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

2.6.6　毒性試験の概要文

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

2.6.6 毒性試験の概要文 10
2.6.6.1 まとめ 10
2.6.6.2 単回投与毒性試験 13
2.6.6.2.1 投与経路：静脈内 13
2.6.6.2.1.1 マウス 13
2.6.6.2.1.1.1 (Rothlin & Schalch, 1944): “Vergleichende Untersuchung einiger Gallensäuren” 英題名 “Comparative investigation of some bile acids” 13
2.6.6.2.1.2 ウサギ 13
2.6.6.2.1.2.1 (Gillert, 1926): “Die Giftigkeit der Gallensäuren.” 英題名 “The toxicity of bile acids.” 13
2.6.6.3 反復投与毒性試験 15
2.6.6.3.1 投与経路：経口 15
2.6.6.3.1.1 マウス 15
2.6.6.3.1.1.1 (Besançon, et al., 1970): “Lithiase expérimentale par excès d’acide cholique chez la souris.” 英題名 “Experimental lithiasis through excess cholic acid in mice.” 15
2.6.6.3.1.1.2 (Wang, et al., 1999): “Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis.” 15
2.6.6.3.1.2 ラット 18
2.6.6.3.1.2.1 (Delzenne, et al., 1992): “Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies” 18
2.6.6.3.1.2.2 (Bray & Gallagher Jr, 1969): “Weight gain and intestinal histology of rats fed cholic, lithocholic, hyodeoxycholic, chenodeoxycholic, and deoxycholic acids” 19
2.6.6.3.1.2.3 (Visek, et al., 1965): “Growth of rats fed bile salts, urea and chlortetracycline” 19
2.6.6.3.1.2.4 (Gambal & Quackenbush, 1960): “Effects of cholesterol and other substances on essential fatty acid deficiencies” 20
2.6.6.3.1.2.5 (Lacassagne, et al., 1967): “Étude comparative du foie de rats récevant l’acide cholique ou l’acide lithocholique seuls, ou associés avec du jaune de beurre” 英題名 “Comparative study of the liver of rats receiving cholic acid or lithocholic acid, alone or associated with butter yellow” 22
2.6.6.3.1.3 スナネズミ 23
2.6.6.3.1.3.1 (Bergman & van der Linden, 1971): “Reaction of the mongolian gerbil to a cholesterol-cholic acid-containing gallstone inducing diet” 23
2.6.6.4 遺伝毒性試験 26
2.6.6.4.1 In vitro 26
2.6.6.4.1.1 非哺乳動物細胞系 26
2.6.6.4.1.1.1 (Mori, et al., 1991): “Absence of mutagenic action of 5 beta-cholan-24-oic acid derivatives in the bacterial fluctuation and standard Ames tests” 26

2.6.6.4.1.1.2 (Venitt, et al., 1987): “Lack of mutagenic activity of bile acids in bacterial fluctuation tests” 28
2.6.6.4.1.1.3 (Watabe & Bernstein, 1985): “The mutagenicity of bile acids using a fluctuation test” 29
2.6.6.4.1.1.4 (Silverman & Andrews, 1977): “Bile Acids: Co-mutagenic Activity in the Salmonella-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test: Brief Communication” 31
2.6.6.4.1.2 哺乳動物細胞系 32
2.6.6.4.1.2.1 (Jenkins, 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.” 32
2.6.6.4.1.2.2 (Martinez-Diez, et al., 2000): “Comparison of the effects of bile acids on cell viability and DNA synthesis by rat hepatocytes in primary culture” 32
2.6.6.4.1.2.3 (Eltahir & Jenkins, 2010): “The bile acid impurity methyl cholate (MC) is non-genotoxic, as measured by the micronucleus assay in oesophageal OE33 cells.”**エラー！ブックマークが定義されていません。**
2.6.6.4.2 In vivo 33
2.6.6.5 がん原性試験 34
2.6.6.5.1 長期がん原性試験 34
2.6.6.5.2 短期又は中期がん原性試験 34
2.6.6.5.2.1 ラット 34
2.6.6.5.2.1.1 (Tsuda, 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” 34
2.6.6.5.2.1.2 (Seraj, et al., 1997): “Effects of dietary bile acids on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in F344 rats” 35
2.6.6.5.2.1.3 (Baijal, et al., 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” 37
2.6.6.5.2.1.4 (McSherry, et al., 1989): “Effects of calcium and bile acid feeding on colon tumours in the rat” 39
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 42
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 42
2.6.6.6.2 胚及び胎児発生に関する試験 42
2.6.6.6.2.1 ハムスター 42
2.6.6.6.2.1.1 (Siviero, et al., 2008): “Hepatobiliary effects of cholic and lithocholic acids: experimental study in hamsters” 42
2.6.6.6.2.2 ヒツジ 42
2.6.6.6.2.2.1 (Perez, et al., 1994): “A single intravenous high dose of cholic acid to a pregnant ewe does not affect fetal well-being” 42
2.6.6.6.2.2.2 (Campos, et al., 1986): “Effects of cholic acid infusion in fetal lambs” 43

2.6.6.6.2.3 ニワトリ 44
2.6.6.6.2.3.1 (Verrett, et al., 1980): “Toxicity and Teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo” 44
2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生に関する試験 45
2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験 45
2.6.6.7 局所刺激性試験 46
2.6.6.8 その他の毒性試験 47
2.6.6.8.1 代謝物の毒性試験 47
2.6.6.8.2 不純物の毒性試験 50
2.6.6.8.2.1 コール酸メチル 50
2.6.6.8.2.1.1 (Macdonald, et al., 1978): “Effect of pH on bile salt degradation by mixed” 50
2.6.6.8.2.1.2 (Kim, et al., 2004): “A cholesterol biosynthesis inhibitor from Rhizopus oryzae” 51
2.6.6.8.2.1.3 (Suzuki, et al., 2008): “The novel compounds that activate Farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression” 51
2.6.6.9 考察及び結論 55
2.6.6.9.1 単回投与毒性試験（静脈内） 62
2.6.6.9.2 反復投与毒性試験（経口） 62
2.6.6.9.3 遺伝毒性試験 64
2.6.6.9.4 がん原性試験 64
2.6.6.9.5 生殖発生毒性試験 65
2.6.6.9.6 その他の毒性試験 66
2.6.6.9.7 結論 67
2.6.6.10 参照文献 70

図表目次

図 2.6.6-1: 異なる食餌を 1 年間与えたマウスの胆嚢内プール胆汁（上）及び各例の肝臓内胆汁（下）中の胆汁塩類の割合 17
図 2.6.6-2: 異なる食餌（各 n＝5）を 1 年間与えたマウス肝臓内の cholesterol 7α-hydroxylase 活性 17
図 2.6.6-3: 0.5%コール酸及び 1%コレステロールを給餌した際の胆汁中主要胆汁酸濃度（平均値と範囲） 25
図 2.6.6-4: 非抱合型及び抱合型胆汁酸の肝細胞生存率に対する用量依存的作用 33
図 2.6.6-5: 妊娠雌ヒツジにコール酸 29 mg を単回静脈内投与したときの母体血漿（●）、胎児血漿（X）及び羊水（○）中のコール酸濃度の経時的変化 43
図 2.6.6-6: コール酸メチル及び他の化合物に応答するレポーター遺伝子発現 52
図 2.6.6-7: レポーター遺伝子アッセイにおける FXR 活性化の差異 53

表 2.6.6-1: 胆嚢内プール胆汁の胆汁脂質組成 16

表 2.6.6-2: 胆汁酸を経口投与した際のアミノトランスフェラーゼ（AST、ALT）活性、総ビリルビン並びに総胆汁酸の血清中濃度にみられる影響 18
表 2.6.6-3: 体重及び心肝重量に胆汁酸が及ぼす影響 [a] 19
表 2.6.6-4: コール酸を添加した基礎飼料を給餌したラットの体重増加量と飼料利用効率 20
表 2.6.6-5: 離乳期ラットに 5 週間給与した添加物の影響 21
表 2.6.6-6: EFA 欠乏食に飽和脂肪を添加した際の影響 21
表 2.6.6-7: DAB 併用下、非併用下でコール酸又はリトコール酸を投与したラットの平均脾臓重量 23
表 2.6.6-8: DMSO、エタノール及び 50%エタノールに溶解したコール酸及びデオキシコール酸の彷徨試験の反復施行（TA98） 27
表 2.6.6-9: DMSO、エタノール及び 50%エタノールに溶解したコール酸及びデオキシコール酸の彷徨試験の反復施行（TA100） 27
表 2.6.6-10: コール酸、ケノデオキシコール酸及びデオキシコール酸の S. typhimurium TA100 を用いた彷徨試験の反復施行 28
表 2.6.6-11: コール酸及びケノデオキシコール酸、デオキシコール酸の S. typhimurium TA98 を用いた彷徨試験の反復施行 29
表 2.6.6-12: TA100 の復帰突然変異コロニー数（彷徨試験） 30
表 2.6.6-13: TA98 の復帰突然変異コロニー数（彷徨試験） 30
表 2.6.6-14: TA100 を用いたプレート変異原性試験（Ames 試験） 31
表 2.6.6-15: 胆汁酸の後投与により生じる肝臓中 GGT 病巣の数と面積 35
表 2.6.6-16: 胆汁酸を添加した食餌を 18 週間給餌した F344 ラット結腸における ACF の発生に対する効果 36
表 2.6.6-17: 胆汁酸を添加した食餌を給餌した F344 ラット結腸における ACF の発生と持続に対する効果 37
表 2.6.6-18: ACF に関する測定項目に対する 12 週間及び 20 週間の給餌の影響 38
表 2.6.6-19: 給餌後 12 週及び 20 週時点で増殖像別にみた ACF の数 38
表 2.6.6-20: 腫瘍に関する測定項目に対する給餌処置の影響 39
表 2.6.6-21: ラット割付投与群 39
表 2.6.6-22: 28 週時点の腫瘍発生率及び腫瘍の分類 41
表 2.6.6-23: 妊娠雌ヒツジへのコール酸静脈内投与前後にモニターした母動物及び胎児の心血管系パラメータ及び血液ガス 43
表 2.6.6-24: ヒツジ胎児に 5%ブドウ糖(対照群)又はコール酸(1.6 μmol·min^{-1}、実験群)を注入した際の心拍数(FHR)、動脈圧(MABP)、血液ガス及び血漿中総胆汁酸濃度(平均値 ± 標準偏差) 44
表 2.6.6-25: デオキシコール酸の影響を検討した単回投与毒性試験 48
表 2.6.6-26: デオキシコール酸の影響を検討した反復投与毒性試験 48
表 2.6.6-27: デオキシコール酸の影響を検討した遺伝毒性試験 49
表 2.6.6-28: デオキシコール酸の影響を検討したがん原性試験 50
表 2.6.6-29: コール酸を単回投与した際の影響を検討した全試験の概要 56

表 2.6.6-30: コール酸を反復投与した際の影響を検討した全試験の概要 57
表 2.6.6-31: コール酸の遺伝毒性作用を検討した全試験の概要 59
表 2.6.6-32: コール酸のがん原性を検討した全試験の概要 60
表 2.6.6-33: コール酸の生殖発生毒性作用を検討した全試験の概要 61

略語一覧

3β-HSD	3β-hydroxy -Δ^5-steroid oxidoreductase
Δ^4-3-oxoR	Δ^4-3-oxosteroid-5β-reductase
3MC	3-メチルコラントレン
4NoPD	4-nitro-o-phenylenediamine
ACF	異常腺窩巣
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AOM	アゾキシメタン
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
BP	血圧
bpm	毎分の拍動数
BS	胆汁酸塩
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
Co	対照
CSI	コレステロール飽和度
DAB	ジメチルアミノアゾベンゼン
DCA	デオキシコール酸
DEN	ジエチルニトロソアミン
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
ECFP	増強シアン蛍光タンパク質
EFA	必須脂肪酸
est	推定
exp	実験
EYFP	増強黄色蛍光タンパク質
F	雌
FHR	胎児心拍数
FXR	ファルネソイド X 受容体
FXRE	ファルネソイド X 応答配列
GFP	緑色蛍光タンパク質
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
HR	心拍数
HepG2	ヒト肝細胞株 G2
IAP	子宮内圧
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
i.v.	静脈内
L	レシチン
LCA	リトコール酸
MABP	平均動脈血圧
MC	コール酸メチル
MeCA	コール酸メチル
MeDCA	デオキシコール酸メチル
MF	実験動物用固形飼料
MMS	メタンスルホン酸メチル
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU	N-Methyl-N-Nitrosourea
N	例数（合計）
N/A	該当せず
n.d.	未測定
NaCl	塩化ナトリウム
NOAEL	無毒性量

略語一覧（続き）

OE33 cells	食道細胞
PAS	過ヨウ素酸シッフ
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
ROS	活性酸素種
RXR-α	レチノイド X 受容体-α
S.E.M.	平均値の標準誤差
SD	標準偏差
SHP	短いヘテロダイマーパートナー
T-β-MC	タウロ-β-ムリコール酸
T-ω-MC	タウロ-ω-ムリコール酸
TC	タウロコール酸
TCDC	タウロケノデオキシコール酸
TDC	タウロデオキシコール酸
TUDC	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
UKEMS	英国環境変異原学会
wt	体重
2-AA	2-アミノアントラセン

審査官への留意事項

これらの毒性試験の概要では、極めて多様な文献情報源からデータを収集している。このため、各情報源では日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH 基準）、及び GLP に適合しておらず、利用可能なデータに合わせてデータの提示法を調整する必要があった。

この毒性試験の概要には文献のみを収録しており、各文献が ICH 基準で規定された非臨床モジュール中の様々なセクションと関わる可能性がある。そこで、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。

可能であれば、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	雄	―	12 g
		雌	―	12 g
スナネズミ	成熟	雄	―	10 g
		雌	―	10 g
ヒツジ	成熟	雄	70 kg	
		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 妊娠動物

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

コール酸（Orphacol®）は胆汁酸である。一次胆汁酸であるコール酸とケノデオキシコール酸は、肝細胞においてコレステロールから合成される。一次胆汁酸とその代謝産物である二次胆汁酸のほか、グリシン及びタウリンとの抱合体はヒトを含む哺乳類の内因性分子である。

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

コール酸の毒性に関するレビューに用いた文献は以下のとおりである。

- マウス及びラットにおける単回投与毒性試験
- マウス、ラット及びスナネズミを用いた反復投与毒性試験
- In vitro の遺伝毒性データ
- ラットにおけるがん原性試験
- ハムスター、ヒツジ及びニワトリを用いた胚・胎児発生試験

In vivo 遺伝毒性データ又は受胎能、出生後の発生又は母体の成長に関する試験を評価した文献は見当たらなかった。

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

可能な場合、ラットに投与したコール酸用量の絶対値又は割合を、生理的なコール酸のプールサイズの平均値と比較した (Cronholm, et al., 1974), (Carrella & Dietschy, 1977), （2.6.5 項）。コール酸のプールサイズは、対照群 2 群で 175～245 mg/kg、136～190 mg/kg (Carrella & Dietschy, 1977)又は、118 mg/kg (Cronholm, et al., 1974)と報告された。したがってラットにおけるコール酸プールサイズの現実的な推定値は 150 mg/kg と考えられた。マウスのコール酸プールサイズについては、168 ± 21 µmol/kg 体重（69mg/kg）とする報告が 1 件ある (Hulzebos, et al., 2001)。しかし、実験時の反復検体採取中に大量の胆汁が採取されたため値が過小に見積もられており、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、当文献で報告されたラットのプールサイズに関する結果は考慮しない。しかし、マウスでは、これより適切な値が得られないため、コール酸プールサイズの基準値として 69 mg/kg を用いている。しかしこの値は過小に見積もられている可能性が高いため、1 日投与量の内因性プールサイズに対する割合は過大な見積もりになると考えられる。

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。

- 試験の要約

コール酸の単回投与毒性試験は、系統的な分析がなされておらず、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、コール酸を静脈内投与した際のLD_{50}は、マウスに静脈内投与した場合だと350 mg/kgであり、明らかに極めて高い。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。後者を除き、特定の毒性作用について、実験的に十分に裏付けられた観察結果の記載はなかった。

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。直腸出血や脾腫等報告されている。

肝重量の増加、胆嚢損傷及び胆石の形成は、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。げっ歯類に0.5%コール酸と1%コレステロール（又はそのコレステロール相当量）を加えた飼料を給餌することで、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。

コール酸が遺伝毒性作用を有するかどうかについては、相反する試験結果が出たことから、結論が出ていない (Watabe & Bernstein, 1985)。しかし、その後の試験では、哺乳類細胞を用いたin vitro小核試験とともに、変異原性はないとする結果が一貫して認められた。

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。しかし、発がん性物質による肝癌及び結腸癌誘発モデルを用いた短期又は中期試験によるがん原性の検討結果が得られた。こうしたモデルを用いた研究数件によると、コール酸は、発がん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可能性が示唆されている。コール酸を単独投与したところ、発がん性はみられなかったものの、これは短期の実験によるものであり、従来のがん原性試験とは比較できない。実験的に誘発したラット肝癌及び結腸癌モデルにおいて、100～150 mg/kgのコール酸で腫瘍促進効果が示された。これらの試験における1日投与量は、内因性濃度（算出値）の0.5～1倍であった。よって、発がん促進作用は、比較的高用量を投与した場合に生じる可能性がある。興味深いことに、コール酸の発がん促進作用は、結腸癌の初期のみにみられた。

ラット及びヒツジを用いた試験では、胎児血中にコール酸が存在しており、胎盤を通過することが認められた。動物の生殖と発生への影響についてハムスターで検討したところ、コール酸によって、母動物と仔双方の肝臓組織像に毒性作用が認められた。しかし、ハムスターの飼料中には0.5%コール酸（60 mg/日）が含まれていた。マウスとラットの内因性コール酸プールサイズを考えると、内因性プールサイズ相当量を日々投与した可能性が高い。妊娠ヒツジへのボーラス

注射と、胎児ヒツジへ 1 日当たり 934 mg の持続注入によりコール酸を投与したところ、胎児の早期分娩が認められた。

しかし、内因性分子として存在する生理的濃度でのコール酸は、確実に胚毒性はない。

コール酸の主要代謝産物のデオキシコール酸でも、同様の用量範囲でコール酸と非常に類似した毒性作用を示すことが多くの文献より示されている。しかし、単回及び反復投与試験では、コール酸が同じ作用を生じるのに必要な用量の約半量のデオキシコール酸で、致死作用、消化管毒性及び肝毒性がみられた。コール酸と同様、デオキシコール酸の遺伝毒性の有無についても、細菌を用いた試験によって決定的な証拠は得られていない。しかし、in vitro 小核試験では明確にデオキシコール酸の遺伝毒性がみられた。肝発がん及び結腸発がんラットモデルでは、コール酸と同様、デオキシコール酸は前がん病変の発生を増強する。

不純物であるコール酸メチルに関する文献は限られている。コール酸メチルは、エームス試験において変異原性がみられず、コール酸に類似した薬力学的特性を有する可能性があることが示されている。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 投与経路：静脈内

2.6.6.2.1.1 マウス

2.6.6.2.1.1.1 (Rothlin & Schalch, 1944): “Vergleichende Untersuchung einiger Gallensäuren” 英題名 “Comparative investigation of some bile acids”

本試験は、コール酸の致死量を検討する白色マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験であった。さらに、一連の胆汁酸（デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グリココール酸及びタウロコール酸）の、物理化学的及び生物学的特性（界面活性剤特性、膵リパーゼの活性化、ネコにおける胆汁分泌促進作用、ヒト、ネコ及びウサギ赤血球に対する溶血作用）を評価し、その関連性を検討することも本試験の目的とした。

白色マウスに被験物質を 30 秒間かけてボーラス静脈内投与した。被験物質の正確な組成は不明であった。致死量の下限及び上限は、予備実験（未発表）でそれぞれ 200 mg/kg 及び 500 mg/kg 体重とした。マウスの体重を 20 g と仮定して計算したところ、コール酸の用量は絶対値で 4～10 mg と算出された。これは、コール酸プールの約 3～7 倍に相当した。主試験では、計 74 例に投与し、LD_{50} を 350 mg/kg すなわち 0.86 mmol/kg と決定した。マウスの LD_{50} の絶対値は、推定コール酸胆汁プールの約 4 倍に相当する 7 mg と計算される。毒性徴候として、掻破をはじめとした運動過多がみられ、用量によっては、運動失調や昏迷を伴う間代性強直性痙攣に悪化がみられた。極度の痙攣がみられる段階に達した例は 5～10 分以内に死亡するが、1～2 時間以内に死亡する例もまれに存在した。生存例でも程度は弱いものの同じ徴候がみられ、5～8 時間以内に回復した。病理組織データは示されなかった。

一連の胆汁酸を用いた追加の試験では、界面活性剤特性と溶血性が、致死毒性と強く相関していたが、膵リパーゼの活性化及び胆汁分泌特性は独立した特性としてみられた。

静脈内の胆汁酸が持つ界面活性特性によって溶血が生じ死に至ることから、界面活性剤特性や溶血性が、致死量との間に因果関係を持つと結論づけられた。

2.6.6.2.1.2 ウサギ

2.6.6.2.1.2.1 (Gillert, 1926): “Die Giftigkeit der Gallensäuren.” 英題名 “The toxicity of bile acids.”

