目次

略語・略号一覧 2
2.6.4 薬物動態試験の概要文 3
2.6.4.1 まとめ 3
2.6.4.1.1 吸収 3
2.6.4.1.2 分布 3
2.6.4.1.3 代謝 3
2.6.4.1.4 排泄 3
2.6.4.1.5 薬物動態学的薬物相互作用 4
2.6.4.2 分析法 5
2.6.4.3 吸収 6
2.6.4.3.1 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-1） 6
2.6.4.3.2 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-2） 8
2.6.4.3.3 ヒスチジンの効果（ラット回腸かん流法） 9
2.6.4.3.4 塩化亜鉛の経口吸収率（ラット経口投与） 10
2.6.4.4 分布 11
2.6.4.4.1 全身 ARG 及び組織中放射能濃度（マウス静脈内投与） 11
2.6.4.4.2 組織中放射能濃度（ラット静脈内投与） 13
2.6.4.4.3 組織中放射能濃度（ラット筋肉内投与） 14
2.6.4.4.4 組織中亜鉛濃度（ラット反復経口投与） 15
2.6.4.4.5 組織中亜鉛濃度に対するヒスチジンの効果（ラット反復経口投与） 16
2.6.4.4.6 たん白結合（in vitro） 17
2.6.4.4.7 血球移行（in vitro） 18
2.6.4.4.8 胎盤通過（ラット経口投与） 19
2.6.4.4.9 尿細管細胞への取込み（in vitro） 20
2.6.4.5 代謝 21
2.6.4.6 排泄 21
2.6.4.6.1 尿中亜鉛排泄に対するヒスチジンの効果（ラット経口投与） 21
2.6.4.6.2 尿中亜鉛排泄に対するヒスチジンの効果（イヌ静脈内投与） 22
2.6.4.6.3 尿糞中排泄（ラット経口投与及び静脈内投与） 23
2.6.4.6.4 胆汁中排泄（イヌ静脈内投与） 23
2.6.4.6.5 膵液中排泄（イヌ静脈内投与） 24
2.6.4.6.6 十二指腸分泌（イヌ静脈内投与） 24
2.6.4.6.7 乳汁中排泄（ラット腹腔内投与） 24
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 24
2.6.4.8 考察及び結論 25
2.6.4.9 図表 31
2.6.4.10 参考文献 31

略語・略号一覧

略語・略号	内容
$^{65}ZnCl_2$	[^{65}Zn]標識 zinc chloride
$^{65}ZnHis$	[^{65}Zn]標識 zinc histidinate、[^{65}Zn]標識ヒスチジン酸亜鉛
$^{65}ZnPA_2$	[^{65}Zn]標識 zinc dipicolinate、[^{65}Zn]標識ジピコリン酸亜鉛
$^{65}Zn(opt)_2$	[^{65}Zn]標識 di(1-oxy-2-pyridinethiolato)zinc
$^{65}Zn(His)_2$	[^{65}Zn]標識 di(L-histidinato)zinc
ARG	オートラジオグラフィー／オートラジオグラム
AUC	薬物濃度-時間曲線下面積
Bq	becquerel
BW	body weight、体重
Ci	curie
cpm	counts per minute
dpm	disintegration per minute
eq	当量
h	hour、時間
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
L	Liter、リットル
MDZnO	微細化酸化亜鉛
min	Minute、分
n	例数
ppm	parts per million
T_{max}	最高血中濃度到達時間
Zn	zinc、亜鉛
ZnO	酸化亜鉛

2.6.4 薬物動態試験の概要文

ヒスチジン亜鉛の薬物動態を公表文献に基づいて評価した。ヒスチジン亜鉛自体を被験物質とした文献及び亜鉛の薬物動態に対するヒスチジンの効果を論じた文献に加えて、その他の亜鉛塩を被験物質とした文献も含めて取りまとめた。

2.6.4.1 まとめ

2.6.4.1.1 吸収

ラットに硫酸亜鉛又は酸化亜鉛を単回経口投与したとき、ヒスチジンの併用投与により、血清中亜鉛濃度の上昇傾向が認められた。

$^{65}ZnCl_2$ をラットに単回経口投与したときの吸収率は約 25%であった。

2.6.4.1.2 分布

$^{65}ZnCl_2$ 又は $^{65}Zn(His)_2$ をマウスに単回静脈内投与したときの放射能の組織分布は良く一致し、相違は認められなかった。内因性レベルを超える高濃度の血漿中ヒスチジンは亜鉛の組織移行性に影響を与えたが、内因性レベルでは大きな影響は与えないと考えられた。

$^{65}ZnCl_2$ を妊娠ラットに経口投与したとき、胎仔への放射能の移行が認められた。

2.6.4.1.3 代謝

ヒスチジン亜鉛水和物（以下、本薬）は亜鉛とヒスチジンのキレート錯体であり、消化管内又は体内で亜鉛とヒスチジンに解離すると考えられるが、亜鉛はそれ以上代謝されない。解離したヒスチジンは食餌由来あるいは内因性のヒスチジンと同様に代謝、排泄又は再利用されるものと考えられる。

2.6.4.1.4 排泄

高用量のヒスチジン投与は亜鉛の尿中排泄を促進したが、本薬投与に伴うヒスチジンの投与量では大きな影響は与えないと考えられた。

$^{65}ZnCl_2$ をラットに単回経口投与したとき、投与後 48 時間までに投与放射能の 80.3%が糞中に排泄された。尿中排泄率はわずかであり、投与量の 0.2%を超えることはなかった。

$^{65}ZnCl_2$ をイヌに静脈内投与したとき、膵液及び十二指腸中に放射能が検出されたが、胆汁への排泄はわずかであった。

$^{65}ZnCl_2$ を授乳ラットに腹腔内投与したとき、乳汁を介した乳仔への放射能の移行が認められた。

2.6.4.1.5 薬物動態学的薬物相互作用

分布及び排泄の項に記載したように、高濃度の血漿中ヒスチジンは亜鉛の体内動態に影響を与える潜在力を有することから、他の 2 価金属についても同様の影響を与えうると考えられる。しかしながら、本薬投与時の血漿中ヒスチジン濃度は内因性レベルから大きくは変化しないと考えられることから、本薬投与時にヒスチジンに由来する薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.6.4.2 分析法

該当する試験を実施していない。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-1）

＜添付資料 4.2.2.2-1 参＞

硫酸亜鉛を雄性ラットに単回経口投与（5、10 及び 20 mg Zn/kg）した時の血清中亜鉛濃度推移を図 2.6.4-1 に示した。いずれの投与量でも、投与後 1 時間に最高血清中濃度を示した後、投与後 6 時間までにベースラインまで低下した。

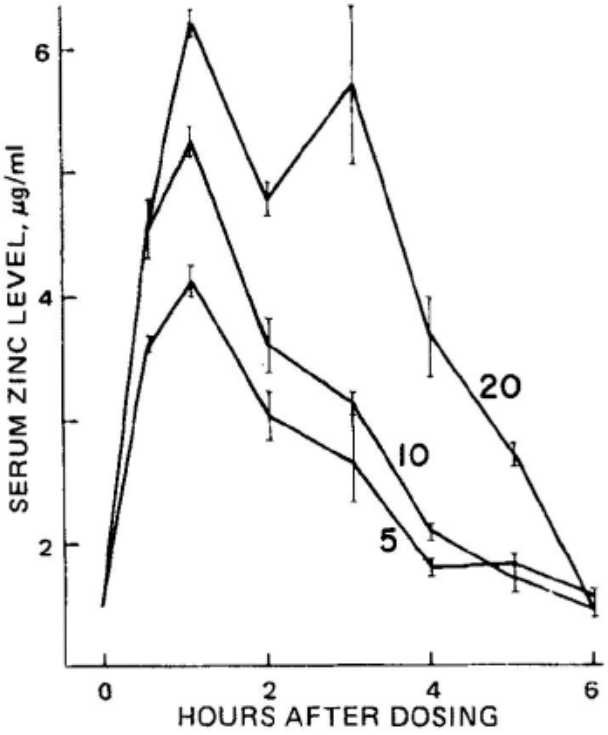


図 2.6.4-1 硫酸亜鉛を単回経口投与した時の血清中亜鉛濃度推移
（5、10 及び 20 mg Zn/kg、平均値±標準誤差）

図 2.6.4-1 に示した 10 mg Zn/kg 投与時の血清中亜鉛濃度（Control）に対して、各種リガンドの併用投与の効果を検討した結果を表 2.6.4-1 に示した。亜鉛の経口吸収を阻害することが知られている Sodium phytate を併用投与（亜鉛に対するモル比＝1:1）したとき、血清中亜鉛濃度は有意に低下した。一方、各種アミノ酸を併用投与（亜鉛：アミノ酸モル比＝1:2）したときには血清中亜鉛濃度の低下は認められず、Lysine、Cysteine、Glycine を併用投与した場合には血清中亜鉛濃度の有意な上昇が認められた。Histidine を併用投与した場合には、有意差は認められなかったものの、有意差の認められた Lysine（5.91 μg/mL）及び Cysteine（5.97 μg/mL）と比較しても高い血清中亜鉛濃度（6.23 μg/mL）が認められた。各アミノ酸の効果は大きく異なるものではなかった。

表 2.6.4-1 硫酸亜鉛を単独投与及びアミノ酸と併用投与したときの血清中亜鉛濃度

併用アミノ酸	亜鉛：リガンド モル比	血清中亜鉛濃度（μg/mL） 平均値±標準誤差 a)	
		1 h	4 h
Sodium phytate	1:1	1.50±0.02 (6) b)	1.69±0.03 (5) b)
なし (Control)	1:0	5.29±0.12 (15)	2.12±0.06 (16)
Asparagine	1:2	5.42±0.16 (6)	2.77±0.24 (5)
Lysine	1:2	5.91±0.13 (6) d)	2.38±0.07 (5)
Cysteine	1:2	5.97±0.15 (12) d)	– c)
Histidine	1:2	6.23±0.58 (6)	– c)
Glycine	1:2	6.61±0.42 (6) d)	– c)

a：表中カッコ内の数値は動物数
b：Control に対して有意に低値（P<0.005）
c：投与後 3 時間に測定され、Control に対する有意差は認められなかった
d：Control に対して有意に高値（P<0.005）

2.6.4.3.2 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-2）

＜添付資料 4.2.2.2-2 参＞

実験開始前に 3 週間低亜鉛飼料を与えた雄性ラットに酸化亜鉛（ZnO）又は微細化酸化亜鉛（MDZnO）を単独経口投与（1 mg Zn/kg）したときの血清中亜鉛濃度に対する Histidine（図中では His と表示）併用投与（3.2 mg Histidine/kg、亜鉛：Histidine モル比＝1:1.3）の効果を検討した（図 2.6.4-2）。

MDZnO と Histidine を併用投与することにより、血清中亜鉛濃度は Control（ミリポア水投与）に対して有意に高値を示し、MDZnO 単独投与よりも高値を示した。

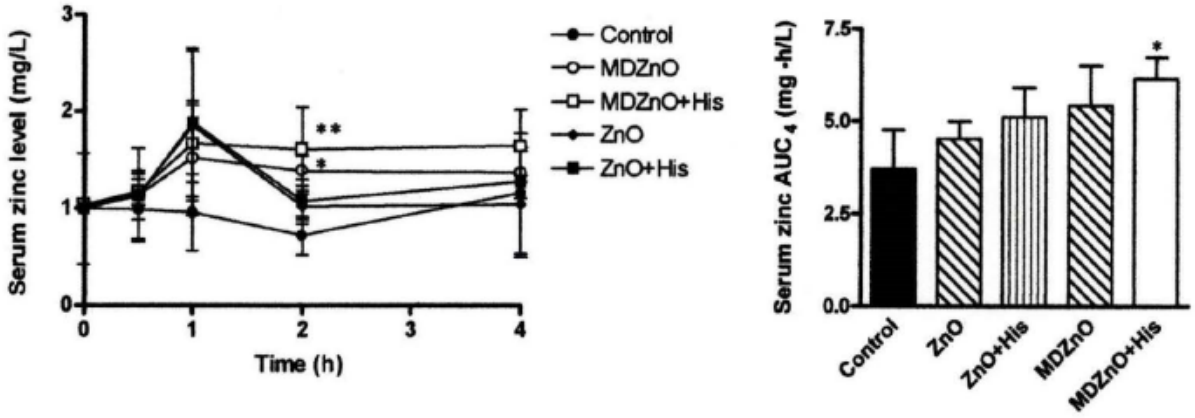


図 2.6.4-2 血清中亜鉛濃度に対するヒスチジン併用投与の効果

左図：投与後の血清中亜鉛濃度推移、右図：投与後 4 時間までの AUC（mg･h/L）

平均値±標準偏差（n=4、ZnO+His のみ n=3）

＊：Control（ミリポア水投与）に対して P<0.05、＊＊：Control に対して P<0.01

2.6.4.3.3 ヒスチジンの効果（ラット回腸かん流法）

＜添付資料 4.2.2.2-3 参＞

亜鉛の消化管吸収に対するヒスチジンの効果をラット回腸かん流法により検討した。

回腸末端から上流へ 5 cm 付近及びその上流 20～30 cm 付近にカテーテルを挿入し、亜鉛（0.153 mmol/L）と種々の濃度の L-又は D-Histidine を含むかん流液を 0.18～0.22 mL/分の速度でかん流した。かん流液を採取して亜鉛濃度を測定し、亜鉛の吸収速度を算出し、図 2.6.4-3 に示した。

L-及び D-Histidine：亜鉛のモル比が小さい場合、L-Histidine 存在下での亜鉛吸収速度は D-Histidine 存在下と比較して有意に高値を示したが、Histidine モル比の上昇に伴い、L-Histidine の亜鉛吸収速度が低下し、D-Histidine との差は消失した。D-Histidine の増加に伴う亜鉛吸収速度の低下はわずかであった。このように、回腸での亜鉛吸収に対する効果は、L-及び D-Histidine で大きく異なり、立体選択性が認められた。

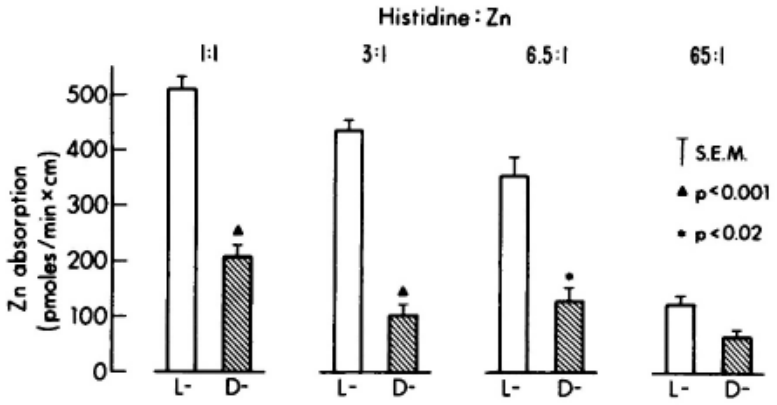


図 2.6.4-3 回腸の亜鉛吸収速度に対する L-及び D-Histidine の効果

平均値±標準誤差

▲、●：それぞれの Histidine：亜鉛のモル比における L-Histidine に対する有意差

2.6.4.3.4 塩化亜鉛の経口吸収率（ラット経口投与）

＜添付資料 4.2.2.2-4 参＞

SD 系雄ラットに $^{65}ZnCl_2$ を単回経口投与（1.23 μg）したときの消化管内の残存放射能及び糞中放射能を測定し、見掛けの吸収率を求め表 2.6.4-2 に示した。

消化管内残存放射能は投与後 15 分に最大値 89.9%が回収され、投与後 30 分には 74.6%に、投与後 8 時間には 65.9%に低下した。糞は投与後 3 時間以降に排泄され、糞中への放射能排泄率は時間の経過とともに増加した。投与放射能から消化管内残存放射能及び糞中放射能を差し引いて求めた見掛けの吸収率は、投与後 30 分から 8 時間にかけて 25%程度で推移した。このことから、経口投与した $^{65}ZnCl_2$ は投与後 30 分には約 25%が吸収されると考えられた。

