オファコルカプセル 50 mg
に関する資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

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

株式会社レクメド

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 9
2.6.2.1 まとめ 9
2.6.2.1.1 緒言及び背景 9
2.6.2.1.2 非臨床薬理試験の概要 10
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 14
2.6.2.2.1 効力を裏付ける試験（マウス） 15
2.6.2.2.1.1 投与経路（経口） 15
2.6.2.2.1.1.1 (Shea, et al., 2007): “Analysis of HSD3β7 knockout mice reveals that a 3α- hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function.” 15
2.6.2.2.1.1.2 (Ishibashi, et al., 1996): “Disruption of Cholesterol 7a-Hydorxylase Gene in Mice I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation.” 18
2.6.2.2.1.1.3 (Li-Hawkins, et al., 2002): “Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice.” 20
2.6.2.2.1.1.4 (Murphy, et al., 2005): “Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice.” 22
2.6.2.2.1.1.5 (Wang, et al., 2002): “Redundant Pathways for Negative Feedback Regulation of Bile Acid Production.” 23
2.6.2.2.1.1.6 (Fickert, et al., 2001): “Effects of Ursodeoxycholic and Cholic Acid Feeding on Hepatocellular Transporter Expression in Mouse Liver.” 24
2.6.2.2.1.1.7 (Lu, et al., 2000): “Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptors.” 26
2.6.2.2.2 効力を裏付ける試験（ラット） 27
2.6.2.2.2.1 In vitro 研究 27
2.6.2.2.2.1.1 (Stieger, et al., 1997): “Differential interaction of bile acids from patients with inborn errors of bile acid synthesis with hepatocellular bile acid transporters.” 27
2.6.2.2.2.1.2 (Goodwin, et al., 2000): “A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis:” 28
2.6.2.2.2.2 投与経路（経口） 28
2.6.2.2.2.2.1 (Pandak, et al., 1994): “Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase” 28
2.6.2.2.2.3 投与経路（静脈内） 29
2.6.2.2.2.3.1 (Klaassen, 1972): “Species differences in the choleretic response to bile salts.” 29
2.6.2.2.2.4 投与経路（十二指腸内） 30
2.6.2.2.2.4.1 (Borgström, et al., 1986): “Effects of cholic acid, 7β-hydroxy- and 12β-hydroxy-isocholic acid on bile flow, lipid secretion and bile acid synthesis in the rat.” 30
2.6.2.2.3 効力を裏付ける試験（ウサギ） 31
2.6.2.2.3.1 投与経路（経口） 31

2.6.2.2.3.1.1 (Araya, et al., 1995): “Different effects on the expression of CYP7 and CYP27 in rabbit liver by cholic acid and cholestyramine.” 31
2.6.2.2.3.1.2 (Hall, et al., 1988): “Bile acid synthesis: down-regulation by monohydroxy bile acids.” 32
2.6.2.2.4 効力を裏付ける試験（霊長類） 33
2.6.2.2.4.1 投与経路（十二指腸内） 33
2.6.2.2.4.1.1 (Redinger, et al., 1984): “The economy of the enterohepatic circulation of bile acids in the baboon.2 Regulation of bile acid synthesis by enterohepatic circulation of bile acids.” 33
2.6.2.2.5 効力を裏付ける試験（その他の非げっ歯類哺乳動物） 34
2.6.2.2.5.1 In vitro 34
2.6.2.2.5.1.1 (Kwekkeboom, et al., 1990): “Bile acids exert negative feedback control on bile acid synthesis in cultured pig hepatocytes by suppression of cholesterol 7 alpha- hydroxylase activity.” 34
2.6.2.3 副次的薬理試験 35
2.6.2.4 安全性薬理試験 36
2.6.2.4.1 安全性薬理試験（ラット） 36
2.6.2.4.1.1 ラット心血管系 36
2.6.2.4.1.1.1 (Joubert, 1978a): “Cholic acid and the heart: in vitro studies of the effect on heart rate and myocardial contractility in the rat.” 及び (Joubert, 1978b): “An in vivo investigation of the negative chronotropic effect of cholic acid in the rat.” 36
2.6.2.4.1.1.2 (Kadłubowski, et al., 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.” 38
2.6.2.4.1.2 ラット自律神経系 40
2.6.2.4.1.2.1 (Szkudlinski, 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.” 40
2.6.2.4.1.3 ラットその他の器官系 40
2.6.2.4.1.3.1 (Pereira, et al., 1995): “In vivo effect of bile salts on platelet aggregation in rats.” 40
2.6.2.4.2 安全性薬理試験（その他の非げっ歯類哺乳動物） 42
2.6.2.4.2.1 ネコ心血管系 42
2.6.2.4.2.1.1 (Colpaert , et al., 1992): “Role of endocardial endothelium in the positive inotropic effect of cholic acid in isolated myocardium.” 42
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 44
2.6.2.6 考察及び結論 45
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験 45
2.6.2.6.1.1 胆汁酸生合成のコール酸による制御 45
2.6.2.6.1.2 コール酸の胆汁酸流刺激 46
2.6.2.6.1.3 腸内脂肪吸引の促進因子としてのコール酸 46

2.6.2.6.1.4 一次胆汁酸合成の先天性異常疾患モデル 46
2.6.2.6.2 副次的薬理試験 47
2.6.2.6.3 安全性薬理試験 47
2.6.2.6.4 薬力学的薬物相互作用 48
2.6.2.7 表及び図 49
2.6.2.8 参照文献 50

図表目次

図 2.6.2-1: ヒトの胆汁酸生合成経路 11
図 2.6.2-2: 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 12
図 2.6.2-3: コール酸を摂取した場合としなかった場合の Hsd3b7$^{-/-}$ マウスの生存曲線 15
図 2.6.2-4: 野生型マウス及び Hsd3b7$^{-/-}$ マウスにおける胆汁酸及びステロール代謝 16
図 2.6.2-5: 野生種マウス及び Hsd3b7 ノックアウトマウスにおけるコレステロール及び脂肪酸の de novo 合成速度 16
図 2.6.2-6: 野生種マウス及び Hsd3b7 ノックアウトマウスの肝臓（A）及び（B）から単離した RNA の RT-PCR 分析 18
図 2.6.2-7: 7α-hydroxylase 欠損マウス生存率 19
図 2.6.2-8: 野生型マウス及び 7α-hydroxylase 欠損マウスにおける体重増加 20
図 2.6.2-9: Cyp8b1$^{-/-}$マウス及び野生型マウスにおける胆汁酸のプールサイズと排泄率 21
図 2.6.2-10: コレステロール及び胆汁酸合成の制御におけるコール酸の役割 22
図 2.6.2-11: SHP$^{-/-}$マウス及び野生型マウスにおける胆汁酸恒常性の比較 24
図 2.6.2-12: 胆汁酸摂取により誘導された肝細胞トランスポーター発現における変化 26
図 2.6.2-13: 核内受容体による胆汁酸合成のフィードバック制御を示したモデル 27
図 2.6.2-14: 各用量のコール酸投与後のラット、ウサギ、イヌにおける胆汁流 30
図 2.6.2-15: コール酸の静脈内投与による心拍数への影響 37
図 2.6.2-16: 対照ラットとコール酸の用量 40 mg/kg と同量の等張生理食塩水を投与したラットで各用量のコール酸投与後に生じた溶血の比較（各群 5 例） 38
図 2.6.2-17: 4 日間閉塞性胆汁うっ滞(n:9)及び 4 日間コール酸摂取(n:19)の血小板凝集への影響 41
図 2.6.2-18: 1%コール酸添加飼料を 4 日間与えたラットにおける典型的な血小板凝集曲線 42
図 2.6.2-19: (A)心内膜内皮に損傷のない心筋 (+EE) 及び乾燥空気によって内皮を損傷させた心筋 (-EE) の等尺性単収縮に対するコール酸の累積濃度の影響・(B)10^{-8} M (0.03 µmol/L) のプロプラノロールで前処理した心筋(+prop) 及び未処理の心筋 (-prop) に対するコール酸 3 x 10^{-8} M (0.03 µmol/L) 添加の影響 43

表 2.6.2-1: CA 又は UDCA を摂取したマウスの血清生化学的検査値 25
表 2.6.2-2: CA 又は UDCA を摂取したマウスにおける胆汁の分泌及び組成 25
表 2.6.2-3: 胆汁酸塩摂取後の胆汁中胆汁酸塩の組成 29

表 2.6.2-4: Cholesterol 7α-hydroxylase の比活性、定常状態の mRNA レベル、転写活性に対する胆汁酸摂取の影響 29
表 2.6.2-5: ^{14}C コール酸、7β-ヒドロキシ-イソコール酸及び 12β-ヒドロキシ-イソコール酸の 2 通りの濃度で注入した時のラット胆汁中回収率 31
表 2.6.2-6: ウサギにおける総胆管尿管吻合術後の胆汁酸排泄量 32
表 2.6.2-7: コール酸生合成及び総胆汁酸排泄に対するコール酸投与の作用 32
表 2.6.2-8:自律神経系作用薬がコール酸投与前後に in vivo ラット心拍数に及ぼす作用 38
表 2.6.2-9: 自律神経系作用薬がコール酸投与前後にラット血管に及ぼす作用 40
表 2.6.2-10: 自律神経系作用薬がコール酸投与前後に摘出した腸に及ぼす作用 40

略語一覧

3β-HSD	3β-hydroxy-Δ^5-C_{27}-steroid oxidoreductase
Δ^4-3-oxoR	Δ^4-3-oxosteroid-5β-reductase
A	アドレナリン
ABCD3	ATP-binding cassette D3
ACh	アセチルコリン
ACC1	アセチル CoA カルボキシラーゼ
ACOX2	Acyl CoA Oxidase 2
ADP	アデノシン二リン酸
AKR1D1	ステロイド 5β-レダクターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AMACR	α-メチルアシル CoA ラセマーゼ
AP	アルカリフォスファターゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	アデノシン三リン酸
BA	胆汁酸
BSEP	胆汁酸塩排出ポンプ
CA	コール酸
CDCA	ケノデオキシコール酸
CH	コレステロール
CoA	補酵素 A
CON	対照飼料
CYP27A1	sterol 27-hydroxylase
CYP7A1	cholesterol 7α-hydroxylase
CYP8B1	sterol 12α-hydroxylase
DBP	D-bifunctional protein
DCA	デオキシコール酸
ECG	心電図
EE	心内膜内皮
est	推定
FAB-MS	高速原子衝撃質量分析
FAS	脂肪酸合成酵素
FGF15	線維芽細胞増殖因子 15
FXR	ファルネソイド X 受容体
FXR-α	ファルネソイド X 受容体-α
FXRE	ファルネソイド X 応答配列
GC-MS	ガスクロマトグラフィー質量分析
GLP	医薬品の非臨床試験の実施の基準
HMG	ヒドロキシメチルグルタリル
HMGCoARed	ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A 還元酵素
HNF-4α	肝細胞核内因子-4α
HPLC	高圧液体クロマトグラフィー
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
I	イソプレナリン
i.p.	腹腔内
i.v.	静脈内
LRH	肝臓受容体ホモログ
LRH-1	肝臓受容体ホモログ 1
LRHRE	肝臓受容体ホモログ応答配列
LXR	肝臓 X 受容体
LXR-α	肝臓 X 受容体-α

略語一覧（続き）

LXRE	肝臓 X 受容体応答配列
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
MCA	ムリコール酸
MDR	多剤耐性トランスポーター
MRP	多剤耐性タンパク質
NA	ノルアドレナリン
NAD	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
n.d.	未測定
NTCP	ナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド
OATP	有機アニオントランスポータータンパク質
PL	リン脂質
PPP	乏血小板血漿
PRP	多血小板血漿
RNA	リボ核酸
RT-PCR	リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応
RXR	レチノイド X 受容体
SCD1	ステアロイル CoA デサチュラーゼ-1
SD	標準偏差
S.E.M.	平均値の標準誤差
SHP	短いヘテロダイマーパートナー
SHP-1	短いヘテロダイマーパートナー1
SREBP-2	ステロール応答配列結合タンパク質 2
$T_{½}$	単収縮発生から等尺性弛緩期中間までの時間
T-β-MCA	タウロ-β-ムリコール酸
TCA	タウロコール酸
TT	等尺性単収縮最大張力の合計
TtTT	等尺性単収縮最大張力までの時間
TUDCA	タウロウルソデオキシコール酸
UDCA	ウルソデオキシコール酸

審査官への留意事項

以下の非臨床薬理試験の概要文は、極めて多様な文献情報から得たデータを集約したものである。このため、各情報源では ICH の基準及び GLP に準拠していない。

コール酸を動物に摂取させた研究間でのデータの比較を容易にするため、可能な限りコール酸の用量を 1 日当たりの mg（コール酸）/kg（動物の体重）の推定値に換算した。文献にデータが記載されていない場合、各動物が摂取したコール酸の濃度又は量の推定値を算出する際には、以下の表の仮定を用いた。

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	25～40 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	300～500 g	5 g/100 g 体重
		雌	200～400 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

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

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 緒言及び背景

本申請は、先天性胆汁酸代謝異常症治療剤であるコール酸（Orphacol®）の日本での承認取得を目的としている。いずれの欠損症も極めてまれな遺伝性疾患である。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。

- 3β-hydroxy-Δ^5-C27steroid 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

同欠損症を有する患者にコール酸を経口投与することにより、胆汁酸合成の律速酵素であるCYP7A1 のダウンレギュレーションにより肝毒性のある胆汁酸前駆物質の産生が抑制され、胆汁流を刺激して毒性のある胆汁酸前駆物質及び毒性物質の肝クリアランスが促進される。さらに、コール酸は脂肪及び脂溶性ビタミンの吸収を促進することにより、成長を改善する。

コール酸は医薬品や食品添加物として長年使用されており、臨床安全性プロファイルが確立されている。コール酸などの胆汁酸の薬理作用は分子レベル及び細胞レベルでの理解が深まりつつあり、活発な研究領域でデータが豊富である。しかし、文献に報告されている各データは、正統な医薬品開発プログラムに必ずしも準拠していない。

予定適応症が非常にまれな疾患である点、コール酸などの胆汁酸の生理機能及び臨床安全性プロファイルが十分に確立されている点から、本剤 Orphacol®の非臨床評価は公表されているデータの包括的レビューに全面的に依拠している。

コール酸などの胆汁酸の生合成及び異化の代謝経路は非常に多くの研究によって既に解明されているため、関連する研究から選定したものを参照している。該当するデータのほか、その他の多数の研究を要約した総説論文及び書籍を非臨床試験の概括評価（2.4 項）にて総括している。

参考にした研究はいずれも学術研究であり、GLP の遵守について言及したものはなかった。申請者は、これ以上動物実験又は試験を実施しても対象領域の科学的知見を深める可能性は低く、動物の福祉に基づいて非倫理的であると考える [5]。

[5] Council Directive on Animal Welfare（動物の福祉に関する指令）86/609/EEC 及び Council Decision on the European Convention of the Protection of Vertebrae Animals（脊椎動物の保護の欧州規約に関する指令）

2.6.2.1.2　非臨床薬理試験の概要

コール酸をはじめとする胆汁酸及び胆汁酸塩は、胆汁の天然成分として知られている。コール酸、ケノデオキシコール酸及びデオキシコール酸がヒトの胆汁酸の 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、胆汁酸塩と呼ばれる (Brunton, et al., 2005)。