本試験は、コール酸（コール酸ナトリウム）の致死量を検討するウサギを用いた単回静脈内投与毒性試験であった。このほか、グリココール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、アポコール酸ナトリウム（3α,12α-Dihydroxy-5β,8(14)-cholen-24-oic acid のナトリウム塩）、デヒドロコール酸、menthadioxycholanic acid（商品名デガロール、Riedel-de Haën 社）の致死量を測定することを目的とした。

ウサギに被験物質 1%溶液をボーラス静脈内投与した。被験物質の正確な組成は不明であった。投与動物数は示されていないが、デヒドロコール酸（8 例）及びデオキシコール酸（4 例）について個々の結果が詳述されているため、各用量 1 例と考えられる。

用量を 30 mg/kg としたところ目に見える変化はなく、忍容性がみられた。用量を 40 mg/kg としたところ絶叫を引き起こした。用量を 50 mg/kg としたところ、痙攣がみられたが、速やかに回復した。用量を 60 mg/kg としたところ、注射時に即死した。病理組織データは示されなかった。

加えて、試験対象とした胆汁酸の界面活性特性との致死量との相関について検討した。

結果、致死量及び亜致死量は 50 mg/kg であると結論付けた。しかし、データを考慮すると、この結論は誤植であり、致死量は 60 mg/kg、亜致死量が 50 mg/kg である可能性が高い。70 kg のヒトでは、3500 mg の静脈内投与に忍容性があると結論づけられた。毒性作用については、血液や血管に対する界面活性剤特性によるものであること、おそらく肝毒性が生じていること、また、呼吸麻痺により倒れたことから中枢作用も有することを考察している。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 投与経路：経口

2.6.6.3.1.1 マウス

2.6.6.3.1.1.1 (Besançon, et al., 1970): “Lithiase expérimentale par excès d’acide cholique chez la souris.” 英題名 “Experimental lithiasis through excess cholic acid in mice.”

本試験は、Swiss 系マウスを用いた 2～8 カ月間の反復投与混餌試験であり、コール酸及び高コレステロール飼料の摂餌が及ぼすコレステロール胆石及び胆嚢病変への影響を検討した。

雌マウスに、0.5%もしくは 1%のコール酸のみ添加した食餌、又は 0.25%コール酸と 0.25%デヒドロコール酸を添加した食餌を 2～8 カ月間投与した。基礎飼料は高コレステロール食としたが、コレステロール量の明示はなかった（飼料中のコレステロール含量は文献に記載されていない）が、ラードを 30%含有する Tepperman による飼料 (Tepperman, et al., 1964)に類似しており、コレステロール含量は約 1%[6]と考えられる。実験に用いたマウスの体重は約 30 g とされていた。したがって、コール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 22.5 又は 45 mg（0.5%又は 1%コール酸）と算出された。これはコール酸プールの約 11～22 倍に相当する。コール酸の相対投与量は 1 日当たり 750 又は 1500 mg/kg であった。投与例数の明示はなく、投与後生存した個体数のみ記載されていた。当該期間内に、0.5%コール酸群では 8 例が 2 カ月間、19 例が 4 カ月間及び 6 例が 8 カ月間投与を受け、1%コール酸群では、5 例が 2 カ月間、10 例が 4 カ月間及び 3 例が 8 カ月間の投与を受けた。0.5%コール酸群での死亡率は、4 カ月後には 20 例中 1 例であり、無視できると考えた。コール酸を 0.5%又は 1%の濃度で通常飼料に加えた場合、コレステロール結石及び胆嚢病変が生じ、肝重量が増加した。組織像では、胆嚢への病変と肝脂肪変性を認めた。これらの作用は、0.5%コール酸群と比べ 1%コール酸群で顕著であった。コール酸とデヒドロコール酸を同時投与した場合は、結石形成及び肝毒性作用の程度ははるかに弱かったが胆嚢病変は、0.5%コール酸群でみられたものと同様であった。

結論として、デヒドロコール酸と比べてコール酸の結石形成作用は安定しておらず、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。

2.6.6.3.1.1.2 (Wang, et al., 1999): “Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis.”

C57L/J マウスにおける 1 年間反復投与混餌試験で、0.5%コール酸含有飼料を用いて結石形成性を有する給餌をした場合の、コレステロール吸収、肝臓コレステロールのホメオスタシス、胆汁分泌、及び結石形成にみられる影響を検討する。

本研究では、1%コレステロールを含む固形飼料を、0.5%コール酸（750 mg/kg/日、コール酸プールサイズの 11 倍）を添加又は非添加の条件で、胆石ができやすい C57L/J 雄マウスに 1 年間給餌した。これらのマウスには、lith 遺伝子があるため、1%コレステロール飼料に 0.5%コール

[6] http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_details.asp?FoodId=1135

酸を加えて給餌したマウスの 100%が胆石を形成した。胆石の個数はほとんどの例で 7～9 個であった。

通常の固形飼料と 1%コレステロールを含む固形飼料を与えたマウスでは、1 年後の胆嚢容積が同程度であった。また、上記両群の胆嚢容積は、1%コレステロールを含む固形飼料に 0.5%コール酸を加えて給餌したマウスと比べて有意に小さかった。給餌 1 年後の時点で、胆嚢の胆汁脂質組成と肝臓の胆汁酸の組成は、固形飼料を給餌したマウスと 1%コレステロールを含む固形飼料を給餌したマウスで概ね同程度であった。これら 2 群のマウスと比較して、1%コレステロールと 0.5%コール酸を含む固形飼料を給餌したマウスでは、コレステロールのモル%濃度及びレシチンが顕著に増加したが、胆汁酸塩の割合は減少した（表 2.6.6-1）。見かけのコレステロール飽和度（CSI）は、1%コレステロールと 0.5%コール酸を含む固形飼料を与えたマウスでは 1.74 と、他群のマウス（固形飼料を与えたマウスでは 0.52、1%コレステロールを含む固形飼料を与えたマウスでは 0.64 と同様の値であった）と比較して有意に高かった（表 2.6.6-1）。

表 2.6.6-1: 胆嚢内プール胆汁の胆汁脂質組成

給餌	Ch（モル%）	L（モル%）	BS（モル%）	L/(L+BS)	[TL]（g/dl）	CSI
固形飼料	2.29	11.83	85.89	0.12	8.68	0.52
1% Ch	2.70	11.35	85.95	0.12	7.66	0.64
1% Ch + 0.5% CA	12.21	22.64	65.14	0.26	6.61	1.74

胆嚢内プール胆汁（n=20/群）から値を求めた。Ch：コレステロール、L：レシチン、BS：胆汁酸塩、[TL]：総脂質濃度、CSI：コレステロール飽和度、CA：コール酸、1%コレステロールと 0.5%コール酸を含む固形飼料群は固形飼料群又は 1%コレステロール含有固形飼料群と比べて有意差あり（*P<0.05 及び**P<0.01）

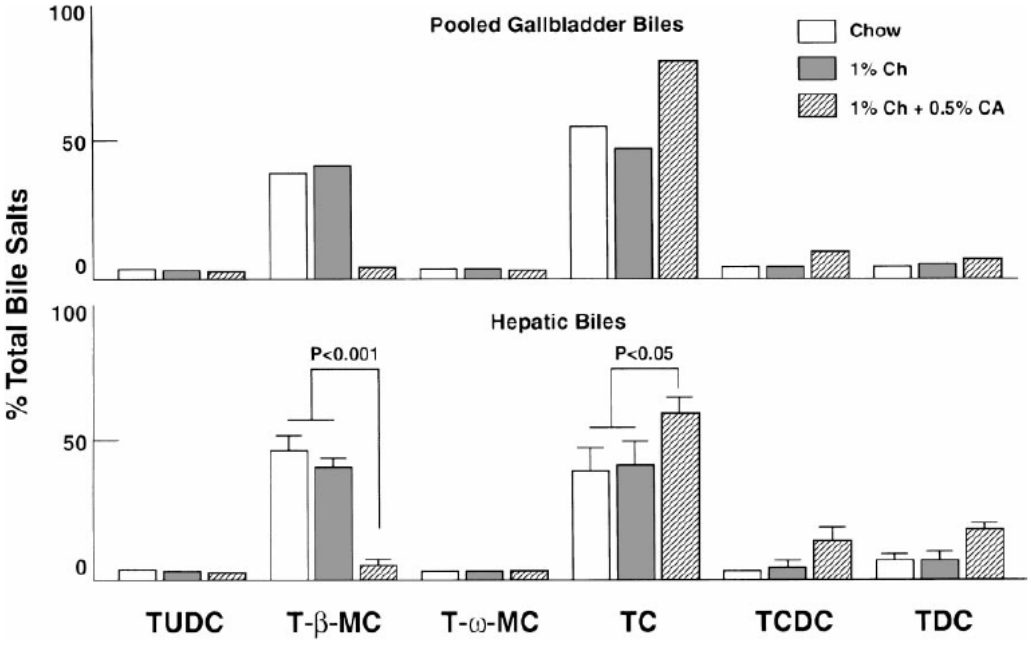
胆汁酸塩は全てタウリン抱合体であり、いずれの例でも、胆汁酸塩組成の分布は胆嚢と肝臓の胆汁で同様であった。1%コレステロールと 0.5%コール酸を含む固形飼料を与えたマウスでは、疎水性のタウロ-β-ムリコール酸（T-β-MC）の濃度が 3.1～4.0%と有意に減少し、タウロコール酸（TC）の濃度が 58.7～77.6%と顕著に増加した（図 2.6.6-1）。

固形飼料又は 1%コレステロール含有固形飼料を与えたマウスと比較して、コレステロールの吸収率は、1%コレステロールと 0.5%コール酸を含む飼料を与えたマウスでは 55 ± 5%、コレステロール不含でコール酸を含む飼料を与えたマウスでは 63 ± 7%と、有意に増加した（P < 0.001）。図 2.6.6-2 に示すように、1%コレステロールと 0.5%コール酸を含む飼料を 1 年間給餌した場合、cholesterol 7α-hydroxylase 活性は 1.8 ± 1.3 pmol· min^{-1}· mg^{-1} と、固形飼料投与群の 5.2 ± 2.4 pmol· min^{-1}· mg^{-1}、1%コレステロール飼料投与群の 5.0 ± 2.9 pmol· min^{-1}· mg^{-1} と比較して、有意に低下した（P < 0.05）。

まず、コール酸によって腸管のコレステロール吸収と胆汁中コレステロール量が増加し、さらに結石形成に向けた相転移が生じることで、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るとする知見が得られた。さらに、この試験により、コール酸は 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形成の促進並びに胆嚢肥大を誘発した。マウスに

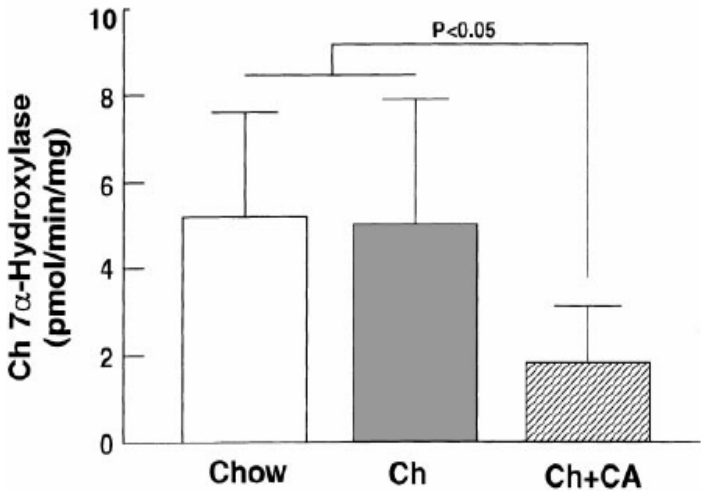
1%コレステロールを単独で投与した場合、結石形成作用もホメオスタシス作用も認められなかった。

図 2.6.6-1: 異なる食餌を 1 年間与えたマウスの胆嚢内プール胆汁（上）及び各例の肝臓内胆汁（下）中の胆汁塩類の割合



Ch：コレステロール、CA：コール酸、TUDC：タウロウルソデオキシコール酸、T-β-MC：タウロ-β-ムリコール酸、T-ω-MC：タウロ-ω-ムリコール酸、TC：タウロコール酸、TCDC：タウロケノデオキシコール酸、TDC：タウロデオキシコール酸

図 2.6.6-2: 異なる食餌（各 n = 5）を 1 年間与えたマウス肝臓内の cholesterol 7α-hydroxylase 活性



2.6.6.3.1.2　ラット

2.6.6.3.1.2.1　(Delzenne, et al., 1992): “Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies”

本試験は、Wistar ラットを用いた 2 週間反復投与混餌試験であり、コール酸及びその他の胆汁酸による肝毒性を検討した。

試験の in vivo 部分では、Wistar 雄ラット 10 例（体重 180g）の群に、0.5%又は 1%のコール酸、デオキシコール酸又はリトコール酸を添加した飼料を 2 週間与えた。したがって、投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 45 mg 及び 90 mg と算出された。これは、算出コール酸プールのそれぞれ 1.7 倍及び 3.3 倍に相当した。このとき、相対投与量は 1 日当たりそれぞれ 250 mg/kg 及び 500 mg/kg と算出された。実験期間終了時に、肝臓の検査項目と血清胆汁酸（表 2.6.6-2）、肝組織像を検討した。

表 2.6.6-2: 胆汁酸を経口投与した際のアミノトランスフェラーゼ（AST、ALT）活性、総ビリルビン並びに総胆汁酸の血清中濃度にみられる影響

投与群		N	AST（IU/L）	ALT（IU/L）	ビリルビン（mg/dL）	総胆汁酸（μmol/L）
対照		10	42 ± 3	23 ± 1	n.d.	30 ± 2
コール酸	0.5%	10	49 ± 9	36 ± 8	n.d.	48 ± 11
	1%	10	52 ± 3	46 ± 8	n.d.	124± 4 b
デオキシコール酸	0.5%	9	590 ± 80 [b]	578 ± 174 [a]	9 ± 3	662 ± 201 [a]
	1%	7	2000 ± 560 [b]	1155 ± 559 [b]	12 ± 5	500 ± 120 [b]
リトコール酸	0.5%	10	39 ± 4	20 ± 4	3 ± 1	66 ± 7 [a]
	1%	9	145 ± 38	133 ± 27 [a]	5 ± 1	207 ± 25 [b]

表に示した値は、平均値 ± SE である。n = 各群例数（10 例未満の場合は、実験期間中に死亡したことを示す）a: $P < 0.05$ 及び b: $P < 0.01$（Student の t 検定）、n.d.検出不能（血清中 1 mg/dL 未満）。

コール酸を投与した場合は、トランスアミナーゼの上昇と血清総胆汁酸濃度の用量依存性の上昇がみられ、これはわずかな胆汁うっ滞を示す所見であった。デオキシコール酸を投与した場合、肝トランスアミナーゼ、ビリルビン、総胆汁酸の極めて大きな上昇がみられ、また、致死率が顕著であった。リトコール酸を投与した場合は、これらの中間的な影響がみられた。コール酸を投与した場合は、肝小葉構造にみられる影響はわずかなものにすぎなかったが、デオキシコール酸を投与した場合は、肝組織像に大きな病理学的変化がみられた。リトコール酸を投与した場合は、やはりこれらの中間的な所見がみられた。

コール酸を投与した場合は、肝臓中の胆汁酸濃度の変化はみられず、自身とその主要代謝産物であるデオキシコール酸の割合が増加した一方でムリコール酸の濃度が減少したことで、その組成量がわずかに変化したのみであった。

このように、検討対象とした 3 種類の胆汁酸のうち、コール酸の毒性作用が最も弱く、デオキシコール酸が最も強かった。リトコール酸でみられた影響が比較的軽度であったことは、げっ歯類でその腸管吸収が弱く、代謝が広いことに関連している可能性がある。

2.6.6.3.1.2.2　(Bray & Gallagher Jr, 1969): “Weight gain and intestinal histology of rats fed cholic, lithocholic, hyodeoxycholic, chenodeoxycholic, and deoxycholic acids”

本試験は、Sprague-Dawley ラットを用いた 26 日間反復投与試験であり、コール酸が腸粘膜への直接作用を介して食物の取り込みを阻害し、最終的に組織学的変化を引き起こすかどうかを検討した。

Sprague‐Dawley 雄ラット 7 例に、0.15%コール酸を添加した飼料を 26 日間与えた際に、体重を週 2～3 回記録した。コール酸の 1 日投与量の絶対値は 4.5 mg と算出された。これはコール酸プールの約半分に相当する。一方、相対投与量は 1 日当たり約 75 mg/kg と算出された。26 日目にラットは屠殺し、腸、肝臓、心臓、生殖腺及び甲状腺の重量を測定した。また、心臓、肝臓、十二指腸付き胃、結腸付き回腸の切片を 10%ホルマリン液並びに Zenker 液で固定した。固定組織切片を作成し、ヘマトキシリン及びエオジンで染色した。

最初の 1 週間が経過した時点で、コール酸及びリトコール酸を投与したラットは、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸又はヒオデオキシコール酸を投与した他のラットよりも体重が有意に軽かった（表 2.6.6-3）。3 週間の終了時点では、胆汁酸を投与した全例で平均体重が減少していた。

ラット屠殺時点で、コール酸を投与したラットでは、体重 100 g 当たりの肝相対重量が減少した。また、コール酸及びリトコール酸を投与したラットでは体重 100 g 当たりの心臓重量が有意に増加したが、他の胆汁酸を投与したラットではこうした増加はみられなかった（表 2.6.6-3）。いずれの胆汁酸を投与したラットでも、生殖腺と甲状腺の重量に対する影響はみられなかった。

心臓、肝臓、十二指腸、回腸及び結腸の組織切片では、胆汁酸の摂取によるものとみられる組織学的変化はみられなかった。

飼料中に 0.15%の割合で胆汁酸を添加した場合はコール酸を含めいずれも、30 日間を通じた体重増加量が低下していたが、いずれの場合も腸粘膜に組織学的変化はみられなかった。

表 2.6.6-3: 体重及び心肝重量に胆汁酸が及ぼす影響 [a]

胆汁酸	例数	体重	肝臓（g）	% Wt（g/体重 100 g）	心臓（mg）	% Wt（mg/体重 100 g）
なし	5	205 ± 6[b]	8.3 ± 0.3	4.05 ± 0.15	809 ± 52	390 ± 25
リトコール酸	7	161 ± 6	6.3 ± 0.3	3.91 ± 0.16	740 ± 21	460 ± 13
デオキシコール酸	5	165 ± 7	6.9 ± 0.3	4.18 ± 0.24	700 ± 10	420 ± 10
コール酸	7	144 ± 5	5.1 ± 0.2	3.52 ± 0.19	653 ± 18	450 ± 12
ケノデオキシコール酸	7	172 ± 7	6.5 ± 0.4	3.75 ± 0.25	717 ± 24	420 ± 14
ヒオデオキシコール酸	7	181 ± 5	7.2 ± 0.4	3.98 ± 0.2	818 ± 74	450 ± 15

a: 体重及び臓器重量は、26 日間胆汁酸投与後に測定した
b: 平均値 ± S.E.M.、wt：体重

2.6.6.3.1.2.3　(Visek, et al., 1965): “Growth of rats fed bile salts, urea and chlortetracycline”

本試験は、Holzman ラットを用いた 28 日間反復投与混餌試験であり、コール酸による体重への影響を検討した。

コール酸ナトリウム 0.1%又は 2%を添加した飼料を 28 日間連日給餌した Holtzman ラット 6 例の平均体重を測定した（表 2.6.6-4）。ラットの初期重量は約 53 g であった。コール酸ナトリウ

ム 0.1%又は 2%であることから、投与開始時のコール酸の投与量の絶対値はそれぞれ 1 日当たり 2.65 mg 及び 53 mg と算出された。これは、算出コール酸プールのそれぞれ約 1/3 及び 7 倍に相当した。このとき、相対投与量はそれぞれ 1 日当たり 50 mg/kg 及び 1000 mg/kg と算出された。

表 2.6.6-4: コール酸を添加した基礎飼料を給餌したラットの体重増加量と飼料利用効率

投与群			28 日体重増加量（g）[a]	増加量／飼料比 [b]
1	基礎飼料		103.5	0.359
2	基礎飼料	＋0.1%コール酸	104.0	0.373
3	基礎飼料	＋2.0%コール酸	21 日後の生存例なし	

a: 各群 6 例の平均値体重増加の平均二乗誤差は 230.6 である。
B: 増加量／飼料比の平均二乗誤差は 0.0014 である。

0.1%コール酸ナトリウム（コール酸プールの約 1/3 に相当）を給餌したところ、体重増加の減少はみられなかったが、2.0%コール酸ナトリウム（1 日当たりコール酸プールの 7 倍）を給餌した例は 7 日目から 21 日目の間に死亡した（表 2.6.6-4）。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。

2.6.6.3.1.2.4　(Gambal & Quackenbush, 1960): “Effects of cholesterol and other substances on essential fatty acid deficiencies”

本研究は、Wistar ラットにおける 5 週間給餌試験であり、必須脂肪酸を含まない低脂肪食で飼育したラットの屠体全体と肝臓の脂質及び必須脂肪酸（EFA）欠乏症状に及ぼすコール酸の影響を検討した。

本研究は、必須脂肪酸を含まない低脂肪食で飼育したラットにおいて、コレステロール、コール酸、グリココール酸ナトリウム、ビタミン B 並びにこれらの組み合わせを給餌した際の屠体全体と肝臓の脂質及び EFA 欠乏症状に及ぼす影響を検討した。体重約 45 g の雄の離乳 Wistar ラットを、表 2.6.6-5 に示すとおりに 7 つの給餌群に分け、5 週間給餌した。添加物はコール酸も含め、飼料中の添加割合は 1%とした。投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 22.5 mg と算出された。これは、算出コール酸プールの 3.3 倍に相当した。このとき、相対投与量は 1 日当たり 500 mg/kg と算出された。