表 2.6.4-2 ラットに $^{65}ZnCl_2$ を単回経口投与したときの見掛けの吸収率

投与後時間	放射能（% of dose）[a]			
	消化管内残存放射能	糞中放射能	消化管内残存放射能＋糞中放射能	見掛けの吸収率 [b]
15 min	89.9	-	89.9	11.1
30 min	74.6	-	74.6	25.4
1 h	75.5	-	75.5	24.5
2 h	77.6	-	77.6	22.4
3 h	75.9	-	75.9	24.1
4 h	72.1	2.9	75.0	25.0
6 h	72.8	3.0	75.8	24.2
8 h	65.9	8.8	74.7	25.3
24 h	5.0	78.2	83.2	16.8
48 h	3.1	80.3	83.4	16.6

a：平均値（n=6）
b：見掛けの吸収率(%)={投与放射能-(消化管内残存放射能+糞中放射能)}／投与放射能×100
-：糞をしていない

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 全身 ARG 及び組織中放射能濃度（マウス静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-1 参＞

$^{65}Zn(opt)_2$、$^{65}ZnCl_2$ 又は $^{65}Zn(His)_2$ をマウスに静脈内投与後、2 時間ごとに作成した放射能のイメージング画像を図 2.6.4-4 に示した。白い矢印は特徴的な放射能の蓄積を示す。すべての亜鉛化合物において、肝臓に高濃度の放射能が認められた。$^{65}Zn(opt)_2$ 投与後には心臓に高濃度の放射能が検出されたが、$^{65}ZnCl_2$ 及び $^{65}Zn(His)_2$ 投与後ではほとんど認められなかった。

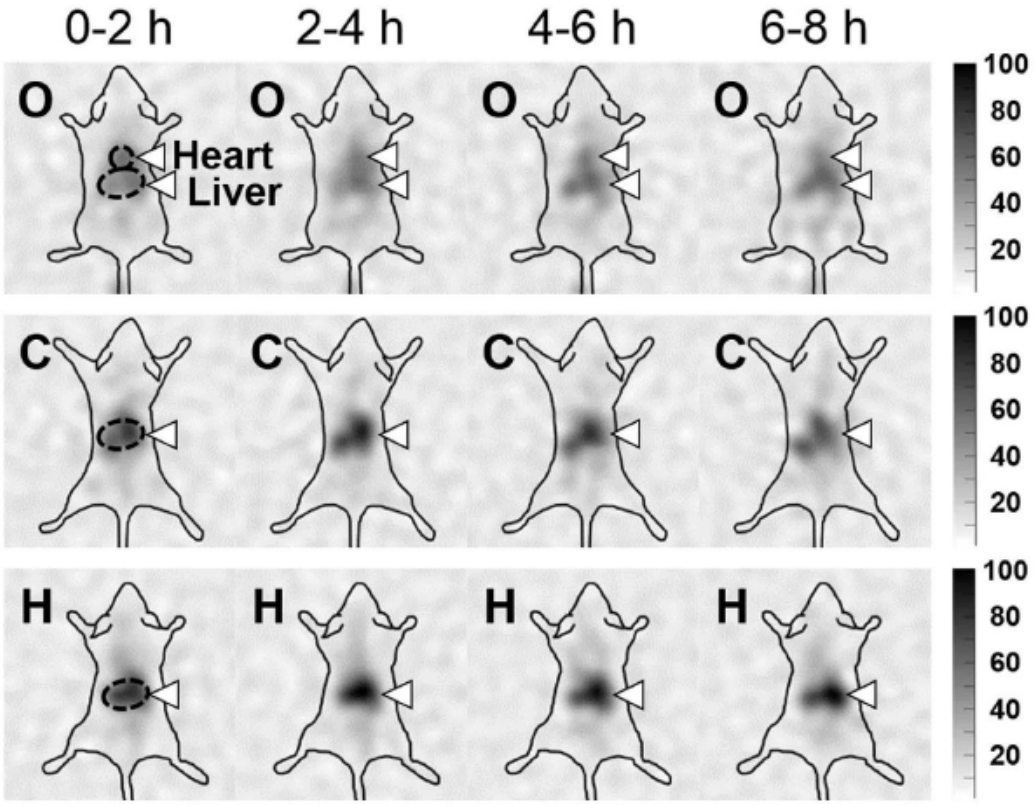


図 2.6.4-4 Gamma-ray emission imaging による ^{65}Zn の分布

上段（O）：$^{65}Zn(opt)_2$、中段（C）：$^{65}ZnCl_2$、下段（H）：$^{65}Zn(His)_2$

肝臓と心臓については、円で囲んだ部分の放射能強度を定量し、図 2.6.4-5 に示した。$^{65}ZnCl_2$ 及び $^{65}Zn(His)_2$ 投与後の肝臓及び心臓中放射能は同程度であり、その放射能は $^{65}Zn(opt)_2$ 投与後と比較すると肝臓では高く、心臓では低かった。

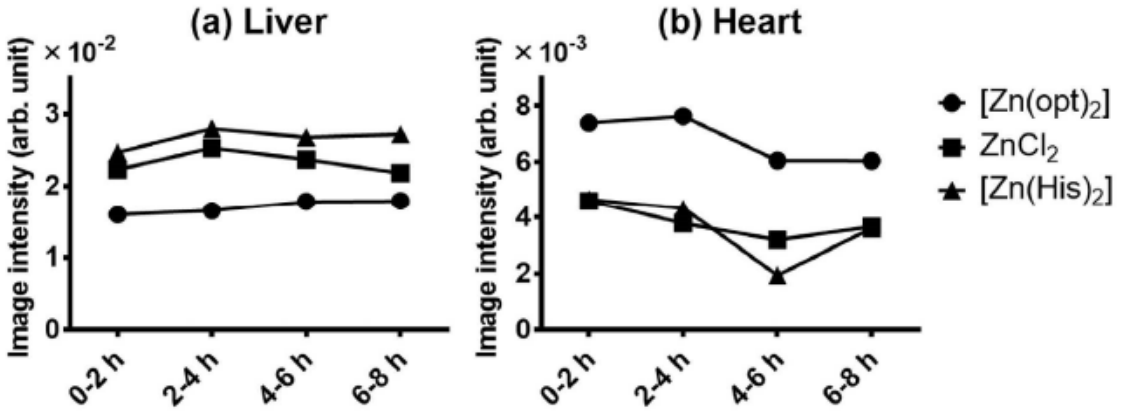


図 2.6.4-5 肝臓及び心臓における放射能強度の推移

$^{65}Zn(opt)_2$、$^{65}ZnCl_2$ 又は $^{65}Zn(His)_2$ をマウスに静脈内投与後 4 時間における心臓、膵臓、肝臓、腎臓及び胃への放射能取込み量（% of dose）及び血液中放射能濃度（% of dose/g）を測定し、図 2.6.4-6 に示した。

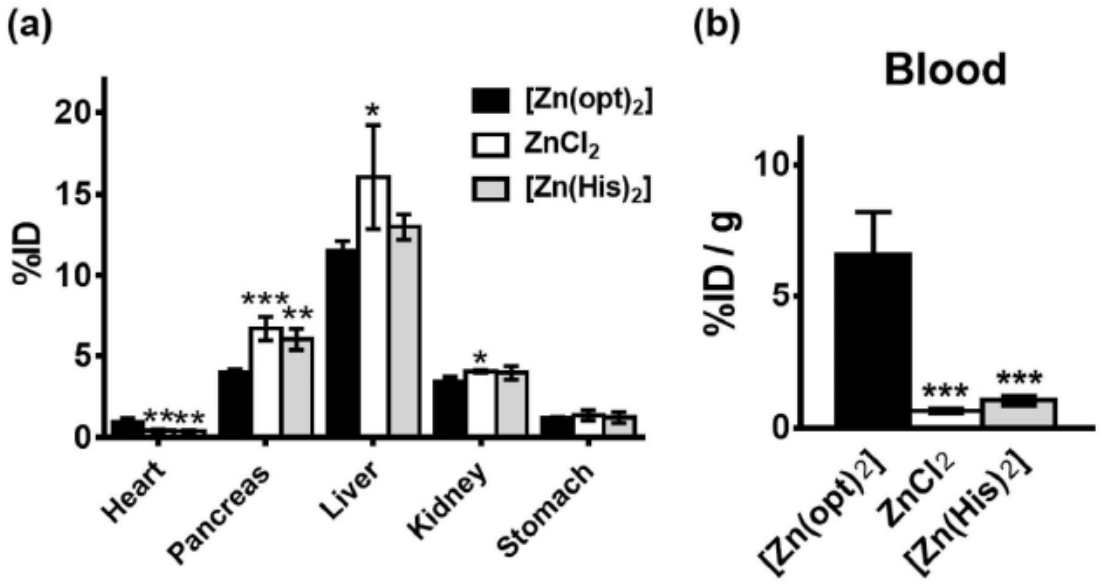


図 2.6.4-6 $^{65}Zn(opt)_2$、$^{65}ZnCl_2$ 又は $^{65}Zn(His)_2$ をマウスに静脈内投与したときの放射能分布

*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、%ID：percent of injected dose

いずれの亜鉛化合物も、肝臓への放射能の取込み（% of dose）が最も高かった。$^{65}ZnCl_2$ 及び $^{65}Zn(His)_2$ の各組織への取込みはほぼ同等であり、膵臓、肝臓、腎臓及び胃では $^{65}Zn(opt)_2$ と比較して高値であった。一方、心臓では $^{65}Zn(opt)_2$ と比較して低値であった。また、血液中放射能濃度（% of dose/g）は $^{65}Zn(opt)_2$ で非常に高く、$^{65}ZnCl_2$ 及び $^{65}Zn(His)_2$ では低値であった。

以上のように、$^{65}ZnCl_2$ 又は $^{65}Zn(His)_2$ をマウスに単回静脈内投与したときの放射能の組織分布は良く一致し、相違は認められなかった。また、$^{65}Zn(opt)_2$ の放射能分布は、$^{65}ZnCl_2$ 及び $^{65}Zn(His)_2$ とは異なった。

2.6.4.4.2 組織中放射能濃度（ラット静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-2 参＞

亜鉛の組織分布に対するヒスチジンの効果を検討する目的で、L-ヒスチジン溶液（250 mmol/L）又はD-ヒスチジン溶液（60 mmol/L）を静脈内に定速注入したラットに、$^{65}ZnCl_2$を単回静脈内投与後の組織中放射能を測定した。ヒスチジンの注入開始後3時間にトレーサー量（123,000 dpm/g BW）の$^{65}ZnCl_2$を単回静脈内投与した。ヒスチジンの注入は継続し、$^{65}ZnCl_2$投与後1時間に各組織を摘出して放射能を測定し、図 2.6.4-7 に示した。

脳、赤血球、肝臓、脾臓、腎臓及び唾液腺ではL-又はD-ヒスチジンを静脈内に定速注入することにより組織中放射能濃度が低下したが、他の組織では上昇し、ヒスチジンの効果は組織により異なった。L-及びD-ヒスチジンの効果に差異はみられなかった。

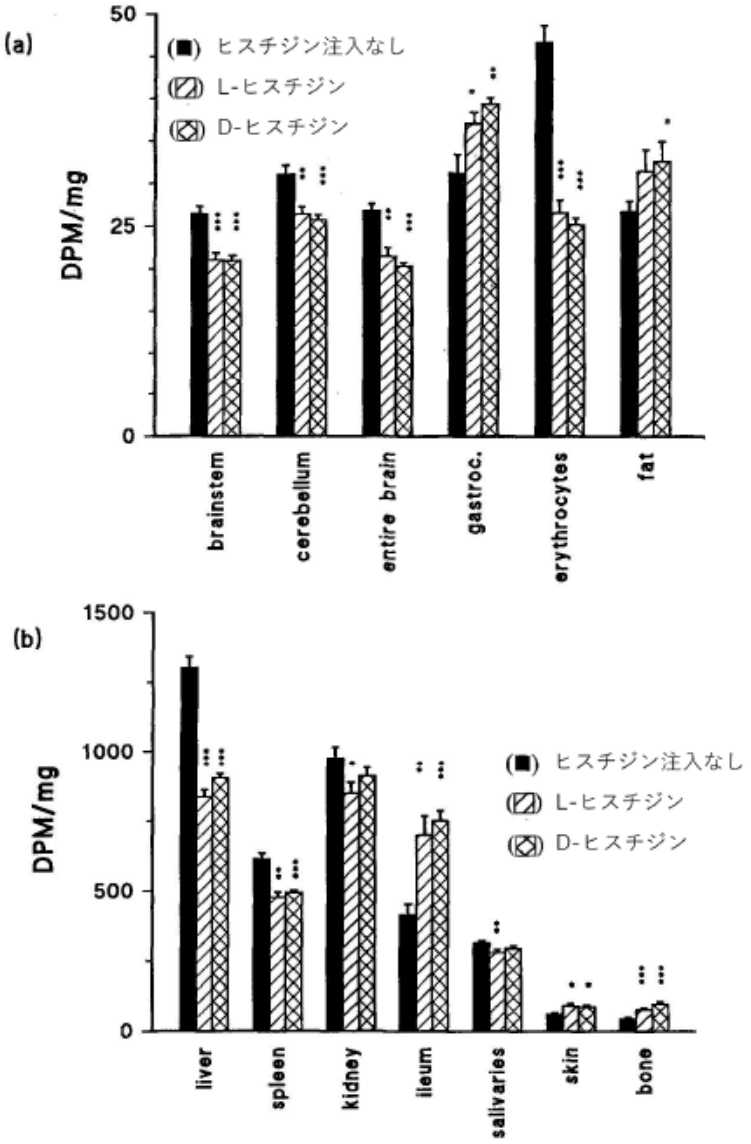


図 2.6.4-7 $^{65}ZnCL_2$を静脈内投与後1時間における組織中放射能濃度（n=6）

*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001（ヒスチジン注入なしに対するt検定）

実験終了時の血漿中ヒスチジン濃度2.70±0.2 mmol/L（L-ヒスチジン）、2.66±0.22 mmol/L（D-ヒスチジン）

(a)：放射能濃度の低い組織、(b)：放射能濃度の高い組織

2.6.4.4.3 組織中放射能濃度（ラット筋肉内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-3 参＞

あらかじめ、低亜鉛飼料（＜1 ppm Zn）又は通常亜鉛飼料（20 ppm Zn）を摂取させたラットに、^{65}Zn で標識したジピコリン酸亜鉛（$^{65}ZnPA_2$）又はヒスチジン酸亜鉛（^{65}ZnHis）を筋肉内投与した後の組織中放射能濃度を表 2.6.4-3 に、その分散分析の結果を表 2.6.4-4 に示した。

膵臓中放射能は、$^{65}ZnPA_2$ 又は ^{65}ZnHis のいずれを投与した場合でも、低亜鉛飼料を与えたラットに比較して、通常飼料を与えたラットで有意に高値を示した（表 2.6.4-4、投与後 15 分：P=0.008、投与後 60 分：P=0.0001）。投与後 60 分の膵臓中放射能濃度の個々の平均値を多重比較法で比較すると、20 ppm の通常亜鉛飼料を与えたラットでは、$^{65}ZnPA_2$ を投与したときよりも ^{65}ZnHis を投与したときの方が有意に高い（P<0.02）放射能濃度を示し、また、^{65}ZnHis を投与した場合、通常亜鉛飼料を与えたラットが低亜鉛飼料を与えたラットよりも有意に高い(P<0.02)放射能濃度を示した。

腎臓中放射能は、膵臓と同様に、$^{65}ZnPA_2$ 又は ^{65}ZnHis のいずれを投与した場合でも、低亜鉛飼料を与えたラットに比較して、通常亜鉛飼料を与えたラットで有意に高値を示した（表 2.6.4-4、投与後 15 分：P=0.026、投与後 60 分：P=0.035）。$^{65}ZnPA_2$ と ^{65}ZnHis の間には差はみられなかった。

