

エディロールカプセル0.5 µg
エディロールカプセル0.75 µg
(エルデカルシトール)
[骨粗鬆症]

第2部 (モジュール 2)
CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ALF	Alfacalcidol	アルファカルシドール
CAL	Calcitriol	カルシトリオール
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1, 25-dihydroxycholecalciferol	活性型ビタミン D ₃
OVX	Ovariectomy	卵巣摘出
VDR	Vitamin D receptor	ビタミン D 受容体
VDRE	Vitamin D Responsive Element	ビタミン D 応答配列

目次

	<u>頁</u>
2.6.1 緒言	4
2.6.1.1 エルデカルシトールの薬理学的特性	4
2.6.1.2 VDR の発現部位及び活性型ビタミン D ₃ の生理作用	4
2.6.1.3 ED-71 の作用機序	5
2.6.1.4 活性型ビタミン D ₃ 製剤	5
2.6.1.5 申請した臨床適応症及び用法・用量	5
2.6.1.5.1 効能・効果	5
2.6.1.5.2 用法・用量	5
2.6.1.6 参考文献	5

2.6.1 緒言

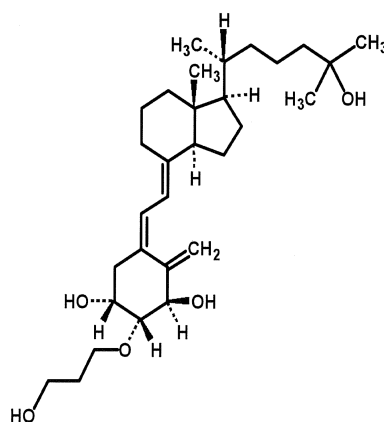
2.6.1.1 エルデカルシトールの薬理学的特性

活性型ビタミン D₃は、骨からのカルシウム (Ca) 動員、腸管での Ca 吸収及び腎での Ca 再吸収促進など、生体内の Ca 恒常性に重要な役割を担っているホルモンである¹⁾。骨において、活性型ビタミン D₃は骨吸収・骨形成などの骨代謝に作用し、骨密度・骨強度を増加させることが明らかとなっている¹⁾。現在、活性型ビタミン D₃製剤のアルファカルシドール (以下、ALF) 及びカルシトリオール (以下、CAL) が、骨粗鬆症薬として広く使用されている。

中外製薬株式会社では、種々の1 α ,25(OH)₂D₃誘導体を合成し、骨粗鬆症モデルである卵巣摘出 (OVX) ラットの骨量増加を指標にスクリーニングを実施し²⁾、これらの誘導体のうち、1 α ,25(OH)₂D₃の2 β 位にヒドロキシプロピルオキシ基を導入したエルデカルシトール (以下、ED-71, 図 2.6.1.1-1) を見出した。ED-71には、活性型ビタミン D₃としての薬理学的特性であるビタミン D 受容体 (VDR) 結合能、ビタミン D 応答配列 (VDRE : Vitamin D Responsive Element) を介した転写活性促進能、破骨細胞形成抑制活性、腸管での Ca 吸収促進作用、血清 Ca 濃度の増加作用、及び抗クル病作用があり、OVX ラットを用いた薬効試験では、ED-71の4週間反復経口投与で骨密度が増加し、その効力は ALF に比べて有意に優れていることが示された。

骨粗鬆症モデリング動物 (OVX ラット) 及び骨粗鬆症リモデリング動物 (OVX サル) を用いた長期間反復経口投与試験 (OVX ラット : 12カ月, OVX サル : 16カ月) では、ED-71の骨密度及び骨強度の改善効果が確認された。また、非臨床試験において、ED-71が示した主な毒性は血清 Ca 濃度の増加及びこれに付随した変化であり、本薬の活性型ビタミン D₃としての薬理作用と関連していた。