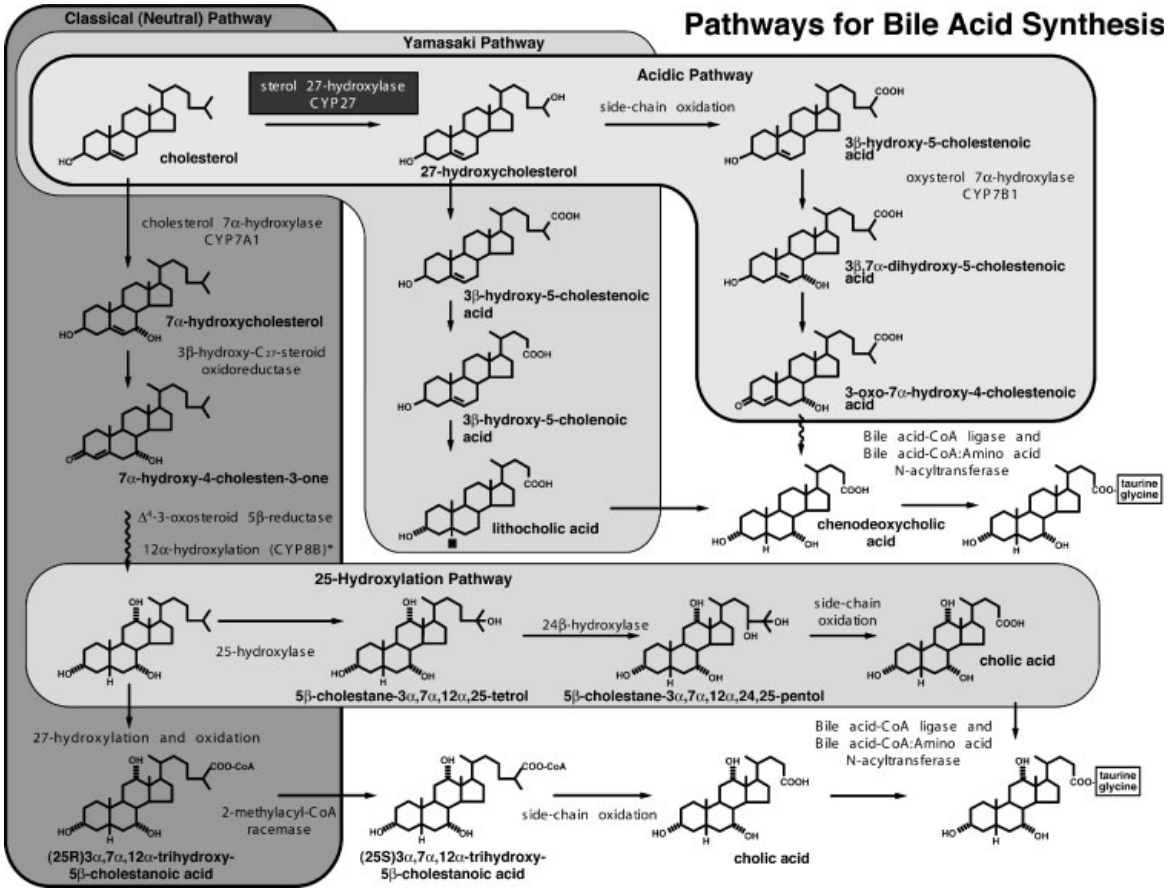
胆汁中に分泌された胆汁酸は脱抱合され、一次胆汁酸の一部は腸内細菌の作用によって二次胆汁酸に変換される。胆汁酸の 90～95%は主に小腸下部で再吸収されて腸肝循環に入り、一部が便中に排泄され、ごく一部が尿中に排泄される。胆汁酸合成の自己制御経路は腸肝循環及び胆汁酸摂取の影響を受ける (Shea, et al., 2007)。

胆汁酸の生理機能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抑制
- 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及び吸収の促進。

ヒトの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、ステロイド骨格と側鎖を修飾する一連の反応によってコレステロールから肝細胞で合成される図 2.6.2-1, (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。通常の条件下でも酵素は相当の基質寛容性（substrate promiscuity）を示す。これは、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損なわれた病的な状態では強化される。現在、一般に、一次胆汁酸合成に至る 2 つの主要経路があることが認識されており、classical pathway 又は neutral pathway 及び acidic pathway と呼ばれている。

図 2.6.2-1: ヒトの胆汁酸生合成経路

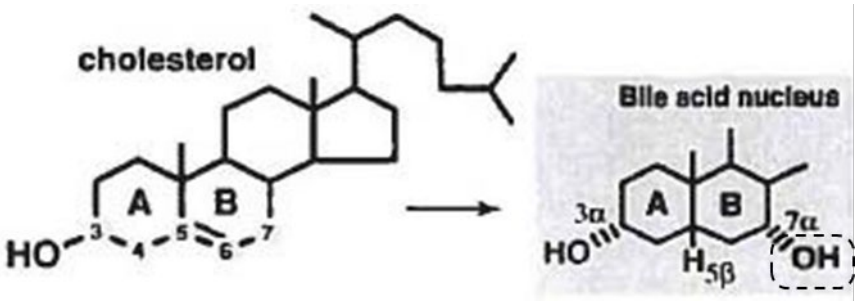


（出典： (Heubi, et al., 2007)一次性胆汁酸の生合成の代謝経路（classical 又は neutral pathway、alternative 又は acidic pathway）。既知の先天性エラーを各経路の箱で囲んで示した。(Reproduced from Bove et al,56 with kind permission from Springer Science and Business Media.)

Classical pathway を介した胆汁酸合成の最初の反応で律速段階は、cholesterol 7α-hydroxcylase 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。胆汁酸の合成は、腸肝の再循環中に門脈を介して戻る胆汁酸による負のフィードバックによって主に制御されている。抑制性のフィードバック回路は非常に複雑で、胆汁酸を介した核のホルモン受容体であるファルネソイド X 受容体 α（FXRα）の活性化から開始される。これにより、short heterodimer partner（SHP）核共受容体の発現が誘導される。

げっ歯類で実証されたように、SHP は、cholesterol 7α-hydroxylase の転写活性化に必須である肝臓 X 受容体 α（LXRα）と肝臓受容体ホモログ-1（LRH-1）の 2 つの核受容体の活性に干渉する (Goodwin, et al., 2000), (Lu, et al., 2000), (Brendel, et al., 2002)。胆汁酸が cholesterol 7α-hydroxylase を調節する能力には、その種類により著しい違いがある。例えば、コール酸とケノデオキシコール酸は合成を抑制方向に制御するが、ウルソデオキシコール酸などの 7β-ヒドロキシ基を持つ胆汁酸は異なる反応を示し、実際にウルソデオキシコール酸は合成速度を高める可能性がある (Lew, et al., 2004), (Setchell & O'Connell, 2007)。

図 2.6.2-2: 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 の合成に続いて、ステロイド骨格への酸化還元及びヒドロキシル化の修飾が行われ、その結果、コール酸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合成される。

- 7α-hydroxycholesterol は 7α-hydroxy 4-cholesten-3-one に変換される。この反応は、ミクロソームのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）依存性の酵素 3β-hydroxy-Δ^5-C27-steroid oxidoreductase（3β-hydroxy-Δ^5-C27-steroid dehydrogenase/isomerase：3β-HSD）によって触媒される。
- 7α-hydroxy 4-cholesten-3-one は、肝ミクロソームのチトクローム P450、12α-hydroxylase によって 7α,12α-dihydroxy-4-cholesten-3-one に変換される。上記反応による 12α-ヒドロキシル化の結果、コール酸経路に向かう（ジヒドロキシ）中間体が合成される。この反応を受けない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 はいずれも可溶性の Δ^4-3-oxosteroid-5β-reductase（Δ^4-3-oxoR 又は 5β-reductase）による還元を受ける。
- その結果として生じた 3-oxo-β(H) sterol 及び 3-hydroxo-5β(H) sterol は、アイソザイムの一群を構成する可溶性の 3α-hydroxysteroid dehydrogenase により変換される。これがステロイド骨格の最終修飾であり、この反応によって中間体、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。
- 次に、胆汁アルコールは一連の側鎖の酸化反応を受け、3 個の炭素原子を失う。これらの反応は、最初にミトコンドリアの酵素、次にペルオキシソームの酵素に触媒され、最終産物としてコール酸及びケノデオキシコール酸を産生する。

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、タウロコール酸、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が生成する。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って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-脱ヒドロキシル化であり、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。

胆汁酸は経口投与すると胆汁分泌を促進するため、利胆作用がある。タウリン及びグリシンと抱合した胆汁酸塩も利胆作用があり、強い両親媒性を有する。胆汁酸塩はリン脂質の作用を得てミセルを形成し、胆汁中のコレステロールなどの脂質を乳化する (Brunton, et al., 2005)。胆汁酸の代謝は肝臓中の過剰なコレステロールの排泄に重要な役割を果たしている。

胆汁酸の分子活性がラット及びマウスでの実験で確認されている。胆汁酸は肝細胞機能の様々な側面に関与する多数の遺伝子の発現に直接作用する。したがって、胆汁酸は肝細胞の核に入ることによってこのような分子活性が生じると考えられる。上記のとおり、胆汁酸はCYP7A1の活性、定常状態のメッセンジャーRNAレベル、転写因子FXRαを介して転写活性のアップレギュレーション及びダウンレギュレーションをもたらす。コール酸による肝細胞の基底外側トランスポーターのダウンレギュレーション及び毛細胆管側トランスポーターのアップレギュレーションは、毒性を有する胆汁酸の肝細胞蓄積を防止するための防御機構である可能性がある (Fickert, et al., 2001)。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

非臨床モデルでのコール酸の効力を裏付ける試験についてレビューした文献には、コール酸の in vitro 研究、並びに経口投与、静脈内投与及び十二指腸内投与による in vivo 研究の報告がある。今回申請する適応症の治療薬としてのコール酸の薬理作用のなかで重要度の高い胆汁酸の生理機能は、コレステロールからの胆汁酸合成及び肝細胞の通過／輸送の調節、胆汁流の誘導、腸内でのミセル形成、脂肪及び脂溶性栄養素の吸収の媒介である。

具体的には、コール酸の効力を裏付ける試験において以下のことが示された。

- 経口投与したコール酸は、CYP7A1 の活性及び発現を阻害することにより (Kwekkeboom, et al., 1990), (Pandak, et al., 1994)、胆汁酸合成の負のフィードバック制御を媒介する (Ishibashi, et al., 1996), (Li-Hawkins, et al., 2002)。
- マウスでは、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上昇した (Ishibashi, et al., 1996)。
- コール酸は胆汁流を刺激し、胆汁酸、リン脂質及びコレステロールの胆汁分泌を増加させた (Klaassen, 1972), (Borgström, et al., 1986), (Fickert, et al., 2001)。
- 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、腸内コレステロール吸収の重要な刺激因子である (Murphy, et al., 2005)。
- 種差はあるが、ラット、ウサギ、イヌにおける胆汁酸の静脈内投与は胆汁流を増加させた (Klaassen, 1972)。同様の調節メカニズムが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)。

マウス及びラットを用いた効力を裏付ける試験で、胆汁酸合成酵素の役割におけるヒトとの類似性が実証されている。3β-HSD 欠損症による先天性一次胆汁酸合成異常の疾患モデルでは、コール酸を飼料に添加したマウスで生存率が増加し、ヒトでもコール酸が同様の効果をもたらした (Shea, et al., 2007)。Stieger et al によると、3β-HSD 欠損症又は Δ^4-3-oxoR 欠損症の患者にみられる胆汁うっ滞における非生理的胆汁酸代謝産物の役割を in vitro モデルで検討した結果、ラットとヒトの胆汁酸輸送系に類似性が認められた (Stieger, et al., 1997)。特に、この研究では異常な胆汁酸の存在下で胆汁酸輸送が妨害されることを示すことによって、3β-HSD 欠損及び Δ^4-3-oxoR 欠損の表現型が機械論的に説明され、胆汁酸の生合成及び代謝の先天性異常を有する患者における胆汁うっ滞が毛細胆管側の ATP 依存性胆汁酸トランスポーター（BSEP）の阻害によるものであることが確認された。

以上のコール酸の効力を裏付ける試験及びその他の試験を以下の項で要約する。

2.6.2.2.1　効力を裏付ける試験（マウス）

2.6.2.2.1.1　投与経路（経口）

2.6.2.2.1.1.1　(Shea, et al., 2007): “Analysis of HSD3β7 knockout mice reveals that a 3α-hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function.”

Shea et al. の目的は、3β-HSD 欠損症のマウスモデルにおいて食餌性コール酸（0.1%又は 0.5%コール酸、1 日 150 又は 750 mg/kg 相当）の薬理作用を評価することであった (Shea, et al., 2007)。

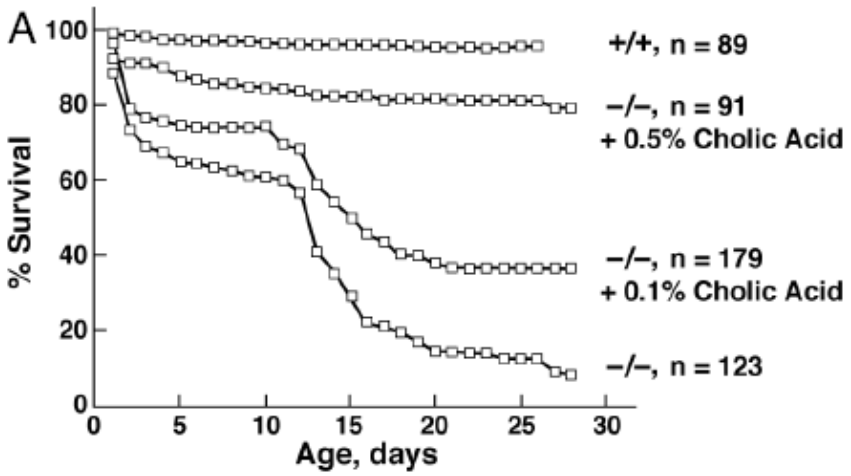
この研究では HSD3β7 をコードする遺伝子（3β-HSD をコードするヒト遺伝子のホモログ）を破壊したマウスを解析した。HSD3β7 の欠損によって正常な胆汁酸の量が減少し、3β-ヒドロキシル化胆汁酸が合成され、腸内コレステロール吸収及び腸肝循環におけるフィードバック制御が抑制された。著者らは、さらに負のフィードバック制御及び栄養吸収における各胆汁酸及びそのヒドロキシル修飾の役割をノックアウトマウスで検討した。

マウス Hsd3b7 遺伝子を遺伝子ターゲッティングにより不活化した。ノックアウトマウスでは 3β-ヒドロキシル化胆汁酸を主とする胆汁酸プールが産生された。新生ホモ接合変異マウスの 90%が死亡し、残存した成体マウスでは食餌性コレステロールの吸収が低下した。これらの変異マウスでは FXR を介する胆汁酸合成の負のフィードバック制御が阻害されていた。

妊娠後期及び出生後 28 日までの妊娠及び哺育マウスの飲水に総合ビタミンサプリメントを添加し、飼料に 0.1%コール酸を添加することによってホモ接合マウスの生存率は約 2 倍となった（図 2.6.2-3）。また、飲水に総合ビタミンサプリメントを添加し、飼料に 0.5%コール酸を添加したとき、変異マウスの生存率は野生型に近づき、この疾患モデルではコール酸がヒトにおける病態と同様の効果を示すことが実証された。

興味深いことに、出生後 28 日までビタミンサプリメント及び胆汁酸の添加を継続した後に通常の固形飼料に切り替えた成体ノックアウトマウスは、対照野生型マウスと同程度の体重に達し、1.5 歳まで血漿中コレステロール濃度が正常で、肝臓組織像も正常であった。

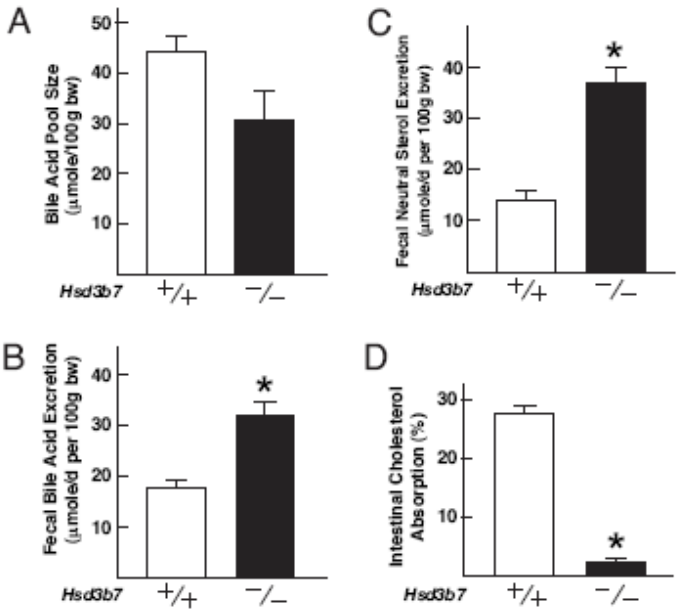
図 2.6.2-3: コール酸を摂取した場合としなかった場合の Hsd3b7$^{-/-}$ マウスの生存曲線



例数（n）は各表現型のマウス 89～179 例であった。雌雄、21 日目に離乳。

図 2.6.2-4 A に示したように、ノックアウトマウスでは胆汁酸プールサイズが減少したが、その減少は統計学的有意に達していなかった。ノックアウトマウスでは糞中の胆汁酸排泄量が有意に増加した（図 2.6.2-4 B）。ノックアウトマウスは中性ステロールの排泄量が野生型マウスの 2.8 倍で（図 2.6.2-4 C）、腸内コレステロール吸収の有意な減少を認めた（図 2.6.2-4 D）。

