

タクロリムス皮内濃度測定法の確立と経皮吸収基剤検討への応用

石井澄雄^{†1}, 荒木博陽^{*†1}, 三宅 悟^{†1}, 二神幸次郎^{†1},
古野勝志^{†2}, 黒崎勇二^{†3}, 川崎博己^{†3}, 五味田 裕^{†1}

岡山大学医学部附属病院薬剤部^{†1}

岡山大学歯学部附属病院薬剤部^{†2}

岡山大学大学院自然科学研究科^{†3}

Establishment of the Measuring Tacrolimus Concentration in the Skin, and Application to Study on the Vehicle for Percutaneous Absorption

Sumio Ishii^{†1}, Hiroaki Araki^{*†1}, Satoru Miyake^{†1}, Koujiro Futagami^{†1}, Katushi Furuno^{†2},

Yuji Kurosaki^{†3}, Hiromu Kawasaki^{†3} and Yutaka Gomita^{†1}

Department of Hospital Pharmacy, Okayama University Medical School^{†1}

Department of Hospital Pharmacy, Okayama University Dental School^{†2}

Department of Clinical Pharmaceutical Science, Graduate School of Natural
Science and Technology, Okayama University^{†3}

[Received April 10, 2000
Accepted December 16, 2000]

Tacrolimus (FK506) ointment has a good therapeutic effect on atopic dermatitis. The efficacy of Tacrolimus ointment, however, depends on the percutaneous adsorption of tacrolimus. To examine the influence of the ointment base on the percutaneous adsorption of tacrolimus, we performed a quantitative analysis of tacrolimus in the skin using an IMX (microparticle enzyme immunoassay) system. We prepared tacrolimus ointments using five kinds of ointment bases, i.e., Carbopol gel, White Petrolatum, Hydrophilic Ointment, Plastibase and Macrogol ointment. The concentration of tacrolimus in the rat abdominal skin were then determined 14 hours after the topical application of the different ointments to the rat skin by using the IMX system, and the effect of the various ointment bases was thus evaluated. As a result, the amount of tacrolimus in the skin measured 14 hours after topical application was as follows: Carbopol gel > White Petrolatum > Hydrophilic Ointment ≅ Plastibase > Macrogol ointment.

Keywords — percutaneous absorption, tacrolimus ointment, rat skin, carbopol gel, IMX

緒 言

タクロリムス (FK506) は1984年に発見された放線菌が産生するマクロライド系免疫抑制剤である。タクロリ

ムス軟膏は、アトピー性皮膚炎と乾癬に優れた臨床効果があることがすでに確かめられている¹⁾。局所から経皮的に吸収されたタクロリムスの血中濃度は1 ng/mL以下であり、懸念される全身作用に及ぼす影響はほとんど

^{†1,2} 岡山市鹿田町2-5-1 ; 2-5-1, Shikata-cho, Okayama-shi, 700-8558 Japan

^{†3} 岡山市津島中1-1-1 ; 1-1-1, Tsushima-naka, Okayama-shi, 700-8530 Japan

ない。また、その後のリバウンドは少なく、寛解期間が比較的長く、さらにステロイド外用剤でみられる皮膚萎縮作用がないなど種々の優れた特徴が報告されている²⁾。そのため、特にステロイド剤を投与した場合に副作用の出現しやすい顔面や頸部の皮疹への適用が期待されている。

タクロリムスの血液中および尿中濃度の測定には、HPLC-MS法、EIA (enzyme immunoassay) 法、放射能カウント法、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 法などが用いられている^{3,4)}。しかしながら、これらの測定方法については、迅速性、簡便性の点で問題があり、測定時間の短縮化が求められている。こうした点を改善した血中濃度測定法に、MEIA (microparticle enzyme immunoassay) の原理に基づいたIMXアナライザーを用いたIMX法がある。この方法におけるタクロリムスの血中濃度測定の信頼性は、1.5ng/mLから30.0ng/mLの間ですでに確立されている。しかし、IMX法を用いての皮内濃度を測定した報告は見当たらない。そこで今回、迅速かつ簡便であるIMX法を用いてタクロリムスの皮内濃度の測定法を確立したので報告する。