消化管の各部位では、投与後 60 分において飼料に関わらず、^{65}ZnHis 投与時の組織中放射能濃度が $^{65}ZnPA_2$ 投与時と比較して低値を示した。

表 2.6.4-3 $^{65}ZnPA_2$ 又は ^{65}ZnHis を筋肉内投与した後の組織中放射能濃度

組織	飼料中亜鉛濃度 (ppm)	亜鉛の取込み量 (μg/g wet tissue、平均値±標準偏差)			
		投与後 15 分		投与後 60 分	
		$^{65}ZnPA_2$ (n=4)	^{65}ZnHis (n=4)	$^{65}ZnPA_2$ (n=4)	^{65}ZnHis (n=4)
膵臓	＜1	0.75±0.15	0.76±0.20	1.48±0.28	1.20±0.12 [a]
	20	0.92±0.23	1.87±0.73	2.32±0.72 [a]	3.96±0.34 [b]
十二指腸	＜1	0.42±0.09	0.54±0.09	1.04±0.12	0.80±0.08
	20	0.50±0.09	0.56±0.15	1.04±0.11	0.94±0.07
空腸	＜1	0.40±0.02	0.46±0.14	1.07±0.15	0.80±0.10
	20	0.40±0.10	0.45±0.12	0.95±0.17	0.88±0.19
回腸	＜1	0.50±0.10	0.56±0.21	1.60±0.37	1.18±0.18
	20	0.62±0.13	0.65±0.22	1.34±0.18	1.30±0.12
腎臓	＜1	0.82±0.24	0.94±0.20	1.80±0.51	1.39±0.05
	20	1.18±0.24	1.24±0.41	1.84±0.28	2.05±0.11
肝臓	＜1	0.95±0.12	1.03±0.18	1.42±0.26	1.16±0.03
	20	0.70±0.13	0.75±0.17	1.00±0.17	1.45±0.68

組織ごとに行内又は列内の比較において、肩の英文字が異なる群間で有意差あり（P<0.02、Scheffe の多重比較）

表 2.6.4-4 表 2.6.4-3 の分散分析

組織	P 値					
	飼料の効果		投与化合物の効果		飼料×投与化合物の相互作用	
	15 分	60 分	15 分	60 分	15 分	60 分
膵臓	0.008	0.0001	0.035	0.008	0.039	0.0007
十二指腸	NS	NS	NS	0.006	NS	NS
空腸	NS	NS	NS	0.046	NS	NS
回腸	NS	NS	NS	0.074	NS	NS
腎臓	0.026	0.035	NS	NS	NS	NS
肝臓	0.005	NS	NS	NS	NS	NS

NS：not significant

2.6.4.4.4 組織中亜鉛濃度（ラット反復経口投与）

＜添付資料 4.2.2.2-2 参＞

実験開始前に 3 週間低亜鉛飼料を与えた雄性ラットに酸化亜鉛（ZnO）又は微細化酸化亜鉛（MDZnO）を 1 日 1 回、7 日間反復経口投与（1 mg Zn/kg）したときの組織中亜鉛濃度に対する Histidine（His）併用投与（3.2 mg His/kg、亜鉛：His モル比＝1:1.3）の効果を検討した（表 2.6.4-5）。

ZnO+His 群では、ZnO 群と比較していずれの組織においても有意な差は認められなかったが、MDZnO+His 群では、MDZnO 群と比較して肝臓及び腎臓において、有意に高い亜鉛濃度を示した。

表 2.6.4-5 酸化亜鉛及び微細化酸化亜鉛投与時の組織中亜鉛濃度に対する
ヒスチジン併用投与の効果

組織／臓器	組織中亜鉛濃度（μg/kg tissue、平均値±標準偏差）				
	Control (n=5)	ZnO (n=8)	ZnO+His (n=8)	MDZnO (n=8)	MDZnO+His (n=8)
肝臓	34.55±3.47 ^{b}	35.53±3.39 ^{ab}	35.92±3.04 ^{ab}	35.10±3.22 ^{b}	40.33±3.48 ^{a}
腎臓	22.38±1.33 ^{c}	24.79±1.23 ^{b}	26.18±0.98 ^{ab}	24.98±1.44 ^{b}	26.93±1.46 ^{a}
膵臓	17.85±2.87 ^{b}	23.58±7.11 ^{ab}	26.18±4.18 ^{a}	26.95±3.54 ^{a}	26.76±2.96 ^{a}
精巣	27.48±2.34	28.95±2.32	28.74±0.82	29.11±1.69	28.29±1.72
筋肉（四頭筋）	11.13±3.66	12.79±1.28	13.06±1.18	12.20±1.20	12.62±1.47
筋肉（腓腹筋）	14.03±2.23	12.69±1.28	12.41±1.52	13.34±1.28	12.43±1.71
大腿骨	34.88±3.87 ^{b}	44.20±1.94 ^{a}	46.15±1.98 ^{a}	46.16±2.63 ^{a}	45.96±1.78 ^{a}
血清（ppm）	0.86±0.31 ^{b}	1.50±0.17 ^{a}	1.61±0.19 ^{a}	1.45±0.09 ^{a}	1.55±0.04 ^{a}

行内の比較において肩の英文字が異なる群間で有意差あり（P<0.05）

2.6.4.4.5 組織中亜鉛濃度に対するヒスチジンの効果（ラット反復経口投与）

＜添付資料 4.2.2.3-4 参＞

SD 系雄ラットに脱イオン水（Control）又はヒスチジン（500 mg/rat/day）を 43 日間反復経口投与後の血漿、精巣及び腎臓中亜鉛濃度を測定した結果を表 2.6.4-6 に示した。

実験開始 3 週間までは Control 群とヒスチジン投与群で体重に差は認められなかった。Day 21 には、ヒスチジン投与群は Control 群に比較して有意に高値を示し、この差は Day 43 まで持続した。

血漿、精巣及び腎臓中亜鉛濃度はいずれも Control 群とヒスチジン投与群の間に有意な差は認められなかった。

表 2.6.4-6 血漿、精巣及び腎臓中亜鉛濃度に対するヒスチジン反復投与の効果

測定項目	平均値±標準誤差（n=10）		P 値
	Control 群	ヒスチジン投与群	
血漿中亜鉛濃度（μg/100 mL）	89.6±3.8	89.9±1.4	NS
精巣中亜鉛濃度（μg/g dry weight）	200.04±3.89	196.51±5.68	NS
腎臓中亜鉛濃度（μg/g dry weight）	109.10±1.06	108.96±1.04	NS
体重 Day 1（g）	185±2	190±2	NS
体重 Day 21（g）	205±1	216±2	＜0.001
体重 Day 43（g）	259±2	273±3	＜0.01

NS：not significant

2.6.4.4.6 たん白結合（in vitro）

＜添付資料 4.2.2.3-5 参＞

健常者の血清中亜鉛濃度は 15.5 μmol/L であり、その内の 19.87%がα2-マクログロブリンに、76.8%がアルブミンに、2.01%がアミノ酸等の低分子リガンドに結合していると報告されている[1)]。ここでは、アルブミンと亜鉛の結合に対するアミノ酸の競合作用についてゲルろ過法により検討した。

ヒト血清アルブミン及び亜鉛をそれぞれ 4.5 g/100 mL 及び 400 μg/100 mL となるように、移動相（0.15 mol/L NaCl、1 mmol/L ジエチルバルビツール酸ナトリウム、pH 7.4）に溶解し、Sefadex-G25 カラムにアプライし、アルブミン画分への亜鉛の回収量（亜鉛のアルブミンに対する結合率）を測定した。移動相中にアミノ酸を加えないときの結合率を 100%として、アミノ酸を漸増させたときの結合率の変化を図 2.6.4-8 に示した。

ヒスチジンは、その生理的な血清中濃度を上回る 10^{-3} mol/L 付近から亜鉛とアルブミンの結合を阻害した。アスパラギン、スレオニン、グリシンの競合作用はヒスチジンと比較して数十分の一程度と弱かった。

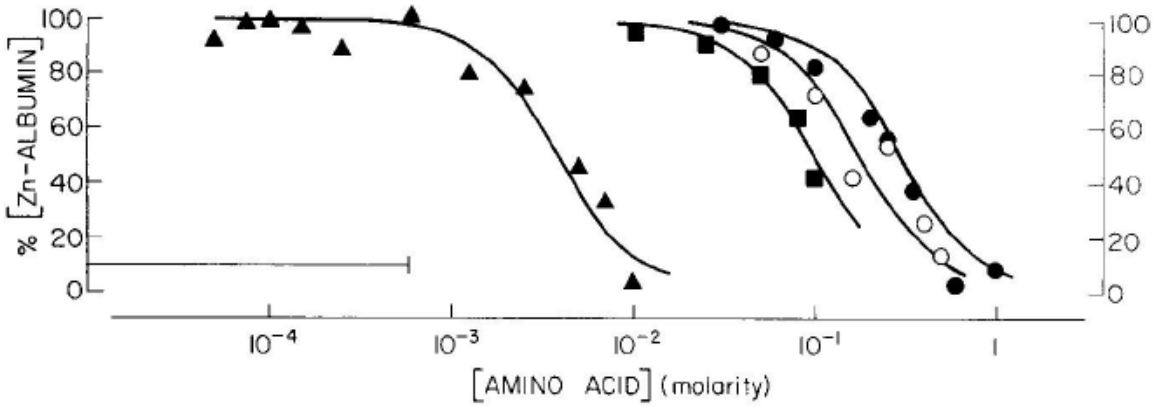


図 2.6.4-8 亜鉛とアルブミンの結合率に対するアミノ酸の競合作用

▲：ヒスチジン、■：アスパラギン、○：スレオニン、●：グリシン
横軸：アミノ酸添加濃度、縦軸：亜鉛のアルブミンに対する結合率
図中左下の水平線は、血清中アミノ酸濃度の生理的濃度範囲を示す

2.6.4.4.7 血球移行（in vitro）

＜添付資料 4.2.2.3-6 参＞

ラット赤血球への亜鉛の取込みに対するヒスチジンの効果を検討した。ラット赤血球を緩衝液（100 mmol/L NaCl、125 mmol/L ショ糖、10 mmol/L HEPES、pH 7.4）に懸濁し、^{65}Zn（3.0 μmol/L）を添加して 37 ℃で 2 時間、インキュベーションした。遠心分離により回収した赤血球を生理食塩水で洗浄し、放射能を測定して ^{65}Zn 取込み量（% of available zinc）を求めた（図 2.6.4-9）。

L-ヒスチジンの効果は 2 相性を示し、0.5～10 mmol/L までは亜鉛の取込みを増加させたが、50 mmol/L では阻害した（図 2.6.4-9、A）。D-ヒスチジンは濃度依存的に亜鉛の取込みを阻害し（図 2.6.4-9、B）、ヒスチジンの効果は立体選択的であった。このようなヒスチジンの効果は、緩衝液からナトリウムを除くこと（図 2.6.4-9、C）及びインキュベーション温度を低温（1 ℃）にすること（図 2.6.4-9、D）により消失した。このように、ヒスチジンの効果は立体選択的、ナトリウム依存的、温度依存的であったことから、亜鉛/ヒスチジン複合体がアミノ酸トランスポーターを介して赤血球に取り込まれることが示唆された。

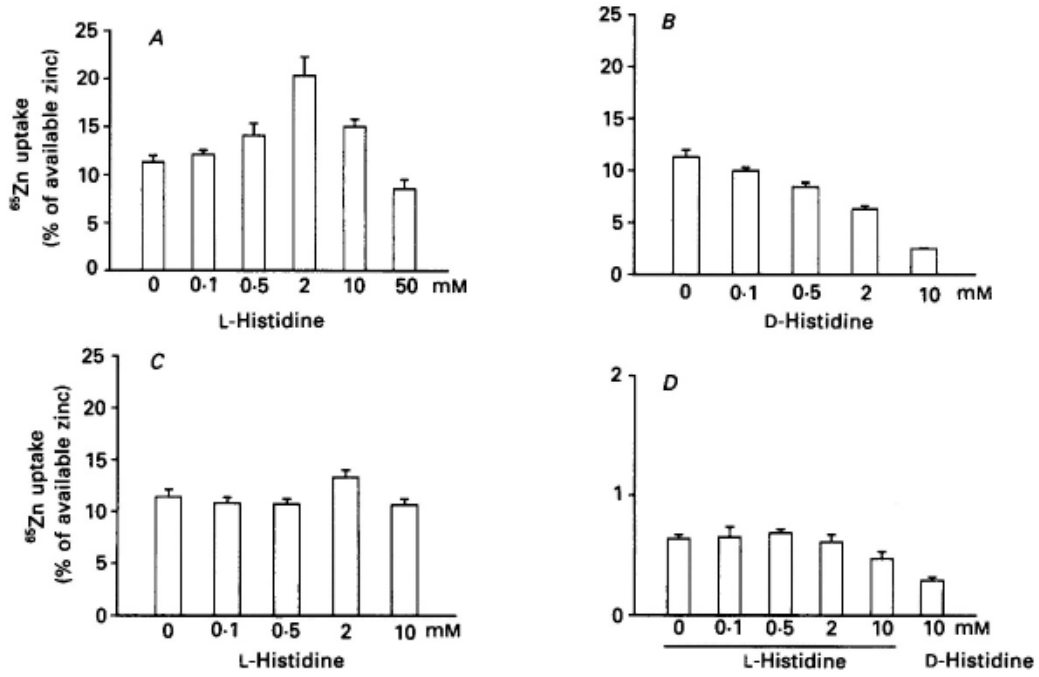


図 2.6.4-9 ラット赤血球への亜鉛の取込みに対するヒスチジンの効果

A：L-Histidine の効果（ナトリウムを含む緩衝液 at 37 ℃）
B：D-Histidine の効果（ナトリウムを含む緩衝液 at 37 ℃）
C：L-Histidine の効果（ナトリウムを含まない緩衝液 at 37 ℃）
D：L-及び D- Histidine の効果（ナトリウムを含む緩衝液 at 1 ℃）

2.6.4.4.8 胎盤通過（ラット経口投与）

＜添付資料 4.2.2.3-7 参＞

妊娠日数の異なるラットにトレーサー量の $^{65}ZnCl_2$ を単回経口投与後 24 時間及び 48 時間の一腹中及び一胎仔中放射能を測定した。投与放射能量から母動物の糞中排泄放射能量及び消化管内放射能量を差し引いた放射能量を母動物に吸収され残存している放射能（投与放射能量の約 5%）として、これを 100%として胎仔への放射能移行率を表 2.6.4-7 に示した。妊娠 15 日までは、胎仔への放射能の移行はわずかであったが、18 日以降急激に増加した。胎仔への放射能移行率は、一腹中の胎仔の数や大きさに依存すると考えられた。

表 2.6.4-7 妊娠ラットに $^{65}ZnCl_2$ を経口投与したときの胎仔への放射能移行率

解剖日の妊娠日数	一腹あたりの放射能移行率 (%) a)		一胎仔あたりの放射能移行率 (%) a)	
	投与後 24 h	投与後 48 h	投与後 24 h	投与後 48 h
11	－	1.0 [1*]	－	0.3
15	0 [1]	1.0 [1]	0	0.1
18	15.2 [1]	－	2.1	－
19	15.8 [1]	6.3 [1]	1.7	0.6
20	52.4 [5] (18.3～70.0) b)	14.6 [2] (8.3～20.9)	7.2 (5.8～8.9)	2.0 (1.7～2.3)
21	40.8 [2] (26.5～55.0)	21.8 [4] (5.6～45.7)	4.0 (2.4～5.6)	2.9 (1.4～5.1)
22	60.3 [4] (20.0～97.4)	25.4 [7] (10.0～41.4)	7.0 (4.1～9.4)	3.3 (2.0～5.0)

a：投与放射能量から母動物の糞中排泄放射能量及び消化管内放射能量を差し引いた放射能量を、母動物に吸収され残存している放射能（投与放射能量の約 5%）とし、これを 100%として移行率を求めた
*：肩の数値は、評価した腹数を示す
b：カッコ内の値は範囲を示す
－：データなし