図 2.6.1.1-1 ED-71の化学構造



分子式 : C₃₀H₅₀O₅, 分子量 : 490.72

2.6.1.2 VDR の発現部位及び活性型ビタミン D₃の生理作用

VDR はステロイド・甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーに属する蛋白であり³⁾、Ca 代謝に重要な役割を担う骨、小腸、副甲状腺、腎臓などの組織に発現がみられる。VDR は下垂体、皮膚、胸腺、脳、骨髄などの組織や免疫担当細胞、腫瘍細胞にも発現しており、VDR は多様な生理機能に関与していることが明らかとなっている^{1),3)}。

活性型ビタミン D₃の主な生理作用は、生体内の Ca の恒常性を維持することである。薬理作用としては、小腸での Ca 吸収促進、副甲状腺での副甲状腺ホルモンの合成抑制、腎臓での Ca 再吸収促進などが知られており、骨に対しては、破骨細胞及び骨芽細胞に作用し骨代謝を改善することが報告されている⁴⁾ (図 2.4.2.1.12-1)。

2.6.1.3 ED-71の作用機序

ED-71は活性型ビタミン D₃としての薬理学的特性を示すことから、1 α ,25(OH)₂D₃と同様な作用機序を有することが推定される。すなわち、ED-71は1 α ,25(OH)₂D₃と同様に細胞内においてVDRに結合し核内へと移行する。核内において、VDRはRXR (Retinoid X receptor) や転写共役因子 (Co-activator) 等と相互作用して巨大複合体 (ED-71-VDR 複合体) を形成する。このED-71-VDR 複合体は VDRE と結合することにより、標的遺伝子の転写活性を促進することが推定される⁵⁾ (図 2.4.2.1.12-2)。

2.6.1.4 活性型ビタミン D₃製剤

本邦では、骨粗鬆症薬として、活性型ビタミン D₃製剤のALF及びCALが長年広く使用されている。CALは1 α ,25(OH)₂D₃を有効成分とする製剤で、ALF (1 α (OH)D₃)は肝臓で速やかに1 α ,25(OH)₂D₃に代謝された後に⁶⁾、その作用を発揮する製剤である。ALF及びCALは骨粗鬆症の他にも慢性腎不全、副甲状腺機能低下症及びクル病・骨軟化症におけるビタミン D 代謝異常に伴う諸症状の改善に対して適応が取得されている。

ED-71は非臨床試験⁷⁾及び臨床試験で、ALFを上回る骨粗鬆症治療効果を示すことが明らかとなっている (2.7.3.2.4)。

2.6.1.5 申請した臨床適応症及び用法・用量

2.6.1.5.1 効能・効果

骨粗鬆症。

2.6.1.5.2 用法・用量

通常、成人にはED-71として1日1回0.75 μ gを経口投与する。ただし、症状により適宜1日1回0.5 μ gに減量する。

2.6.1.6 参考文献

- 1) 尾形悦郎, 須田立雄, 小椋陽介編. ビタミン D のすべて. 講談社サイエンティフィック 1993 (第1刷) .
- 2) Tsuji N, Takahashi F. Therapeutic agents for disorders of bone and calcium metabolism. ED-71. Clin Calcium 2007;17:72-9.
- 3) Dusso AS, Brown AJ. Mechanism of vitamin D action and its regulation. Am J Kidney Dis 1998;32:S13-S24.
- 4) Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, Mathern DR, Barthel TK, Gurevich M, et al. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. J Bone Miner Res 2007;22 Suppl 2:v2-v10.
- 5) Christakos S. Vitamin D gene regulation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2002. p573-86.
- 6) Fukushima M, Suzuki Y, Tohira Y, Matsunga I, Ochi K, Nagao H. Metabolism of 1 α -hydroxyvitamin D₃ to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in perfused rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1975;66:632-8.
- 7) Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, et al. ED-71, a vitamin D analog, is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. Bone 2002;30:582-8.