ところで一方、軟膏剤による経皮吸収特性は、基剤により異なることが知られている⁵⁾。河村らは、タクロリムス軟膏塗布時のラットにおける経皮吸収特性について検討しており、軟膏中の主薬濃度 (0.03, 0.1, 0.5w/w%) に依存して全血中タクロリムス濃度が上昇したことを報告している⁶⁾。タクロリムス軟膏の効力は経皮からの吸収性によるところが大きいと考えられるが、タクロリムスの皮内移行動態に及ぼす軟膏基剤の影響に関する試験は少ない。そこで今回、タクロリムスの皮内移行動態に及ぼす軟膏基剤の影響を検討するため、白色ワセリンを含め5種類の軟膏基剤を用いてタクロリムス含有軟膏を調製した。そして、今回確立したIMXアナライザーによる皮内濃度測定法 (IMX法) を用いて、ラット皮膚に塗布した後のタクロリムス皮内量を各軟膏基剤ごとにそれぞれ測定した。

実験材料および実験方法

1. 実験試料

1) 試料

実験に使用した試料は以下の通りである。タクロリムス標品 (藤沢薬品工業 (株))、タクロリムス注射液 (プログラフ®注射液, 藤沢薬品工業 (株))、白色ワセリン (日局, 油脂性基剤, 丸石製薬 (株))、親水軟膏 (日局, 水中油型乳剤性基剤, 丸石製薬 (株))、プラスチックベース (日局, 油脂性基剤, 大正製薬 (株))、マクロゴール (日局, 水溶性基剤, 大日本製薬 (株))、カーボポール934NP (水

溶性ゲル基剤, BF Goodrich 社)、ヒドロキシプロピルセルロース、チオグリコール酸カルシウム三水和物 (以上, 和光純薬 (株))。

2) 実験動物

7~8週令のWistar系雄性ラット (チャールス・リバー) を使用した。

2. 実験方法

1) *In vivo* 経皮吸収試験

1-1 軟膏剤の調製

5種の軟膏基剤 (白色ワセリン, 親水軟膏, プラスチックベース, マクロゴール, カーボポールゲル) を用いて経皮吸収性について検討した。これら各軟膏基剤5gにタクロリムス注射液 (5mg/mL) 1mLを加え、軟膏板で均一になるまで十分に練合し、タクロリムスを0.83mg/g含有する各軟膏試料を調製した。なお、今回使用したカーボポールゲル基剤はカーボポール934NP 0.08gを水2.45gとイソプロパノール2.45gの混液中に分散溶解させ、水溶性有機アミンであるトリスヒドロキシアミノメタン0.02gで中和させた高粘度な透明ゲルである。

1-2 タクロリムスの皮内量測定方法の確立

1-2-1 血中濃度測定法による検討

サンプルとして全血液の代わりに皮膚から抽出されたタクロリムスのメタノール溶液を用い、IMXアナライザー (ダイナパック社) を用いた方法でタクロリムスの皮内量の測定を血中濃度測定と同様な方法で試みた。すなわち、皮内から抽出されたタクロリムスのメタノール溶液を血中濃度測定と同様に、「サンプル (メタノール溶液) と除タンパク剤」を混合し、9500g (12000rpm) で4分間遠心分離後、上清をリアクションセルに移した後、IMXアナライザー機器にセットし、皮内中のタクロリムス濃度の測定を行った (図1)。