図 2.6.2-4: 野生型マウス及び Hsd3b7$^{-/-}$ マウスにおける胆汁酸及びステロール代謝



上記の実験はすべて異なる動物を用いて（各遺伝子型 5～6 例）異なる日に少なくとも 2 回繰り返した。*, P < 0.05

図 2.6.2-5: 野生種マウス及び Hsd3b7 ノックアウトマウスにおけるコレステロール及び脂肪酸の de novo 合成速度

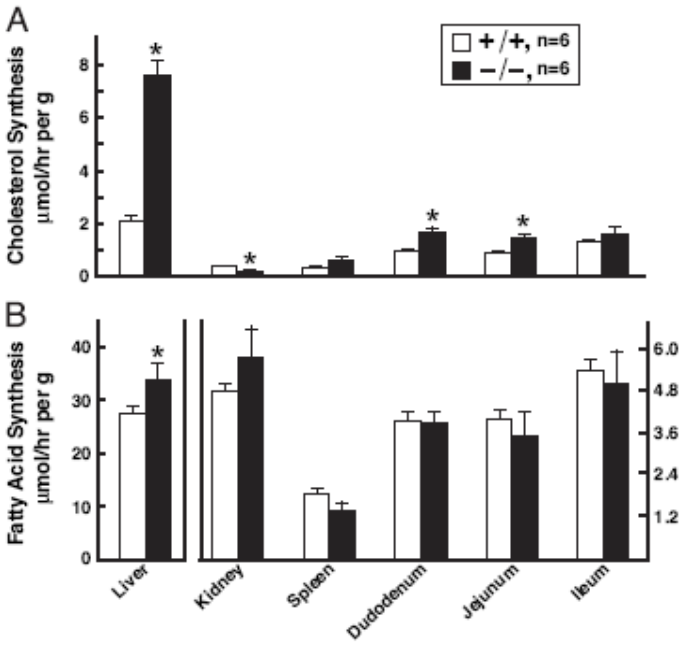


図 2.6.2-5 に示したように、Hsd3b7 の欠損によって肝臓では de novo コレステロール合成が 3.5 倍に増加し、十二指腸及び小腸空腸部ではそれよりも少ないものの有意に増加した。これらの結果とは対照的に、小腸末端部（回腸）ではコレステロール合成速度に変化がなかった。これらのデータから、ノックアウトマウスでは肝臓及び小腸部での de novo コレステロール合成速度が高まり、食餌性コレステロールの損失が補われることが示唆された（図 2.6.2-5 A）。ノックアウトマウスの肝臓では脂肪酸合成速度が約 20%増加し、他の組織では変化がなかった（図 2.6.2-5 B）。

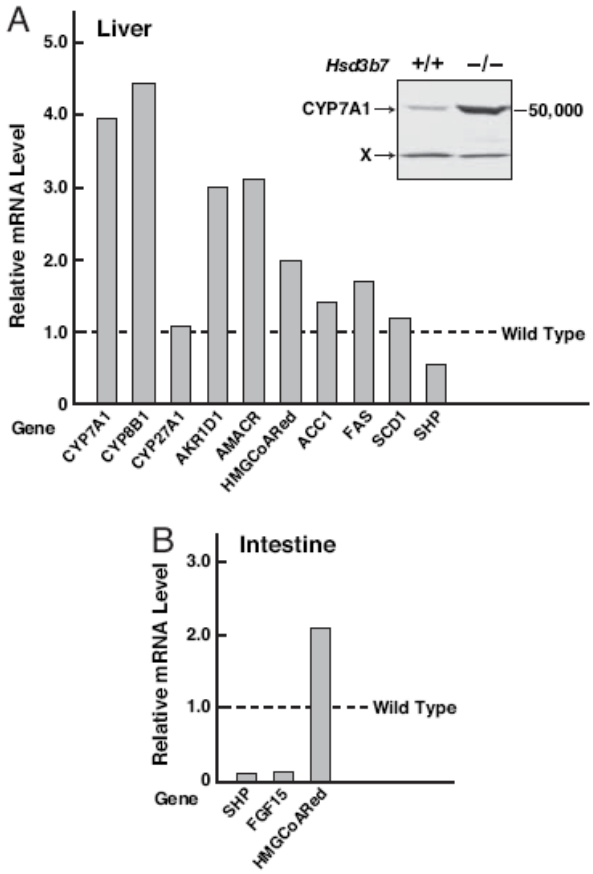
ノックアウトマウスにおける FAB-MS 及び GC-MS 分析の結果、ノックアウトマウスの胆汁では正常な胆汁酸の量が減少し、2 種類の異常な胆汁酸 3β,7α,12α-trihydroxy-5β-cholanoic acid 及び 3β,6α- dihydroxy-5β-cholanoic acid が認められた。

通常、FXR を介して作用する胆汁酸によって抑制される cholesterol 7α-hydroxylase mRNA 及び sterol 12α-hydroxylase の mRNA の量が野生型マウスに比べて 4 倍に増加した（図 2.6.2-6）。意外なことに、通常は恒常的に発現するその他の 2 種類の mRNA、換言すると胆汁酸生合成酵素 Δ4-3-oxoR 及び racemase をコードする mRNA のレベルがノックアウトマウスでは約 3 倍に増加した。通常、FXR 及び胆汁酸によって活性化される SHP の mRNA レベルは、ノックアウトマウスの肝臓では約 1/2 に減少した。

この経路の律速酵素である hydroxymethylglutaryl（HMG）CoA reductase をコードする mRNA のレベルの増加は、図 2.6.2-5 A に示したコレステロール合成速度の増加を反映したものであるのに対し、acetyl-CoA carboxylase 1、fatty acid synthase、stearoyl-CoA desaturase 1 をコードする mRNA の増加は、これらの動物で測定された脂肪酸合成速度の増加を反映したものである。腸内では、胆汁酸プールの組成の変化によって、SHP 及び線維芽細胞増殖因子 15 をコードする 2 つの既知の FXR 標的 mRNA のレベルが低下した（図 2.6.2-6 B）。コレステロール合成速度の増加と並行して HMG CoA reductase の mRNA 量が増加した。

結論として、HSD3β7 によって付与される 3-ヒドロキシル基の α 立体選択性は、ヒトにとって胆汁酸の機能特性及び制御特性の維持に必要であるのと同じようにマウスでも必要なものである。

図 2.6.2-6: 野生種マウス及び Hsd3b7 ノックアウトマウスの肝臓（A）及び（B）から単離した RNA の RT-PCR 分析



野生型マウスの組織の各 mRNA のレベルを 1 とした。CYP8B1 = sterol 12α-hydroxylase、CYP27A1 = sterol 27-hydroxylase、AKR1D1 = steroid 5β-reductase（Δ^4-3-oxoR）、AMACR = α-methylacyl CoA racemase、HMGCoARed = hydroxymethylglutaryl CoA reductase、ACC1= acetyl-CoA carboxylase 1、FAS = fatty acid synthase、SCD1 = stearoyl CoA desaturase 1、FGF15 = 線維芽細胞増殖因子 15。挿入図は、Hsd3b7 遺伝子型を有するマウスから単離し、CYP7A1 タンパク質に対する抗血清を用いて探索した肝細胞膜タンパク質のイムノブロット（x = 交差反応性タンパク質）。

2.6.2.2.1.1.2　(Ishibashi, et al., 1996): “Disruption of Cholesterol 7a-Hydorxylase Gene in Mice I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation.”

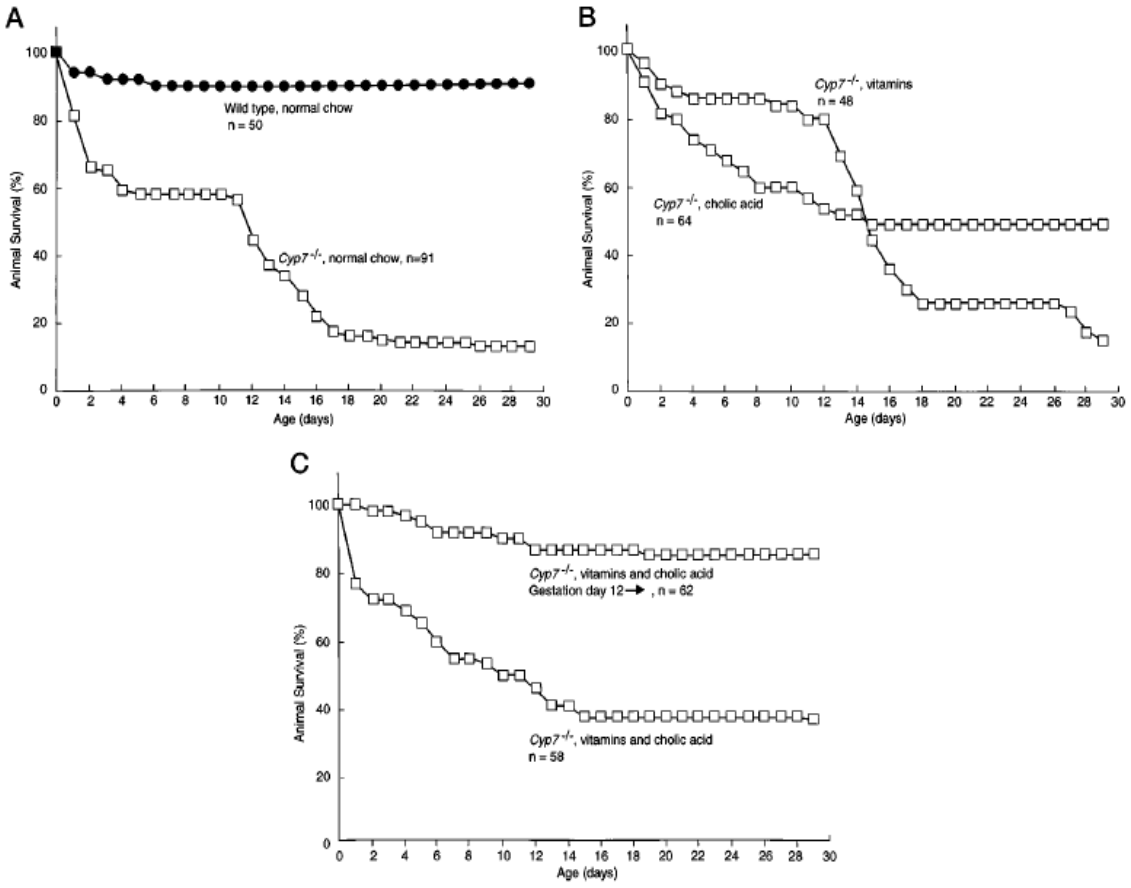
この研究の目的は、Cyp7 遺伝子の標的破壊及び食餌性コール酸添加（1%コール酸又は 1 日 1500 mg/kg）によって、マウスの生後発達における cholesterol 7α-hydroxylase の生理学的役割を調べることであった。

Cyp7 変異によって遺伝子のエクソン 3～5 が欠失し、免疫反応性も酵素活性もないタンパク質をコードするヌル対立遺伝子が発生した。

以下の図 2.6.2-7 に示すように、各遺伝子型のマウスを交配させ、仔の生存率を求めた。その結果を生後生存日数当たりの仔の生存率としてプロットした。図 2.6.2-7 A では、野生型（•）又は Cyp7$^{-/-}$（□）哺育母動物に通常の固形飼料を与えた。図 2.6.2-7 B では、Cyp7$^{-/-}$母動物にビタミン又は 1%（w/w）コール酸を添加した固形飼料を与えた。図 2.6.2-7 C では、Cyp7$^{-/-}$母動物に

ビタミン及び 1%コール酸を添加した固形飼料を出生時（1 日目）又は妊娠 12 日目から継続して与えた。

図 2.6.2-7: 7α-hydroxylase 欠損マウス生存率



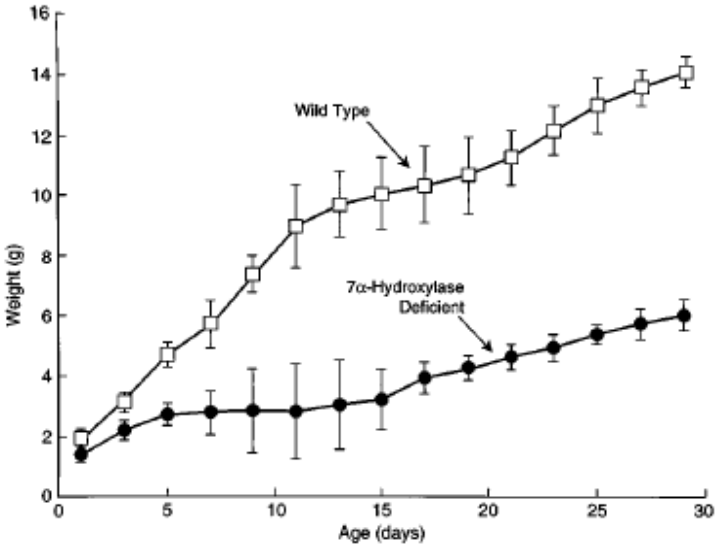
ホモ接合体マウスの分析で、マウスの正常な生後発達における cholesterol 7α-hydroxylase 及び胆汁酸生合成の重要な役割が明らかになった。遺伝子が破壊されたヘテロ接合体（$Cyp7^{+/-}$）は表現型的に正常であった。ホモ接合体（$Cyp7^{-/-}$は出生時には正常に見えたが、生後 18 日以内に死亡した。約 40%が生後 1～4 日目に、45%が生後 11～18 日目に死亡した。哺育母動物の飲水へのビタミンの添加は早期の死亡を防いだが、固形飼料へのコール酸の添加は早期以降の死亡を防いだ。

死亡に先行して体重増加の異常な鈍化、脂肪便、過角化、被毛の異常な外観、行動異常が認められた。いずれの症状も脂肪吸収不良（消耗及び脂肪便）及び脂溶性ビタミン吸収不良（皮膚、被毛、視覚の異常）の代表的な症状であり、$Cyp7^{-/-}$マウスでこのような症状が生じたことから、小胞体で 7α-hydroxylase によって惹起される胆汁酸経路が新生仔の栄養恒常性に極めて重要であることが示唆された。

野生型又は $Cyp7^{-/-}$欠損成体の交配によって生まれた新生仔の体重を生後 1 日目から 29 日目まで 1 日 1 回測定した。3 腹から生まれた野生型仔 22 例及び 7 腹から生まれた $Cyp7^{-/-}$仔 41 例の体重を測定した。非添加固形飼料を与えた母動物から生まれた $Cyp7^{-/-}$仔は通常の速度で体重が増

加せず（図 2.6.2-8）、油性被毛、過角化、視覚異常が認められた。いずれの症状も生後 3 週時には減少し、症状の消失に伴って生存率が著しく上昇した。

図 2.6.2-8: 野生型マウス及び 7α-hydroxylase 欠損マウスにおける体重増加



2.6.2.2.1.1.3　(Li-Hawkins, et al., 2002): “Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice.”

