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）

2.4　非臨床試験の概括評価

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

2.4 非臨床試験の概括評価 7
2.4.1 非臨床試験計画概略 7
2.4.1.1 緒言 7
2.4.1.2 非臨床試験計画概略 8
2.4.1.3 現行規格に基づくデータの質 8
2.4.2 薬理試験 9
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 11
2.4.2.1.1 胆汁酸生合成のコール酸による制御 12
2.4.2.1.2 コール酸による胆汁流刺激 12
2.4.2.1.3 腸管内脂質吸収促進因子としてのコール酸 13
2.4.2.1.4 一次胆汁酸合成の先天性異常の疾患モデル 13
2.4.2.2 副次的薬理試験 14
2.4.2.3 安全性薬理試験 15
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 16
2.4.3 薬物動態試験 16
2.4.3.1 吸収 16
2.4.3.1.1 腸肝循環における吸収段階 16
2.4.3.1.2 コール酸のプールサイズ 19
2.4.3.2 分布 20
2.4.3.2.1 組織分布試験 20
2.4.3.2.2 血漿タンパク結合 20
2.4.3.2.3 胎盤通過試験 20
2.4.3.3 代謝 21
2.4.3.4 排泄 21
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 21
2.4.3.6 結論 23
2.4.4 毒性試験 23
2.4.4.1 単回投与毒性試験 24
2.4.4.2 反復投与毒性試験 25
2.4.4.2.1 体重に対する影響 25
2.4.4.2.2 肝臓及び脾臓に対する影響 25
2.4.4.2.3 胆石の形成 26
2.4.4.2.4 下痢 27
2.4.4.3 遺伝毒性試験 31
2.4.4.4 がん原性試験 34
2.4.4.4.1 肝癌 34
2.4.4.4.2 大腸癌 35

2.4.4.4.2.1　ACF に対するコール酸の影響 38
2.4.4.4.2.2　腫瘍数に対するコール酸の影響 38
2.4.4.4.2.3　その他の検討事項 39
2.4.4.4.3　げっ歯類発がんモデルのヒトとの関連性 39
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 41
2.4.4.6　幼若動物を用いた試験 42
2.4.4.7　妊娠前及び妊娠期間、授乳期間、及び小児の発達期における投与の影響 42
2.4.4.8　局所刺激性試験 42
2.4.4.9　その他の毒性試験／特別な問題点を明らかにするための試験 42
2.4.4.9.1　代謝物の毒性試験 42
2.4.4.9.2　不純物の毒性試験 45
2.4.4.10　結論 47
2.4.5　総括及び結論 49
2.4.6　参照文献 53

図表目次

図 2.4-1: ヒトにおける胆汁酸合成経路 10
図 2.4-2: コレステロール骨格の C-7 位へのヒドロキシル基の導入 10
図 2.4-3: 小腸管腔からの胆汁酸吸収 17
図 2.4-4: 肝細胞基底膜側におけるコール酸トランスポーター 18
図 2.4-5: 肝細胞からのコール酸分泌及び胆汁成分 19
図 2.4-6 0～500 μg/mL の 2 種類の胆汁酸で処理した菌株 TA100 の生存曲線 (Watabe & Bernstein, 1985) 32

表 2.4-1: げっ歯類におけるコール酸のプールサイズ、代謝回転率及び合成速度 19
表 2.4-2: 単回投与試験における各用量のコール酸で観察された用量－効果反応の要約 28
表 2.4-3: 反復投与試験における各濃度のコール酸で観察された用量－効果反応の要約 29
表 2.4-4: 発がん物質誘発異常腺窩巣の形成／又は腫瘍増殖に対するコール酸の腫瘍形成促進効果を検討した試験 36
表 2.4-5: 発がん物質誘導腫瘍増殖に対するコール酸の腫瘍形成促進効果を検討した試験 37

略語一覧

3β-HSD	3β-hydroxy-Δ^5-C_{27}-steroid oxidoreductase
Δ^4-3-oxoR	Δ^4-3-oxosteroid 5β-reductase
ACF	異常腺窩巣
ABCD3	ATP-binding cassette D3
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA racemase
AOM	アゾキシメタン
AP	アルカリフォスファターゼ
AQP	アクアポリン
ASBT	頂端側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BSEP	胆汁酸塩排出ポンプ
CA	コール酸
CTX	Cerebrotendinous xanthomatosis
CHMP	ヒト用医薬品委員会
CsA	シクロスポリン A
CYP7A1	cholesterol 7α-hydroxylase
CYP8B1	sterol 12α-hydroxylase
DAB	ジメチルアミノアゾベンゼン
DBP	D-bifunctional protein
DCA	デオキシコール酸
DEN	ジエチルニトロソアミン
DMH	ジメチルヒドラジン
DNA	デオキシリボ核酸
EC	欧州委員会
ECG	心電図
EE	心内膜内皮
EFA	必須脂肪酸
est	推定
F	フィッシャー
FTR	代謝回転率
FXR	ファルネソイド X 受容体
GGT	γ-グルタミルトランスペプチダーゼ
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HNF-4α	肝細胞核内因子 4α
i.v.	静脈内
IBABP	腸管の胆汁酸結合タンパク質
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
INN	国際一般名
LD_{lo}	致死量下限
LD_{50}	中央値致死量
LRW-1	肝臓受容体ホモログ-1
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU	N-Methyl-N-nitrosourea
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
MRP	多剤耐性タンパク質
MRP2	多剤耐性関連タンパク質 2
MRP3	多剤耐性関連タンパク質 3

略語一覧（続き）

N/A	該当せず
N/D	未測定
NAD	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NF-κB	核内因子 κB
NOAEL	無毒性量
NTCP	ナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド
OATP	有機アニオン輸送ポリペプチド
OATP3	有機アニオン輸送ポリペプチド 3
OST	有機溶質トランスポーター
PC	ホスファチジルコリン
SCPx	Sterol carrier protein X
SD	Sprague-Dawley
SHP	small heterodimer partner
tASBT	切断型頂端側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター
V_{max}	能動的吸収の最大速度

審査官に対する注記事項

非臨床試験の概要では、極めて多様な文献情報源からデータを収集している。そのため、これらの情報源は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）基準にも GLP にも適合せず、データの提示は利用可能なデータにあわせて調整する必要があった。

非臨床試験の概要には文献の参照データのみを記載する。それぞれの論文は ICH 基準で規定されている非臨床モジュールの様々なセクションに関連する可能性がある。そこで、申請者の判断により、情報を提示するのに最も適したセクションを決定した。

各動物に投与されたコール酸の濃度又は量を算出するために、体重又は摂餌量に関する詳細情報を可能な限り参考文献から入手した。しかし、情報が入手できなかった場合には、必要に応じて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
ウサギ [4]	成熟	雄	4.5 kg	200 g
ハムスター	成熟	雌雄	–	12 g
スナネズミ	成熟	雌雄	–	10 g
ヒツジ	成熟	雌 [5]	70 kg	

[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
[4] http://www.ag.ndsu.edu/pubs/alt-ag/rabbit.htm; www.harlan.com/download.axd/727676722ade434ba25eeceec35f3b73.pdf?d=RMS1008-US-EN-01-PS-21_NZWRabbit; http://books.google.com/books?id=Jv8jIGZ2HGsC&pg=PA38&lpg=PA38&dq=male+new+zealand+white+rabbit+weight+sexually+mature+age&source=bl&ots=qf13jZoIeJ&sig=6uDH0ELABQrm49nnaeOFvdx3kvs&hl=en&ei=maw2SoL_O5e5jAe1rPmBCg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1#PPA13,M2
[5] 妊娠

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

2.4.1.1　緒言

コール酸は一次胆汁酸である。胆汁酸とその抱合体は、肝臓でコレステロールから合成される胆汁の必須成分である。

コール酸は白色～オフホワイトの結晶性粉末で、水に溶けにくく（溶解度 0.28 g/L）、エタノールに溶けやすい（30.56 g/L）。コール酸は両親媒性分子であり、最小及び最大臨界ミセル濃度はそれぞれ 2.5 mmol/L 及び 29.3 mmol/L（37°C の水中のナトリウム塩として）である。

コール酸はウシの胆汁から純度 99.0%以上に精製されたものである。不純物は、主に胆汁の正常成分である他の胆汁酸並びに 0.4%以下のコール酸メチルである。

コール酸は、50 mg 硬カプセル剤として製剤化される。標準的な薬局方の賦形剤が使用されており、カプセルフィルに乳糖一水和物、無水コロイドシリカ及びステアリン酸マグネシウム、カプセルシェルにゼラチン、二酸化チタン、インジゴカルミン（FD&C Blue 2）及び黄色酸化鉄が含まれる。

本申請は、先天性胆汁酸代謝異常症の治療におけるコール酸（オファコルカプセル 50 mg）の日本での承認取得を目的としている。先天性胆汁酸代謝異常症は、合成経路に関与する酵素（以下の酵素を含むがこれらに限定しない）のいずれか一つの欠損によって起こり得る。欠損する酵素によって以下の病型に分類される。いずれの異常症も極めてまれな遺伝性疾患である。

- 3β-hydroxy-Δ^5-C_{27}steroid oxidoreductase (3β-HSD) deficiency
- Δ^4-3-oxosteroid 5β-reductase (Δ^4-3-oxoR) deficiency.
- Oxysterol 7α-hydroxylase（CYP7B1）deficiency
- Cholesterol 7α-hydroxylase（CYP7A1）deficiency.
- Sterol 27-hydroxylase deficiency (Cerebrotendinous xanthomatosis)
- ATP-binding cassette D3 (ABCD3) deficiency
- Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) deficiency
- Acyl CoA Oxidase 2 (ACOX2) deficiency
- D-bifunctional protein (DBP) deficiency
- Sterol carrier protein X (SCPx) deficiency

コール酸の 1 日用量は成人及び小児において 5～15 mg/kg である。1 日用量は、原則として、正常な成人における 1 日当たりの一次胆汁酸総合成量に相当する 500 mg を最大投与量とする。投与量は、血液及び／又は尿のクロマトグラフィーによる胆汁酸プロファイル又は肝機能検査に応じて、患者ごとに、投与期間中に調節を行う。コール酸の投与は長期的に行い、今後その他の治療選択肢が現れない場合は、生涯にわたって行う。

患者集団には、小児及び成人が含まれる。

2.4.1.2 非臨床試験計画概略

胆汁酸は胆汁の流れを誘導し、コレステロール生合成をフィードバック阻害し、コレステロールの腸管からの排泄を促進し、脂質及び脂溶性ビタミンの分散と吸収を促進する。胆汁酸は胆管に分泌された後、大部分（95%）が腸管（主に回腸）で再吸収され、肝臓に戻り、その後再び胆汁中に分泌される (Brunton, et al., 2005)。腸肝循環を構成するこの回路については、数十年間に十分解明されてきた。コレステロールからの一次胆汁酸の生合成及び腸内細菌の作用を介した二次胆汁酸への代謝変換については詳細に解明され、この 50 年間にさらに解明が進んでいる。過去 20 年間にわたり、一次胆汁酸合成の調節及び腸肝循環のコンパートメント間の輸送段階における分子相互作用が詳細に解明されてきた (Ross, 2008)。

より最近では、胆汁酸の潜在的な内分泌調節機能が発見された (Houten, et al., 2006)。この分野は現在活発な研究領域である。しかし、コール酸を含む胆汁酸が代謝調節において重要な役割を担っていることを示すエビデンスについては、今も未解決である。

コール酸及び胆汁酸全般については多数の文献があり、現代医学及び生理学の始まりまで遡る (Reuben, 2005) (Ross, 2008)。文献全体について詳細なレビューを提供することは、本申請の範囲外である。また、これらの研究の方向性並びに既存のデータは、ヒト及び動物におけるコール酸の正常な代謝と生理機能を理解したいという欲求から得られたものであった。そのため、研究は ICH ガイドラインに規定されている従来の医薬品開発プログラムと完全に適合する方法では実施されていなかった。上記を考慮した結果、申請者は、利用可能な非臨床試験データを一部はレビュー論文の形で、一部は選別したオリジナル論文の形で提示することとした。レビュー論文は、大量のデータを要約して、それらを総合的に見た時にのみ理路整然とした事実が得られる場合に参照する。医薬品としてのコール酸の非臨床評価に最も適切であると考えられたオリジナル論文は、非臨床試験の概要及び本申請書に詳細に提示されている。

2.4.1.3 現行規格に基づくデータの質

引用したオリジナル論文の大部分は 10 年以上前のものであり、最も古いものは 1926 年に発行されたものである。これは、ある時点で、各研究分野、特に毒性について徹底的な検討が行われ、その時点以降、そのテーマについてはそれ以上研究が行われなかったためである。そうはいうものの、これらのオリジナル論文の多くは、方法論又はデータ報告に関する現在の標準から見て、重大な欠陥がある。しかし、通常、これらの欠陥は文献の古さや発表以降の科学的標準の発展に関係するものである。

コール酸は非常に特異な特性を有する内因性分子であるため、従来の医薬品の非臨床評価はコール酸に適さない側面がある一方、医薬品の特性評価に厳密に沿った特性解析では、ある重要な側面を見逃す可能性がある。例えば、生理的（すなわち内因性）濃度では、コール酸は確かに毒性を示さず、その濃度はヒトでの使用で安全かつ有効な用量範囲となっている。さらに、コール酸は内因的に合成され、この合成を負に制御し、腸肝循環を受けるという事実により、従来の input/output に基づく薬物動態研究は適さない。また、健常被験者並びに慢性肝疾患患者におけるコール酸の生理機能については既に豊富な知識が存在するため、ヒトにおける有効性及び安全性の評価への非臨床データの重要性は低い。以上のことから、本申請に提示するコール酸の非臨

床データは、ICH ガイドラインの規定には完全には準拠しない。逸脱及び省略はすべて、2.4 項及び 2.6 項を通じて十分に説明される。

申請者は、さらなる動物実験や試験によって、対象領域の科学的知見が深まる可能性は低く、その実施は、動物の福祉に基づき非倫理的であると考える。

2.4.2　薬理試験

コール酸、その他の胆汁酸及び胆汁酸塩は、胆汁の天然成分として認められる。コール酸、ケノデオキシコール酸及びデオキシコール酸はヒトの胆汁酸の 95%を占める。リトコール酸及びウルソデオキシコール酸は微量成分である。胆汁酸は主にグリシン及びタウリンとの抱合体として存在し、これらは胆汁酸塩と呼ばれている (Brunton, et al., 2005)。

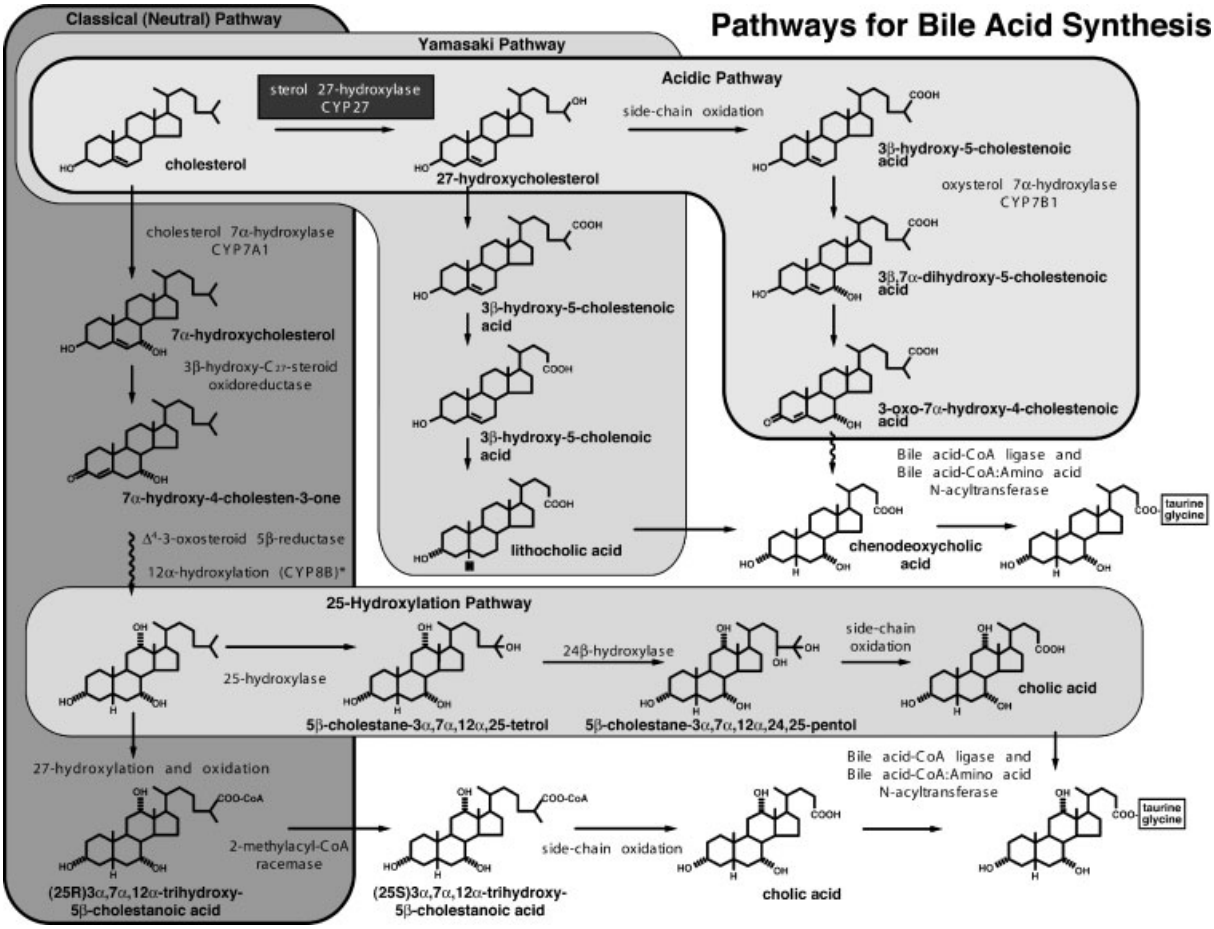
胆汁中に分泌された胆汁酸は脱抱合され、一次胆汁酸の一部は腸内細菌の作用によって二次胆汁酸に変換される。胆汁酸の 90～95%は主に小腸下部で再吸収され、腸肝循環を経て、少量が糞便中に排泄され、通常尿中に排泄されるのはごくわずかである。腸肝循環経路を経て肝臓に戻った胆汁酸は、胆汁中に再分泌される前に再抱合される。胆汁酸合成の自己調節経路は、腸肝循環及び胆汁酸摂取の影響を受けやすい (Setchell & O'Connell, 2007)。

胆汁酸の生理的作用には以下のものがある (Brunton, et al., 2005)。

- 胆汁流の誘導
- 胆汁酸合成のフィードバック阻害
- コレステロール合成の調節
- コレステロールの排泄
- 脂質及び脂溶性ビタミンの分散・吸収の促進

ヒトにおけ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、肝細胞においてステロイド核と側鎖を修飾する一連の反応によりコレステロールから合成される（図 2.4-1、 (Setchell & O'Connell, 2007)）。これらの反応を触媒する酵素は様々な細胞内コンパートメントに存在する。正常な条件下では寛容な基質特異性（promiscuity）を示し、3β-HSD 欠損症や Δ^4-3-oxoR 欠損症のように、生合成経路の完全性が阻害される病的条件下では、このような寛容な基質特異性が増強される。全体として、現在一次胆汁酸合成に至る主要経路は 2 つ存在すると認識されており、classical 又は neutral pathway 及び acidic pathway と呼ばれている。

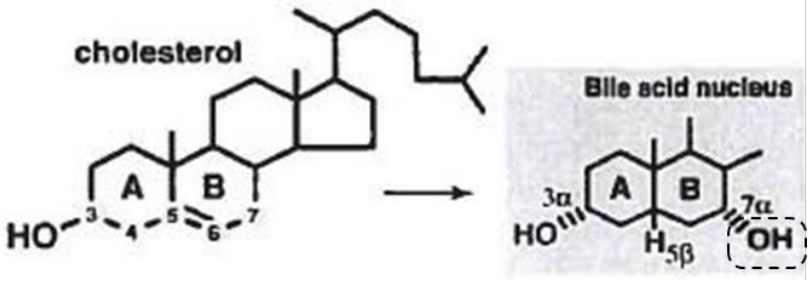
図 2.4-1: ヒトにおける胆汁酸合成経路



出典： (Heubi, et al., 2007) 一次性胆汁酸の生合成の代謝経路（classical 又は neutral pathway、alternative 又は acidic pathway）。既知の先天性エラーを各経路の箱で囲んで示した。(Reproduced from Bove et al,56 with kind permission from Springer Science and Business Media.)