コール酸を投与された動物は、重度の胃腸障害を示す所見として下痢がみられ、うち 2 例は 5 週間以内に死亡した。コール酸によって体重増加の抑制がみられ、最大体重は対照群の 36%であった。食餌にコレステロールを添加することで、下痢と成長抑制は幾分軽減された。肝臓脂質に対する最も顕著な影響は、コレステロールを添加した給餌にコール酸又はグリココール酸ナトリウムを加えた場合にみられた。これらの物質によって、コレステロールを単独で添加した場合の 3～4 倍に肝臓脂質が増加した。コール酸を含有する全ての飼料で、屠体脂質は大幅に減少した。

コール酸を含む飼料でビタミン B 量を増やした場合は、体重が減少するとともに肝臓脂質が増加する傾向がみられた。コール酸の給餌でみられる成長抑制については、ビタミン B を 50%増量した場合や、コレステロールと米糠濃縮物を加えた場合には、より大きくなると考えられた。ただし、コレステロール非存在下では、コール酸にビタミン B を添加しても、体重への影

響はほとんどなかった。米糠濃縮物を添加することで、下痢が軽減し、摂餌量が増加することで体重も増加すると考えられた。

表 2.6.6-5: 離乳期ラットに 5 週間給与した添加物の影響

給餌番号	基礎飼料への添加物 [1]	例数			平均体重増加量	平均総脂質	
		開始時	皮膚炎発現	死亡		屠体	肝臓
					対照に対する割合（%）	% S.E[4]	% S.E
1	大豆油（陽性対照）	5	0	0	100	4.9 ± 0.71	1.8 ± 0.10
2	なし	7	0	0	75	4.4 ± 0.46	2.4 ± 0.78
3	コレステロール	7	5	0	58	3.8 ± 0.57	3.4 ± 0.52
3a	コレステロールと R.B.[3]	7	7	0	70	3.1 ± 0.28	3.8 ± 0.98[5]
3b	コレステロールと R.B.[3]+ B[2]	7	0	0	75	3.5 ± 0.41	5.0 ± 0.36
4	コール酸	7	0	2	36	1.6 ± 0.17	1.9 ± 0.35
4a	コール酸と R.B.[3]	7	0	0	45	1.5 ± 0.09	2.5 ± 0.19
4b	コール酸 ＋B[2]	7	0	0	30	2.1 ± 0.22	3.9 ± 0.41
5	コレステロールとコール酸	7	0	0	59	1.7 ± 0.19	7.4 ± 1.01[5]
5a	コレステロール、コール酸、R.B.[3]	7	0	1	46	1.9 ± 0.12	12.9 ± 1.59[5]
5b	コレステロールとコール酸+B[2]	7	0	0	41	2.1 ± 0.23	9.4 ± 1.14[5]
6	グリココール酸ナトリウム	7	3	0	66	2.7 ± 0.30	4.4 ± 0.52
7	コレステロールとグリココール酸	7	4	0	58	3.6 ± 0.24	13.7 ± 0.58

1: 特段の記載がなければ、添加物はいずれも飼料の 1%とした
2: ビタミン B は 50%増量した。
3: R.B.：水溶性米糠濃縮物 2%
4: 平均値の標準誤差
5: 異常値を 1 件含む

また、無脂肪の EFA 欠乏飼料でもコレステロールとコール酸を加えた際に成長抑制作用が認められた（表 2.6.6-6）。飼料中に水添ヤシ油を加えたところ、コレステロールとコール酸をともに給餌した際にみられる成長抑制効果が低下した。

表 2.6.6-6: EFA 欠乏食に飽和脂肪を添加した際の影響

給餌番号	基礎飼料への添加物	平均体重増加量		皮膚炎を示した例数	
		無脂肪食	3%脂肪食 [a]	無脂肪食	3%脂肪食 [a]
		対照に対する割合（%）	対照に対する割合（%）		
1	なし（対照）	100	100	0	0
4	コール酸	41.2	48.0	0	0
3	コレステロール	84.5	74.0	0	4
5	コレステロールとコール酸	48.6	79.0	0	1

a: 水添ヤシ油

コール酸（算出コール酸プールの 3 倍）によって、EFA 欠乏による症状の促進は生じないものの、下痢、成長抑制及び体脂肪蓄積抑制が生じるとする結論であった。また、コール酸とともにコレステロールを混餌投与した場合、肝臓の脂質含有量が数倍に増加した。

2.6.6.3.1.2.5　(Lacassagne, et al., 1967): “Étude comparative du foie de rats récevant l’acide cholique ou l’acide lithocholique seuls, ou associés avec du jaune de beurre” 英題名 “Comparative study of the liver of rats receiving cholic acid or lithocholic acid, alone or associated with butter yellow”

Wistar ラットを用いた 2 件の慢性給餌（1 年、9 カ月）試験において、コール酸を単独又は発がん物質のパラ - ジメチルアミノアゾベンゼン（DAB）と併せて投与した際の毒性を検討している。このとき比較対照としてリトコール酸を用いた。

1 年間の試験では、Wistar 雄ラット 10 例（平均体重：370g）にコール酸 0.05%を含む低タンパク食を給餌した。投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 9.25 mg と算出された。これは、算出コール酸プールの 1/6 に相当した。このとき、相対投与量は 1 日当たり 25 mg/kg と算出された。屠殺は、32、95、153、211、264、285、319、333、349 及び 362 日目に各 1 例とした。対照群では、ラット 6 例に食物中にリトコール酸を同濃度で投与した。屠殺は 28、49、103、161、272 及び 372 日目に各 1 例とした。いずれの群でも死亡例はなかった。開始時の平均体重が 370 g であったコール酸投与群では、平均 100 g の体重減少がみられた。一方、リトコール酸では体重は不変だった。肝臓の肉眼所見は正常であったが、いずれの投与群でも肥大がみられた。組織像では脂肪変性、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。精子形成は、最終観察時を除いて、いずれの投与群でも正常であった。なお当該時点の所見は、ラットの年齢に起因すると考えられた。副腎の重量は正常であった。組織像では、皮質の束状層及び網状層に細胞空胞化の増加がわずかにみられ、腺細胞及び内皮細胞に、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色性リポクロムの増加を認めた。

コール酸を投与した 2 例とリトコール酸を投与した 1 例で白血球の増多がみられた。脾臓組織像では、多核細胞のびまん性浸潤、閉塞、小出血がみられた。最初の数カ月時点でビルロート索の大きさは、骨髄赤血球細胞塊の発生によって増加した。同時にマルピーギ小体の萎縮がみられ、その濾胞構造は消失していた。5 カ月後の時点では、骨髄造血が大きく減少又は消失した。傍濾胞細胞及び細網細胞にはヘモジデリンが沈着しており、硬化性が認められた。

9 カ月間の試験では Wistar 雄ラット 10 例に、コール酸又はリトコール酸 0.05%（コール酸の用量計算については上記参照、動物の平均体重は 380g で、若干重いが差は無視できる）を 0.06%の DAB と併せて添加した飼料を給餌し、DAB による肝発がんへの影響を検討した。ラットは 278 日まで定期的に屠殺し、肝臓を観察した。最初、肝臓表面に肉眼的な変化がみられ、ステージ IV（前がん性）を示す DAB の毒性が発現したのは、コール酸投与ラットでは 89 日目（発現時として通常）に、リトコール酸投与ラットでは 147 日目（発現時として極めて遅い）にみられた。リトコール酸の連日投与では、コール酸の投与と比べて DAB の毒性効果をわずかに遅らせることができた。これは、リトコール酸が DAB 毒性から肝細胞を保護しているためと考えられた。ラットを 2 つの投与群に分けて投与をしたところ、脾臓の重量は、各投与群で異なっていた。コール酸を単独又は DAB と併用投与したラットでは、リトコール酸を単独又は DAB と併用投与したラットと比べて、DAB 毒性による脾臓の肥大が重度であった（表 2.6.6-7）。

表 2.6.6-7: DAB 併用下、非併用下でコール酸又はリトコール酸を投与したラットの平均脾臓重量

胆汁酸	脾臓重量（N=10）	観察所見
CA	1,100 g	軽度の肥大がみられたが、ほとんどの場合進行性ではなかった。
LCA	0,890 g	正常範囲
CA + DAB	1.900 g	2.200g 及び 2.500g と著しい肥大が 2 例にみられた。
LCA + DAB	1,390 g	肥大に進行性はみられなかった。

CA：コール酸、LCA：リトコール酸、DAB：パラ-ジメチルアミノアゾベンゼン

リトコール酸及びコール酸には、DAB の発がん性に対する促進作用がみられなかった。リトコール酸を数カ月間連日投与した際にみられた毒性は、コール酸と比べてやや低かった。

2.6.6.3.1.3　スナネズミ

2.6.6.3.1.3.1　(Bergman & van der Linden, 1971): “Reaction of the mongolian gerbil to a cholesterol-cholic acid-containing gallstone inducing diet”

スナネズミを用いた 2 件の 4 カ月間反復投与混餌試験であり、肝臓、胆嚢、肺、心臓、脾臓、リンパ節、腎臓、副腎及び甲状腺を含む様々な臓器に対してコール酸単独又はコレステロールと併用投与した際にみられる影響を検討した。

最初の試験では、雌雄のスナネズミ 30 例（平均体重：60g）に、1%コレステロールと 0.5%コール酸を添加した固形飼料を 4 カ月間給餌した。投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 50 mg と算出された。このとき、相対投与量は 1 日当たり 833 mg/kg と算出された。対照群 8 例には未添加の飼料を給餌した。

投与期間終了時に生存例を屠殺し、肝臓、胆嚢、肺、心臓、脾臓、リンパ節、腎臓、副腎及び甲状腺を含む種々の臓器の重量測定し検査した。

4 カ月後時点で、試験群の生存例は 7 例であったのに対し、対照群では 6 例であった（p = 0.0105、Fisher の正確確率検定）。試験群の生存例の平均体重は、対照群の 72.8 g と比較して 75.1 g に上昇していた。

平均肝重量は、対照群が 3.1 g であったのに対し、コレステロールとコール酸投与群は 11.1 g であり、非常に有意な差がみられた。試験群の生存例の肝臓は、淡黄色を呈しており、これは極度の脂肪変性を示す所見であった。また、胆嚢が極度に拡張していた。生存例の 7 例中 5 例で、小さなコレステロール胆石の大量の蓄積が認められた。実験最終月に死亡した動物ではほとんどに同様の胆石がみられた。対照群では胆石がみられなかった。試験群の生存例はすべて、脾臓が著しく肥大しており、腹水が認められた。肝臓の組織像では極度の脂肪変性がみられ、実質細胞及びクッパー細胞の細胞内脂肪滴の大量蓄積や複屈折性のコレステロール結晶が認められた。肝細胞は多型性がみられ、二核細胞が多くみられた。軽度の線維化と結節性の肝臓実質再生がみられた。胆嚢壁の菲薄化と、粘膜の軽度な線維化と萎縮がみられた。一部の例では、小さな粘膜潰瘍と散在性の炎症細胞浸潤が認められた。

肺、脾臓、リンパ節の細網内皮細胞にも染色性脂質の著明な蓄積と複屈折性のコレステロール結晶が認められた。肺では、肺胞内腔に遊離するか、肺胞壁に付着する脂肪陽性肺胞マクロ

ファージの集塊がみられた。脾臓では、実質組織の大部分が脂質を含む組織球にほぼ置換されており、針状結晶と顆粒の蓄積がみられた。また、添加物を加えた飼料を給餌した動物の脾臓ではターンブルブルー染色陽性物質の増加が認められた。コレステロールとコール酸を投与した一部の動物の腎臓では、ヘンレのループ及び近位曲尿細管にわずかな脂肪化がみられた。内分泌腺に関して、正常対照群で認められた甲状腺の低形成が、添加飼料投与群では強くみられた。添加飼料投与群の副腎皮質の全層で染色性脂質とコレステロール結晶の顕著な増加が見られた一方で、下垂体前葉では違いがみられなかった。動脈硬化性の変化はみられなかった。

血清コレステロール値の比較では、対照群の 104 mg%に比べて試験群で平均 867 mg%と極端な差が認められたことから、観察所見としてみられた変化は、高コレステロール血症が少なくとも部分的に関与している可能性が示唆された。

平均体重 70 g の動物 100 例を、それぞれ 20 例と 80 例の 2 群に分けて、さらに別の実験を行った。実験前は全例に通常の固形飼料を与えた。うち 20 例からなる群では全例で未添加の飼料を与え、1 カ月後に屠殺し、これを対照とした。実験群とした 80 例には、1%コレステロールと 0.5%コール酸を添加した固形飼料を与えた。投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 50 mg と算出された。このとき、相対投与量は 1 日当たり 714 mg/kg と算出された。1 カ月後、無作為に選んだ 20 例を屠殺し、検査した。残りの動物は未添加の固形飼料に戻した。その後 1、2、3 カ月後に、無作為に選択した 20 例を屠殺し、検査した。

コレステロールとコール酸を添加した飼料を給餌し 1 カ月後に屠殺した群でみられた所見は以下の通りであった。

- 脂肪変性を伴う肝臓の顕著な肥大と重量の増加（対照群が 2.5 g であるのに対して 3.9 g）
- 実質細胞及びクッパー細胞にみられた細胞内脂肪滴や複屈折性のコレステロール結晶の蓄積
- 対照群と比較して約 2 倍の胆汁中コレステロール濃度、コール酸及びデオキシコール酸濃度の有意な上昇、ケノデオキシコール酸濃度の有意な低下（図 2.6.6-3）
- 胆石は認められず
- 中等度の胆嚢拡張
- 4 カ月間投与群と同程度の血清コレステロール値の上昇

通常の固形飼料に戻してから 1、2、4 カ月後に屠殺したスナネズミとの比較所見は以下の通りであった。

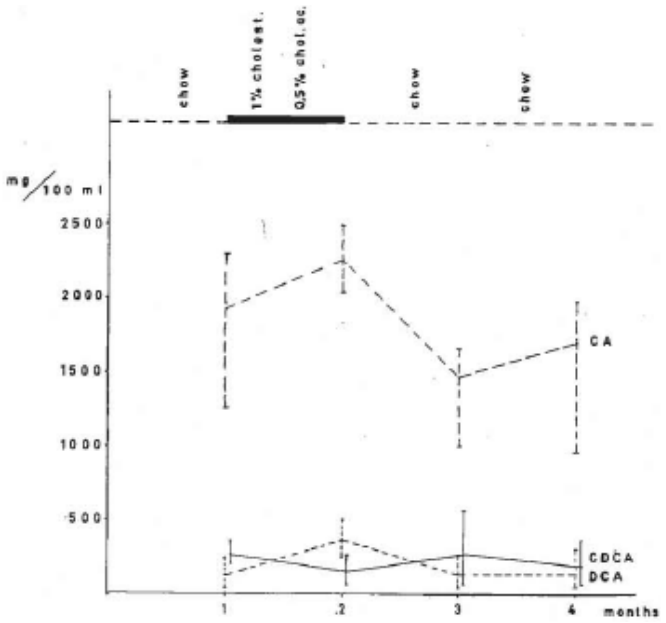
- 主に肝小葉の中心部と中間部での脂肪化の持続
- 引き続き対照群と有意に異なる肝重量
- 2 カ月後の時点で実験前とほぼ同じに戻る血清コレステロール値の急激な低下
- 胆汁中コレステロール濃度の緩やかな低下と、2 カ月後の時点で実験前値に達し、正常な胆汁酸組成に復帰（図 2.6.6-3）

結論として、1%コレステロール及び 0.5%コール酸添加固形飼料を与えたスナネズミでは、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、顕著な甲状腺低形成がみられた。

胆汁中ではコレステロール濃度の著明な上昇、コール酸、デオキシコール酸濃度の軽度上昇、ケノデオキシコール酸濃度の低下がみられた。給餌 4 カ月時点で、拡張した胆嚢にコレステロー

ル胆石がみられた。給餌を中止しても、スナネズミのコレステロール過剰状態はなかなか改善できず、肝組織所見の正常状態への復帰は非常に遅く、不完全であった。

図 2.6.6-3: 0.5%コール酸及び 1%コレステロールを給餌した際の胆汁中主要胆汁酸濃度（平均値と範囲）



CA：コール酸、DCA：デオキシコール酸、CDCA：ケノデオキシコール酸

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 In vitro

2.6.6.4.1.1 非哺乳動物細胞系

2.6.6.4.1.1.1 (Mori, et al., 1991): “Absence of mutagenic action of 5 beta-cholan-24-oic acid derivatives in the bacterial fluctuation and standard Ames tests”

Salmonella typhimurium TA100 及び TA98 を用いたコール酸による細菌彷徨試験であった。デオキシコール酸を含む他の胆汁酸も検討対象とした。

細菌彷徨試験では下記の処理条件を用いた。

細菌液 0.5 mL を解凍し、5mL の普通ブイヨン培地で希釈し、一晩インキュベートした。Davis Mingioli 塩 120 mL を 20% D-グルコース 2.4 mL、0.1 mg/mL ビオチン 0.48 mL、1 mg/mL の L-ヒスチジン 30 µL、105/mL 懸濁菌液 1 mL 及び胆汁酸溶液 0.2 mL と混合した。上記混合液のうち 2 mL を 50 本の試験管に分注し、37°C で 3 日間（TA100）又は 5 日間（TA98）インキュベートした。胆汁酸を添加した試験管のうち、his+の復帰突然変異体を含んでおり白濁がみられるものの数を計数した。

メタンスルホン酸メチル（MMS）、4-nitro-o-phenylenediamine（4NoPD）及び 2-アセチルアミノフルオレンを試験対照として用いた。また、デオキシコール酸についても併せて検討した。さらにこの他、5β-コラン酸を含む胆汁酸の誘導体 9 種類に対しても本彷徨試験とエームス試験で検討した。

上記の試験液と試験条件のもとで、陽性対照は変異原性を示した。

コール酸、デオキシコール酸、その他の 5β-コラン酸を含む 9 種類の胆汁酸誘導体のいずれも、Salmonella typhimurium TA100 又は TA98 において復帰変異コロニー数の増加はみられなかった（表 2.6.6-8 及び表 2.6.6-9）。また、5β-コラン酸を含む胆汁酸誘導体の 9 種は、S9 混合液添加下において、Salmonella typhimurium TA100 及び TA98 のいずれに対してもエームス試験陰性であった。

表 2.6.6-8: DMSO、エタノール及び 50%エタノールに溶解したコール酸及びデオキシコール酸の彷徨試験の反復施行（TA98）

胆汁酸	用量 (μg/mL)	DMSO				エタノール（100%）				エタノール（50%）			
		白濁試験管数				白濁試験管数				白濁試験管数			
		試験 1	試験 2	平均	試験管当たりの復帰突然変異体数	試験 1	試験 2	平均	試験管当たりの復帰突然変異体数	試験 1	試験 2	平均	試験管当たりの復帰突然変異体数
対照	-	15	19	17.0	0.41	18	21	19.5	0.49	13	16	14.5	0.34
コール酸	25	15	16	15.5	0.37	13	24	16.5	0.40	22	17	19.5	0.49
	40	14	19	16.5	0.40	18	18	18.0	0.45	12	19	15.5	0.37
	50	17	20	18.5	0.46	18	20	19.0	0.48	20	20	20.0	0.51
	75	15	15	15.0	0.36	17	21	19.0	0.48	11	19	14.5	0.34
デオキシコール酸	15	15	17	16.0	0.39	18	18	18.0	0.45	20	19	19.5	0.49
	20	15	23	19.0	0.48	17	19	18.0	0.45	24	17	20.5	0.53
	30	17	22	19.5	0.49	21	18	19.5	0.49	19	15	17.0	0.41
	40	16	15	15.5	0.37	14	21	17.5	0.43	16	22	19.0	0.48

表 2.6.6-9: DMSO、エタノール及び 50%エタノールに溶解したコール酸及びデオキシコール酸の彷徨試験の反復施行（TA100）

胆汁酸	用量 (μg/mL)	DMSO				エタノール（100%）				エタノール（50%）			
		白濁試験管数				白濁試験管数				白濁試験管数			
		試験 1	試験 2	平均	試験管当たりの復帰突然変異体数	試験 1	試験 2	平均	試験管当たりの復帰突然変異体数	試験 1	試験 2	平均	試験管当たりの復帰突然変異体数
対照	-	26	21	23.5	0.63	24	19	21.5	0.56	19	18	18.5	0.46
コール酸	15	24	19	21.5	0.56	24	14	19.0	0.48	20	19	19.5	0.49
	25	27	19	23.0	0.62	26	19	22.5	0.60	19	21	20.0	0.51
	40	20	21	20.5	0.53	23	19	21.0	0.54	25	19	22.0	0.58
	50	24	21	22.5	0.60	24	20	22.0	0.58	25	18	21.5	0.56
デオキシコール酸	15	15	24	19.5	0.49	18	16	17.0	0.41	17	21	19.0	0.48
	20	15	22	18.5	0.46	20	13	16.5	0.40	19	18	18.5	0.46
	30	21	22	21.5	0.56	17	12	14.5	0.34	21	25	23.0	0.62
	40	23	26	24.5	0.67	19	13	16.0	0.39	23	24	23.5	0.63

2.6.6.4.1.1.2　(Venitt, et al., 1987): “Lack of mutagenic activity of bile acids in bacterial fluctuation tests”

Salmonella typhimurium TA100 及び TA98 を用いたコール酸による細菌彷徨試験であった。デオキシコール酸を含む他の胆汁酸も検討対象とした。

