オファコルカプセル 50 mg
に関する資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.4　薬物動態試験の概要文

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、株式会社レクメドに帰属するものであります。当該情報を適正使用以外の営利目的に本資料を利用することはできません。

株式会社レクメド

目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文 7
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 10
2.6.4.3 吸収 11
2.6.4.3.1 吸収（吸収の程度と速度、in vivo 及び in situ 試験） 11
2.6.4.3.1.1 マウス及びラット 11
2.6.4.3.1.1.1 (Hulzebos, et al., 2001): “Measurement of parameters of cholic acid kinetics in plasma using a microscale stable isotope dilution technique: application to rodents and humans” 11
2.6.4.3.1.2 モルモット 12
2.6.4.3.1.2.1 (Weiner & Lack, 1962): “Absorption of bile salts from the small intestine in vivo” 12
2.6.4.3.2 薬物動態パラメータ、生物学的同等性及びバイオアベイラビリティ（血清、血漿及び全血） 13
2.6.4.4 分布 14
2.6.4.4.1 組織分布試験 14
2.6.4.4.2 胎盤通過試験 14
2.6.4.4.2.1 ラット 14
2.6.4.4.2.1.1 (Hassan & Subbiah, 1980): “Bile acids in the foetal rat: effect of maternal bile duct ligation” 14
2.6.4.4.2.2 サル 15
2.6.4.4.2.2.1 (Little, et al., 1975): “Bile-salt metabolism in the primate foetus” 15
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較） 18
2.6.4.6 排泄 19
2.6.4.6.1 排泄の経路及び程度 19
2.6.4.6.1.1 ラット 19
2.6.4.6.1.1.1 (Lindstedt & Norman, 1955): “On the excretion of bile acid derivatives in feces of rats fed cholic acid-24-14C and chenodeoxycholic acid-24 ^{14}C” 19
2.6.4.6.2 乳汁排泄 20
2.6.4.7 薬物動態学的相互作用 21
2.6.4.7.1 In vitro 21
2.6.4.7.1.1.1 (Ostrower, et al., 1974): “Effect of phenobarbital on intestinal cholic acid absorption in the rat” 21
2.6.4.7.1.1.2 (Redinger & Small, 1973): The effect of Phenobarbital upon bile salt synthesis and pool size, biliary lipid secretion, and bile composition 22
2.6.4.7.1.1.3 (Ryu , et al., 2021): “Evaluation for Potential Drug-Drug Interaction of MT921 Using In Vitro Studies and Physiologically-Based Pharmacokinetic Models” 25
2.6.4.7.2 In vivo 26

2.6.4.7.2.1 ラット 26
2.6.4.7.2.1.1 (Cronholm, et al., 1974): “Changes in vivo metabolism of bile acids in rat after treatment with phenobarbital” 26
2.6.4.7.2.1.2 (Azer & Stacey, 1994): “Differential Effects of Cyclosporin A on Transport of Bile Acids by Rat Hepatocytes: Relationship to Individual Serum Bile Acid Levels.” 27
2.6.4.7.3 In vitro 30
2.6.4.7.3.1 ラット 30
2.6.4.7.3.1.1 (Barth, et al., 2006): “Influence of Verapamil and Cyclosporin A on bile acid metabolism and transport in rat liver slices.” 30
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 33
2.6.4.9 考察及び結論 34
2.6.4.10 図表 37
2.6.4.11 参照文献 38

図表目次

図 2.6.4-1: モルモット胆汁瘻の小腸部に導入した胆汁酸塩の胆汁中の回収率 13
図 2.6.4-2: 注入した胆汁酸塩の血漿消失 15
図 2.6.4-3: 胆汁酸の胎盤通過 16
図 2.6.4-4: 注入した[^{14}C]コール酸塩の回収 17
図 2.6.4-5 コール酸-24-^{14}C の腹腔内投与後に糞中に排泄された同位体 19
図 2.6.4-6: 対照(-)及びフェノバルビタール投与(P)(- -)動物における活性コール酸の回腸吸収 ... 21
図 2.6.4-7: 対照動物及びフェノバルビタール投与動物における回腸の V_{max} ± 1 SE 22
図 2.6.4-8: 胆汁酸塩合成と肝臓に戻った胆汁酸塩との関係 23
図 2.6.4-9: 胆汁瘻のある動物(a)及び腸肝循環が健全な動物(b)の胆汁流量及び胆汁脂質の分泌に及ぼすフェノバルビタールの作用 24
図 2.6.4-10: DMSO 又は様々な濃度のシクロスポリン A で in vitro 処理した単離ラット肝細胞による基質蓄積 29
図 2.6.4-11: コール酸(100 μM)及び CsA(3 μM)の条件下での単離ラット肝細胞による基質蓄積.. 30
図 2.6.4-12: ベラパミル(V 100 μM)、シクロスポリン A(CsA 5 μM)、コール酸(CA 5 μM)、V＋CA 又は CsA＋CA を添加して 4 時間インキュベーションした後の肝スライス中(パート A)及び培地(パート B)中の遊離 CA 濃度 32

表 2.6.4-1: ラット、マウス、ヒトの血漿を対象として[$^{2}H_4$]コール酸の同位体濃縮測定で求めたコール酸のプールサイズ、代謝回転率及び合成速度 12
表 2.6.4-2: 妊娠ラットの体重、血漿コレステロール及び胆汁酸（平均値 ± S.E.M.） 14
表 2.6.4-3: ラット胎児の血漿コレステロール及び胆汁酸プールサイズ 14
表 2.6.4-4: 全面的胆汁瘻状態の動物の 1 日胆汁酸合成量 23

表 2.6.4-5: 肝循環が健全な動物における胆汁酸塩代謝に対するフェノバルビタールの影響 23
表 2.6.4-6: ラットにおけるコール酸のプールサイズ及び代謝回転に対するフェノバルビタール処置の影響.....26
表 2.6.4-7: ラットにおけるデオキシコール酸及びケノデオキシコール酸のプールサイズ及び代謝回転に対するフェノバルビタール処置の影響.....27
表 2.6.4-8: シクロスポリン A の用量をさまざまに変えた場合の個々の血清胆汁酸濃度の変化..27
表 2.6.4-9: 各濃度のシクロスポリン A 存在下におけるコール酸塩、グリココール酸塩、ケノデオキシコール酸塩及びデオキシコール酸塩輸送の見かけの速度論的パラメータ 28

略語一覧

3β-HSD	3β-hydroxy -Δ^5-steroid oxidoreductase
Δ^4-3-oxoR	Δ^4-3-oxosteroid-5β-reductase
^{14}C	^{14}炭素
BA	胆汁酸
C	対照
CA	コール酸
CDCA	ケノデオキシコール酸
CsA	シクロスポリン A
DCA	デオキシコール酸
DMSO	ジメチルスルホキシド
dpm	壊変毎分
EHC	腸肝循環
est	推定
FTR	代謝回転率
GCA	グリココール酸
GCDCA	グリコケノデオキシコール酸
GDCA	グリコデオキシコール酸
GLCA	グリコリトコール酸
GI	胃腸の
GLP	医薬品の非臨床試験の実施の基準
ISBA	個々の血清胆汁酸
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
INN	国際一般名
i.p.	腹腔内
K_m	ミカエリス定数
MDR	多剤耐性トランスポーター
$NaHCO_3$	炭酸水素ナトリウム
PB	フェノバルビタール
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PK	薬物動態
rpm	毎分回転数
S.E.M.	平均値の標準誤差
TCA	タウロコール酸
TCDCA	タウロケノデオキシコール酸
TDCA	タウロデオキシコール酸
TUDCA	タウロウルソデオキシコール酸
UDCA	ウルソデオキシコール酸
V	ベラパミル
V_{max}	能動的吸収の最大速度

審査官への留意事項

これらの薬物動態の概要文は、極めて多様な文献情報から得たデータを集めたものである。このため、各情報源では日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH 基準）、及び GLP に適合しておらず、利用可能なデータに合わせてデータの提示法を調整する必要があった。

薬物動態の概要には文献のみを収録しており、各文献が ICH 基準で規定された非臨床モジュール中の様々なセクションと関わる可能性がある。そこで、内部判断により、情報を提示するのに最も適したセクションを決定した。

動物に投与したコール酸の濃度又は量を計算するために、以下のように仮定した。

動物種	齢	性別	体重（推定）	1 日摂餌量（推定）
マウス [1][2]	成熟	雄	20～40 g	15 g/100 g 体重
		雌	20～30 g	15 g/100 g 体重
	若齢	雄	10 g（3 週齢）	15 g/100 g 体重
		雌	10 g（3 週齢）	15 g/100 g 体重
ラット [3]	成熟	雄	100～500 g	5 g/100 g 体重
		雌	100～400 g	5 g/100 g 体重
	若齢	雄	50 g（3 週齢以下）	5 g/100 g 体重
		雌	50 g（3 週齢以下）	5 g/100 g 体重

[1] http://www.uwm.edu/Dept/EHSRM/ACP/MANUAL/mouse.pdf
[2] http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_c_C57BL6_mouse_weight_chart.pdf
[3] http://www.uwm.edu/Dept/EHSRM/ACP/MANUAL/rat.pdf

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

コール酸（Orphacol®）は胆汁酸である。一次胆汁酸であるコール酸及びケノデオキシコール酸は、肝細胞内でコレステロールから生合成される。ヒトをはじめとする哺乳類では、一次胆汁酸及びその代謝産物である二次胆汁酸のほか、グリシン及びタウリンとの抱合体が内因性分子である。

先天性胆汁酸合成異常症の治療において、コール酸を用いた長期にわたる臨床経験があり、コール酸の使用が十分に確立されていることを考慮し、その薬物動態プロファイルの非臨床評価は、公表されているデータのレビューに基づいて行う。

レビューしたコール酸の薬物動態に関する文献には、以下に関するデータが記載されていた。

- 吸収（吸収の程度と速度、in vivo 及び in situ 試験）
- 分布（胎盤通過試験）
- 排泄（排泄の経路及び程度）
- 薬物動態学的薬物相互作用

以下の項目の評価に関する公開文献は確認されなかった。

- 吸収動態パラメータ、生物学的同等性及び／又はバイオアベイラビリティ（血清／血漿／血中 PK）
- 分布
  - 組織分布
  - 血漿タンパク質結合及び血球中への移行
- 代謝（部分的に 2.6.3 項で取り上げている点に注意）
  - 生体試料中の代謝物の化学構造及び含有量
  - 推定代謝経路
  - 初回通過代謝（消化管／肝初回通過効果）
  - P450 試験を含む in vitro 代謝
  - 酵素誘導及び阻害
- 排泄（乳汁排泄）

試験の大半は、GLP（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）規制の実施以前である 1970 年代以前に実施されたものであった。参考にした研究はいずれも学術研究であり、GLP の遵守について言及したものはなかった。

使用した動物の種及び系統は、薬理及び毒性の項に記載されているものと類似しており、最もよく使用されている種はラットであった。

主な結果

コール酸が摂取されると、まず小腸で吸収され、その後、門脈を経て肝臓に運ばれさらに処理される。コール酸とその抱合体がモルモット小腸の近位部よりも主に遠位部（回腸）で吸収されることが報告されている (Weiner & Lack, 1962)。

吸収試験の結果、コール酸プールサイズはマウス及びラットでそれぞれ 168 ± 21 及び 106 ± 12 µmol/ kg であった。これはマウス及びラットに対してそれぞれ 68.5 ± 8.6 及び 43.2 ± 4.9 mg/kg に相当する (Hulzebos, et al., 2001)。しかし、この実験では、反復サンプリング中に大量の胆汁が除去されるため、プールサイズに影響しており、過小評価されていることが認められた (Hulzebos, et al., 2001)。このため、本報告中のラットプールサイズに関する結果は正確ではなく、プールサイズの推定に関する各報告結果の不一致の原因と考えられる (Cronholm, et al., 1974), (Carrella & Dietschy, 1977), (Hulzebos, et al., 2001)（2.4.3.1 項）。