Classical pathway を介する胆汁酸合成の最初の反応で律速段階は、cholesterol 7α-hydroxylase によるコレステロール核の C-7 位へのヒドロキシル基の導入である（図 2.4-2）。胆汁酸合成は、主に、その腸肝再循環中に門脈を介して戻った胆汁酸による負のフィードバックによって調節されている。

図 2.4-2: コレステロール骨格の C-7 位へのヒドロキシル基の導入



（出典：(Setchell & O'Connell, 2007)C-7 位へのヒドロキシル基の導入部位を点線で囲んで示す。ステロイド骨格の AB 環の修飾反応に関わる酵素に関して、3 種類の変異がよく知られている。これらの変異による代謝障害により、家族性肝内胆汁うっ滞症として臨床症状が発現することが知られている。）

7α-hydroxycholesterol 合成に続いて 、ステロイド核への酸化還元及び水酸化の修飾が行われ、その結果、コール酸経路又はケノデオキシコール酸経路のいずれかに向かうステロール中間体が生成される。

- 7α-hydroxycholesterol が 7α-hydroxy 4-cholesten-3-one に変換される。ミクロソームニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）依存性 3β-hydroxy-Δ^5-C_{27}- steroid oxidoreductase enzyme［3β-hydroxy-Δ^5-C_{27}-steroid dehydrogenase/isomerase（3β-HSD）とも言う］によって触媒される反応。
- 7α-hydroxy 4-cholesten-3-one は、肝ミクロソームのチトクローム P450 12α-hydroxylase により 7α,12α-dihydroxy-4-cholesten-3-one に変換される。上記反応を介した 12α-水酸化により、（dihydroy-）中間体はコール酸経路に向かう。一方、この水酸化反応を受けなかった中間体はケノデオキシコール酸に変換される。
- 7α,12α-Dihydroxy-4-cholesten-3-one 及び 7α-hydroxy-4-cholesten-3-one はいずれも、可溶性 Δ^4-3-oxosteroid5-β reductase（Δ^4-3-oxoR、又は 5β-reductase）による還元を受ける。
- 3-oxo-5β (H) sterol 及び 3-hydroxo-5β (H) sterol は、一群のアイソザイムからなる可溶性 3α-hydroxysteroid dehydrogenase により変換される。これはステロイド核の最終修飾であり、これにより中間体である 5β-cholestane-3α,7α,12α-triol 及び 5β-cholestane-3α,7α-diol（胆汁アルコール）が生成される。
- 次いで、胆汁アルコールは一連の側鎖の酸化反応を受け、側鎖長が炭素原子 3 個分短くなる。これらの反応は、まずミトコンドリア酵素、次いでペルオキシソーム酵素によって触媒され、最終産物であるコール酸及びケノデオキシコール酸が生成される。

その後、一次胆汁酸はグリシン及びタウリンと抱合し、グリココール酸及びタウロコール酸並びにグリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸を形成する。胆汁酸は、腸管内に分泌された後、主に回腸で再吸収され、門脈血を介して肝臓に戻る (Ross, 2008)。結腸での再吸収を免れた一次胆汁酸は脱抱合され、腸内細菌の作用により二次胆汁酸に変換される。この経路において最も重要な反応は 7α-脱水酸化であり、コール酸はデオキシコール酸に、ケノデオキシコール酸はリトコール酸に変換される (Ross, 2008)。

げっ歯類では、ケノデオキシコール酸からさらに β-ムリコール酸が合成され、一次胆汁酸となる。げっ歯類では、その他の二次胆汁酸として、ω-ムリコール酸が β-ムリコール酸から生成される。

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

胆汁酸の生理機能のいくつかの側面は、先天性胆汁酸代謝異常症の治療におけるコール酸の主薬効（primary pharmacodynamic action）に極めて重要である。第一に、胆汁酸のコレステロールからの合成と肝細胞内輸送を自ら調節する作用、第二に、胆汁流を誘導する作用、第三に、腸内でミセルを形成し、脂肪と脂溶性栄養素の吸収を仲介する作用である。

文献には、特に第一及び第二の作用に関する豊富なデータが存在し、以下に要約する。さらに、一次胆汁酸合成の先天性異常疾患モデル（3β-HSD 欠損症、Δ^4-3-oxoR 欠損症及び CYP7A1 欠損症）におけるコール酸の効果や疾患メカニズムを検討した 3 つの試験がある。

2.4.2.1.1　胆汁酸生合成のコール酸による制御

胆汁酸代謝は、一次胆汁酸合成の負のフィードバック調節を介して厳密に制御されている。胆汁酸合成の負のフィードバック調節は、動物モデルを用いたコール酸経口投与、静脈内投与、十二指腸内投与での幅広い試験、in vivo 及び in vitro 試験において認められる普遍的なメカニズムである。

胆汁酸は、特に CYP7A1（cholesterol 7α-hydroxylase）の活性 (Kwekkeboom, et al., 1990)及び発現 (Pandak, et al., 1994)を阻害することにより、その合成に負のフィードバック調節がなされる。実際に、胆汁酸合成に関与するチトクローム P450 酵素 CYP7A1 及び CYP8B1（sterol 12α-hydroxylase）は、主に核内胆汁酸受容体 FXR を介して、コール酸を含む胆汁酸による負のフィードバック調節を受ける (Li-Hawkins, et al., 2002), (Murphy, et al., 2005), (Shea, et al., 2007)。コール酸を含む疎水性胆汁酸により活性化されると、FXR は small heterodimer partner （SHP）転写抑制因子の発現を誘導する。SHP が消失した場合、胆汁酸のホメオスタシスの異常をもたらす (Wang, et al., 2002)。SHP は、CYP7A1 及び CYP8B1 遺伝子のプロモーター領域に結合する他の転写因子肝臓 X 受容体 α（LXRα）、肝臓受容体ホモログ-1（LRH-1）及び肝細胞核内因子 4α（HNF-4α）と負の相互作用を示し、その結果、一次胆汁酸合成が抑制される (Goodwin, et al., 2000), (Lu, et al., 2000), (Brendel, et al., 2002)。また、FXR 及び SHP を介する経路に依存しない胆汁酸誘導性 CYP7A1 のダウンレギュレーションのメカニズムが報告されている (Wang, et al., 2002)。これらの調節メカニズムは、げっ歯類及び霊長類で確認されているが (Redinger, et al., 1984), (Goodwin, et al., 2000)、ウサギは、コール酸が CYP7A1 発現及び一次胆汁酸合成をダウンレギュレートしない点で例外である (Hall, et al., 1988), (Araya, et al., 1995)。

胆汁酸調節経路における cholesterol 7α-hydroxylase の重要性を強調するエビデンスが、CYP7A1 遺伝子を破壊したマウスから得られている。これらの動物は、出生時には一見正常であったが、明らかに脂溶性ビタミン及び一次胆汁酸の欠乏のため、生後 18 日以内に約 85%が死亡した。一方、母動物の飼料にコール酸を添加すると、授乳中の CYP7A1 遺伝子が破壊された仔動物の出生後後期の生存率が正常に近くなった (Ishibashi, et al., 1996)。

2.4.2.1.2　コール酸による胆汁流刺激

胆汁酸の利胆作用はよく知られている (Brunton, et al., 2005)。コール酸を静脈内投与及び十二指腸内投与すると、胆汁分泌が増加し、胆汁への胆汁酸、リン脂質及びコレステロールの分泌が増加する (Klaassen, 1972), (Borgström, et al., 1986), (Fickert, et al., 2001)。コール酸の経口投与は、基底膜側の胆汁酸トランスポーター（NTCP）のダウンレギュレーション、毛細胆管側膜の胆汁酸トランスポーター（BSEP）のアップレギュレーションをもたらし、これは胆汁酸の肝細胞蓄積を防止するための防御機構の可能性がある (Fickert, et al., 2001)。

2.4.2.1.3 腸管内脂質吸収促進因子としてのコール酸

コール酸は、コレステロール合成及び CYP7A1 を介したコレステロールの胆汁酸への変換を減少させる一方で、コレステロールの腸管吸収の重要な刺激因子である (Murphy, et al., 2005)。

一次胆汁酸の約 80%を占めるコール酸は、タウリンもしくはグリシン抱合胆汁酸として胆汁中に分泌され、胆嚢の収縮に伴って十二指腸に流入する。ステロイド骨格に付加された水酸基やカルボン酸などが形成する親水的領域と反対側が形成する疎水的領域に起因した界面活性作用を有し、食事由来の脂肪やビタミン D を含む脂溶性ビタミンとミセルを形成し、消化管腔内で分散させることができ、界面でのリパーゼの作用による脂質の消化やその後の腸管での吸収に寄与する。そして、胆汁中へと排出されたコール酸の多くは腸管から再吸収され、門脈を通して肝臓に戻り、腸肝循環に戻る。

参考文献：

- 石塚敏, 2014. 胆汁酸分子種の多様性 構造・代謝と生理作用.: 化学と生物; 52(5): 301-6
- 内田清久, 1992. 胆汁酸代謝と腸内細菌.: ビフィズス; 5: 157-72
- 小西ら, 2013. 腸肝循環：胆汁酸サイクルを中心に.: 外科と代謝・栄養; 47(1): 41-3
- 池田義人, 2020. タウロヒオデオキシコール酸が有する胆汁中リン脂質排出促進作用とその機序-胆汁酸肝組織障害に対する治療薬開発を目指した ABCB4 活性化分子の探索-.: YAKUGAKU ZASSHI; 140(11): 1329-34
- 渡辺 志朗, 2020. 胆汁酸による脂肪合成系の制御.: Journal of Japanese Biochemical Society; 92(5): 680-7

2.4.2.1.4 一次胆汁酸合成の先天性異常の疾患モデル

3β-HSD 欠損 (Shea, et al., 2007)及び cholesterol 7α-hydroxylase 欠損 (Ishibashi, et al., 1996)のような異なる欠損動物モデルで、コール酸の効果が評価された。3β-HSD 及び cholesterol 7α-hydroxylase の両方の欠損モデルにおいてコール酸の同様の効果が観察されたので、他の適応症の疾患モデルでの同等の効果が考えられる。

HSD3β7 遺伝子（3β-HSD をコードするヒト遺伝子のホモログ）を破壊したマウスでは、出生後の死亡率が極めて高く、授乳中の母動物の飼料にコール酸及びビタミンサプリメントを添加すると、改善が認められた (Shea, et al., 2007)。コール酸の効果は用量依存的であった。このように、コール酸投与は、疾患モデルでヒトにおける病態と同様の効果を示した。ノックアウトマウスでは、胆汁酸の糞中排泄が増加し、腸管でのコレステロール吸収が大きく減少した。このコレステロール吸収の低下は、増加したコレステロール生合成により相殺された。ヒトと同様に、胆汁中の一次胆汁酸の量が減少し、胆汁中には 3β-HSD 欠損症患者と同じ代謝産物ではないものの、主に 2 種類の異常胆汁酸代謝産物が含まれていた（代謝産物の違いは、げっ歯類とヒトとの種特異的な一次胆汁酸及びその生合成の違いによる可能性が高い）。2.4.2.1.1 項に示した結果と一致して、ノックアウトマウスの肝細胞では、CYP7A1 及び CYP8B1 mRNA のレベルが増強し、SHP mRNA のレベルが低下しており、これらノックアウトマウスでは FXR を介した負の

フィードバック調節が破壊されていることを示している。興味深いことに、ノックアウトマウスの肝細胞では Δ^4-3-oxoR をコードする遺伝子である AKR1D1 の発現も増加していた。

cholesterol 7α-hydroxylase 及び胆汁酸生合成のマウスの生後の正常な発育における重要な役割がホモ接合体ノックアウトマウスによって明らかになった (Ishibashi, et al., 1996)。cholesterol 7α-hydroxylase 遺伝子欠損のヘテロ接合体(Cyp7+/-)は、表現型上は正常だった。ホモ接合体(Cyp7-/-)は、出生時には一見正常であったが、生後 18 日以内に死亡した。約 40%の動物が生後 1 から 4 日で、45%の動物が生後 11～18 日に死亡した。死亡前に、体重増加の異常な鈍化、脂肪便、過角化、被毛の異常な外観及び行動異常が見られた。これらの症状は脂肪吸収障害（消耗、脂肪便）及び脂溶性ビタミン吸収障害（皮膚、被毛、視覚の異常）を表していて、ホモ接合体(Cyp7-/-)にこれらの症状が起こることは、cholesterol 7α-hydroxylase により開始される小胞体での胆汁酸生合成経路が新生動物の栄養のホメオスタシスのために重要であることを示唆する。

授乳中の母動物の飲料水にビタミンを添加すると、生後初期の死亡が防がれ、母動物の飼料にコール酸を添加すると、その後の死亡が防がれた。

胆汁酸代謝は、一次胆汁酸合成の負のフィードバック調節を介して厳密に制御されている（2.4.2.1.1 項）。胆汁酸合成の負のフィードバック調節は、動物モデルを用いたコール酸経口投与、静脈内投与、十二指腸内投与での幅広い試験、in vivo 及び in vitro 試験において認められる普遍的なメカニズムである。

従って、3β-HSD 欠損モデル及び cholesterol 7α-hydroxylase 欠損モデルで大変類似した表現型がみられ、いずれの表現型もコール酸を授乳中の母動物に与えることで救済される。これらのモデルでの救命作用における正確なメカニズムは、現在のところ明らかではない。しかしながら、Δ^4-3-oxoR, ABCD3, AMACR, ACOX2, DBP, SCPx 及び Sterol 27-hydroxylase は、3β-HSD 及び cholesterol 7α-hydroxylase のように同じ胆汁酸生合成経路の一部なので、これら酵素の欠損も前述の欠損モデルと類似の表現型を示し、コール酸により救済されることが期待される。3β-HSD 欠損症又は Δ^4-3-oxoR 欠損症患者で見られる胆汁うっ滞における非生理的胆汁酸代謝物の役割については、in vitro で検討されている (Stieger, et al., 1997)。3β,7α-dihydroxy-5-cholenoyltaurine（3β-HSD 欠損症でみられる）及び 7α-hydroxy-3-oxo-4- cholenoyltaurine（Δ^4-3-oxoR 欠損症でみられる）は、毛細胆管側膜の ATP 依存性胆汁酸トランスポーターBSEP（肝細胞における経細胞胆汁酸輸送の律速段階）の強力な阻害剤である。したがって、先天性胆汁酸生合成異常及び代謝異常を有する患者でみられる胆汁うっ滞は、ATP 依存性 BSEP の阻害によるものである。上述したとおり、コール酸は BSEP 発現も正に調節する。動物モデルでは検討されていないが、患者におけるコール酸非存在下での BSEP の基礎的発現は、さらなる胆汁うっ滞機序を示している可能性がある。

2.4.2.2　副次的薬理試験

コール酸の副次的薬理作用について記述した試験は確認されなかった。この内因性物質については、副次的薬理作用は予測されない。反復投与毒性試験では、腸肝循環の器官外でのコール酸の薬理作用や毒性作用を示す知見は得られていない。したがって、コール酸の副次的薬理作用を検討した試験がないことは許容できると考えられる。

2.4.2.3　安全性薬理試験

コール酸の安全性薬理試験により、摘出ネコ心筋において、コール酸は比較的低い濃度範囲（0.003～0.3 μmol/L）で軽度の陽性変力作用を示し、心内膜内皮（EE）依存性及びβ受容体介在性の陽性変力反応を誘発することが示された。より高濃度（> 3 μmol/L）又は低濃度のコール酸でも長時間暴露した場合、EE に広範な形態学的損傷を引き起こすが、下層心筋の検出可能な形態学的又は機能的障害は認められなかった (Colpaert, et al., 1992)。ラットでは、コール酸による陽性変力作用は、用量依存性の陰性変時作用の結果であり、電気的ペーシングによって除去することができる。コール酸は細胞膜表面に単層を形成することにより陰性変時作用を発揮し、それにより膜機能を機械的に阻害すると考えられる (Joubert, 1978a)。

ラットを用いた in vivo 研究において、コール酸 10～40 mg/kg の静脈内投与により、陰性変時作用が認められ、50 mg/kg（内因性コール酸プールサイズの約 3 分の 1）の投与で心停止に至った。アトロピン投与又は迷走神経切断は、コール酸の陰性変時作用を有意に低下させ、神経節遮断及び除脳はコール酸の陰性変時作用を減少させる。ラットで見られるコール酸による溶血は、陰性変時作用には関与しないようである (Joubert, 1978b)。

コール酸投与（30 mg/kg）後にアドレナリン及びノルアドレナリンを投与すると、これらの薬剤の血管収縮作用が増強し、心臓及び血管に対するアセチルコリンの作用が逆転し、ラットの心拍数が減少することを報告している (Kadłubowski, et al., 1984)。In vitro 濃度 2 mmol/L のコール酸存在下では、アドレナリン／ノルアドレナリン及びアセチルコリンの作用が逆転することがラットで示されている (Szkudlinski, 1984)。この原因は依然として不明である。

胆汁酸は、0.2 mmol/L の濃度で、ラット腸管に対するイソプレナリンの弛緩作用を低下させ、腸管に対するアドレナリン及びノルアドレナリンの作用を逆転させ、腸管におけるアセチルコリン及びピロカルピンの収縮誘発作用を増強させる (Szkudlinski, 1984)。

コール酸が腸肝循環に限局している場合、正常な条件下では心臓はマイクロモル濃度でコール酸に曝露されることに注意が必要である。この濃度は、上記の実験で用いられた濃度を 10～1000 倍下回る。潜在的な心血管リスクが想定されるのは、胆汁うっ滞又はコール酸の慢性的な過量投与の条件下で、コール酸濃度がこれらの濃度に近くなるときのみである。しかし、その様な状況は、掻痒、下痢、血清コール酸増加及び、特に GGT の増加で示されるコール酸の自己限定性の毒性のために、持続し難い (Güldütuna, et al., 1993), (Gonzales, et al., 2009)。コール酸の慢性的な過量投与に対する注意には、血清中及び尿中のコール酸レベル及び肝臓パラメータの定期的なモニタリングを含む。添付文書案に示すように、これらのパラメータは注意深くモニターすべきである。

コール酸を 500 mg/kg/日で短期経口投与（1%コール酸を食餌に加え 4 日間投与した結果、血清中胆汁酸塩がベースラインの 8 倍に上昇）した場合、ラットの血小板凝集能を 18%低下させた (Pereira, et al., 1995)。

ICH ガイドライン S7A「ヒト医薬品の安全性薬理試験」に定義された安全性薬理コアバッテリー試験の観点から、今回報告した試験は心血管系のみに関するものであり、中枢神経系及び呼吸系については検討されていない。多くのバイオテクノロジー応用分子と同様に、コール酸は特

異的なトランスポーター及び受容体タンパク質に結合する（2.4.2.1.1 項及び 2.4.3.1 項を参照）。したがって、毒性試験での評価は許容できると考えられる。反復投与毒性試験では、腸肝循環の器官がコール酸毒性の標的器官であることが一貫して確認されている（2.4.4.2 項を参照）。臨床所見はこの所見を裏付けている（2.5.5 項を参照）。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

コール酸との薬力学的薬物相互作用について特に検討した文献はなかった。2.4.3.5 項に、ラットの in vitro 及び in vivo モデルにおいてコール酸との薬物動態学的薬物相互作用を検討した論文の要約を示す。

