚に比べてTLの全身移行量が増加し、先に述べた正の相関関係よりも高い値となった。これらのことから、起炎剤投与によるTLの全身移行量の増加は、血管透過性の亢進と血流の増大の両方による影響と考えられる。アドレナリンを皮下投与した皮膚において、皮膚血流量の減少によりTL全身移行量が低下した。そして、TL軟膏にアドレナリンを混合して適用することで、血流量や血管透過性の上昇を抑え、TLの全身移行を抑制できることを明らかにした。TL全身移行量の予測には、TEWLの測定を行い、そのTEWL値に応じた軟膏の希釈は、TLの全身性副作用の回避に有効である。また、AD患者でも、血流量の増加や血管透過性の亢進が生じている患者では、TLの全身移行の増加に注意が必要であり、血管収縮剤の併用によって血流量を低下させることで、TL全身移行の抑制が期待できる。

2. タクロリムスの全身および皮膚局所動態に及ぼす血管外漏出タンパク質の影響に関する検討

炎症の急性反応である血管透過性の亢進により血管から皮膚組織中へ漏出したタンパク質は、タンパ

ク結合性の高い TL と相互作用することで、その全身および皮膚局所移行性に影響を及ぼすことが考えられた。本章では、角層を完全に除去し、起炎剤を皮内投与したヘアレスラットの皮膚において、*in vivo* 皮膚適用試験により、TL の全身移行動態および皮膚局所濃度に対する血管外漏出タンパク質の影響を評価した。第 1 章の結果を踏まえ、TL の全身移行回避を目的に希釈した TL 軟膏を角層除去起炎剤投与皮膚に適用すると、起炎剤を投与していない角層除去皮膚に比べて、軟膏適用直後の全血中 TL 濃度が低い値を示した。それにもかかわらず、角層除去起炎剤投与皮膚において、希釈軟膏適用直後の抽出皮膚中 TL 濃度は高い値を示した。すなわち、皮膚の組織液中に存在する血管外漏出タンパク質と TL が結合することで、皮膚組織中に TL が滞留し、全身への吸収が抑制されたと考えられた。希釈軟膏適用後一定時間経過すると、両皮膚ともに皮膚中 TL 濃度に変化はなく、一方で角層除去皮膚に比べて角層除去起炎剤投与皮膚において、全血中 TL 濃度が高い値となった。そのため、皮膚局所において TL とタンパク質との結合に飽和が生じたと考えられる。

3. アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるタクロリムス全身移行および皮膚中濃度に関する検討

第 1 章および第 2 章に亘り、TL の全身移行および皮膚局所移行に影響を及ぼす要因を調査してきた。本章では、ダニ抗原の塗布により AD 様皮膚病変を呈する AD モデルマウスを用いて、軟膏適用後の全血および皮膚中 TL 濃度を測定することで、AD 患者で起こり得る全身移行動態や皮膚局所移行動態特性を考察した。さらに、全身移行の制御もしくは回避を目指した軟膏の希釈や血管収縮剤の併用の効果の検証を行い、その時の動態特性を解析した。*In vivo* 皮膚適用試験に供したダニ抗原誘発 AD モデルマウスは、角層バリア能が低下している一方で、血流は正常値であり、さらに、耳介厚が上昇していたことから継続して浮腫が生じているモデルであった。0.1%TL 軟膏を適用した場合、TL 全身移行量は角層バリア能と良い相関性を示し、第 1 章で示した軟膏の希釈が有効と判断された。そこで、角層バリア能に応じた軟膏の希釈を行った結果、血中濃度の実測値は予測値よりも低い値であったが、軟膏の希釈が全身移行の抑制に有効であることが示された。血管収縮剤を併用した場合、全血中 TL 濃度は、角層バリア能が低下したマウスにおいては、低い値を示す傾向にあった。また、希釈軟膏とともに血管収縮剤を併用すると、血中濃度の低下が認められた。皮膚中濃度と血中濃度の関係性を評価すると、ある皮膚中濃度以上で血中濃度が急激に上昇し、両者の関係は 2 相性を示した。すなわち、皮膚組織や、炎症部に漏出した血漿成分と TL との間の結合が飽和することが示唆された。また、希釈軟膏にアドレナリンを併用した場合、より低い血中濃度/皮膚中濃度比となったことから、より有効で安全な治療を考慮する上で有効な方法であると考えられた。