1-2-2 モード1キャリブレーター (0ng/mL, 薬物無添加全血液) 添加による検討

サンプルにモード1キャリブレーター (0ng/mL, 薬物無添加全血液) を加える方法、すなわち「モード1キャリブレーター, サンプル (メタノール溶液) および除タンパク剤」を混合し、(1-2-1) と同様に後処理を行いIMXアナライザーを用いた方法 (IMX法) で皮内濃度測定を行った。使用したモード1キャリブレーターとは、0ng/mLの薬物無添加全血液であり、IMXアナライザーによる血中濃度測定時にブランクとして用いられる (図1)。

1-3 *In vivo* 経皮吸収試験

ラットを麻酔し、腹部をはさみおよび除毛ゲルにて除毛した。2日後、ラット腹部にO-リング (有効面積

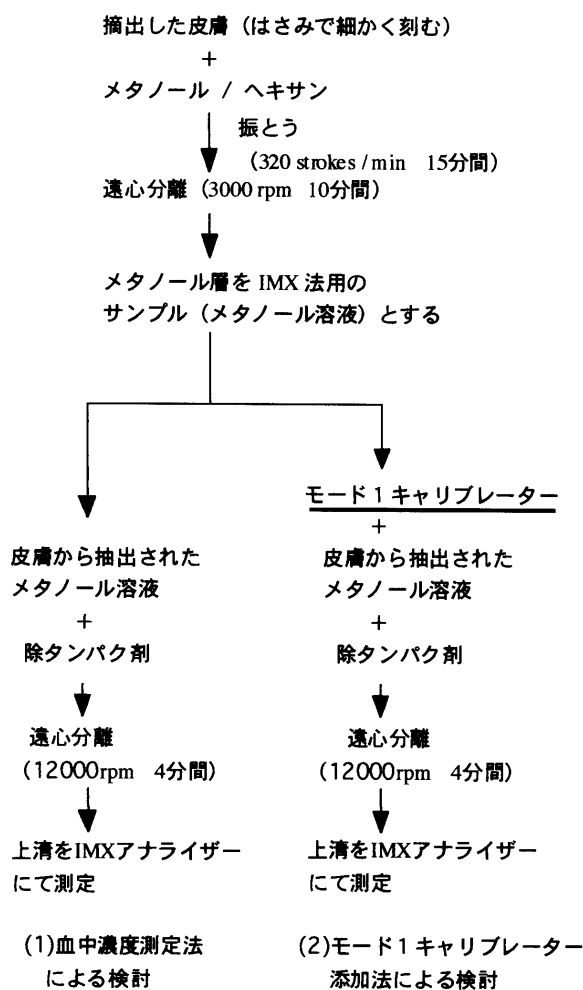


図1. 摘出皮膚からのタクロリムスの抽出方法およびIMX測定前処理

0.95cm²) をアロンアルファ®にて接着し、その部位に0.83mg/g 含有タクロリムス軟膏0.13g を塗布した。軟膏塗布14時間後にラットを放血致死させ、スパーテルで軟膏をかきとった後、50%メタノールを浸した脱脂綿にて塗布部位に残存した軟膏を除去した。O-リングの内周に沿って皮膚を摘出し、皮下脂肪を除去した後、セロテープで角質層のテープストリッピングを20回行った。得られた皮膚試料を、はさみで細かく刻んだ後、4 mL メタノール、4 mL ヘキサンを加え、320strokes/min で15分間振とう後、3000rpm で10分間遠心分離した。メタノール層を40℃で減圧濃縮し、適量のメタノールを加えた後、(1-2) で確立したIMX アナライザーを用いたタクロリムス皮内量測定方法(IMX法)にて定量した(図1)。

1-4 検量線

既知量のタクロリムスを添加した皮膚試料から同様な方法でタクロリムスを抽出し、IMX アナライザー機器

にて測定した。血液試料にはIMX タクロリムスII キャリブレーター (0, 3, 6, 12, 20, 30ng/mL) を用いた。

2) 統計処理方法

得られた結果の各群間の統計的有意差の検定はTukeyの多重比較検定法を用いて行った。危険率5%未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. 血中濃度測定法による検討