2.4.3　薬物動態試験

分析方法は、適宜、個々のオリジナル論文に記載されている。分析法又はバリデーションに関する別個の報告書は入手していない。

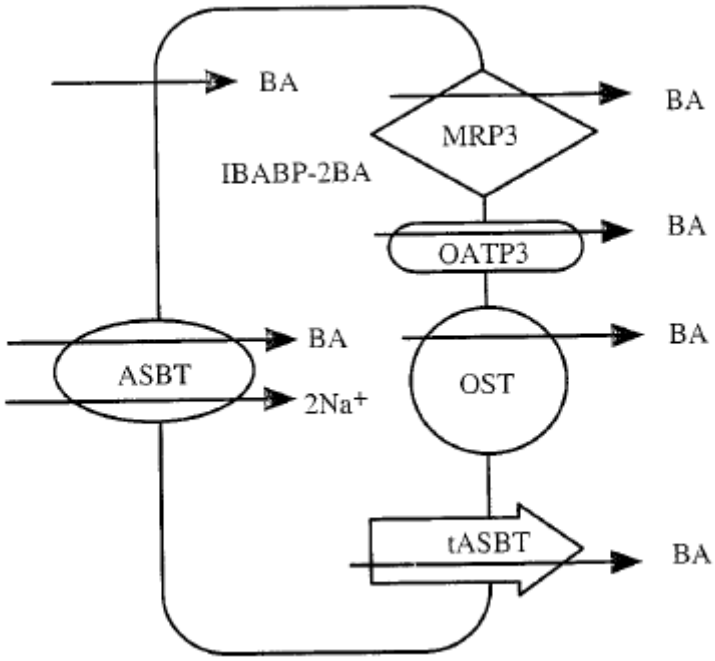
2.4.3.1　吸収

2.4.3.1.1　腸肝循環における吸収段階

コール酸は、摂取後、まず小腸で吸収され、その後、血流により肝臓に運ばれ肝細胞に取り込まれる。コール酸とその抱合体は、モルモット小腸の近位部ではなく、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)。

非抱合型コール酸はイオン化されていないため、腸管腔で受動的に吸収されると考えられる。しかし、抱合型コール酸はイオン化されているため、図 2.4-3 に示したように、腸上皮細胞を通過するにはトランスポーターが必要である。抱合型及び非抱合型コール酸はいずれも、頂端側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター（ASBT）により回腸末端部の管腔から腸上皮細胞に輸送される。その後、コール酸は腸上皮細胞内で腸管の胆汁酸結合タンパク質（IBABP）に結合する。腸上皮細胞から門脈血への排出には、切断型 ASBT（tASBT）及び／又は多剤耐性関連タンパク質 3（MRP3）が関与している可能性があるが、この点についてはまだ明らかになっていない。腸上皮細胞からのコール酸輸送には、ヘテロメリックな有機溶質トランスポーター（OST）α 及び OSTβ 遺伝子産物の両方がさらに関与している可能性がある (Ross, 2008)。回腸で吸収されなかった胆汁酸は、結腸で二次胆汁酸に変換され、受動拡散により吸収されると考えられる。未吸収の胆汁酸は、糞便中に排泄される（2.4.3.4 項を参照）。

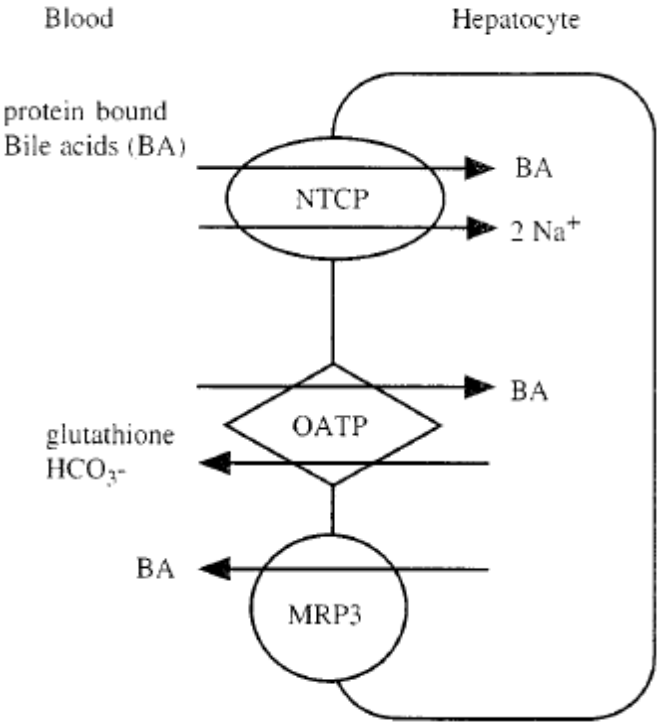
図 2.4-3: 小腸管腔からの胆汁酸吸収



出典: (Ross, 2008), 頂端側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター（ASBT）；多剤耐性関連タンパク質 3（MRP3）；有機アニオン輸送ポリペプチド 3（OATP3）；切断型 ASBT（tASBT）；ヘテロメリックな有機溶質トランスポーター（OST）OATP3 mRNA は同定されているが、このタンパク質が小腸内で機能しているかどうかは不明である。

アルブミンに結合したコール酸は門脈血中から肝臓に戻り、肝臓できわめて効率よく抽出される。コール酸は、ナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド（NTCP）及び有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）を介して肝細胞基底（類洞）膜に運ばれる。胆汁うっ滞では、胆汁酸の肝細胞内輸送及び胆汁中への胆汁酸分泌が障害されており、コール酸は多剤耐性関連タンパク質 3（MRP3）によって血液中に戻ると考えられる (Ross, 2008)。

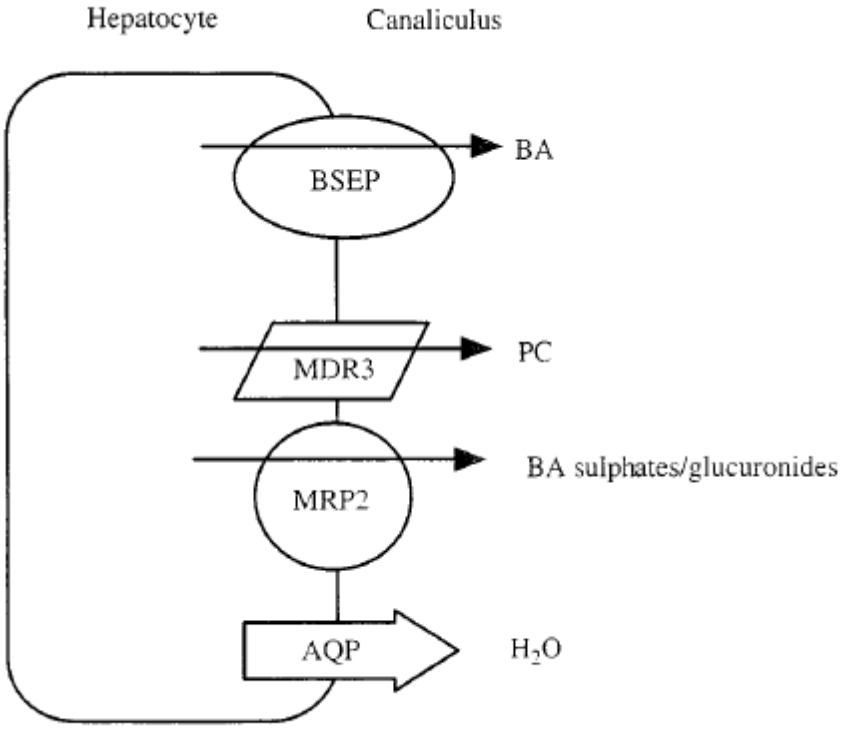
図 2.4-4: 肝細胞基底膜側におけるコール酸トランスポーター



出典: (Ross, 2008), ナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド（NTCP）；有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）；多剤耐性関連タンパク質 3（MRP3）

肝細胞内では、コール酸はタンパク質に結合し、主要な結合タンパクの 1 つは 3α-hydroxysteroid dehydrogenase のようである。遊離コール酸は再抱合し、P 糖タンパク質（多剤耐性タンパク質, MRP としても知られている）膜タンパク質ファミリーの 1 つである ATP 依存性胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）によって毛細胆管内に輸送される。毛細胆管側膜の胆汁酸輸送には MRP3 も関与していると考えられる。BSEP の発現は、FXR を介してコール酸の細胞内濃度によって正に制御されている。胆汁酸依存性の胆汁を形成するために、apical membrane（頂端膜）の内葉（inner leaflet）からホスファチジルコリン（PC）が外層にフリップされ、BSEP によって排出されたコール酸と相互に作用する。アクアポリン（AQP）は胆汁中に水分を供給する (Ross, 2008)。胆管を被覆する上皮細胞である胆管細胞は、分泌された胆汁酸の一部を肝細胞に戻すと考えられ、ここには上述の多くのトランスポーターの作用が関与している。また、胆管細胞は胆汁酸非依存性胆汁を分泌する。

図 2.4-5: 肝細胞からのコール酸分泌及び胆汁成分



出典 (Ross, 2008)胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）；ホスファチジルコリン（PC）；多剤耐性関連タンパク質 2 及び 3（それぞれ MRP2 及び MRP3）；アクアポリン（AQP）

2.4.3.1.2　コール酸のプールサイズ

吸収試験より、コール酸のプールサイズはマウス及びラットでそれぞれ 168 ± 21 µmol/kg 体重及び 106 ± 12 µmol/kg 体重であることが示された。これは、マウス及びラットでそれぞれ 68.5 ± 8.6 mg/kg 及び 43.2 ± 4.9 mg/kg に相当する (Hulzebos, et al., 2001)（表 2.4-1）。

表 2.4-1: げっ歯類における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 mg/kg 体重	代謝回転率/日	合成速度 mg/kg 体重
マウス	68.5 ± 8.6	0.44 ± 0.03	29.8 ± 6.5
ラット	43.2 ± 4.9	0.88 ± 0.10	37.9 ± 0.4

両動物種とも値は平均値+/-標準偏差（n=6）を表す。

しかし、この結果は、実験を通して反復検体採取中に大量の胆汁が採取されたため値が低く見積もられており、プールサイズに影響を与えたことを筆者らは認めている (Hulzebos, et al., 2001)。このため、この論文に報告されたラットのプールサイズに関する結果は正確なものではないと考える。プールサイズの推定に関する結果に食い違いがみられたことも (Cronholm, et al., 1974), (Carrella & Dietschy, 1977), (Hulzebos, et al., 2001)、このことで説明できると考えられる。

Cronholm らは、ラットの平均プールサイズは 118 ± 38.3 mg/kg と報告しており (Cronholm, et al., 1974)、これは Hulzebos らが報告した値の 2 倍である (Hulzebos, et al., 2001)。

さらに、2 つの対照群のラットでのプールサイズは 175～245 mg/kg 及び 136～190 mg/kg としているが、これは腸内胆汁酸プールのみのアッセイである (Carrella & Dietschy, 1977)。したがって、ラットにおけるコール酸のプールサイズは 150 mg/kg というのが現実的な推定値であると考える。マウスでは、Hulzebos らによってのみコール酸のプールサイズが検討され、168 ± 21 µmol/kg 体重（69 mg/kg）と報告されている (Hulzebos, et al., 2001)。マウスについてはより適切な推定値がないため、おそらく過小評価であることを認めた上で、コール酸プールサイズの基準値として 69 mg/kg を使用する。

代謝回転率（FTR）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、それぞれ 29.8 ± 6.5 mg/kg 及び 38 ± 0.4 mg/kg の合成速度に相当する (Hulzebos, et al., 2001), 表 2.4-1。

2.4.3.2　分布

2.4.3.2.1　組織分布試験

コール酸の組織分布を検討した非臨床試験は確認されなかった。しかし、一般的に、文献上では、コール酸の大部分は腸肝循環の器官内に存在し、末梢血中に存在する量は少ないと考えられている。このことは、アカゲザル胎児での研究によって裏付けられている（以下の項を参照）(Little, et al., 1975)。

2.4.3.2.2　血漿タンパク結合

コール酸の血漿タンパクへの結合を検討した非臨床試験は確認されなかった。ヒト血清アルブミンへのコール酸の結合に関する臨床的考察については、2.5.3.1.4 項を参照のこと。

2.4.3.2.3　胎盤通過試験

ラットを用いた胎盤通過試験では、胆管結紮後に母獣の血漿中胆汁酸量が 30 倍増加したにもかかわらず、胎児の胆汁酸量には大幅な増加は認められなかったことから、胎盤を通過する胆汁酸量は少ないことが示唆された (Hassan & Subbiah, 1980)。さらに、胆管結紮ラットの胎児（妊娠 21 日目）における胆汁酸プールサイズは、対照群の胎児と比較して、実際に小さかった。しかし、ヒツジを用いた Perez ら (Perez, et al., 1994)の研究結果は、他の所見 (Hassan & Subbiah, 1980)とは矛盾するものであり、胎児血清中のコール酸濃度は母獣にコール酸 29 mg を静脈内ボーラス投与した後に有意に増加した（2.6.6 項を参照）。Campos ら (Campos, et al., 1986)は、ヒツジ胎児血漿中のコール酸濃度の有意な上昇により早産が発生することを認めている（2.6.6 項を参照）。

興味深いことに、Little ら (Little, et al., 1975)は、アカゲザルの胎児では、胎児・母体胎盤通過量は[^{14}C]コール酸投与量の平均 30%であることを報告した。注目すべき点として、Little ら (Little, et al., 1975)は、アカゲザル胎児の血漿、胆汁、肝臓及び腸において測定可能な量の放射性標識薬物が検出されたが、その他の胎児組織では認められないことを報告した。

これまでのデータからは、これらの相違が実験デザインによるものか、種差によるものかは不明である。しかし、通常、胎児血清中にはコール酸や他の胆汁酸が存在する (Little, et al., 1975), (Hassan & Subbiah, 1980), (Campos, et al., 1986), (Perez, et al., 1994)ため、胎児が内因性レベルのコール酸及び胎盤を通過したコール酸に曝露されることは生理的に起こりうる。

2.4.3.3　代謝

コール酸の代謝に関する考察については、前述の 2.4.2 項を参照のこと。

2.4.3.4　排泄

コール酸の排泄に関する考察については、前述の 2.4.3.1 項を参照のこと。ラットを用いた排泄試験では、コール酸は代謝物の形でほとんど糞便中に排泄されることが示された (Lindstedt & Norman, 1955)。

また、ラットにおいて、非抱合型で検出されるのはコール酸のごく少量であることが示された (Lindstedt & Norman, 1955)。さらに、標識コール酸とケノデオキシコール酸を同時に投与した場合、糞便試料のクロマトグラム上で観察された異なるバンドは、環標識コレステロールの投与後に観察されるものと同じバンドを示している。

動物における乳汁中排泄に関する文献はなかった。しかし、HSD3B7 遺伝子を選択的に不活化した妊娠マウス及び授乳マウスに対し、妊娠後期中及び出生後 28 日目まで 0.1%又は 0.5%コール酸を混餌投与すると、ホモ接合性突然変異を有する仔マウスの生存率がそれぞれ約 2 倍に増加又は正常化した（2.4.2.1.4 項）。このことは、マウスではコール酸が乳汁中に分泌されることを強く示唆している。コール酸の乳汁中分泌については、ヒトのデータが得られている（2.5.3.1.2 項）。

2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用

ラットを用いた薬物動態学的薬物相互作用試験では、予想されたように、胆汁酸吸着剤であるコレスチラミンはコール酸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 において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。In vivo でのベラパミルとの相互作用の重要性は、これらの実験からは明らかになっていない (Barth, et al., 2006)。

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 2 倍に増加する (Ostrower, et al., 1974)。Cronholm らは (Cronholm, et al., 1974)、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 になることを示した。さらに、フェノバルビタール投与ラットでは、対照ラットに比べて、コール酸の 1 日産生量が減少した。興味深い所見として、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排泄半減期を有意に（$P < 0.05$）減少させることが示された。

サルでは、フェノバルビタールは胆汁酸合成の最大速度を増加しただけでなく、肝臓に戻る胆汁酸塩が胆汁酸塩合成を阻害する正常な調節機構に拮抗した (Redinger & Small, 1973)。これは、健常ボランティアにおいてフェノバルビタールがコール酸のプールサイズ及び代謝回転を増加したことを示す臨床試験によっても支持された (Miller & Nestel, 1973)。実際、フェノバルビタール投与は cholesterol 7α-hydroxylase 活性を 20%増加した (Coyne, et al., 1976)。これらの結果は、明らかにラットでの結果よりヒトにとって重要である。

フェノバルビタールは、コール酸の患者で期待される作用に拮抗し、確立された代謝調節を危険にさらし得るので、コール酸投与の患者には併用禁忌である（4.3 項: SmPC）。

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。

2.4.3.6　結論

コール酸は、モルモット腸管の近位部ではなく主に遠位部で吸収されることがわかった (Weiner & Lack, 1962)。非抱合型コール酸は腸管腔で受動的に吸収され、抱合型コール酸は腸上皮細胞から能動的に輸送される。コール酸は、頂端側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター（ASBT）により回腸末端部の管腔から腸上皮細胞に輸送され、ここで腸管の胆汁酸結合タンパク質（IBABP）と結合する。腸上皮細胞からのコール酸の排出には、切断型 ASBT（tASBT）、多剤耐性関連タンパク質 3（MRP3）、有機溶質トランスポーター（OST）α と β 及び／又は有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）3 が関与していると考えられるが、この点については未だ明確になっていない (Ross, 2008)。

門脈を通って肝臓に戻ったタンパク質結合コール酸は、ナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド（NTCP）及び OATP を介して肝細胞内に輸送される。肝細胞内で、コール酸は 3α-hydroxysteroid dehydrogenase に結合し、胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）によって毛細胆管内に輸送される (Ross, 2008)。

コール酸（CA）のプールサイズはマウスで 68.5 ± 8.6 mg/kg とされたが、これはおそらく過小評価である。ラットのデータは決定的なものではないが、おおよそのプールサイズは 150 mg/kg と推定できる。代謝回転率（FTR）はマウス及びラットでそれぞれ 1 日当たり 0.44 ± 0.03 及び 0.88 ± 0.10 であり、これはそれぞれ 29.8 ± 6.5 mg/kg 及び 37.9 ± 0.4 mg/kg の合成速度に相当する (Cronholm, et al., 1974), (Carrella & Dietschy, 1977), (Hulzebos, et al., 2001)。

ラットでは、コール酸は代謝物の形でほとんど糞便中に排泄される (Lindstedt & Norman, 1955)。

コール酸の組織内分布又はタンパク結合を検討した非臨床試験は確認されなかった。コール酸の代謝については、前述の 2.4.2 項を参照のこと。

コール酸が母体と胎児の間を通過するかどうかについては、胎盤通過試験から矛盾した知見が得られている。しかし、通常、胎児血清中にはコール酸や他の胆汁酸が存在する (Little, et al., 1975), (Hassan & Subbiah, 1980), (Campos, et al., 1986), (Perez, et al., 1994)ため、胎児が内因性レベルのコール酸及び胎盤を通過したコール酸に曝露されることは生理的に起こりうる。

ラットを用いた薬物動態学的薬物相互作用試験では、コール酸とコレスチラミン等の胆汁酸吸着剤、シクロスポリン及びフェノバルビタール等との潜在的相互作用が認められ、いずれの物質もコール酸の正常な腸肝循環を阻害した。In vitro で認められたコール酸とベラパミルとの相互作用の臨床での重要性は不明である。コール酸とフェノバルビタールは併用禁忌である。

2.4.4　毒性試験

以下の反復投与毒性試験では、コール酸の規定量を強制経口投与するのではなく、実験動物の飼料にコール酸を添加したため、各投与量の比較は概算である。さらに、ほとんどの場合、動物

の正確な体重は不明である。したがって、コール酸の消費量、ひいては投与量については推定しかできない。コール酸に関する詳細な情報も、ほとんどが不完全である。現在市販されているコール酸は、最大純度 99%である [6]。しかし、上記の過去の研究において使用されたコール酸の純度は、現在市販されているコール酸よりも低かったと推定するのが妥当である。しかし、正確な不純物プロファイルは依然として不明である。

NOAEL の確定に関しては、ここに示した公表論文はすべて毒性学的効果を特定することに焦点を当てており、毒性学的効果を及ぼさないコール酸の投与に関連した報告はされていない。したがって、毒性試験の文献からはコール酸の NOAEL は確定できなかった。しかし、内因性レベルのコール酸では、ヒトを含むすべての動物種において有害作用がないことは明らかである。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

様々な動物モデルを用いた単回及び反復投与毒性試験において、コール酸投与後に認められた用量-効果反応を表 2.4-2 に要約する。観察された影響は、コール酸の投与量だけでなく、試験の期間及び使用した動物モデルによっても影響されることに注意しなければならない。