この研究の目的は、マウスにおいて sterol 12α- hydroxylase 遺伝子（Cyp8b1）を標的破壊し、コール酸合成能を欠損させた場合の影響を検討することであった。

Cyp8b1 の破壊によってコール酸及びその代謝産物の合成が阻害された。Cyp8b1$^{-/-}$マウスでは CYP7A1 のフィードバック制御が失われ、胆汁酸プールの増大及びコレステロール代謝の変化が生じた。このマウスでは他の FXR 標的遺伝子の発現に変化はなかった。この研究では、コール酸（0.1%又は 0.25%、1 日 150 又は 375 mg/kg 相当）によって in vivo 及び in vitro での CYP7A1 制御が回復した。この研究の結果から、コール酸がマウスにおける胆汁酸生合成の負のフィードバック制御の in vivo メディエーターであることが示され、核内受容体によるリガンド特異的遺伝子活性化の予備的な根拠が提示されている。

Cyp8b1$^{-/-}$マウスでは、胆汁酸プールの増大に伴い胆汁酸の種類の変化が認められた。Cyp8b1$^{-/-}$マウスでは胆汁酸合成速度が高まることから、ノックアウトマウスではこの経路の産生量が増加することが示唆された。

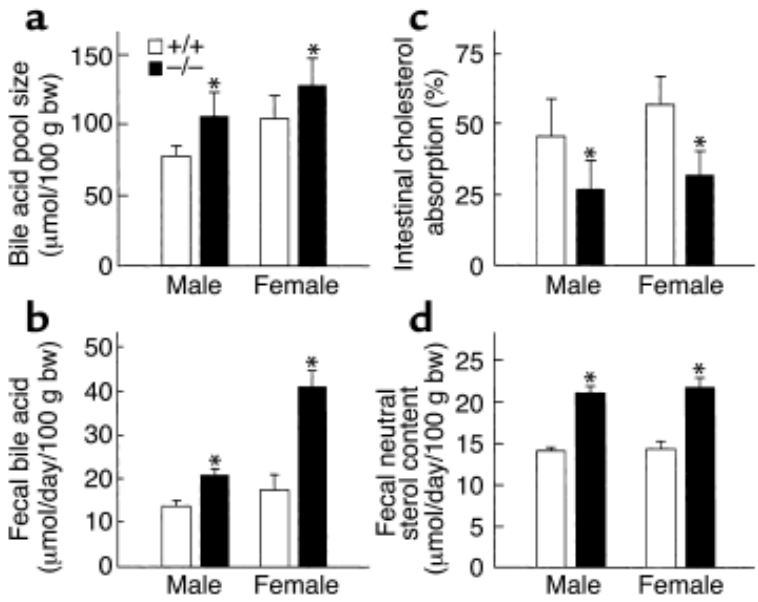
図 2.6.2-9 C に示したように、Cyp8b1$^{-/-}$マウスでは胆汁酸プールが増大したもののコレステロール吸収が野生型マウスよりも低下していた。Cyp8b1$^{-/-}$マウスでの食餌性コレステロールの吸収低下に伴い、肝臓でのコレステロール合成が著しく増加していた。肝臓でのステロール de novo 合成速度は雄ノックアウトマウスで 2.3 ± 0.4 μmol/g 組織/h であったのに対し、野生型マウスで 1.0 ± 0.2 μmol/g 組織/h であった。

Cyp8b1$^{-/-}$マウスにおける胆汁酸プールサイズ及び排泄の増加は CYP7A1 経路の産生量増加を示唆していた。CYP7A1 mRNA レベル及びタンパク質レベルは Cyp8b1$^{-/-}$マウスで顕著に増加した

が、増加量は sterol 27-hydroxylase 欠損（Cyp27a1$^{-/-}$）マウスで認められた増加量に近かった。Cyp8b1$^{-/-}$マウスでは CYP7A1 酵素活性のレベルも増加したが、mRNA レベルやタンパク質レベルの増加ほど顕著ではなかった。遺伝子のヌル変異を有するマウス（Cyp7a1$^{-/-}$マウス）では CYP7A1 mRNA 及びタンパク質は検出されず、コントロール mRNA（シクロフィリン）及びミクロソームタンパク質（免疫グロブリン重鎖結合タンパク質、BIP）のレベルの変化は認められなかった。

この研究のデータは、胆汁酸合成経路の制御における CYP8B1 の重要な役割を明確にし、この酵素の発現が負のフィードバック制御を受ける理由を示している。胆汁酸による CYP8B1 発現の抑制によって 3 つの重要な目的、具体的には（1）フィードバック制御のために FXR が必要とするリガンドの合成を著しく低減すること、（2）腸肝循環のサイクルごとにコール酸のレベルが徐々に低下するにつれて、系が徐々に正常に戻り、正常な状態が再び確立される速度が系におけるコール酸の半減期の関数となる態勢を整えること、（3）胆汁酸の半減期は主に肝臓ではなく腸の因子に依存しているため、腸肝系の片方の臓器で生じた制御イベントをもう片方の臓器で調節することを可能とすることを実現している。

図 2.6.2-9: Cyp8b1$^{-/-}$マウス及び野生型マウスにおける胆汁酸のプールサイズと排泄率



Cyp8b1$^{-/-}$マウスでの測定値（平均値±標準誤差）には正常対照と有意差があった（雄 P = 0.0037、雌 P = 0.04、両側 Student t 検定）。図 2.6.2-9 B では、糞中胆汁酸排泄率を明らかにした。Cyp8b1$^{-/-}$マウスでの排泄量は野生型マウスに比べて有意に高値であった（雄 P = 0.003、雌 P = 0.0002）。図 2.6.2-9 C では、各遺伝子型の雌雄マウス（各群 6 例）に強制投与した放射能標識化コレステロール及び非吸収性の回収標準物質（シトスタノール）のデータを示している。72 時間の間に動物から排泄された糞からステロールを抽出し、コレステロールの吸収率を求めた。Cyp8b1$^{-/-}$マウスで測定された吸収率は野生型マウスと比較して有意に低値であった（雄 P = 0.02、雌 P = 0.0007）。図 2.6.2-9 D では、ガスクロマトグラフィーで定量した糞中の中性ステロール（コレステロール、コプロスタノール、コレスタノン）の量を示している。Cyp8b1$^{-/-}$マウスでは、吸収低下(図 2.6.2-9 C）によってステロール排泄率が有意に上昇した（雌雄とも P < 0.0003）。

2.6.2.2.1.1.4　(Murphy, et al., 2005): “Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice.”

この研究の目的は、コール酸摂取がマウスの肝コレステロール代謝に及ぼす影響を評価することであった。コール酸を産生しないマウスモデル、CYP8B1 ノックアウトを用いて、コール酸を代謝に再投入し、腸内コレステロール吸収、肝コレステロール de novo 合成、血漿脂質、肝臓でのコレステロール沈着パターンへの影響を観察した。

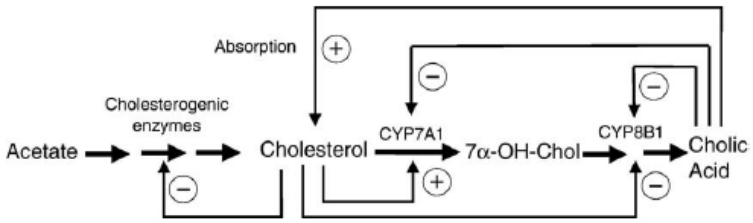
この研究では、雄 sterol 12α-hydroxylase（CYP8B1）ノックアウトマウス及び野生型マウスに対照飼料、対照飼料に 0.1%又は 0.5%コール酸（1 日 150 又は 750 mg/kg 相当）を添加した飼料、対照飼料に 1%コレステロールを添加した飼料のいずれかを 6～7 日間与えた。対照飼料の摂取期間中、ノックアウトマウスでのコレステロール合成が野生型マウスに比べて増加した。コレステロール及びコール酸の摂取はいずれもコレステロール生合成遺伝子の mRNA 発現及び肝コレステロールの de novo 合成をダウンレギュレートした。また、これに付随して核内因子 SREBP-2 前駆体タンパク質の減少及び肝臓の遊離コレステロールレベルの増加も認められた。

CYP8B1 遺伝子を欠損していないマウス（$CYP8B1^{+/+}$マウス及び C57Bl/6 マウス）の肝臓では、$CYP8B1^{-/-}$マウス（8 倍）に比べて高濃度（それぞれ 24 倍及び 25 倍）のコレステロールエステルが蓄積していた。コール酸の摂取は腸内コレステロール吸収を $CYP8B1^{+/+}$マウスで 23%、$CYP8B1^{-/-}$マウスで 50%増加させた。血漿コレステロールは $CYP8B1^{+/+}$マウスと$^{-/-}$マウスで差がなかったが、コントロール条件下でコレステロールを摂取した $CYP8B1^{-/-}$マウスでは減少を認め、コール酸を摂取した野生型マウスでは減少を認めなかった。

図 2.6.2-10 に示すように、コール酸はコレステロール吸収を刺激すると同時に、コレステロール合成及び CYP7A1 を介するコレステロールから胆汁酸への変換を減少させる。コレステロールにもコール酸にも CYP8B1 に対する抑制作用があるため、コール酸の生成量が減少し、その結果としてコレステロールの吸収が低下する。これらの変化は、肝臓でのコレステロールの蓄積を相殺すると考えられる。しかし、コール酸そのものが CYP7A1 に対する抑制作用を有するため、これが上記の変化を相殺する可能性がある（図 2.6.2-10）。

以上の結果から、CYP8B1 の抑制が肝脂質代謝に変化をもたらすことが示された。この研究では、コール酸が腸内コレステロール吸収の重要な決定因子であり、肝臓での転写因子 SREBP-2 のレベルが、コール酸が腸内コレステロール吸収及び CYP7A1 に及ぼす複合的な作用に依存していることが示された。

図 2.6.2-10: コレステロール及び胆汁酸合成の制御におけるコール酸の役割



2.6.2.2.1.1.5　(Wang, et al., 2002): “Redundant Pathways for Negative Feedback Regulation of Bile Acid Production.”

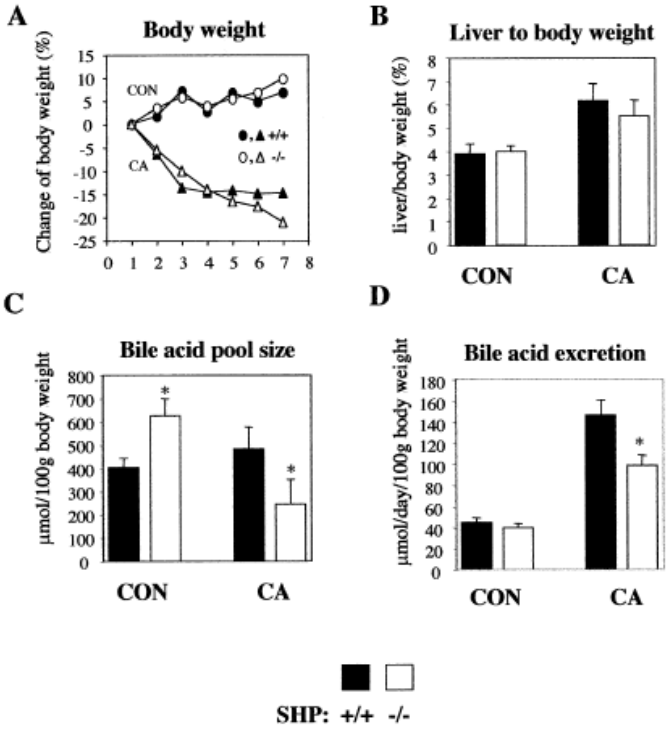
この研究の目的は、in vivo での CYP7A 産生を抑制するオーファン核内受容体 SHP に依存する核内受容体カスケード及びコレステロール恒常性のこの部分を制御する他の経路に関して、マウスにおける胆汁酸産生の負のフィードバック制御を検討することであった。野生型マウス及び SHP$^{-/-}$マウス（推定体重 20～40 g）に 1%コール酸（1 日 1500 mg/kg 相当）を 7 日間摂取させた。

野生型マウス及び SHP$^{-/-}$マウスにおける胆汁酸及びコレステロール恒常性の異常を探索するため、各種パラメータを評価した。図 2.6.2-11 A に示すように、対照飼料を与えた場合には野生型マウス及び SHP$^{-/-}$マウスの体重増加及び成長が正常であった。しかし、コール酸添加飼料の開始から 2 日間で、野生型マウスでも SHP$^{-/-}$マウスでも劇的な体重減少が認められた。その後、野生型マウスはコール酸添加飼料に良好な忍容性を示し、それ以上の体重減少を認めなかったが、SHP$^{-/-}$マウスでは持続的な体重減少を認めた。肝臓重量の体重比は、対照飼料を与えた野生型マウスと SHP$^{-/-}$マウスでは同程度であったが、コール酸添加飼料を与えるといずれも同じように増加した（図 2.6.2-11 B）。

対照飼料を与えた SHP$^{-/-}$マウスの血清総胆汁酸濃度は野生型マウスの約 2.3 倍であった。しかし、1%コール酸添加飼料を与えたときには、野生型マウスの血清胆汁酸濃度が SHP$^{-/-}$マウスよりもはるかに顕著に増加し、野生型マウスの血清中胆汁酸濃度が SHP$^{-/-}$マウスの 2.7 倍となった。対照飼料を与えた SHP$^{-/-}$マウスの胆汁酸プールサイズは野生型マウスの 1.6 倍に増加したが、コール酸添加飼料では野生型マウスの 1/2 に減少した（図 2.6.2-11 C）。対照飼料を与えたときの胆汁酸排泄量には各遺伝子型のマウスで有意差はなかった。コール酸添加飼料を与えた野生型マウスでは胆汁酸排泄量が顕著に増加した。胆汁酸プールサイズの変化と同様に、SHP$^{-/-}$マウスでは胆汁酸排泄量にそれほど顕著な増加は認められず、野生型マウスに比べて有意に低値であった（図 2.6.2-11 D）。以上の結果から、SHP が消失すると胆汁酸ホメオスタシスの異常をもたらすことが示された。

以上の結果から、胆汁酸代謝における SHP の役割が確認され、コレステロール恒常性におけるこの重要部分を制御する重複経路の存在が示された。

図 2.6.2-11: SHP$^{-/-}$マウス及び野生型マウスにおける胆汁酸恒常性の比較



対照飼料（CON）、1%コール酸添加飼料（CA）
A:対照飼料又は CA 添加飼料を与えたときの野生型マウス及び SHP-/-マウスの体重変化。
B:対照飼料又は CA 添加飼料を与えたときの野生型マウス及び SHP-/-マウスの肝臓重量の体重比。
C:対照飼料又は CA 添加飼料を与えたときの野生型マウス及び SHP-/-マウスの胆汁酸プールサイズ。
D:対照飼料又は CA 添加飼料を与えたときの野生型マウス及び SHP-/-マウスの胆汁酸排泄量。

2.6.2.2.1.1.6　(Fickert, et al., 2001): “Effects of Ursodeoxycholic and Cholic Acid Feeding on Hepatocellular Transporter Expression in Mouse Liver.”

この研究の目的は、マウス肝臓における胆汁酸の肝細胞トランスポーター［NTCP、BSEP、有機アニオン（OATP1、MRP2）、有機カチオン（MDR1a/b）、リン脂質（MDR2）］の発現に対するコール酸及びウルソデオキシコール酸の作用を調べることであった。雄 Swiss Albino マウス（Him OF1 SPF 系統、体重 25～30 g）に 0.5%コール酸、1% コール酸、0.5%ウルソデオキシコール酸又は 1%ウルソデオキシコール酸（1 日 750 又は 1500 mg/kg、コール酸プールの 11 又は 22 倍相当）を 7 日間与えた。コール酸又はウルソデオキシコール酸を与えたマウスの胆汁の流れ及び組成を分析した。

表 2.6.2-1 に示すように、コール酸の摂取によって AST 値、ALT 値及び AP 値が用量依存的かつ有意に増加した。コール酸及びウルソデオキシコール酸を摂取したマウスで血清総胆汁酸濃度が有意に上昇した。

表 2.6.2-1: CA 又は UDCA を摂取したマウスの血清生化学的検査値

実験群	AST（U/L）	ALT（U/L）	AP（U/L）	BA（μmol/L）
対照	203 ± 53	32 ± 7	43 ± 15	4 ± 0.8
CA 0.5%	268 ± 83	287 ± 87a	387 ± 2a	n.d.
CA 1%	360 ± 168a	313 ± 9a	402 ± 61a	58 ± 32a
UDCA 0.5%	180 ± 40	40 ± 10	120 ± 64	n.d.
UDCA 1%	200 ± 30	45 ± 15	140 ± 47a	91 ± 35a

注：数値は平均値 ± SD
AST：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT：アラニンアミノトランスフェラーゼ、AP：アルカリフォスファターゼ、BA：胆汁酸、n.d.：未測定
a P < 0.05、対照（標準飼料を与えたマウス）との比較。

コール酸（224%に増加）及びウルソデオキシコール酸（180%に増加）はいずれも胆汁流を有意に刺激した（表 2.6.2-2）。コール酸による胆汁酸排泄量の増加量（対照の 480%、P < 0.01）の方がウルソデオキシコール酸（260%、P < 0.05）より高値であった。ウルソデオキシコール酸及びコール酸の摂取によって、摂取した胆汁酸と内因性胆汁酸の置換が生じ、その量は胆汁中の胆汁酸の 95%超に相当し、胆汁酸プール組成の変化も示された。コール酸はリン脂質及びコレステロールの胆汁排泄量を有意に増加させた。

表 2.6.2-2: CA 又は UDCA を摂取したマウスにおける胆汁の分泌及び組成

飼料	胆汁流	胆汁分泌量（肝臓 1 g 当たり nmol/min）				胆汁酸の組成
	(肝臓 1 g 当たり μL/min)	胆汁酸	リン脂質	コレステロール	グルタチオン	（主要胆汁酸、%）
対照	2.5 ± 1	112 ± 59	17 ± 1	1.67 ± 0.3	7 ± 1.4	TCA 45%, T-β-MCA 30%
UDCA 1%	4.5 ± 0.8a	296 ± 90a	26 ± 21	3.15 ± 1.6	22.9 ± 2.3c	TUDCA 97%, T-β-MCA 2%
CA 1%	5.6 ± 1.2b	539 ± 196b	53 ± 14a	19.4 ± 4.3c	16.8 ± 2.1c	TCA 98%, T-β-MCA 2%