エディロールカプセル0.5 µg
エディロールカプセル0.75 µg
(エルデカルシトール)
[骨粗鬆症]

第2部 (モジュール 2)
CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
Ac.f	Activation Frequency	骨単位活性化率
ALF	Alfacalcidol	アルファカルシドール
ALN	Alendronate sodium hydrate	アレンドロネート；アレンドロン酸ナトリウム水和物
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
AUC	Area under the curve	—
BAP	Bone-specific alkaline phosphatase	骨型アルカリホスファターゼ
BFR	Bone Formation Rate	骨形成速度
BS	Bone Surface	単位骨梁面
Ca.S	Callus Surface	仮骨細胞面
CHO 細胞	Chinese hamster ovary 細胞	チャイニーズハムスター卵巣細胞
CTX	Type I collagen cross-linked C-telopeptide	I型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
Cre	Creatinine	クレアチニン
DPD	Deoxyypyridinoline	デオキシピリジノリン
DXA	Dual energy X-ray absorptiometry	二重エネルギーエックス線吸収法
ED-138	—	ED-71 の 代 謝 物 （ 2 位 の 3-hydroxypropoxy の脱離体）
1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$	1,25-dihydroxycholecalciferol	活性型ビタミン D $_3$
24(OH)ED-71	—	ED-71の代謝物（24位の水酸化体）
EC $_{50}$	50% effective concentration	50%有効濃度
hERG	human ether-a-go-go-related gene	—
IC $_{50}$	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IP	Inorganic phosphate	無機リン
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
NTX	Type I collagen cross-linked N-telopeptide	I型コラーゲン架橋 N-テロペプチド
N.Oc	Osteoclast Number	破骨細胞数
rhVDR	recombinant human Vitamin D receptor	リコンビナントヒトビタミン D 受容体
VDR	Vitamin D receptor	ビタミン D 受容体
VDRE	Vitamin D Responsive Element	ビタミン D 応答配列
OC	Osteocalcin	オステオカルシン
Oc.S	Osteoclast Surface	破骨細胞面
OVX	Ovariectomy	卵巣摘出
PTH	Parathyroid hormone	副甲状腺ホルモン
pQCT	peripheral Quantitative Computed Tomography	定量的 CT 測定法
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B	—

目次

	頁
2.6.2 薬理試験の概要文	4
2.6.2.1 まとめ	4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	7
2.6.2.2.1 活性型ビタミン D ₃ 作用	7
2.6.2.2.1.1 ビタミン D 受容体 (VDR) に対する結合能	7
2.6.2.2.1.2 ビタミン D 応答配列 (VDRE) を介した転写活性促進能	7
2.6.2.2.1.3 破骨細胞形成抑制活性	8
2.6.2.2.1.4 腸管からの Ca 吸収促進作用	9
2.6.2.2.1.5 血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に及ぼす影響	10
2.6.2.2.1.6 抗クル病作用	11
2.6.2.2.2 骨量増加効果	12
2.6.2.2.2.1 予防系モデルに対する効果	12
2.6.2.2.2.2 治療系モデルに対する効果	14
2.6.2.2.3 ALF との効力比較	16
2.6.2.2.4 骨粗鬆症モデリング動物 (OVX ラット) の骨量減少に対する効果	18
2.6.2.2.5 骨粗鬆症リモデリング動物 (OVX サル) の骨量減少に対する効果	23
2.6.2.2.5.1 OVX サルを用いた薬効評価試験のための用量設定試験 (I)	23
2.6.2.2.5.2 OVX サルを用いた薬効評価試験のための用量設定試験 (II)	25
2.6.2.2.5.3 OVX サルに対する効果	27
2.6.2.2.6 骨折モデルラットの骨折治癒過程に及ぼす影響	34
2.6.2.2.6.1 骨の形状、力学的強度及び固有材料特性値に及ぼす影響	34
2.6.2.2.6.2 仮骨リモデリングに及ぼす影響	35
2.6.2.3 副次的薬理試験	36
2.6.2.4 安全性薬理試験	36
2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響	36
2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響	37
2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響	38
2.6.2.4.4 腎/泌尿器系に及ぼす影響	38
2.6.2.4.5 胃腸管系に及ぼす影響	39
2.6.2.4.6 平滑筋に及ぼす影響	39
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	39
2.6.2.6 考察及び結論	39
2.6.2.7 図表	41
2.6.2.8 参考文献	41