Rothlin と Schalch (Rothlin & Schalch, 1944)は、マウスにコール酸を静脈内ボーラス投与したときの致死量下限（LD_{Lo}）は 200 mg/kg であると報告した。さらに、LD_{50} は 350 mg/kg （コール酸プールサイズの 5 倍）であり、不安、間代性強直性痙攣に至る運動過多、運動失調及び昏迷（完全消耗又は 5～10 分以内の死亡に至る）などの毒性症状がみられた (Rothlin & Schalch, 1944)。生存した動物は 5～8 時間以内に回復した。また、致死量の下限及び上限はそれぞれ 200 mg/kg（コール酸プールの 3 倍）及び 500 mg/kg（コール酸プールの 7 倍）であった。

Yamasaki ら (Informatics Inc., 1973)[7]は、体重 18～28 g の雄雌の白色マウスにコール酸を経口投与したときの LD_{50} は 1520 mg/kg に等しいと報告した（LD_{50} 絶対値：27.4～42.6 mg)。各群 5～8 例のマウスに 408、612、816、1224、1632、2448 mg/kg の用量を投与した。活動亢進に続いて「自動」運動の減少が認められた。通常、症状は投与後 1～2 時間に発現し、動物が生存した場合には 6 時間以内に回復した。死亡例では、横向きに倒れ、死亡するまで動かなかった。痙攣は認められなかった。死亡は投与後 15 分～48 時間にみられた。算出された生理的コール酸プール（68.5 mg/kg）を LD_{50} の用量と比較すると、経口投与での LD_{50} はプールサイズの 22 倍である。

麻酔下の Wistar 成熟雄ラットにコール酸を 5～60 mg/kg（5 mg/g ずつ増量；コール酸プールサイズの 0.03～0.4 倍）で単回静脈内投与したとき、平均動脈血圧の低下を伴う明らかな用量依存性の陰性変時作用が認められた (Joubert, 1978b)。50 mg/kg（コール酸プールサイズの 0.33 倍）を超える用量は致死量であった。ECG 解析により、心拍数の減少は低用量では単純な洞性徐脈によるものであるが、高用量では様々な程度の房室ブロックを伴うことが示された。

ウサギにコール酸 30 mg/kg を静脈内ボーラス投与した場合、毒性所見は認められなかったが、60 mg/kg に増量すると、毒性作用及び致死率が増加した (Gillert, 1926)。このことから、致

[6] Sigma Aldrich Cholic Acid Technical Sheet. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=C1129|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

[7] このオリジナル論文は原文を参照できなかったため、2.6.7 項には含めないこととした。ここでは (Informatics Inc., 1973)で得られた要約を利用している。

死量は 60 mg/kg であると結論づけられた。これは、ヒト体重を 70 kg とした場合、静脈絶対投与量 3500 mg（50 mg/kg）までは許容できると推察される。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

コール酸投与により、体重減少、肝重量増加、胆石及び下痢などが高頻度に報告されている。他に、直腸出血 (Baijal, et al., 1998)及び脾腫 (Lacassagne, et al., 1967)等のその他の影響も報告されている（表 2.4-2）。

2.4.4.2.1　体重に対する影響

ラットに 0.15%コール酸（1 日当たりコール酸 75 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 2 分の 1）を含む飼料を 26 日間与えた結果、体重減少が認められた (Bray & Gallagher Jr, 1969)。ラットに 0.1%コール酸ナトリウム（1 日当たりコール酸ナトリウム約 50 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 3 分の 1）を含む飼料を 28 日間与えた結果、成長抑制は認められなかったが、2%コール酸ナトリウム（1 日当たりコール酸ナトリウム約 1000 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 7 倍）を与えたラットは実験終了前にすべて死亡した (Visek, et al., 1965)。Wistar ラットに 1%コール酸（1 日当たりコール酸約 500 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 3.3 倍）を含む飼料を与えた結果、体重増加抑制を認め、5 週間後の最大体重は対照群の 36%であった (Gambal & Quackenbush, 1960)。最後に、0.05%コール酸（1 日当たりコール酸約 25 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 6 分の 1）を含む飼料を 278 日間又は 372 日間与えたラットにおいても、ベースラインと比較して体重の減少が認められた (Lacassagne, et al., 1967)。いずれの論文でも、影響の大きさ又は重症度の評価について、十分に詳細な定量的データは示されていなかった。

2.4.4.2.2　肝臓及び脾臓に対する影響

マウスに 1 日当たりコール酸 750 mg/kg 又は 1500 mg/kg（コール酸プールサイズのそれぞれ 11 倍及び 22 倍）を 7 日間混餌投与すると、AST、ALT 及び ALP レベルが用量依存的に有意に増加し、播種性肝細胞壊死、肝細胞サイズの増大、有糸分裂像数の増加及び小葉間胆管の拡張が認められた。胆汁流は有意に刺激された (Fickert, et al., 2001)。

ラットにおける 14 日間反復混餌投与試験では、0.5%又は 1%コール酸（それぞれ 1 日当たり約 250 mg/kg 及び 500 mg/kg 又はコール酸プールの 1.7 倍及び 3.3 倍）含有飼料を与えた結果、トランスアミナーゼがわずかに上昇し、肝小葉組織像に軽度の変化を示す、軽度の肝障害が認められた (Delzenne, et al., 1992)。Wistar ラットに 0.05%コール酸（1 日当たりコール酸約 25 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 6 分の 1）含有飼料を 1 年間与えた結果、肝臓は正常であったが、軽度の非進行性の脾腫が認められた (Lacassagne, et al., 1967)。さらに、スナネズミに 1%コレステロール及び 0.5%コール酸（833 mg/kg/日）を添加した固形飼料を 4 カ月間与えたところ、生存した全例で、腹水を伴う脾腫が認められた (Bergman & van der Linden, 1971)。スナネズミに 1%コレステロール及び 0.5%コール酸を添加した固形飼料を与えた結果、肝臓の脂肪変性、細網内皮系における脂質の蓄積、血清コレステロール高値及び顕著な甲状腺低形成変化がみられた (Bergman & van der Linden, 1971)。

スナネズミに 1%コレステロール及び 0.5%コール酸（この実験群では 833 mg/kg/日）を添加した固形飼料を 4 カ月間連続で与えた結果、対照群の肝臓と比較して肝臓サイズの有意な増加がみられた。コール酸／コレステロール混餌投与群の動物の肝臓は、脂肪変性に特有の淡黄色を呈しており、胆嚢は極端に拡張していた (Bergman & van der Linden, 1971)。また、スナネズミに 1%コレステロール及び 0.5%コール酸（この実験群では 714 mg/kg/日）を添加した固形飼料を 1 カ月間与え、その後未添加の固形飼料に切り替えた別の試験でも、肝肥大がみられた (Bergman & van der Linden, 1971)。また、体重に対する心臓の重量も有意に増加した。コール酸とコレステロールを併用した場合、コレステロールのホメオスタシスに大きく影響するため、コール酸単独とは著しく異なる効果を有することを考慮する必要がある（次項を参照）。

2.4.4.2.3　胆石の形成

コール酸／コレステロール混合飼料を与えたげっ歯類における胆石形成は、Tepperman らの研究 (Tepperman, et al., 1964)によって初めて認められ、多数の研究で確認されている。また、そのメカニズムが研究されている (Wang, et al., 1999)。C57L/J マウスに 1%コレステロール含有固形飼料を与えると、0.5%コール酸（750 mg/kg/日）添加の有無にかかわらず、腸管コレステロール吸収及び胆汁中コレステロール量が増加するとともに、胆汁における胆石形成に向けた相転移が生じ、これによりコレステロールの過飽和と急速なコレステロール結晶化が生じた (Wang, et al., 1999)。さらに、この試験により、コール酸は肝 cholesterol 7α-hydroxylase の活性を低下させ、それによりコレステロールの胆汁酸塩への異化変換を阻害し、コレステロール分泌速度を亢進し、それによってコレステロール過飽和をさらに促進する可能性を示した。また、コレステロールとコール酸の両方を飼料に添加した場合のみ、コール酸はムチンゲルの形成、コレステロール結晶及び胆石の形成並びに胆嚢肥大を誘発した。マウスに 1%コレステロールを単独で投与した場合、結石形成作用もホメオスタシス作用も認められなかった。

マウスに、高コレステロール含有飼料に 0.5%又は 1%コール酸（750 mg/kg 及び 1500 mg/kg；コール酸プールサイズのそれぞれ 11 倍及び 22 倍）を添加して与えたところ、コレステロール結石及び胆嚢病変が誘発された (Besançon, et al., 1970)。コール酸の結石形成作用はデヒドロコール酸ほど安定しておらず、弱いものであった。しかし、コール酸の胆嚢及び肝臓に対する病変誘発作用はデヒドロコール酸と比べて同等以上に強かった (Besançon, et al., 1970)。この所見に合致して、スナネズミでは、1%コレステロール及び 0.5%コール酸（約 833 mg/kg）を 4 カ月間混餌投与した結果、胆嚢が極度に拡張し、生存した 7 例中 5 例で小さなコレステロール胆石の大量蓄積がみられた (Bergman & van der Linden, 1971)。

スナネズミは草食性なのでコレステロール代謝に適応し難いことに注意するべきである。スナネズミに 0.2%コレステロールを 4 週間混餌投与したとき、総ステロイド排泄量はラットに比べ半分だった (Temmerman, et al., 1989)。ラットに比べてスナネズミの低いコレステロール代謝回転及び、おそらく糞中ステロイド排泄を増加できないことは、スナネズミでのコレステロールエステルの蓄積を説明するかもしれない。加えて、コレステロール吸収もスナネズミにおけるコレステロールエステルの蓄積の別の寄与因子かもしれない。

それゆえに、スナネズミのデータは、コール酸／コレステロール混合飼料を与えたげっ歯類における胆石形成の理解に有益である。しかし、ラット及びヒトは共に雑食性で、コレステロール代謝の点で生理学的により類似している。スナネズミは、ヒトへの結論を導くために適した種ではない。

ヒトでの試験により、デオキシコール酸がコール酸の結石形成作用のメディエーターである可能性が示されている (Thomas, 2008)（2.4.4.9.1 項）。

2.4.4.2.4　下痢

ラットに、2%コール酸ナトリウム（1 日当たりコール酸ナトリウム約 1000 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 7 倍）を 7～21 日間混餌投与した結果、死亡したすべてのラットで重度の下痢が認められた (Visek, et al., 1965)。

ラットに 1%コール酸（1 日当たりコール酸約 500 mg/kg 又はコール酸プールの 3.3 倍）を 5 週間混餌投与したところ、下痢など重度の消化管障害が認められ、7 例中 2 例は 5 週間以内に死亡した (Gambal & Quackenbush, 1960)。

上記の研究 (Gambal & Quackenbush, 1960), (Visek, et al., 1965)以外のほとんどの研究報告では、内因性コール酸プールとほぼ同等かそれ以下の 1 日投与量を使用しており、下痢は報告されなかった。

ラットに 0.2%コール酸（1 日当たりコール酸約 100 mg/kg 又は算出されたコール酸プールサイズの 2 分の 1）を 20 週間混餌投与した結果、直腸出血等のその他の影響も報告されている (Baijal, et al., 1998)。しかし、他の低用量コール酸投与試験では、これらの毒性は報告されていない。

表 2.4-2: 単回投与試験における各用量のコール酸で観察された用量－効果反応の要約

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量（mg/kg）	コール酸プールサイズの倍数	試験結果	参考文献
単回静脈内投与	マウス	静注	200～500 mg/kg	3～7	LD_{50} は 350 mg/kg 又は 0.86 mmol/kg。LD_{50} 絶対値は、マウス 1 例当たり 7 mg、又は推定コール酸プールの約 4 倍である。	(Rothlin & Schalch, 1944)
単回経口投与	マウス	経口（詳細不明）	408、612、816、1224、1632、2448 mg/kg	6～36	LD_{50} は 1520 mg/kg、又は LD_{50} 絶対値は、マウス 1 例当たり 27.4～42.6 mg、又は推定コール酸プールの約 22 倍である。	Yamasaki et al, 1960 (Informatics Inc., 1973)
単回静脈内投与	ラット／Wistar	静注	5～60 mg/kg (5 mg ずつ増量)	0.03～0.4	コール酸の静脈内投与により、通常、平均動脈血圧の低下を伴う用量依存的な陰性変時作用が惹起された。50 mg/kg を超える用量は致死量であった。	(Joubert, 1978b)
単回静脈内投与	ウサギ	静注	30 mg/kg	N/D	忍容性があり、目に見える反応なし。	(Gillert, 1926)
			40 mg/kg		絶叫を引き起こした。	
			50 mg/kg		痙攣を起こしたが、動物はすぐに回復した。	
			60 mg/kg		注射時に即死した。	

表 2.4-3: 反復投与試験における各濃度のコール酸で観察された用量－効果反応の要約

試験の種類	動物種／系統	N／群	投与方法	投与期間	コール酸の混餌濃度%	用量（mg/kg）	コール酸プールサイズの倍数	試験結果	参考文献
7 日間混餌投与試験	マウス／Swiss	5	混餌投与	7 日間	0.5% 1%	750 mg/kg 1500 mg/kg	11 22	コール酸混餌投与により以下が認められた。 ・AST、ALT 及び AP 値の用量依存的な有意な増加。 ・播種性肝細胞壊死、肝細胞サイズの増大、有糸分裂像数の増加及び小葉間胆管の拡張に至った。 ・血清胆汁酸値が有意に上昇した。 ・胆汁流は有意に刺激された。	(Fickert, et al., 2001)
8 カ月間混餌投与試験	マウス／Swiss	33 18	混餌投与	2～8 カ月間	0.5% 1%	750 mg/kg 1500 mg/kg	11 22	コール酸は、コレステロール結石及び胆嚢病変並びに肝重量の増加を誘発する。	(Besançon, et al., 1970)
1 年間混餌投与試験	マウス／C57L/J	5	コレステロールとともに混餌投与	1 年間	0.5%	750 mg/kg	11	胆汁中コレステロールの過剰分泌及び胆石形成の促進	(Wang, et al., 1999)
2 週間混餌投与試験	ラット／Wistar	10	混餌投与	14 日間	0.5% 1%	250 mg/kg 500 mg/kg	1.667 3.333	コール酸混餌投与により、トランスアミナーゼの軽度上昇及び総血清胆汁酸の顕著な増加が認められたが、肝臓胆汁酸は増加しなかった。肝小葉組織像の軽度の変化のみ。	(Delzenne, et al., 1992)
26 日間混餌投与試験	ラット	7	混餌投与	26 日間	0.15%	75 mg/kg	0.5	30 日間にわたる体重増加抑制。 コール酸は腸粘膜の組織学的変化を惹起しなかった。	(Bray & Gallagher Jr, 1969)
28 日間混餌投与試験	ラット	6	混餌投与	28 日間	0.1%	50 mg/kg	0.3	動物の成長抑制及び死亡は認められなかった。	(Visek, et al., 1965)
					2%	1000 mg/kg	7	実験 7～21 日目に死亡が認められた。 投与に関係なく、死亡した動物では重度の下痢が認められた。	

表 2.4-3: 反復投与試験における各濃度のコール酸で観察された用量－効果反応の要約（続き）

試験の種類	動物種／系統	N／群	投与方法	投与期間	コール酸の混餌濃度%	用量（mg/kg）	コール酸プールサイズの倍数	試験結果	参考文献
5 週間混餌投与試験	ラット／Wistar	7	コレステロール添加又は非添加で混餌投与	5 週間	1%	500 mg/kg	3.3	必須脂肪酸（EFA）欠乏症状の発現を促進しなかったが、下痢、成長抑制及び体脂肪沈着抑制が認められた。 コール酸とともにコレステロールを混餌投与した場合、肝臓の脂肪含有量が数倍に増加した。	(Gambal & Quackenbush, 1960)
1 年間又は 9 カ月間の混餌投与試験	ラット	10	混餌投与	278 日間又は 372 日間	0.05%	25 mg/kg	0.16	体重減少が認められた。肝臓の肉眼所見は正常であったが、肥大しており、組織学的検査で脂肪変性、門脈腔のリンパ球浸潤及び類洞内皮細胞の肥大が観察された。脾臓は腫大及び組織学的変化を示し、遅発性の骨髄造血欠損が認められた。 DAB の発がん性に対する促進作用なし。	(Lacassagne, et al., 1967)
4 カ月間混餌投与試験	スナネズミ	30	コレステロールとともに混餌投与	4 カ月間	0.5%	833 mg/kg	N/D	1%コレステロール及び 833 mg/kg のコール酸を混餌投与した動物では、肝臓の脂肪変性、細網内皮系における脂質の蓄積、血清コレステロール高値及び顕著な甲状腺低形成変化が認められた。	(Bergman & van der Linden, 1971)

2.4.4.3　遺伝毒性試験

コール酸が遺伝毒性及び変異原性作用を有する可能性があるかどうかについては、現在得られている知見から明確な結論は出ていないが、ほとんどが遺伝毒性作用を否定するものである。

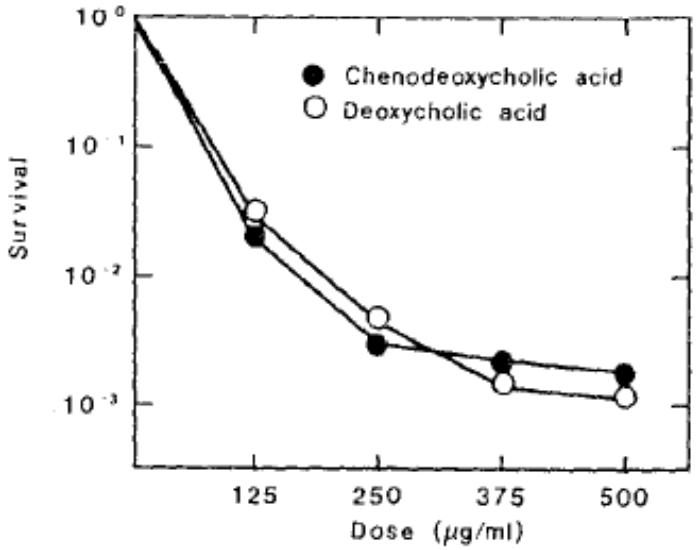
本申請資料に記載した遺伝毒性研究は、ICH ガイドライン S2(R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」に従うものではなかった。実際、本申請資料に記載した研究のデータは、ほとんどが規制要件を満たすという観点でなく、基礎科学における関心に基づいて学術研究機関が実施した研究で得られたものである。したがって、記載したデータはこの学術的関心を反映している。

コール酸及びデオキシコール酸の細菌を用いた in vitro 遺伝毒性試験について報告した 4 件の文献を検討した (Silverman & Andrews, 1977), (Watabe & Bernstein, 1985), (Venitt, et al., 1987), (Mori, et al., 1991)。OECD 471 に準拠した細菌を用いた復帰突然変異試験について報告した文献はなかった。

(Silverman & Andrews, 1977)では、試験菌株として TA1535、TA1536、TA1537、TA1538、TA98 及び TA100 を用いたエームス試験を実施し、コール酸及びデオキシコール酸の変異原性を調べている。本研究では、ICH ガイドライン S2A「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス（廃止）」に遺伝毒性試験に用いる試験菌株として記載されている 5 菌株のうち、4 菌株（TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いている。また、TA102 の代わりに TA1538 を用いている。フェノバルビタールで処理したラット肝ホモジネートの S9 分画を用い、陽性対照物質 2-アミノアントラセン（2-AA）の存在下及び非存在下で用量 500 µg/plate のコール酸のエームス試験が実施された。コール酸は、上記の試験菌株において変異原性又は 2-AA の変異原性を増強する助変異原性を有していないことが判明した。同様の結果がデオキシコール酸でも判明した。

Watabe 及び Bernstein の文献では、ネズミチフス菌株 TA100 及び TA98 を用いたエームス試験及び彷徨試験について報告している (Watabe & Bernstein, 1985)。また、簡便で低濃度の変異原に対して高感度であることから、彷徨試験が選択された。試験に用いた濃度に関しては、著者らは 0～500 µg/mL のデオキシコール酸又はケノデオキシコール酸を添加しインキュベートした菌株 TA100 の生存曲線を報告しており、125 µg/mL 以上の濃度で重度の毒性が認められた。代謝活性化系の存在下又は非存在下でのエームス試験は、500 µg/plate 以下の濃度で実施されていた（図 2.4-6）。コール酸の細胞毒性に関するデータは報告されていない。