2.6.4.4.9 尿細管細胞への取込み（in vitro）

＜添付資料 4.2.2.3-8 参＞

ウサギ尿細管細胞への亜鉛の取込みに対するL-システイン及びL-ヒスチジンの効果を検討した。ウサギの腎臓を培地（pH 7.4）でかん流した後、細切した腎皮質をナイロンメッシュでろ過して単離尿細管細胞を得た。細胞をハンクス平衡塩類溶液（ナトリウムを含む）又はナトリウムを含まない培地に懸濁し、^{65}Zn（25 μmol/L）を加え、20℃で0.5分間インキュベーションした後、遠心分離して細胞を回収した。細胞は3回洗浄して放射能を測定した。L-システイン、L-ヒスチジン又はアルブミンを添加したときの取込み量の変化を図 2.6.4-10 に示した。

ハンクス平衡塩類溶液（ナトリウムを含む）を使用した場合では、L-システイン及びL-ヒスチジンの亜鉛取込みに対する効果（図 2.6.4-10、●及び■）は濃度依存的であり、低濃度領域（0～200 μmol/L）ではいずれも亜鉛の取込みを促進し、その効果はL-システインで顕著であった。ナトリウムを含まない培地では、アミノ酸による亜鉛取込みの促進は認められなかった（図 2.6.4-10、○及び□）。一方、アミノ酸が存在しないときの亜鉛取込み量は、ナトリウムの有無に関わらず同程度であった。L-システイン及びL-ヒスチジン濃度が400 μmol/L（アミノ酸：亜鉛モル比＝16：1）を超えると、亜鉛の取込みは、ナトリウムの有無に関わらず、顕著に阻害された。また、アルブミンは低濃度（100 μmol/L）で強力に亜鉛の取込みを阻害した（図 2.6.4-10、▼）。これらの結果から、亜鉛/L-システイン複合体及び亜鉛/L-ヒスチジン複合体がアミノ酸トランスポーターを介して尿細管細胞に取り込まれることが示唆された。

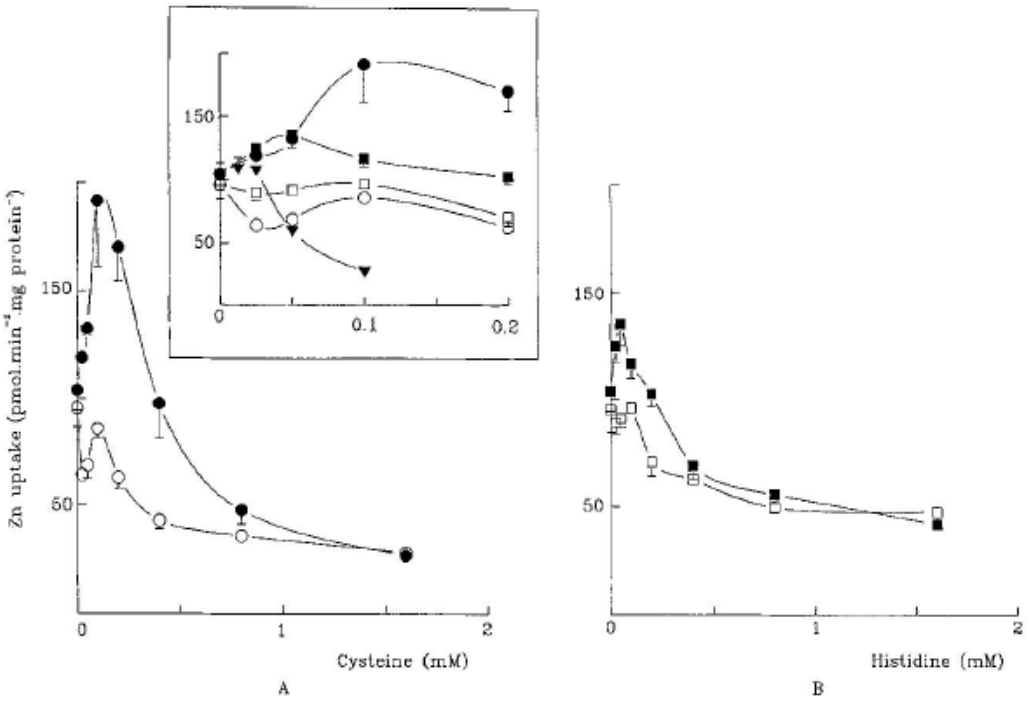


図 2.6.4-10 ウサギ尿細管細胞への亜鉛の取込みに対するシステイン及びヒスチジンの効果

A：L-システイン（●、○）の効果、B：L-ヒスチジン（■、□）の効果
●、■、▼：ハンクス平衡塩類溶液での実験、○、□：ナトリウムを含まない培地での実験
挿入図は、アミノ酸濃度の低い領域を拡大したもの（▼：アルブミン）

2.6.4.5 代謝

該当する試験は実施していない。本薬は亜鉛とヒスチジンのキレート錯体であり、消化管内又は体内で亜鉛とヒスチジンに解離すると考えられるが、亜鉛はそれ以上代謝されない。解離したヒスチジンは食餌由来あるいは内因性のヒスチジンと同様に代謝、排泄又は再利用されるものと考えられる。亜鉛とヒスチジンの解離について、公表文献に基づく考察を 2.6.4.8【吸収】の項に記載した。

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 尿中亜鉛排泄に対するヒスチジンの効果（ラット経口投与）

＜添付資料 4.2.2.3-4 参＞

SD 系雄ラットに脱イオン水（2 mL/rat/day、Control）又はヒスチジン（500 mg/2 mL/rat/day）を 43 日間反復経口投与した。投与期間中、毎日、尿を採取して尿中亜鉛を測定し、1 週間の尿中亜鉛排泄量を 24 時間あたりの排泄量として図 2.6.4-11 に示した。

ヒスチジン投与群（●）では、Control 群（○）に対して 3～6 倍の尿中亜鉛排泄が認められた。

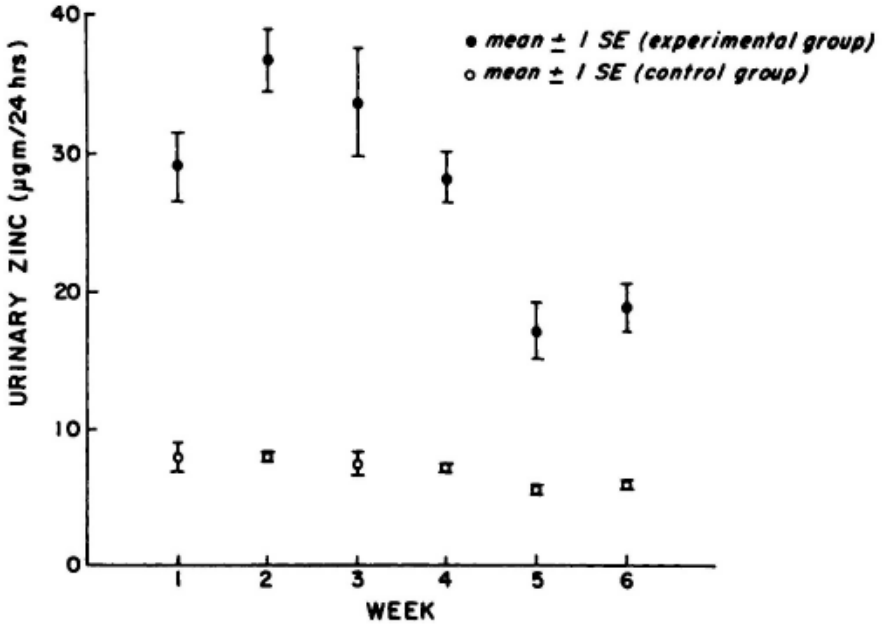


図 2.6.4-11 ヒスチジンを反復経口投与したときの尿中亜鉛排泄量の変化（n=10）

2.6.4.6.2 尿中亜鉛排泄に対するヒスチジンの効果（イヌ静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.5-1 参＞

麻酔下にて両側の尿管にカテーテルを挿入してすべての尿を回収できるように処置したイヌ（雑種）に亜鉛、Cysteine、Histidine 又は Glycine を静脈内定速注入したときの尿中亜鉛排泄速度の変化を図 2.6.4-12 に、限外ろ過後の血漿中亜鉛濃度（高分子に結合していない亜鉛濃度）を表 2.6.4-8 に示した。

0.9%食塩水の定速注入を開始し、30 分の平衡化の後、20 分間隔で 10 区間の尿を採取した（U1、U2、U3・・・U10）。U3 の採取後（尿の採取開始 60 分後）、被験物質（亜鉛又はアミノ酸）溶液を 60 分間、静脈内に定速注入した。各尿採取区間の中央時間に採取した血漿を限外ろ過し、高分子に結合していない亜鉛濃度を測定した。

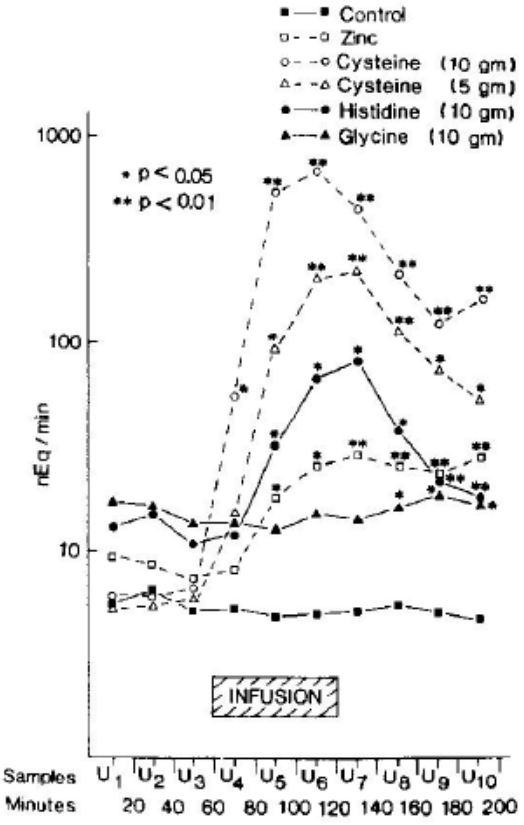


図 2.6.4-12 亜鉛（40 mg）、Cysteine（10 又は 5 g）、Histidine（10 g）又は Glycine（10 g）を静脈内定速注入（60 min）したときの尿中亜鉛排泄速度（neq/min）の変化

それぞれの被験物質群の投与開始前（U3）に対する有意差：*P<0.05、**P<0.01、Control：0.9%食塩水

亜鉛（40 mg/dog/60 min）の注入により血清中亜鉛濃度は 19 μeq/L から 410 μeq/L に上昇し、尿中亜鉛排泄速度は 7.4 μeq/min から 26.1 μeq/min に上昇した。この時の限外ろ過後の血漿中亜鉛濃度に大きな変化はなく、注入された亜鉛は血漿たん白に結合したことが示唆された。Cysteine を 10 g 又は 5 g 注入したとき、亜鉛の尿中排泄はそれぞれ 100 倍及び 30 倍上昇した。Histidine を 10 g 注入したとき、尿中亜鉛排泄は 6 倍上昇し、限外ろ過後の血漿中亜鉛

濃度は注入開始前の 3.1 μeq/L から 5.2 μeq/L へ有意に上昇した。Glycine（10 g）は亜鉛の尿中排泄に影響を与えなかった。

表 2.6.4-8 亜鉛、Cysteine、Histidine 又は Glycine を静脈内定速注入したときの限外ろ過後[a)]の血漿中亜鉛濃度（μeq/L）の経時変化

被験物質（投与量）	試料数	血漿試料				
		B0	B4	B6	B8	B10
亜鉛（40 mg）	9	－	1.5±0.3	1.8±0.3	2.1±0.3	1.5±0.3
Cysteine（10 g）	5	－	2.4±0.3	2.8±0.3	2.7±0.6	2.4±0.6
Cysteine（5 g）	4	1.5±0.3	1.8±0.3	1.8±0.3	1.5±0.3	1.8±0.3
Histidine（10 g）	5	3.1±0.6	4.6±0.9	5.2±0.9*	4.3±0.6	2.4±0.6
Glycine（10 g）	3	2.4±0.3	1.5±0.3	2.4±0.6	1.8±0.3	2.1±0.3
Saline（control）	4	－	1.8±0.3	1.8±0.3	1.8±0.3	2.1±0.9

平均値±標準誤差
a：遊離の亜鉛イオン又は分子量 1000 未満の低分子物質に結合した亜鉛を示す
B0：アミノ酸の注入開始前
B4：アミノ酸の注入開始後 10 分
B6：アミノ酸の注入開始後 50 分
B8：アミノ酸の注入終了後 30 分
B10：アミノ酸の注入終了後 70 分
*：B0 に対して P<0.05

2.6.4.6.3 尿糞中排泄（ラット経口投与及び静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.2-4 参＞

SD 系雄ラットにトレーサー量の $^{65}ZnCl_2$ を単回経口投与（1 μCi/1.23 μg/rat）したとき、投与後 8 、24 及び 48 時間までの糞中に投与放射能量の 8.8、78.2 及び 80.3%がそれぞれ排泄された（表 2.6.4-2）。投与後 8、24 及び 48 時間に腸管内に残存している放射能はそれぞれ投与放射能量の 65.9、5.0 及び 3.1%であった。尿中排泄率はわずかであり、全ての測定時点において投与放射能量の 0.2%を超えることはなかった。

＜添付資料 4.2.2.5-2 参＞

SD 系雄ラットにトレーサー量の $^{65}ZnCl_2$ を単回静脈内投与（1 μCi/1.25 μg/rat）したとき、投与後 24 時間までに投与放射能量の 6.3%が糞中に、0.2%が尿中に排泄され、尿中への排泄はわずかであった。

2.6.4.6.4 胆汁中排泄（イヌ静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.5-3 参＞

胆管にカテーテルを挿入して胆汁を回収できるようにした 4 頭のイヌ（Dog No.1、3、6 及び 8）に $^{65}ZnCl_2$ を単回静脈内投与したときの胆汁への累積排泄率を測定した。Dog No.1 及び 3 では、採取した胆汁量が少なかったため放射能を検出できなかった。Dog No.6 及び 8 では、それぞれ、投与放射能量の 0.42%（投与後 8 日まで）及び 0.083%（投与後 14 日まで）が胆汁中に排泄された。放射能の胆汁排泄率は最大でも 0.42%であり、わずかであった。

2.6.4.6.5 膵液中排泄（イヌ静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.5-3 参＞

膵管にカテーテルを挿入して膵液を回収できるようにした3頭のイヌ（Dog No.1、3及び4）に $^{65}ZnCl_2$ を単回静脈内投与したときの膵液への放射能の累積排泄率は、それぞれ、投与放射能量の6.55%（投与後7日まで）、11%（投与後14日まで）及び4.59%（投与後7日まで）であった。このことから、亜鉛が膵液を介して排泄されることが示された。

2.6.4.6.6 十二指腸分泌（イヌ静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.5-3 参＞

十二指腸を結紮して作成したループにカテーテルを挿入して腸液を回収できるようにした2頭のイヌ（Dog No.6及び8）に $^{65}ZnCl_2$ を単回静脈内投与した。所定時間に腸液を回収して遠心分離した後、上清画分と沈殿画分の放射能を測定し、十二指腸への放射能の分泌率を測定した。Dog No.6では投与後11日までに上清画分に4.72%、沈殿画分に2.85%、合計7.57%の放射能が分泌された。Dog No.8では、投与後14日までに上清画分に3.58%、沈殿画分に5.95%、合計9.53%の放射能が分泌された。このことから亜鉛が十二指腸内に分泌されることが示されたが、十二指腸ループから回収した放射能のかなりの部分が、細胞残渣と考えられる沈殿画分に検出されたことから、放射能が腸液を介して十二指腸に分泌されているとは結論できなかった。