(Cronholm, et al., 1974)は、ラットのプールサイズの平均値は 118 ± 38.3 mg/kg であると報告しており、この値は (Hulzebos, et al., 2001)の報告値の 2 倍であった。さらに、 (Carrella & Dietschy, 1977)は、実施した 2 つの試験の対照群のラットのプールサイズを 175～245 mg/kg 及び 136～190 mg/kg と報告したが、これは腸内胆汁酸プールのみをアッセイしたものである。上記の通り、ラットの試験では、ラットの種差（Wistar Rat か SD Rat）、ラットの週齢でプールサイズが大きく変動することから一定のプールサイズを数学的に求めず、週齢や種差で 40 mg から 250 mg/kg の変動があると考える。一方、マウスのコール酸プールサイズは 1 件の報告があり、168 ± 21 µmol/kg 体重（69 mg/kg）であった (Hulzebos, et al., 2001)ことから、コール酸プールサイズも 69 mg/kg 中心に一定の幅があると推測される。

代謝回転率（Fractional Turnover Rate：FTR）値はマウスとラットでそれぞれ 0.44 ± 0.03 と 0.88 ± 0.10 であり、対応する合成速度はそれぞれ 29.8 ± 6.5 mg/kg と 38 ± 0.4 mg/kg であった (Hulzebos, et al., 2001)。

ラットを用いた胎盤通過試験では、胆管結紮後に母体血漿胆汁酸が 30 倍増加したにもかかわらず、胎児胆汁酸の大幅な増加は認められず、胎盤を通過する胆汁酸の移行は小さいことが示唆された (Hassan & Subbiah, 1980)。さらに、胆管結紮ラットからの胎児（妊娠 21 日目）における胆汁酸プールサイズは対照胎児よりもむしろ低値であった。しかし、ヒツジでの研究 (Perez, et al., 1994)は、上記の試験での所見 (Hassan & Subbiah, 1980)と矛盾し、母体に 29 mg のコール酸をボーラス注射した後に胎児血清中のコール酸濃度が有意に上昇することを示した（2.6.6.6.2.2 項）。また、胎児血漿中のコール酸濃度の有意な上昇が仔ヒツジの早期分娩につながった (Campos, et al., 1986)（2.6.6.6.2.2 項）。

興味深いことに、アカゲザルの胎児において注入された[^{14}C]コール酸塩投与量の平均 30%に、胎児から母体へ胎盤通過が認められた (Little, et al., 1975)。注目すべきことに、アカゲザルの胎児の血漿、胆汁、肝臓、及び腸管に測定可能な量の放射標識が認められたが、他の胎児組織には認められなかった (Little, et al., 1975)。

ラットを用いた排泄試験では、コール酸はほぼ代謝物の形で糞中に排泄されることが示された (Lindstedt & Norman, 1955)。ラットの糞中に非抱合型コール酸は少量しか認められなかった (Lindstedt & Norman, 1955)。さらに、標識コール酸及び標識ケノデオキシコール酸を同時に投与

した後に、糞試料のクロマトグラム上で認められたさまざまなバンドは、環標識コレステロールの投与後に認められるものと同じである。

ラットを用いた薬物動態学的薬物相互作用試験では、予想どおり、胆汁酸封鎖剤であるコレスチラミンがプールからコール酸を除去し、その生合成速度を増強させることが示された (Hulzebos, et al., 2001)。

シクロスポリン A（CsA、INN：ciclosporin）は in vitro でラット肝細胞へのコール酸の取り込みを阻害し、in vivo で血清コール酸濃度を上昇させる (Azer & Stacey, 1994)。単離及び培養したラット肝スライスにおいて、CsA 及びベラパミルはいずれもコール酸の輸送を阻害した。ベラパミル相互作用の in vivo での意義は、これらの実験からは明らかではない (Barth, et al., 2006)。フェノバルビタール治療は、ラットの回腸における胆汁酸塩の輸送能（V_{max}）を 2 倍に増加させる (Ostrower, et al., 1974)。 (Cronholm, et al., 1974)では、ラットにフェノバルビタールを 10 日間投与すると、対照群のラットと比較してコール酸プールが 4 分の 1 になることが示された。さらに、フェノバルビタール処置ラットでは、対照ラットと比較して、コール酸の産生が減少した。興味深いことに、デオキシコール酸及びケノデオキシコール酸の合成に対しては、フェノバルビタールの効果に有意差は認められなかった。しかし、フェノバルビタールはケノデオキシコール酸の半減排泄時間を有意に（< 0.05）減少させることが示された。

対照的に、サルではフェノバルビタールによって胆汁酸合成の最大速度が増加したうえ、肝臓に戻る胆汁酸塩が胆汁酸塩合成を阻害する正常な制御機構を変化させた (Redinger & Small, 1973)。この所見は、ヒトにおけるフェノバルビタールの作用を検討した臨床試験と一致している（2.7.2 項）。その結果、フェノバルビタールは、胆汁酸の負のフィードバック阻害を阻害することにより胆汁酸産生を増加させると考えられる。

2.6.4.2 分析法

文献全体にわたって用いられている分析方法が異なるため、概要を統合しても有用ではない。使用された各分析方法の詳細な説明については、個々の文献を参照のこと（4.2.2 項）。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 吸収（吸収の程度と速度、in vivo 及び in situ 試験）

2.6.4.3.1.1 マウス及びラット

2.6.4.3.1.1.1 (Hulzebos, et al., 2001): “Measurement of parameters of cholic acid kinetics in plasma using a microscale stable isotope dilution technique: application to rodents and humans”

この研究では、in vivo でのコール酸の動態、具体的には Wistar ラット及び FVB マウスにおけるプールサイズ、代謝回転率（FTR）及び合成速度の測定を可能にするマイクロスケール安定同位体希釈法の開発を取り上げている。

ペンタフルオロベンジル - トリメチルシリル誘導体化を適用して、ガス - 液体クロマトグラフィー／電子捕獲負化学イオン化 - 質量分析によって 50 µL の血漿試料中で投与した[2,2,4,4-$^2H_4$]コール酸濃縮の崩壊を時間単位で測定した。

実験 1：ヒトの血漿で測定したコール酸動態

ヒトでの検討結果については、2.7.2.2.2.1.4 項に示した。

実験 2：ラットの血漿及び胆汁中で測定したコール酸動態の比較

3 例のラットを個別に飼育し、胆管、十二指腸及び心臓に永久カテーテルを装着した。腸肝循環が損なわれないようにするために、胆管及び十二指腸のカテーテルを接続した。術後 5 日目の動物に、7 mg の[$^2H_4$]コール酸を含む総量 250 µL の 0.5%NaHCO3/リン酸緩衝食塩水（PBS）を十二指腸カテーテルからボーラス投与した。投与された標識コール酸の量は、内因性胆汁酸プールの約 10%に等しいと推定された。[$^2H_4$]コール酸投与の 1、3、4.5、6、9、12、21、24、48、72 及び 96 時間後に、心臓カテーテルから血液試料（250 µL）を採取した。胆汁試料（50 µL）は、血液試料と同時に、胆管カテーテルより約 2 分で採取した。胆汁の採取後、腸肝循環を直ちに回復させた。血液を 4000 rpm で 10 分間遠心分離させた。血漿及び胆汁試料は、分析まで-20°C で保存した。

実験 3：コレスチラミン処置のコール酸動態に対する影響

12 例のラットに心臓カテーテルを装着し、各 6 例ずつ 2 群に無作為に分けた。1 群には通常の固形飼料を自由に摂取させ（対照）、もう 1 群には通常の固形飼料に 1%（w/w）のコレスチラミンを添加して 7 日間与えた。5 日目に、PBS 溶液中の[$^2H_4$]コール酸 5 mg を心臓カテーテルから投与した。[$^2H_4$]コール酸の注射前のほか注射の 3、4.5、6、12、24、30 及び 48 時間後に、心臓カテーテルから血液試料を採取した。

実験 4：マウスにおける[$^2H_4$]コール酸動態の測定

マウスにおける胆汁酸の動態を測定するために、6 例の雄マウスを個別に飼育した。7 日目に、210 µg の[$^2H_4$]コール酸の 0.5% NaHCO3/PBS 溶液をハロタン麻酔下で陰茎静脈にゆっくりと注射した。6、23、48 及び 72 時間後（n = 3）に、ハロタン麻酔下で尾出血させて血液試料（225 µL）を採取した。ベースラインの同位体存在度測定に用いた試料は、別のマウス群から心臓穿刺によって採取した。血液をヘパリン含有ミクロヘマトクリット管に採取し、遠心分離して血漿を得た。

遠心分離（4000 rpm、10 分間）後、血漿を分析まで-20°C で保存した。

表 2.6.4-1 に、ラット及びマウスにおけるコール酸プールサイズ、FTR 及び合成速度を示す。ラット胆汁の値と血漿による値とにほとんど差はなかった。

表 2.6.4-1: ラット、マウス、ヒトの血漿を対象として[$^2H_4$]コール酸の同位体濃縮測定で求めたコール酸のプールサイズ、代謝回転率及び合成速度

動物種	プールサイズ	FTR	合成速度
	μmol/kg 体重 [a]	1 日当たり	μmol/kg 体重 [a]
ラット	106 ± 12	0.88 ± 0.10	93 ± 01
マウス	168 ± 21	0.44 ± 0.03	73 ± 16
ヒト	24 ± 7	0.46 ± 0.14	10 ± 2

a 文献内のデータから kg に換算

しかし、著者らは、この実験で得られたプールサイズ、FTR 及び合成速度の絶対値は、実験中の胆汁の除去（1 回の採取につき約 5%）の影響を強く受けるため、生理学的意味を持たないと警告している。

コレスチラミン処置ラットでは、コール酸プールサイズがわずか（-21%）ながら有意に減少した（84 ± 19 μmol/kg 体重対 107 ± 12 μmol/kg 体重、$P < 0.05$）。

コレスチラミン処置ラットでは予想どおりコール酸の FTR 及び合成速度が有意に高値で、それぞれ 1.89 ± 0.29/日対 0.88 ± 0.11/日（$P < 0.005$）及び 157 ± 34 μmol/kg 体重対 93 ± 1 μmol/kg 体重（$P < 0.05$）であった。

ラットとマウスとではコール酸プールサイズ及び合成速度にほとんど差がなかったが、ヒトよりも著しく高値であった。対照的に、FTR はラットよりもマウスが著しく低値であった。

2.6.4.3.1.2 モルモット

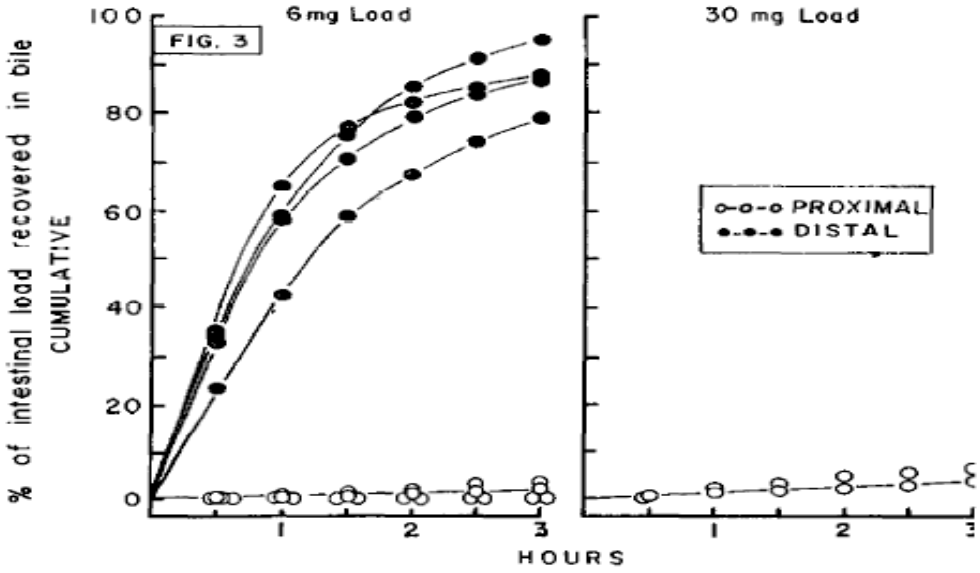
2.6.4.3.1.2.1 (Weiner & Lack, 1962): “Absorption of bile salts from the small intestine in vivo”