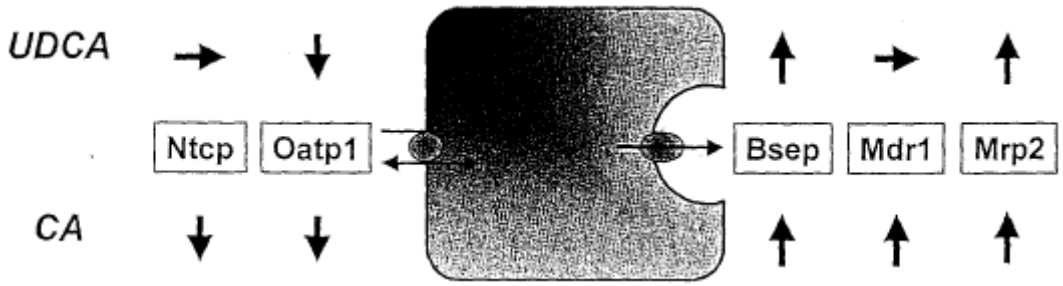
注：ウルソデオキシコール酸及びコール酸を摂取したマウス、並びに標準固形飼料を与えた対照マウス（各群 5 例）から 1 時間かけて胆汁を採取し、胆汁酸、リン脂質、コレステロール及びグルタチオンの含有量を分析した。胆汁中の胆汁酸組成を高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）で評価した。数値は平均値 ± SD。
TUDCA：タウロウルソデオキシコール酸、TCA：タウロコール酸、T-β-MCA：タウロ-β-ムリコール酸。
a:P < 0.05、b:P < 0.01、c:P < 0.001、対照（標準固形飼料）との比較。

コール酸は基底外側のナトリウム・タウロコール酸共トランスポーターNtcp 及び有機アニオントランスポーターOATP1 をダウンレギュレートし、毛細胆管側の胆汁酸塩排出ポンプ BSEP、有機アニオントランスポーターMRP2（抱合体排出ポンプ）、有機カチオントランスポーターMDR1a/b（多剤耐性トランスポーター、ABCB1 又は P-糖タンパク質）をアップレギュレートした。コール酸及びウルソデオキシコール酸は、リン脂質トランスポーターMDR2 の発現には影響しなかった（図 2.6.2-12）。コール酸及びウルソデオキシコール酸はいずれも胆汁中への胆汁酸及びグルタチオンの排泄を刺激したが、リン脂質及びコレステロールの排泄を増加させたのはコール酸のみであった。観察された変化から、観察された胆汁流の増加の分子基盤が示されている。

コール酸による基底外側トランスポーターのダウンレギュレーション及び毛細胆管側トランスポーターのアップレギュレーションは、胆汁酸の肝細胞蓄積を防止するための防御機構である可能性がある 。この研究によって、胆汁うっ滞時のトランスポーター発現の維持又はアップレ

ギュレーションによって胆汁うっ滞性肝損傷を改善する効果を期待できるという結論が得られた。

図 2.6.2-12: 胆汁酸摂取により誘導された肝細胞トランスポーター発現における変化



コール酸の摂取によって基底外側の NTCP 及び OATP1 のダウンレギュレーション及び毛細胆管側の BSEP、MDR1、MRP2 のアップレギュレーションが生じた。これに対し、ウルソデオキシコール酸の摂取によって NTCP のアップレギュレーション、OATP1 のダウンレギュレーションが生じ、BSEP 及び MRP2 がアップレギュレートされた。ウルソデオキシコール酸及びコール酸はいずれも MDR2 の発現に影響しなかった（データ記載なし）。

2.6.2.2.1.1.7　(Lu, et al., 2000): “Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptors.”

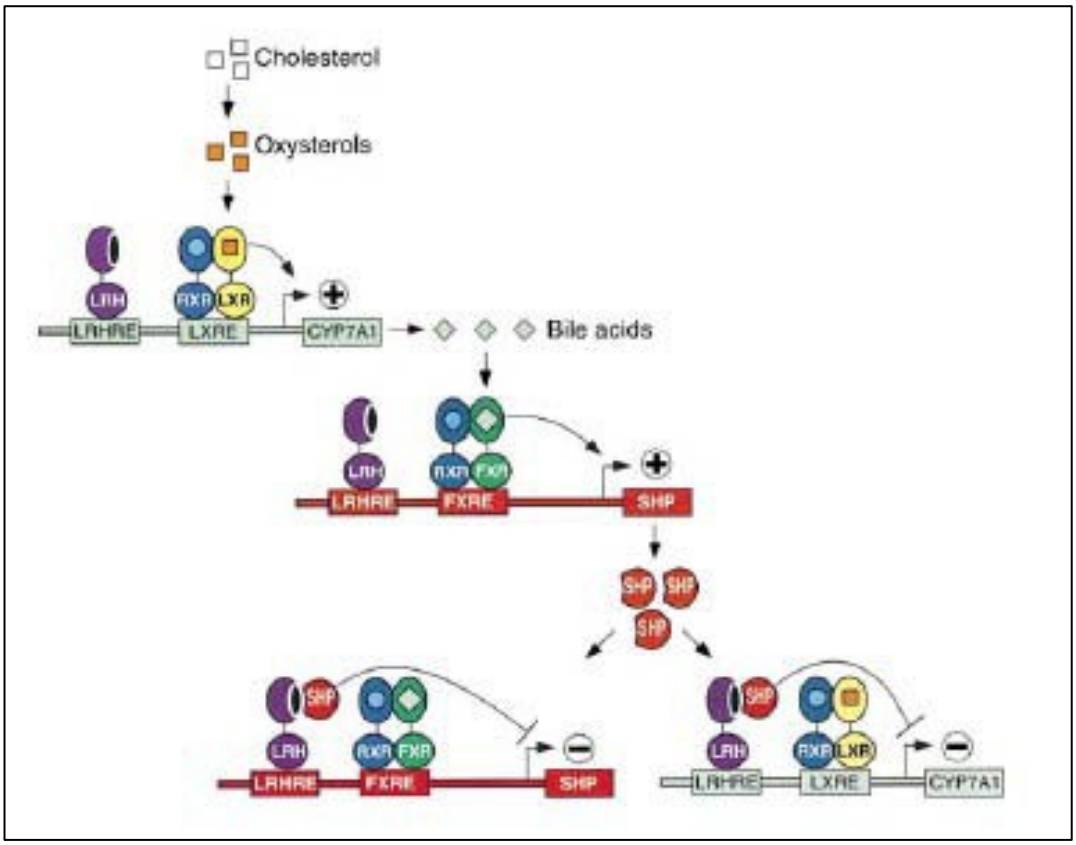
この研究の目的は、0.1%又は 0.25%コール酸（1 日 150 又は 375 mg/kg 相当）を 10 日間与えた雄の野生型マウス又は Cyp7a1$^{-/-}$マウス（25～40 g）における胆汁酸生合成のフィードバック制御を評価することであった。

研究の結果、少なくとも 5 つの核内受容体が関与する自己調節カスケードが胆汁酸代謝を調節し、核内受容体がコレステロール恒常性の重要な主要調節因子であることが示された。

図 2.6.2-13 に、胆汁酸が自身の合成を効率的にダウンレギュレートする経路を要約した。最初に、コレステロールの増加によってオキシステロールが生成し、これが LXRα と結合して CYP7A1 転写を活性化する。CYP7A1 のアップレギュレーションによって胆汁酸合成が促進され、その結果としてコレステロールの排泄が増加する。胆汁酸レベルが上昇すると、FXR が活性化され、その結果として SHP の転写が誘導される。SHP タンパク質のレベルが上昇すると、SHP が LRH-1 と抑制性のヘテロダイマーを形成し、CYP7A1 プロモーター及び SHP プロモーターがいずれも抑制される。

この文献に記載されていた実験で、in vivo での SHP 発現における胆汁酸依存性が示され、一次胆汁酸合成のフィードバック抑制のメディエーターとしての SHP の役割が強く裏付けられた。

図 2.6.2-13: 核内受容体による胆汁酸合成のフィードバック制御を示したモデル



LRHRE：LHR-1 応答配列、LXRE：LXR 応答配列、LRH：肝臓受容体ホモログ、RXR：レチノイド X 受容体、LXR：肝臓 X 受容体、FXR：ファルネソイド X 受容体、FXRE：FXR 応答配列、SHP：短いヘテロダイマーパートナー、CYP7A1：cholesterol 7α-hydroxylase

2.6.2.2.2　効力を裏付ける試験（ラット）

2.6.2.2.2.1　In vitro 研究

2.6.2.2.2.1.1　(Stieger, et al., 1997): “Differential interaction of bile acids from patients with inborn errors of bile acid synthesis with hepatocellular bile acid transporters.”

この研究では、3β-HSD 欠損及び Δ^4-3-oxoR 欠損を有するラットで産生された異常胆汁酸の存在下での in vitro での胆汁酸輸送が検討された。研究の目的は、機能性 3β-hydroxy-Δ^5-C_{27}-steriod dehydrogenase/isomerase 又は 3-oxo-Δ^4-steroid 5β-reductase を持たない患者で産生された異常胆汁酸が肝細胞原形質膜で胆汁酸トランスポーターと直接相互作用することによって胆汁うっ滞を誘導するとする仮説を検証することであった。

この研究では、ラット肝臓から基底外側（又は類洞側）及び毛細胆管側の原型質膜小胞を単離した。急速ろ過法を用いて、モデル胆汁酸の存在下で単離小胞へのコリルタウリンの輸送を明らかにした。3β,7α-dihydroxy-5- cholenoic acid 及び 7α-hydroxy-3-oxo-4-cholenoic acid はいずれも毛細胆管側のコリルタウリンの ATP 依存性輸送系を競合的に阻害することが示され、K_m 値はそれぞれ 15 µM 及び 16 µM であった。放射能標識化 3β,7α-dihydroxy-5-cholenoyltaurine（3β-HSD 欠損で産生）及び 7α-hydroxy-3-oxo-4-cholenoyltaurine（Δ^4-3-oxoR 欠損で産生）は異なる輸送系によって輸送された。同様の実験を基底外側の原形質膜小胞を用いて実施した結果、7α-hydroxy-3-

oxo-4-cholenoyltaurine のみがコリルタウリンのナトリウム依存性輸送系を競合的に阻害し、Km 値は 16 μM であった。放射能標識化 7α-hydroxy-3-oxo-4-cholenoyltaurine 及び 3β,7α-dihydroxy-5-cholenoyltaurine を用いた実験の結果、7α-hydroxy-3-oxo-4-cholenoyltaurine は基底外側のラット肝臓原形質膜小胞にナトリウム依存性に輸送されたが、3β,7α-dihydroxy-5-cholenoyltaurine はナトリウム依存性に輸送されなかった。

この研究で主に 2 つの結果が示された。第一に、3β,7α-dihydroxy-5-cholenoyltaurine 及び 7α-hydroxy-3-oxo-4-cholenoyltaurine は、毛細胆管側の ATP 依存性胆汁酸トランスポーター（肝細胞における全経細胞性胆汁酸輸送における律速段階）の強力な阻害因子である。したがって、胆汁酸の生合成及び代謝の先天性異常を有する患者における胆汁うっ滞は、BSEP の阻害によるものであるという結論が得られた。第二に、合成胆汁酸は胆汁酸の基底外側及び毛細胆管側の輸送系と異なる相互作用を示した。したがって、胆汁酸特性は類似しているが、肝細胞原形質膜の基底外側及び毛細胆管側に存在する胆汁酸トランスポーターは（図 2.6.2-12）分子レベルで胆汁酸結合部位が異なると考えられる。

以上の結果は、胆汁酸生合成異常を有する患者に見られる異常胆汁酸が胆汁うっ滞の原因物質として作用する可能性があるとする仮説を裏付けるものであった。

胆汁酸トランスポーターの制御に対するコール酸の影響は、 (Fickert, et al., 2001)によってマウスモデルで詳細に考察されており（2.6.2.2.1.1.6 項）、胆汁酸による基底外側及び毛細胆管側の輸送系の mRNA レベル及びタンパク質レベルの制御について報告されている。

2.6.2.2.2.1.2 (Goodwin, et al., 2000): “A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis:”

この研究の目的は、FXR が雄 Fisher ラットの肝細胞での SHP-1 の発現（胆汁酸生合成）を制御することを実証するため、強力な非ステロイド性 FXR リガンドについて in vitro モデル及び in vivo モデルで検討することであった。

FXR が short heterodimer partner-1（SHP-1）の発現を誘導し、SHP-1 が肝臓受容体ホモログ-1（LRH-1）の活性を抑制することで CYP7A1 の発現を抑制した。胆汁酸によって活性化されるこの制御カスケードは、胆汁酸生合成に関与する CYP7A1 などの遺伝子の調和的抑制の分子基盤となる。

2.6.2.2.2 投与経路（経口）

2.6.2.2.2.1 (Pandak, et al., 1994): “Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase”

この研究の目的は、腸肝循環が正常なラットにおいて cholesterol 7α-hydroxylase の制御の分子基盤に胆汁酸が及ぼす影響を検討することであった。雄 Sprague-Dawley ラット（体重 300～500 g）に 1%コール酸（1 日 500 mg/kg 相当）添加飼料を 2 週間与えた。同時にコレスチラミン（5%）、ケノデオキシコール酸（1%）、デオキシコール酸（0.25%）を添加した飼料を検討した。

コール酸の摂取により cholesterol 7α-hydroxylase 活性（62%）、定常状態の mRNA レベル（72%）、転写活性（44%）が顕著に低下した（表 2.6.2-4）。コール酸による cholesterol 7α-hydroxylase 活性のダウンレギュレーションは、CYP7A1 遺伝子の転写活性の低下の結果として生じた。

表 2.6.2-3 に示すように、コール酸の摂取によって胆汁酸に占めるコール酸の割合が増加した（対照ラット 29.3%、コール酸摂取ラット 74.3%）。

表 2.6.2-3: 胆汁酸塩摂取後の胆汁中胆汁酸塩の組成

条件	胆汁中胆汁酸塩				
	MCA	UDCA	CA	CDCA	DCA
対照（n = 5）	58.4 ± 1.0[a]	5.2 ± 0.7	29.3 ± 0.8	3.3 ± 0.5	3.8 ± 0.9
コレスチラミン（5%）（n = 3）	22.4 ± 3.2	6.0 ± 3.6	61.7 ± 0.8	8.6 ± 1.3	1.3 ± 0.6
CA（1%）（n = 4）	11.0 ± 3.4	2.4 ± 1.5	74.3 ± 5.7	5.9 ± 2.3	6.4 ± 2.8
CDCA（1%）（n = 4）	48.9 ± 3.6	15.9 ± 0.6	3.9 ± 0.8	26.7 ± 7.2	5.2 ± 3.9
DCA（0.25%）（n = 3）	33.2 ± 4.6	9.3 ± 3.9	36.8 ± 3.2	2.9 ± 2.2	17.9 ± 5.2

MCA = ムリコール酸、UDCA = ウルソデオキシコール酸、CA = コール酸、CDCA = ケノデオキシコール酸、DCA = デオキシコール酸。
a データは胆汁酸塩全体に対する割合（平均値 ± S.E.M.）を示している。

表 2.6.2-4: Cholesterol 7α-hydroxylase の比活性、定常状態の mRNA レベル、転写活性に対する胆汁酸摂取の影響

条件	Cholesterol 7α-hydroxylase（%対照）		
	比活性	mRNA レベル	転写活性
コレスチラミン（5%）（n = 3）	338 ± 54	310 ± 122	285 ± 74
コール酸（1%）（n = 4）	38 ± 14	28 ± 3	56 ± 3
ケノデオキシコール酸（1%）（n = 4）	16 ± 11	71 ± 11	57 ± 8
デオキシコール酸（0.25%）（n = 3）	3 ± 1	39 ± 12	46 ± 3

2.6.2.2.2.3　投与経路（静脈内）

2.6.2.2.2.3.1　(Klaassen, 1972): “Species differences in the choleretic response to bile salts.”