2.6.4.6.7 乳汁中排泄（ラット腹腔内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-7 参＞

分娩時のラットにトレーサー量の $^{65}ZnCl_2$ を単回腹腔内投与したとき、投与後24時間にはretained dose（投与放射能量から母動物の糞中排泄放射能量及び消化管内放射能量を差し引いた放射能量）の21%が乳汁を介して乳仔に移行した。投与後48、72及び96時間ではそれぞれ37%、45%、57%が乳仔に移行した。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

該当する試験は実施していないが、吸収、分布及び排泄の項において、それぞれ、薬物相互作用に関する情報を記載した。吸収の項ではアミノ酸が亜鉛の経口吸収に影響を与えること（表2.6.4-1）、分布の項ではヒスチジンが亜鉛の組織分布に影響を与えること（図 2.6.4-7）及びアミノ酸が亜鉛のたん白結合に影響を与えること（図 2.6.4-8）、並びに排泄の項ではアミノ酸が亜鉛の尿中排泄に影響を与えること（図 2.6.4-11及び図 2.6.4-12）を示した。

2.6.4.8 考察及び結論

【吸収】

硫酸亜鉛又は酸化亜鉛をラットに経口投与したときの血清中亜鉛濃度は、いずれも、ヒスチジンを併用投与することにより高値を示した（表 2.6.4-1 及び図 2.6.4-2）。同様に、ヒトにヒスチジン亜鉛（Zn：ヒスチジンモル比＝1：2）又は硫酸亜鉛を経口投与（20 mg Zn/man）したとき、ヒスチジン亜鉛の方が高い血清中亜鉛濃度を示したことが報告されている（ヒスチジン亜鉛：430±107 g･h/dL、硫酸亜鉛：294±78 g･h/dL）[2]。このように、in vivo の試験では、ヒスチジンは亜鉛の経口吸収性を高めることが示唆されている。

一方、亜鉛の経口吸収に対するヒスチジンを含む各種アミノ酸の効果について、様々な ex vivo、in situ 又は in vitro 試験がこれまでに数多く報告されているが、その成績は一貫しておらず、必ずしも in vivo を反映していない。ラット反転腸管[3]及びラット消化管かん流法[4]を用いてヒスチジンが亜鉛の吸収を促進するという報告がある一方、ラット消化管かん流法[5]及びラット単離腸細胞[6]を用いてヒスチジンが亜鉛の吸収を阻害するという報告や、ヒト大腸がん由来細胞（Caco-2）をポリカーボネートフィルター上に培養した Caco-2 細胞単層膜[7]を用いて、ヒスチジンは亜鉛の Caco-2 細胞への取込み及び単層膜の透過に影響を与えなかった、という報告等がある。これらの報告は試験系が異なるだけではなく、試験に用いる消化管の部位、亜鉛の種類（無機塩や有機酸塩、アミノ酸との複合体など）、亜鉛の試験濃度、ヒスチジンの試験濃度、試験液の組成（Na の有無や pH 等）など、実験条件が様々に異なっているため、文献間の包括的な考察は容易ではない。しかしながら、それらの研究報告において共通していることとして、亜鉛の吸収又は細胞への取込みには飽和性が認められること（すなわちトランスポーターが関与すること）、亜鉛の吸収は pH に依存すること、アミノ酸の効果は亜鉛とアミノ酸のモル比により大きく変化すること、などが挙げられる。

経口摂取された酢酸亜鉛や硫酸亜鉛のような亜鉛塩は、消化管管腔内で亜鉛イオンに解離した後、亜鉛トランスポーターである ZIP4 を介して小腸上皮細胞内へ取り込まれると考えられている。一方、本薬のような 2 価金属とアミノ酸の複合体についても同様に、2 価金属がアミノ酸から解離した後に吸収されることを示唆する成績が複数報告されている。

Darwish et al. (1984)[8]は、銅を[^{64}Cu]で、ヒスチジンを[^{3}H]でそれぞれ標識した[^{64}Cu]/[^{3}H]ヒスチジン複合体を培地に加え、ラット初代肝細胞への取込みを検討した。[^{64}Cu]又は[^{3}H]ヒスチジンをそれぞれ単独に投与した場合、[^{64}Cu]の取込みに対して[^{3}H]ヒスチジンの取込みはわずかであった。さらに、[^{64}Cu]/[^{3}H]ヒスチジン複合体を投与した場合の[^{64}Cu]及び[^{3}H]ヒスチジンの取込みは、それぞれ単独投与の場合と同程度であり、[^{64}Cu]に比較して[^{3}H]ヒスチジンの取込みはわずかであった。これらのことから、[^{64}Cu]/[^{3}H]ヒスチジン複合体から解離した[^{64}Cu]イオンが取り込まれていると結論している。

Hill et al. (1987)[9]は亜鉛を[^{65}Zn]で、メチオニンを[^{14}C]でそれぞれ標識した[^{65}Zn]/[^{14}C]メチオニン複合体、及びリジンを[^{3}H]で標識した[^{65}Zn]/[^{3}H]リジン複合体の取込みをラット反転腸管を用いて検討した。その結果、いずれの複合体を用いたときにも[^{65}Zn]の取込み量とアミノ酸

（[^{14}C]又は[^{3}H]）の取込み量が異なったことから、亜鉛とアミノ酸の複合体は複合体として取り込まれるのではないであろうと述べている。

Beutler et al.（1998）[10]は、亜鉛を[^{65}Zn]で、メチオニンを[^{35}S]でそれぞれ標識した[^{65}Zn]/[^{35}S]メチオニン複合体の取込みをミドリザル腎臓由来細胞（CV-1）及びヒト結腸癌由来細胞（T-84）を用いて検討した。その結果、[^{35}S]メチオニンの取込み量が[^{65}Zn]の取込み量に比較して非常に少なかったことから、亜鉛/メチオニン複合体は培地中で解離し、亜鉛イオンとメチオニンはそれぞれ独立して細胞に取り込まれるのであろうと述べている。

Sano et al.（1991）[11]は、[^{65}Zn]/L-カルノシン複合体（[^{65}Zn]ポラプレジンク）又は亜鉛/[^{14}C]L-カルノシン複合体（[^{14}C]ポラプレジンク）をラットに経口投与した後の[^{65}Zn]及び[^{14}C]の挙動を調べ、(1)血液中の[^{65}Zn]濃度は[^{14}C]濃度に比較して非常に低く、かつT_{max}が異なること、(2)血液中[^{65}Zn]のAUCの上昇は投与量の増加よりも小さかったのに対し、血液中[^{14}C]のAUCは投与量に比例して増加したこと、(3)血液中[^{65}Zn]濃度は絶食投与に比較して食後投与では大きく低下する一方、[^{14}C]濃度は食後投与でも変化しなかったことを報告している。このように、[^{65}Zn]と[^{14}C]の挙動が大きく異なることは、ポラプレジンクが投与後に亜鉛とL-カルノシンに解離した後にそれぞれが異なる経路で吸収されていることを示唆するものと考えられる。

上記の事例と同様に、経口投与した本薬は、消化管管腔内で解離し、解離した亜鉛がZIP4により吸収されると考えられる。ただし、上記の事例は、2価金属/アミノ酸複合体を投与したときに複合体として吸収されることを否定するものではなく、亜鉛/アミノ酸複合体がアミノ酸トランスポーターにより輸送されるとの報告も複数存在する。

ラット回腸かん流法を用いて、[^{65}Zn]の吸収に対するL-及びD-ヒスチジンの効果を検討した結果、亜鉛に対するヒスチジンのモル比が小さい場合、L-ヒスチジン存在下での亜鉛吸収速度はD-ヒスチジン存在下と比較して有意に高値を示したが、ヒスチジンの濃度の上昇に伴いL-ヒスチジン存在下の亜鉛吸収速度は低下し、D-ヒスチジン存在下との差が消失した（図 2.6.4-3）。このように、L-ヒスチジンは低濃度では亜鉛の吸収を促進する一方、高濃度では阻害し、そのような効果が立体選択的であったことは、亜鉛の吸収にアミノ酸トランスポーターが関与することを示唆するものと考えられる。

Sauer et al.（2017）[12]は、ヒト大腸がん由来細胞（Caco-2）及びヒトiPS細胞から分化させた腸細胞を用いて、亜鉛とアミノ酸（グルタミン酸、メチオニン又はリジン、ヒスチジンは検討されていない）の複合体がアミノ酸トランスポーターにより吸収される可能性について検討した。(1)Caco-2細胞において、塩化亜鉛を投与したときの亜鉛の取込みはアミノ酸により阻害されなかったが、亜鉛/アミノ酸複合体を投与した場合の亜鉛の取込みは対応するアミノ酸により阻害されたこと、(2)Caco-2細胞において塩化亜鉛を投与したときの亜鉛の取込みは銅イオン及びカルシウムイオン、フィチン酸又は葉酸により阻害されたが、亜鉛/アミノ酸複合体を投与した場合の亜鉛の取込みはこれらの影響を受けなかったこと、(3)ZIP4の機能障害を呈する先天性腸性肢端皮膚炎患者由来のiPS細胞から分化させた腸細胞では、健常者のiPS細胞から分化させた腸細胞に比較して、塩化亜鉛を投与したときの亜鉛の取込みが低下したのに対し、亜鉛/アミノ酸複合体を投与したときの亜鉛の取込みはいずれの腸細胞においても同等であったことなどか

ら、亜鉛/アミノ酸複合体は、少なくともその一部は、アミノ酸トランスポーターに輸送されると述べている。

さらに、吸収の観点からの研究ではないが、ラット赤血球（図 2.6.4-9）やウサギ尿細管細胞（図 2.6.4-10）において、亜鉛/ヒスチジン複合体がアミノ酸トランスポーターに輸送されることが示唆されていることからも、経口投与された本薬が一部複合体としてアミノ酸トランスポーターにより吸収される可能性も考えられる。

以上のことから、ヒスチジンは亜鉛の消化管吸収を促進することが示唆されるものの、そのメカニズムは明らかではなく、本薬を経口投与したとき、解離した亜鉛が ZIP4 を介して吸収されると考えられるが、アミノ酸トランスポーターを介してヒスチジン/亜鉛複合体として吸収される可能性も考えられる。

【分布】

^{65}Zn で標識した亜鉛/ヒスチジン複合体（$^{65}Zn(His)_2$）又は塩化亜鉛（$^{65}ZnCl_2$）をマウスに単回静脈内投与したとき、放射能の組織分布及び血液中放射能濃度に相違は認められなかった（図 2.6.4-4～図 2.6.4-6）。このことから、本薬を経口投与したとき、吸収の項で述べたように本薬がヒスチジン/亜鉛の複合体として吸収されたとしても、亜鉛塩を経口投与した場合と比較して、亜鉛の組織分布に大きな差異が生じる可能性は低いと考えられる。

亜鉛の組織移行に対するヒスチジンの効果を検討する目的で、あらかじめ L-又は D-ヒスチジンを静脈内定速注入し、血漿中ヒスチジン濃度を 2～3 mmol/L 程度に上昇させたラットに、$^{65}ZnCl_2$ を静脈内投与後 1 時間の組織中放射能濃度を測定したところ、ヒスチジンを注入していないラットと比較して、脳、赤血球、肝臓、脾臓、腎臓及び唾液腺では組織中放射能濃度が低下したが、筋肉、脂肪、回腸、皮膚、骨では上昇した。L-及び D-ヒスチジンではほぼ同様の結果であり、ヒスチジンの立体選択的効果は認められなかった（図 2.6.4-7）。ヒスチジンの効果が組織により異なったことの原因は明らかではないが、高濃度の血漿中ヒスチジンは亜鉛の組織移行性に影響を与えることが示された。

肝臓及び腎臓の亜鉛の取込みがヒスチジンにより低下したことは、ラットに MDZnO とヒスチジンを併用して 7 日間反復経口投与したときの肝臓及び腎臓中亜鉛濃度が MDZnO 単独投与と比較して高値を示したこと（表 2.6.4-5）とは矛盾した結果のようにも見える。MDZnO の経口投与の場合は、ヒスチジンの併用により単純に亜鉛吸収が増加した結果とも考えられるが、必ずしもすべての組織中濃度が上昇したわけではないので、亜鉛の吸収増加によるものとは結論しがたい。ラット赤血球（図 2.6.4-9）やウサギ尿細管細胞（図 2.6.4-10）において、低濃度の L-ヒスチジンが亜鉛の細胞への取込みを促進する一方、高濃度では亜鉛の取込みを低下させることが示唆されていることから、血漿中ヒスチジン濃度の相違が一つの要因として考えられる。

ラットにヒスチジンを 43 日間反復経口投与（500 mg/rat/day）したとき、精巣及び腎臓中亜鉛濃度は対照群（脱イオン水）と比較して変化が認められなかった（表 2.6.4-6）。ラットの体重を 250 g とすると、体重あたりの投与量は 2000 mg/kg/day となる。一方、本薬は亜鉛 1 原子に対してヒスチジン 2 分子がキレートしていることから、亜鉛の原子量を 65、ヒスチジンの分

子量を 155 として重量換算すると、本薬の臨床での最大投与量である 1 日 1 回 150 mg（亜鉛としての重量、CTD2.7.3.4）投与時のヒスチジン投与量は約 715 mg となる。体重を 60 kg とすると体重あたりの投与量は約 12 mg/kg となり、この投与量はヒスチジンの影響が認められなかったラット試験の投与量（2000 mg/kg）と比較して約 167 分の 1 というわずかな量である。従って、本薬投与に伴うヒスチジンの経口摂取が亜鉛の組織分布に影響を与えるとは考えにくい。

^{65}ZnHis 又は ^{65}ZnPA$_2$ を低亜鉛飼料（＜1 ppm Zn）又は通常亜鉛飼料（20 ppm Zn）を与えたラットに筋肉内投与したとき、膵臓及び腎臓中放射能濃度は、通常亜鉛飼料を与えたラットの方が低亜鉛飼料を摂取したラットに比較して高値を示した（表 2.6.4-3 及び表 2.6.4-4）ことから、亜鉛の摂取状況によって亜鉛の組織移行性が変化することが示された。膵臓及び腎臓は亜鉛の排泄に関わる臓器であることから、低亜鉛飼料の摂取により体内亜鉛が欠乏したラットでは、排泄臓器への亜鉛の取込みが低下した可能性が考えられた。

^{65}Zn(opt)$_2$ 又は ^{65}Zn(His)$_2$ を静脈内投与したときの放射能の分布状況は異なった（図 2.6.4-4～図 2.6.4-6）。また、^{65}ZnHis 及び ^{65}ZnPA$_2$ を筋肉内投与した時の分布状況は異なった（表 2.6.4-3 及び表 2.6.4-4）。これらのことから、異なるリガンドと複合体を形成した亜鉛の組織移行性は異なることが示唆された。

【代謝】

本薬は亜鉛とヒスチジンのキレート錯体であり、消化管内又は体内で亜鉛とヒスチジンに解離すると考えられるが、亜鉛はそれ以上代謝されない。解離したヒスチジンは食餌由来あるいは内因性のヒスチジンと同様に代謝、排泄又は再利用されるものと考えられる。亜鉛とヒスチジンの解離については、【吸収】の項において記載した。

【排泄】

亜鉛の尿中排泄に対するヒスチジンの影響を検討する目的で、ヒスチジンをラットに 43 日間反復経口投与（500 mg/rat/day）したとき、尿中への亜鉛の排泄が増加した（図 2.6.4-11）。また、ヒスチジンをイヌに静脈内定速注入したときにも同様に、尿中への亜鉛の排泄が増加した（図 2.6.4-12）。この時、血漿中の限外ろ過後の亜鉛濃度が増加した（表 2.6.4-8）ことから、図 2.6.4-8 に示したように、亜鉛と結合しているアルブミンがヒスチジンに置換され、亜鉛/ヒスチジン複合体が増加し、この亜鉛/ヒスチジン複合体が糸球体ろ過されたために、亜鉛の尿中排泄が増加したものと考えられる。ヒスチジンよりも亜鉛との結合親和性が弱く[13]、かつアルブミンとの競合力も弱い（図 2.6.4-8）グリシンを同様に投与したときには、亜鉛の尿中排泄は変化しなかった。一方、ヒスチジンよりも亜鉛に対して結合親和性の強いシステイン [13]を同様に投与したときは、ヒスチジン投与時よりも顕著に亜鉛の尿中排泄が増加した。ただし、このとき、血漿中の限外ろ過後の亜鉛濃度が増加しなかったことから、システイン投与時の尿中亜鉛排泄の増加は糸球体ろ過される亜鉛が増加したためとは考えにくい。システインがヒスチジンよりも強く亜鉛の尿中排泄を促進した原因は不明であるが、尿細管細胞の亜鉛の取込みに対する効果がヒスチジンよりもシステインの方が強いこと（図 2.6.4-10）と関係しているのかも知れない。