この研究では、モルモットから摘出した小腸部に注入したコール酸の胆汁排泄を測定することにより、in vivo におけるモルモット小腸からの胆汁酸塩の吸収を検討した。

雌の Hartley モルモットをエーテルで麻酔して腹部を開き、胆嚢管を結紮して総胆管にチューブを挿入した。閉腹し、胆汁を 30 分間採取した。その後、再開腹し、リン酸カリウム緩衝液を含む生理食塩液 3 mL 中に胆汁酸塩を 6 mg 又は 30 mg 含む溶液を結紮した腸部分に導入した。腹部を縫合して閉じ、胆汁の 30 分間採取を 6 回行った。実験期間を通して軽いエーテル麻酔を維持し、実験終了時に動物を屠殺した。結果は、腸管への導入量に対する百分率として表した胆汁中のコール酸誘導体の累積排泄量（図 2.6.4-1）及び各動物から得られた対照胆汁の非特異的吸光度で補正した値として示す。吸収は、小腸の遠位部（回腸）に限定されていた。タウロコール酸及びグリココール酸の結果でもコール酸とほとんど差がなかった。

コール酸は、小腸の近位部よりも主に遠位部（回腸）で吸収されることが示された。

図 2.6.4-1: モルモット胆汁瘻の小腸部に導入した胆汁酸塩の胆汁中の回収率



各曲線は 1 例分の実験を表す。各点を描出できるように、白丸は時間軸に沿って少しずつずらした。

2.6.4.3.2　薬物動態パラメータ、生物学的同等性及びバイオアベイラビリティ（血清、血漿及び全血）

動態パラメータ、生物学的同等性及び／又はバイオアベイラビリティに関する公開文献は確認されなかった。

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　組織分布試験

2.6.4.4.2.2 項に示す (Little, et al., 1975)による研究を除いて、組織分布、並びにタンパク質結合及び血球中への移行に関する公開文献は確認されなかった。

2.6.4.4.2　胎盤通過試験

2.6.4.4.2.1　ラット

2.6.4.4.2.1.1　(Hassan & Subbiah, 1980): “Bile acids in the foetal rat: effect of maternal bile duct ligation”

この研究では、Sprague‐Dawley ラットを用いて、妊娠中の胆管結紮による実験的胆汁うっ滞が胎児の胆汁酸含量及び組成に及ぼす影響を検討している。

妊娠 9 日目に、妊娠した Sprague‐Dawley ラットの胆管を結紮した。妊娠 21 日目に、両群から無作為に選択した動物をエーテルで麻酔し、心臓穿刺により採血することで失血させ、胎児を分析した。胎児における胆汁酸プールの分析には消化管全体を用いた。胆汁酸分析のために、5～7 例の胎児の消化管及び肝臓をプールした。

表 2.6.4-2 に、胆管結紮がラットの体重、血漿コレステロール及び血漿胆汁酸に及ぼす影響を示す。胆管結紮ラットの体重は、対照ラットより有意に低かった。さらに、総抱合型コール酸の血漿中濃度は、胆管結紮動物で有意に高かった（$p < 0.05$）。表 2.6.4-3 に、偽手術されたラット及び胆管結紮ラットの胎児の胆汁酸プールサイズを示す。胆管結紮ラットの胎児におけるコール酸及び総胆汁酸のプールサイズは、偽手術ラットより有意に低かった（$p < 0.05$）。

注目すべきは、母体血漿胆汁酸が 30 倍に増加したにもかかわらず胎児胆汁酸の大幅な増加は認められなかった点であり、胎盤を通過する胆汁酸の移行は小さいことが示唆された。さらに、胆管結紮ラットからの胎児（妊娠 21 日目）における胆汁酸プールサイズは対照胎児よりもむしろ低値であった。

表 2.6.4-2: 妊娠ラットの体重、血漿コレステロール及び胆汁酸（平均値 ± S.E.M.）

群	体重（g）	血漿コレステロール（mg%）	血漿胆汁酸（mol/L）
対照（6）*	374.0 ± 13.3	44.5 ± 1.3	2.15 ± 0.83
胆管結紮（6）	300.6 ± 7.8**	57.0 ± 6.5	64.63 ± 6.08**

*括弧内の数字は、検討した試料又は動物の数を示す
**対照と有意差あり、$p < 0.05$

表 2.6.4-3: ラット胎児の血漿コレステロール及び胆汁酸プールサイズ

群	血漿コレステロール（mg%）	胆汁酸（mg/kg 体重）		
		コール酸	ケノデオキシコール酸	総胆汁酸
対照	81.39 ± 3.38 (5)	11.7 ± 1.8 (4)	4.1 ± 0.9 (4)	19.7 ± 3.4 (4)
胆管結紮	68.98 ± 3.58**(4)	5.2 ± 0.8**(3)	1.4 ± 0.3 (3)	7.6 ± 1.2**(3)

*括弧内の数字は、検討した試料又は動物の数を示す
**対照と有意差あり、$p < 0.05$

2.6.4.4.2.2　サル

2.6.4.4.2.2.1　(Little, et al., 1975): “Bile-salt metabolism in the primate foetus”

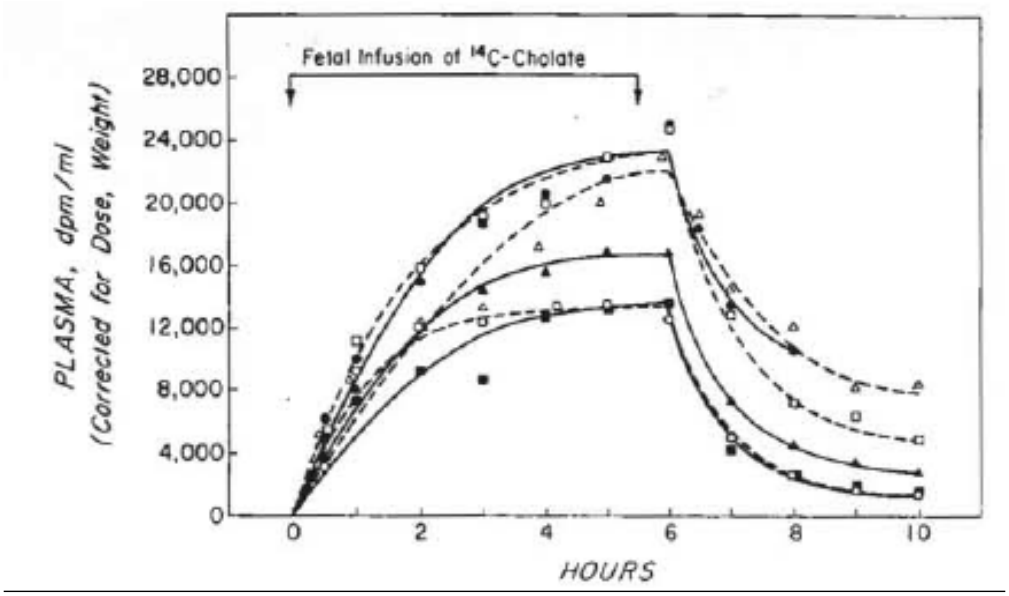
本研究では、アカゲザル胎児 6 例に[^{14}C]コール酸塩を静脈内注入することより、胎児における胆汁酸塩の代謝を検討した。投与した放射標識胆汁酸塩の胎盤通過性、胎児の血漿クリアランス及び胎児の肝排泄を測定した。

妊娠アカゲザル 6 例（Macaca mulata）を用いて実験を行った。胎児頸静脈カテーテルを通して、生理食塩水 2.5 mL に溶解したトレーサー量の[^{14}C]コール酸塩を 6 時間にわたる持続注入により胎児に投与した。注入中の 6 時間及び注入後の 4 時間にわたって動脈血中の放射標識濃度を測定した。母体胆汁中の ^{14}C 標識胆汁酸塩を測定することによって胎児から母体への移行を定量した。試験は 10 時間で終了し、^{14}C 標識胆汁酸塩について、母体及び胎児の組織を分析した。

[^{14}C]コール酸塩のクリアランス及び排泄

^{14}C 標識は胎児血漿中に次第に蓄積し、注入開始から 5 時間後から 6 時間後の間に濃度がプラトーに向かうないし達する傾向があった（図 2.6.4-2）。

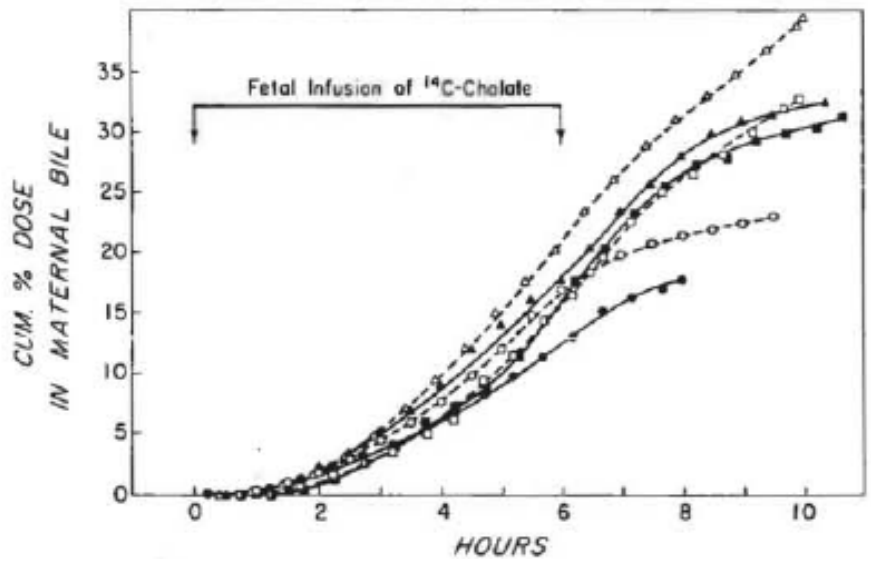
図 2.6.4-2: 注入した胆汁酸塩の血漿消失



[^{14}C]を胎児に静脈内投与し、^{14}C 標識の胎児血漿からの消失を評価した。縦軸は血漿中の放射標識濃度を示し、胎児の体重及び用量の差で補正する。胎児 M1（○−○）、M2（●−●）、M3（Δ−Δ）、M4（▲−▲）、M5（□−□）、M6（■−■）

胎盤通過は、注入開始後 1～2 時間以内に始まり、検討時間全体で継続した（図 2.6.4-3）。胎盤移行量の平均値は注入量の 30%であった。このうち 98%超が母体胆汁中に[^{14}C]タウロコール酸塩又は[^{14}C]グリココール酸塩の形で認められた。