皮内から抽出されたタクロリムスのメタノール溶液をIMX法により血中濃度測定と同様な方法で測定を試みたが、測定不可能であった。

2. モード1 キャリブレーター (0 ng/mL, 薬物無添加全血液) 添加による検討

サンプルにモード1 キャリブレーターを加える方法、すなわち「モード1 キャリブレーター、サンプル (メタノール溶液) および除タンパク剤」を混合し、1.と同様に後処理を行った。

1) 検量線および血中濃度と皮内濃度の定量精度の比較

既知濃度のタクロリムスを含む血液試料と皮膚試料から調製した検量線用抽出試料のIMX 蛍光強度の変化をタクロリムス濃度の対数値に対しプロットしたものを比較したところ、図2に示す通り両者とも同様の良好な直線性を示した。このことから、皮膚からのタクロリムス抽出率はほぼ100%であると考えられる。皮内濃度測定における蛍光強度の変化の変動係数は5%以下であった。なお、本報で用いた試料調製法においてIMXによるタクロリムスの定量範囲は1.5~30.0ng/mLであった。

2) タクロリムスの経皮吸収に及ぼす基剤の影響

各種軟膏をラット腹部に塗布し、14時間後の表皮および真皮中の薬物量を図3に示した。なお、この軟膏基剤の影響は、同一薬物濃度のタクロリムス軟膏を塗布し比較した場合の結果である。皮内中のタクロリムス量はカーボボールゲルを適用した際に最も多く、次いで白色ワセリンであった。プラスチックベースと親水軟膏はほぼ同量な値を示した。最も少なかったのはマクロゴールであり、マクロゴールとカーボボールゲルおよび白色ワセリンの間で有意差 ($p<0.01$, $p<0.05$) が認められた。

考 察

IMX は、EIA の競合法に基づいた固定法 (マイクロパーティクル) を利用して検体 (血液) 中のタクロリムスを測定する方法である⁷⁾。IMX を用いての血中濃度の