以上のことから、アミノ酸は亜鉛との結合親和性に応じて、亜鉛の排泄に影響を与えうると考えられる。しかしながら、静脈内持続注入のように実験的にアミノ酸を大量に注入するとこのような変化が顕在化するものの、本薬投与時の血漿中ヒスチジン濃度は内因性レベルから大きくは変化しないと考えられる（薬物動態学的薬物相互作用の項を参照）。

【薬物動態学的薬物相互作用】

吸収、分布及び排泄の項に記載したように、ヒスチジンは亜鉛の体内動態に影響を与える潜在力を有することが示された。

表 2.6.4-1 に示したように、ヒスチジンのみならず各種のアミノ酸に亜鉛の吸収を増加させる傾向がみられたが、各アミノ酸の効果は大きく異なるものではなかった。

亜鉛の分布や排泄に対するヒスチジンの影響（分布：図 2.6.4-7 及び図 2.6.4-8、排泄：図 2.6.4-11 及び図 2.6.4-12）は、ヒスチジンが亜鉛とキレートすることによると考えられ、ヒスチジンは亜鉛のみならず他の 2 価金属ともキレートすることから、他の 2 価金属に対しても亜鉛に対するのと同様の影響を与えうると考えられる。しかしながら、ヒトに L-ヒスチジン 4 g を 2 週間反復経口投与（1 g×4 times/day）したときの血清中ヒスチジン濃度は対照群の 88.3 nmol/mL に対して 130.5 nmol/mL とわずかな上昇が認められたにすぎず、この時の血清中亜鉛濃度及び尿中亜鉛排泄量には変化が認められなかったことが報告されている[14]。この試験の被験者の平均体重が 71.6 kg であったことから、体重 1 kg 当たりの投与量に換算すると約 56 mg/day/kg となり、尿中亜鉛排泄量の増加が認められたラット反復経口投与試験（図 2.6.4-11）の投与量（500 mg/day/rat：体重を 200 g とすると 2500 mg/day/kg）と比較すると約 45 分の 1 である。また、図 2.6.4-7 に示した組織分布への影響は血漿中ヒスチジン濃度が 2 mmol/L を超えており、図 2.6.4-8 に示したたん白結合への影響もヒスチジン濃度が 1 mmol/L を超える濃度域での現象であり、毎日 4 g のヒスチジンを経口投与しても、血清中ヒスチジン濃度（130.5 nmol/mL）はこれらの濃度を大きく下回る。さらに、本薬は亜鉛 1 原子に対してヒスチジン 2 分子がキレートしていることから、亜鉛の原子量を 65、ヒスチジンの分子量を 155 として重量換算すると、本薬の臨床での最大投与量である 1 日 1 回 150 mg（亜鉛としての重量、CTD2.7.3.4）投与時のヒスチジン投与量は約 715 mg となり、上記のヒスチジン反復投与試験の投与量（4 g/day）の約 18%にすぎないことから、本薬 150 mg 投与時の血漿中ヒスチジン濃度は内因性レベルから大きくは変化しないと考えられる。従って、本薬を亜鉛として 150 mg 投与時に、ヒスチジンに由来する薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

なお、本薬の投与量よりは少ないものの、ヒスチジン亜鉛 20 mg（亜鉛としての重量）をヒトに単回経口投与したときに、血清中ヒスチジン濃度は投与前値（86～89 μmol/L）からの上昇がみられなかったことが報告されている[2)]。

【結論】

ヒスチジンは亜鉛の経口吸収性を高めることが示唆されたが、そのメカニズムは不明であった。経口投与した本薬は消化管内で亜鉛とヒスチジンに解離し、解離した亜鉛は ZIP4 により吸収されると考えられるが、一部はヒスチジン/亜鉛複合体としてアミノ酸トランスポーターによ

り吸収される可能性も考えられる。一部がヒスチジン/亜鉛複合体として吸収されたとしても、吸収後に解離及び血漿たん白質との結合が生じることにより、本薬に由来する亜鉛の吸収後の体内動態は、他の亜鉛塩（ノベルジン錠など）投与時と同様であろうと考えられる。

血漿中ヒスチジン濃度を実験的に高濃度に設定した動物試験によって、ヒスチジンが亜鉛の組織移行性を変化させたり、亜鉛の尿中排泄を促進したりするなどの潜在的な効果が明らかになった。このような効果は亜鉛のみならず他の 2 価金属に対しても同様と考えられるものの、本薬投与時の血漿中ヒスチジン濃度は内因性レベルから大きくは変化しないと考えられることから、本薬投与時にヒスチジンに由来する薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.6.4.9 図表

本文中に記載した。

2.6.4.10 参考文献

1) Faure H, Favier A, Tripier M, et al. Determination of the major zinc fractions in human serum by ultrafiltration. Biol Trace Elem Res. 1990;24(1):25-37.
2) Schölmerich J, Freudemann A, Köttgen E, et al. Bioavailability of zinc from zinc-histidine complexes. I. Comparison with zinc sulfate in healthy men. Am J Clin Nutr. 1987;45(6):1480-6.
3) Seal CJ, Heaton FW. Chemical factors affecting the intestinal absorption of zinc in vitro and in vivo. Br J Nutr. 1983;50(2):317-24.
4) Wapnir RA, Stiel L. Zinc intestinal absorption in rats: Specificity of amino acids as ligands. J Nutr. 1986;116(11):2171-9.
5) Oestreicher P, Cousins RJ. Influence of intraluminal constituents on zinc absorption by isolated, vascularly perfused rat intestine. J Nutr. 1982;112(10):1978-82.
6) Raffaniello RD, Wapnir RA . Zinc uptake by isolated rat enterocytes: Effect of low molecular weight ligands. Proc Soc Exp Biol Med. 1989;192(3):219-24.
7) Raffaniello RD, Lee SY, Teichberg S, et al. Distinct mechanisms of zinc uptake at the apical and basolateral membranes of Caco-2 cells. J Cell Physiol. 1992;152(2):356-61.
8) Darwish HM, Cheney JC, Schmitt RC, et al. Mobilization of copper(II) from plasma components and mechanisms of hepatic copper transport. Am J Physiol. 1984;246(1 Pt 1):G72-9.
9) Hill DA, Peo ER Jr, Lewis AJ. Influence of picolinic acid on the uptake of ^{65}zinc-amino acid complexes by the everted rat gut. J Anim Sci. 1987;65(1):173-8.
10) Beutler KT, Pankewycz O, Brautigan DL. Equivalent uptake of organic and inorganic zinc by monkey kidney fibroblasts, human intestinal epithelial cells, or perfused mouse intestine. Biol Trace Elem Res. 1998;61(1):19-31.
11) Sano H, Furuta S, Toyama S, et al. Study on the metabolic fate of catena-(S)-[μ-[N$^{\alpha}$-(3-Aminopropionyl)histidinato(2-)-N^{1},N^{2},O:N$^{\tau}$]-zinc]. 1 st communication: Absorption, distribution, metabolism and excretion after single administration to rats. Arzneimittelforschung. 1991;41(9):965-75.
12) Sauer AK, Pfaender S, Hagmeyer S, et al. Characterization of zinc amino acid complexes for zinc delivery in vitro using Caco-2 cells and enterocytes from hiPSC. Biometals. 2017;30(5):643-61.
13) Krężel A, Maret W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. Arch Biochem Biophys. 2016;611:3-19.
14) Schechter PJ, Prakash NJ. Failure of oral L-histidine to influence appetite or affect zinc metabolism in man: a double-blind study. Am J Clin Nutr. 1979;32(5):1011-4.

目次

2.6.5 薬物動態試験概要表 3
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 3
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 5
2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与 6
2.6.5.3.1 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-1） 6
2.6.5.3.2 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-2） 7
2.6.5.3.3 ヒスチジンの効果（ラット回腸かん流法） 8
2.6.5.3.4 塩化亜鉛の経口吸収率（ラット経口投与） 9
2.6.5.4 薬物動態試験：分布 10
2.6.5.4.1 全身 ARG 及び組織中放射能濃度（マウス静脈内投与） 10
2.6.5.4.2 組織中放射能濃度（ラット静脈内投与） 12
2.6.5.4.3 組織中放射能濃度（ラット筋肉内投与） 13
2.6.5.4.4 組織中亜鉛濃度（ラット反復経口投与） 14
2.6.5.4.5 組織中亜鉛濃度に対するヒスチジンの効果（ラット反復経口投与） 15
2.6.5.5 薬物動態試験：たん白結合 16
2.6.5.6 薬物動態試験：血球移行 17
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 18
2.6.5.7.1 胎盤通過（ラット経口投与） 18
2.6.5.7.2 乳汁中排泄（ラット腹腔内投与） 19
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 20
2.6.5.8.1 尿細管細胞への取込み 20
2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：in vivo 21
2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：in vitro 21
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 21
2.6.5.12 薬物動態試験：代謝：薬物代謝酵素の誘導／阻害 21
2.6.5.13 薬物動態試験：排泄 22
2.6.5.13.1 亜鉛の尿中排泄に対するヒスチジンの効果（ラット経口投与） 22
2.6.5.13.2 亜鉛の尿中排泄に対するヒスチジンの効果（イヌ静脈内投与） 23
2.6.5.13.3 尿糞中排泄（ラット経口投与） 24
2.6.5.13.4 尿糞中排泄（ラット静脈内投与） 24
2.6.5.13.5 胆汁中排泄、膵液中排泄及び十二指腸分泌（イヌ静脈内投与） 25
2.6.5.14 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用 27
2.6.5.15 薬物動態試験：その他 27

略語・略号一覧

略語・略号	内容
$^{65}ZnCl_2$	[^{65}Zn]標識 zinc chloride
$^{65}ZnHis$	[^{65}Zn]標識 zinc histidinate
$^{65}ZnPA_2$	[^{65}Zn]標識 zinc dipicolinate
$^{65}Zn(opt)_2$	[^{65}Zn]標識 di(1-oxy-2-pyridinethiolato)zinc
$^{65}Zn(His)_2$	[^{65}Zn]標識 di(L-histidinato)zinc
ARG	オートラジオグラフィー/オートラジオグラム
AUC	薬物濃度-時間曲線下面積
Bq	becquerel
BW	body weight、体重
Ci	curie
cpm	counts per minute
dpm	disintegration per minute
eq	当量
h	hour、時間
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
L	Liter、リットル
MDZnO	微細化酸化亜鉛
min	minute、分
n	例数
ppm	parts per million
Zn	zinc、亜鉛
ZnO	酸化亜鉛

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

試験の種類		試験系／被験物質	投与経路／投与量	実施施設(出典)	試験番号	添付資料
分析方法及びバリデーション試験：該当する試験を実施していない						
吸収						
	単回投与後の血清中亜鉛濃度	ラット／硫酸亜鉛 (with or without Histidine)	経口投与／5、10、20 mg Zn/kg	J Pharm Sci 1977;66(3):391-5	該当なし	4.2.2.2-1 参
		ラット／酸化亜鉛 (with or without Histidine)	経口投与／1 mg Zn/kg	J Nutr Sci Vitaminol 2008;54(1):54-60	該当なし	4.2.2.2-2 参
	in situ 吸収試験	ラット回腸かん流法／硫酸亜鉛	該当なし	J Nutr 1983;113(7):1346-54	該当なし	4.2.2.2-3 参
	経口吸収率	ラット／$^{65}ZnCl_2$	経口投与／1.23 μg Zn/rat	J Appl Physiol 1973;34(1):58-62	該当なし	4.2.2.2-4 参
分布						
	全身 ARG 及び組織中濃度	マウス／$^{65}Zn(opt)_2$ 及び $^{65}Zn(His)_2$	静脈内投与／1 mg Zn/kg	Biochem Biophys Rep 2016;5:211-5	該当なし	4.2.2.3-1 参
	組織中濃度	ラット／$^{65}ZnCl_2$ (Histidine を前投与)	静脈内投与／123,000 dpm/g BW (約 70 ng Zn/rat)	Biometals 1992;5(4):235-43	該当なし	4.2.2.3-2 参
		ラット／$^{65}ZnPA_2$ 及び $^{65}ZnHis$	筋肉内投与／0.09 mg Zn/rat	J Nutr 1982;112(5):914-9	該当なし	4.2.2.3-3 参
		ラット／酸化亜鉛 (with or without Histidine)	7 日間反復経口投与／1 mg Zn/kg	J Nutr Sci Vitaminol 2008;54(1):54-60	該当なし	4.2.2.2-2 参
		ラット／ヒスチジン	43 日間反復経口投与／500 mg Histidine/2 mL/rat	Am J Clin Nutr 1977;30(4):523-7	該当なし	4.2.2.3-4 参
	たん白結合	in vitro：ヒト血清アルブミン	該当なし	Biochim Biophys Acta 1972;273(1):64-72	該当なし	4.2.2.3-5 参
	血球移行	in vitro：ラット赤血球	該当なし	J Physiol 1992;445:69-80	該当なし	4.2.2.3-6 参

試験の種類	試験系／被験物質	投与経路／投与量	実施施設	試験番号	添付資料
妊娠又は授乳動物に於ける試験					
胎盤通過	ラット／$^{65}ZnCl_2$	経口投与／トレーサー量	Am J Physiol 1955;181(2):287-90	該当なし	4.2.2.3-7 参
乳汁中排泄	ラット／$^{65}ZnCl_2$	腹腔内投与／トレーサー量	Am J Physiol 1955;181(2):287-90	該当なし	4.2.2.3-7 参
その他の分布試験					
尿細管細胞への取込み	in vitro：ウサギ尿細管細胞	該当なし	Pflugers Arch 1991;419(6):583-7	該当なし	4.2.2.3-8 参
代謝：該当する試験を実施していない					
排泄					
尿中排泄	ラット／ヒスチジン	43 日間反復経口投与／ 500 mg histidine/2 mL/rat	Am J Clin Nutr 1977;30(4):523-7	該当なし	4.2.2.3-4 参
尿中排泄	イヌ／硫酸亜鉛、Histidine、 Cysteine 又は Glycine	静脈内持続注入／ 40 mg Zn/60 min/dog 10 g histidine/60 min/dog 5、10 g Cysteine/60 min/dog 10 g Glycine/60 min/dog	Am J Physiol 1978;235(1):F40-5	該当なし	4.2.2.5-1 参
尿糞中排泄	ラット／$^{65}ZnCl_2$	経口投与／1.23 μg Zn/rat	J Appl Physiol 1973;34(1):58-62	該当なし	4.2.2.2-4 参
尿糞中排泄	ラット／$^{65}ZnCl_2$	静脈内投与／1.25 μg Zn/rat	J Appl Physiol 1973;34(1):63-7	該当なし	4.2.2.5-2 参
胆汁中排泄 膵液中排泄 十二指腸分泌	イヌ／$^{65}ZnCl_2$	静脈内投与／ 1.63～37.5 μg $ZnCl_2$/dog	J Exp Med 1943;78(3):151-9	該当なし	4.2.2.5-3 参
薬物動態学的薬物相互作用：該当する試験を実施していない					