図 2.6.4-3: 胆汁酸の胎盤通過

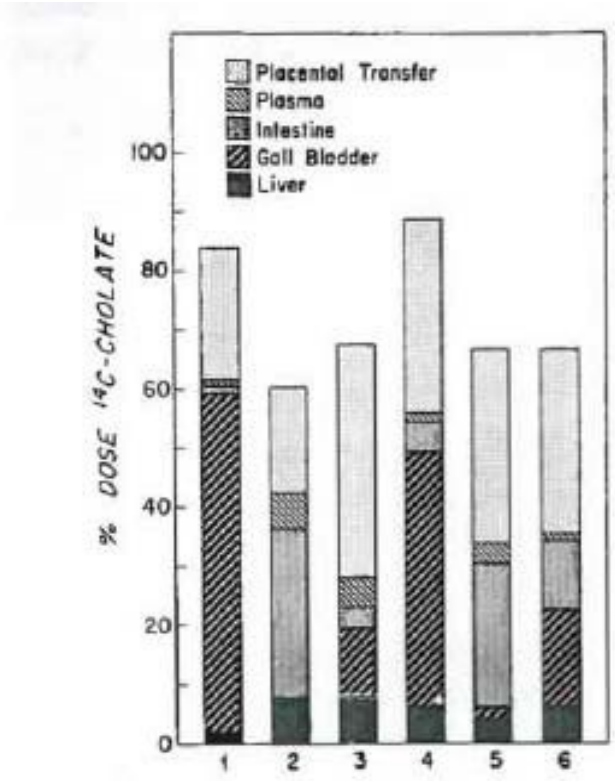


胎児への[^{14}C]コール酸塩の静脈内注入中及び注入後の母体胆汁中での ^{14}C 標識の出現。縦軸は、母体の胆汁中にみられた総線量の累積率を示す。記号は図 2.6.4-2 と共通。

著者は、胎児の胆嚢胆汁及び腸管の放射標識が試験期間中の胎児肝臓から排泄されたおおよその量を示すとする場合、排泄量は注入量の 33%（範囲、14～58）に等しいと想定されるとしている（図 2.6.4-4）。このうち、78%（範囲、65～85）は[^{14}C]タウロコール酸塩の形態で、これよりは少量であるものの[^{14}C]グリココール酸塩及び遊離[^{14}C]コール酸塩が認められた。

総合すると、この試験では、胎児から母体への胎盤通過量の平均値が注入量の 30%であることが示された。

図 2.6.4-4: 注入した[^{14}C]コール酸塩の回収



実験終了時の放射標識の分布

2.6.4.5 代謝（動物種間の比較）

コール酸をはじめとする胆汁酸の代謝に関する研究は数多く行われているため、2.4 項に挙げた公開文献をレビューする。しかし、入手可能な定量的データは少ない。追加情報については、2.6.3 項を参照すること。

2.6.4.6　排泄

2.6.4.6.1　排泄の経路及び程度

2.6.4.6.1.1　ラット

2.6.4.6.1.1.1　(Lindstedt & Norman, 1955): “On the excretion of bile acid derivatives in feces of rats fed cholic acid-24-14C and chenodeoxycholic acid-24 ^{14}C”

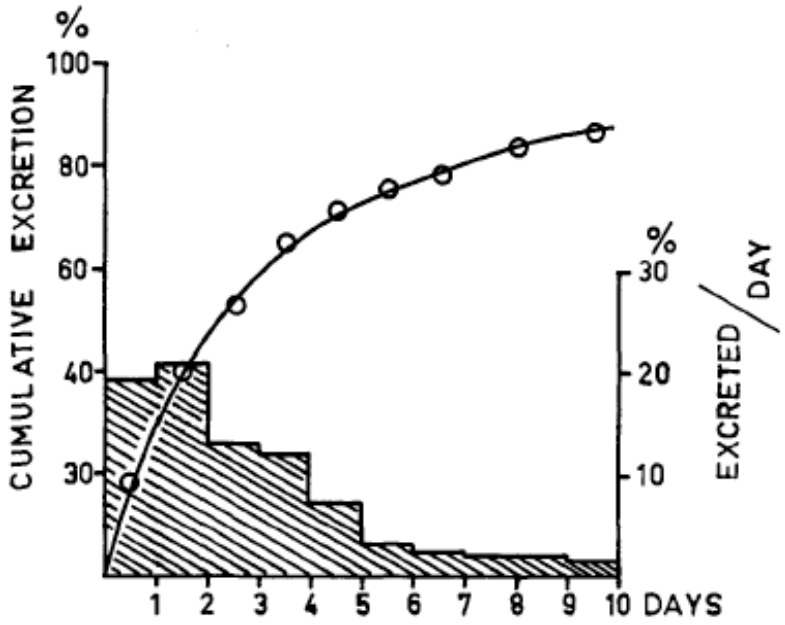
この研究では、コレステロール-4-^{14}C を与えた後にみられた糞中の酸性産物が、コール酸-24-^{14}C 及びケノデオキシコール酸-24-^{14}C を与えた後のクロマトグラム上で認められるかどうかを検討している。

雄のラット（体重約 150 g）に、放射標識コール酸 1～3 mg を腹腔内注射した。したがって、動物にはコール酸 6.7～20 mg/kg を投与した。24 時間ごとの糞を採取した。

図 2.6.4-5 は、コール酸-24-^{14}C を腹腔内投与してから 10 日以内に、放射標識が完全に糞中に排泄されることを示している。尿中に放射能は認められなかった。さらに、非抱合型のままなのは少量に限られる。過去の試験では、コール酸は肝臓によっていかなる新しい代謝物にも変換されないことが示されている（2.4 項を参照）。その結果、腸内細菌中に存在する酵素の作用を介して代謝産物が産生される。

標識コール酸及び標識ケノデオキシコール酸を同時に投与した後に、糞試料のクロマトグラム上で認められたさまざまなバンドは、環標識コレステロールの投与後に認められるものと同じである。

図 2.6.4-5 コール酸-24-^{14}C の腹腔内投与後に糞中に排泄された同位体



影の部分は排泄された放射能を日数別に投与量に対する割合で表したもので、白丸は総排泄量を示している。

2.6.4.6.2 乳汁排泄

コール酸の乳汁排泄に関する公開文献は確認されなかった。しかし、マウスではコール酸が母乳中に移行するという定性的証拠がある（2.6.2.2.1.1.1 項）。

2.6.4.7　薬物動態学的相互作用

2.6.4.7.1　In vitro

2.6.4.7.1.1.1　(Ostrower, et al., 1974): “Effect of phenobarbital on intestinal cholic acid absorption in the rat”

この研究では、Sprague‐Dawley ラットから腸係蹄を摘出して潅流を実施することにより、フェノバルビタールナトリウムの皮下投与（80 mg/kg/日、8 日間）がコール酸の腸管吸収に及ぼす影響を in vivo で検討している。

雌の Sprague-Dawley ラットを未処置の対照動物群と 80 mg/kg/日のフェノバルビタールナトリウムを 8 日間皮下投与する処置動物群とに分けた。最後の注射から 24 時間以内に、未処置の対照動物及び処置動物を腹腔内ペントバルビタール麻酔下（対照動物では 60 mg/kg、処置動物では必要に応じて漸増）で手術した。潅流させるコール酸を[^{14}C]で標識した。最終濃度は 0.1～10 mM とした。最終溶液の比放射能を実験ごとに測定し、同位体が保存されるが計数制度が維持されるように 1000～45,000 dpm/ µmole とした。各動物の潅流は腸係蹄 1 カ所のみで、各動物を実験に用いるのは 1 回までであった。潅流は較正速度 0.52 mL/min で、60～120 分間行った。 潅流中、胆汁の連続 5 分量を計数バイアル及び 10 mL のシンチレーション溶液に直接採取した。

回腸におけるコール酸の能動的吸収に対する見かけの Vmax は、対照群では 2239 ± 357 pmoles/min/cm/100 g であり、フェノバルビタール投与群では 5300 ± 1358 pmoles/min/cm/100 g であった（図 2.6.4-6）。この 2 倍の差の有意性は高いものであった（$p < 0.001$）（図 2.6.4-7）。

図 2.6.4-6: 対照(-)及びフェノバルビタール投与(P)(- -)動物における活性コール酸の回腸吸収

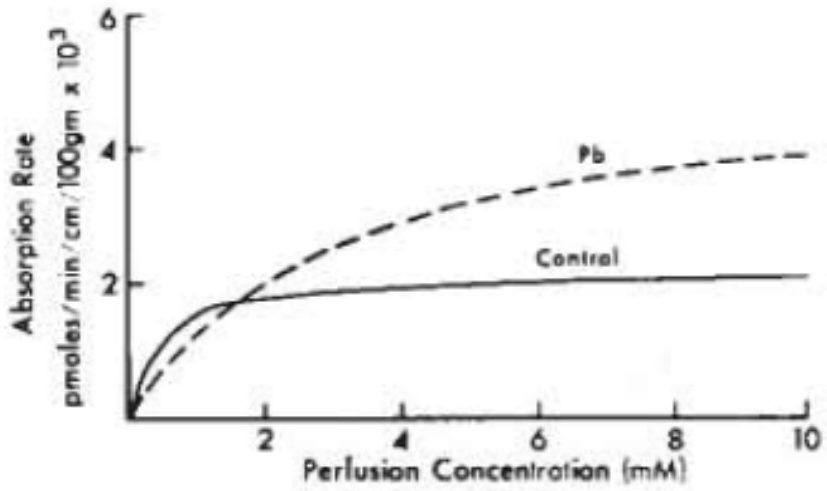
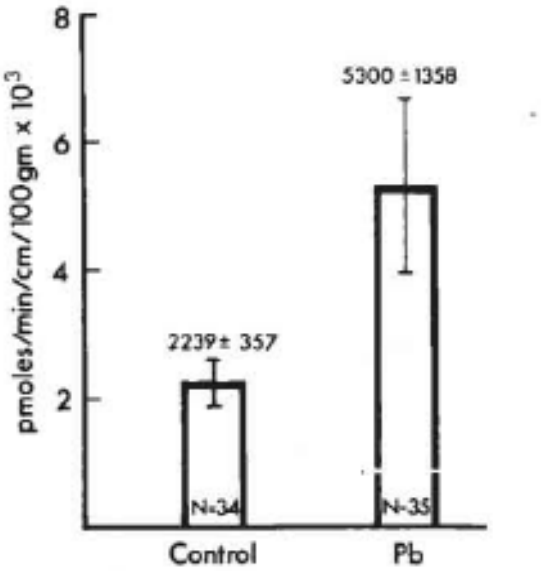


図 2.6.4-7: 対照動物及びフェノバルビタール投与動物における回腸の V_{max} ± 1 SE



Pb：フェノバルビタール。
P < 0.025

フェノバルビタールが空腸の胆汁酸塩輸送を変化させなかったことは、この薬剤の作用が回腸の能動輸送機構に限定されており、腸管表面積、透過性及び肝輸送の増加の結果ではないことを示す証拠である。

この研究は、フェノバルビタールを投与すると、ラット回腸における胆汁酸塩の輸送能（V_{max}）が有意に増加することを示している。

2.6.4.7.1.1.2　(Redinger & Small, 1973): The effect of Phenobarbital upon bile salt synthesis and pool size, biliary lipid secretion, and bile composition

この研究では、アカゲザルを用いて、十二指腸瘻を介して投与したフェノバルビタールナトリウム（5 mg/kg/日、1～2 週間）が胆汁流量、胆汁脂質分泌、胆汁酸合成及び胆汁酸プールサイズに及ぼす作用を検討した。

雌雄のアカゲザルを腸肝循環が健全な状態の 3 例と全面的な胆汁瘻の状態の 3 例の 2 群に分け、各動物自体をそれぞれの対照としても用いて研究を実施した。総胆汁流量、並びに胆汁酸塩、リン脂質及びコレステロールの分泌を定常状態で 24 時間ごとに測定した。さらに、腸肝循環が健全な条件下で、対照期間及び薬物投与期間の胆汁酸の合成速度を 3 例で測定し、プールサイズを 2 例で推定した。

全面的胆汁瘻状態では cholesterol 7α-hydroxylase のフィードバック阻害がないために de novo 合成速度が原則として最大の状態であるが、フェノバルビタールによって 3 例とも胆汁酸合成の最大速度が 25～30%有意に上昇した（P < 0.05）（表 2.6.4-4）。また、腸肝循環が健全な動物でも、対照データの測定時には胆汁酸塩が肝臓に戻る速度によって胆汁酸合成が阻害されたと思われるのに対して、フェノバルビタール投与時には同じく胆汁酸合成及びプールサイズが増大した（表 2.6.4-5 及び図 2.6.4-8）。