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

エルデカルシトール（以下、ED-71）は、活性型ビタミン D₃の骨量増加効果に着目して開発された新規1 α ,25(OH)₂D₃誘導体である。

一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験から、ED-71が活性型ビタミン D₃としての薬理学的特性であるビタミン D 受容体（VDR）結合能、ビタミン D 応答配列（VDRE : Vitamin D Responsive Element）を介した転写活性促進能、破骨細胞形成抑制活性、腸管からのカルシウム（Ca）吸収促進作用、血清 Ca 濃度増加作用を有することを明らかにした。また、クル病モデルラットに対し、ED-71は抗クル病作用を示した。骨粗鬆症モデルラットでは、ED-71は予防系及び治療系の両モデルに効果を示した。更に、骨粗鬆症モデリング動物（OVX ラット）及びリモデリング動物（OVX サル）において骨密度・骨強度の改善効果が認められた。

安全性薬理試験からは、ED-71にカリウムチャネル阻害作用が確認されたが、その阻害活性を示す濃度は高く（IC₂₀ : 2.84 μ mol/L），臨床において本薬が心臓の刺激伝達系に重篤な副作用を発現させる可能性は低いと考えられた。その他の中枢系、心血管系、呼吸系、腎/泌尿器系及び胃腸管系に対する影響は認められなかった。

効力を裏付ける試験

(1) VDR に対する結合能

リコンビナントヒトビタミン D 受容体（rhVDR）と活性型ビタミン D₃の³H 標識体との結合に対する ED-71及び1 α ,25(OH)₂D₃の結合阻害活性（IC₅₀）を検討した。ED-71及び1 α ,25(OH)₂D₃の IC₅₀値はそれぞれ9.8及び3.9 nmol/L であった。

(2) VDRE を介した転写活性促進能

ヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63及びヒト腸管様細胞株 Caco-2における VDRE 含有プロモーターを用いたレポータージーンアッセイにて、ED-71及び1 α ,25(OH)₂D₃の VDRE を介した転写活性促進能（EC₅₀）を検討した。MG-63細胞における ED-71及び1 α ,25(OH)₂D₃の EC₅₀値はそれぞれ8.2及び77 nmol/L，Caco-2細胞での EC₅₀値はそれぞれ1.2及び0.2 nmol/L であった。

(3) 破骨細胞形成抑制活性

ヒト破骨前駆細胞を用いて、ED-71（0.1, 1, 10, 100 nmol/L）の破骨細胞形成抑制活性を検討した。ED-71は濃度依存的に破骨細胞の形成を抑制し、10及び100 nmol/L では有意な抑制作用を示した。

(4) 腸管からの Ca 吸収促進作用

ED-71（0.1, 0.3, 1 μ g/kg）及び1 α ,25(OH)₂D₃（1 μ g/kg）をラットに単回経口投与し、投与6時間後に摘出した腸管での Ca 吸収促進作用を *in vitro* で検討した。ED-71の投与量の増加に伴って Ca 吸収は促進され、1 μ g/kg では1 α ,25(OH)₂D₃と同様に有意な Ca 吸収促進が認められた。

(5) 血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に及ぼす影響

ED-71（0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 μ g/kg/日）をラットに12週間反復経口投与し、本薬の血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に及ぼす影響を検討した。最高用量の0.1 μ g/kg では、投与2週後に血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量が vehicle 対照群に比べて有意に増加した。0.05及び0.025 μ g/kg では、投与12週後に血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量が有意に増加した。0.01 μ g/kg でも、投与12週後に尿中 Ca 排泄量の有意な増加がみられたが、血清 Ca 濃度に有意な差は認められなかった。0.005 μ g/kg では、投与2週後、12週後いずれにおいても血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に有意な差は認められなかった。