TL 経皮適用後の全身移行および皮膚局所動態が、皮膚の状態により様々に変化することを明らかにした。特に、角層バリア能の変化により TL の全身移行性が強く依存することから、経皮水分蒸散量の測定による皮膚病変部におけるバリア能の評価が有用となる。患者個々のバリア能に合わせて、軟膏の希釈を行うことで、TL 全身移行の回避が可能となる。また、通常 TL 軟膏が使用されない、重度に皮膚バリアが破綻した皮膚においても、血管収縮剤を併用することで、TL の全身移行を回避でき、TL 軟膏の適用が期待出来る。経皮水分蒸散量の測定は医療従事者が容易に実施できることから、その皮膚バリア能に応じて、薬剤師が軟膏の希釈や血管収縮剤の併用といった薬学的管理のもと、より安全な薬物療法を提供できると考える。

Thesis abstract

Study on systemic absorption and skin disposition of tacrolimus after application of tacrolimus ointment on skins with various physiological conditions for development of the safe use

Yutaro Hazama

Tacrolimus (TL), an immunosuppressive drug being used topically for atopic dermatitis (AD) as an ointment, is expected to exhibit local effects and not to be absorbed systemically from the viewpoint of systemic side effects. Inflamed skin in AD patients has various physiological skin conditions, e.g. disruption of stratum corneum (SC), changes in skin blood flow, vascular hyperpermeability and leakage of plasma components. These alterations could affect the systemic absorption and skin disposition of TL. The aim of this study was to investigate on the properties of systemic absorption and skin disposition of TL administered topically through physiologically altered skin, and on the factors that influence these absorption properties.

1. Effects of various physiological skin conditions on systemic absorption of TL through hairless rat skin

Evaluation of pharmacokinetic properties is difficult due to the concurrent inflammatory reactions in AD skin. In order to investigate the drug disposition after topical application on AD skin, it is necessary to understand different influential factors and their individual effects. Thus, I created various physiological dorsal skin conditions: skin barrier disruption with repeated adhesive tape stripping, acute inflammatory reaction induced by intradermal injections of a proinflammatory material solution (PMS), and a hypovascular state induced by subcutaneous infusion of a vasoconstrictor, adrenaline (Adr), in order to separate the complex inflammatory reactions into fundamental processes and evaluate the relationships between systemic absorption of TL and each process. The physiologically altered model skins were used for *in vivo* absorption studies, and conditions were simultaneously evaluated by measuring transepidermal water loss (TEWL) as skin barrier and perfusion unit (PU) as skin blood flow. Very little TL absorption was observed through intact skin. Greater TL absorption was noted in skins with high TEWL values and fully stripped skin with PMS injections. In contrast, Adr infusion, which reduced skin blood flow, resulted in decreased TL absorption through fully stripped skin. Combined use of TL and Adr on skin with PMS injections resulted in suppression of TL absorption. Systemic absorption of TL can be estimated by measuring TEWL and the dilution of the TL ointment according to patient TEWL value is an option in order to decrease the systemic absorption of TL with respect to mitigating systemic side effects. For AD patients with acute exacerbation of severely SC-disrupted skin, exhibiting redness or warmth, the combination use of vasoconstrictor could be beneficial in preventing excessive vascular uptake of TL.

2. Effects of plasma protein leakage into skin tissue on systemic absorption and skin disposition

of TL

Plasma protein leaking into skin tissue from skin capillaries could affect the systemic absorption and skin disposition of TL due to the interaction between the proteins and TL penetrating through skin. In order to investigate the effects of the protein leakage on the TL absorption and TL skin concentration, *in vivo* absorption study was conducted using fully stripped skin with PMS injections. Based on the result of the chapter 1, when the TL ointment with dilution for avoiding the TL systemic absorption was applied, the TL blood concentration 15 min after application on the fully stripped skin with PMS injections was lower than that on the fully stripped skin without PMS injections. In contrast, the TL concentration in the PMS-injected skin was higher than that in the non-injected skin. These results suggested that the skin retention of TL binding with the proteins in skin tissue suppressed the TL systemic absorption. The TL skin concentrations 90 min after application showed no difference between the PMS-injected skin and the non-injected skin. The TL whole blood concentration 90 min after application on the PMS-injected skin was higher than that on the non-injected skin. These results suggested that the protein binding with TL in the skin tissue was saturated.