表 2.6.4-4: 全面的胆汁瘻状態の動物の 1 日胆汁酸合成量

動物	対照 mmol/24 h	n	フェノバルビタール mmol/24 h	n	P 値
A	1.66 (0.13)	5	2.28 (0.06)	7	<0.01
B	2.03 (0.35)	4	2.60 (0.08)	4	<0.001
C	1.95 (0.16)	5	2.46 (0.06)	5	<0.05

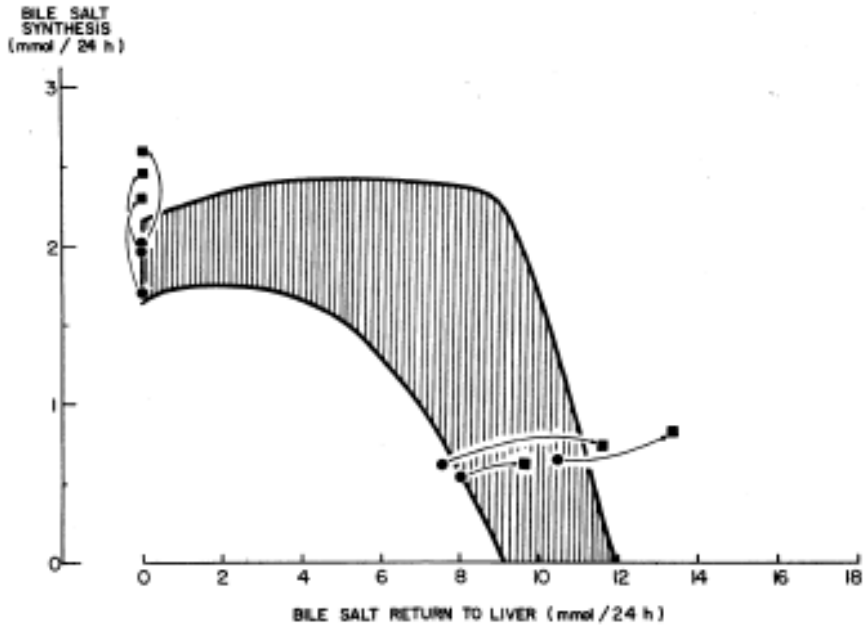
n：定常状態期間の回数。対照期間でもフェノバルビタール投与期間でも動物は定常状態にあり、n は各実験に対する 24 時間の試験期間の総数を意味する。() 内の数字は、各試験の SEM を示す。このように、対照期間中にすでに胆汁酸合成速度が最大の動物であっても、各試験でフェノバルビタールを投与すると胆汁酸合成速度が有意に増加した。

表 2.6.4-5: 肝循環が健全な動物における胆汁酸塩代謝に対するフェノバルビタールの影響

動物		n	吸収された胆汁酸塩及び肝臓に戻った胆汁酸塩（mmol/24 h）	胆汁酸塩合成（mmol/24 h）	
A	対照	6	7.91	0.548 (0.022)	P<0.05
	薬物	11	9.43	0.628 (0.025)	
B	対照	3	7.4	0.512 (0.029)	P<0.01
	薬物	5	11.59	0.739 (0.033)	
D	対照	19	10.32	0.680 (0.018)	P<0.001
	薬物	18	13.38	0.835 (0.017)	

n：定常状態期間の回数。各実験では、分泌した総胆汁量の 5%を分析のために採取し、残り（95%）を動物に戻す。対照期間の平均値及びフェノバルビタール投与期間の平均値を示す。

図 2.6.4-8: 胆汁酸塩合成と肝臓に戻った胆汁酸塩との関係

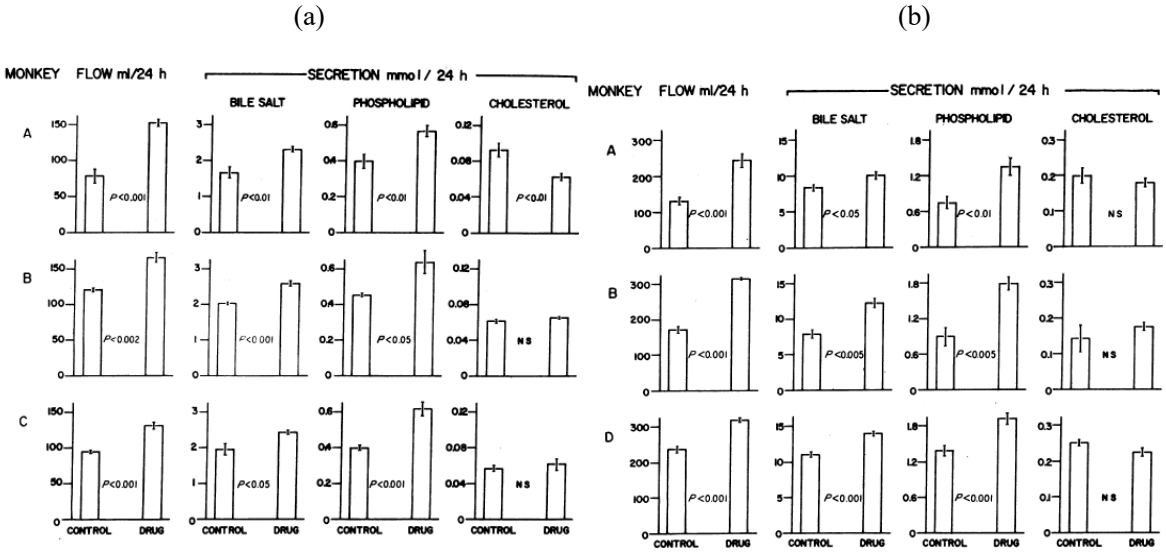


網掛け部分は、胆汁酸塩合成（mmol/24 h）と、胆汁酸塩が門脈によって肝臓に戻る速度（mmol/24 h）との関係を示している。網掛け部分の面積は、腸肝循環の遮断量を様々に変化させた 20 例の動物を用いて検討した合成速度と肝臓に戻る速度との関係について求めた± 2 SEM の範囲を示す。胆汁酸塩の合成は、肝臓に戻る速度が 7 mmol/24 h を超えるまで抑制されなかった。胆汁酸塩合成を完全に抑制するには、肝臓に戻る速度が約 12 mmol/24 h であることが条件であった。対照期間のサル（丸）は正常域内に収まっていたが、フェノバルビタールを投与すると（四

角）、胆汁酸塩が肝臓に戻らない場合（左）には胆汁酸塩合成速度の「最大値」が増大したうえ、戻る速度が高値の場合（右）にも合成速度が増大した。（表 2.6.4-5 の 4 列目及び 5 列目の個々のデータ）

また、フェノバルビタールを 5 mg/kg/日で投与すると、全動物で胆汁流量が増加した（P < 0.002 以上）（図 2.6.4-9）。胆汁流量の増加は、「胆汁酸塩非依存性分画」の増加及び胆汁酸塩分泌速度の増加の両方に起因していた。フェノバルビタールは、胆汁酸塩（P < 0.01）及びリン脂質の分泌（P < 0.05）を有意に増加させた。

図 2.6.4-9: 胆汁瘻のある動物(a)及び腸肝循環が健全な動物(b)の胆汁流量及び胆汁脂質の分泌に及ぼすフェノバルビタールの作用



(a)：ヒストグラムは左から順に、全面的胆汁瘻状態にあるサルの対照期間中及び薬物投与期間中に測定された胆汁流量、胆汁酸塩の分泌速度、リン脂質の分泌速度及びコレステロールの分泌速度の平均値を示している。縦棒は± SEM を表す。全面的胆汁瘻状態での定常状態では胆汁酸塩の分泌が胆汁酸塩合成と等しいことに注意すること。各パラメータの確率値、P は、スチューデント t 検定により決定した。

(b)：ヒストグラムの高さは、各動物の対照期間中及び薬物投与期間中に測定された胆汁流量、胆汁酸塩の分泌速度、リン脂質の分泌速度及びコレステロールの分泌速度の平均値を表す。縦棒は± 1 SEM を表す。P 値は、スチューデント t 検定により決定した。いずれの実験でも胆汁流量、胆汁酸塩の分泌速度及びリン脂質の分泌速度の増加が認められたが、コレステロールの分泌速度は変化しなかった。

結論として、フェノバルビタールは、胆汁酸が肝臓に戻ることで発現する胆汁酸合成の正常な制御を部分的に克服することにより、胆汁酸合成レベルを正常範囲を超えて高めた。

著者らは、各実験で用いたフェノバルビタールの用量（5 mg/kg/日）は体重ベースのヒトでの治療用量に近いが、ラットを用いた同様の研究でははるかに高用量（100 mg/kg/日）が用いられた点を指摘している。また、著者らは、30 mg/kg/日の用量を投与したアカゲザルは忍容性が不良で、胆汁形成が減少したことを指摘している。

2.6.4.7.1.1.3　(Ryu , et al., 2021): “Evaluation for Potential Drug-Drug Interaction of MT921 Using In Vitro Studies and Physiologically-Based Pharmacokinetic Models”

コール酸のトランスポーターに対する阻害作用及び薬物代謝酵素に対する誘導・阻害作用に関しては、顎下脂肪低下用注射剤 MT921（有効成分はコール酸）を用いて検討した (Ryu , et al., 2021)の論文およびその Supplementary Materials で以下の内容が報告されている。

- トランスポーターを発現させたヒト胎児腎細胞株 HEK293 を用いた検討結果、organic anion transporting polypeptide（OATP）1B3、organic anion transporter（OAT）3、Na+-taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP）、apical sodium-dependent bile acid transporter（ASBT）が MT921 のトランスポートに関与することが認められた。
- OATP1B1、OATP1B3、OAT3、NTCP、ASBT の代表的基質取り込みに対する MT921 の阻害活性 IC50 は、OATP1B1：63.2 μmol/L、OATP1B3：38.3 μmol/L、OAT3：68.7 μmol/L、NTCP：53 μmol/L、ASBT：39.1 μmol/L であった。
- MT921 は、薬物排出トランスポーター（MDR1、BCRP、MRP2、BSEP）や薬物取り込みトランスポーター（OATP1B1、OATP2B1、OAT1、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2K）の基質とならず、これらに対する阻害作用を示さないことが確認された。
- in vitro 試験及び in silico 生理学的薬物速度論モデルから、MT921 と慢性疾患治療薬（アムロジピン、シンバスタチン、ピオグリタゾン）の間には薬物相互作用の可能性はないと判断された。
- ヒト肝ミクロソーム培養系を用いて、9 種のシトクローム P450（CYP）アイソフォーム（1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A）によるそれぞれの基質カクテルとの酵素反応について、MT921 の阻害作用を検討した。いずれの CYP アイソフォームに対しても、MT921 の IC50 は 100 μM 以上であり、阻害作用は認められなかった。
- ヒト肝ミクロソーム培養系を用いて、6 種の UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）アイソフォーム（1A1、1A3、1A4、1A6、1A9、2B7）によるそれぞれの基質カクテルとの酵素反応について、MT921 の阻害作用を検討した。いずれの UGT アイソフォームに対しても、MT921 の IC50 は 100 μM 以上であり、阻害作用は認められなかった。
- 3 バッチのヒト凍結保存肝細胞を MT921 と 48 時間培養後、6 種の CYP アイソフォーム（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、3A）、6 種の UGT アイソフォーム（1A1、1A3、1A4、1A6、1A9、2B7）、6 種の薬物トランスポーター（MDR1、BCRP、MRP2、BSEP、OATP1B1、OCT1）の mRNA 発現の変化を検討した。100 μM の MT921 と培養しても、それぞれの酵素およびトランスポーターに対し、米国 FDA ガイドラインで規定された誘導作用は認められなかった。なお、MT921 による細胞毒性は認められなかった。