Klaassen et al.（1972）は、様々な用量のコール酸、タウロコール酸、デヒドロコール酸を 2 時間に 2 回静脈内投与した雄 Sprague-Dawley ラット（260～360 g）、雄 New Zealand ホワイトウサギ（1～2 kg）、雄雑種イヌ（7～13 kg）におけるコール酸、タウロコール酸、デヒドロコール酸の静脈内投与に対する胆汁分泌反応の種差を検討した。

コール酸、タウロコール酸、デヒドロコール酸を 3.12、6.25、12.5、25、50、100 mg/kg の用量で静脈内投与した。胆汁中胆汁酸濃度は 50 mg/kg であった。図 2.6.2-14 に示すように、各動物種ではコール酸の用量増加に伴って胆汁流の増加が認められた。

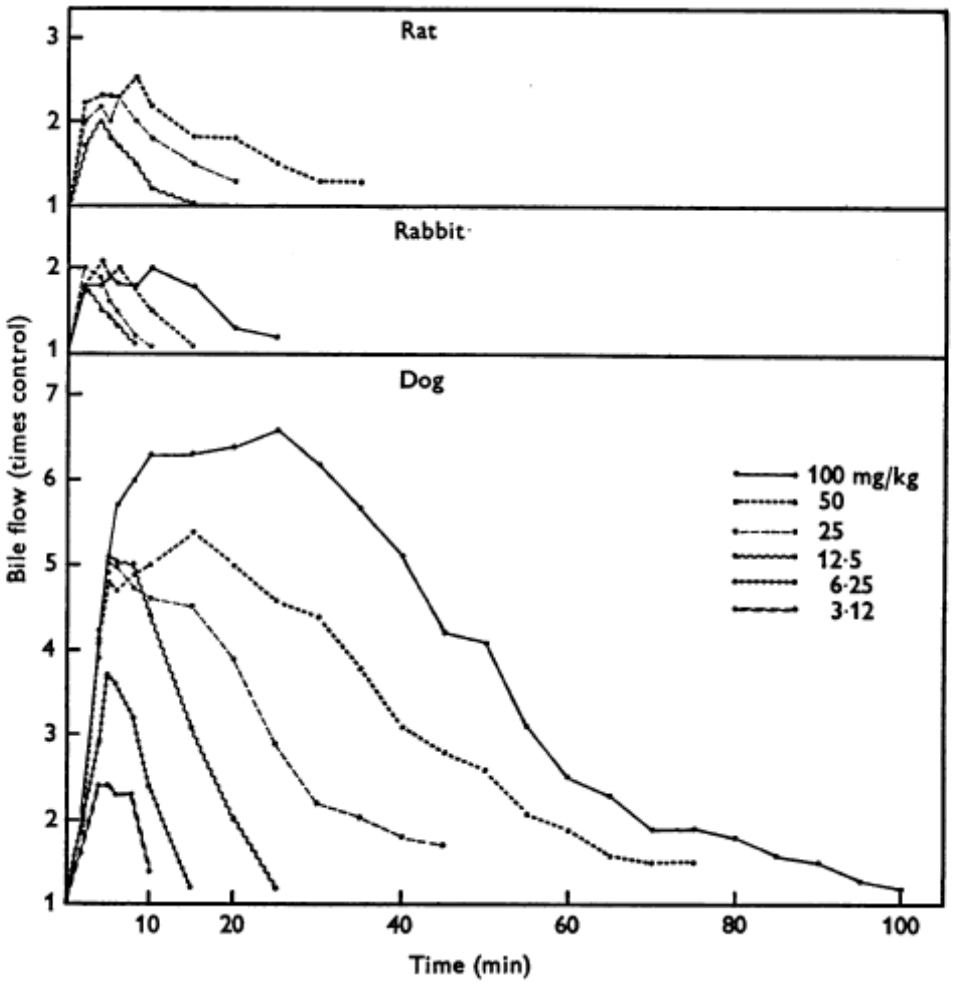
胆汁の産生及び薬物の胆汁排泄には種差があり、取り上げた動物種が外因性胆汁酸の投与に異なる反応を示すことが分かった。

コール酸の最高用量（100 mg/kg）では、イヌでは胆汁流が 6.5 倍に増加したが、ラットでは 2 倍、ウサギでは 2.5 倍にとどまった。胆汁分泌反応は、イヌ（90 分）ではラット及びウサギ（20～30 分）に比べて長時間持続した。胆汁流が対照値に戻る時間はコール酸が最も短く

（ラット及びウサギ 10～15 分、イヌ 45 分）、デヒドロコール酸が最も長かった（ラット及びウサギ 25～40 分、イヌ 120 分）。この研究では、コール酸がウサギ及びラットにおいてイヌよりも速やかに抱合されることが分かった。

すべての動物種で、胆汁酸の静脈内投与後に排泄された胆汁中胆汁酸濃度に上昇が認められた。ラット（50 µL/min/kg）及びウサギ（70 µL/min/kg）の対照胆汁流量は、イヌ（5 µL/min/kg）よりはるかに高値であった。これらの動物種の胆汁分泌反応の差の一部は、基礎の胆汁産生の差に起因していると考えられた。

図 2.6.2-14: 各用量のコール酸投与後のラット、ウサギ、イヌにおける胆汁流



2.6.2.2.2.4　投与経路（十二指腸内）

2.6.2.2.2.4.1　(Borgström, et al., 1986): “Effects of cholic acid, 7β-hydroxy- and 12β-hydroxy-isocholic acid on bile flow, lipid secretion and bile acid synthesis in the rat.”

この研究の目的は、胆汁瘻ラットにおけるコール酸、7β-ヒドロキシ-イソコール酸（7β 又はウルソコール酸）、12β-ヒドロキシ-イソコール酸（12β）の十二指腸内投与が胆汁流、脂質分泌、胆汁合成、胆汁ミセル特性に及ぼす影響を評価することであった。

この研究では、カニューレ留置後 72 時間の時点、換言すると胆汁酸プールを排出後に内因性胆汁酸塩合成が平衡状態になった時点で胆汁酸塩の十二指腸内注入を開始した。標識化した各胆汁酸塩を 2 通りの濃度（15 mmol/L 及び 30 mmol/L）及び 1 時間当たり 2 mL の注入速度で計 12 時間注入した。コール酸及び 7β を 6 例、12β を 11 例に注入した。

表 2.6.2-5 に示したように、注入した胆汁酸塩は腸で吸収されて胆汁中に分泌された。12 時間の注入時間を通して比放射能が高く、回収率が良好であった。標識化コール酸はすべて抱合体として胆汁中に分泌された。

この研究では、注入した 3 種類の胆汁酸塩すべてで胆汁流が注入前よりも増加し、増加量が 7β > 12β > コール酸の順であった。胆汁流は胆汁酸塩分泌に比例して増加し、7β ではコール酸及び 12β よりも増加が顕著であった。コール酸の注入によってリン脂質（PL）及びコレステロール（CH）の胆汁中分泌が注入前よりも増加した。7β 及び 12β の注入によって PL 及び CH の分泌が注入前よりも減少した。この研究で用いた 2 通りの濃度でのコール酸及び 7β の注入によって新規合成された胆汁酸塩の分泌が注入前よりも減少した。12β の注入によって新規合成された胆汁酸塩の分泌速度が 2 倍になった。臨界ミセル濃度が高い 7β 及び 12β の注入後に分泌された胆汁中の混合胆汁酸塩ミセルの含有量は、コール酸注入後に認められた値よりも少なかった。

表 2.6.2-5: ^{14}C コール酸、7β-ヒドロキシ - イソコール酸及び 12β-ヒドロキシ - イソコール酸の 2 通りの濃度で注入した時のラット胆汁中回収率

	CA		7β		12β	
	15mmol/L	30mmol/L	15mmol/L	30mmol/L	15mmol/L	30mmol/L
注入した標識化胆汁酸塩（A）	1.86±0.03	3.85±0.06	2.10±0.02	4.11±0.03	1.88±0.04	4.21±0.04
分泌された胆汁酸塩の総量（B）	1.54±0.05	2.78±0.20	2.03±0.14	3.68±0.12	2.19±0.05	4.06±0.06
分泌された標識化胆汁酸塩（C）	1.29±0.04	2.62±0.20	1.81±0.12	3.56±0.12	1.67±0.04	3.40±0.05
胆汁酸塩の合成（B - C）	0.25±0.03	0.16±0.08	0.22±0.06	0.12±0.08	0.52±0.04	0.66±0.06
標識化胆汁酸塩の回収率	69.9±1.5	68.1±4.7	86.5±5.6	86.5±2.6	88.5±1.0	80.5±0.9
（C/A）						
分泌された胆汁酸塩の比放射能（C/B）	84.4±1.4	94.6±2.7	89.6±2.5	96.9±2.2	76.3±1.3	83.8±1.2

数値の単位は μmol min^{-1} kg^{-1}。X ± SE

2.6.2.2.3　効力を裏付ける試験（ウサギ）

2.6.2.2.3.1　投与経路（経口）

2.6.2.2.3.1.1　(Araya, et al., 1995): “Different effects on the expression of CYP7 and CYP27 in rabbit liver by cholic acid and cholestyramine.”

この研究の目的は、単離したラット肝細胞及びラット肝臓にみられる CYP7 及び CYP27 の協調的制御がウサギ肝臓にあるかどうかを評価する一連の実験を通して、ウサギ肝臓における胆汁酸の負のフィードバックを検討することであった。

雄 New Zealand ホワイトウサギ（性成熟、9 カ月齢での推定体重 4.5 kg）に 1%（wt/wt）コール酸（1 日 444 mg/kg 相当）を 7 日間与えた。

ウサギのコール酸又はコレスチラミン摂取により、それぞれ CYP7 mRNA の顕著な抑制及び誘導が生じた。一方、CYP27 mRNA の発現、CYP27 タンパク質の量、ミトコンドリアの 27-hydroxylase 活性には顕著な影響はなかった。したがって、ラットとウサギでは胆汁酸による CYP27 の制御に関して明らかな差があった。ウサギでは、転写レベルで CYP7 及び CYP27 の協調的制御はほとんどないし全くなく、CYP27 は転写レベルでも転写後レベルでも胆汁酸による負のフィードバック制御を受けないという結論が得られた。

2.6.2.2.3.1.2　(Hall, et al., 1988): “Bile acid synthesis: down-regulation by monohydroxy bile acids.”

この研究の目的は、総胆管尿管吻合によって腸肝循環を遮断したウサギにおける胆汁酸合成の制御を検討することであった。

以下の表 2.6.2-6 に、総胆管尿管吻合術に成功した体重 2～3.5 kg の New Zealand ホワイトウサギ 3 例から得た典型的なデータを示した。デオキシコール酸はコール酸に置換されて速やかに消失し、コール酸が総胆汁酸量の 95%以上を占めていた。総胆汁酸量の増加が生じた。

表 2.6.2-6: ウサギにおける総胆管尿管吻合術後の胆汁酸排泄量

	排泄量、µmol/24 hr	
術後日数	コール酸	総胆汁酸
1	52	442
2	285	523
3	375	426
4	673	716
5	673	693

これらのウサギを用いて、経口投与した各胆汁酸が胃管を通じて及ぼす作用を検討した。グリココール酸、グリコデオキシコール酸、ウサギ胆嚢胆汁、タウロコール酸、コール酸 600～800 µmol/24 h の投与によるコール酸合成の抑制は認められなかった（表 2.6.2-7）。しかし、同量のケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸の投与ではコール酸排泄量が減少したが、総胆汁酸合成は正常範囲内であった。

投与した胆汁酸が吸収されて肝臓に取り込まれると総胆汁酸排泄量が増加した。これは、内因性の合成量が最大排泄量よりも極めて小さいことを示している。

ウサギを用いたこの実験系では、肝臓又は腸由来のモノヒドロキシ胆汁酸が胆汁酸合成のダウンレギュレーションに関与しているという知見が得られた。この結果は、コール酸が自身の合成を抑制するげっ歯類及び霊長類とは著しく異なっていた。

表 2.6.2-7: コール酸生合成及び総胆汁酸排泄に対するコール酸投与の作用

日数	コール酸、µmol/24 hr	排泄された胆汁酸、µmol/24 hr		
		コール酸	総胆汁酸	コール酸/総胆汁酸
- [a]	0	749 ± 126	772 ± 130	0.97
45	600	784 [b]	1,135	0.99
94	800	837 [b]	1,387	0.99

a 110 日間で得たデータの平均値及び s（n = 110）。b 吸収量及び胆汁中排泄量で補正。

2.6.2.2.4　効力を裏付ける試験（霊長類）

2.6.2.2.4.1　投与経路（十二指腸内）

2.6.2.2.4.1.1　(Redinger, et al., 1984): “The economy of the enterohepatic circulation of bile acids in the baboon.2 Regulation of bile acid synthesis by enterohepatic circulation of bile acids.”

この研究の目的は、胆汁酸プール中の同位体希釈分析及びコレステロールの胆汁酸への酸化の放射化学的評価によって、腸肝循環をコントロールした健康な雌成体ヒヒ 6 例における胆汁酸合成の短時間フィードバック制御を評価することであった。この研究では、放射化学的手法を用いて、自身の（内因性）胆汁酸プール又は選択された（外因性）胆汁酸プールを十二指腸内注入により腸肝循環に再吸収させた動物における胆汁酸塩合成の初期抑制を評価した。

内因性胆汁酸プールを用いた実験では、胆汁酸の分泌、組成及びプールサイズが正常であることを確認した後、各実験開始時にウォッシュアウトして胆汁酸プールを回収し、放射能標識化したコール酸、ケノデオキシコール酸又はその両方と混合した。胆汁酸合成を促進するため、完全な（100%）胆汁採取を継続した。次に、標識化した胆汁酸プールを十二指腸内のチューブから 600、200 又は 100 µmol/hr の注入速度で（それぞれ 2、6、又は 12 時間かけて）腸肝循環に戻し、肝臓に胆汁酸プールを戻す速度の変化が胆汁酸合成に及ぼす影響を評価した。

外因性胆汁酸プールを用いた実験では、コール酸又はケノデオキシコール酸 1 g（又はそれぞれのグリシン抱合体）を含む胆汁酸プールを 0.15 M 生理食塩水で 50～100 mL に調製し、放射能標識化したコール酸、ケノデオキシコール酸又はその両方と混合した。これらのプールを 200 µmol/hr の注入速度で 6 時間かけて注入した。また、別の実験としてデオキシコール酸 1 g を同じ要領で注入した。さらに別の実験では、コール酸 500 mg 又は 2 g を 600 µmol/hr の注入速度で注入し、プールサイズが胆汁酸合成のフィードバック抑制に及ぼす影響に着目した。

以上の実験の結果、胆汁酸合成のフィードバック抑制は胆汁酸を戻す速度と正比例することが分かった。

各胆汁酸塩は自身の合成を他の胆汁酸塩よりも強く抑制し、ケノデオキシコール酸及びデオキシコール酸はコール酸よりも抑制作用が強いことが判明した。混合した胆汁酸プールを注入した結果、ケノデオキシコール酸及びデオキシコール酸はコール酸のフィードバック抑制を亢進した。グリシンと抱合したコール酸は、非抱合コール酸よりも胆汁酸合成抑制作用が強かった。以上の実験を通して、胆汁酸のフィードバック抑制は、抑制解除（腸肝循環の完全な遮断による合成の促進）に必要な時間の半分未満で生じ、胆汁酸の回復速度と正比例していた。

2.6.2.2.5 効力を裏付ける試験（その他の非げっ歯類哺乳動物）

2.6.2.2.5.1 In vitro

2.6.2.2.5.1.1 (Kwekkeboom, et al., 1990): “Bile acids exert negative feedback control on bile acid synthesis in cultured pig hepatocytes by suppression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity.”

この in vitro 研究の目的は、雌ブタ（7～8 週齢）から単離した単層培養肝細胞における胆汁酸合成のフィードバック制御を検討することであった。コール酸をはじめ数種類の胆汁酸を 100 µmol/L の濃度で添加し、48 時間インキュベーション後に CYP7A1 活性を評価した。

コール酸が cholesterol 7α-hydroxylase 活性を最も強く抑制した。胆汁酸は肝細胞に直接作用して cholesterol 7α-hydroxylase 活性を抑制し、門脈血中で観察された濃度で胆汁酸合成を抑制した。培養ブタ肝細胞において、外因性コレステロールからの胆汁酸合成はその最終産物によって制御された。この研究では、胆汁酸合成の負のフィードバック機構の普遍性が裏付けられた。

2.6.2.3 副次的薬理試験

入手した文献を詳細にレビューしたが、コール酸の副次的薬理試験に関する文献は確認されなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

コール酸の安全性薬理に注目した非臨床研究は件数が少ない。しかし、幾つかの研究ではコール酸が特に心血管系、自律神経系、血小板凝集に及ぼす作用に注目している。

2.6.2.4.1 安全性薬理試験（ラット）

2.6.2.4.1.1 ラット心血管系

2.6.2.4.1.1.1 (Joubert, 1978a): “Cholic acid and the heart: in vitro studies of the effect on heart rate and myocardial contractility in the rat.”及び (Joubert, 1978b): “An in vivo investigation of the negative chronotropic effect of cholic acid in the rat.”