下記の処理条件を用いた。

Davis Mingioli 塩 120 mL を 20% D-グルコース 2.4 mL、0.1 mg/mL ビオチン 0.48 mL、1 mg/mL の L-ヒスチジン 30 µL、105/mL 懸濁菌液（10 時間培養）1 mL 及び胆汁酸溶液 0.06～0.6 mL と混合した。上記混合液のうち 2 mL を 50 本の試験管に分注し、37° C で 3 日間（TA100）又は 5 日間（TA98）インキュベートした。胆汁酸を添加した試験管のうち、his+の復帰突然変異体を含んでおり白濁がみられるものの数を計数した。

メタンスルホン酸メチル（MMS）及び 4-nitro-o-phenylenediamine（4NoPD）を陽性対照として用いた。また、ケノデオキシコール酸とデオキシコール酸についても併せて検討した。

上記の試験液と試験条件のもとで、陽性対照は変異原性を示した。

コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸のいずれも、Salmonella typhimurium TA100 又は TA98 において復帰変異コロニー数の増加はみられなかった（表 2.6.6-10 及び表 2.6.6-11）。

表 2.6.6-10: コール酸、ケノデオキシコール酸及びデオキシコール酸の S. typhimurium TA100 を用いた彷徨試験の反復施行

試験化合物	用量（µg/mL）	白濁試験管数				ウェル当たりの復帰突然変異体数
		試験 1	試験 2	試験 3	平均	
対照	0	33	41	34	36.0	1.31
コール酸	15	37	29	37	34.3	1.18
	25	37	39	42	39.3	1.56
	40	36	35	37	36.0	1.27
	50	37	32	43	37.3	1.45
ケノデオキシコール酸	10	30	41	39	36.7	1.38
	15	34	39	38	37.0	1.36
	20	35	39	35	36.3	1.30
	25	35	38	41	38.0	1.45
デオキシコール酸	15	40	37	37	38.0	1.43
	20	37	42	41	40.0	1.63
	30	42	35	39	38.7	1.51
	40	34	40	38	37.3	1.39
MMS[a]	0.13		48	47[b]	47.5	3.02
	0.65		50	50	50.0	-
	1.30	50	50	50	50.0	-
	6.50	0(毒性あり)				
	13.0	0(毒性あり)				

a: メタンスルホン酸メチル（陽性対照）
b: カイ二乗検定で p<0.001（用量が 0 の統合データとの統合データ比較による）

表 2.6.6-11: コール酸及びケノデオキシコール酸、デオキシコール酸の S. typhimurium TA98 を用いた彷徨試験の反復施行

試験化合物	用量（μg/mL）	白濁試験管数				ウェル当たりの復帰突然変異体数
		試験 1	試験 2	試験 3	平均	
対照	0	28	27	28	27.7	0.81
コール酸	25	22	25	29	25.3	0.70
	40	28	32	25	28.3	0.84
	50	28	25	31	28.0	0.83
	75	29	30	22	27.0	0.79
ケノデオキシコール酸	10	21	26	23	23.3	0.63
	15	28	28	24	26.7	0.76
	20	34	34	32	33.3	1.09
	25	35	29	23	29.0	0.89
デオキシコール酸	15	27	22	20	23.0	0.62
	20	39	26	30	31.7	1.05
	30	35	29	23	29.0	0.89
	40	35	36	21	30.7	1.00
4NoPD[a]	0.01	34	47	37[b]	39.3	1.76
	0.02	46	48	46 [b]	46.7	2.76
	0.10	50	50	50	50.0	-

a: 4-nitro-o-phenylenediamine（陽性対照）
b: カイ二乗検定で $p < 0.001$（用量が 0 の統合データとの統合データ比較による）

2.6.6.4.1.1.3　(Watabe & Bernstein, 1985): “The mutagenicity of bile acids using a fluctuation test”

Salmonella typhimurium TA100 及び TA98 を用いたコール酸による細菌彷徨試験と、Salmonella typhimurium TA 100 を用いたプレート変異原性試験を実施した。デオキシコール酸を含む他の胆汁酸も検討対象とした。

- 彷徨試験

彷徨試験では下記の処理条件を用いた。

Davis Mingioli 塩 120 mL を 20% D-グルコース 2.4 mL、0.1 mg/mL ビオチン 0.48 mL、1 mg/mL の L-ヒスチジン 30 μL、105/mL 懸濁菌液（10 時間培養）1 mL 及び胆汁酸溶液 0.06～0.6 mL と混合した。上記混合液のうち 2 mL を 50 本の試験管に分注し、37°C で 3 日間（TA100）又は 5 日間（TA98）インキュベートした。胆汁酸を添加した試験管のうち、his+の復帰突然変異体を含んでおり白濁がみられるものの数を計数した。

メタンスルホン酸メチル（MMS）、N-methyl-N’-nitro-N-nitrosoguanidine（MNNG）、3-メチルコラントレン（3MC）、4-nitro-o-phenylenediamine（4NoPD）を陽性対照として用いた。また、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、ウルソデオキシコール酸についても併せて検討した。

上記の試験液と試験条件のもとで、陽性対照は変異原性を示した。

コール酸 40～50 μg/mL によって、Salmonella typhimurium TA100（表 2.6.6-12）及び TA98（表 2.6.6-13）において復帰変異コロニー数の増加がみられた（それぞれ $p<0.05$）。

表 2.6.6-12: TA100 の復帰突然変異コロニー数（彷徨試験）

胆汁酸又は対照	μg/mL	復帰突然変異体を含む試験管の数				試験管当たり変異割合 [a]
		試験 1	試験 2	試験 3	平均	
対照	なし	20	20	24	21.3	0.56
コール酸	15	20	21	25	22	0.59
	25	29	28	30	29	0.86
	40	31	30	33	31.3	0.93*
	50	30	27	26	27.6	0.80
ケノデオキシコール酸	10	20	21	19	20	0.51
	15	27	29	29	28.3	0.83
	20	30	30	32	30.6	0.94*
	25	20	24	26	23.3	0.63
デオキシコール酸	15	20	25	25	23.3	0.63
	20	36	34	36	35.3	1.22**
	30	25	26	26	25.6	0.70
	40	25	20	20	21.6	0.56
リトコール酸	10	19	18	26	20.3	0.52
	15	16	20	21	19.0	0.47
	20	15	14	20	16.3	0.39
ウルソデオキシコール酸	20	22	16	23	20.3	0.52
	40	22	21	23	22.0	0.57
	50	19	16	21	18.7	0.49
メタンスルホン酸メチル	1.3	34	36	37	35.7	1.25**
	6.5	40	41	44	41.7	1.79***
	13.0	42	45	47	44.7	2.24***

* P< 0.05、**P< 0.01、***P< 0.001。a: 試験管当たりの平均突然変異事象数（元の細胞数は各セル 2 × 10^3）

表 2.6.6-13: TA98 の復帰突然変異コロニー数（彷徨試験）

胆汁酸又は対照	μg/mL	復帰突然変異体を含む試験管の数				試験管当たり変異割合 [a]
		試験 1	試験 2	試験 3	平均	
対照	なし	15	13	13	13.7	0.32
コール酸	25	14	12	14	13.3	0.30
	40	19	20	21	20.0	0.51
	50	24	22	23	23.0	0.61*
	75	15	16	14	15.0	0.35
ケノデオキシコール酸	10	18	18	16	17.3	0.42
	15	23	24	20	22.3	0.60
	20	26	28	27	27.0	0.77**
	25	23	21	22	22.0	0.57
デオキシコール酸	15	18	18	18	18.0	0.44
	20	26	22	21	23.0	0.61*
	30	16	12	20	17.0	0.46
	40	7	11	11	9.7	0.21
リトコール酸	10	8	9	11	9.3	0.20
	15	9	14	10	11.0	0.25
	40	6	5	7	6.0	0.13
ウルソデオキシコール酸	20	16	15	16	15.7	0.38
	40	23	26	22	23.7	0.64*
	50	18	20	20	19.3	0.49
メタンスルホン酸メチル	0.01	28	25	22	25	0.69*
	0.02	36	32	28	32	1.02***
	0.10	48	45	43	45.3	2.36***

* P< 0.05、**P< 0.01、***P< 0.001。a: 試験管当たりの平均突然変異事象数（元の細胞数は各セル 2 × 10^3）

- Salmonella typhimurium TA100 を用いたプレート変異原性試験

彷徨試験では下記の処理条件を用いた。

胆汁酸 20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、100 µg 又は 500 µg を、アロクロール 1254 で処理した Sprague‐Dawley ラットから調製した S9 混合液添加又は非添加の条件でトップアガーに加えた。106/mL の菌液 0.1 mL を、異なる濃度の胆汁酸、過剰のヒスチジン及びビオチンを含む 2 mL のトップアガー試験管に加え、これらの試験管内容物をそれぞれ最少グルコース寒天培地プレート上に重層した。2 日間のインキュベーション後、プレート上のコロニーを計数した。

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine（MNNG）、3-メチルコラントレン（3MC）、4-nitro-o-phenylenediamine（4NoPD）を陽性対照として用いた。

上記の試験液と試験条件のもとで、陽性対照は変異原性を示した。

試験した 5 種類の胆汁酸（コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸及びウルソデオキシコール酸）のいずれでも、2 mL のトップアガーに 20、30、40、50、100 又は 500 µg で加えた場合、S9 混合液（アロクロール 1254 誘導ラット肝ホモジネート）添加の有無にかかわらず復帰突然変異体数の有意な増加はみられなかった（表 2.6.6-14）

表 2.6.6-14: TA100 を用いたプレート変異原性試験（エームス試験）

胆汁酸	濃度 µg/mL トップアガー	復帰突然変異コロニー数	
		-S9	+S9
対照	なし	106	137
コール酸	10	124	144
	15	106	137
	20	121	121
	25	121	138
	50	115	124
	250	123	130
ケノデオキシコール酸	10	136	138
	15	124	126
	20	148	125
	25	138	135
	50	118	140
	250	101	129
デオキシコール酸	10	154	133
	15	149	119
	20	143	146
	25	140	127
	50	126	124
	250	96	132
リトコール酸	10	123	141
	15	118	135
	20	107	133
	25	121	158
	50	127	128
	250	112	134

a 幾何平均（N = 2）

2.6.6.4.1.1.4　(Silverman & Andrews, 1977): “Bile Acids: Co-mutagenic Activity in the Salmonella-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test: Brief Communication”

TA1535、TA1536、TA1537、TA1538、TA98 及び TA100 を指標菌株としたエームス試験でコール酸の変異原性を検討した。

フェノバルビタールを投与したラット肝ホモジネートの S9 分画で活性化した 2-アミノアントラセン（2-AA）の存在下、非存在下で各プレートに 500 µg のコール酸を添加してエームス試験を実施したところ、コール酸の変異原性並びに 2-AA による助変異原性は、いずれの菌株でも確認されなかった。また、デオキシコール酸でも結果は同様であった。

ICH S2A 遺伝毒性試験：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でエームス試験における使用が明記されている 5 種類の指標菌株のうち、本試験では 4 種類（1.TA98、2.TA100、3.TA1535、4.TA1537）が使用されており、一方、5.TA102 の代わりに TA1538 が使用されていた。

2.6.6.4.1.2　哺乳動物細胞系

2.6.6.4.1.2.1　(Jenkins, 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.”

ヒト食道腺癌細胞株 OE33 を用いてコール酸の遺伝毒性試験（小核試験）を実施した。本研究の主な目的は、デオキシコール酸の潜在的遺伝毒性及びその機序を検討することとした。

グリココール酸やタウロコール酸と同様、50 µmol/L～1 mmol/L のコール酸による小核数の有意な増加は生じなかった。

一方、50～200 µmol/L のデオキシコール酸（DCA）では、同じ（中性 pH）条件下で有意な小核数の増加がみられた。この遺伝毒性は中性 pH でも酸性 pH でも明らかであったが、酸性 pH では胆汁によって生じる毒性が大きく増強した。酸性 pH で細胞死が多く、細胞生存率が低かった。これは、死細胞ではがんを発生することができないため、酸性胆汁を曝露した場合には発がん性ではなく毒性がみられるものと考えられる。また、DCA（中性及び酸性 pH）が曝露細胞の細胞質内で活性酸素種（ROS）の放出を誘導したことが示されている。さらに、抗酸化物質であるビタミン C の存在下で細胞を DCA で処置した際、小核形成が有意に低下したことから、DCA の遺伝毒性は ROS によるものであることを示した。

コール酸ではなく DCA が、中性及び酸性 pH のいずれにおいても遺伝子毒性作用を持つという結論であった。DCA などの胆汁酸は、中性 pH で DNA 損傷を誘発する可能性があるので、逆流物の酸性度を抑制しても、その発がん性を完全に取り除くことはできないものと考えられる。しかし、DCA の遺伝毒性は ROS 依存性であることから、酸抑制に加えて抗酸化剤を補給することで、バレット食道患者の DCA による発がんを防ぐ可能性がある。

2.6.6.4.1.2.2　(Martinez-Diez, et al., 2000): “Comparison of the effects of bile acids on cell viability and DNA synthesis by rat hepatocytes in primary culture”

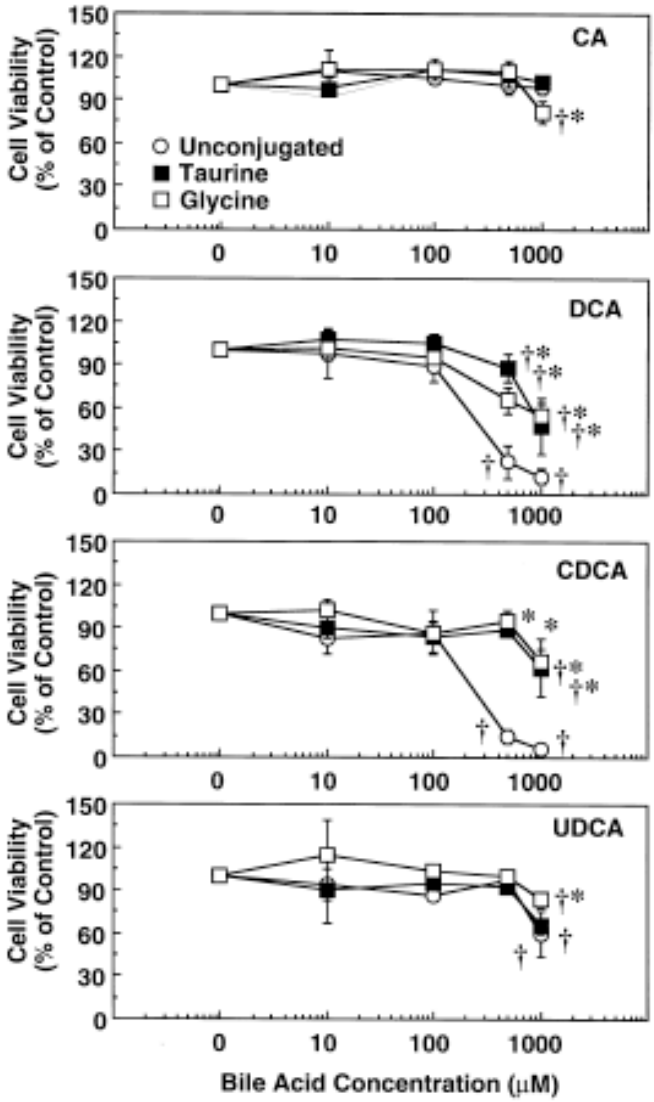
Wistar ラットの細胞を用い、コール酸の肝細胞生存性試験を行った。デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸及びウルソデオキシコール酸並びにこれらの抱合型による影響も検討した。

培養液を、対照又は濃度範囲を 10～1000 µmol/L（最終濃度）とした試験対象の胆汁酸のいずれか一つを含む新鮮培地と置換し、肝細胞の生存試験を実施した。置換液に 6 時間曝露した後、

ニュートラルレッド取り込み試験法及び／又はホルマザン形成試験法により細胞生存率を測定した。対照は、胆汁酸を含まない培地とした。

コール酸は、500 µmol/L 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低下させることが示された。（図 2.6.6-4）。コール酸はウルソデオキシコール酸と同様に、細胞生存率低下作用が最も小さい胆汁酸であった。

図 2.6.6-4: 非抱合型及び抱合型胆汁酸の肝細胞生存率に対する用量依存的作用



CA：コール酸、DCA：デオキシコール酸、CDCA：ケノデオキシコール酸、UDCA：ウルソデオキシコール酸、白丸：非抱合型、黒四角：タウリン抱合型、白四角：グリシン抱合型。結果を対照と比較するために、対応のある t 検定（† $p < 0.05$）並びに胆汁酸種類間の Bonferroni の多重比較検定法（*$p<0.05$）を用いた

2.6.6.4.2　In vivo

In vivo の遺伝毒性試験に関する文献はなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 長期がん原性試験

長期がん原性試験に関する文献はなかった。

2.6.6.5.2 短期又は中期がん原性試験

2.6.6.5.2.1 ラット

2.6.6.5.2.1.1 (Tsuda, 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”

Fischer（F344）雄ラットにおける 10 週間の給餌試験で、ジエチルニトロソアミン（DEN）200 mg/kg の単回腹腔内投与によってイニシエートされる肝発がんに対して、5 種類の胆汁酸を給餌した場合の影響を調べた。

6 週齢の F344 ラット 260 例を 20 例ずつ群分けした。第 1 群には 0.9% NaCl 溶液に溶解した DEN 200 mg/kg を単回腹腔内投与し、肝発がんをイニシエートした。基礎飼料を 2 週間給餌した後、ラットに 0.3%コール酸、0.3%、0.06%、0.12%デオキシコール酸、0.05%ケノデオキシコール酸、0.3%リトコール酸又は 0.3%ウルソデオキシコール酸のいずれかを投与した。コール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 15 mg と算出された。これは、算出コール酸プールの 1 倍に相当した。このとき、相対投与量は 1 日当たり 150 mg/kg と算出された。検査のため、DEN 注射後 3 週目に 2/3 の肝切除をし、8 週目に屠殺した。3 週目の肝切除時と 8 週目の屠殺時にはいずれも、肝臓内の γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）陽性細胞巣によって示される病変の発生に対する組織学的検査と定量を行った。第 2 群のラットには、試験対象化合物を給餌せずに、DEN の投与と 3 週目の部分的肝切除を行った。第 3 群のラットには、DEN 溶液の代わりに 0.9% NaCl 溶液を注射し、その後、第 1 群で実施したのと同様の胆汁酸の給餌及び部分肝切除を行った。なお、第 3 群（対照群）のラットは、肝部分切除という介入はしているものの、被験胆汁酸の反復投与混餌試験集団にもなっている。本試験のコール酸投与量での致死率は 25%であった。最も毒性が強い胆汁酸はデオキシコール酸であり、致死率は 60%であった。

DEN のみ投与した対応する対照群と比較して、GGT 陽性細胞巣の定量値が有意に増加したことから（表 2.6.6-15）、コール酸は、前がん性と考えられる病変の発生をラット肝で促進する作用を有するという結論であった。DEN 投与後に 0.3% CA を与えた動物（第 1 群）における 1 cm^2 当たりの GGT 陽性細胞巣の数と面積は、DEN のみ投与した群（第 2 群）の値と比較して有意に増加した。肝癌の発生に先立って GGT 陽性細胞巣が生じることから、コール酸には、肝発がんを促進する可能性があると考えられる。

表 2.6.6-15: 胆汁酸の後投与により生じる肝臓中 GGT 病巣の数と面積

群	投与内容			例数		1 cm^2 当たり γ- GT 病巣の定量値	
	イニシエーション	プロモーション	（用量）[a]	開始時	終了時	数[b]	面積（mm^2）[b]
1	DEN	→ CA	(0.30)	20	17	14.4 ± 4.9[c]	0.82 ± 0.48[c]
	DEN	→ DCA	(0.30)	20	9	28.9 ± 7.1[c]	2.61 ± 1.12[c]
	DEN	→ DCA	(0.12)	20	16	15.1 ± 3.6[c]	0.72 ± 0.39[c]
	DEN	→ DCA	(0.06)	20	18	8.8 ± 2.4	0.50 ± 0.63
	DEN	→ CDCA	(0.05)	26	26	7.7 ± 3.1	0.22 ± 0.15
	DEN	→ LCA	(0.30)	20	20	8.5 ± 3.1	0.32 ± 0.17
	DEN	→ UDCA	(0.30)	23	23	7.9 ± 2.4	0.36 ± 0.26
2	DEN	→ (-)	(-)	68	67	8.4 ± 3.2	0.30 ± 0.15
3	0.9% NaCl	→ CA	(0.30)	20	15	0.3 ± 0.4	0.07 ± 0.09
	0.9% NaCl	→ DCA	(0.30)	20	8	0.2 ± 0.2	0.11 ± 0.12
	0.9% NaCl	→ CDCA	(0.05)	20	18	0.2 ± 0.4	0.01 ± 0.05
	0.9% NaCl	→ LCA	(0.30)	20	20	0.1 ± 0.1	<0.01
	0.9% NaCl	→ UDCA	(0.30)	20	20	0.3 ± 0.5	0.06 ± 0.01

a: 基礎飼料中での含有率（%）
b: 平均 ± SD
c: DEN 単独投与群（第 2 群）と比べて有意に増加（$p < 0.001$）
DEN：ジエチルニトロソアミン、CA：コール酸、DCA：デオキシコール酸、CDCA：ケノデオキシコール酸、LCA：リトコール酸、UDCA：ウルソデオキシコール酸

2.6.6.5.2.1.2　(Seraj, et al., 1997): “Effects of dietary bile acids on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in F344 rats”

- 試験 1

最初の試験では、AOM を投与せず、基礎飼料に 0.4%コール酸を添加して 18 週間投与した後の F344 雄ラットの結腸における異常腺窩巣（ACF）の発生と成長に対する影響を検討した。