2.6.4.7.2 In vivo

2.6.4.7.2.1 ラット

2.6.4.7.2.1.1 (Cronholm, et al., 1974): “Changes in vivo metabolism of bile acids in rat after treatment with phenobarbital”

この研究では、24-^{14}C コール酸を投与することにより、フェノバルビタールが Sprague - Dawley ラットのコール酸のプールサイズ及び代謝回転に及ぼす影響を検討している。

実験期間を通して 100 mg/kg 体重に相当する濃度のフェノバルビタールの生理食塩水溶液 1 mL を毎日腹腔内投与するグループと、同量の生理食塩水を投与するグループの 2 群を検討した。10 日間の投与後、[24-^{14}C]コール酸 0.1 mg を生理食塩水に溶解させて腹腔内投与した。その後、糞を 24 時間ごとに 10 日間採取した。採取期間後、総胆管にポリエチレンカニューレを導入して胆汁瘻を作り、胆汁を 12 時間採取した。

クロマトグラフィーを用いて、胆汁酸の代謝回転を評価した。コール酸のプールサイズを算出すると、胆管カニュレーション後最初の 12 時間に排泄された胆汁酸とほぼ同量であった。10 日間で糞中に排泄された 1 日当たりの ^{14}C の総量を算出した。コール酸の 1 日合成速度は、コール酸のプール、その代謝産物のデオキシコール酸及び[24-^{14}C]コール酸の半減排泄時間から計算した。表 2.6.4-6 は、ラットにおけるコール酸のプールサイズ及び代謝回転に対するフェノバルビタール処置の影響を示す。

表 2.6.4-7 は、ラットにおけるデオキシコール酸及びケノデオキシコール酸のプールサイズ及び代謝回転に対するフェノバルビタール処置の影響を示す。

フェノバルビタール処置ラットでは、対照ラットよりコール酸プールが低値であった（それぞれ 30.4 ± 10.45 mg/kg 及び 118 ± 38.3 mg/kg）。さらに、フェノバルビタール処置ラットでは、対照ラットよりコール酸の 1 日合成速度が低値であった（それぞれ 10.6 ± 2.3 mg/kg 及び 36.25 ± 8.3 mg/kg）。

デオキシコール酸及びケノデオキシコール酸の合成に対するフェノバルビタールの影響に有意差は認められなかった。しかし、フェノバルビタールはケノデオキシコール酸の半減排泄時間を有意に（< 0.05）減少させることが示された。

表 2.6.4-6: ラットにおけるコール酸のプールサイズ及び代謝回転に対するフェノバルビタール処置の影響

ラット	コール酸（mg/kg）	半減排泄時間（日）	排泄（mg/kg/日）
C1	111.75	2.20	35.75
C2	159.05	2.60	44.7
C3	83.25	2.10	28.15
平均	118 ± 38.3	2.30 ± 0.26	36.25 ± 8.3
PB1	41.2	2.30	12.85
PB2	20.35	1.85	8.3
PB3	29.7	2.15	10.7
平均	30.4 ± 10.45	2.10 ± 0.23	10.6 ± 2.3
P[a]	<0.02	NS	<0.01

C = 対照ラット、PB = フェノバルビタール処置ラット、NS = 有意性なし
a スチューデントの t 検定による

表 2.6.4-7: ラットにおけるデオキシコール酸及びケノデオキシコール酸のプールサイズ及び代謝回転に対するフェノバルビタール処置の影響

ラット	デオキシコール酸（mg/kg）	ケノデオキシコール酸（mg/kg）	ケノデオキシコール酸の半減排泄時間（日）	ケノデオキシコール酸の排泄時間（mg/kg/日）
C1	1.3	6.6	1.20	47.25
C2	8.4	17.2	1.10	45.3
C3	2.2	6.2	1.25	20.6
平均	3.95 ± 3.85	10 ± 6.25	1.18 ± 0.08	37.7 ± 14.85
PB1	1.45	17.95	1.05	61.5
PB2	1.75	20.75	0.95	40.1
PB3	3.55	24.55	1.00	44.55
平均	2.25 ± 1.15	21.1 ± 3.3	1.00 ± 0.05	48.7 ± 11.25
P[a]	NS	NS	<0.05	NS

C = 対照ラット、PB = フェノバルビタール処置ラット、NS = 有意性なし
a スチューデントの t 検定による

2.6.4.7.2.1.2　(Azer & Stacey, 1994): “Differential Effects of Cyclosporin A on Transport of Bile Acids by Rat Hepatocytes: Relationship to Individual Serum Bile Acid Levels.”

この研究では、体重 200～280 g の雄の Sprague-Dawley ラット由来の肝細胞への胆汁酸取込みに及ぼす CsA の影響を比較することにより、個々の血清胆汁酸濃度の変化を検討している。

- 血清胆汁酸に対する CsA 前処置の影響

1 日量 0.1、1 及び 10 mg/kg を 4 日間投与した CsA 処置ラットにおいて、個々の血清胆汁酸を高速液体クロマトグラフィーで測定した。対照群には、クレモフォール含有溶媒を投与した。

表 2.6.4-8 に示すように、CsA の 1 日量が多い（10 mg/kg）場合には対照群と比較して総血清胆汁酸、並びに CA、TCA、CDCA、DCA、TCDCA 及び TDCA の有意な増加が誘発されたが、最低 1 日量（0.1 mg/kg）では CA のみに影響を及ぼした。CA、TCA、CDCA 及び DCA については、明らかな用量-作用関係が認められた。

表 2.6.4-8: シクロスポリン A の用量をさまざまに変えた場合の個々の血清胆汁酸濃度の変化

ISBA	対照 [2]	CsA（mg/kg/日）[1]		
		0.1	**1**	**10**
GCA	0.4 ± 0.1[3]	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1
GCDCA	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.3
GDCA	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
GLCA	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
CA	2.2 ± 0.5	5.2 ± 0.5*	20.5 ± 2.9*	38.3 ± 3.4*
CDCA	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2.3 ± 0.7*	2.7 ± 0.5*
DCA	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1*	1.5 ± 0.2*
UDCA	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.0
TCA	1.8 ± 0.6	2.7 ± 1.0	8.1 ± 2.9*	26.3 ± 1.7*
TCDCA	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.3*	0.9 ± 0.3*
TDCA	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.2*
TUDCA	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
総胆汁酸	7.7 ± 1.0	11.7 ± 1.8	36.9 ± 5.7*	72.8 ± 3.6*

1 ラットに 4 日間 i.p.投与し、最終投与の 24 時間後に血清を採取した（各群 8 例）。
2 クレモフォール（1 mL/kg/日）を同じ要領で投与した対照（10 例）
3 濃度（μ mol/L）は平均値 ± SEM で示す
*それぞれの対照と統計的有意差あり（$p < 0.05$）
CA：コール酸、CDCA：ケノデオキシコール酸、CsA：シクロスポリン A、DCA：デオキシコール酸、DMSO：ジメチルスルホキシド、GCA：グリココール酸、GCDCA：グリコケノデオキシコール酸、GDCA：グ

リコデオキシコール酸、GLCA：グリコリトコール酸、IBSA：個々の血清胆汁酸、TCA：タウロコール酸、TCDCA：タウロケノデオキシコール酸、TDCA：タウロデオキシコール酸、TUDCA：タウロウルソデオキシコール酸、UDCA：ウルソデオキシコール酸。

- 胆汁酸取込みに対する CsA の影響

コール酸（CA）、グリココール酸（GCA）、ケノデオキシコール酸（CDCA）及びデオキシコール酸（DCA）を対象とする胆汁酸取込み実験では、単離肝細胞をジメチルスルホキシド（DMSO）中の CsA 又は対照の DMSO と共に 30 秒間プレインキュベーションした後、放射標識胆汁酸を 10～100 μM の最終濃度で添加した。

ラット肝細胞を 3、10、100 μM の CsA とインキュベートすると 4 種類とも取込みが阻害されたが、最低濃度（1 μM）では CA のみ取込みが阻害された（表 2.6.4-9）。CA、GCA 及び CDCA では K_m が有意に増加したものの V_{max} に変化はなく、各基質に対する CsA による競合阻害が示唆された。しかし、DCA では CsA によって K_m に有意な変化はみられなかったのに対して Vmax が有意に減少したため、取込みの阻害は非競合的であった。

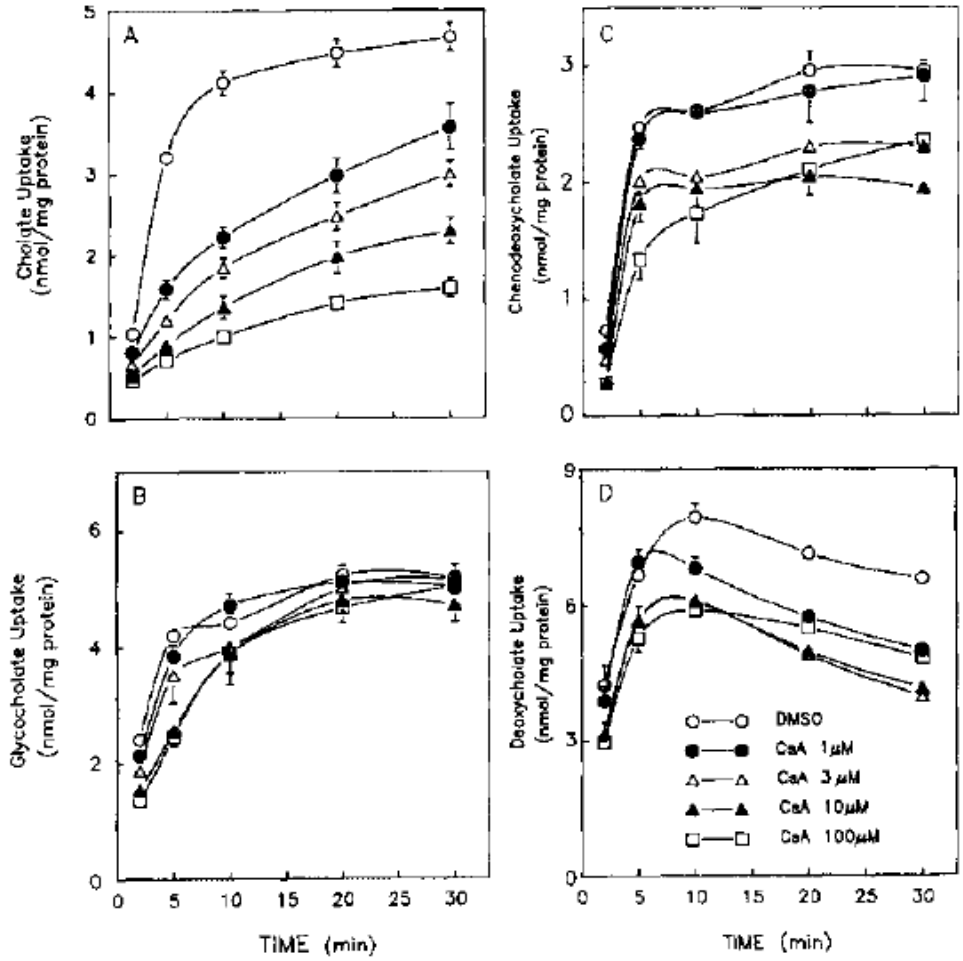
CsA（1、3、10、及び 100 μM）を単離肝細胞と共に長時間インキュベート（2～30 分）した場合に各胆汁酸の蓄積に及ぶ影響についても検討した。データから、CsA の存在下で CA、CDCA 及び DCA の肝細胞蓄積に対する有意な阻害が示されている。GCA は、CsA によって蓄積が阻害されなかった唯一の胆汁酸であった（図 2.6.4-10）。

表 2.6.4-9: 各濃度のシクロスポリン A 存在下におけるコール酸塩、グリココール酸塩、ケノデオキシコール酸塩及びデオキシコール酸塩輸送の見かけの速度論的パラメータ