3. Systemic absorption and skin disposition of TL in AD model mice

The properties of systemic absorption and skin disposition were investigated using AD mice induced by repeatedly administrating ointment including *Dermatophagoides farinae* extract (Dfe). Furthermore, TL ointment was diluted or combined with ADR to avoid the systemic absorption of TL and investigated the effects of the application methods of TL ointment on the TL migration. The AD skin for *in vivo* absorption study exhibited SC disruption, normal skin blood perfusion and ear swelling. In the case of 0.1% TL ointment, the TL absorption showed good correlation with TEWL values. With the ointment diluted according to TEWL values, the TL whole blood concentration was lower than the value calculated by the relationship between TL absorption and TEWL. These results suggested that the ointment dilution could be effective to avoid the TL absorption. The combined use of TL and ADR resulted in suppression of TL absorption in the skin with high TEWL. Diluting ointment and combining with ADR simultaneously, the TL whole blood concentration reduced. Evaluating the relationship between the TL skin concentration and TL whole blood concentration, they showed the diphasic relationship and the TL whole blood concentration increased rapidly over a specific skin concentration. These results suggested that the TL binding with skin components and/or leaking plasma proteins was saturated. In addition, the diluted ointment with combined use with ADR resulted in a lower blood-skin concentration ratio, suggesting that dilution of ointment and combined use with ADR were useful in AD therapy using TL ointment.

The findings in this study support the recommendation that the assessment of the physiological conditions in lesional skin is important to provide an improved understanding of systemic absorption and skin disposition of TL in AD skin. Medical staffs can measure TEWL in AD patients with ease. Therefore, pharmacists could provide an effective drug treatment with dilution of ointment and/or combined use with ADR according to the skin barrier function.

論文審査の結果の要旨

アトピー性皮膚炎 (AD) の治療薬のひとつとして、タクロリムス (TL) を含有する軟膏剤が上市され臨床的に使用されている。TL の分子量は約 822 であり、正常な皮膚を介した生体内への浸透は極めて低いが、AD 患者の皮膚バリア能は一般に低下しており、皮膚透過量が増大し、皮膚真皮層に存在する毛細血管から全身循環系へ移行することによる副作用発現の懸念がある。AD 患者の皮膚に適用した薬物の全身移行は、角層バリア能だけでなく、皮膚血流量の変化、血管透過性亢進およびそれに伴い血管外に漏出した血漿タンパク質への結合など複合的な事象に影響を受けると考えられ、それらの要因を考慮した TL 軟膏製剤の臨床適用を提案することが重要である。

本論文は3章からなり、AD 患者の皮膚で観察される炎症に伴う皮膚生理状態の変化、すなわち角層バリア能、皮膚血流量、血管透過性、および血漿タンパク質の血管外漏出の変化という観点を踏まえ、TL の皮内動態および全身移行動態を評価することを目的としている。第1章では、ヘアレスラットの皮膚生理状態を実験的に変化させたモデル動物を用い、その変化と TL 全身移行動態の関係を評価している。第2章では、ヘアレスラットの皮膚に炎症を惹起した皮膚炎症モデルを用いて TL の皮内および全身移行動態を評価し、それら動態に対する血管からの漏出血漿タンパク質の影響を評価している。これらの基礎的情報を踏まえ、第3章ではアトピー様皮膚病変を呈する AD モデルマウスに TL 軟膏を適用した後の血中および皮膚中 TL 量を測定し、AD 患者で起こり得る皮内および全身移行動態の変化について考察し、TL 軟膏皮膚適用後の TL の全身移行を回避する方策について提案している。