5 週齢の F344 雄ラットを用い、実験用固形飼料（MF）のみ（対照群）又はそれぞれの胆汁酸（CA、DCA、CDCA、LCA、UDCA）0.4%（w/w）を添加したものを給餌した（表 2.6.6-16）。コール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 20 mg と算出された。これは、算出コール酸プールの 1.3 倍に相当した。このとき、相対投与量は 1 日当たり 200 mg/kg と算出された（コール酸プールサイズの 1.3 倍）。基礎飼料群が 9 例であることを除き、各群 7 例とした。給餌期間は各群 18 週間とし、各群 1 例を 6 週目と 12 週目に屠殺し、結腸の ACF を評価した。

いずれのラットも 18 週目に屠殺した。全試験期間を通じて、ラットの体重や摂餌量に有意差は認められず、実験終了時まで全例が生存した。

本試験の結果から、病巣は非常にまれにしか観察されず、発生率（ACF を有するラット数/各群のラット数）も 18 週間のコール酸飼料給餌後は 50%未満であった（表 2.6.6-16）。いずれの給餌群においても、測定項目に統計学的有意差は認められなかった。

表 2.6.6-16: 胆汁酸を添加した食餌を 18 週間給餌した F344 ラット結腸における ACF の発生に対する効果

給餌	発生率[a]			結腸当たり ACF[b]	結腸当たり AC[c]
	6[d]	12	18		
実験動物用固形飼料（MF）	0/1	0/1	4/7	0.71 ± 0.76	1.43 ± 1.40
コール酸（CA）	0/1	0/1	1/5	0.20 ± 0.45	2.40 ± 5.37
デオキシコール酸（DCA）	0/1	1/1[e]	2/5	0.60 ± 0.89	2.00 ± 3.94
ケノデオキシコール酸（CDCA）	0/1	0/1	1/5	0.20 ± 0.45	0.80 ± 1.79
リトコール酸（LCA）	0/1	0/1	2/5	0.60 ± 0.89	2.60 ± 3.72
ウルソデオキシコール酸（UDCA）	0/1	0/1	1/5	0.20 ± 0.45	0.80 ± 1.79

a: 各時点における ACF を有するラット数/群のラット数
b: 異常腺窩巣の総数は、平均値±標準偏差で示す（18 週時点で各群 5～7 例）
c: 異常腺窩の総数は、平均値で示す（18 週時点で各群 5～7 例）
d: ACF 計測時点（週）
e: 病巣は 2 つみられ、うち 1 つは腺窩を 1 つ含み、もう 1 つは腺窩を 2 つ含む

- 試験 2

別試験では、5 週齢の F344 雄ラットに AOM（15 mg/kg）を 7 日間隔で 2 回投与し、AOM の初回投与後から、基礎飼料又は基礎飼料にそれぞれの胆汁酸（CA、DCA、CDCA、LCA、UDCA）0.4%(w/w)を加えたものを 8 週間給餌した。最初の試験と同様に、F344 雄ラットの結腸における ACF の誘導と増殖に対する影響を検討した。体重及び摂餌量は、毎週記録した。8 週間後に、全例屠殺して ACF を計数した。

全試験期間を通じて、デオキシコール酸給餌群を除き、ラットの体重や摂餌量に有意差は認められず、実験終了時まで全例が生存した。デオキシコール酸給餌群では、本試験の他群と比べて AOM の初回投与以降の体重増加が少なかった。ただしこれは 2 回目の投与から 1 週間の時点で正常に回復した。

結腸当たり ACF の平均数は、MF 群と比較して CA 群、DCA 群、CDCA 群及び LCA 群で有意に多かった。一次胆汁酸では、腺窩を 1 つ含む病巣の平均数も、MF と比較して有意に多かった($p<0.05$)。その他の病巣についても CA、DCA、CDCA、LCA 群では MF 群に比べて数が多かった（表 2.6.6-17 の AC2 - 4、AC≥5、）。

腺窩の多重性は CA 群、DCA 群、CDCA 群、LCA 群と MF 群の間で有意差はなかった。

ACF 数が最も多かったのは結腸の遠位部であり、近位になるにつれて減少した。また、飼料とは無関係であった。CA、DCA、CDCA 及び LCA 群における肛門末端から 10 cm 地点に至るまでの部分で結腸 2 cm 当たりの ACF 数は MF 群と比較して多かった。しかし UDCA 群では MF 群よりも少なかった。

結論として、コール酸 0.4%を飼料に添加しても結腸に ACF 様前がん病変の誘導はみられず、F344 ラットの身体発達に有害な影響は認められなかった。一方、発がん物質である AOM の投与後にコール酸を投与したことで、基礎飼料給餌群と比較して ACF 数が統計学的に多くなった。このことは、AOM 誘発モデルにおいて飼料にコール酸を添加した群で、急速な病巣の増殖が起こることを示している。したがって、コール酸は結腸発がんを促進すると考えられる。

表 2.6.6-17: 胆汁酸を添加した食餌を給餌した F344 ラット結腸における ACF の発生と持続に対する効果

給餌	結腸当たり ACF					結腸当たり総病巣数	病巣当たり異常腺窩数 [b]
	AC1[a]	AC2	AC3	AC4	AC ≥ 5		
MF	28 ± 15.6[c]	38.6 ± 2.9	28. 6 ± 4.8	19.6 ± 10.4	14.8 ± 5.9	129.6 ± 18.5	2.8 ± 0.4
CA	51.6 ± 14.4[d]	86.8 ± 34.6[d]	66.8 ± 16.6[d]	44 ± 12.4[d]	43.6 ± 19.2[d]	292 ± 68.7[d]	2.9 ± 0.2
DCA	41.8 ± 25.2	80.4 ± 29.8[d]	50 ± 12.4[d]	39.8 ± 15.5[d]	54.2 ± 18.8[d]	266 ± 72.7[d]	3.1 ± 0.3
CDCA	76 ± 32.1[d]	88.6 ± 22.1[d]	71.6 ± 18.4[d]	49 ± 18.2[d]	46.4 ± 16.8[d]	331.6 ± 94.2[d]	2.8 ±0.1
LCA	46.6 ± 16.1	71.6 ± 18.7[d]	56.4 ± 9.2[d]	38.6 ± 4.2[d]	37.4 ± 10.3[d]	250.6 ± 25[d]	2.9 ±0.2
UDCA	22 ± 14.6	19.8 ± 11.5[d]	8.8 ± 3[d]	6.3 ± 3[d]	1.8 ± 1.7[d]	58.5 ± 22.4[d]	2.1 ± 0.2[d]

a: AC1：病巣当たりの腺窩が 1 つ、AC2：病巣当たりの腺窩が 2 つ、AC3：病巣当たりの腺窩が 3 つ、AC4：病巣当たりの腺窩が 4 つ、AC≥5：病巣当たりの腺窩が 5 つ以上
b: 腺窩の多重性を示す
c: データは平均値±標準偏差で示す（各群 5 例）
d: 各欄の平均値が MF 群と P<0.05 で有意に異なる場合に上付きにする

2.6.6.5.2.1.3 (Baijal, et al., 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”

本試験は Sprague-Dawley 雄ラットを用いた 20 週間混餌試験であり、体重に応じて 0.2%のコール酸を含む飼料を給餌した場合に、AOM（15 mg/kg 体重/週）によってイニシエートした発がん初期に結腸腫瘍の発生率が増加するかどうかを検討した。

離乳期の Sprague-Dawley 雄ラット 180 例に AOM（15 mg/kg 体重/週、皮下）を注射し、i) AIN-93G 飼料を給餌した対照群（Co）又は ii) 体重に応じて 0.2%コール酸を添加した対照飼料給餌群の 2 群のいずれかに無作為に割り付けた。投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 4.5 mg と算出された。これは、算出コール酸プールの約 0.75 倍に相当した。このとき、相対投与量は 1 日当たり 100 mg/kg と算出された。また、1 週間後に 2 回目の AOM 注射を行った。2 回目の AOM 注射の 2 週間後、Co 群及び CA 群の各 10 例を屠殺した。また、残りの動物に対しては Co 飼料群又は CA 飼料群のいずれかへさらなる無作為割付けをした。よって、給餌群は以下の 4 群となった。

a）Co-Co 群：対照飼料のみ、b）Co-CA 群：対照飼料から CA 飼料に切り替え、c）CA-CA 群：CA 飼料のみ、d）CA-Co 群：CA 飼料から対照飼料に切り替え（表 2.6.6-18）実験期間中は、これら 4 つのサブグループで動物の飼育を継続した。

最初の発がん物質注射後から 3 週目（n=10/群）、12 週目（n=10/群）、及び 20 週目（n=30/群）に動物を屠殺し、結腸の ACF について評価した。また、20 週目の各群 30 例で肉眼による腫瘍の評価を実施した。

3 週目では、CA 群は Co 群と比較して、ACF の総数、及び小型、中型の ACF が少なかったが、その差は統計学的に有意ではなかった。

実験期間終了時、各群で観察された体重に有意差はなかった。

群間で体重に有意差はなかったが、CA-CA 群では体重が軽く、直腸出血がこの群の数例で観察された。

12 週目では、Co-CA 群は Co-Co 群、CA-CA 群、CA-Co 群より ACF 数が少なかったが、この傾向は統計学的に有意ではなかった（表 2.6.6-18）。CA-CA 群と CA-Co 群の腺窩の多重性は、

Co-Co 群と Co-CA 群の双方と比較して大きかった。中型 ACF 数は Co-Co 群、CA-CA 群、CA-Co 群で Co-CA 群と比較して多かった（p<0.05）。CA-CA 群では大型 ACF 数も、Co-Co 群と比較して有意に多かった（p<0.05）。CA-CA 群及び CA-Co 群の各々における大型 ACF の数は、Co-Co 群より 3 倍多く、Co-CA 群より 7～8 倍多かった。

20 週目では、ACF の総数に群間で差がなかった。CA-CA 群と CA-Co 群の腺窩の多重性は、Co-Co 群と Co-CA 群の双方と比較して有意に大きかった（p<0.01）（表 2.6.6-18）。CA-Co 群の大型 ACF 数は CA-CA 群の 2 倍、Co-Co 群の 3.5 倍、Co-CA 群の 4.5 倍だった（p<0.05）。CA-CA 群及び CA-Co 群は、Co-Co 群と Co-CA 群と比較して増殖が進んだ像を示す ACF の数が多かった（表 2.6.6-19）。

CA-CA 群は、腫瘍の発生率が最も高く、CA-Co 群は、Co-Co 及び Co-CA 群と比較して腫瘍発生率が 2 倍だった（p<0.05）（表 2.6.6-20）。動物（担腫瘍動物及び非担腫瘍動物の両方を含む）1 例当たりの腫瘍数も給餌群間で有意差が認められた（p<0.05）。担腫瘍ラット 1 例当たりの平均腫瘍サイズ、群当たりの平均腫瘍サイズ、及び腫瘍量に群間で有意差は認められなかった。CA-Co 群及び CA-CA 群では、腺腫及び腺癌の数が Co-Co 群及び Co-CA 群に比べて多かった（表 2.6.6-20）。腺腫と腺癌の割合は群間で差がなかった。

コール酸 0.2%を給餌することで、初期段階の結腸発がん増強がみられるが、イニシエーション後の段階では効果がないという結論であった。

表 2.6.6-18: ACF に関する測定項目に対する 12 週間及び 20 週間の給餌の影響

項目	Co-Co 群	Co-CA 群	CA-CA 群	CA-Co 群
12 週				
ACF 総数	222 ± 33[a]	135 ± 24[a]	243 ± 19[a]	213 ± 32[a]
腺窩の多重性	2.50 ± 0.16[a]	2.38 ± 0.10[a]	3.08 ± 0.15[b]	3.22 ± 0.12[b]
20 週				
ACF 総数	62 ± 20[a]	76 ± 17[a]	62 ± 15[a]	84 ±15[a]
腺窩の多重性	2.21 ± 0.24[a]	2.42 ± 0.08[a]	3.05 ± 0.26[b]	3.40 ± 0.21[b]

注：数値は平均値 ± SEM（n = 5～7）各行に記載の平均値は、上付き文字が異なる場合に有意差あり（p<0.05）

表 2.6.6-19: 給餌後 12 週及び 20 週時点で増殖像別にみた ACF の数

ACF 増殖像	Co-Co 群	Co-CA 群	CA-CA 群	CA-Co 群
12 週				
小型	182 ± 33[a]	116 ± 19[a]	173 ± 11[a]	147 ± 25[a]
中型	36 ± 6[a]	17 ± 5[b]	53 ± 7[a]	52 ± 4[a]
大型	5.0 ± 1.5[ac]	1.8 ± 0.7[c]	17 ± 5[b]	14 ± 4[ab]
20 週				
小型	49 ± 15[a]	69 ± 14[a]	44 ± 10[a]	57 ± 11[a]
中型	10.1 ± 3.9[a]	10.9 ± 2.9[a]	13.6 ± 3.6[a]	17.9 ± 3.5[a]
大型	2.4 ± 1.1[a]	1.9 ± 0.3[a]	4.3 ± 1.5[a]	8.6 ± 2.2[b]

注：ACF は小型（病巣当たり腺窩数 1～3）、中型（病巣当たり腺窩数 4～6）、大型（病巣当たり腺窩数 7 以上）に分類した。表中には、各群の小型、中型、大型 ACF 数の平均値 ± SEM を示す（n = 5～7/群）。各行に記載の平均値は、上付き文字が異なる場合に有意差あり（p<0.05）

表 2.6.6-20: 腫瘍に関する測定項目に対する給餌処置の影響

	Co-Co 群	Co-CA 群	CA-CA 群	CA-Co 群
合計例数	30	29	29	30
腫瘍の発現率（%）	30[a]	31[a]	82.8[b]	56.7[c]
腫瘍の多重性*	1.44 ± 0.24[ab]	1 ± 0.0[b]	2.33 ± 0.26[a]	2.29 ± 0.48[a]
動物 1 例当たりの腫瘍数*	0.4 ± 0.14[a]	0.3 ± 0.09[a]	1.9 ± 0.27[b]	1.3 ± 0.34[b]
担腫瘍ラット 1 例当たりの平均腫瘍サイズ（mm^2）*	26.4 ± 9.6	16.2 ± 7.8	14.5 ± 3.2	18.4 ± 4.6
群当たりの平均腫瘍サイズ*	24.2 ± 7.3	16.2 ± 7.8	15.2 ± 2.4	20.5 ± 4.3
腫瘍量*	34.9 ± 11.1	16.2 ± 7.8	35.6 ± 8.8	46.9 ± 14.7
腺腫数**	7 (54%)	6 (67%)	39 (70%)	25 (64%)
腺癌数**	6 (46%)	3 (33%)	17 (30%)	14 (36%)

* 値は平均 ± S.E.M.で表す。各行に記載の平均値は、上付き文字が異なる場合に有意差あり（$p<0.05$）。ラット 1 例当たりの腫瘍サイズ、群当たりの腫瘍サイズ、腫瘍量について、それぞれ群間に有意差はなかった。群当たりの腺腫又は腺癌の数を求めた。** 括弧内の値は、各給餌群における腺腫及び腺癌の割合である。

2.6.6.5.2.1.4 (McSherry, et al., 1989): “Effects of calcium and bile acid feeding on colon tumours in the rat”

Fisher 344 雄ラットに N-Methyl-N-Nitrosourea（MNU）又は生理食塩水（対照）のいずれかを投与した後に、コール酸及び／又はカルシウムを添加した飼料を給餌したときの影響を検討する試験を 27 週間にわたり実施した。

N-Methyl-N-Nitrosourea（MNU）0.1 mg/kg 又は生理食塩水（対照）を実験の 1 日目と 4 日目にラットに注射し、0.2%コール酸及び／又は 1.6%カルシウム添加又非添加の基礎飼料を与えた。コール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 5 mg と算出された。これはコール酸プールの 0.75 倍に相当する。このとき、相対投与量は 1 日当たり約 100 mg/kg と算出された。カルシウム投与量の絶対値は 1 日当たりで 40 mg と算出された。これは相対投与量として 1 日当たり 800 mg/kg 相当と算出された。

動物は、28 週目に屠殺し、腫瘍数をはじめとして発がん作用を比較した。

ラットは、表 2.6.6-21 に示すように 10 群の投与群に分けた。

表 2.6.6-21: ラット割付投与群

群番号	投与内容	N
第 1 群	対照（AIN-76 基礎飼料を給餌、0.9% NaCl 溶液を結腸内投与）	10
第 2 群	AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	20
第 3 群	コール酸（0.2%）添加 AIN-76 を給餌、0.9% NaCl 溶液を結腸内投与	10
第 4 群	コール酸（0.2%）添加 AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	25
第 5 群	カルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、0.9% NaCl 溶液を結腸内投与	10
第 6 群	カルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	25
第 7 群	コール酸（0.2%）及びカルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、0.9%NaCl 溶液を結腸内投与	20
第 8 群	コール酸（0.2%）及びカルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	50
第 9 群	0.9% NaCl の結腸内投与に先立ち、カルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を 2 週間給餌	10
第 10 群	MNU の結腸内投与に先立ち、カルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を 2 週間給餌	25

No.：番号（順序）、N：例数

第 6 群及び第 10 群の動物の 68%に腫瘍が認められており、飼料中のカルシウムを増加させても腫瘍形成の阻害はみられなかった。食餌にコール酸とカルシウムを併用した場合（第 8 群）の腫瘍発生率はコール酸単独投与群（第 4 群）と同程度であった（72%対 80%、動物 1 例当たりの腫瘍数 2.00 対 2.24、担腫瘍動物 1 例当たりの腫瘍数 2.77 対 2.80）。大部分の腫瘍は腺腫性ポリープであったが、非浸潤がんや浸潤がんも認められた。食餌にカルシウムを加えることで浸潤がんの数が減少した（第 6 群対第 2 群、P<0.04)（表 2.6.6-22）。

Fisher 344 ラットの飼料にコール酸を添加すると、特定の結腸発がん物質 MNU の投与後に腫瘍数が増加するという結論であった。しかし、カルシウムに腫瘍性疾患の発症から結腸を保護する作用はみられなかった。

表 2.6.6-22: 28 週時点の腫瘍発生率及び腫瘍の分類

1 日投与量（mg/kg）	対照（AIN-76 基礎飼料を給餌、0.9% NaCl 溶液を結腸内投与）	AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	コール酸（0.2%）添加 AIN-76 を給餌、0.9% NaCl 溶液を結腸内投与	コール酸（0.2%）添加 AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	カルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、0.9% NaCl 溶液を結腸内投与	カルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	コール酸（0.2%）及びカルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、0.9%NaCl 溶液を結腸内投与	コール酸（0.2%）及びカルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を給餌、MNU を結腸内投与	実験前にカルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を 2 週間給餌してから 0.9% NaCl の結腸内投与 [d]	実験前にカルシウム（1.6%）添加 AIN-76 を 2 週間給餌してから MNU の結腸内投与 [d]
性別	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄
例数	10	20	10	25	10	25	20	50	10	25
死亡例数、屠殺（瀕死）例数	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
最終屠殺（週）	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
体重（g[a]）	401±36	432±23	409±13	442±26	424±33	415±24	422±17	405±34	417±25	411±29
摂餌量（g/日）	12.9	12.5	13.0	12.0	13.0	12.0	12.6	11.2	10.8	10.8
性別	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄	雄
評価例数	10	20	10	25	10	25	20	50	10	25
腫瘍性病変が認められた例数	0	11	0	20	0	17	0	36	0	17
動物 1 例当たりの腫瘍数	0	0.75	0	2.24[a]	0	1.56[c]	0	2.00[a]	0	1.40[a]
担腫瘍動物 1 例当たりの腫瘍数	0	1.36	0	2.80[b]	0	2.29	0	2.77	0	2.05
腺腫	0	12	0	38	0	35	0	75	0	31
非浸潤がん	0	1	0	14	0	2	0	11	0	1
がん	0	2	0	5	0	2	0	14	0	3
合計腫瘍数	0	15	0	57	0	39	0	100	0	35

a: 第 2 群と有意差あり（p<0.01、t 検定）、b: 第 2 群と有意差あり（p<0.08、t 検定）c: 第 2 群と有意差あり（p<0.07、t 検定）、d: N-Methyl-N-Nitrosourea（又は生食プラセボ）の投与 2 週間前に給餌を開始、f 第 4 群と有意差あり（p<0.05、t 検定）

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

受胎能及び初期胚発生に関する公表文献はなかった。

2.6.6.6.2 胚及び胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ハムスター

2.6.6.6.2.1.1 (Siviero, et al., 2008): “Hepatobiliary effects of cholic and lithocholic acids: experimental study in hamsters”

コール酸 0.5%を含む飼料が雌ハムスター及び仔の肝臓に及ぼす影響を定性的に検討した研究である。

30～40 日齢の雌ハムスター3 例に、交配翌日から出産まで、すなわち 18 日間にわたり 0.5%コール酸を混餌投与した。投与開始時のコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 60 mg と算出された。このとき、相対投与量は 1 日当たり約 600 mg/kg と算出された。仔の出生 2 日後に母動物 3 例及び仔 12 例を屠殺し、肝臓を検査し胚・胎児発生関連毒性を検討した。

母動物の肝臓では細胆管増生がみられ、中等度のものが 1 例、軽微なものが 1 例、顕著なものが 1 例であった。2 例で門脈域の炎症細胞浸潤、3 例でセロイドを含むクッパー細胞が認められ、別の 2 例で分葉の増強が認められた。肝内及び／又は肝外胆管では、上皮細胞の過形成又は増殖が全ての動物で認められた。