図 2.4-6 0～500 μg/mL の 2 種類の胆汁酸で処理した菌株 TA100 の生存曲線 (Watabe & Bernstein, 1985)



菌株 TA100 を用いたエームス試験では、デオキシコール酸のみ、濃度 100 及び 500 μg/plate で S9-mix 非存在下で復帰変異コロニー数の減少が認められた。復帰変異コロニー数が対照値を下回っていないことから、この所見が毒性を反映していた（生存曲線を裏付ける）かどうかを判断するのは困難である。

細菌を用いた彷徨試験は、コール酸については 50 μg/mL（TA100）又は 75 μg/mL（TA98）以下の濃度で実施された。デオキシコール酸については、菌株 TA100 及び TA98 とも 40 μg/mL 以下の濃度で実施された。コール酸及びデオキシコール酸はいずれも中等度の濃度で復帰変異ウェル数を増加させたが、高濃度では復帰変異ウェル数が対照値と一致していた。著者らは、後者の所見について毒性を反映していると説明していたが、数値が対照値と一致していたことから、これが正しい説明かどうかを判断するのは困難である。

この他、彷徨試験（ネズミチフス菌株 TA98 及び TA100 を用いた）を実施した 2 件の研究では、いずれの菌株でも変異原性が認められず (Venitt, et al., 1987), (Mori, et al., 1991)、肝代謝活性化系の存在下又は非存在下での標準的なエームス試験でも変異原性は認められなかった (Mori, et al., 1991)。

さらに、 (Macdonald, et al., 1978)でも、エームス試験においてコール酸の変異原性は認められなかったが、この研究の詳細は不明である。実際、別のエームス試験で、コール酸はメチルヒドラジン（DMH）の存在下でも変異原性を示さなかった (Wilpart, et al., 1983)。

現在得られている知見から明確な結論は出ていないが、コール酸の遺伝毒性を陽性とする報告及び陰性とする報告がある。 (Watabe & Bernstein, 1985)と (Venitt, et al., 1987), (Mori, et al., 1991) での結果の不一致は、異なる実験方法を採用したことが原因である可能性がある。しかし、原核生物を用いたこれらのデータには、別の理由で欠点があると考えられる。第一に、胆汁酸には殺菌作用があり (Monte, et al., 2009)、偽陰性の結果をもたらす可能性が高い。

さらに重要なことに、最近では胆汁酸の遺伝毒性（及びおそらく全身毒性）はミトコンドリア膜の傷害による活性酸素種の誘発に起因すると考えられている (Jenkins, et al., 2007), (Jenkins, et

al., 2008a), (Rosignoli, et al., 2008)。例えば、デオキシコール酸はネイキッド DNA に直接損傷を与えることはできず、細胞の介在を必要とすることが研究で示されている。細菌はミトコンドリアを持っておらず、ほ乳類の細胞や動物個体における活性酸素種による遺伝毒性作用を再現できないことから、コール酸又はデオキシコール酸の細菌を用いた遺伝毒性試験（エームス試験、彷徨試験等）の意義は限定的であると考えられる。したがって、特にヒトにおける胆汁酸全般並びにコール酸及びデオキシコール酸の遺伝毒性を、細菌を用いた試験で予測することの価値は限定的である。

ヒト食道癌細胞株 OE33 において濃度 50 μM～1 mM のコール酸は小核の明らかな増加を誘発しなかった (Jenkins, et al., 2007)。この試験では、コール酸の細胞毒性又は遺伝毒性は認められなかった。デオキシコール酸は遺伝毒性を示したが、非線形の用量反応性を示し、100 μM 未満の濃度では DNA 損傷を誘発しなかった。これは活性酸素種に対する細胞内の抗酸化物質の防御効果によるものと考えられる（2.4.4.9.1 項）, (Jenkins, et al., 2007), (Jenkins, et al., 2008a)。また、デオキシコール酸は 100 μM 未満の濃度で弱い毒性を示した (Murray & Kowdley, 2001), (Jenkins, et al., 2007)。

本項に記載した in vitro 遺伝毒性試験は、ICH-S2(R1)に規定された遺伝毒性試験の標準的組合せに該当するもののみである (Hardie, 2008)。しかし、コール酸は内因性物質であり、生理的濃度では遺伝毒性を示さないことから、in vivo の遺伝毒性データがないのは当然と考えられる。(Scates, et al., 1995)で実施された研究は、コール酸には遺伝毒性がないという見解を裏付けている。著者らは、^{32}P-ポストラベル法を用いて DNA 付加体の形成を調べた結果、コール酸が in vitro で DNA に共有結合しなかったと報告している。一方、 (Couch, et al., 1991)に報告された研究では、食餌性コール酸が C57BL/6 系マウスにおける姉妹染色分体交換（SCE）に影響を及ぼすかどうかについて結論が得られていない。

コール酸が遺伝毒性を有さないという見解を裏付けるさらなるエビデンスが (Martinez-Diez, et al., 2000)に示されている。500 μM を超える濃度のコール酸で処理したラット初代培養肝細胞において、ニュートラルレッド取り込み量及び細胞生存率の有意な低下が認められた。コール酸は、ウルソデオキシコール酸とともに、細胞生存率の低下を誘発する作用が特に弱い胆汁酸であることが判明した (Martinez-Diez, et al., 2000)。

結論として、本申請資料に記載した遺伝毒性試験は、現行の ICH ガイダンス S2(R1)の規定に従って実施されたものではない。その制約の範囲において、細菌を用いた復帰突然変異試験でコール酸及びデオキシコール酸が明確な遺伝毒性を有すると判断することはできなかった。しかし、活性酸素種が関連する胆汁酸の遺伝毒性作用は細菌では再現できないことを強く示唆するエビデンスがあるため、これらの試験の有用性は限定的であることが示唆された。In vitro ほ乳類細胞において、ヒト生体内濃度に該当する濃度のコール酸の細胞毒性又は遺伝毒性を示したエビデンスはない。100 μM を超えるデオキシコール酸の遺伝毒性に関してはいくらかエビデンスがあり、ほ乳類細胞を用いた in vitro 試験で胆汁酸の遺伝毒性を検出できることが実証されている（2.4.4.9.1 項）。

遺伝毒性試験が OECD 471 ガイドライン及び ICH ガイドライン S2(R1)に完全に従って実施されたか否かを問わず、患者に投与されるコール酸の用量は、健常者において生理的に存在する濃度と同等の濃度を回復することを意図した用量である。したがって、コール酸及びデオキシコー

ル酸が患者に及ぼすと思われる遺伝毒性リスクは、これらの胆汁酸を体内で産生する健康成人の遺伝毒性リスクと同等であると考えられる。

2.4.4.4　がん原性試験

コール酸又は他の胆汁酸に関する従来の長期経口投与がん原性試験の報告はない。その代わり、すべての試験は、既知の発がん物質を投与して腫瘍又は前がん病変の形成を惹起する発がんモデルを用いて実施された。これらの試験結果については、以下の項で概説する。げっ歯類を用いた長期経口投与がん原性試験の妥当性に関する考察ついては、2.4.4.4.3 項を参照のこと。

1940 年代から、胆汁酸は潜在的な発がん物質として研究が行われてきた (Bernstein, et al., 2005)。マウスにおいてデオキシコール酸投与後に腫瘍形成が認められたことから、胆汁酸が潜在的発がん物質であると疑われるようになった (Hardie, 2008)。デオキシコール酸はコール酸の主代謝物である（2.4.2.1 項及び 2.4.4.9.1 項）。

2.4.4.4.1　肝癌

コール酸誘発肝発がん性に関する研究は、腫瘍及び／又は肝臓 1 cm^2 当たりの γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）陽性細胞巣の増加を確認することに焦点を置いたものであった。GGT はラットにおける前がん性肝細胞の同定に用いられるマーカーである。

Wistar 雄ラットに 0.05%コール酸（1 日当たりコール酸 25 mg/kg 又は算出されたコール酸プールの 6 分の 1）とともに 0.06%ジメチルアミノアゾベンゼン（DAB）を含有する飼料を与えた 9 カ月間混餌投与試験において、肝臓に対して毒性作用を示した (Lacassagne, et al., 1967)。しかし、前がん病変の出現は、DAB のみを投与した動物と同時点であった。

F344 ラットに発がん物質ジエチルニトロソアミン（DEN）単回投与した後に 0.3%コール酸（1 日当たりコール酸約 150 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 1 倍）を 8 週間混餌投与した結果、DEN のみを与えた動物と比較して、肝臓 1 cm^2 当たりの GGT 陽性細胞巣の数及び面積が有意に増加した (Tsuda, et al., 1984)。

これを裏付ける試験として、ラットにおいて DEN による発がんイニシエーション後の肝腫瘍形成に対する 25 週間の 0.4%コール酸（1 日当たりコール酸約 200 mg/kg 又はコール酸プールの 1.3 倍）混餌投与の効果が検討された (Shiota, et al., 1999)。試験データから、コール酸の経口投与は bcl - 2 の誘導を介してアポトーシスを著しく減少させることにより、DEN によってイニシエーションされた肝腫瘍の成長を促進することが示された。

これらの試験の主要な知見は、ラットに発がん物質投与後高用量のコール酸を投与した場合、肝臓 1 cm^2 当たりの GGT 陽性細胞巣が増加する、又は肝腫瘍の増殖が促進されるということである。この知見から、コール酸又はその主代謝物デオキシコール酸（2.4.4.9.1 項）は肝発がんのプロモーターとして作用している可能性が示唆される。しかしながら、コール酸は低用量では DAB により誘発された肝発がんを促進しないようである。

2.4.4.4.2　大腸癌

コール酸の大腸発がん性に関する研究は、腫瘍及び／又は異常腺窩巣（ACF）の増加を確認することに重点を置いたものであった。異常腺窩巣（ACF）は、結腸及び直腸の内壁表面にみられる異常な管状の腺の集合体である。異常腺窩巣は大腸ポリープ以前に発生し、結腸における癌化の可能性がある最も初期の生理的変化の 1 つである (Corpet, et al., 1997), (Seraj, et al., 1997), (Baijal, et al., 1998)。

様々なラットモデルにおいて、投与された胆汁酸は、発がん物質、特にアルキル化剤による誘発後に、結腸内の ACF を増加させ、及び／又は腫瘍の増殖を促進することが示されている（表 2.4-4）。

表 2.4-4: 発がん物質誘発異常腺窩巣の形成／又は腫瘍増殖に対するコール酸の腫瘍形成促進効果を検討した試験

発がん物質[a]	動物[b]	コール酸の混餌濃度%	CA[c]の 1 日投与量	コール酸プールサイズの倍数	投与期間	主な所見	参考文献
AOM	SD 雌ラット	0.2%	150 mg/kg	同等	4 週間	コール酸 150 mg/kg の混餌投与により、ACF の増殖が増加したが、正常腺窩の増殖は増加しなかった。	(Corpet, et al., 1997)
AOM	F344 雄ラット	0.4%	200 mg/kg	1.3	8 又は 18 週間	コール酸 200 mg/kg のみの混餌投与では、結腸に ACF 様前がん病変は誘発されず、F344 ラットの身体発達に有害な影響は認められなかった。 AOM 投与後、コール酸 200 mg/kg 混餌投与群では、基礎飼料群と比較して ACF 数が統計的に高かった。	(Seraj, et al., 1997)
AOM	SD 雄ラット	0.2%	100 mg/kg	0.67	20 週間	コール酸 100 mg/kg の混餌投与は、早期の結腸発がんに対して増強効果を示したが、イニシエーション後の発がんには増強効果を示さなかった。	(Baijal, et al., 1998)[d]
AOM	SD 雄ラット	0.2%	100 mg/kg	0.67	18 週間	コール酸 100 mg/kg を混餌投与したラットの正常腺窩及び ACF はいずれも、対照飼料を与えたラットの腺窩に比べて、細胞 100 個当たりのアポトーシス小体数が少なかった。 このことから、コール酸 100 mg/kg を含有する飼料を長期間与えると、アポトーシス抵抗性の増強が生じることが示唆される。	(Magnuson, et al., 1994)

a: AOM, アゾキシメタン
b: SD, Sprague-Dawley; F, Fischer.
c: CA, コール酸の 1 日量（mg/kg）; 基礎飼料に添加したコール酸の割合から推定（但し、著者が用量を算出した (Corpet, et al., 1997)を除く）。
d: 試験には腫瘍の評価項目も含まれていた。

表 2.4-5: 発がん物質誘導腫瘍増殖に対するコール酸の腫瘍形成促進効果を検討した試験

発がん物質	動物	コール酸の混餌濃度%	CA の 1 日投与量	コール酸プールサイズの倍数	投与期間	主な所見	参考文献
MNU	F344 雄ラット	0.2%	100 mg/kg	0.67	27 週間	コール酸 100 mg/kg は MNU 投与後の腫瘍数を増加させた。 カルシウム 800 mg/kg は、結腸における腫瘍病変の形成を阻止しなかった。	(McSherry, et al., 1989)
MNNG	F344 雌ラット	N/A（直腸内投与）	200 mg/kg	1.3	46 週間	MNNG 直腸内投与による腫瘍イニシエーション後に、コール酸を 46 週間直腸内投与した結果、MNNG と生理食塩水を投与した対照群と比較して、腺癌及び腺腫の発生率並びに 1 例当たりの発生数が増加した。この効果は、正常ラット及び二次胆汁酸を持たない無菌ラットにおいて認められたが、腫瘍を有する無菌ラット数の増加は統計学的に有意ではなかった。	(Reddy, et al., 1977)
DMH	Wistar 雌ラット	N/A（胃内注入）	20 mg/kg/週	1/50 未満	20 週間	腫瘍発現までの期間、生存率、原発性又は転移性結腸癌の剖検率、群当たりの結腸腫瘍数に関して有意差は認められなかった。 このデータから、DMH はラットにおける結腸腫瘍プロモーターではないことが示唆される。	(Cruse, et al., 1981)

a: MNNG, N-methyl-N1-nitro-N-nitrosoguanidine; MNU, N-methyl-N-nitrosourea; DMH, ジメチルヒドラジン
b: SD, Sprague-Dawley; F, Fischer.
c: CA、コール酸の 1 日量（mg/kg）:基礎飼料に添加したコール酸の割合から推定
N/A, 該当しない

2.4.4.4.2.1　ACF に対するコール酸の影響

F344 ラットに 0.4%コール酸（1 日当たりコール酸約 200 mg/kg 又はコール酸プールサイズの 1.3 倍）の濃度で 8 週間又は 18 週間混餌投与したところ、対照飼料を与えたラットと比較して、結腸の ACF の発生率に有意な影響は認められなかった (Seraj, et al., 1997))。しかし、ラットに発がん物質アゾキシメタン（AOM）投与後に 0.2%コール酸（1 日当たり約 150 mg/kg 又はコール酸プールと同等量）を 4 週間混餌投与した場合は、結腸当たりの ACF 平均数が対照群の動物と比較して有意に高かった。AOM による誘導後に 0.2%コール酸（1 日当たり 150 mg/kg 又はコール酸プールの 1 倍）をラットに混餌投与すると、ACF の増殖が増大したが、正常腺窩の増殖は増大しなかった (Corpet, et al., 1997)。これは、コール酸が結腸発がんのイニシエーターではなく、発がんプロモーターとして作用していることを証明している。

さらに、ラットの固形飼料に 0.2%コール酸（1 日当たり約 100 mg/kg 又はコール酸プールの 0.67 倍）を添加して 20 週間混餌投与したところ、発がん物質 AOM 投与後の発がん早期過程に投与した場合には結腸発がんの増強が見られるが、イニシエーション後に投与した場合には増強しないことが報告された (Baijal, et al., 1998)。

ラットに 0.2%コール酸（約 100 mg/kg 又はコール酸プールの 0.67 倍）を 18 週間混餌投与した結果、正常に見える腺窩及び ACF の細胞はいずれも、対照飼料を与えたラットに比べて、アポトーシスに対する抵抗性が高いことが明らかになった (Magnuson, et al., 1994)。コール酸への曝露による ACF の細胞死率の低下は、コール酸を混餌投与した動物でみられた ACF 増殖の亢進及び腫瘍発生率の上昇に寄与している可能性がある。

2.4.4.4.2.2　腫瘍数に対するコール酸の影響

発がん物質 N- methyl-N-nitrosourea（MNU）を投与した Fisher 344 ラットに、0.2%コール酸（1 日当たりコール酸約 100 mg/kg 又はコール酸プールの 0.67 倍）を 27 週間混餌投与したところ、腫瘍数（80% vs. 55%）、腫瘍／動物比（2.24 vs. 0.75）及び腫瘍／担腫瘍動物比（2.80 vs.1.36）が有意に増加した (McSherry, et al., 1989)。ほとんどの腫瘍は腺腫性ポリープであったが、上皮内癌や浸潤癌もみられた。

F344 雌 ラットを用いた試験では、発がん物質 N-methyl-N1-nitro-N-nitrosoguanidine（MNNG）の直腸内投与による腫瘍イニシエーション後に、1 日当たりコール酸 200 mg/kg（コール酸プールの約 1.3 倍）を 46 週間直腸内投与した結果、MNNG と食塩水のみを投与した対照群と比較して、腺癌と腺腫の発生率及び動物 1 例当たりの発生数が増加することが示された (Reddy, et al., 1977)。この効果は、正常ラット（N=30）及び二次胆汁酸を持たない無菌ラット（N=24）において認められたが、腫瘍を有する無菌ラット数の増加は統計学的に有意ではなかった。コール酸のみを 46 週間投与した対照群の動物（コンベンショナルラット N=12、無菌ラット N=10）では腺癌又は腺腫の発生は認められなかった。このことから、コール酸は、デオキシコール酸に代謝されることなく、それ自体で MNNG によってイニシエーションされる結腸発がんを促進する可能性を示している。しかし、コール酸代謝物は主に糞便中に排泄され、正常下では一次胆汁酸が大量に直腸に到達することはないため、これらの結果は投与経路及び投与部位が原因と考えられる（2.4.3.4 項）。

一方、ラットにおいてコール酸は結腸の腫瘍プロモーターとして作用しないことが報告されている (Cruse, et al., 1981)。ラットにおいて DMH 皮下投与後にコール酸 20 mg/kg を週 1 回計 20 回胃内注入したところ、腫瘍発現までの期間、生存率、原発性又は転移性結腸癌の剖検率又は群当たりの結腸腫瘍数について、水のみを与えた動物と差はなかった (Cruse, et al., 1981)。しかし、この効果の重要性を明らかにするためには、さらなる検討が必要であろう。本試験のコール酸投与量は他の試験よりもはるかに低い一方、他方では発がん物質依存的な効果を除外することはできない。

上記すべての試験の主要な知見は、ラット又はマウスにコール酸を投与すると、通常、アルキル化剤（AOM, MNU; MNNG, DMH）投与後にのみ ACF の増加又は腫瘍発生が生じるということである。したがって、この知見から、コール酸は発がん物質それ自体としてではなく、プロモーターとして作用することが示唆される。しかし、発がん物質依存性である可能性がある (Cruse, et al., 1981)。また、強調すべき点として、発がん物質を投与せずコール酸を投与した場合、発がん作用は認められなかった。

2.4.4.4.2.3　その他の検討事項

最近の多くの in vitro 研究から、胆汁酸は酸化ストレスや活性酸素種の産生を誘導することにより、間接的に DNA 損傷を引き起こすことが示されている（ (Bernstein, et al., 2005)によるレビュー)。DNA 損傷が繰り返し起きると、突然変異率が上昇する可能性が高まる。その他の研究では、胆汁酸が結腸上皮細胞のアポトーシスを誘導することが示唆されている。即ち、高濃度の胆汁酸に繰り返し曝露されると、がん化する可能性のあるアポトーシス抵抗性細胞が選択されると考えられる。これらの過程におけるコール酸の可能性を示す証拠はないが、二次胆汁酸であるデオキシコール酸及びリトコール酸の関与は強く示唆されている。胆汁酸の DNA 損傷能及びアポトーシス促進能の in vivo での重要性は明らかではない。