Joubert et al.による研究の目的は、in vitro 及び in vivo ラットモデルを用いて、心拍数、心筋収縮力及び陰性変時作用の面からコール酸が及ぼす心血管系への作用を様々な濃度で検討することであった (Joubert, 1978a), (Joubert, 1978b)。

Joubert が報告したこれらの研究では (Joubert, 1978b)、コール酸には in vitro で用量依存的に陰性変時作用があり、心拍数に対して迷走神経性の作用と直接作用を及ぼすことが示されている。

Joubert による最初の論文 (Joubert, 1978a)では、Wistar ラットの摘出心房を用いて陰性変時作用に関する累積投与量-反応試験が実施された。コール酸の変時作用に対するカリウム及びカルシウム濃度の変化の影響、自律神経の影響の役割、表面張力の変化の影響を検討した。

すべての実験群で、コール酸の 40 mg/mL 蒸留水溶液を調製した。心房を安定化させてベースラインを測定した後、コール酸を 5 分間隔で累積的に添加した。コール酸は in vitro で用量依存性の心拍数低下を引き起こすとともに陽性変力作用を示したが、電気ペーシングによって除去することができた。コール酸の陰性変時作用と表面張力の変化との関係を考えた場合、陰性変時作用が最小限となるコール酸の濃度で表面張力の低下が最大となり、心拍数を顕著に低下させる濃度では表面張力が比較的一定に保たれていた。コール酸が細胞膜の表面に単層を形成することによって陰性変時作用を発揮した結果、膜機能を機械的に阻害する可能性があることが示唆された。

カルシウム及びカリウムの濃度の変化はコール酸の陰性変時作用に影響しなかった。14 mmol/L のコール酸に曝露した心房では、局所的にミトコンドリアの膨張が認められた。

その後 Joubert が実施した研究では (Joubert, 1978b)、Wistar ラットの心拍数に対するコール酸の影響を in vivo で検討された。

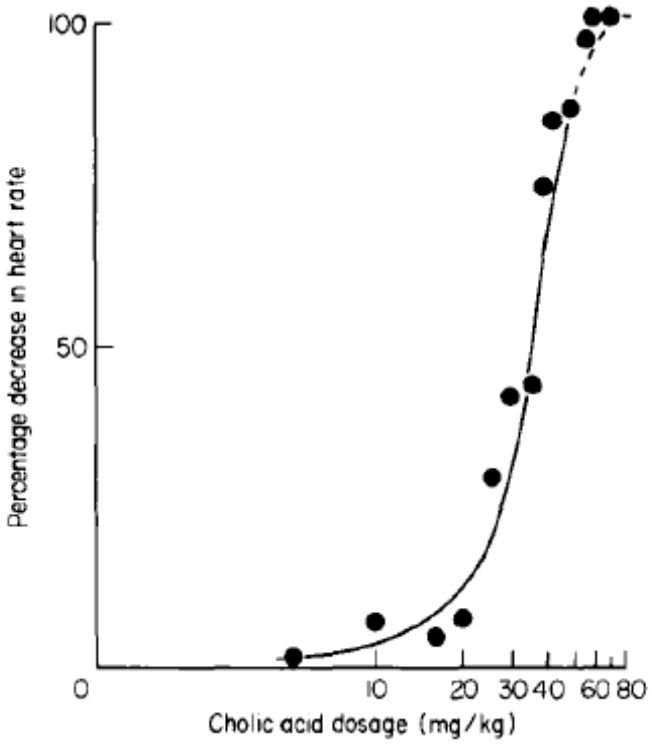
以下の 4 段階で実験が行われた。(1) 閉塞性黄疸の存在下でラットが徐脈を起こすかどうかを明らかにする。(2) コール酸の投与と心拍数との間に用量-反応関係があるかどうかを確立する。(3) in vivo での作用機序を明らかにする。(4) コール酸の心拍数への影響において胆汁酸による溶血が果たしうる役割を検討する。

研究の結果、Wistar ラットにおける実験的閉塞性黄疸は心拍数の顕著な低下をもたらすことが分かった。In vivo でコール酸 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 倍相当）を単回静脈内投与したとき、平均動脈血圧の低下を伴う用量依存性の陰性変時作用が認められた（図 2.6.2-15）。50 mg/kg（コール酸プールサイズの 0.33 倍相当）以上の用量で死亡が

認められた。ECG 測定の結果、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ったが、高用量では様々な程度の房室ブロックを伴っていた。コール酸の陰性変時作用は、アトロピン又は迷走神経切断によって顕著に低減したが消失はしなかった。コール酸の陰性変時作用は、程度は少ないものの、神経節遮断及び除脳によって低減した。レセルピンによる交感神経抑制は、コール酸に対する反応を軽度に増強した。この他、この研究では、総頸動脈に投与したコール酸の影響は頸静脈に投与した場合に比べて弱いことも分かった。コール酸による溶血は、陰性変時作用には関与しないと思われた（図 2.6.2-16）。

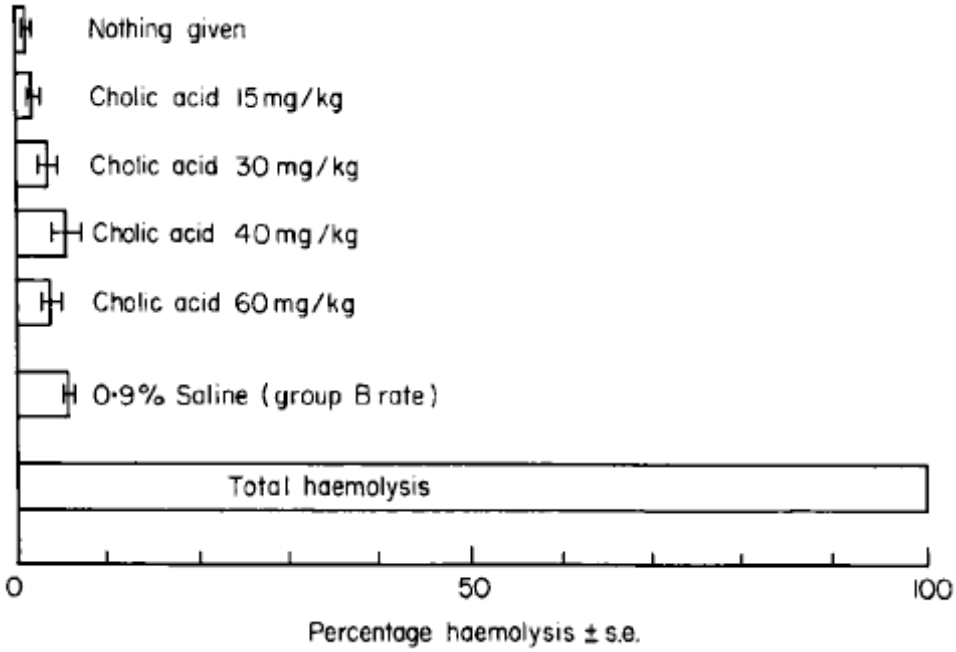
この研究では、コール酸は Wistar ラットにおいて陰性変時作用を直接及び迷走神経性に生じるという結論が得られた。

図 2.6.2-15: コール酸の静脈内投与による心拍数への影響



各ポイントはラット 5 例の平均値（ラット計 60 例）を表している。

図 2.6.2-16: 対照ラットとコール酸の用量 40 mg/kg と同量の等張生理食塩水を投与したラットで各用量のコール酸投与後に生じた溶血の比較（各群 5 例）



2.6.2.4.1.1.2　(Kadłubowski, et al., 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.”

この研究の目的は、コール酸、デオキシコール酸、デヒドロコール酸投与後に自律神経系作用薬が心血管に及ぼす作用を評価することであった。ラット心臓を用いた in vivo 実験及び摘出ラット血管標本を用いた実験が行われた。胆汁酸の投与前後で薬物の作用を比較した。

ラット心臓を用いた in vivo 実験では、ラットに 30 mg/kg の胆汁酸溶液を注射後、自律神経系作用薬の 2 回目の投与を行った。自律神経系作用薬が心拍数に及ぼす作用に対する胆汁酸の影響を表 2.6.2-8 に示した。コール酸及びデオキシコール酸はイソプレナリンの心臓刺激作用を顕著に抑制した。しかし、胆汁酸の後に投与したイソプレナリンは S 波を浅くする作用を維持していた。さらに、胆汁酸はアドレナリン及びノルアドレナリンの心臓に対する作用の逆転を引き起こして両薬物の血管収縮作用を増強し、心血管に対するアセチルコリンの作用の逆転を引き起こした。

表 2.6.2-8:自律神経系作用薬がコール酸投与前後に in vivo ラット心拍数に及ぼす作用

用量 (g/kg)	薬物単独の作用				コール酸投与後の薬物の作用			
	I	A	NA	ACh	I	A	NA	ACh
$3.2x10^{-6}$	123 ± 1.4	109 ± 1.4	105 ± 3.1	57 ± 1.7	104^{x} ± 2.4	78^{x} ± 3.6	$90^{x,xx}$ ± 3.0	124^{x} ± 3.4
10^{-5}	152 ± 1.4	117 ± 1.7	110 ± 2.9	52 ± 2.0	115^{x} ± 3.6	58^{x} ± 3.6	$81^{x,xx}$ ± 4.2	143^{x} ± 3.0
$3.2x10^{-5}$	168 ± 1.1	144 ± 1.7	115 ± 1.4	35 ±2.0	128^{x} ± 2.4	54^{x} ± 3.6	$62^{x,xx}$ ± 2.4	163^{x} ± 3.0
10^{-4}	197 ± 1.1	147 ± 1.7	117 ± 1.4	13 ± 1.4	139^{x} ± 3.6	46^{x} ± 3.6	$46^{x,xx}$ ± 3.0	175^{x} ± 3.6
b	45.8	28.2	8.0	-31.6	23.8	-20.6	-30.2	37.0

s_b	3.4	6.3	0.6	7.1	1.0	4.6	2.9	2.0
t	13.5	4.5	12.7	4.4	22.9	4.5	10.5	18.3

I：イソプレナリン、A：アドレナリン、NA：ノルアドレナリン、ACh：アセチルコリン、x：薬物単独の作用と比較して統計学的有意差あり（p≥95%）、xx：デオキシコール酸投与後の薬物の作用と比較して統計学的有意差あり、b：回帰係数、sb：回帰係数の誤差、t：回帰係数、心拍数（%）、標準偏差（%）の有意性の指数。

ラット血管を用いた実験では、標本を 8 x 10^{-4} g/mL の胆汁酸溶液で 2 分間潅流後、被験薬を添加して 2 分間その作用を測定した。この実験では、デオキシコール酸がイソプレナリンの血管拡張作用を有意に抑制したが、コール酸はイソプレナリンの作用に有意な変化をもたらさなかった。

実験に用いた胆汁酸はいずれも血管標本に対するアドレナリン及びノルアドレナリンの血管収縮作用を亢進した（表 2.6.2-9）。

表 2.6.2-9: 自律神経系作用薬がコール酸投与前後にラット血管に及ぼす作用

		薬物単独の作用		コール酸投与後の薬物の作用	
薬物	濃度	平均流量（%）	s	平均流量（%）	s
イソプレナリン	10^{-6}	236	8.4	216^{xx}	8.3
アドレナリン	10^{-6}	57	2.8	48	3.3
ノルアドレナリン	10^{-6}	47	2.5	28^{x}	3.5
アセチルコリン	10^{-6}	173	3.9	$81^{x,xx}$	3.8
ピロカルピン	10^{-4}	216	6.1	74^{x}	10.4

x：薬物単独の作用と比較して統計学的有意差あり（$p \geq 95\%$）
xx：デオキシコール酸投与後の薬物の作用と比較して統計学的有意差あり（$p \geq 95\%$）
s：標準偏差

2.6.2.4.1.2　ラット自律神経系

2.6.2.4.1.2.1　(Szkudlinski, 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.”

Szkudlinkski の目的は、摘出ラット腸におけるアドレナリン受容体及びコリン受容体の反応性に対するコール酸及びデオキシコール酸の影響を検討することであった (Szkudlinski, 1984)。摘出ラット腸切片を胆汁酸溶液（8 x 10^{-5} g/mL）に 10 分間曝露させた後、被験薬を 2 回添加した。

研究の結果、胆汁酸は腸に対するイソプレナリンの弛緩作用を抑制し、アドレナリン及びノルアドレナリンの腸に対する作用を逆転させることが分かった（表 2.6.2-10）。さらに、胆汁酸は腸におけるアセチルコリン及びピロカルピンの収縮誘導作用を増強したが、向筋肉性薬物パパベリン及び塩化バリウムの作用に有意な変化をもたらさなかった。

表 2.6.2-10: 自律神経系作用薬がコール酸投与前後に摘出した腸に及ぼす作用

濃度	薬物単独の作用				コール酸投与後の薬物の作用（%）			
	I (-)	A (-)	NA (-)	ACh (+)	I (-)	A (+)	NA (+)	ACh (+)
10^{-7}	18 ± 1.0	7 ± 1.6	3 ± 0.4	27 ± 3.7	-	6^{x} ± 0.6	$10^{x,xx}$ ± 2.4	17^{xx} ± 1.4
$3.2x10^{-7}$	38 ± 5.0	25 ± 4.5	7 ± 1.0	51 ± 3.1	-	14^{x} ± 2.0	21^{x} ± 2.9	$44^{x,xx}$ ± 3.5
10^{-6}	50 ± 1.3	25 ± 3.0	8 ± 0.2	59 ± 2.3	$13^{x,xx}$ ± 2.0	$42^{x,xx}$ ± 2.1	$18^{x,xx}$ ± 0.8	71^{x} ± 3.7
$3.2x10^{-6}$	69 ± 3.9	48 ± 6.2	18 ± 2.3	63 ± 2.7	$17^{x,xx}$ ± 1.7	$45^{x,xx}$ ± 4.6	$22^{x,xx}$ ± 2.8	$78^{x,xx}$ ± 3.6
10^{-5}	96 ± 1.0	53 ± 2.9	19 ± 2.0	66 ± 2.3	59^{x} ± 2.2	$35^{x,xx}$ ± 3.6	$43^{x,xx}$ ± 3.3	$83^{x,xx}$ ± 2.7
b	37.3	23.2	8.4	18.0	46.8	17.5	13.3	33.4
s_b	2.9	3.2	1.6	4.8	21.7	7.6	4.6	6.6
t	12.7	7.2	6.3	3.8	2.2	2.3	2.9	5.1

I：イソプレナリン、A：アドレナリン、NA：ノルアドレナリン、ACh：アセチルコリン、(-)：弛緩作用、(+)：収縮作用、x：薬物単独の作用と比較して統計学的有意差あり（$p \geq 95\%$）、xx：デオキシコール酸投与後の薬物の作用と比較して統計学的有意差あり、b：回帰係数、sb：回帰係数の誤差、t：回帰係数、心拍数（%）、標準偏差（%）の有意性の指数。

2.6.2.4.1.3　ラットその他の器官系

2.6.2.4.1.3.1　(Pereira, et al., 1995): “In vivo effect of bile salts on platelet aggregation in rats.”

Pereira et al.の目的は、ラットにおける血小板機能に対する胆汁酸の in vivo 作用を検討することであった (Pereira, et al., 1995)。具体的には、この研究では完全胆管閉鎖によって血清胆汁酸塩

レベルを上昇させたラット又は飼料への 1%コール酸の添加による胆汁酸塩の摂取増加ラットを用いて血小板凝集試験を実施した。

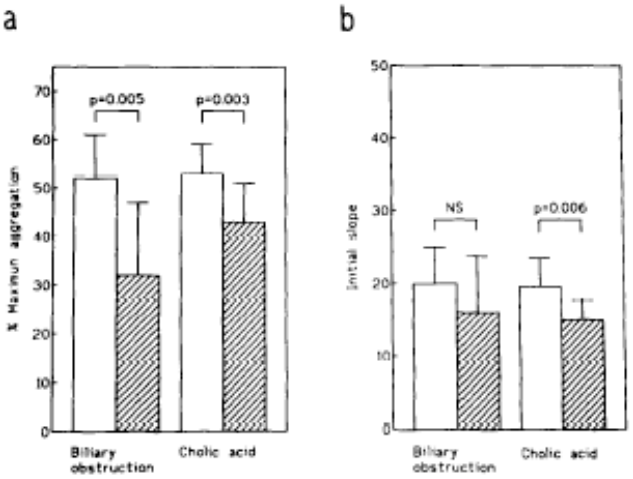
雄 Sprague-Dawley ラットに 1%コール酸（1 日 85～150 mg、500 mg/kg 相当）を添加した飼料を 1 日 1 回、4 日間与えた。ラットの 1 日摂餌量及び体重を測定し、無作為に選別され標準飼料を与えたこと以外は同様に扱ったラットを対照群とした。

完全胆管閉鎖を得るため、腹腔内麻酔下で総胆管を二重結紮して切断した。偽手術を施したラットを対照として用いた。コール酸添加飼料の給餌又は手術の 4 日後にラットに麻酔を施し、ディスポーザブルシリンジを用いて下大静脈から採血した。血液に 1：9（v/v）クエン酸三ナトリウム（3.2%）を加えて凝固させ、多血小板血漿（PRP）を調製した。全血を 240 x g で室温にて 10 分間遠心分離して PRP を調製し、残りの血液を 2000 x g で 15 分間遠心分離して乏血小板血漿（PPP）を調製した。自家 PPP を加えて PRP 中の血小板数を 3.0 x 10^8 cells/mL に調製した。