すべての仔で、対照群と比較して髄外造血が軽度に亢進していた。また、肝外胆管上皮の過形成又は増殖が 3 例でみられた（25%）。上記例では、門脈域で軽微な細胆管／胆管増生もみられた。

妊娠期間中の 0.5%コール酸摂取は、母体及び新生仔の肝胆道系に対し、程度は様々だが毒性を引き起こすと結論づけた。しかし、コール酸プールが少なくともマウスでは体重 20 g 当たり 1.37 mg、ラットでは体重 100 g 当たり約 15 mg であることを考えると、各ハムスターに投与したコール酸の 1 日投与量の絶対値（60 mg）は非常に高かった可能性が高い。

2.6.6.6.2.2 ヒツジ

2.6.6.6.2.2.1 (Perez, et al., 1994): “A single intravenous high dose of cholic acid to a pregnant ewe does not affect fetal well-being”

コール酸を投与した際の、妊娠雌ヒツジ及びその胎児の心血管系パラメータ、血液ガス及び胆汁酸に及ぼす影響を評価する単回静脈内投与毒性試験を実施した。

妊娠雌ヒツジ 5 例の妊娠末期にコール酸 29 mg（0.41 mg/kg）を静脈内にボーラス注射で単回投与した。胎児及び母動物の血液を用い、心血管系パラメータ、血液ガス及び胆汁酸を、コール酸静脈内投与の 20 分前（ベースライン）及び 120 分後に測定した。

静脈内に単回注射したコール酸は、速やかに胎児血漿中に検出され、40 分以内にピークに達する（図 2.6.6-5）。胎児の血漿中コール酸平衡濃度は母動物のほぼ 4 倍であった。胎児の心血管系パラメータ及び血液ガスは、実験時にも、24 時間後にも変化がなかった。

妊娠雌ヒツジ 1 例に対し、満期直前にコール酸を投与したところ、2～3 分の潜時を経て子宮収縮が生じた。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

母動物の血漿中胆汁酸濃度が急激に上昇しても、母動物にも胎児にも重大な有害作用は生じないという結論であった。

図 2.6.6-5: 妊娠雌ヒツジにコール酸 29 mg を単回静脈内投与したときの母体血漿（●）、胎児血漿（X）及び羊水（○）中のコール酸濃度の経時的変化

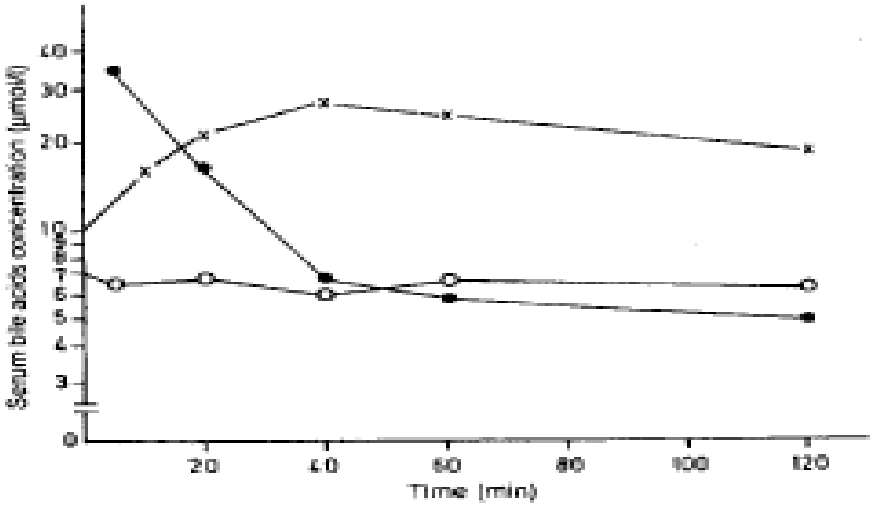


表 2.6.6-23: 妊娠雌ヒツジへのコール酸静脈内投与前後にモニターした母動物及び胎児の心血管系パラメータ及び血液ガス

	母動物（平均値 ± 標準偏差、n = 5）				
	ベースライン	5 分	20 分	40 分	60 分
HR (bpm)	90.0 ± 4.9	86.0 ± 6.5	84.0 ± 5.6	86.0 ± 6.5	82.0 ± 5.N*
BP (mm Hg)	73.3 ± 2.9	68.9 ± 2.4	74.7 ± 2.4	76.7 ± 0.7	76.5 ± 4.N*
IAP (mm Hg)	6.33 ± 0.80	7.00 ± 0.40	7.83 ± 0.83	6.16 ± 0.54	7.20 ± 0.N*
	胎児（平均値 ± 標準偏差、n = 5）				
	ベースライン	5 分	20 分	40 分	60 分
HR (bpm)	145.5 ± 13.9	144.0 ± 13.2	144.0 ± 14.5	145. 5 ± 14.6	145.5 ± 1.N*
BP (mm Hg)	41.3 ± 0.8	43.1 ± 1.0	42.7 ± 1.7	44.0 ± 1.2	42.5 ± 1.N*
PO_2 (mm Hg)	21.75 ± 3.13	20.50 ± 1.32	20.75 ± 1.65	20.75 ± 0.63	20.75 ± 0.N*
PCO_2 (mm Hg)	37.75 ± 3.13	39.88 ± 2.62	39.83 ± 2.03	41.48 ± 2.05	40.55 ± 2.N*
pH	7.39 ± 0.02	7.37 ± 0.03	7.37 ± 0.03	7.38 ± 0.01	7.38 ± 0.N*

HR：心拍数、毎分の拍動数、BP 及び IAP：平均動脈血圧及び子宮内圧、単位はいずれも mm Hg、PO_2 及び PCO_2：血液ガス、単位は mm Hg。結果は平均値 ± 標準偏差で示す。N*：コピーした文献からは上記の数字に関する情報は得られなかった。

2.6.6.6.2.2.2　(Campos, et al., 1986): “Effects of cholic acid infusion in fetal lambs”

コール酸を投与した際の、ヒツジ胎児の血液ガス、pH、心拍数、動脈圧、血漿中胆汁酸に及ぼす影響を評価する反復静脈内投与毒性試験を実施した。

妊娠雌ヒツジ 10 例の胎児 11 例を、2.3 mmol/日（934 mg）のコール酸投与群と対照群に分けて、それぞれにアンピシリン（1 g/L）及びヘパリン（コール酸投与群 2000 IU/L、対照群 4000 IU/L）を含む 5%ブドウ糖液を頸静脈に持続注入した。（胎児の体重が不明であるため、体重に基づく投与量の推定はできない。）コール酸の注入は、妊娠 122～127 日の間に開始し、満期（150 日）の 19～26 日前まで継続した。

このとき、血液ガス、pH、心拍数、動脈圧に対するコール酸の有意な影響はみられなかった。しかし、対照群内では総胆汁濃度はほとんど変化しなかったのに対し、コール酸を投与したヒツジ胎児では、分娩時の血漿中胆汁酸濃度が 829 ± 305 µmol/L と、投与前の 24.3 ± 5.7 µmol/L から有意に増加した（p<0.05）（表 2.6.6-24）。

コール酸を注入したヒツジ胎児及び対照双胎児 1 例（双胎児 b を除く）は、妊娠期間 131 ± 2.5 日で生存分娩となった。5%ブドウ糖を注入した対照胎児（双胎児 b を除く）は満期（147 ± 4.6 日）で生存分娩となった。

しかし、コール酸を注入した胎児では、実験 3 日目までに羊水中に胎便が出現した。

コール酸を高用量で注入した場合でも、胎児に対して致死的でなく、重度な危害も生じないという結論であった。しかし、胎児の早産は予期せぬものであったため、これについて正確な機序をさらに検討する必要があることを示唆している。

表 2.6.6-24: ヒツジ胎児に 5%ブドウ糖(対照群)又はコール酸(1.6 µmol· min^{-1}、実験群)を注入した際の心拍数(FHR)、動脈圧(MABP)、血液ガス及び血漿中総胆汁酸濃度(平均値 ± 標準偏差)

	対照群（n = 6）		実験群（n = 5）	
	ベースライン	注入時	ベースライン	注入時
FHR (bpm)	176 ± 10.3	171 ± 12.9	175 ± 14.1	176 ± 5.7
MABP (mm Hg)	42.2 ± 1.3	43.4 ± 3.2	43.2 ± 1.6	41.5 ± 3.6
$_pO^2$ (Torr)	24.0 ± 1.4	22.3 ± 1.6	24.3 ± 3.2	21.7 ± 3.9
$_pCO^2$ (Torr)	40.4 ± 3.8	42.6 ± 1.9	44.0 ± 4.2	42.9 ± 2.9
pH	7.40 ± 0.001	7.39 ± 0.008	7.38 ± 0.006	7.38 ± 0.006
羊水中に胎便がみられた例数	0/6	1/6	0/5	5/5[b]
血漿中胆汁酸（µmol/L）	23.8 ± 6.6[a]	24.4 ± 5.7[a]	24.3 ± 5.7	829 ± 305[c]

a: 双胎児 B を含む
b: カイ二乗検定で p<0.05（ベースラインと比較）
c: Student の t 検定で p<0.05（ベースラインと比較）FHR：胎児心拍数、MABP：動脈圧

2.6.6.6.2.3　ニワトリ

2.6.6.6.2.3.1　(Verrett, et al., 1980): “Toxicity and Teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo”

発育ニワトリ胚に対するコール酸の影響を検討する単回投与毒性及び催奇形性試験を行った。アセトンに溶解したコール酸を新鮮受精卵に卵当たり最大 25 mg で容量を 100 µL 以下とし単回注入した (Verrett, et al., 1980)。注射経路は、卵黄内投与と気室投与の 2 つとした。各注射経路に対し、卵への注入時期を孵卵前（0 時間）と孵卵 4 日目（96 時間）の 2 つで設定した。

各条件で、20 個以上の卵に注入した。このとき用量は 5 段階以上を設定し、各用量で注入例が 100 例に達するようにした。これにより、いずれの用量でも雛が孵化するようにした。

胚と孵化雛を無作為に 5 個以上選択し、以下の分析を行った。死亡率（%）、異常が 1 つ以上みられる鳥の総数、構造異常がみられる鳥の総数。

上記 4 つの試験条件下では、コール酸による催奇形性作用はみられなかった。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生に関する試験

出生前及び出生後の発生に関する文献はなかった

2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験に関する文献はなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

局所刺激性試験に関する文献はなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 代謝物の毒性試験

デオキシコール酸はコール酸の主代謝物である。以下の試験が、デオキシコール酸の単回投与、反復投与、遺伝毒性及び原がん性試験となる。結果の詳細は表 2.6.6-25～表 2.6.6-28 並びに下記にまとめている。

単回投与毒性試験において、マウスにおける静脈内投与でのデオキシコール酸の LD50 は、コール酸の約 2 分の 1 であったが、それでも非常に高かった（表 2.6.6-25）。

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、そのときの用量はコール酸より低かった（表 2.6.6-26）。デオキシコール酸を添加した混餌投与によって、体重増加量の低下又は体重減少、肝構造の損傷、血清トランスアミナーゼ上昇及び下痢がみられた。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。中間用量である 250 mg/kg/日をラットに投与したところ、数例の死亡、腸刺激症状及び下痢、並びに重度の肝障害の徴候が認められた。これらの作用はコール酸でみられる作用と類似しているが（2.6.6.9.2 項）、デオキシコール酸ではコール酸の約半量でみられた。以上から、コール酸の毒性作用は少なくとも部分的にデオキシコール酸を介するものである可能性が示唆される。

以下に提示する遺伝毒性試験によると、エームス試験又は彷徨試験におけるデオキシコール酸の変異原性に関するエビデンスはあいまいであった（表 2.6.6-27）。1 件の彷徨試験において、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。この知見もコール酸についての知見ときわめて類似しているが、デオキシコール酸によるこれらの影響は、コール酸の半分の濃度でみられた。デオキシコール酸は、コール酸より 10 倍低い濃度で、培養ラット肝細胞の生存率と DNA 合成を低下させるとする知見も得られた。

がん原性試験の結果より、コール酸とデオキシコール酸はいずれも発がん作用のプロモーターであることが示唆されている（表 2.6.6-28）。研究によると、発がん性物質 DEN 投与後に 8 週間混餌投与した場合に、デオキシコール酸が肝発がん促進作用を有することが示唆されている (Tsuda, et al., 1984)。DEN 投与後の GGT 陽性細胞巣が、デオキシコール酸混餌投与群で、DEN 単独投与群と比較して有意に増加した。0.3%コール酸（150 mg/kg/日）又は 0.06%、0.12%及び 0.3%のデオキシコール酸（それぞれ 30、60 又は 150 mg/kg/日）のいずれかを投与した動物の肝切片で、1 cm^2 当たりの前がん性 GGT 陽性細胞巣の数及び面積に明らかな用量依存性がみられた。

結腸発がんモデルを用い、2 パートに分けて行った試験のうち最初のパートでは、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を検討した (Seraj, et al., 1997)。この条件で、デオキシコール酸による有意な ACF の誘導はみられなかった。しかし、あらかじめ AOM による発がん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動物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 数が有意に多かった。同じ試験デザインを用いて検討した場合、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 数が多かった（10%）が、結腸当たりの平均 ACF 数については CA と DCA の間に統計学的有意差はなかった。

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結腸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が部分的に関与すると考えられる。

表 2.6.6-25: デオキシコール酸の影響を検討した単回投与毒性試験

試験	動物種、用量	結果
(Rothlin & Schalch, 1944)	マウス 100～200 mg/kg	LD_{50} = 150 mg/kg CA と同様の病理学的効果（2.6.6.2.1.1.1 項）

表 2.6.6-26: デオキシコール酸の影響を検討した反復投与毒性試験

試験	動物種、1 日投与量（mg/kg）	結果
(Delzenne, et al., 1992)	ラット 250 mg/kg 500 mg/kg	Wistar 雄ラットに、0.5%又は 1%のデオキシコール酸を添加した飼料を 2 週間与えた。 デオキシコール酸を投与することで、血清中のトランスアミナーゼ、ビリルビン、総胆汁酸の極めて大きな上昇がみられた。いずれの用量でも、以下のような肝実質構造の完全な変化がみられた。拡大した門脈腔の中央でみられる毛細胆管と卵形細胞の過剰増殖、及び主に好酸性多核細胞からなる門脈周囲の炎症性浸潤。 デオキシコール酸を投与した動物では、肝胆汁酸の総濃度が有意に増加し、デオキシコール酸が占める割合が大きくなった。
(Bray & Gallagher Jr, 1969)	ラット 75 mg/kg	Gofmoor 雄ラットに、デオキシコール酸 0.15%を添加した飼料を 26 日間与えた。デオキシコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 4.5 mg と算出された。このとき、相対投与量は 1 日当たり約 75 mg/kg と算出された。 デオキシコール酸 0.15%を含む給餌によって体重増加量が低下した。 用量 1 又は 10 mmol/L のデオキシコール酸によって、腸切片におけるオレイン酸-1-^{14}C の脂質への取り込みが有意に減少した。これらの結果は、1 又は 10 mmol/L のデオキシコール酸がオレイン酸のエステル化を in vitro で阻害することを示している。
(Visek, et al., 1965)	ラット 50～500 mg/kg	離乳期の Holtzman 雄ラットに 0.1%、0.5%又は 1%のデオキシコール酸ナトリウムを 28 日間与え、体重又は飼料消費量を記録し変化を観察した（実験 1）。デオキシコール酸の投与量の絶対値は 1 日当たり 2.65～26.5 mg と算出された。このとき、相対投与量は 1 日当たり約 50～500 mg/kg と算出された。さらに、1%尿素とクロルテトラサイクリン 100 mg/kg の添加又は非添加（単独又は併用）と条件を変えて、デオキシコール酸ナトリウム 0.1%、0.3%又は 0.5%を 28 日間ラットに給餌した（実験 2）。 デオキシコール酸 1%を投与した動物はすべて 5 日以内に死亡した。デオキシコール酸を 0.5%以上で与えた群では、28 日生存例でも下痢が認められた。死亡時又は 28 日目に、デオキシコール酸 0.5%を給餌した群では、遠位小腸の充血がみられた。実験 2 で 28 日間生存した 78 例の体重の平均増加量は、デオキシコール酸を飼料に添加した群で低下した。デオキシコール酸濃度の関数としてプロットしたところ、この低下を線形に近似できた。デオキシコール酸ナトリウム濃度が 0.1%増えるごとに体重増加量は、デオキシコール酸未投与群全体の平均値 108 g から約 10%ずつ下回って減少した。デオキシコール酸の投与濃度間にみられた差は非常に有意であった（$p<0.001$）。最低濃度のデオキシコール酸（0.1%）でも飼料摂取量が低下したが、高濃度では体重増加の低下が、飼料摂取量の低下のみによると考えられるものより大きかった。飼料による体重増加への転換に関するデータは、体重増加量の差異に関するものと同様であった。 体重増加抑制と死亡率からみられるように、デオキシコール酸ナトリウムは他の胆汁酸塩と比較して最も毒性が強いことが示された。

表 2.6.6-27: デオキシコール酸の影響を検討した遺伝毒性試験

試験	結果
(Mori, et al., 1991)	Salmonella typhimuriumTA100 及び TA98 を用いたデオキシコール酸 15～40 µg/mL による細菌彷徨試験であった。 デオキシコール酸では、Salmonella typhimurium TA100 又は TA98 における復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。 この結果より、デオキシコール酸には変異原性がないことが示唆された
(Venitt, et al., 1987)	Salmonella typhimuriumTA100 及び TA98 を用いたデオキシコール酸 15～40 µg/mL による細菌彷徨試験であった。 デオキシコール酸では、Salmonella typhimurium TA100 又は TA98 における復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。 この結果より、デオキシコール酸には変異原性がないことが示唆された。
(Watabe & Bernstein, 1985)	Salmonella typhimurium TA 100 及び TA98 を用いたデオキシコール酸による細菌彷徨試験と、Salmonella typhimurium TA 100 を用いたプレート変異原性試験（エームス試験）を実施した。 彷徨試験に用いた濃度は 15～40 µg/mL であった。 彷徨試験では、デオキシコール酸 20 µg/mL によって、Salmonella typhimurium TA98 及び TA100 において復帰変異コロニー数の増加がみられた。 プレート変異原性（エームス）試験では、2 mL のトップアガーにデオキシコール酸を 20、30、40、50、100 又は 500 µg で加えたところ、S9 混合液（アロクロール 1254 誘導ラット肝ホモジネート）添加の有無にかかわらず復帰突然変異体数の有意な増加はみられなかった。 これらの結果は、デオキシコール酸に変異原性があるか否かについて一貫しておらず、細菌彷徨試験は 20 µg/mL で陽性であったが、エームス試験は陰性であった。
(Martinez-Diez, et al., 2000)	Wistar ラットの初代培養肝細胞を、10～1000 µmol/L のデオキシコール酸に 6 時間曝露し、ニュートラルレッド取り込み及びホルマザン形成を用いて生存率を測定した。DNA 合成速度は、DNA への放射性標識チミジンの取り込みにより測定した。 細胞採取の 6 時間前に胆汁酸と放射性標識チミジンの両方を加えたそれぞれの培養皿で、DNA 合成に及ぼすデオキシコール酸の影響を検討した。なお、48 時間培養の細胞を用いた。 デオキシコール酸によるニュートラルレッド取り込みの低下は、コール酸やウルソデオキシコール酸よりも顕著であった。非抱合型のデオキシコール酸及びケノデオキシコール酸によって、タウリン抱合型やグリシン抱合型よりも強い毒性作用が生じた（2.6.6.4.1.2.1 のグラフ表示を参照）。 DNA への放射性標識チミン取り込み阻害作用は、タウロデオキシコール酸及びグリコデオキシコール酸の方がデオキシコール酸よりわずかに低かった。 したがって、これらの結果は、デオキシコール酸が細胞生存率と DNA 合成の両方を低下させる作用を持つことを示唆する。
(Jenkins, et al., 2007)	ヒト食道腺癌細胞株 OE33 を用いてコール酸の遺伝毒性試験（小核試験）を実施した。本研究の主な目的は、デオキシコール酸の潜在的遺伝毒性及びその機序を検討することとした。 デオキシコール酸（DCA）50～200 µmol/L にでは、同じ（中性 pH）条件下で有意な小数核の増加がみられた。この遺伝毒性は中性 pH でも酸性 pH でも明らかであったが、酸性 pH では胆汁によって生じる毒性が大きく増強した。酸性 pH で細胞死が多く、細胞生存率が低かった。これは、死細胞ではがんを発生することができないため、酸性胆汁を曝露した場合には発がん性ではなく毒性がみられるものと考えられる。また、DCA（中性及び酸性 pH）が曝露細胞の細胞質内で活性酸素種（ROS）の放出を誘導したことが示されている。さらに、抗酸化物質であるビタミン C の存在下で細胞を DCA で処置した際、小核形成が有意に低下したことから、DCA の遺伝毒性は ROS によるものであることを示した。 DCA が、中性及び酸性 pH のいずれにおいても遺伝子毒性作用を持つという結論であった。

表 2.6.6-28: デオキシコール酸の影響を検討したがん原性試験

試験	1 日投与量（mg/kg）	結果
(Tsuda, et al., 1984)	38～150 mg/kg	デオキシコール酸の肝発がん促進効果を、最初に DEN を単回投与した Fischer 雄ラットで検討した。DEN の単回投与（200mg/kg、腹腔内投与）の 2 週間後に、ラットに 0.06%、0.12%又は 0.3%デオキシコール酸を含む食餌を 8 週間給餌した。DEN 投与の 3 週間後に、全例で部分肝切除を行った。 相対投与量は 1 日当たり約 38～150 mg/kg と算出された。 デオキシコール酸 150mg/kg を給餌したラットでは、3 週目の部分肝切除後の数日以内に 55～60%が死亡した。 DEN のみ投与した対応する対照群と比較して、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ陽性（γ-GT^{+}）肝細胞巣の値が有意に増加したことから、デオキシコール酸（75～150 mg/kg）は促進作用を有すると考えられた。
(Seraj, et al., 1997)	200 mg/kg	最初の試験では、AOM を投与せず、基礎飼料に 0.4%デオキシコール酸を添加して 18 週間投与した後の F344 雄ラットの結腸における ACF の誘導と増殖に対する影響を検討した。コール酸の投与量は 1 日当たり約 20 mg と算出された。これは 200 mg/kg に相当する（コール酸プールサイズの 1.3 倍）。 次に、AOM（アゾキシメタン、15 mg/kg）を 7 日間隔で 2 回投与し、AOM の初回投与後から、基礎飼料又は基礎飼料に 0.4%デオキシコール酸を添加したものを 8 週間投与したときの F344 雄ラットの結腸における ACF の誘導と増殖に対する影響を同様に検討した。 コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸及びリトコール酸を与えたラットの結腸当たり ACF の平均数は、実験動物用固形飼料給餌群よりも多く、その差は統計的に有意であった（p<0.005）。腺窩を 5 つ以上有する ACF の平均数は、対照群である実験動物用飼料給餌群と比較して、コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸及びリトコール酸投与群で約 2.5～3.7 倍多かったが、ウルソデオキシコール酸投与群では約 8.2 倍少なかった。並行して行われた試験では、AOM を投与せずに同様の胆汁酸添加飼料を 18 週間給餌しても、ACF の有意な発生はなかった。 このデータは、AOM によって生じる ACF の発生と成長の増強がデオキシコール酸によってみられることを示唆する。

2.6.6.8.2　不純物の毒性試験

2.6.6.8.2.1　コール酸メチル

2.6.6.8.2.1.1　(Eltahir & Jenkins, 2010): “The bile acid impurity methyl cholate (MC) is non-genotoxic, as measured by the micronucleus assay in oesophageal OE33 cells.”