2.4.4.4.3　げっ歯類発がんモデルのヒトとの関連性

コール酸のヒトでの発がん作用を検討する上で、マウス及びラットモデルのヒトとの関連性については議論の余地がある。本申請に提示した試験はすべて、短い観察期間及び高用量の発がん物質による人工的発がんモデルを使用している。

ヒトの一生においてコール酸は常に腸内分泌されており、その大部分が再吸収され、一部が大腸を経由し便中に排泄される。一方、ヒトは元来一定量（各食事時に 4～8 g）のコール酸が十二指腸に分泌され、一生涯暴露されている状態にある。本剤による治療は欠乏したコール酸の補充療法であり、ヒトの通常の一日排泄量（約 500 mg）を補充し、胆汁の量を一定（胆汁酸プール約 500 mg）に保つことを基本としている。したがって、通常の胆汁酸プールを大きく超えない投与では、ヒトの一生の暴露と同程度と考えられる。その観点から、通常の吸収量を超えた投与時のげっ歯類で得られた結果をヒトに外挿する場合には十分な注意が必要である。

また、コール酸投与前に発がん物質を投与するげっ歯類発がん促進モデルでは、消化器癌及び肝癌のいずれにおいてもコール酸又はその代謝物は発がん物質自体としてではなく、腫瘍プロモーターとして作用する可能性が示唆されている（2.4.4.4.1 項及び 2.4.4.4.2 項)。しかし、げっ

歯類の種／系統、発がん物質の種類、コール酸と発がん物質の両方の投与量と投与経路の違いにより、試験間の比較が妨げられ、決定的な結論を出すには大きな問題がある。例えば、ある試験では、腫瘍プロモーションは発がん物質依存性であることが示唆されている (Cruse, et al., 1981), (Wilpart, et al., 1983)。

さらに、げっ歯類モデルの消化管における胆汁酸スペクトルは、ヒトとは著しく異なる。例えば、ラットでは、糞便中の主な胆汁酸はヒオデオキシコール酸（23%）、ムリコール酸（β 及び ω）（21%）、デオキシコール酸（17%）であるが、ヒトの糞便水中では、デオキシコール酸（58%）、リトコール酸（12%）及びコール酸（4%）である (Bernstein, et al., 2005)。したがって、げっ歯類は、同じ濃度のコール酸と特にその主代謝物デオキシコール酸に対処するために、（動物種によって）ヒトとは異なる適応をしている可能性がある。

以上をまとめると、コール酸の発がん性又は共発がん性（co-carcinogenic potential）についての非臨床的知見は明確ではない。動物モデルでのデータはその可能性を示唆しているが、ヒトでのこれらのモデルの妥当性は不明である。しかし、ヒトのデータを評価する際には、動物試験の結果、特にコール酸の消化管及び肝臓発がん性の可能性について考慮するべきである。さらに、コール酸混餌投与下での胆汁及び十二指腸中のデオキシコール酸含有量の増加（2.5.3.2.3 項）は、デオキシコール酸の潜在的な影響も考慮する必要があることを意味している。

糞便中胆汁酸と大腸癌又は大腸腺腫との関連性を検討した臨床観察研究に関する最近のメタアナリシスでは、計 1226 例を含む 20 件のケースコントロール研究又はコホート研究からデータが集められた (Tong, et al., 2008)。糞便中コール酸含有量について特に解析は実施されなかったが、唯一有意な関連性が認められたのは、対照群に比べて結腸癌又は結腸腺腫患者ではケノデオキシコール酸の糞便中排泄量が有意に高かったことであった。動物モデルではコール酸の主代謝物デオキシコール酸が腫瘍プロモーターであることが示されている（2.4.4.9 項）一方、デオキシコール酸の糞便中排泄と癌／腺腫との関連性に関する知見は曖昧であった。このメタアナリシス研究は、大腸腫瘍の発生における糞便中の胆汁酸、特にケノデオキシコール酸の役割についての知見を提供するものである。

一部の胆汁酸の腫瘍促進作用を示す知見はあるにもかかわらず、胆汁酸代謝に関与する遺伝子を特異的に不活化したマウスでの致死遺伝子の表現型発現から明らかなように、胆汁酸を代謝から完全に排除することは明らかに不可能である（2.4.2.1 項）。機能的な胆汁酸が極めて重要であることは、こうした胆汁酸を持たない未治療の 3-β-Hydroxy-Δ^5-C_{27}-steroid oxidoreductase（3β-HSD）欠損症及び Δ^4-3-oxosteroid-5-β-reductase（Δ^4-3-oxoR）欠損症の患者においても明らかである。これらの疾患では、脂肪及び脂溶性ビタミンの重度の吸収不良が認められ（2.5.1.2.3 項及び 2.5.1.2.4 項）、これらの遺伝的欠損により引き起こされる肝疾患は、肝硬変を引き起こし、乳児又は幼児期には死に至ることさえある。これらの患者にコール酸経口投与による治療を行うことは、正常で機能的な腸肝循環の回復、脂肪及び脂溶性ビタミンの吸収、肝パラメータの正常化、肝硬変の改善及び長期生存につながる。したがって、消化管における胆汁酸濃度の上昇は、消化器癌の潜在的危険因子とみなすのが妥当と考えられる。延命及び肝疾患の回避（肝疾患自体が発がんリスクである）は、コール酸の投与に伴う発がん性増大の潜在的リスクを大きく上回る。

従って、限定された長期がん原性試験、限定された非臨床ファーマコキネティクス／トキシコキネティクスデータ及び限定された長期臨床経験は、対象患者にコール酸がもたらすベネフィットにより相殺される。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

以下及び 2.5.3.1.2 項に示すように、コール酸はヒト及び動物の胎児、新生児及び成人（妊婦を含む）に存在する内因性化合物である。コール酸の生理的濃度範囲での曝露は明らかに毒性を示さないが、正常濃度を上回る濃度のコール酸への曝露は、妊娠性肝内胆汁うっ滞又は過量投与時に発生する可能性があるため、高濃度で曝露したときの、受胎能、胚・胎児発生、出生前及び出生後の機能に及ぼす影響を評価する必要がある。したがって、以下に示すように、特定の試験が実施されていないことは許容できると考えられる。

文献中の毒性試験には、受胎能に対するコール酸の影響を検討した試験は含まれていない。

ある試験では、きわめて高用量のコール酸投与により母体及び胎児肝毒性が示唆されている (Siviero, et al., 2008)。3 例の妊娠ハムスターに 0.5%コール酸（600 mg/kg）を交配日から屠殺時（仔の出生 2 日後、計 18 日間）まで混餌投与したときの影響を検討する定性的試験が実施された (Siviero, et al., 2008)。母動物の肝臓において、軽微～顕著な細胆管増生が各 1 例で認められた (Siviero, et al., 2008)。門脈域の炎症性浸潤及びセロイドを含むクッパー細胞が 2 例で、分葉化の増強が 2 例で認められた。肝内及び／又は肝外胆管では、全ての動物で上皮細胞の過形成又は増殖が認められた。すべての出生仔（N=12）で、対照群と比較して髄外造血が軽度に亢進していた。3 例が肝外胆管上皮の過形成又は増殖を呈した（出生仔の 25%）。これらの動物は、門脈域で軽微な細胆管／胆管増生を示した (Siviero, et al., 2008)。これらの肝臓の変化は、母体の腸内細菌の 7α-hydroxylase によりコール酸からデヒドロキシコール酸が生成されたことに起因すると考察されている。

5 例の妊娠ヒツジ（雌ヒツジ）に、コール酸 0.41 mg/kg を単回ボーラス静脈内投与した結果、投与時と比較して、その後の 24 時間に心血管パラメータ又は血液ガスに有意な変化は認められなかった (Perez, et al., 1994)。同様に、ヒツジ胎児にコール酸 934 mg/日を持続静脈内投与しても、血液ガス、pH、心拍数、動脈圧を含む各種心血管パラメータに有意な影響は認められなかった (Campos, et al., 1986)。興味深いことに、胎児のコール酸濃度は母体の血漿中濃度のほぼ 4 倍で推移した (Perez, et al., 1994)。この所見と一致して、ヒツジ胎児の血漿中胆汁酸濃度は投与前の 24.3 ± 5.7 μM から出生時には 829 ± 305 μM に有意に（$p < 0.05$）増加した (Campos, et al., 1986)。出産間近の妊娠雌ヒツジにコール酸を投与すると、2～3 分の潜伏時間で子宮収縮が誘発された。しかし、こうした子宮収縮によって 24 時間後に生じた分娩は正常であった (Perez, et al., 1994)。対照動物のデータは示されていないため、コール酸又は実験手順のいずれかによる効果であるかは不明である。

コール酸が胎児に毒性を示さないことを検討するために、コール酸 25 mg を卵 1 個当たり 100 μL 以下の容量で単回注入した結果、ニワトリに催奇形性作用は認められなかった (Verrett, et al., 1980)。

2.4.4.6　幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験は確認されなかった。前述したように、幼若動物は内因的にコール酸を産生するため、幼若動物を用いた試験が実施されていないことは許容できると考えられる（以下の項も参照のこと）。

2.4.4.7　妊娠前及び妊娠期間、授乳期間、及び小児の発達期における投与の影響

臨床データから、コール酸の投与を受けていた患者で妊娠成功例があり、いずれも健康な子が生まれたことが示されている（2.5 項）。しかし、上記で述べた試験（2.4.4.5 項）を含む全ての知見から、早産のリスク又は母親若しくは胎児における肝障害のリスクを避けるために、コール酸を含む胆汁酸の生理的濃度を維持する必要があることが示唆される。コール酸の投与を受けている妊娠患者に対しては、注意深いモニタリングが必要である。

授乳期間及び小児発達期におけるコール酸投与の影響を検討した非臨床試験は確認されなかった。しかし、HSD3B7 遺伝子を選択的に不活化した妊娠マウス及び授乳マウスに対し、妊娠後期中及び出生後 28 日目まで 0.1%又は 0.5%コール酸を混餌投与すると、ホモ接合性突然変異を有する仔マウスの生存率がそれぞれ約 2 倍に増加又は正常化した（2.4.2.1.4 項）。このことは、コール酸はマウスの乳汁中に分泌され、一次胆汁酸合成における先天異常に有益な効果をもたらすことを強く示唆している。

2.4.4.8　局所刺激性試験

局所刺激性を検討した試験は確認されなかった。投与経路は経口投与であるため、局所刺激性試験は関連がないと考えられる。

2.4.4.9　その他の毒性試験／特別な問題点を明らかにするための試験

2.4.4.9.1　代謝物の毒性試験

2.4.2 項に示したように、コール酸の主代謝物はデオキシコール酸である。デオキシコール酸と様々な毒性作用の関連性を示す明らかな知見がある。デオキシコール酸の投与により、体重減少、下痢、変異原性及び発がん作用が発現することが研究によって示されている。デオキシコール酸の効果はコール酸の効果と類似しているが、それらを誘発するのに必要な濃度はコール酸の約 2 分の 1 である（詳細な参考文献については、2.6.6.8.1 項を参照のこと）。

単回投与毒性試験において、デオキシコール酸の静脈内投与での LD_{50} はマウスで 150 mg/kg、静脈内投与での致死量はウサギで 15 mg/kg であり、それぞれコール酸での約 4 分の 1～2 分の 1 であったが、それでも非常に高い。ウサギにおける経口投与での致死量は g/kg の範囲であり、強い消化管炎症の徴候が認められた。

げっ歯類を用いた反復投与毒性試験において、デオキシコール酸はコール酸と概ね同等の毒性を示したが、その用量は同じ試験でのコール酸の約 2 分の 1 であった。デオキシコール酸をサプリメントとして混餌投与すると、体重増加の減少又は体重減少、肝臓の構造的損傷、血清トランスアミナーゼ上昇及び下痢が発現した。用量相関性が認められており、ラットにおいて、50

mg/kg/日の用量では 1 カ月未満の投与で体重増加に軽度な影響がみられたが、500 mg/kg/日では 5 日未満の投与で動物を死亡させた。ラットにおいて中間用量 250 mg/kg/日の投与では、数例の死亡、腸刺激症状及び下痢、ならびに重度の肝障害の徴候が認められた。また、ヒトでの試験により、デオキシコール酸プールサイズの増加は、腸管通過時間の遅延、細菌の 7α-dehydroxylase 活性の上昇及び腸内 pH の低下と相関し、胆汁コレステロール過飽和及び胆嚢収縮障害を増大させることにより、コレステロール胆石形成の増加に関与している可能性が示唆されている (Thomas, 2008)。全体として、コール酸の毒性作用は少なくとも部分的にはデオキシコール酸を介するものである可能性がデータから示唆される。

コール酸とは対照的に、デオキシコール酸のデータはその遺伝毒性を示唆している。提示した遺伝毒性試験のうち、彷徨試験を用いた 1 試験では、S9 代謝活性化系の非存在下において比較的低濃度で遺伝毒性陽性であったが、並行して行ったエームス試験では、その他の全ての試験と同様に陰性であった。上記の所見はコール酸と類似しているが、デオキシコール酸によるこれらの影響はコール酸のほぼ半分の濃度で認められた。その他の試験でも、デオキシコール酸の変異原性が報告されている。そのうちの 1 つでは、デオキシコール酸はネズミチフス菌において数種の変異原（ジメチルヒドラジン、2-ニトロフルオレン、N-methyl-N'- nitro-N-nitrosoguanidine 及び 2-アセチル-アミノフルオレン）による復帰突然変異の頻度を増加させることが報告された (Wilpart, et al., 1983)。哺乳類細胞を用いた試験では、食道腺癌細胞株 OE33 において小核形成の誘導に対するデオキシコール酸の非線形の用量依存的効果が報告されている。遺伝毒性は 100 μM を超える濃度で認められ、活性酸素種によって媒介されることがわかった (Jenkins, et al., 2008a)。その他のいくつかの試験からも、in vitro においてデオキシコール酸が遺伝毒性活性を有するという知見が得られているが、この中で遺伝毒性試験の標準的組み合わせを用いた試験はなかった (Hardie, 2008)。実際、デオキシコール酸は in vitro において転写因子である核内因子 κB（NF-κB）を活性化することが示されており、これは腫瘍形成における重要な分子的事象である (Jenkins, et al., 2008a)。さらに、デオキシコール酸ナトリウム（100 μM）は、食道細胞株 FLO-1 及び HET1-A において、やはり中性 pH でのみ DNA 損傷を有意に増加させた (Jolly, et al., 2004)。これらのデータから、胃食道逆流物の成分としてのデオキシコール酸は DNA 損傷を引き起こすことができ、このメカニズムを介してバレット食道の発生と進行に関与する可能性があることが示唆される。

がん原性試験により、デオキシコール酸は発がん作用のプロモーターであることが示唆される。デオキシコール酸は、ラットにおいて発がん物質 DEN 投与後に 8 週間混餌投与した場合に、肝発がん促進活性を有することが研究から示唆されている。DEN 投与後の GGT 陽性細胞巣は、DEN 単独投与群と比較して、デオキシコール酸混餌投与群で有意に増加した。肝切片 1 cm^2 当たりの前がん性 GGT 陽性細胞巣の数及び面積について、0.06%、0.12%及び 0.3%デオキシコール酸の混餌濃度で明らかな用量依存的効果が認められた。

結腸発がんモデルを用いた試験が報告されている。この試験の最初のパートでは、18 週間の混餌投与試験において、F344 雄マウスの結腸における ACF の誘導と増殖に対するデオキシコール酸の影響が検討された。この状況下で、デオキシコール酸は有意な ACF 形成誘導を示さなかった。しかし、予め AOM（アゾキシメタン）による誘導後に同じ混餌投与を行った場合は、デオキシコール酸非添加の実験用固形飼料を与えた対照群に比べて、結腸当たりの平均 ACF 数

が有意に高かった。同じ試験デザインを用いて検討したところ、コール酸混餌投与群ではデオキシコール酸混餌投与群よりも結腸当たりの ACF 数が高かった（10%）が、結腸当たりの平均 ACF 数についてはコール酸混餌投与群とデオキシコール酸混餌投与群の間に統計学的有意差はなかった。

ある試験により、部分肝切除前及び部分肝切除後 1 週間にわたってデオキシコール酸を混餌投与すると、肝臓の過形成性結節数が増加することが明確に示された (Ross, 2008)。別の試験では、C57BL/6 マウスにデオキシコール酸を含有する亜鉛欠乏食を最長 152 日間与えた結果、63%の動物で食道腺癌の前がん状態であるバレット食道に似た食道病変が認められた (Ross, 2008)。

これらのデータから、デオキシコール酸は、コール酸と同様に、ラットの肝発がん及び消化管発がんモデルにおいて前がん病変の発生を増強することが示唆される。この場合も、コール酸の作用は、その代謝物であるデオキシコール酸によって部分的に仲介されると考えられる。しかし、コール酸は、デオキシコール酸産生が認められないはずの無菌ラットにおいて腫瘍促進活性を有することが示されている (Reddy, et al., 1977)。

(Rosignoli, et al., 2008)では、多段階発がんのプロセスにおいて、デオキシコール酸がプロモーターとしてのみならずイニシエーターとしても作用していると報告されている。著者らが培養結腸細胞を用いた研究で得たエビデンスは、デオキシコール酸が誘発する DNA 損傷に活性酸素種が関与しているという仮説を裏付けるものであった。同様の作用がケノデオキシコール酸でも実証されている。 (Rosignoli, et al., 2008)では、デオキシコール酸が発がんのイニシエーターとして作用する可能性があると指摘されている。しかし、 (Jenkins, et al., 2007), (Jenkins, et al., 2008a)では、培養食道細胞においてデオキシコール酸が実際に活性酸素種を介して DNA 損傷を誘発したが、その作用は非線形の用量反応性を示し、おそらく活性酸素種に対する細胞内の抗酸化物質の防御効果によって、100 μM 未満の濃度では DNA 損傷を誘発しないと報告されている。したがって、低濃度のデオキシコール酸への長期曝露は生物学的に重要な影響を及ぼさないと考えられる。

概して、ヒトの内因性分子であるデオキシコール酸は、コール酸よりも毒性が強く、実際にコール酸の毒性の一部を担う原因物質であると考えられる。動物及びヒトはこの代謝物の存在に対処するように適応しているため、毒性作用は高用量、非生理的用量及び／又は長期曝露後にのみ認められる。

しかし、コール酸を摂取した患者では、デオキシコール酸の発がん作用の標的と考えられる消化管内で、健常者よりもデオキシコール酸の絶対濃度が高くなるというエビデンスはない。現時点では、各集団の腸内デオキシコール酸濃度範囲に関する疫学的データが乏しく、「正常な濃度範囲」を定義できない。デオキシコール酸濃度は、食事、腸内細菌叢、宿主の遺伝的性質によって変動することから (Jenkins, et al., 2008a)、「正常な濃度範囲」を推定するのは困難である。本剤を投与する患者にはコール酸の生理的用量が投与されるため、コール酸及びデオキシコール酸への曝露による長期発がんリスクは、生涯を通じてこれらの胆汁酸に継続的に曝露している健常者と概ね同等であると考えられる。

また、ケノデオキシコール酸はデオキシコール酸と同程度の遺伝毒性を有することが明らかになっている (Rosignoli, et al., 2008), (Tong, et al., 2008)。コール酸を単独投与した 3β-HSD 欠損症患者の腸内では、ケノデオキシコール酸が存在しないか著しく減少することから (Gonzales, et

al., 2009)、本剤を投与した患者におけるケノデオキシコール酸による発がんリスクはかなり低いと考えられる。入手したデータから、ケノデオキシコール酸の濃度低下及びデオキシコール酸の濃度上昇による実質的な影響を予測することは不可能であった。

3β-HSD 欠損症及び Δ^4-3-oxoR 欠損症患者、並びに胆汁酸代謝が正常な被験者を対象とした試験によれば、コール酸投与後の血清中及び胆汁中の胆汁酸は主にコール酸とデオキシコール酸であり、ケノデオキシコール酸とその代謝物は減少すると考えられる（2.5.3.2.3 項）。したがって、コール酸投与下では、患者は未投与時と比較して高いデオキシコール酸濃度に曝される。治療用量のコール酸では、短期投与及び最長 30 年の投与では一般的な副作用は認められておらず、本剤を投与した患者において、健康人に比べ、その代謝物が質的あるいは量的に大きく異なる可能性は低いと考えられるものの、コール酸に加えてデオキシコール酸は発癌プロモーターとして作用している可能性が示唆されていることから、消化管癌の長期リスクについては製造販売後も注視する予定である。