4 日間の胆管閉鎖後の血清胆汁酸塩濃度の平均値（± SD）は 709 ± 29 µmol/L、対照群は 6.2 ± 3.3 µmol/L であった。図 2.6.2-17 A に示すように、胆管閉鎖ラット群では最大凝集率が有意に低下した（32.2 ± 15.5%対 52.1 ± 9.4%、p = 0.005）。血小板凝集曲線の初期の傾きには 2 群間で有意差がなかった（図 2.6.2-17 B）。

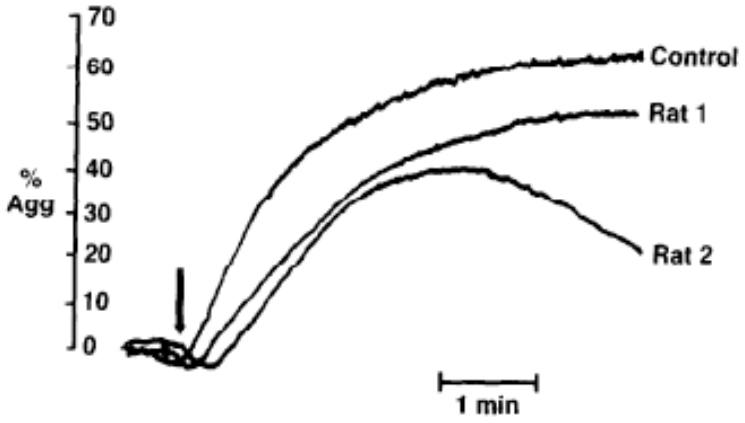
コール酸添加飼料を与えたラットの最終体重は、対照群よりもわずかに低かった（187 ± 19 g 対 207 ± 22 g、p = 0.0013）。また、血清胆汁酸塩濃度が対照群の 8 倍であった（53 ± 15 µmol/L 対 6.2 ± 3.2 µmol/L）。4 日間コール酸摂取後の PRP 中の血小板数には有意な変化が認められなかった（8.43 ± 1.59 x 10^8 cells/mL 対 9.67 ± 2.27 x 10^8 cells/mL）。ADP／エピネフリン混合物を最終濃度 4 µmol/L で添加したとき、血小板凝集が惹起された。ADP／エピネフリン混合物に対する血小板の最大凝集率は、対照群に比べてコール酸摂取ラットで有意に低下した（18%低下、図 2.6.2-18、43.7 ± 8.7%対 53.3 ± 6.2%、p = 0.003）。同様に凝集曲線の初期の傾きもコール酸摂取後に減少した（15.7 ± 2.7 対 19.5 ± 4.0、p = 0.006）。コール酸添加飼料の血小板凝集への影響を表した典型例 2 例を図 2.6.2-18 に示す。

図 2.6.2-17: 4 日間閉塞性胆汁うっ滞(n:9)及び 4 日間コール酸摂取(n:19)の血小板凝集への影響



パネル A は最大光透過率を示している。パネル B は血小板凝集曲線の初期の傾きを示している。バーは対照群（白抜きのバー）及び処置群（斜線を引いたバー）での 2 回測定値の平均値 ± SD を示している。

図 2.6.2-18: 1%コール酸添加飼料を 4 日間与えたラットにおける典型的な血小板凝集曲線



ADP／エピネフリン混合物、最終濃度 4 µmol/L の添加により血小板凝集が惹起された。対照曲線は標準飼料を与えたラットの血小板凝集を示し、ラット 1 及びラット 2 の曲線は別々の実験に用いた 2 例のデータに相当する。

以上の結果から、血中胆汁酸を増加させた状態は、in vivo での初期の血小板凝集速度の低下及び最大凝集率の低下を特徴とする明らかな血小板凝集異常を生じさせることが示された。コール酸摂取によって選択的に胆汁酸塩を増加させたラットで認められた影響は、血清胆汁酸塩レベルが低かったものの胆管閉鎖したラットと同様であった。コール酸は血中血小板機能に影響を及ぼす可能性があるという結論が得られた。

2.6.2.4.2　安全性薬理試験（その他の非げっ歯類哺乳動物）

2.6.2.4.2.1　ネコ心血管系

2.6.2.4.2.1.1　(Colpaert , et al., 1992): “Role of endocardial endothelium in the positive inotropic effect of cholic acid in isolated myocardium.”

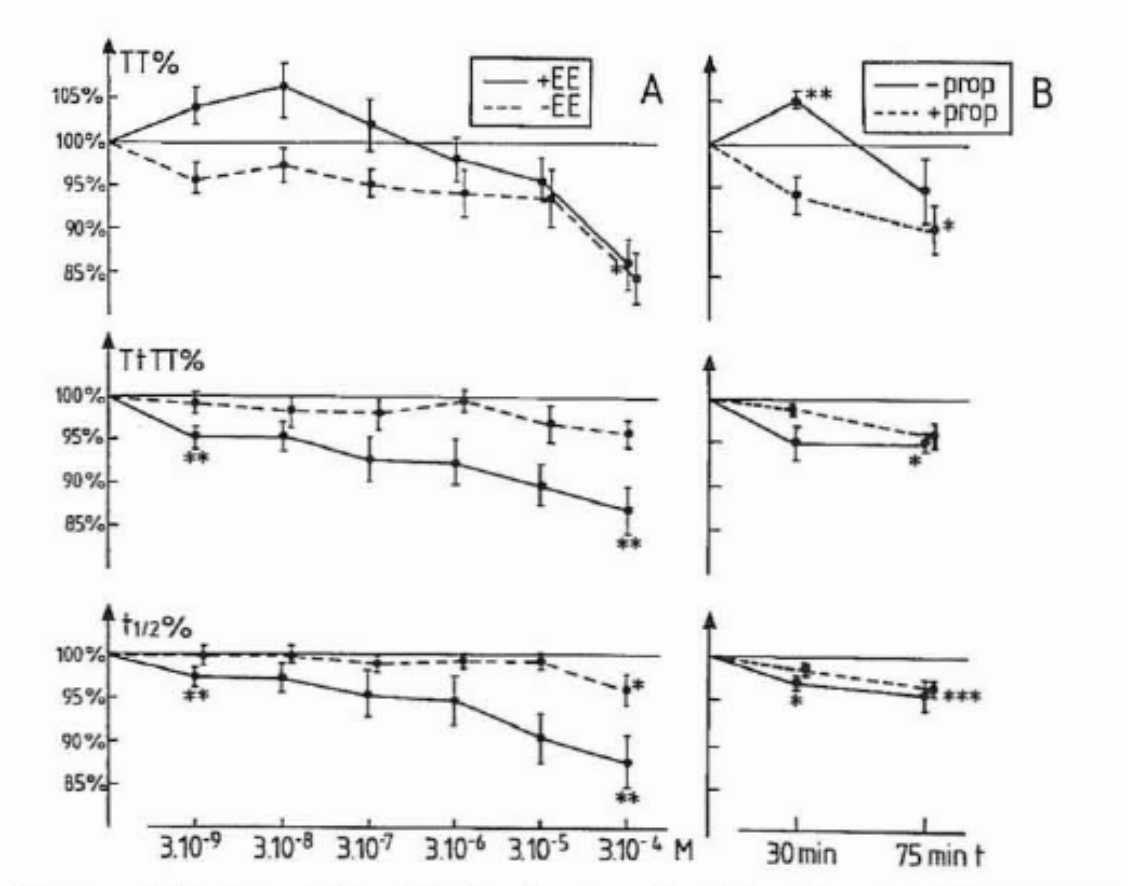
Colpaert et al. の目的は、ネコから摘出した心室乳頭筋の心内膜表面を損傷させる前後で、胆汁酸塩（コール酸の累積濃度 0.003～300 µmol/L）が機械的特性に及ぼす作用を検討することであった (Colpaert , et al., 1992)。この研究では、心内膜内皮（EE）に損傷のない心筋では、低濃度のコール酸（3×10^{-9}～3×10^{-7} M、0.003～0.3 µmol/L 相当）が摘出ネコ右室乳頭筋において軽度の陽性変力作用を誘発することが報告された。

EE に損傷のある心筋では、陽性変力作用を認めなかった。EE に損傷のない心筋にプロプラノロールを添加しても反応を認めなかった。以上の所見から、コール酸は摘出心筋において EE 依存性に β 受容体を介して陽性変力作用を誘発することが示唆された。

3×10^{-7} M（0.3 µmol/L）以上の高濃度又は 3×10^{-8} M（0.03 µmol/L）の低濃度でも長時間曝露した場合には、下位心筋の検出可能な形態学的又は機能的障害を引き起こさず、EE の広範な形態学的損傷を引き起こした。この研究では、生理的濃度及び生理的濃度を超える高濃度のコール

酸はいずれも EE を介して心機能を変調させる可能性があるという結論が得られた。血中胆汁酸濃度の上昇による EE の機能的又は形態学的障害は、胆汁うっ滞患者において観察される心機能低下に重要な役割を果たしている可能性がある。

図 2.6.2-19: (A)心内膜内皮に損傷のない心筋 (+EE) 及び乾燥空気によって内皮を損傷させた心筋 (-EE) の等尺性単収縮に対するコール酸の累積濃度の影響・(B)10^{-8} M (0.03 µmol/L) のプロプラノロールで前処理した心筋(+prop) 及び未処理の心筋 (-prop) に対するコール酸 3 x 10^{-8} M (0.03 µmol/L) 添加の影響



（A）データは最低濃度（3 x 10^{-9} M 又は 0.003 µmol/L）添加前に測定したベースライン値に対する割合の平均値 ± S.E.M.。（B）データはコール酸添加直前に測定したベースライン値に対する割合の平均値 ± S.E.M.。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、TT = 等尺性単収縮最大張力の合計、TtTT = 等尺性単収縮最大張力までの時間、$t_{1/2}$ = 単収縮発生から等尺性弛緩期中間までの時間。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

予定適応症におけるコール酸の主要な薬理作用は、欠損した内因性胆汁酸の作用の回復及び非生理的胆汁酸代謝産物への曝露の防止である。この作用との薬力学的相互作用を報告した非臨床研究は発見できなかった。

胆汁酸に対する特定の薬物の薬物動態学的相互作用を報告した研究については 2.6.4.7 項に要約した。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

胆汁酸の生理機能の一部、具体的には第一に、コレステロールからの胆汁酸の合成及び肝細胞を通過する輸送を制御する機能、第二に、胆汁の流れを誘導する機能、第三に、腸内でミセルを形成し、脂質や脂溶性栄養素の吸収を媒介する機能は、先天性一次胆汁酸合成異常の治療におけるコール酸の主要な薬理作用にとって極めて重要である。本資料には、特に第一及び第二の機能に関する詳細なデータを収録している。その内容を以下に要約する。さらに、3 つの研究で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ている。

2.6.2.6.1.1 胆汁酸生合成のコール酸による制御

胆汁酸の代謝は一次胆汁酸の合成に対する負のフィードバック制御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制御は、動物モデルでの、経口、静脈内、十二指腸内へのコール酸投与による in vivo 及び in vitro の幅広い研究において認められた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)を抑制することで自身の合成に負のフィードバック制御を及ぼしている。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制御を受ける (Li-Hawkins, et al., 2002), (Murphy, et al., 2005), (Shea, et al., 2007)。FXR はコール酸を含む疎水性胆汁酸により活性化されると、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、胆汁酸ホメオスタシスの異常をもたらす (Wang, et al., 2002)。SHP が 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、肝臓受容体ホモログ-1（LRH-1）及び肝細胞核因子-4α（HNF-4α）と負の相互作用を示す結果、一次胆汁酸の合成抑制が生じる (Goodwin, et al., 2000), (Lu, et al., 2000)。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と報告されている (Hall, et al., 1988), (Araya, et al., 1995)。

Cholesterol 7α-hydroxylase の胆汁酸調節経路における重要性は、CYP7A1 遺伝子を破壊したマウスの研究から示されている。各動物は出生時には正常であったが、明らかに脂溶性ビタミン及び一次胆汁酸の欠乏が原因で生後 18 日以内に約 85%が死亡した。一方、母動物の固形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上昇した (Ishibashi, et al., 1996)。

2.6.2.6.1.2 コール酸の胆汁酸流刺激

コール酸の静脈内及び十二指腸内投与は、マウス、ラット及びイヌの胆汁分泌を増加させ、胆汁酸、リン脂質及びコレステロールの胆汁への分泌を増加させる (Klaassen, 1972), (Borgström, et al., 1986), (Fickert, et al., 2001)。コール酸の経口投与は、基底外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及び毛細胆管側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)。胆汁酸の利胆作用はよく知られている (Brunton, et al., 2005)。

2.6.2.6.1.3 腸内脂肪吸引の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、マウスの腸内コレステロール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

2.6.2.6.1.4 一次胆汁酸合成の先天性異常疾患モデル

HSD3β7 遺伝子（3β-HSD をコードするヒト遺伝子のホモログ）が破壊されたマウスでは、出生後の非常に高い致死性が認められた。これは、哺育マウス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ことで防止された (Shea, et al., 2007)。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、糞中の胆汁酸排泄が増加し、腸内コレステロール吸収が大きく低下した。このコレステロール吸収の低下は、コレステロール生合成の増加によって相殺されていた。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。2.6.2.6.1.1 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 のレベルが大きく増加し、SHP mRNA のレベルが低下していた。さらに、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 AKR1D1 の発現も増加していた。

3β-HSD 欠損症又は Δ^4-3-oxoR 欠損症患者で観察される胆汁うっ滞における非生理的胆汁酸代謝物の役割が in vitro で研究された (Stieger, et al., 1997)。（3β-HSD 欠損症に存在する）3β,7α-dihydroxy-5-cholenoyltaurine 及び（Δ^4-3-oxoR 欠損症に存在する）7α-hydroxy-3-oxo-4-cholenoyltaurine は、毛細胆管 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性胆汁酸輸送における律速段階）の強力な阻害因子である。したがって、先天性胆汁酸生合成及び代謝異常患者における胆汁うっ滞は、毛細胆管側の ATP 依存性胆汁酸トランスポーターの阻害によるものである。

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。

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

コール酸の副次的薬理作用に関する研究は確認されなかった。

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

コール酸の安全性薬理に関する研究で、コール酸 500 mg/kg/日の短期経口投与によって血小板凝集を 18%抑制しうることが示された（1%コール酸添加飼料として 4 日間投与した結果、血清中胆汁酸塩がベースライン値の 8 倍に増加） (Pereira, et al., 1995)。摘出ネコ心筋において、コール酸の低濃度範囲で軽度の陽性変力作用を示し、心内膜内皮依存性及びβ受容体介在の陽性変力作用を誘導した。また、高濃度又は低濃度のコール酸でも長時間曝露した場合には、下位心筋の検出可能な形態学的又は機能的障害を引き起こさず、EE の広範な形態学的損傷を引き起こした (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、電気ペーシングによって除去することができた。コール酸は、細胞膜の表面に単層を形成することにより、その陰性変時作用を発揮し、その結果、膜機能を機械的に阻害する可能性がある (Joubert, 1978a)。ラット in vivo 研究では、コール酸 10～40 mg/kg の静脈内投与で陰性変時作用が観察され、50 mg/kg 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術は、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

用を低下させた。コール酸による溶血は、陰性変時作用には関与していないと報告されている (Joubert, 1978b)。

(Joubert, 1978a), (Joubert, 1978b)と同様に、 (Kadłubowski, et al., 1984)では、コール酸投与後のアドレナリン及びノルアドレナリン投与により、これらの薬物の血管収縮作用が亢進し、心臓及び血管に対するアセチルコリン作用の逆転を示し、ラットの心拍数が減少したと報告されている。 (Kadłubowski, et al., 1984)でも、 (Szkudlinski, 1984)と同様に、in vitro 濃度 2 mmol/L のコール酸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効果が逆転することがラットで示されている。この原因は不明である。

胆汁酸は 0.2 mmol/L の濃度で、ラット腸に対するイソプレナリンの弛緩効果を減少させ、腸に対するアドレナリン及びノルアドレナリンの効果を逆転させ、腸におけるアセチルコリン及びピロカルピンの収縮誘導効果の増加を引き起こす (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。

2.6.2.6.4 薬力学的薬物相互作用

コール酸との薬力学的薬物相互作用に関して具体的に報告した文献は確認されなかった。2.6.4.7 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概要を示した。

2.6.2.7 表及び図

本文中に記載したすべての試験をまとめた表については、非臨床薬理試験の概要表を参照のこと（2.6.3 項）。補足のため追加の図表を本文書に記載している。

2.6.2.8 参照文献

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.

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.

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.

Colpaert , C. G., Vandenbroucke, M. P., Andries, L. J. & Van Marck, E. A., 1992. *Role of endocardial endothelium in the positive inotropic effect of cholic acid in isolated myocardium.,* : J Cardiovasc Pharmacol 20 Suppl 12: S179-82.

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

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.

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

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.

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.

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.

Lew, J. L. et al., 2004. *The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion.,* : J Biol Chem 279(10): 8856-61.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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