第1章では、AD 患者の皮膚で生じると考えられる様々な皮膚生理状態の変化を素過程に分離し、TL の全身移行に対する影響を評価した。まず、角層バリア能の影響を評価するために、種々の回数でのテープストリッピング処理により角層バリア能を低下させた皮膚に TL 軟膏を塗布し、経皮水分蒸散量 (TEWL) を角層バリア能の指標として、全身への TL 移行性について評価したところ、角層バリア能の低下に依存して TL の全身移行量が増大することが明らかとなった。ストリッピングにより角層を除去後に起炎剤を投与して浮腫を惹起した皮膚、さらに血管収縮剤であるアドレナリンを投与した皮膚に対して TL 軟膏を適用し、TL の全身移行に対する血流の影響について検討した。テープストリッピングによる角層除去によっても皮膚血流の増大が誘導され、それに伴い TL の全身移行の増大が認められるが、起炎剤により浮腫を惹起した皮膚では、血流の増大から見積もられるよりも明らかに高い全身移行が認められるという結果が得られ、このような状況では、TL の全身移行増大に血管透過性の亢進が関与していることを考察している。本章の結果から、AD 患者の TEWL や皮膚血流の測定および皮膚炎症の有無を指標として、TL 軟膏の適切な希釈や血管収縮剤を併用することにより、TL の全身移行を最小限に抑えることが可能になることが示された。

第2章では、浮腫が起きている状態の皮膚における TL の皮内および全身移行動態に対する血管外漏出タンパク質の影響について評価した。角層バリア能が障害されたモデルとして角層除去皮膚を用い、浮腫を惹起した皮膚と惹起していない皮膚において希釈した TL 軟膏適用後の TL の全身移行を評価したところ、浮腫が惹起された皮膚において TL の全身移行の遅延が観察された。この時の皮膚中 TL 濃度は、浮腫を惹起した皮膚において有意に高かったことから、タンパク結合率の高い薬物であることが知られている TL が、浮腫に伴って血管外に漏出した血漿タンパク質に結合し、皮膚中に滞留したことが示唆される結果を得た。

第3章では、ダニ抗原の反復塗布により作成した AD モデルマウスを用い、AD 患者で起こりうる皮内および全身移行動態の特性を評価した。作成した AD モデルマウスは、血流は正常皮膚と変わらないが、角層バリア能の低下と浮腫が生じているモデルである。さらに AD モデルマウスにおいて、皮膚局所に適用した TL の全身移行の制御あるいは回避のための TL 軟膏の希釈と血管収縮剤の併用効果の検証を試みた。TEWL 測定値に基づいて軟膏の希釈を行い皮膚に適用したところ、軟膏の希釈が TL の全身移行の抑制に有効であることが検証できた。AD モデルマウスにおいて、TL 軟膏適用後の皮膚中 TL 濃度と全身移行の関係を解析したところ、その関係に 2 相性が認められた。すなわち、皮膚中 TL 濃度が低い場合には全身移行が低い、ある皮膚中濃度を超えると急激に TL の全身移行が増大することが明らかとなった。そのような挙動を示す要因の一つとして、浮腫を生じている皮膚中に漏出した血漿タンパク質への結合の飽和現象が関与していることが推測された。加えて、希釈した軟膏に血管収縮剤としてアドレナリンを併用すると、TL の全身移行がより抑えられる傾向が認められたことから、AD 患者の皮膚の状態を把握しながら TL 軟膏の希釈と血管収縮剤の併用を考慮することは、有効で安全な AD 治療を行っていくうえで有用な方法になることが明らかとなった。

以上、本論文の結果から、皮膚に適用した TL 軟膏からの TL の皮内および全身移行動態は、角層バリア能、皮膚血流、および浮腫の有無により影響を受けることが明らかとなった。このような皮膚の状態を客観的に評価し、TL 製剤の薬学的管理に活かしていくためには、今後のさらなる研究の発展に期待するものであるが、本論文は様々な皮膚の状態で起こり得る TL の皮内および全身移行動態の変化を科学的に検証しており、それを実際の薬物治療に応用することを目指している点で学術的意義が高いだけでなく、新規性を有している内容であると判断できる。よって本論文は、本研究科課程による博士（薬学）論文に十分値するものと判定した。