吸収されて腸肝循環により再び肝臓に戻ると、未代謝のコール酸はタウリン抱合体又はグリシン抱合体となる。抱合型コール酸代謝物であるタウロコール酸及びグリココール酸は、in vitro 小核試験において遺伝毒性がないことが示されている (Jenkins, et al., 2007)。文献上、これらの親水性胆汁酸は毒性が低いというのが一致した見解である (Monte, et al., 2009)。これら 2 種類の抱合型コール酸については、すべてのコール酸経口投与毒性試験において暗黙的に試験され、特別な懸念は生じていないため、詳細な考察は必要ないと考えられる。

結論として、消化管における胆汁酸濃度の上昇は、消化管癌の潜在的危険因子とみなすのが妥当と考えられる。本邦における予定適応症を有する患者に投与する場合、正常に機能する腸肝循環、脂肪及び脂溶性ビタミンの吸収、長期生存率の回復が、潜在的な発がんリスクよりも重要である。

2.4.4.9.2　不純物の毒性試験

適用されるオファコルカプセル 50 mg の規格では、不純物であるコール酸メチルの濃度は 0.4%以下に設定されている。コール酸の最大 1 日投与量は 500 mg（2 g 以下に該当）であり、コール酸メチル含有量は> 0.15%、最大 1 日摂取量は 2 mg（1 mg 超に該当）であるため、ICH ガイドライン Q3A(R2) 「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」に従い、コール酸メチルの安全性を確認し、生物学的安全性を確立しなければならない。コール酸メチルの規格値を安全性確認の必要な閾値未満まで下げることは不可能と判断された。コール酸メチルに関する文献は非常に限られているが、その生物学的安全性をある程度確認することは可能である。

コール酸メチルはエームス試験において非変異原性であることが示された (Macdonald, et al., 1978)。 (Jenkins, et al., 2007)の細胞分裂の阻止を伴う小核試験を用いて、食道由来細胞（OE33 細胞）における in vitro の遺伝毒性試験を実施した結果、本試験に用いた用量範囲（25～200 μM）ではコール酸メチルの遺伝毒性は認められなかった (Eltahir & Jenkins, 2010)。また、二核細胞の割合にも変化がみられなかったことから、細胞毒性も認められなかった。同じモデルにお

いて、コール酸は同じ用量範囲で遺伝毒性を示さなかったが、二次胆汁酸デオキシコール酸は上述の通り 100 µM を超える濃度で遺伝毒性を示した (Jenkins, et al., 2007)。

本剤の最大 1 日量（コール酸 500 mg/日）では、現行の不純物の規格（0.4%以下）に照らすと、コール酸メチル（分子量 422.60）の最大 1 日摂取量は 2 mg となり、コール酸メチル 4.7 µmol に相当する。SmPC に記載されている通り、1 日 2 回食後に服用した場合、消化管内でのコール酸メチルの局所濃度が 200 µM に達する可能性はきわめて低い。

薬力学試験において、コール酸メチルは in vitro でのコレステロール合成を中程度に阻害することが判明している (Kim, et al., 2004)。コール酸メチルとメバスタチン（毒性が報告され現在使用されていないスタチン、HMG-CoA 阻害作用はロバスタチンとほぼ同等 (Alberts, et al., 1980)の IC_{50} を比較した結果、コール酸メチルは 1/40 であると報告されている (Kim, et al., 2004)。ロバスタチンの最小有効量を 10 mg/日とすると、コレステロールに対する作用をもたらすと考えられるコール酸メチルの摂取量は 400 mg となり、本剤中に存在する量（500 mg 中 2 mg）の 200 倍に相当する。

さらに、レポーターアッセイにおいて、コール酸メチルは最も高い効力を示す内因性胆汁酸ケノデオキシコール酸と同程度に FXR 受容体を活性化することが判明している (Suzuki, et al., 2008)。上記の結果から、コール酸メチルは胆汁酸及びコレステロールのホメオスタシスにおいて重要な遺伝子の発現を調節し、細胞種特異的に、又は遺伝子-種選択的に、あるいはこの両方によってこれらの遺伝子の発現を調節している可能性があることが示唆された。注目すべき点として、これらの作用は、コール酸の効力発現に重要な作用と非常に似ている。

コール酸メチルの安全性確認のもう 1 つの要素として、 (Gonzales, et al., 2009)に報告されている 15 例以上の患者に規格の濃度以上のコール酸メチル（0.4～0.5%）を含む製剤が投与され、その大半が 10 年以上にわたり投与されていた点に留意すべきである（2.3.P.2 項）。これは、コール酸を投与した患者集団で、系統的に報告された最大の患者集団である。この患者集団において、治療用量のコール酸で有害事象は報告されていないことから、コール酸メチルの生物学的安全性がさらに裏付けられている。したがって、申請者は、設定した規格で不純物であるコール酸メチルの安全性は確認され、コール酸メチルの安全性試験をあらためて実施する必要はないと考える。

以上のデータは、先天性胆汁酸代謝異常症患者の治療としてコール酸を投与した際に、不純物であるコール酸メチルによる毒性や遺伝毒性のおそれが生じる可能性は低いという結論を裏付けるものである。実際、最大 0.5%のコール酸メチルを含有するコール酸を数年間にわたり投与した患者において毒性は認められていない。また、本剤の 1 日量に規格の最大限の濃度でコール酸メチルが含有されていたとしても、患者のコレステロール合成に影響を及ぼすことはないと考えられる。

コール酸メチルのほか、適用される規格では、不純物デオキシコール酸及びケノデオキシコール酸の濃度をそれぞれ 0.5%以下、総不純物の総量を 1.5%以下と設定している。デオキシコール酸はコール酸の主要代謝物であり（2.4.4.9.1 項）、ケノデオキシコール酸は健常者では本剤に由来する 1 日最大摂取量の約 50 倍が内因性に産生されることから、申請者は、ICH ガイドライン Q3A(R2)に従い、両物質とも安全性が確認されたと判断した。

2.4.4.10　結論

コール酸は、一次胆汁酸の合成が高度に障害された、あるいは合成が認められない患者に対して、一次胆汁酸の 1 日の内因性合成速度までのレベルで経口投与する。コール酸の投与量は、患者の代謝反応に応じて投与期間中に調節する。臨床使用におけるコール酸の 1 日最大投与量は 500 mg とし、これは健康なヒトにおける一次胆汁酸の総プールサイズの 1/4～1/6 及び一次胆汁酸合成量に相当する（2.5.3.1.3 項）。

コール酸の毒性に関する文献から、ヒトでの使用について多くの重要な結論を得ることが可能であるが、方法論的及び実験的制約により妨げられる。組織病理学的データを報告した試験はほとんどなく、2 試験でのみトキシコキネティクスデータが報告された (Pereira, et al., 1995), (Fickert, et al., 2001)。経口投与試験はいずれもコール酸を混餌投与しており、投与量についての確かなデータは得られていない。系統的な用量反応試験データは得られていない。したがって、毒性試験の文献からはコール酸の NOAEL は確定できなかった。このことは、動物及びヒトにおけるコール酸と他の胆汁酸の生理的濃度についての知見、即ち、毒性がないだけでなく、正常な生理機能に必要であるということで埋め合わせできる。

コール酸の単回投与毒性試験は、系統的な分析が行われず、LD_{50} の確定に重点が置かれていたため、その価値は限定的である。しかし、試験に用いた動物において静脈内投与及び経口投与でのコール酸の LD_{50} は極めて高いことが明らかであり、マウスでは静脈内投与で 350 mg/kg、経口投与で 1520 mg/kg である。さらに、ウサギに 60 mg/kg を単回静脈内投与した際は致死的となり、ラットに 50 mg/kg のコール酸を単回投与すると心停止に至った。心毒性についてのメカニズムに関するデータで実験所見を裏付けているこのラットでの試験以外に、文献上特に毒性作用は記載されていない。ヒツジに 1 mg/kg 未満の用量を投与した試験では、有意な毒性は認められなかった。げっ歯類及びウサギにおける単回静脈内投与試験で認められた作用は、投与経路の違いから、予定しているコール酸の使用に直接関連するものではない。しかし、反復経口投与毒性について幅広いデータが得られているため、詳細な単回経口投与毒性データがないことは許容できる。

げっ歯類におけるコール酸の単独又はコレステロールとの併用による反復投与毒性試験では、1 日当たりの内因性レベルの最大 22 倍のコール酸を投与した結果、体重減少、肝重量増加、肝障害、血清トランスアミナーゼ上昇、脾腫及び下痢が認められることが報告されている。ラットに 1 日当たり 25～75 mg/kg（内因性プールサイズの 0.16～0.5 倍）を 1 カ月未満投与した際は影響が全くないか、ごくわずかであったものの、1000 mg/kg を投与した際は 7 日超経過してから致死的となった。このように用量との相関性がみられた。ラットに中間用量 500 mg/kg/日（内因性プールサイズの 3.3 倍）を投与した場合は、主に下痢がみられ、時に重度及び軽度の肝障害の徴候が認められた。直腸出血や脾腫等も報告されている。

肝重量の増加、胆嚢損傷及び胆石形成は、コール酸を高コレステロールとともに混餌投与したげっ歯類において増強されている。0.5%コール酸と 1%コレステロール（又は同等のコレステロール含量）を加えた飼料をげっ歯類に与えると、胆石の発生が一貫してみられた。この毒性作用の基本的メカニズムについては十分に検討されており、この特定の代謝関連物質の組み合わせ

に関連しているようである。胆石の形成は、このような食餌によって生じる胆汁コレステロールの過飽和と関連している。

げっ歯類以外の関連のある動物種を用いた毒性試験は文献では確認されていない。コール酸はヒトにおける内因性物質であり、げっ歯類とヒトで観察された毒性作用が一致していることを考慮すると、このことは許容できると考えられる。

コール酸は変異原性、遺伝毒性を示さないという見解は文献から大いに裏付けられている。3 件のエームス試験及び 2 件の 彷徨試験により、コール酸は変異原性陰性であることが示された。しかし、彷徨試験を用いた 1 件の試験では、コール酸は陽性であると報告された。このような試験結果の矛盾は、使用した方法の違いによるものであることが示唆されている。コール酸は、ヒト食道腺癌細胞株において、小核数の有意な増加を誘発しなかった。これらの試験は ICH ガイドライン S2(R1)の遺伝毒性試験の要件を完全には満たしていないが、胆汁酸の潜在的な遺伝毒性は遺伝毒性試験の標準的組合せの要件に適合しない多数の試験で検討されており、そのいずれもコール酸の変異原性を否定している。

コール酸は、500 μM を超える濃度でのみ、ニュートラルレッド取り込み量、すなわち細胞生存率を有意に減少させることが示された。コール酸は、ウルソデオキシコール酸とともに、細胞生存率低下作用が最も低い胆汁酸であった。

コール酸に関する従来の長期がん原性試験の報告はない。コール酸は消化管発がんのプロモーターとして作用するが、それ自体発がん物質としては作用しないことを示唆する重大な知見がラットでの研究から得られている、というのが現在の文献上での一致した見解である。これは、コール酸の混餌投与又は直腸内注入により多くの発がん物質、特にアルキル化剤の発がん作用が促進又は増強されることを示した多数の試験からの結論である。これらの結果は一貫しているが、ヒトとの関連性は完全には明らかではない。しかし、動物及びヒトにおいて消化管発がんにおけるコール酸の主代謝物デオキシコール酸の関与を示唆するいくつかの知見がある（以下参照)。コール酸及びデオキシコール酸の潜在的な長期腫瘍促進効果に注目する一方で、これまでの試験において、それらの単独投与では発がん性は示されておらず、生理的レベルでのそれらの存在は明らかに正常な代謝の必須条件であることを念頭に置いておく必要がある。

ラット及びヒツジを用いた試験では、胎児血液中にコール酸が存在し、胎盤を通過することが証明されている。大多数の動物種では、胚毒性又は催奇形性を示す知見は認められなかった。しかし、ハムスターを用いた 1 つの試験では、高用量のコール酸（0.5%を飼料に添加）混餌投与で、母体及び胎児の両方で肝臓生理機能の変化が報告された。コール酸の静脈内投与では早産が発生しやすくなる可能性がある。目的とする臨床使用に関連して、内因性分子としての生理的濃度のコール酸は確かに胚毒性を示さないことを理解する必要がある。さらに、正常な（intact）一次胆汁酸合成はヒトの生存に必須であるため、それらの存在は妊娠発生にも不可欠である。

多数の文献により、コール酸の主代謝物デオキシコール酸は、同等の用量範囲でコール酸と極めて類似した毒性作用を示すことが示唆されている。しかし、単回及び反復投与毒性試験において、デオキシコール酸は致死作用、消化管毒性及び肝毒性を示したが、その用量はコール酸が同じ作用を惹起するのに必要な用量の約 2 分の 1 であった。デオキシコール酸に遺伝毒性があるかどうかについては、細菌を用いた試験から決定的な知見は得られていないが、ヒト腺癌細胞株を用いた小核試験では陽性所見が認められている。ラットの肝発がん及び大腸発がんモデルにおい

て、デオキシコール酸は、コール酸と同様に、前がん病変の発生を増強する。したがって、デオキシコール酸濃度の上昇は消化器癌発生の潜在的危険因子となる。しかし、デオキシコール酸と大腸癌との関連性については、これまでのところ、ヒトにおける疫学的研究から決定的な結論は得られていない (Tong, et al., 2008)。

患者に投与されるコール酸の用量は、健常人に存在する生理的な濃度に匹敵する濃度に回復することを意図するものであることに注意すべきである。従って患者におけるコール酸及びデオキシコール酸の遺伝毒性あるいはがん原性リスクは、もともとこれら胆汁酸を生産する健常人と同等と考えられる。

コール酸メチルは、オファコルカプセル 50 mg の不純物であり、安全性確認が必要なレベルで存在する。コール酸メチルに関する文献は限られているが、エームス試験において変異原性は認められず、コール酸と同様の薬力学的特性を有することが示されている。さらに、かなりの数の患者が、規定濃度以上のコール酸メチルを含有する製剤の投与を受けているが、副作用の知見はない。したがって、当該不純物は申請者により安全性が確認されたと考えられる。

検討した公表データは、コール酸の非臨床毒性に関する広範なデータセットである。このデータセットは、申請する臨床適応におけるベネフィット・リスク評価の観点から、オファコルカプセル 50 mg の安全性についての概括評価を十分裏付けるものと考えられる。

2.4.5　総括及び結論

コール酸は一次胆汁酸である。胆汁酸とその抱合体は、肝臓でコレステロールから合成される動物及びヒトの胆汁の必須成分である。必須の内因性物質として、コール酸の薬理、薬物動態及び毒性について従来の医薬品とは異なる評価を行う必要がある。薬理試験では、健康で正常な生体におけるコール酸の機能及びホメオスタシスを検討し、薬物動態試験では、その生合成と特異的輸送機構を検討する。さらに、毒性評価では、生体が内因性濃度での存在に適応しているため、内因性濃度のコール酸が本質的に非毒性であることを考慮する必要がある。

コール酸の非臨床特性についての評価には、これまでに得られているコール酸の生理機能及び毒性に関する極めて膨大な文献のごく一部を使用する。これらの文献は数十年にわたって蓄積してきたものであるため、適用される ICH ガイドラインに規定されている非臨床試験パラダイムに適合することは期待できない。特に毒性についてある程度のデータギャップが残っているが、それでもこれらのデータからはコール酸の薬理、薬力学及び毒性についての包括的で一貫した実態がわかる。

コール酸は肝臓でコレステロールから合成される。コール酸は腸肝循環を受けるが、その中での主要な機能は、胆汁流の誘導、胆汁酸合成のフィードバック阻害、コレステロール合成の調節、コレステロールの排泄、ミセル形成を介した脂質及び脂溶性ビタミンの分散・吸収の促進等である。コール酸の生合成とそのフィードバック調節、並びに回腸上皮細胞及び肝細胞内での輸送については、分子レベルで解明されている。3β-HSD 欠損症のノックアウトマウスモデルを用いた検討により、本疾患の治療において想定されるコール酸の薬理作用機序が確認されている。ヒトと同様に、マウスにコール酸を混餌投与すると、この遺伝子欠損による致死作用が阻害され

た。コール酸は CYP7A1 を介した一次胆汁酸合成阻害及び脂肪や脂溶性ビタミンの吸収を回復させる。

内因性コール酸のプールサイズ及び代謝回転がマウス及びラットにおいて検討されている。これは、毒性試験で使用された投与量についてのベースライン比較となるものである。残念ながら、マウスでの値は過小に見積もられている可能性が極めて高く、内因性プールの倍数として示した実験でのコール酸投与量はおそらく過大な見積もりとなる。

コール酸及びその他の胆汁酸は通常胎児血清中に存在する。胆汁酸には双方向性の胎盤通過が存在するようであるが、決定的なデータは得られていない。

薬物動態学的薬物相互作用試験では、コール酸とコレスチラミン等の胆汁酸吸着剤、CsA 及びフェノバルビタールとの潜在的相互作用が認められ、いずれの物質もコール酸の正常な腸肝循環を阻害した。In vitro で認められたコール酸とベラパミルとの相互作用の臨床使用における重要性は不明である。コール酸と CsA の相互作用については、臨床診療において注意深く監視すべきである。フェノバルビタールは、コール酸の効果を拮抗するので、コール酸との併用は禁忌である。胆汁酸吸着剤の投与は、コール酸の使用意図とは全く逆である。その使用が避けられない場合は、コール酸と同時に使用してはならない。

安全性薬理試験により、心機能及び交感神経系に対するコール酸の影響が示されたが、極めて高濃度を投与した場合のみ認められ、これらの器官系がこのような高濃度に曝露されるのは、極度の胆汁うっ滞又は致死量に近い用量を投与した状況下だけと考えられる。

単回投与毒性試験は非常に限られており、コール酸の LD_{50} 又は致死量に重点が置かれており、その他のデータはほとんどない。げっ歯類及びウサギにおける静脈内投与と、より関連のある経口投与での LD_{50} はいずれも非常に高く、また、十分な反復投与データが得られていることを考慮すると、これは許容できると考えられる。

評価したすべての反復投与毒性試験は、経口投与経路を用いている。これまでに得られた試験はすべてげっ歯類、主にラットを用いて実施されており、短期（1～2 週間）、中期（1 カ月）及び慢性（8～12 カ月）混餌投与試験が含まれている。いずれの試験でも動物数は少なく、系統的な用量範囲試験及び用量検索試験データは得られていない。動物数が少ないこと、並びにこれらの多くの公表論文で毒性徴候や症状について非体系的な報告しか行われていないことは、既存データの明らかな限界となっている。体系的な用量範囲試験データの欠如は、利用可能なデータについての総合的な見解によって部分的に埋め合わせることができる。すなわち、ラットにおける中期投与試験では約 50～1000 mg/kg、慢性投与試験では 25 mg/kg の毒性用量範囲が示されている。イヌ、ブタ又はサル等の非げっ歯類動物におけるトキシコキネティクスデータ又は反復経口投与データは確認できなかった。トキシコキネティクスデータの欠如は、特に、毒性作用におけるデオキシコール酸の潜在的役割及びこれらの試験が混餌投与試験であり、明確な用量が投与されていないということを考えると、明らかな限界である。ヒトに使用した場合のコール酸の一連のデータを考えると、げっ歯類以外の毒性データがないことは許容できると考えられる。反復投与毒性試験データから、コール酸の標的毒性器官は腸肝循環に関連する器官であり、肝障害と下痢が主要な影響であることが示されている。体重減少は一貫して報告されており、上記の影響によるものであると考えられるが、代謝に対する直接的な内分泌作用も想定できる (Houten, et al., 2006)。げっ歯類において高コレステロール含有飼料と併用した場合、コール酸の投与により