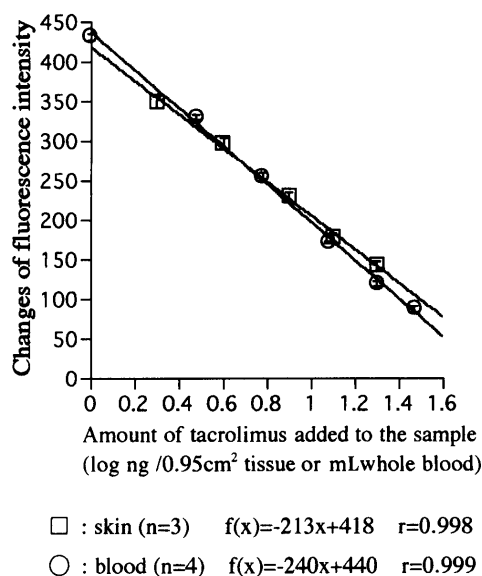


図2. ラット皮膚からとヒト全血液から抽出された
タクロリムスの検量線の比較

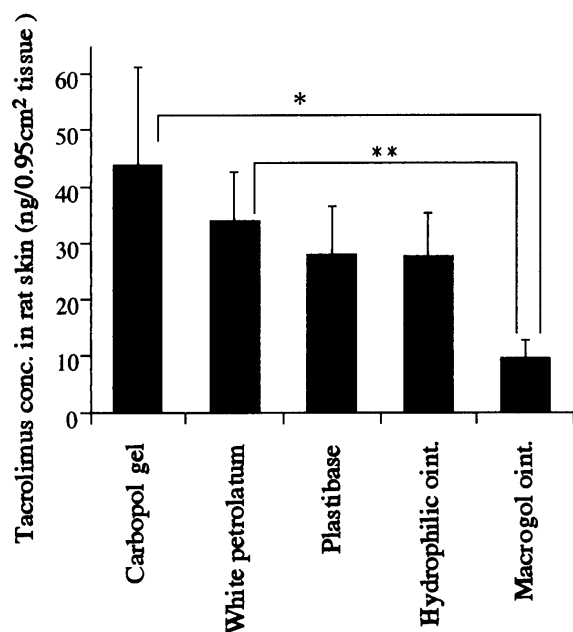


図3. 異なる軟膏を塗布した後のラット皮膚中の
タクロリムス濃度 (n=4)
(*; $p < 0.01$, **; $p < 0.05$)

測定はほぼ確立されているものの、血液以外の組織中の測定法についてはまだ確立されていない。今回われわれはタクロリムスの皮膚内含量の測定について検討した。タクロリムスの血中濃度測定は、全血液に除タンパク剤を加えて混和、後処理後測定する。タクロリムスの皮膚濃度の測定についても、まず血中濃度の測定と同様な方

法で試みた。すなわちサンプルに全血液の代わりに皮膚から抽出したタクロリムスのメタノール液を用い「サンプル(メタノール溶液)と除タンパク剤」を混合した後処理を行う方法で測定を試みたが、測定不可であった。そこで、サンプルにモード1キャリブレーター(薬物無添加全血液)を加える方法により測定を行ったところ、タクロリムスの皮内濃度の測定が可能となった。皮内濃度測定における蛍光強度の変化の変動係数が5%以下で、かつ皮内濃度および血中濃度が同様の良好な直線性を示したことより、タクロリムスの皮内濃度測定法についてはモード1キャリブレーターを加えることにより血中濃度測定法と同程度の精度で定量することが可能であることが明らかとなった。皮内濃度測定について、モード1キャリブレーターを加えず、血中濃度測定法と同様な方法では測定ができなかった理由としては、使用するサンプルの中に血液が含有されていなかったためではないかと推測される。IMXアナライザーは、タクロリムス血中濃度測定のためだけに開発された機器であり、サンプルには血液のみを使用することになっている。そのため、今回のようにサンプルに血液を含有していないメタノール溶液だけのものについては測定ができず、全血液のモード1キャリブレーターを加えることで、測定が可能になったものと考えられる。

今回の検討では、基剤として臨床でよく用いられる白色ワセリン、プラスチックベース、親水軟膏、マクロゴール、およびカーボポールゲルを使用してタクロリムス軟膏を調製し、タクロリムスの経皮吸収に及ぼす影響を検討した。カーボポールはアクリル酸架橋重合体(カルボキシビニルポリマー)である。これをゲル化したカーボポールゲルは、カーボポールを水とイソプロパノールの混液中に分散溶解させ、水溶性有機アミンで中和させた高粘度な透明ゲルである。本剤の特色は、温度による粘性変化がほとんどなく、べとつかず延びがよいことである。現在、カーボポールゲルが基剤に使用されている軟膏の1つにインテバン®クリームがある。鳥らはこのインドメタシンのカーボポールゲル基剤からの経皮吸収機構について、カーボポールゲル基剤中の溶媒の蒸発によりインドメタシンが基剤中で濃縮されて、基剤からの薬物放出性を高めると報告し⁸⁾、インドメタシンの皮膚内移行率は、カーボポールゲル>吸水軟膏>親水軟膏>白色ワセリン>プラスチックベース>マクロゴールの順で、カーボポールゲル基剤は他の軟膏基剤に比べ吸収性の点で優れているとしている。また、Coldmanらは揮発性溶媒と不揮発性溶媒からなる混合基剤を用いた薬物の経皮吸収促進機構について検討し、揮発性溶媒の蒸発に伴い薬物が飽和溶解度以上の濃度で基剤中に溶解することに