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

該当する試験を実施していない。

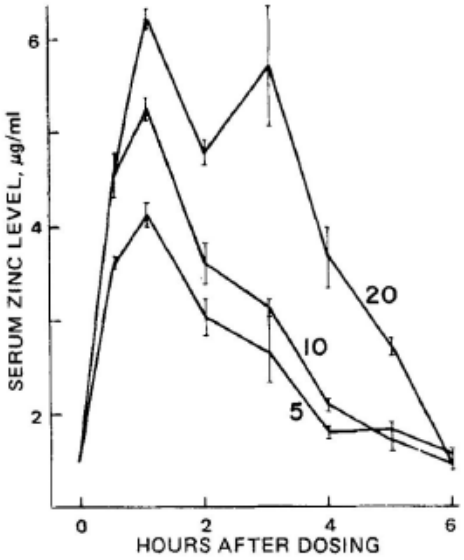
2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与

2.6.5.3.1 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-1）

＜添付資料 4.2.2.2-1 参＞

動物種	SD 系雄ラット
給餌	通常飼料（85 mg Zn/kg）、20～24 時間前から絶食、水は自由摂取
被験物質	硫酸亜鉛
溶媒／投与形態	水／水溶液又は懸濁液
投与経路	経口
投与量	5、10、20 mg Zn/kg
試験構成	・硫酸亜鉛単独投与（5、10、20 mg Zn/kg） ・硫酸亜鉛とリガンドの併用投与 （10 mg Zn/kg＋リガンド、リガンドの投与量は下表に記載）
試料	血清
定量（対象）物質	Zn
定量法	原子吸光法

硫酸亜鉛単独投与（5、10 及び 20 mg Zn/kg）時の血清中亜鉛濃度推移
（μg/mL、平均値±標準誤差、n=5、ただし、5 mg Zn/kg 投与後 1 時間は n=3、4 時間は n=4）



硫酸亜鉛を単独投与（10 mg Zn/kg）及び種々のリガンドと併用投与したときの血清中亜鉛濃度

リガンド	モル比 亜鉛：リガンド	血清中亜鉛濃度（μg/mL、平均値±標準誤差）[a]	
		1 h	4 h
Sodium phytate	1:1	1.50±0.02 (6) [b]	1.69±0.03 (5) [b]
なし（Control）	-	5.29±0.12 (15)	2.12±0.06 (16)
Asparagine	1:2	5.42±0.16 (6)	2.77±0.24 (5)
Lysine	1:2	5.91±0.13 (6) [d]	2.38±0.07 (5)
Cysteine	1:2	5.97±0.15 (12) [d]	- [c]
Histidine	1:2	6.23±0.58 (6)	- [c]
Glycine	1:2	6.61±0.42 (6) [d]	- [c]

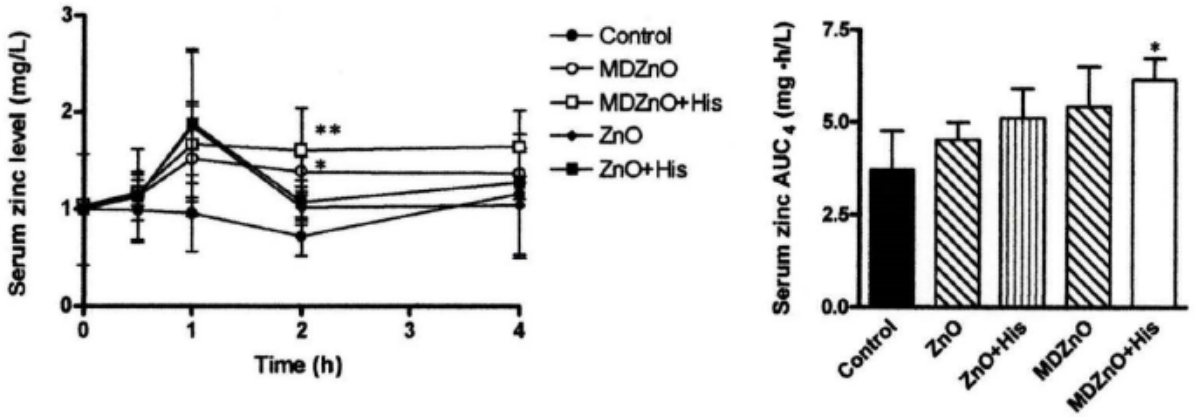
a：表中のカッコ内の値は動物数
b：Control に対して有意に低値（P<0.005）
c：投与後 3 時間に測定され、Control に対する有意差は認められなかった
d：Control に対して有意に高値（P<0.005）

2.6.5.3.2 ヒスチジン併用投与の効果（ラット経口投与-2）

＜添付資料 4.2.2.2-2 参＞

動物種	Wistar 系雄ラット
給餌	低亜鉛飼料（2.66 mg Zn/kg）
被験物質	・酸化亜鉛（ZnO）、粒子径：1.84 μm ・微細化酸化亜鉛（MDZnO）、粒子径：0.25 μm
溶媒／投与形態	記載なし／溶液
投与経路	経口
投与量	亜鉛単独投与：1 mg Zn/kg、 Histidine 併用投与：1 mg Zn/kg + 3.2 mg Histidine/kg （Zn：Histidine モル比 = 1：1.3）
試験構成	・ミリポア水投与群（Control） ・酸化亜鉛投与群（ZnO） ・酸化亜鉛＋Histidine 併用投与群（ZnO+His） ・微細化酸化亜鉛投与群（MDZnO） ・微細化酸化亜鉛＋Histidine 併用投与群（MDZnO+His）
試料	血清
定量（対象）物質	Zn
定量法	Inductivity-coupled plasma mass spectrometry（ICP-MS）

血清中亜鉛濃度に対する Histidine 併用投与の効果



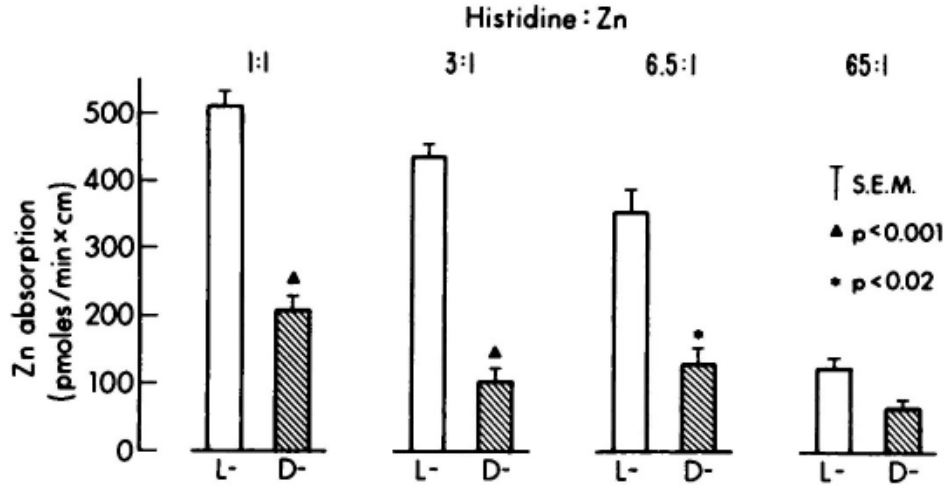
左図：投与後の血清中亜鉛濃度推移、右図：投与後 4 時間までの AUC(mg･h/L)[a)]
平均値±標準偏差（n=4、ZnO+His のみ n=3）
＊：Control に対して P<0.05、＊＊：Control に対して P<0.01
a：台形公式により算出

2.6.5.3.3 ヒスチジンの効果（ラット回腸かん流法）

＜添付資料 4.2.2.2-3 参＞

試験系	Wistar 系雄ラット、回腸かん流法
給餌	通常飼料（58 ppm Zn）
被験物質	硫酸亜鉛
試験方法	・NaCl にて等張にした 5 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5）に硫酸亜鉛（0.153 mmol/L）を加え、さらに、L-又は D-Histidine を所定量添加してかん流液を調製した ・回腸末端から上流へ 5 cm 付近及びその上流 20～30 cm 付近にカテーテルを挿入し、37℃のかん流液を 0.18～0.22 mL/分の速度でかん流した ・1 時間の平衡化の後、15 分ずつ 10 画分のかん流液を採取した ・各画分の亜鉛を原子吸光法により測定した

亜鉛の吸収に対する L-及び D-Histidine の効果



平均値±標準誤差（25 to 46 determinations for L-, and 17 to 30 determinations for D-Histidine）
▲、＊：それぞれの Histidine：亜鉛のモル比における L-Histidine に対する有意差

2.6.5.3.4 塩化亜鉛の経口吸収率（ラット経口投与）

＜添付資料 4.2.2.2-4 参＞

動物種	SD 系雄ラット
給餌	通常亜鉛飼料（40 ppm Zn）
被験物質	$^{65}ZnCl_2$
溶媒／投与形態	生理食塩水／溶液
投与経路	経口投与
投与量	トレーサー量（1 μCi/1.23 μg Zn/rat）
放射性核種	^{65}Zn
比放射能	0.81 mCi/mg Zn
定量（対象）物質	放射能
定量法	Well-type gamma-scintillation counter
試験方法	・$^{65}ZnCl_2$を単回経口投与後、代謝ケージに収容し、所定の時間に消化管内容物を回収して放射能を測定した ・同時点までに排泄された糞及び尿中放射能を測定した ・下式により見掛けの吸収率を算出した ・見掛けの吸収率（%）＝ {投与放射能-(消化管内残存放射能+糞中放射能)}／投与放射能×100

ラットに $^{65}ZnCl_2$ を経口投与後の消化内及び糞中放射能並びに見掛けの吸収率

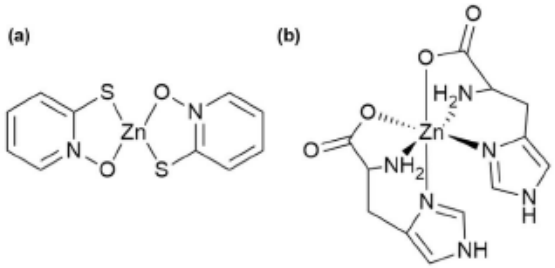
投与後時間	放射能（% of dose）[a]				
	消化管内残存放射能	糞中放射能	消化管内残存放射能＋糞中放射能	見掛けの吸収率[b]	尿中放射能
15 min	89.9	-	89.9	11.1	尿中放射能は非常に低く、測定したすべての時点において、投与放射能の0.2%を超えることはなかった
30 min	74.6	-	74.6	25.4	
1 h	75.5	-	75.5	24.5	
2 h	77.6	-	77.6	22.4	
3 h	75.9	-	75.9	24.1	
4 h	72.1	2.9	75.0	25.0	
6 h	72.8	3.0	75.8	24.2	
8 h	65.9	8.8	74.7	25.3	
24 h	5.0	78.2	83.2	16.8	
48 h	3.1	80.3	83.4	16.6	

a：平均値（n=6）
b：見掛けの吸収率(%)={投与放射能-(消化管内残存放射能+糞中放射能)}／投与放射能×100
-：糞をしていない

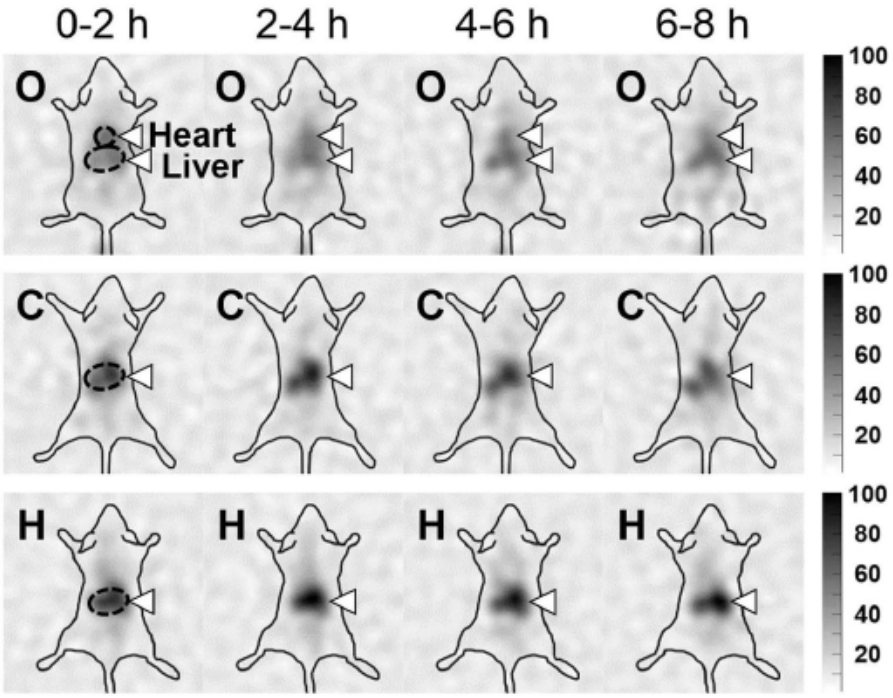
2.6.5.4 薬物動態試験：分布

2.6.5.4.1 全身 ARG 及び組織中放射能濃度（マウス静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-1 参＞

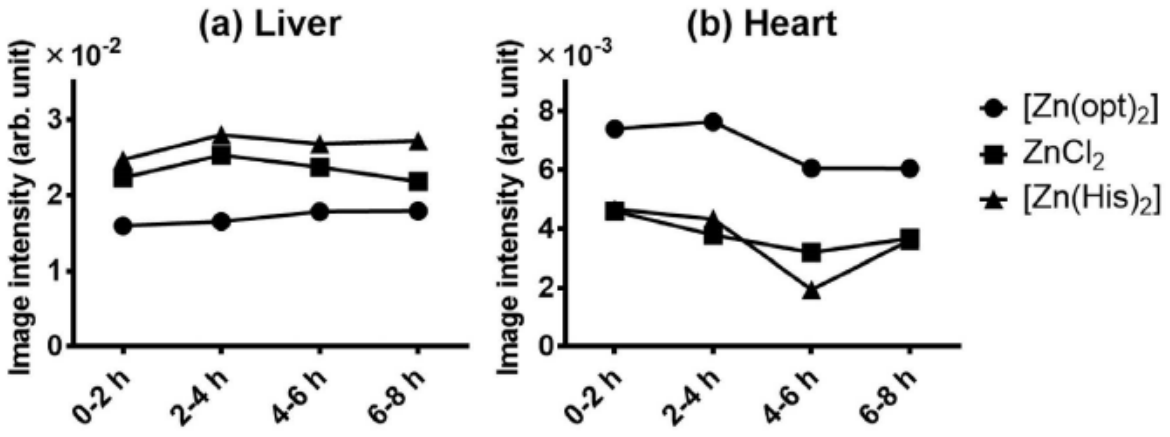
動物種	C57BL/6J マウス
給餌	投与前非絶食
被験物質	・[^{65}Zn]標識 di(1-oxy-2-pyridinethiolato)Zn（a：以下、^{65}Zn(opt)$_2$） ・[^{65}Zn]標識 di(L-histidinato)Zn（b：以下、^{65}Zn(His)$_2$） ・[^{65}Zn]標識 $ZnCl_2$（以下、$^{65}ZnCl_2$） (a)　(b) 
溶媒／投与形態	生理食塩水又は生理食塩水/DMSO（30/70）／溶液
投与経路	静脈内
投与量	1 mg Zn/kg
試験構成	・Gamma-ray emission imaging：各被験物質ごとに n=1 ・組織中放射能測定：投与後 4 時間に組織摘出、放射能測定（n=4）
放射性核種	^{65}Zn
比放射能	・Gamma-ray emission imaging の場合：10 MBq/10 mg Zn ・組織中放射能測定の場合：2.5 MBq/10 mg Zn
定量（対象）物質	放射能
定量法	・Gamma-ray emission imaging ・ゲルマニウム検出器（組織中放射能）