肝重量の増加と胆石形成が認められる。この毒性作用の基本的メカニズムについては十分に検討されており、この特定の代謝関連物質の組み合わせに関連しているようである。胆石の形成は、このような食餌によって生じる胆汁コレステロールの過飽和と関連している。ヒト使用においても食物によって生じる胆汁コレステロールとの関連性は除外することはできない。本薬の医薬品リスク管理計画書案には、胆石症を重要な潜在的リスクとして定め、必要な安全性監視の活動及びリスク最小化のための活動を実施する予定である。

コール酸は変異原性及び遺伝毒性を示さないという見解は、これまでの文献から大いに裏付けられている。3 件のエームス試験及び 2 件の 彷徨試験により、コール酸は変異原性陰性であることが示された。しかし、彷徨試験を用いた 1 件の試験では、コール酸は陽性であると報告された。このような試験結果の矛盾は、使用した方法の違いによるものであることが示唆されている。コール酸は、ヒト食道腺癌細胞株において、小核数の有意な増加を誘発しなかった。これらの試験は ICH ガイドライン S2(R1)の遺伝毒性試験の要件を完全には満たしていないが、これ以外にコール酸の遺伝毒性活性についての他の試験の知見はない。

コール酸に関する従来の長期がん原性試験の報告はない。コール酸は消化管発がんのプロモーターとして作用するが、それ自体発がん物質としては作用しないことを示唆する重大な知見がラットでの研究から得られている、というのが現在の文献上での一致した見解である。これは、コール酸の混餌投与又は直腸内注入により多くの発がん物質の発がん作用が促進又は増強されることを示した多数の試験からの結論である。これらの研究のほとんどが、アルキル化剤と胆汁酸の同時暴露に関連していることを考慮すると、観察された影響には交絡が存在すると考えられる。胆汁酸の単独投与では発がん性は認められない。これらの結果は一貫しているが、ヒトとの関連性は完全には明らかではない。しかし、動物及びヒトにおいて消化管発がんにおけるコール酸の主代謝物デオキシコール酸の関与を示唆するいくつかの知見がある（以下参照）。コール酸及びデオキシコール酸の潜在的な長期腫瘍促進効果に注目する一方で、生理的レベルでのそれらの存在は明らかに正常な代謝の必須条件であることを念頭に置いておく必要がある。したがって、実証された臨床的ベネフィットと長期にわたる消化器癌の潜在的発生リスクとを照らして考慮する必要がある。

大多数の動物種では、コール酸の胚毒性又は催奇形性を示す知見は認められなかった。しかし、ハムスターを用いた 1 つの試験では、高用量のコール酸を混餌投与した場合に、母動物と胎児双方で肝臓生理機能の変化が報告された。コール酸の静脈内投与では早産が発生しやすくなる可能性がある。目的とする臨床使用に関連して、内因性分子としての生理的濃度のコール酸は確かに胚毒性を示さないことを理解する必要がある。さらに、正常な（intact）一次胆汁酸合成はヒトの生存に必須であるため、それらの存在は妊娠発生にも不可欠である。

多数の文献により、コール酸の主代謝物デオキシコール酸は、同等の用量範囲でコール酸と極めて類似した毒性作用を示すことが示唆されている。しかし、単回及び反復投与毒性試験において、デオキシコール酸は致死作用、消化管毒性及び肝毒性を示したが、その用量はコール酸が同じ作用を惹起するのに必要な用量の約 2 分の 1 であった。デオキシコール酸が遺伝毒性を有するかどうかについては、細菌を用いた試験から決定的な知見は得られていない。ラットの肝発がん及び大腸発がんモデルにおいて、デオキシコール酸は、コール酸と同様に、前がん病変の発生を増強する。しかし、コール酸を摂取した患者では、消化管内で、健常者よりもデオキシコール酸

の絶対濃度が高くなるというエビデンスはない。したがって、重大な濃度に満たないデオキシコール酸の暴露は、長期間での生物学的に意味のある影響を及ぼさない可能性がある。

提示した非臨床試験で使用された被験物質の品質及び純度を、オファコルカプセル 50 mg 原薬のそれと比較するには十分なデータが得られていない。しかし、これらの被験物質は、オファコルカプセル 50 mg の原薬ほど高純度ではない、又は非常に異なる不純物スペクトルを含むと仮定するのが妥当である。コール酸メチルは、オファコルカプセル 50 mg の不純物であり、安全性確認が必要なレベルで存在する。コール酸メチルに関する文献は限られているが、エームス試験において変異原性は認められず、コール酸と同様の薬力学的特性を有することが示されている。さらに、かなりの数の患者が、規定濃度以上のコール酸メチルを含有する製剤の投与を受けているが、副作用の知見はない。したがって、当該不純物は申請者により安全性が確認されたと考えられる。

申請する適応症の患者では、コール酸の代謝欠損及び肝毒性胆汁酸代謝物の蓄積がみられる。オファコルカプセル 50 mg の連日経口投与は、毒性のない生理的レベルのコール酸、通常の機能的な腸肝循環、脂肪及び脂溶性ビタミンの吸収を回復させ、コール酸代謝物の肝臓での合成を抑制することを目的としている。コール酸は内因性分子であり、生理的レベルでの毒性は予想されない。また、治療用量を超えるコール酸の投与又は胆汁酸代謝物の生合成の不十分な抑制による肝毒性の徴候について、患者を注意深く監視しなければならない。

検討した公表データは、コール酸の非臨床毒性に関する広範なデータセットである。このデータセットは、申請する臨床適応におけるオファコルカプセル 50 mg の非臨床薬理、薬物動態及び安全性についての概括ベネフィット・リスク評価を十分裏付けるものと考えられる。

2.4.6 参照文献

Alberts, A. W. et al., 1980. *Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent,* : Proc Natl Acad Sci U S A 77(7):3957-61.

Araya, z., Sjöberg, H. & Wikvall, K., 1995. *Different effects on the expression of CYP7 and CYP27 in rabbit liver by cholic acid and cholestyramine.,* : Biochem Biophys Res Commun 216(3): 868-73.

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.

Baijal, P. K., Clow, E. P., Fitzpatrick, D. W. & Bird, R. P., 1998. *Tumor-enhancing effects of cholic acid are exerted on the early stages of colon carcinogenesis via induction of aberrant crypt foci with an enhanced growth phenotype.,* : Can J Physiol Pharmacol 76(12): 1095-102.

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.

Bergman, F. & van der Linden, W., 1971. *Reaction of the mongolian gerbil to a cholesterol-cholic acid-containing gallstone inducing diet.,* : Acta Pathol Microbiol Scand [A] 79(5): 476-86.

Bernstein, H. et al., 2005. *Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers.,* : Mutat Res 589(1): 47-65.

Besançon, F., Marche, C. & Parrot, J., 1970. *Experimental lithiasis due to excess cholic acid in mice.,* : Biol Gastroenterol (Paris) 2: 147-60.

Borgström, B. et al., 1986. *Effects of cholic acid, 7 beta-hydroxy- and 12 beta-hydroxy isocholic acid on bile flow, lipid secretion and bile acid synthesis in the rat.,* : Scand J Clin Lab Invest 46(2): 167-75.

Bray, G. A. & Gallagher Jr, T. F., 1969. *Weight gain and intestinal histology of rats fed cholic, lithocholic, hyodeoxycholic, chenodeoxycholic, and deoxycholic acids.,* : Proc Soc Exp Biol Med 130(1): 175-7.

Brendel, C. et al., 2002. *The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity.,* : Mol Endocrinol 16(9): 2065-76.

Brunton, et al., 2005. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,* New York: McGraw-Hill.

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.

Colpaert, C. G. et al., 1992. *Role of endocardial endothelium in the positive inotropic effect of cholic acid in isolated myocardium.,* : J Cardiovasc Pharmacol 20 Suppl 12: S179-82.

Corpet, D. E., Taché, S. & Peiffer, G., 1997. *Colon tumor promotion: is it a selective process? Effects of cholate, phytate, and food restriction in rats on proliferation and apoptosis in normal and aberrant crypts.,* : Cancer Lett 114(1-2): 135-8.

Couch, D. B., Stuart, E. & Heddle, J. A., 1991. *Effect of cholic acid on the colonic sister chromatid exchange frequency induced by 1,2-dimethylhydrazine in C57BL/6 mice.,* : Environ Mol Mutagen 17(1): 1-3.

Coyne, M. J., Bonorris, G. G., Goldstein, L. I. & Schoenfield, L. J., 1976. *Effect of chenodeoxycholic acid and phenobarbital on the rate-limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in patients with gallstones.,* : J Lab Clin Med 87(2): 281-91.

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.

Cruse, J. P., Lewin, M. R. & Clark, C. G., 1981. *The effects of cholic acid and bile salt binding agents on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in the rat.,* : Carcinogenesis 2(5): 439-43.

Delzenne, N. M., Calderon, P. B., Taper, H. S. & Roberfroid, M. B., 1992. *Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies.,* : Toxicol Lett 61(2-3): 291-304.

Eltahir, Z. & Jenkins, G., 2010. *The bile acid impurity methyl cholate (MC) is non-genotoxic, as measured by the micronucleus assay in oesophageal OE33 cells.,* : Mutagenesis 25: 644-5.

Fickert, P. et al., 2001. *Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver.,* : Gastroenterology 121(1): 170-83.

Gambal, D. & Quackenbush, F. W., 1960. *Effects of cholesterol and other substances on essential fatty acid deficiencies.,* : J Nutr 70: 497-501.

Gillert, E., 1926. *Toxicity of bile acids.,* : Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschließlich experimentelle Chirurgie 52(5/6): 779-90.

Gonzales, E. et al., 2009. *Oral cholic acid for hereditary defects of primary bile acid synthesis: a safe and efficective long-term therapy.,* : Gastroenterology 137: 1310-20.

Goodwin, B. et al., 2000. *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis.,* : Mol Cell 6(3): 517-26.

Güldütuna, S. et al., 1993. *Cholic acid and ursodeoxycholic acid therapy in primary biliary cirrhosis. Changes in bile acid patterns and their correlation with liver function.,* : Eur J ClinPharmacol 45(3): 221-5.

Hall, R., Kok, E. & Javitt, N. B., 1988. *Bile acid synthesis: down-regulation by monohydroxy bile acids.,* : Faseb J 2(2): 152-6.

Hardie, L. J., 2008. *The Genotoxicity of Bile Acids.,* : Bile Acids: Toxicology and Bioactivity. G. Jenkins and L. J. Hardie. Cambridge (UK), Royal Society of Chemistry: 72-83.

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

Heubi, J. E., Setchell, K. D. R. & Bove, K. E., 2007. *Inborn errors of bile acid metabolism.,* : Semin Liver Dis 27(3): 282-94.

Houten, S. M., Watanabe, M. & Auwerx, J., 2006. *Endocrine functions of bile acids.,* : Embo J 25(7): 1419-25.

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.

Informatics Inc., 1973. *Scientific Literature Reviews on Generally Recognized as Safe (GRAS) Food Ingredients - Cholic Acid and Derivatives.,* : U. S. F. a. D. Administration. Washington, DC, U.S. Food and Drug Administration: 1-108.

Ishibashi, S. et al., 1996. *Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation,* : J Biol Chem 26;271(30):18017-23.

Jenkins, G. J. S. et al., 2008a. *The bile acid deoxycholic acid has a non-linear dose response for DNA damage and possibly NF-kappaB activation in oesophageal cells, with a mechanism of action involving ROS,* : Mutagenesis 23(5):399-405.

Jenkins, G. S. J. et al., 2007. *Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: The potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus.,* : Carcinogenesis 28(1): 136-42.

Jolly, A. J., Wild, C. P. & Hardie, L. J., 2004. *Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines.,* : Mutagenesis 19(4): 319-24.

Joubert, P., 1978a. *Cholic acid and the heart: in vitro studies of the effect on heart rate and myocardial contractility in the rat.,* : Clin Exp Pharmacol Physiol 5(1): 9-16.

Joubert, P., 1978b. *An in vivo investigation of the negative chronotropic effect of cholic acid in the rat.,* : Clin Exp Pharmacol Physiol 5(1): 1-8.

Kadłubowski, R., Szkudliński, J. & Grzywacz, M., 1984. *Further studies on the properties of bile acids. I. Bile acid-induced changes of the action of drugs acting on the autonomic nervous system on the heart and blood vessels.,* : Acta Physiol Pol 35(5-6): 491-9.

Kim, H. J., Yim, S. & Lee, I., 2004. *A cholesterol biosynthesis inhibitor from Rhizopus oryzae.,* : Arch Pharm Res 27(6): 624-7.

Klaassen, C. D., 1972. *Species differences in the choleretic response to bile salts.,* : J Physiol 224(2): 259-69.

Kwekkeboom, J., Princen, H. M., Voorthuizen, E. M. & Kempen, H. J., 1990. *Bile acids exert negative feedback control on bile acid synthesis in cultured pig hepatocytes by suppression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity.,* : Hepatology 12(5): 1209-15.

Lacassagne, A., Buu-Hoi, N. P. & Hurst, L., 1967. *Comparative study of the liver of rats receiving cholic acid or lithocholic acid, alone or associated with butter yellow.,* : Tumori 53(1): 43-54.

Li-Hawkins, J. et al., 2002. *Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice.,* : J Clin Invest 110(8): 1191-200.

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.

Lu, T. T. et al., 2000. *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors.,* : Mol Cell 6(3): 507-15.

Macdonald, I. A., Singh, G., Mahony, D. E. & Meier, C. E., 1978. *Effect of pH on bile salt degradation by mixed fecal cultures.,* : Steroids 32(2): 245-56.

Magnuson, B. A., Shirtliff, N. & Bird, R. P., 1994. *Resistance of aberrant crypt foci to apoptosis induced by azoxymethane in rats chronically fed cholic acid.,* : Carcinogenesis 15(7): 1459-62.

Martinez-Diez, M. C., Serrano, M. A., Monte, M. A. & Marin, J. J., 2000. *Comparison of the effects of bile acids on cell viability and DNA synthesis by rat hepatocytes in primary culture.,* : Biochim Biophys Acta 1500(2): 153-60.

McSherry, C. K. et al., 1989. *Effects of calcium and bile acid feeding on colon tumors in the rat.,* : Cancer Res 49(21): 6039-43.

Miller, N. E. & Nestel, P. J., 1973. *Altered bile acid metabolism during teratment with phenobarbitone.,* : Clin Sci Mol Med 45(2): 257-62.

Monte, M. J., Marin, J. J. G., Antelo, A. & Vazquez-Tato, J., 2009. *Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology,* : World J Gastroenterol 15(7): 804-16.

Mori, Y. et al., 1991. *Absence of mutagenic action of 5 beta-cholan-24-oic acid derivatives in the bacterial fluctuation and standard Ames tests.,* : Mutat Res 262(4): 267-74.

Murphy, C. et al., 2005. *Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice.,* : Biochim Biophys Acta 1735(3): 167-75.

Murray, K. F. & Kowdley, K. V., 2001. *Neonatal hemochromatosis.,* : Pediatrics 108(4): 960-4.

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.

Pandak, W. M. et al., 1994. *Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase.,* : Hepatology 19(4): 941-7.

Pereira, J. et al., 1995. *In vivo effect of bile salts on platelet aggregation in rats.,* : Thromb Res 80(4): 357-62.

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.

Reddy, B. S., Watanabe, K., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L., 1977. *Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats.,* : Cancer Res 37(9): 3238-42.

Redinger, R. N., Hawkins, J. W. & Grace, D. M., 1984. *The economy of the enterohepatic circulation of bile acids in the baboon. 1. Studies of controlled enterohepatic circulation of bile acids.,* : J Lipid Res 25(5): 428-36.

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.

Reuben, A., 2005. *The biliary cycle of Moritz Schif.,* : Hepatology 42(2): 500-5.

Rosignoli, P. et al., 2008. *Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate,* : Eur J Nutr 47(6):301-9.

Ross, P. E., 2008. *Bile-Acid Physiology and Measurement.,* : Bile Acids: Toxicology and Bioactivity. G. Jenkins and L. J. Hardie. Cambridge (UK), Royal Society of Chemistry: 14-47.

Rothlin, E. & Schalch, W. R., 1944. *Comparative study of some bile acids.,* : Helv. Physiol. Pharmacal. Acta. 2: 249-68.

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.

Scates, D. K., Spigelman, A. D. & Venitt, S., 1995. *Appearance of artefacts when using 32P-postlabelling to investigate DNA adduct formation by bile acids in vitro: lack of evidence for covalent binding.,* : Carcinogenesis 16(7): 1489-91.

Seraj, M. J. et al., 1997. *Effects of dietary bile acids on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in F344 rats.,* : Cancer Lett 115(1): 97-103.

Setchell, K. D. R. & O'Connell, N. C., 2007. *Disorders of bile acid synthesis and metabolism: a metabolic basis for liver disease.,* : Liver disease in children. F. J. Suchy, R. J. Sokol and W. F. Balistreri. Cambridge, Cambridge University Press: 736-66.

Shea, H. C., Head, D. D., Setchell, K. D. R. & Russell, D. W., 2007. *Analysis of HSD3B7 knockout mice reveals that a 3alpha-hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function.,* : Proc Natl Acad Sci U S A 104(28): 11526-33.

Shiota, G. et al., 1999. *Oral administration of cholic acid promotes growth of liver tumors initiated by diethylnitrosamine in rats.,* : Int J Oncol 15(2): 259-65.

Silverman, S. J. & Andrews, A. W., 1977. *Bile acids: co-mutagenic activity in the Salmonella-mammalian-microsome mutagenisity test: brief communication.,* : J Natl Cancer Inst 59(5): 1557-9.

Siviero, I. et al., 2008. *Hepatobiliary effects of cholic and lithocholic acids: experimental study in hamsters.,* : Pediatr Surg Int 24(3): 325-31.

Stieger, B. et al., 1997. *Differential interaction of bile acids from patients with inborn errors of bile acid synthesis with hepatocellular bile acid transporters.,* : Eur J Biochem 244(1): 39-44.

Suzuki, T. et al., 2008. *The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression.,* : J Pharmacol Sci 107(3): 285-94.

Szkudlinski, J., 1984. *Further studies on the properties of bile acids. II. Effect of bile acids on the reactivity of adrenergic and cholinergic receptors in rat intestine.,* : Acta Physiol Pol 35(5-6): 500-8.

Temmerman, A. M. et al., 1989. *Effects of dietary cholesterol in the Mongolian gerbil and the rat: a comparative study,* : Lab Anim 23(1):30-5.

Tepperman, J., Caldwell, F. T. & Tepperman, H. M., 1964. *Induction Of Gallstones In Mice By Feeding A Cholesterol-Cholic Acid Containing Diet.,* : Am J Physiol 206: 628-34.

Thomas, L. A., 2008. *The Role of Bile Acids in Cholesterol-Rich Gallstione Formation.,* : Bile Acids: Toxicology and Bioactivity. G. Jenkins and L. J. Hardie. Cambridge (UK), Royal Society of Chemistry: 141-56.

Tong, J. L. et al., 2008. *Association between fecal bile acids and colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies.,* : Yonsei Med J 49(5): 792-803.

Tsuda, H. et al., 1984. *Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of gamma-glutamyl transpeptidase-positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats.,* : Gann 75(10): 871-5.

Venitt, S., Bosworth, D. & Easton, D. F., 1987. *Lack of mutagenic activity of bile acids in bacterial fluctuation tests.,* : Mutat Res 190(3): 191-6.

Verrett, M. J. et al., 1980. *Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo.,* : Toxicol Appl Pharmacol 56(2): 265-73.

Visek, W. J., Dang, H. C., Kirby, S. R. & Sperling, G. A., 1965. *Growth of rats fed bile salts, urea and chlortetracycline.,* : Proc Soc Exp Biol Med 120(1): 48-51.

Wang, D. Q. et al., 1999. *Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis.,* : Am J Physiol 276(3 Pt 1): G751-60.

Wang, L. et al., 2002. *Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production.,* : Dev Cell 2(6): 721-31.

Watabe, J. & Bernstein, H., 1985. *The mutagenicity of bile acids using a fluctuation test.,* : Mutat Res 158(1-2): 45-51.

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

Wilpart, M., Mainguet, P., Maskens, A. & Roberfroid, M., 1983. *Mutagenicity of 1,2-dimethylhydrazine towards Salmonella typhimurium, co-mutagenic effect of secondary biliary acids.,* : Carcinogenesis 4(1): 45-8.