細胞分裂阻止法による小核試験を用いて、食道細胞（OE33 細胞）における in vitro の遺伝毒性試験を実施し、コール酸メチルの遺伝毒性の有無を検討したところ、本試験で採用した用量範囲（25～200 µmol/L）では、遺伝毒性が認められなかった。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。同時に、既報の所見 (Jenkins, et al., 2007)のように、コール酸は上記と同用量で遺伝毒性を示さなかったが、二次胆汁酸であるデオキシコール酸では上記と同用量で遺伝毒性を示した。

結論として、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考えられる。

2.6.6.8.2.1.2　(Macdonald, et al., 1978): “Effect of pH on bile salt degradation by mixed”

コール酸メチルエステル、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、リトコール酸、3α,7α-dihydroxy-12-oxo-5β-cholan-24-oate、3α,12α-dihydroxy-7-oxo-5β-cholan-24-eate、7α,12α-dihydroxy-3-

oxo-5β-cholan-24-oate、及び非エステル化胆汁酸に対して、Salmonella typhinurum の TA1535、TA1537、TA1438、TA98、及び TA100 株を用いたエームス試験を実施した。

実験の詳細は文献に記載されていない。

コール酸メチルを含むいずれの胆汁酸によっても、有意な数の復帰突然変異体がどの Salmonella 菌株でも生じなかった。実際には、胆汁酸によってバックグラウンド菌数が低下しておりこれは特に、デオキシコール酸とケノデオキシコール酸でみられた。

2.6.6.8.2.1.3 (Kim, et al., 2004): “A cholesterol biosynthesis inhibitor from Rhizopus oryzae”

ヒト肝細胞のコレステロール生合成に及ぼすコール酸メチルの影響を in vitro で検討する試験を実施した。

真菌 Rhizopus oryzae の酢酸抽出物からコレステロール生合成阻害剤として働くコール酸メチルを単離した。コール酸メチルには、ヒトの Chang 肝細胞におけるコレステロール生合成に対する中程度の阻害活性がみられた。またその阻害作用は、コレステロール生合成の後期段階に対してのものであり、その作用機序は HMG-CoA 還元酵素に作用するスタチンとは異なっていた。

2.6.6.8.2.1.4 (Suzuki, et al., 2008): “The novel compounds that activate Farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression”

細胞 4 種（COS-7、HepG2、HuH-7、Caco-2）におけるレポーター遺伝子アッセイによって、FXR 活性化に対する種々の化合物の効果及び FXR により調節される遺伝子発現への影響を検討する in vitro 毒性試験を実施した。

コール酸メチル（MeCA）、デオキシコール酸メチル（MeDCA）、5β-コラン酸、5β-コラン酸-7α,12α-ジオール、及び NIHS700 の胆汁酸誘導体 5 種類とマルカンチン A 及びマルカンチン E の天然物 2 種を試験対象化合物とした。比較として、内因性リガンド数種（コール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、ケノデオキシコール酸）も検討対象とした。

レポーター遺伝子アッセイ系を 2 種類用いた。サル腎臓細胞株の COS-7 に FXR 発現プラスミドを導入した条件で GFP 誘導体を用いるトレポーター遺伝子アッセイ。EYFP 及び ECFP の蛍光タンパク質 2 種類を用いた。前者を FXR 活性化の検出に用い、後者を内部対照として使用した。また、遺伝子導入したヒト肝細胞株（HepG2）、HuH-7、Caco-2 細胞に対してルシフェラーゼを用い、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を併用したレポーター遺伝子アッセイを実施した。

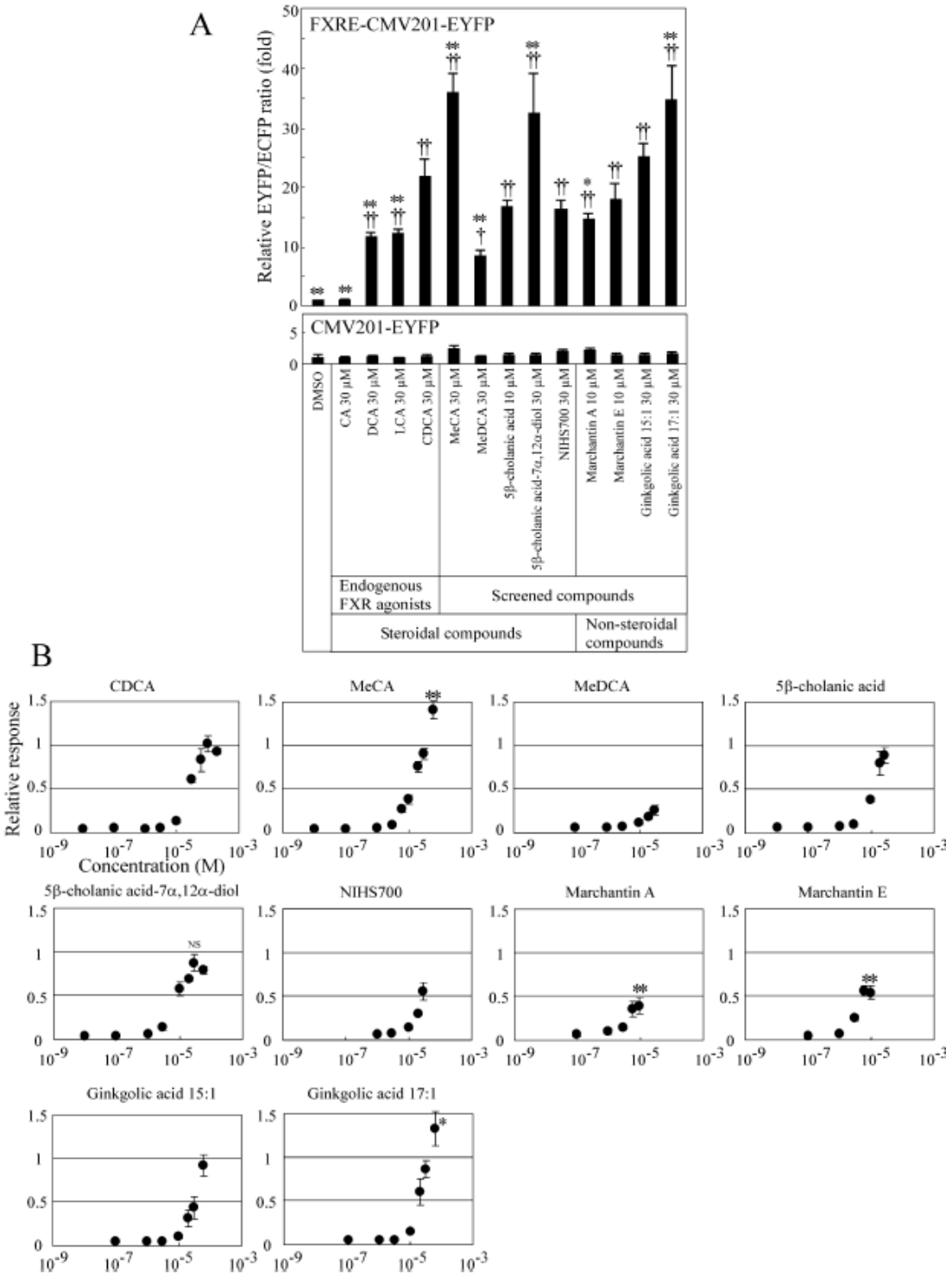
FXR 活性化の蛍光検出による、FXR 受容体を活性化する内因性分子と試験化合物（MeCA、MeDCA、5β-コラン酸、5β-コラン酸-17α,12α-ジオール、NIHS700、マルカンチン A、マルカンチン E、ギンコール酸 15:1、ギンコール酸 17:1）の効果の比較を図 2.6.6-6 に示す。

さらに、試験対象化合物の用量反応性を CDCA100 µmol/L と比較したものを図示した。

胆汁酸誘導体 5 種類（MeCA、MeDCA、5β-コラン酸、5β-コラン酸-7α,12α-ジオール、及び NIHS700）と天然物 2 種（マルカンチン A 及びマルカンチン E）は、レポーター遺伝子アッセイ

において、FXR 受容体を活性化することがわかった（図 2.6.6-6）。これらの化合物には、最も強力な内因性胆汁酸であるケノデオキシコール酸と同様の高度な FXR 活性化がみられた。

図 2.6.6-6: コール酸メチル及び他の化合物に応答するレポーター遺伝子発現



A：FXR の活性化。COS-7 細胞に FXRE を含むレポータープラスミド、FXR 及び RXRα 発現プラスミド、並びに内部対照プラスミドを導入した。遺伝子導入した細胞を各化合物で処理した。値はすべて平均 ± S.D.とし、

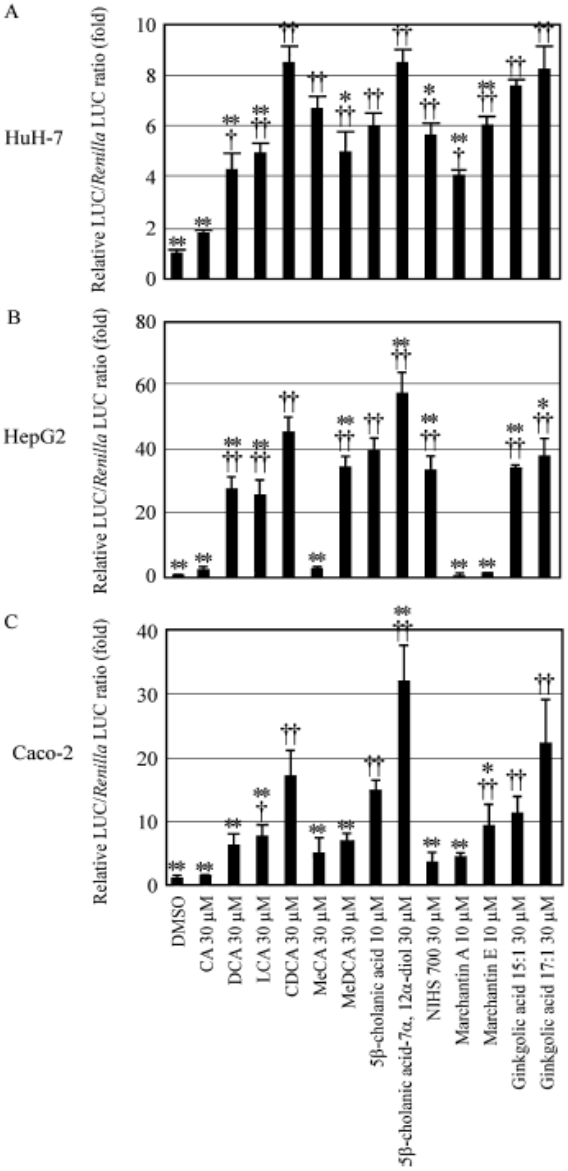
n = 4 である。(†) DMSO との比較で P<0.05、(† †) DMSO との比較で P<0.01、*CDCA（30 µmol/L）との比較で P<0.05、**CDCA（30 µmol/L）との比較で P<0.01、以上、Dunnett 検定による。
B：FXR のレポーター遺伝子アッセイに関する用量反応分析 CDCA 100 µmol/L でみられた反応に対する比を示す。値はすべて平均 ± S.D.とし、n = 4 である。*P<0.05、**P<0.01、NS：有意差なし（CDCA 100 µmol/L との Student の t 検定による比較）

各種内因性の FXR 活性化因子及び試験対象化合物による FXR の活性化作用を各種細胞株（HuH-7、HepG2 及び CaCo-2）でみたものを図 2.6.6-7 に示す。

HuH-7 細胞におけるコール酸メチルによる BSEP 発現の誘導は、HepG2 細胞における BSEP 及び SHP 発現の誘導よりも強かった（図 2.6.6-7）。

コール酸メチルを含む 7 つの化合物によって、最も強力な胆汁酸と同程度の FXR の活性化がみられ、FXR の調節を受ける遺伝子の発現が細胞特異的、遺伝子選択的に制御される場合がみられたとする結論であった。

図 2.6.6-7: レポーター遺伝子アッセイにおける FXR 活性化の差異



A：HuH-7 細胞における FXR の活性化を示す。HuH-7 細胞に FXRE とルシフェラーゼを含むレポータープラスミド、FXR 及び RXRα発現プラスミド、並びにウミシイタケルシフェラーゼを含む内部対照プラスミドを導入した。遺伝子導入した細胞を各化合物で処理した。データはすべて 4 ウェルの平均 ± S.D.で示す。(†) DMSO との比較で P<0.05、(††) DMSO との比較で P<0.01、*CDCA（30 µmol/L）との比較で P<0.05、**CDCA（30 µmol/L）との比較で P<0.01、以上、Dunnett 検定による。HepG2 及び caco-2 細胞における FXR の活性化を、それぞれ中央及び下のパネルに示す。細胞種以外、全ての操作は上記と同じとした。
B：HepG2 細胞、n = 4C：Caco-2 細胞、n = 4～5

2.6.6.9 考察及び結論

コール酸の安全性を非臨床試験で評価した文献でレビューした。考察を以下に示す。コール酸の単回投与、反復投与、遺伝毒性作用、原がん性作用について検討した試験すべての要約を表 2.6.6-29 に示す。

可能な場合、実験動物に投与したコール酸投与量の絶対値又は相対値を、生理的なコール酸のプールサイズの平均値と比較した (Cronholm, et al., 1974), (Carrella & Dietschy, 1977), （2.6.5 項）。ラットのコール酸プールサイズは、対照群 2 群で 175～245 mg/kg、136～190 mg/kg (Carrella & Dietschy, 1977)又は、118 mg/kg (Cronholm, et al., 1974)と報告された。したがってラットにおけるコール酸プールサイズの現実的な推定値は 150 mg/kg と考えられた。マウスのコール酸プールサイズについては、168 ± 21 µmol/kg 体重（69 mg/kg）とする報告が 1 件ある（Hulzebos et al. 2001[56]）。しかし、実験時の反復検体採取中に大量の胆汁が採取されたために値が過小に見積もられており、プールサイズに影響したことを筆者らは認めている (Hulzebos, et al., 2001)。

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。

NOAEL の確定に関しては、前述の文献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、コール酸の投与に関連した影響については検討していない。したがって、毒性試験の文献からコール酸の 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、ヒトを含めてすべての実験系において有害作用がないことは明らかである。

表 2.6.6-29: コール酸を単回投与した際の影響を検討した全試験の概要

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量（mg/kg）	CA 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	静脈内注射	200 - 500 mg/kg	3-7	LD_{50} は 350 mg/kg（0.86 mmol/kg）。LD_{50} 絶対値は、マウス 1 例当たり 7 mg で、推定コール酸プールの約 4 倍である。	(Rothlin & Schalch, 1944)
単回静脈内投与	ラット／Wistar	静脈内注射	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、用量依存的な陰性変時作用がみられた。このとき一般的に随伴する、平均動脈圧の低下もみられた。50 mg/kg を超える用量は致死的であった。	(Joubert, 1978b)
単回静脈内投与	ウサギ	静脈内注射	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、すぐに回復した。	
			60 mg/kg		注射時に即死した。	

CA：コール酸、N.D.：未測定

表 2.6.6-30: コール酸を反復投与した際の影響を検討した全試験の概要

試験の種類	動物種／系統	N／群	投与方法	投与期間	CA の混餌濃度（%）	用量（mg/kg）	CA 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	給餌	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 値の有意な用量依存的増加。 びまん性肝細胞壊死、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。 血清胆汁酸値の有意な上昇。 胆汁流量の有意な増加。	(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	コール酸によって、コレステロール結石及び胆嚢病変が生じ、肝重量が増加した。	(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	コール酸は、胆汁中コレステロールの腸管吸収、肝臓におけるバイオアベイラビリティ及び相分離を増強することにより、胆汁コレステロールの過剰分泌及び胆石形成を促進する。	(Wang, et al., 1999)
2 週間混餌投与試験	ラット／Wistar	10	給餌	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増加及び血清総胆汁酸の強い増加が認められたが、肝臓の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／Sprague-Dawley	7	給餌	26 日間	0.15 %	75 mg/kg	0.5	30 日間にわたる体重増加抑制。 CA 投与による腸粘膜の組織学的変化は生じなかった。	(Bray & Gallagher Jr, 1969)
28 日間混餌投与試験	ラット／Holzman	6	給餌	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 2.6.6-30: コール酸を反復投与した際の影響を検討した全試験の概要　（続き）

試験の種類	動物種／系統	N／群	投与方法	投与期間	CA の混餌濃度（%）	用量（mg/kg）	CA 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、肝臓の脂質含有量が数倍に増加した。	(Gambal & Quackenbush, 1960)
1 年間及び 9 カ月間の混餌投与試験	ラット／Wistar	10	給餌	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、組織像で脂肪変性、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。脾臓には腫大と組織像の変化がみられ、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)

いずれの用量も 1 日当たり投与量とする。CA：コール酸、N：例数、N.D.：未測定

表 2.6.6-31: コール酸の遺伝毒性作用を検討した全試験の概要

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与期間	用量	試験結果	参考文献
エームス試験 彷徨試験	Salmonella Typhimurium TA100 株と TA98 株	In vitro	N/A	15-75 µg/mL	コール酸では、Salmonella typhimurium TA100 又は TA98 における復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。	(Mori, et al., 1991)
エームス試験	Salmonella Typhimurium TA100 株と TA98 株	In vitro	N/A	15-75 µg/mL	コール酸では、Salmonella typhimurium TA100 又は TA98 における復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。	(Venitt, et al., 1987)
エームス試験 彷徨試験	Salmonella Typhimurium TA100 株と TA98 株	In vitro	N/A	25-75 µg/mL	コール酸 40～50 µg/mL によって、Salmonella typhimurium TA100 及び T98 において復帰変異コロニー数の増加がみられた（$p < 0.05$）。 2 mL のトップアガーにコール酸を 20、30、40、50、100 又は 500 µg で加えたところ、S9 混合液（アロクロール 1254 誘導ラット肝ホモジネート）添加の有無にかかわらず復帰突然変異体数の有意な増加はみられなかった（表 2.6.6-14）。	(Watabe & Bernstein, 1985)
エームス試験	Salmonella Typhimurium TA1535,TA1536, TA1537,TA1538, TA98 及び TA100 株	In vitro	N/A	500 µg	コール酸の変異原性並びに 2-AA による助変異原性は、いずれの菌株でも確認されなかった。また、デオキシコール酸でも結果は同様であった。	(Silverman & Andrews, 1977)
小核試験	ヒト腺癌細胞株 OE33	In vitro	N/A	50 µM - 1 mM	試験に用いた用量のコール酸による小核数の増加はなかった。	(Jenkins, et al., 2007)
有糸分裂	雌性 Wistar CF ラット肝細胞	In vitro	6 時間	10-1000 µmol/L	コール酸は、500 µmol/L 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低下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同様に、細胞生存率低下作用が最も小さい胆汁酸であった。	(Martinez-Diez, et al., 2000)