より、経皮吸収が促進されることを報告している⁹⁾。さらに、アルコール自身にも経皮吸収促進作用が知られており、例えばエタノールはエストラジオールやフェンタニル等の経皮治療システムに用いられている。エタノールの吸収促進機構としては、角質層中の脂質の流動性亢進¹⁰⁾や、脱脂作用¹¹⁾、蛋白質構造の変化¹²⁾、エタノール自身の皮膚透過に伴う共輸送¹³⁾等があげられる。今回の実験で、軟膏を塗布し14時間後のタクロリムスの皮内量は基剤にカーボポールゲルを適用したときが最も多かった。しかし、14時間目の皮内濃度からだけでは、カーボポールゲルからのタクロリムスの皮内吸収動態を判断したり、また製剤間で比較することはできない。そのため、今後カーボポールゲルなどの基剤を使用した時の、経時的なタクロリムスの皮内濃度および血中濃度を測定し、それら製剤間における皮内吸収動態および全身作用についてさらに詳細な検討をする必要性があると思われる。

引用文献

- 1) 川島真, 檜垣祐子, タクロリムス軟膏剤の皮膚刺激性及びアトピー性皮膚炎における治療効果について, アレルギー, **42**, 1474(1993).
- 2) 中川秀己, 移植免疫抑制剤によるアトピー性皮膚炎の治療, 薬局, **47**, 1137-1141(1996).
- 3) A. K. Gonschior, U. Christians, M. Winkler, H. M. Schiebel, A. Linck, and K. Fr. Sewing, Simplified high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for measurement of tacrolimus and its metabolites and cross-validation with microparticle enzyme immunoassay, *Therapeutic Drug Monitoring*, **17**, 504-510(1995).
- 4) K. Iwasaki, H. Matsuda, T. Shiraga, A. Kawamura, Y. Miyazaki, Y. Teramura, Z. Tozuka, and T. Hata, Comparison of tacrolimus (FK506) levels determined by three different methods in the rat blood, 薬物動態, **10**, 837-847(1995).
- 5) T. Murakami, M. Yoshioka, I. Okamoto, R. Yumoto, Y. Higashi, K. Okahara, and N. Yata, Effect of ointment bases on topical and transdermal delivery of salicylic acid in rats: evaluation by skin microdialysis, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 55-61(1998).
- 6) 河村章生, 寺村善則, 白神歳文, 宮崎由香子, 岩崎一秀, 戸塚善三郎, 秦武久, FK506軟膏塗布時の動物における経皮吸収特性, 薬物動態, **11**, suppl., S267(1996).
- 7) 佐藤友啓, 結城祥充, 唯野貢司, 高橋保志, 竹内一郎, 平野哲夫, MEIA改良法によるタクロリムス全血中濃度測定の評価, 医学と薬学, **36**, 1403-1407(1996).
- 8) K. Shima, C. Matsusaka, M. Hirose, T. Noguchi, and Y. Yamahira, Biopharmaceutical characteristics of indomethacin gel ointment, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2338-2344(1981).
- 9) M. F. Coldman, B. J. Poulsen, and T. Higuchi, Enhancement of percutaneous absorption by the use of volatile: nonvolatile systems as vehicles, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 1098-1102(1969).
- 10) K. Knutson, S. L. Krill, and J. Zhang, Solvent-mediated alterations of the stratum corneum, *J. Controlled Release*, **11**, 93-103(1990).
- 11) T. Kurihara-Bergstrom, K. Knutson, L. J. DeNoble, and C. Y. Goates, Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin, *Pharm. Res.*, **7**, 762-766(1990).
- 12) B. Berner, R. Juang, and G. C. Mazzenga, Ethanol and water sorption into stratum corneum and model systems, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 472-476(1989).
- 13) P. Liu, T. Kurihara-Bergstrom, and W. R. Good, Co-transport of estradiol and ethanol through human skin *in vitro*: understanding the permeant/enhancer flux relationship, *Pharm. Res.*, **8**, 938-944(1991).