Gamma-ray emission imaging による ^{65}Zn の分布
－イメージング画像－

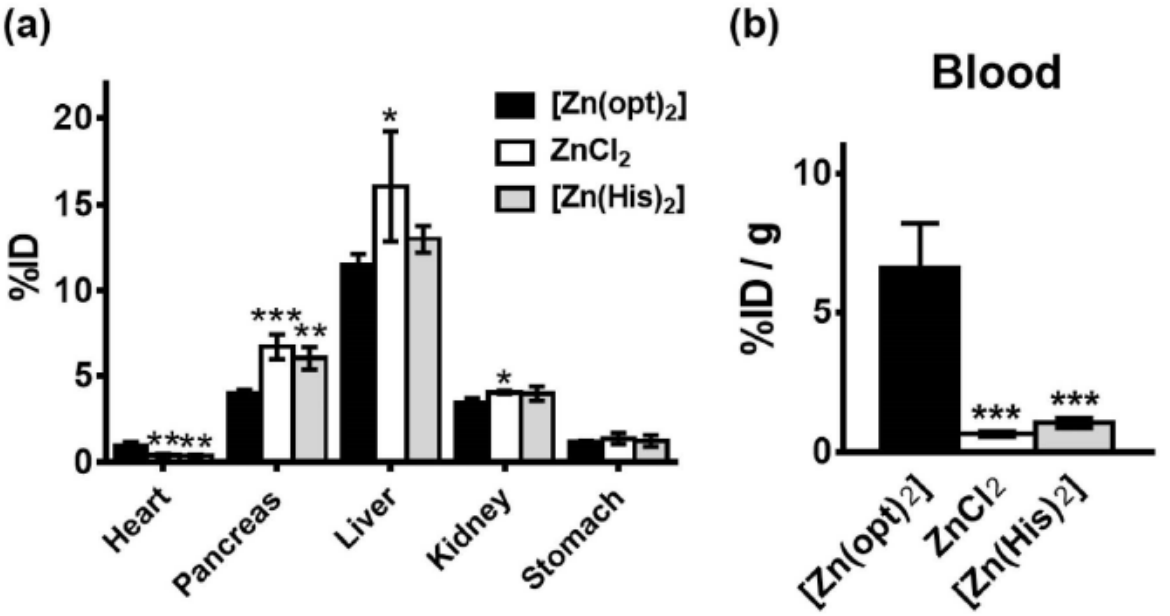


上段（O）：^{65}Zn(opt)$_2$、中段（C）：$^{65}ZnCl_2$、下段（H）：^{65}Zn(His)$_2$
白い矢印は特徴的な放射能の蓄積を示す

Gamma-ray emission imaging による ^{65}Zn の分布
－肝臓及び心臓における放射能強度の経時推移－



$^{65}Zn(opt)_2$、$^{65}ZnCl_2$ 又は $^{65}Zn(His)_2$ をマウスに静脈内投与後 4 時間における放射能分布



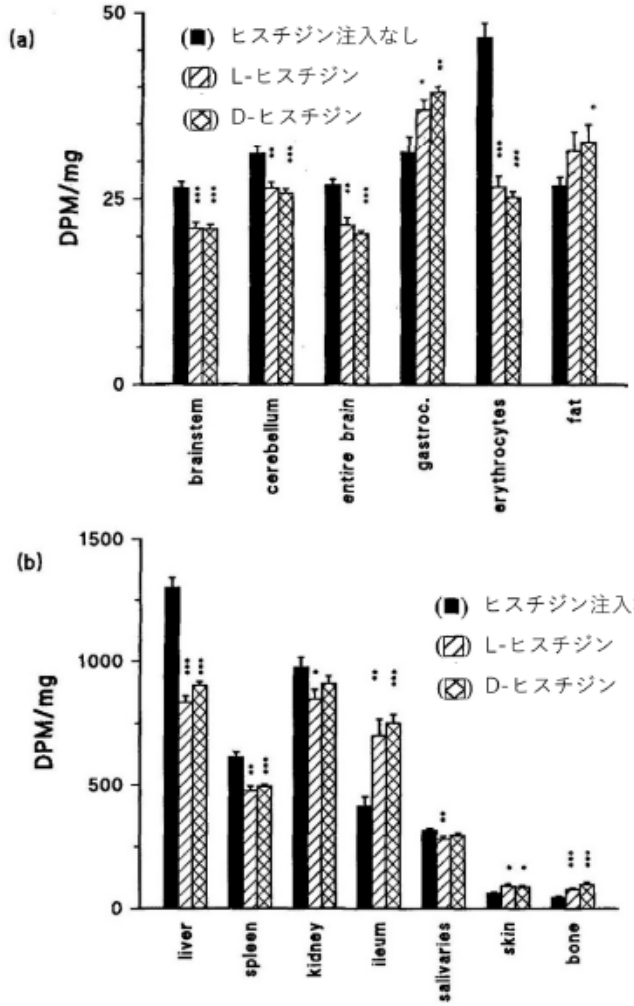
*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001
%ID：percent of injected dose

2.6.5.4.2 組織中放射能濃度（ラット静脈内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-2 参＞

動物種	Wistar 系雄ラット
給餌	記載なし
被験物質	$^{65}ZnCl_2$
溶媒／投与形態	500 mmol/L Tris、pH 7.4／溶液
投与経路	静脈内投与
投与量	123,000 dpm/g BW（約 70 ng Zn/rat）
放射性核種	^{65}Zn
比放射能	約 3×10^{14} Bq/g Zn
定量（対象）物質	放射能
定量法	Well-type scintillation counter
試験方法	・ヒスチジンを水に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.4 に調整した ・L-ヒスチジン濃度は 250 mmol/L、D-ヒスチジンは 60 mmol/L とした ・注入速度：注入開始から 2 分間は 1 mL/min、その後 28 分間は 4 mL/h、以後は 2 mL/h とした ・注入開始後 3 時間に ^{65}Zn 溶液を静脈内投与し、投与後 1 時間に組織を摘出して放射能を測定した

ヒスチジンを静脈内定速注入したラットに ^{65}Zn を静脈内投与後 1 時間の組織中放射能濃度
（平均値±標準誤差、n=6）



*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001（ヒスチジン注入なしに対する t 検定）
実験終了時の血漿中ヒスチジン濃度：
2.70±0.2 mmol/L for L-ヒスチジン、2.66±0.22 mmol/L for D-ヒスチジン
(a)：放射能濃度の低い組織、(b)：放射能濃度の高い組織

2.6.5.4.3 組織中放射能濃度（ラット筋肉内投与）

＜添付資料 4.2.2.3-3 参＞

動物種	Long-Evans 系雄ラット				
給餌	低亜鉛飼料（＜1 ppm Zn）又は通常亜鉛飼料（20 ppm Zn）				
被験物質	・[^{65}Zn]標識 zinc dipicolinate（以下、$^{65}ZnPA_2$） ・[^{65}Zn]標識 zinc histidinate（以下、^{65}ZnHis）				
溶媒／投与形態	0.15 mol/L NaCl／溶液				
投与経路	筋肉内投与				
投与量	0.09 mg Zn/0.1 μCi/0.1 mL/rat				
放射性核種	^{65}Zn				
比放射能	$^{65}ZnPA_2$：7.0×10^4 cpm/mg Zn ^{65}ZnHis：7.5×10^4 cpm/mg Zn				
定量（対象）物質	放射能				
定量法	Well-type gamma scintillation counter				
組織	飼料中 Zn 濃度（ppm）	Zn 取込み量（μg/g wet tissue、平均値±標準偏差）			
		投与後 15 分		投与後 60 分	
		$^{65}ZnPA_2$ (n=4)	^{65}ZnHis (n=4)	$^{65}ZnPA_2$ (n=4)	^{65}ZnHis (n=4)
膵臓	＜1	0.75±0.15	0.76±0.20	1.48±0.28	1.20±0.12 [a)]
	20	0.92±0.23	1.87±0.73	2.32±0.72 [a)]	3.96±0.34 [b)]
十二指腸	＜1	0.42±0.09	0.54±0.09	1.04±0.12	0.80±0.08
	20	0.50±0.09	0.56±0.15	1.04±0.11	0.94±0.07
空腸	＜1	0.40±0.02	0.46±0.14	1.07±0.15	0.80±0.10
	20	0.40±0.10	0.45±0.12	0.95±0.17	0.88±0.19
回腸	＜1	0.50±0.10	0.56±0.21	1.60±0.37	1.18±0.18
	20	0.62±0.13	0.65±0.22	1.34±0.18	1.30±0.12
腎臓	＜1	0.82±0.06	0.94±0.20	1.80±0.51	1.39±0.05
	20	1.18±0.24	1.24±0.41	1.84±0.28	2.05±0.11
肝臓	＜1	0.95±0.12	1.03±0.18	1.42±0.26	1.16±0.03
	20	0.70±0.13	0.75±0.17	1.00±0.17	1.45±0.68
組織ごとに行内又は列内の比較において肩の英文字が異なる群間で有意差あり（P<0.02、Scheffe の多重比較）					

上表のデータによる分散分析

組織	P 値					
	飼料の効果		投与化合物の効果		飼料×投与化合物の相互作用	
	15 分	60 分	15 分	60 分	15 分	60 分
膵臓	0.008	0.0001	0.035	0.008	0.039	0.0007
十二指腸	NS	NS	NS	0.006	NS	NS
空腸	NS	NS	NS	0.046	NS	NS
回腸	NS	NS	NS	0.074	NS	NS
腎臓	0.026	0.035	NS	NS	NS	NS
肝臓	0.005	NS	NS	NS	NS	NS
NS：not significant						

2.6.5.4.4 組織中亜鉛濃度（ラット反復経口投与）

＜添付資料 4.2.2.2-2 参＞

動物種	Wistar 系雄ラット				
給餌	低亜鉛飼料（2.66 mg Zn/kg）				
被験物質	・酸化亜鉛（ZnO）、粒子径：1.84 μm ・微細化酸化亜鉛（MDZnO）、粒子径：0.25 μm				
溶媒／投与形態	記載なし／溶液				
投与経路／投与回数	経口／7 日間				
投与量	・亜鉛単独投与：1 mg Zn/kg、 ・Histidine 併用投与：1 mg Zn/kg + 3.2 mg Histidine/kg （Zn：Histidine モル比 = 1：1.3）				
試験構成	・ミリポア水投与群（Control） ・酸化亜鉛投与群（ZnO） ・酸化亜鉛＋Histidine 併用投与群（ZnO+His） ・微細化酸化亜鉛投与群（MDZnO） ・微細化酸化亜鉛＋Histidine 併用投与群（MDZnO+His）				
試料	血清、組織／臓器				
定量（対象）物質	Zn				
定量法	Inductivity-coupled plasma mass spectrometry（ICP-MS）				
組織／臓器	組織中亜鉛濃度 （μg/kg tissue、平均値±標準偏差）				
	Control (n=5)	ZnO (n=8)	ZnO+His (n=8)	MDZnO (n=8)	MDZnO+His (n=8)
肝臓	34.55 ±3.47 [b]	35.53 ±3.39 [ab]	35.92 ±3.04 [ab]	35.10 ±3.22 [b]	40.33 ±3.48 [a]
腎臓	22.38 ±1.33 [c]	24.79 ±1.23 [b]	26.18 ±0.98 [ab]	24.98 ±1.44 [b]	26.93 ±1.46 [a]
膵臓	17.85 ±2.87 [b]	23.58 ±7.11 [ab]	26.18 ±4.18 [a]	26.95 ±3.54 [a]	26.76 ±2.96 [a]
精巣	27.48 ±2.34	28.95 ±2.32	28.74 ±0.82	29.11 ±1.69	28.29 ±1.72
筋肉（四頭筋）	11.13 ±3.66	12.79 ±1.28	13.06 ±1.18	12.20 ±1.20	12.62 ±1.47
筋肉（腓腹筋）	14.03 ±2.23	12.69 ±1.28	12.41 ±1.52	13.34 ±1.28	12.43 ±1.71
大腿骨	34.88 ±3.87 [b]	44.20 ±1.94 [a]	46.15 ±1.98 [a]	46.16 ±2.63 [a]	45.96 ±1.78 [a]
血清（ppm）	0.86 ±0.31 [b]	1.50 ±0.17 [a]	1.61 ±0.19 [a]	1.45 ±0.09 [a]	1.55 ±0.04 [a]
肩の英文字が異なる群間で有意差あり（P<0.05）					

2.6.5.4.5 組織中亜鉛濃度に対するヒスチジンの効果（ラット反復経口投与）

＜添付資料 4.2.2.3-4 参＞

動物種	SD 系雄ラット		
給餌	通常飼料（150 ppm Zn）		
被験物質	ヒスチジン		
溶媒／投与形態	水／水溶液		
投与経路／投与回数	経口投与／1 日 1 回、43 日間		
投与量	500 mg/2 mL/rat/day		
定量（対象）物質	Zn		
定量法	原子吸光法		
測定結果			
測定項目	平均値±標準誤差（n=10）		P 値
	Control 群（脱イオン水）	ヒスチジン投与群	
血漿中亜鉛濃度（μg/100 mL）	89.6±3.8	89.9±1.4	NS
精巣中亜鉛濃度（μg/g dry weight）	200.04±3.89	196.51±5.68	NS
腎臓中亜鉛濃度（μg/g dry weight）	109.10±1.06	108.96±1.04	NS
体重 Day 1（g）	185±2	190±2	NS
体重 Day 21（g）[a)]	205±1	216±2	＜0.001
体重 Day 43（g）	259±2	273±3	＜0.01

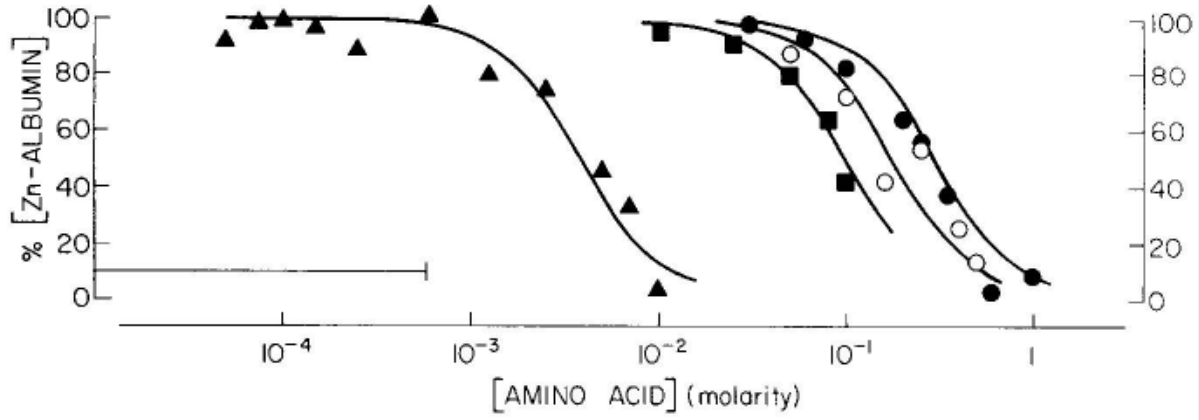
NS：not significant
a：原資料では表中への記載はなく本文に記載

2.6.5.5 薬物動態試験：たん白結合

＜添付資料 4.2.2.3-5 参＞

試験系	ヒト血清アルブミン
試験方法	・アルブミンと亜鉛の結合に対するアミノ酸の競合作用についてゲルろ過法により検討した ・充填剤：Sephadex G-25 fine ・カラム直径：1 cm ・ベッドボリューム：16.4～16.6 mL ・移動相：0.15 M NaCl、1 mmol/L ジエチルバルビツール酸ナトリウム、pH 7.4 ・試料：アルブミン（4.5 g/100 mL）及び亜鉛（400 μg/100 mL）を移動相に溶解し、さらに、所定濃度のヒスチジン、アスパラギン、スレオニン又はグリシンを添加（添加濃度は下図の横軸に示す） ・試料をカラムにアプライ、アルブミン溶出画分を分取、アルブミンと亜鉛をそれぞれ Lowry 法及び原子吸光法で定量 ・亜鉛のアルブミンに対する結合率を算出 ・横軸にアミノ酸添加濃度、縦軸に亜鉛のアルブミンに対する結合率をプロット

アルブミンと亜鉛の結合に対するアミノ酸の競合作用



▲：ヒスチジン、■：アスパラギン、○：スレオニン、●：グリシン
横軸：アミノ酸添加濃度、縦軸：亜鉛のアルブミンに対する結合率
図中横線は血漿中アミノ酸濃度の生理的濃度範囲を示す