N/A：該当せず

表 2.6.6-32: コール酸のがん原性を検討した全試験の概要

試験の種類	動物種／系統	N／群	投与方法	投与期間	CA 用量	CA プールサイズの倍数	試験結果	参考文献
ジエチルニトロソアミン誘発性腫瘍に対する作用	ラット／F344	20	200 mg/kg の DEN を単回腹腔内投与後にコール酸 0.3%を混餌投与	8 週間	30-150 mg/kg	1	DEN のみ投与した対応する対照群と比較して、GGT 陽性細胞巣の定量値が有意に増加したことから、150 mg/kg のコール酸は、前がん性と考えられる病変の発生をラット肝で促進する作用を有した。	(Tsuda, et al., 1984)
単独の作用、又はアゾキシメタン誘発性腫瘍に対する作用	ラット／F344	7	AOM15 mg/kg の皮下投与 コール酸 0.4%を飼料に添加	18 週間又は 8 週間	200 mg/kg	1.3	コール酸 200 mg/kg を飼料に添加しても結腸に ACF 様前がん病変の発生はみられず、F344 ラットの身体発達に有害な影響は認められなかった。 一方、AOM の投与後にコール酸 200 mg/kg を投与したことで、基礎飼料給餌群と比較して ACF 数が統計学的に多くなった。	(Seraj, et al., 1997)
アゾキシメタン誘発性腫瘍に対する作用	ラット／Sprague-Dawley	5-7	AOM15 mg/kg の皮下投与 コール酸 0.2%を飼料に添加	20 週間	100 mg/kg	0.67	コール酸 100 mg/kg によって、初期段階の結腸発がん増強がみられるが、イニシエーション後の段階では効果がない。	(Baijal, et al., 1998)
N- Methyl-N-nitrosourea 誘発性腫瘍に対する作用	ラット／F344	10-25	MNU 0.1 mg/kg の直腸内投与 カルシウム 1.6%の添加又は非添加の飼料にコール酸 0.2%を添加	27 週間	100 mg/kg	0.67	飼料にコール酸 100 mg/kg を添加すると、特定の結腸発がん物質 MNU の投与後に腫瘍数が増加する。 カルシウム 800 mg/kg に、腫瘍性疾患の発症から結腸を保護する作用はなかった。	(McSherry, et al., 1989)

いずれの用量も 1 日当たり投与量とする。CA：コール酸、DEN：ジエチルニトロソアミン、AOM：アゾキシメタン、MNU：N-Methyl-N-Nitrosourea、GGT：γ-グルタミルトランスペプチダーゼ、ACR：異常腺窩巣

表 2.6.6-33: コール酸の生殖発生毒性作用を検討した全試験の概要

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与期間	用量	CA プールサイズの倍数	試験結果	参考文献
胚・胎児発生への影響	ゴールデンハムスター	飼料中 0.5%	18 日間	540～720 mg/kg	N.D.	妊娠期間中のコール酸 540～720 mg/kg 摂取は、母体及び新生児の肝胆道系に対し、程度は様々だが毒性を引き起こした。	(Siviero, et al., 2008)
胚・胎児発生への影響	ヒツジ（雌）	静脈内ボーラス投与	ボーラス単回注射	0.41 mg/kg	N.D.	母動物の胆汁酸血漿中濃度が急激に上昇しても、母動物にも胎児にも重大な有害作用は生じない。	(Perez, et al., 1994)
胚・胎児発生への影響	ヒツジ（子ヒツジ）	点滴静注	屠殺時まで継続	934 mg/日で持続静注	N.D.	コール酸を高用量（408 mg/kg）で注入した場合でも、胎児に対して致死的でなく、重度な危害も生じない。 胎児の早産あり。	(Campos, et al., 1986)
胚・胎児発生への影響	ニワトリ	卵黄又は気室への注射	注射	25 mg/卵	N.D.	上記 4 つの試験条件下では、コール酸による催奇形性作用はみられなかった。	(Verrett, et al., 1980)

a：反復投与試験及びがん原性試験における 1 日投与量、N/A：該当せず、N.D.：未測定

2.6.6.9.1 単回投与毒性試験（静脈内）

単回投与毒性データの概要については、表 2.6.6-29 を参照のこと。予備実験において、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は 200 mg/kg であった (Rothlin & Schalch, 1944)。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、不穏、間代性強直性痙攣に至る運動過多、運動失調及び昏迷（完全に衰弱し、5～10 分以内で死亡に至る）が認められた (Rothlin & Schalch, 1944)。生存例は 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）とした。

ウサギにコール酸 30 mg/kg を静脈内ボーラス投与したところ、有害事象は認められなかった (Gillert, 1926)。コール酸を 30 mg/kg から 60 mg/kg に増量すると、副作用及び致死率が増加した (Gillert, 1926)。このことから、致死量は 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、静脈内投与量 3500 mg までは許容できると推察される。

また、2.6.2.4.1.1.1 項に概要を示した報告によると、コール酸を麻酔下ラットに静脈内投与したところ、用量依存的な陰性変時作用がみられた。このとき一般的に、平均動脈圧の低下もあわせてみられた (Joubert, 1978b)。50 mg/kg（コール酸プールサイズの 1/3）を超える用量は致死的であった。

2.6.6.9.2 反復投与毒性試験（経口）

高頻度に報告されているコール酸の影響は、体重減少、肝臓重量の増減、胆石及び下痢である。その他に、直腸出血 (Baijal, et al., 1998)及び脾腫 (Lacassagne, et al., 1967)等が報告されている。反復投与毒性データの概要については、表 2.6.6-30 を参照のこと。

- 体重への影響

ラットに 1 日当たりコール酸約 75 mg/kg（コール酸プールサイズの 2 分の 1）を 26 日間混餌投与した結果、体重減少が認められた (Bray & Gallagher Jr, 1969)。ラットに 1 日当たりコール酸ナトリウム約 50 mg/kg（コール酸プールサイズの 3 分の 1）を 28 日間投与した結果、成長抑制は認められなかったが、コール酸ナトリウムを 1 日当たり約 1000 mg/kg（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 日当たりコール酸約 500 mg/kg（内因性コール酸プールサイズの 3.3 倍）を 5 週間混餌投与したところ、体重増加抑制を認め、最大体重は対照群の 36%であった (Gambal & Quackenbush, 1960)。最後に、1 日当たりコール酸 25 mg/kg（コール酸プールサイズの 6 分の 1）を 1 年間混餌投与したラットにおいても、体重の減少が認められた (Lacassagne, et al., 1967)。

- 肝臓及び脾臓への影響

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 AP レベルの有意な用量依存的増加がみられ、びまん性肝細胞壊死、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 (Fickert, et al., 2001)。この概要は 2.6.2.2.1.1.6 項に示す。また、胆汁流量が有意に上昇した。

ラットに 1 日当たりコール酸 250 mg/kg 及び 500 mg/kg（内因性コール酸プールの 1.7 倍及び 3.3 倍）を 2 週間投与したところ、トランスアミナーゼの軽微な上昇及び肝小葉組織像の軽度な変化がみられ、軽度の肝障害が認められた (Delzenne, et al., 1992)。Wistar ラットに 1 日当たりコール酸約 25 mg/kg（コール酸プールサイズの 6 分の 1）を 1 年間混餌投与したところ、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)。コール酸による炎症作用が一般的に認められた (Lacassagne, et al., 1967)。

スナネズミにコール酸 833 mg/kg 及びコレステロール 1666 mg/kg を添加した固形飼料を 4 カ月間与えたところ、対照群の肝臓と比較して肝臓が有意に大きくなった。コール酸／コレステロール混餌投与群の動物の肝臓は淡黄色を呈しており、脂肪変性を示した。また、胆嚢の極度な拡張がみられた (Bergman & van der Linden, 1971)。さらに、スナネズミにコール酸 714 mg/kg 及びコレステロール 1428 mg/kg 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)。またこのとき、体重に対する心臓の相対重量も有意に増加した。

さらに、1 日当たりコール酸 833 mg とコレステロール 1666 mg/kg を給餌した試験群の生存例ではすべて腹水を伴う脾腫が認められたとする報告もあった (Bergman & van der Linden, 1971)。コール酸 714～833 mg/kg とコレステロール 1428～1666 mg/kg を添加した固形飼料を与えたスナネズミでは、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みられたと結論づけた (Bergman & van der Linden, 1971)。

- 胆石の形成

高コレステロール飼料とともにコール酸を 1 日当たり 750mg/kg 又は 1500mg/kg（コール酸プールサイズの 11 倍及び 22 倍）で 2～8 カ月間投与したマウスにコレステロール結石及び胆嚢病変がみられた (Besançon, et al., 1970)。デヒドロコール酸と比べてコール酸の結石形成作用は安定しておらず、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)。作用機序試験では 1 日当たりコール酸 750mg/kg（コール酸プールサイズの 11 倍）を 1%コレステロールとともに 1 年間投与したマウスで、いずれも胆石が数個みられた (Wang, et al., 1999)。コール酸によって腸管のコレステロール吸収と胆汁中コレステロール量が増加し、さらに結石形成に向けた相転移が生じることで、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。さらに、この試験により、コール酸は 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、コール酸によってムチンゲル形成が誘発された。

この所見に合致して、スナネズミでは、1 日当たり 833 mg/kg のコール酸を 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)。

- 下痢

ラットに 1 日当たりコール酸ナトリウム約 1000 mg/kg（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、死亡した全例で重度の下痢が認められた (Visek, et al., 1965)。

1 日当たりコール酸約 500 mg/kg（コール酸プールの 3.3 倍）を投与したラットでは、下痢など重度の消化管障害が認められ、7 例中 2 例が 5 週間の投与期間中に死亡した (Gambal & Quackenbush, 1960)。

相対投与量として 1 日当たり約 100 mg/kg（コール酸プールサイズの 0.75 倍）を 20 週間混餌投与したラットでは、直腸出血等のその他の影響も報告された (Baijal, et al., 1998)。

2.6.6.9.3　遺伝毒性試験

遺伝毒性データの概要については、表 2.6.6-31 を参照のこと。

- 彷徨試験、エームス試験

彷徨試験で 25～75 µg/mL (Mori, et al., 1991)又は 15～50 µg/mL (Watabe & Bernstein, 1985), (Venitt, et al., 1987)を用いたところ、Salmonella Typhimurium TA100 又は TA98 のいずれにおいても復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。しかしながら、コール酸 40～50 µg/mL によって、Salmonella typhimurium TA100 及び TA98 のいずれにおいても復帰変異コロニー数の増加がみられた（$p<0.05$） (Watabe & Bernstein, 1985)。ただし、S9 混合液添加下でコール酸 20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、100 µg、500 µg で処理したエームス試験結果は陰性であった (Watabe & Bernstein, 1985)。遺伝毒性試験結果の違いは、用いた方法が試験間で異なることによるものと考えられる。

- 哺乳類細胞を用いた in vitro 試験

コール酸は、ヒト食道腺癌細胞株において、50 µmol/L～1 mmol/L の濃度で、小核数の有意な増加を誘発しなかった (Jenkins, et al., 2007)。

肝細胞を 10～1000 µmol/L の濃度のコール酸でインキュベートしたところ、コール酸はウルソデオキシコール酸と同様に、細胞生存率低下作用が最も小さい胆汁酸であることがわかった。コール酸は、500 µmol/L 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低下させることが示された (Martinez-Diez, et al., 2000)。これは、コール酸が肝細胞の生存性に対する影響がないことを示している。

2.6.6.9.4　がん原性試験

がん原性データの概要については、表 2.6.6-32 を参照のこと。

- 肝発がん性

低用量のコール酸（飼料中 0.05%、これは 1 日当たり 25 mg/kg に相当し、コール酸プールの 1/6 である）を DAB とともに 1 年間又は 9 カ月間給餌した試験のラットで、発がん作用の促進はみられなかった (Lacassagne, et al., 1967)。コール酸を飼料中に 0.3%の高用量（1 日当たり 150

mg 又はコール酸プールの 1 倍）で 8 週間投与したところ、発がん物質 DEN 投与後の F344 ラットの肝臓 1 cm^2 当たりの GGT 陽性細胞巣の数と面積は、DEN を単独で投与した群と比べて有意に増加した (Tsuda, et al., 1984)。

ただしいずれの試験も評価したものは、前がん病変であり、実際の肝がんではなかった。

- 結腸発がん性（ACF に対する作用）

F344 ラットにコール酸を 0.4%（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）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 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 平均数が対照群と比較して有意に多かった。

コール酸 0.2%（1 日当たり 100 mg/kg、コール酸プールの 0.75 倍）を飼料に添加して 20 週間与えたところ、発がん物質 AOM 投与後の発がん初期段階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発がんの増強がみられなかった (Baijal, et al., 1998)。

- 腫瘍数に対するコール酸の影響

発がん物質 MNU を投与した各群の Fisher 344 ラットに、コール酸 0.2%（1 日当たりコール酸 100 mg/kg 又はコール酸プールの 0.75 倍）を 27 週間混餌投与したところ、対照飼料投与例と比べて腫瘍数（80% vs. 55%）、動物 1 例当たりの腫瘍数（2.24 vs. 0.75）及び担腫瘍動物 1 例当たりの腫瘍数（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、非浸潤がんや浸潤がんもみられた。

2.6.6.9.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性データの概要については、表 2.6.6-33 を参照のこと。

妊娠雌ハムスター3 例にコール酸 600 mg/kg を交配日から 18 日間混餌投与した場合の影響を検討した定性的試験では、屠殺時の母動物の肝臓に細胆管増生が認められた（中等度、軽微、顕著なものがそれぞれ 1 例ずつ） (Siviero, et al., 2008)。門脈域の炎症細胞浸潤及びクッパー細胞のセロイド沈着が 2 例で認められ、また、分葉の増強が 2 例で認められた。肝内及び／又は肝外胆管では、上皮細胞の過形成又は増殖が全ての動物で認められた。すべての仔（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。また、肝外胆管上皮の過形成又は増殖が 3 例でみられた（25%）。上記例では、門脈域で軽微な細胆管／胆管増生もみられた (Siviero, et al., 2008)。

妊娠雌ヒツジ 5 例において、コール酸 0.41 mg/kg を単回ボーラス投与した結果、投与時と比較して、その後の 24 時間に心血管系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、コール酸 298 mg/kg を持続静脈内投与したところ、血液ガス、pH、心拍数、動脈圧を含む各種心血管系パラメータに有意な影響はみられなかった (Campos, et al., 1986)。興味深いことに、胎児のコール酸平衡濃度は母体の血漿中濃度のほぼ 4 倍であった

(Perez, et al., 1994)。この知見と一致して、報告によると、ヒツジ胎児の血漿中胆汁酸濃度は投与前の 24.3 ± 5.7 µmol/L から出生後に 829 ± 305 µmol/L へと有意に増加した（p<0.05） (Campos, et al., 1986)。

妊娠雌ヒツジ 1 例に対し、満期直前にコール酸を投与したところ、2〜3 分の潜時を経て子宮収縮が生じた。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)。なお、対照動物のデータの記載はなかった。よってこの影響を、コール酸又は実験手順によるものと考えることはできない。

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、ニワトリにおいて催奇形性作用はみられなかった (Verrett, et al., 1980)。

2.6.6.9.6 その他の毒性試験

- 代謝物

デオキシコール酸はコール酸の主代謝物である。

単回投与毒性試験においてデオキシコール酸を静脈内投与したときのマウスの LD_{50} やウサギの致死量は、コール酸におけるこれらの値のそれぞれ約 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 の範囲であった。またこの用量では、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、その用量はコール酸の約 2 分の 1 であった。デオキシコール酸を添加した混餌投与によって、体重増加量の低下又は体重減少、肝構造の損傷、血清トランスアミナーゼ上昇及び下痢がみられた。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。中間用量である 250 mg/kg/日をラットに投与したところ、数例の死亡、腸刺激症状及び下痢、並びに重度の肝障害の徴候が認められた。全体として、コール酸の毒性作用は少なくとも部分的に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。

細菌を用いた遺伝毒性試験として示したもののうち、比較的低濃度で遺伝毒性陽性となったとする彷徨試験による試験報告が単発で 1 件みられたが、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。この知見もコール酸についての知見ときわめて類似しているが、デオキシコール酸によるこれらの影響は、コール酸の半分の濃度でみられた。デオキシコール酸は、コール酸より 10 倍低い濃度で、培養ラット肝細胞の生存率と DNA 合成を低下させるとする知見も得られた。

がん原性試験の結果より、コール酸とデオキシコール酸はいずれも発がん作用のプロモーターであることが示唆されている。研究によると、発がん性物質 DEN 投与後に 8 週間混餌投与した場合に、デオキシコール酸が肝発がん促進作用を有することが示唆されている。DEN 投与後の GGT 陽性細胞巣が、デオキシコール酸混餌投与群で、DEN 単独投与群と比較して有意に増加した。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性効果が認められた。

結腸発がんモデルを用いた試験の報告がある。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を検討した。この条件で、デオキシコール酸による有意な ACF の誘導はみられなかった。しかし、あらかじめ AOM（アゾキシメタン）による発がん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動物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 数は有意に多かった。同じ試験デザインを用いて検討した場合、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 数が多かった（10%）が、結腸当たりの平均 ACF 数については CA と DCA の間に統計学的有意差はなかった。

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結腸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が部分的に関与すると考えられる。

- 不純物

Orphacol®の不純物であるコール酸メチルに関する文献は極めて限られている。コール酸メチルはエームス試験において変異原性を持たないことが示された (Macdonald, et al., 1978)。コール酸メチルは食道細胞（OE33 細胞）を用いた小核試験において、遺伝毒性は認められなかった (Eltahir & Jenkins, 2010)。

薬力学的実験において、コール酸メチルは in vitro でコレステロール合成を中程度に阻害することが示された (Kim, et al., 2004)。さらに、コール酸メチルはレポーターアッセイにおいて、もっとも強力な内因性胆汁酸であるケノデオキシコール酸と同様、高度に FXR 受容体を活性化した (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できることが示され、コール酸メチルは細胞型特異的に、及び／又は遺伝子-種選択的にこれらの遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。

2.6.6.9.7　結論

Orphacol®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 日の内因性合成量を最大用量として経口投与する。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 に相当する（2.7.2.4.1.4 項）。

コール酸の単回投与毒性試験は、系統的な分析がなされておらず、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、コール酸を静脈内投与した際の LD_{50} は、マウスに静脈内投与した場合だと 350 mg/kg であり、明らかに極めて高い。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。後者を除き、特定の毒性作用について、実験的に十分に裏付けられた観察結果の記載はなかった。ヒツジに 1 mg/kg 未満の用量を投与した試験では、有意な毒性がみられなかった。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、目的とするコール酸の使用に直接関連するものではない。

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。げっ歯類に 0.5%コール酸と 1%コレステロール（又はそのコレステロール相当量）を加えた飼料を給餌することで、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。

コール酸が遺伝毒性作用を有するかどうかについては、相反する試験結果が出たことから、結論が出ていない (Watabe & Bernstein, 1985)。しかし、その後の試験では、哺乳類細胞を用いた in vitro 小核試験とともに、変異原性はないとする結果が一貫して認められた。

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。しかし、発がん性物質による肝癌及び結腸癌誘発モデルを用いた短期又は中期試験によるがん原性の検討結果が得られた。こうしたモデルを用いた研究数件によると、コール酸は、発がん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可能性が示唆されている。コール酸を単独投与したところ、発がん性はみられなかったものの、これは短期の実験によるものであり、従来のがん原性試験とは比較できない。実験的に誘発したラット肝癌及び結腸癌モデルにおいて、100～150 mg/kg のコール酸で腫瘍促進効果が示された。これらの試験における 1 日投与量は、内因性濃度（算出値）の 0.5～1 倍であった。よって、発がん促進作用は、比較的高用量を投与した場合に生じる可能性がある。興味深いことに、コール酸の発がん促進作用は、結腸癌の初期のみにみられた。残念ながら、発がん促進効果が認められると考えられる最低濃度を系統的に検討した試験はない。しかし、用量を 25 mg/kg とした 1 件の実験系で、肝腫瘍促進効果は認められなかった。

ラット及びヒツジを用いた試験では、胎児血中にコール酸が存在しており、胎盤を通過することが認められた。動物の生殖と発生への影響についてハムスターで検討したところ、コール酸によって、母動物と仔双方の肝臓組織像に毒性作用が認められた。しかし、ハムスターの飼料中には 0.5%コール酸（60 mg/日）が含まれていた。マウスとラットの内因性コール酸プールサイズを考えると、内因性プールサイズ相当量を日々投与した可能性が高い。コール酸 29 mg を単回ボーラス注射した際の妊娠雌ヒツジの心血管系パラメータ又は血液ガスに対する有意な影響はみられなかった報告があり、これは、コール酸が発育中の胚に影響を及ぼす可能性は低いという示唆を裏付けるものである。しかし、コール酸をボーラス注射した場合と、胎児ヒツジへ 1 日当たり 934 mg の持続注入した場合とで、胎児の早期分娩が認められた。内因性分子として存在する生理的濃度のコール酸では胚毒性が明らかにみられないことを、目的とする臨床使用との関連で

理解する必要がある。さらに、正常な一次胆汁酸合成はヒトの生存に必須であり、妊娠が生じる際も、その存在は不可欠である。

コール酸の主要代謝産物のデオキシコール酸でも、同様の用量範囲でコール酸と非常に類似した毒性作用を示すことが多くの文献より示されている。しかし、単回及び反復投与試験では、コール酸が同じ作用を生じるのに必要な用量の約半量のデオキシコール酸で、致死作用、消化管毒性及び肝毒性がみられた。コール酸と同様、デオキシコール酸の遺伝毒性の有無についても、細菌を用いた試験によって決定的な証拠は得られていない。しかし、in vitro 小核試験では明確にデオキシコール酸の遺伝毒性がみられた。肝発がん及び結腸発がんラットモデルでは、コール酸と同様、デオキシコール酸は前がん病変の発生を増強する。

不純物であるコール酸メチルに関する文献は限られている。コール酸メチルは、エームス試験において変異原性がみられず、コール酸に類似した薬力学的特性を有する可能性があることが示されている。

2.6.6.10 参照文献

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.

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.

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

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.

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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