	CsA 濃度（μM）				
胆汁酸	0	1	3	10	100
コール酸					
K_m	40.3 ± 2.3	61.5 ± 3.3*	84.6 ± 17.4*	244.3 ± 34.8*	484.3 ± 56.5*
V_{max}	1.03 ± 0.05	0.98 ± 0.03	0.93 ± 0.15	1.19 ± 0.14	1.43 ± 0.15
GCA					
K_m	43.9 ± 2.2	56.7 ± 11.1	71.9 ± 2.0*	118.3 ± 3.9*	138.8 ± 21.1*
V_{max}	2.34 ± 0.18	2.15 ± 0.28	2.05 ± 0.08	1.76 ± 0.09	1.75 ± 0.25
CDCA					
K_m	32.4 ± 1.4	40.1 ± 2.9	50.4 ± 3.5*	100.6 ± 2.5*	106.3 ± 12.4*
V_{max}	0.37 ± 0.03	0.39 ± 0.12	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.03
DC					
K_m	145.1 ± 15.9	118.5 ± 20.9	136.0 ± 9.3	155.2 ± 14.1	121.3 ± 3.2
V_{max}	8.93 ± 1.05	7.09 ± 1.06	5.95 ± 0.30*	4.39 ± 0.42*	2.99 ± 0.07*

注：各胆汁酸に関する Km（μM）及び Vmax（nmol· min-1· mg-1 protein）の値は、Eadie-Hofstee プロットから推定した。各値は、3～4 細胞標本の平均値 ± SEM を表す。
*対照と比較して有意差あり（$p < 0.05$）

図 2.6.4-10: DMSO 又は様々な濃度のシクロスポリン A で in vitro 処理した単離ラット肝細胞による基質蓄積



値は平均値 ± SEM を表す（n = 3）。（A）コール酸塩（25 μM）、（B）グリココール酸塩（25 μM）、（C）ケノデオキシコール酸塩（25 μM）、（D）デオキシコール酸塩（25 μM）

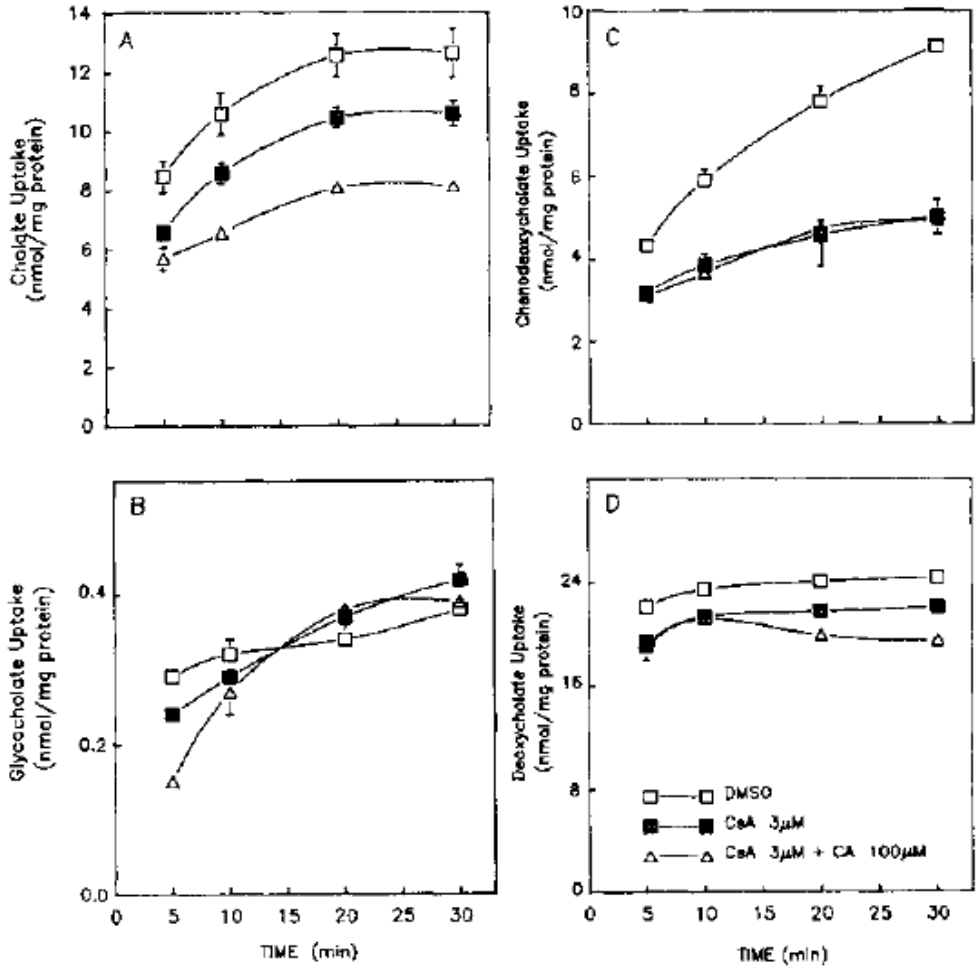
単離ラット肝細胞では、[^{14}C]コール酸、[^{14}C]ケノデオキシコール酸及び[^{14}C]デオキシコール酸の初期取込み率及び蓄積率の阻害がそれぞれの血清胆汁酸の変化と一致した。

コール酸との共インキュベーションの影響

コール酸が CsA 処置ラットの血清中の主要な胆汁酸であったため、コール酸以外の胆汁酸の肝細胞蓄積に対するコール酸及び CsA の影響を検討した。3 μM の CsA を添加した後、肝細胞を 100 μM のコール酸と共に 1 分 20 秒間インキュベートし、放射性胆汁酸を添加した（各フラスコにつき胆汁酸 1 種）。

ラット肝細胞を非標識コール酸と共インキュベートすると、[^{14}C]コール酸及び[^{14}C]デオキシコール酸の蓄積に対する阻害作用が強まった（図 2.6.4-11 A 及び図 2.6.4-11 D）。コール酸が存在しても CDCA の蓄積阻害は強まらなかった（図 2.6.4-11 C）。さらに、ラット肝細胞を 100 μM のコール酸及びシクロスポリン A で共インキュベートしても、グリココール酸塩の蓄積は阻害されなかった（図 2.6.4-11 B）。

図 2.6.4-11: コール酸(100 μM)及び CsA(3 μM)の条件下での単離ラット肝細胞による基質蓄積



（A）コール酸塩（100 μM）、（B）グリココール酸塩（2 μM）、（C）ケノデオキシコール酸塩（100 μM）、（D）デオキシコール酸塩（100 μM）

全体として、シクロスポリン A 処置ラットにおける個々の血清胆汁酸の変化は、同ラットの肝細胞蓄積に対するシクロスポリン A の影響と一致していた。この研究により、CsA にはコール酸、CDCA 及び DCA の肝細胞への初期取込みに及ぶ迅速な濃度依存性の阻害作用があることが示された。コール酸は、in vivo 試験でも in vitro 実験でも CsA の作用に最も感受性の高い胆汁酸であった。

2.6.4.7.3　In vitro

2.6.4.7.3.1　ラット

2.6.4.7.3.1.1　(Barth, et al., 2006): “Influence of Verapamil and Cyclosporin A on bile acid metabolism and transport in rat liver slices.”

この研究の目的は、カルシウムチャンネルブロッカーであるベラパミル（V）及び免疫抑制薬である CsA が単離ラット肝スライス内での胆汁酸の代謝及び輸送に及ぼす影響を検討することであった。

ベラパミル及びCsAは、肝細胞小管膜のP糖タンパク質（MDR1）の特異的阻害剤であり、CsAには肝臓に対して潜在的な胆汁うっ滞性の有害作用があって別の輸送体との相互作用がみられる。胆汁酸はMDR1によって輸送されない。

この研究では、外因性コール酸及びタウロウルソデオキシコール酸（TUDCA）によって肝胆汁酸蓄積及びトランスポーターアップレギュレーションが発生している条件下でベラパミル及びCsAが及ぼす影響を検討した。

34～40日齢の雄のWistarラットから精密切断肝スライスを採取し、肝輸送及び合成機能の内因性マーカーとして26種類の遊離胆汁酸及び抱合型胆汁酸を用いた。4つの肝スライスの一部分ずつをKrebs-Henseleit緩衝液（KHB）中で4時間インキュベーションした。インキュベーションの条件はベラパミル（100 µM）の存在下、CsA（5 µM）の存在下、コール酸（5 µM）の存在下及びT-UDCA（5 µM）の存在下のほか、胆汁酸を補充した条件を検討するためにベラパミルにコール酸又はTUDCAを追加した条件及びCsAにコール酸又はTUDCAを追加した条件とした。対照のインキュベーションには、ベラパミル、CsA及び胆汁酸を添加しなかった。

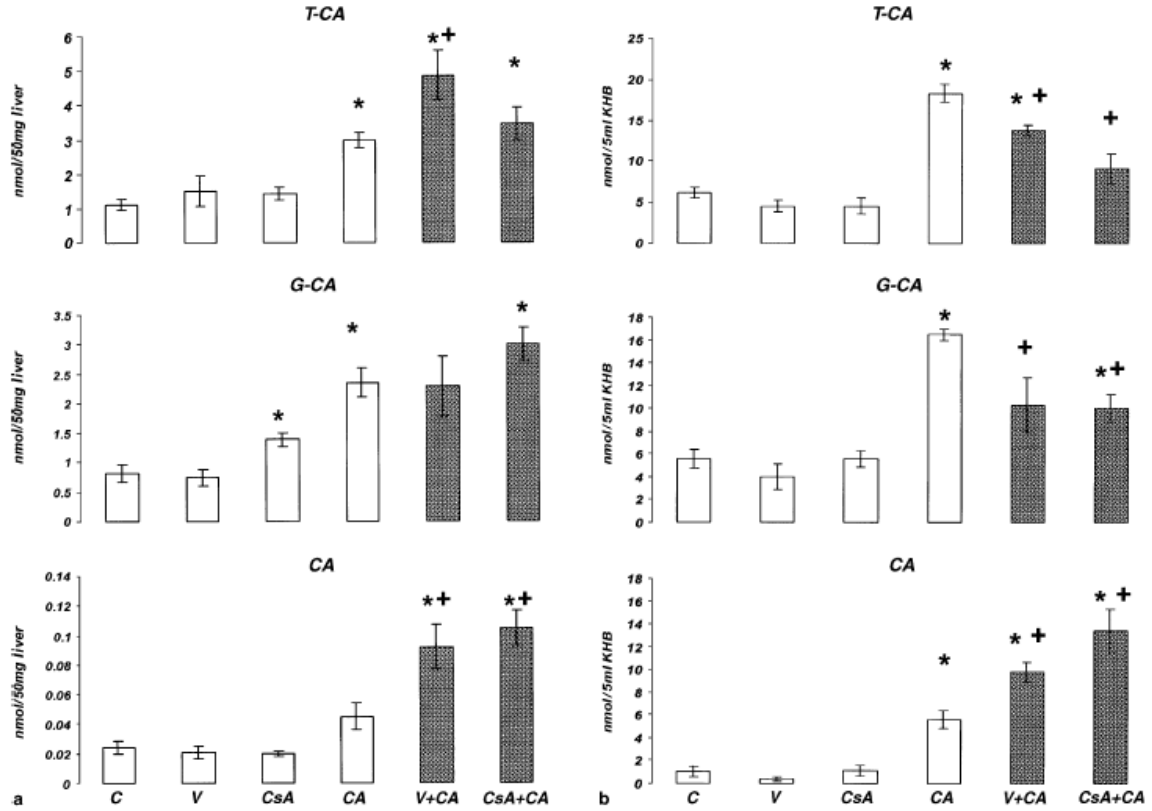
ベラパミル又はCsA単独により、肝組織及び培地中のコール酸濃度は変化しなかった。培地（25 nmol CA/5 mL KHB）にコール酸のみを添加すると、スライス中のTCA及びGCAのほか、培地中の抱合型及び遊離コール酸が有意に増加した（図 2.6.4-12）。コール酸負荷条件下では、ベラパミルは肝組織中のコール酸及びTCA濃度を有意に高めたが、CsAはコール酸の単独添加と比較してスライス中のコール酸濃度のみを増加させた（図 2.6.4-12）。

ベラパミル及びCsAによって培地ではコール酸媒介性に高値となっていたTCA濃度及びGCA濃度が有意に低下したが、コール酸測定値の部分については両薬剤によって増加量が増しており、この傾向が培地でもみられた（図 2.6.4-12）。非抱合コール酸濃度については、スライスではベラパミル存在下の方がCsA存在下より高値であったが、培地ではCsA存在下の値がベラパミル存在下の2倍であったことから、取込み後の排泄ではなくベラパミルによるコール酸の取込みであることが示されている。

コール酸により、スライス中及び培地中のT-及びG-抱合胆汁酸を含め総胆汁酸が増加した。

ベラパミル及びCsAが示す胆汁酸の輸送及び代謝に及ぼす類似の作用は、個々の胆汁酸トランスポーターの阻害ではなく、MDR1を介した細胞のATP輸送の妨害によって説明できる。

図 2.6.4-12: ベラパミル(V 100 μM)、シクロスポリン A(CsA 5 μM)、コール酸(CA 5 μM)、V＋CA 又は CsA＋CA を添加して 4 時間インキュベーションした後の肝スライス中(パート A)及び培地(パート B)中の遊離 CA 濃度



C＝ 対照、V：ベラパミル、シクロスポリン A（CsA）、CA：コール酸、n＝6、平均 ± SEM、*C との有意差あり、+CA 単独との有意差あり。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

コール酸に関する他の薬物動態試験は確認されなかった。

2.6.4.9　考察及び結論

- 吸収

吸収試験の結果、コール酸プールサイズはマウス及びラットでそれぞれ 168 ± 21 及び 106 ± 12 µmol/ kg であった。これはマウス及びラットに対してそれぞれ 68.5 ± 8.6 及び 43.2 ± 4.9 mg/kg に相当する (Hulzebos, et al., 2001)。この研究結果は、ラットのプールサイズの平均値を (Hulzebos, et al., 2001)による報告値の 2 倍に相当する 118 ± 38.3 mg/kg と報告した (Cronholm, et al., 1974)による研究と一致していない。代謝回転率（FTR）値はマウス及びラットでそれぞれ 0.44 ± 0.03 及び 0.88 ± 0.10 であり、対応する合成速度はそれぞれ 7.3 ± 1.6 及び 9.3 ± 0.1 であった (Hulzebos, et al., 2001)。また、コール酸は、腸の近位部ではなく主に遠位部で吸収されることが報告された (Weiner & Lack, 1962)。ヒトと比較して、マウス及びラットのコール酸プールサイズは約 4〜6 倍である (Hulzebos, et al., 2001)。しかし、 (Hulzebos, et al., 2001)はコール酸プールサイズが過小評価されている可能性があるとしている。胆汁を収集する際に大量の試料を採取することで、コール酸プールサイズが減少した可能性があり、過小評価が生じたことが示唆された (Hulzebos, et al., 2001)。このことから、 (Hulzebos, et al., 2001)と (Cronholm, et al., 1974)の結果の不一致を説明できると思われる。

- 分布

胎盤通過性試験では、胆管結紮後に母体血漿胆汁酸が 30 倍増加したにもかかわらず、胎児胆汁酸の大幅な増加は認められず、胎盤を通過する胆汁酸の移行は小さいことが示唆された (Hassan & Subbiah, 1980)。さらに、胆管結紮ラットからの胎児（妊娠 21 日目）における胆汁酸プールサイズは対照胎児よりもむしろ低値であった。しかし、アカゲザルの胎児において注入された[^{14}C]コール酸塩投与量の平均 30%に、胎児から母体への胎盤通過が認められた (Little, et al., 1975)。

興味深いことに、 (Perez, et al., 1994)によって行われたヒツジの研究は、 (Hassan & Subbiah, 1980)の所見と矛盾し、母体に 29 mg のコール酸をボーラス注射した後に胎児血清中のコール酸濃度が有意に上昇することを示した（2.6.6.6.2.2 項）。 (Campos, et al., 1986)は、胎児血漿中のコール酸濃度の有意な上昇が雌ヒツジの早期分娩につながったことを報告した（2.6.6.6.2.2 項）。入手可能なデータからは、これらの相違が実験デザインによるものか、実際の種差によるものかは不明である。

注目すべきことに、アカゲザルの胎児の血漿、胆汁、肝臓及び腸管に測定可能な量の放射標識が認められたが、他の胎児組織には認められなかったことが報告された (Little, et al., 1975)（図 2.6.4-3）。

- 排泄

排泄（排泄の経路及び程度）試験により、非抱合型で検出されるコール酸はごく少量であることが示された (Lindstedt & Norman, 1955)。さらに、標識コール酸及び標識ケノデオキシコール酸を同時に投与した後に、糞試料のクロマトグラム上で認められたさまざまなバンドは、環標識コレステロールの投与後に認められるものと同じである。

- 薬物動態学的薬物相互作用

コール酸と、MDR1（P-糖タンパク質）と強く相互作用する薬剤、特にCsA及びベラパミルとの間に、in vitro及びin vivoにおける薬物動態学的薬物相互作用が認められている。両薬剤は小管のMDR1を阻害するが、小管胆汁酸トランスポーターであるBSEPとの相互作用は未だに不明である。

CsAは、高用量では、全動物の血清コール酸濃度を対照と比較して有意に上昇させた (Azer & Stacey, 1994)。単離ラット肝細胞では、コール酸の初期取込み率及び蓄積率の阻害は、それぞれの血清胆汁酸の変化と一致した。ラット肝細胞を非標識コール酸と共インキュベートすると、放射標識コール酸蓄積に対する阻害作用が強まった。

培養肝スライスでは、ベラパミル（V）単独及びCsA単独では肝組織中及び培地中のコール酸濃度が変化しなかった (Barth, et al., 2006)。培地にコール酸のみを添加すると、培地中の遊離コール酸が有意に増加した。コール酸負荷条件下では、ベラパミルによって肝組織中のコール酸及びタウロコール酸濃度が有意に高まったが、CsAではコール酸の単独添加後に認められた値と比較してスライス中のコール酸濃度のみが増加した。ベラパミル相互作用のIn vivoでの意義は、これらの試験からは明らかではない。

薬物動態学的薬物相互作用の研究により、フェノバルビタール治療は、ラットの回腸における胆汁酸塩の輸送能（V_{max}）を2倍に有意に増加させることがさらに示された (Ostrower, et al., 1974)。 (Cronholm, et al., 1974)では、ラットにフェノバルビタールを10日間投与すると、対照群のラットと比較してコール酸プールが4分の1になることが示された。さらに、フェノバルビタール処置ラットでは、対照ラットと比較して、コール酸の産生が減少した。興味深いことに、デオキシコール酸及びケノデオキシコール酸の合成に対しては、フェノバルビタールの効果に有意差は認められなかった。しかし、フェノバルビタールはケノデオキシコール酸の半減排泄時間を有意に（< 0.05）減少させることが示された。

対照的に、サルではフェノバルビタールによって胆汁酸合成の最大速度が増加したうえ、肝臓に戻る胆汁酸塩が胆汁酸塩合成を阻害する正常な制御機構を変化させた (Redinger & Small, 1973)。この所見は、ヒトにおけるフェノバルビタールの作用を検討した臨床試験と一致している（2.7.2 項）。その結果、フェノバルビタールは、胆汁酸の負のフィードバック阻害を阻害することにより胆汁酸産生を増加させると考えられる。

- 結論

コール酸の重要な薬力学的パラメータであるプールサイズ、代謝回転率及び1日の合成速度がげっ歯類で測定されており、ヒトとは異なることがわかっている。コール酸の母体から胎児への胎盤移行は、入手可能なデータからは可能性を排除することはできない。コール酸の代謝産物（二次及び三次胆汁酸）は主に糞中に排泄される。シクロスポリンAはコール酸と薬理学的に意味のある相互作用を起こす可能性があるが、ベラパミルとの潜在的相互作用の意義は評価した実験からは明らかではない。フェノバルビタールはコール酸と薬物動態学的に相互作用し、ラットでは、コール酸の回腸吸収を増加させてコール酸の合成を減少させる結果、コール酸プールサ

イズが小さくなった。対照的に、サルではフェノバルビタールによって胆汁酸合成の最大速度が増加したうえ、肝臓に戻る胆汁酸塩が胆汁酸塩合成を阻害する正常な制御機構を変化させた。

2.6.4.10 図表

本文書で取り上げた全試験の全容を示す表については、非臨床薬物動態試験の概要表（2.6.5 項を参照）を参照のこと。補足のため追加の図表を本文書に記載している。

2.6.4.11 参照文献

Azer, S. A. & Stacey, N. H., 1994. *Differential effects of cyclosporin A on transport of bile acids by rat hepatocytes: relationship to individual serum bile acid levels.,* : Toxicol Appl Pharmacol 124(2): 302-9.

Barth, A., Braun, J. & Müller, D., 2006. *Influence of Verapamil and Cyclosporin A on bile acid metabolism and transport in rat liver slices.,* : Exp Toxicol Pathol 58(1): 31-7.

Campos, G. A., Guerra, F. A. & Israel, E. J., 1986. *Effects of cholic acid infusion in fetal lambs.,* : Acta Obstet Gynecol Scand 65(1): 23-6.

Carrella, M. & Dietschy, J. M., 1977. *Comparison of the effects of cholic acid and chenic acid feeding on rates of cholesterol synthesis in the liver of the rat.,* : Am J Dig Dis 22(4): 318-26.

Cronholm, T., Einarsson, K. & Gustafsson, J. A., 1974. *Changes in in vivo metabolism of bile acids in rat after treatment with phenobarbital.,* : Lipids 9(11): 844-9.

Hassan, A. S. & Subbiah, M. T., 1980. *Bile acids in the fetal rat: effect of maternal bile duct ligation.,* : Steroids 36(6): 709-15.

Hulzebos, C. V. et al., 2001. *Measurement of parameters of cholic acid kinetics in plasma using a microscale stable isotope dilution technique: application to rodents and humans.,* : J Lipid Res 42(11): 1923-9.

Lindstedt, S. & Norman, A., 1955. *On the excretion of bile acid derivatives in feces of rats fed cholic acid-2414C and chenodesoxycholic acid-2414C; bile acids and steroids 19.,* : Acta Physiol Scand 34(1): 1-10.

Little, J. M. et al., 1975. *Bile-salt metabolism in the primate fetus.,* : Gastroenterology 69(6): 1315-20.

Ostrower, V. S., Coan, P. & Kern Jr, F., 1974. *Effect of phenobarbital on intestinal cholic acid absorption in the rat.,* : Gastroenterology 67(6): 1162-8.

Perez, R. et al., 1994. *A single intravenous high dose of cholic acid to a pregnant ewe does not affect fetal well-being.,* : Res Exp Med (Berl) 194(1): 63-7.

Redinger, R. N. & Small, D. M., 1973. *Primate biliary physiology. 8. The effect of phenobarbital upon bile salt synthesis and pool size, biliary lipid secretion, and bile composition.,* : J Clin Invest 52(1): 161-72.

Ryu , H.-J.et al., 2021. *Evaluation for Potential Drug-Drug Interaction of MT921 Using In Vitro Studies and Physiologically-Based Pharmacokinetic Models,* : Pharmaceuticals (Basel) 14(7): 654-70.

Weiner, I. M. & Lack, L., 1962. *Absorption of bile salts from the small intestine in vivo.,* : Am J Physiol 202: 155-7.