投与12週後の血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清 ED-71濃度との間には正の相関が認められた。

(6) 抗クル病作用

クル病モデルラットに ED-71 (0.1, 0.2, 0.4 µg/kg/日) 及び $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (5, 10, 20 µg/kg/日) を2週間反復経口投与し、最終投与翌日に下腿骨の骨端軟骨幅指数及び大腿骨遠位部の骨密度を測定した。ED-71は最高用量の0.4 µg/kg で骨端軟骨幅指数を有意に低下させ、且つ、すべての用量で骨密度を有意に増加させた。一方、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨密度を増加させなかったものの、骨端軟骨幅指数を減少させる傾向を示した。

(7) 骨量増加効果

ED-71の骨粗鬆症モデルにおける骨量増加効果を、卵巣摘出 (OVX) 直後から投与を開始する予防系ラットモデル及び OVX により既に骨量が減少した時点 (OVX から15週後) から投与を開始する治療系ラットモデルを用いて検討した。ED-71 (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg/日) の週5回、6カ月間経口投与は、腰椎 (L₂₋₅) 及び大腿骨の両骨密度を、予防系モデルでは0.01 µg/kg 以上、治療系モデルでは0.02 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意に増加させた。骨強度においても、腰椎 (L₅) 及び大腿骨の両骨強度は、予防系モデルでは0.02 µg/kg 以上、治療系モデルでは0.04 µg/kg で OVX 対照群に比べて有意に増加した。また、ED-71投与群について、腰椎 (L₅) 及び大腿骨骨密度と骨強度との関係を検討したところ、正の相関が認められた。

(8) ALF との効力比較

ED-71 (0.03 µg/kg/日) と ALF (0.075 µg/kg/日) の骨粗鬆症モデルにおける効力比較を OVX ラットへの4週間反復経口投与により行った。ED-71及び ALF はともに OVX による腰椎 (L₂₋₅) 及び大腿骨の骨密度減少を有意に抑制したが、腰椎骨密度に対する効果は ALF に比べて ED-71が有意に強かった。骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン (DPD) も ED-71 及び ALF によって有意に低下したが、その作用も ALF に比べて ED-71が有意に強かった。

(9) 骨粗鬆症モデリング動物 (OVX ラット) に対する効果

OVX ラットに ED-71 (0.0075, 0.015, 0.03 µg/kg/日) を12カ月間反復経口投与し、本薬の薬理効果を評価した。ED-71はすべての用量で、投与12カ月後の腰椎 (L₂₋₅) 骨密度を OVX 対照群と比べて有意に増加させるとともに、大腿骨骨密度も0.015, 0.03 µg/kg で有意に増加させた。腰椎 (L₄) の圧迫試験において、ED-71の0.015及び0.03 µg/kg 投与は OVX によって減少した剛性を有意に増加させた。0.03 µg/kg では剛性に加えて最大負荷及び吸収エネルギーの有意な増加も認められた。大腿骨の3点曲げ強度試験において、ED-71の0.015及び0.03 µg/kg 投与は剛性及び最大負荷を有意に増加させた。OVX 対照群及び ED-71投与群、両群のデータを併せて、腰椎 (L₄) 及び大腿骨骨密度と骨強度との関係を検討したところ、正の相関が認められた。

骨代謝マーカーにおいて、ED-71投与による骨形成マーカー (血清アルカリホスファターゼ, ALP) に対する有意な差は認められなかったが、ED-71はすべての用量で投与12カ月後の尿中 DPD 排泄量を有意に低下させた。このことから、ED-71は OVX により亢進した骨吸収を抑制することが示唆された。骨吸収パラメータ [破骨細胞面 (Oc.S/BS), 破骨細胞数 (N.Oc/BS)] 及び骨形成パラメータ [骨形成速度 (BFR/BS)] を指標とした骨組織を検討した結果から、ED-71は Oc.S/BS 及び N.Oc/BS を用量依存的に抑制し、0.03 µg/kg では有意な低下が認められた。骨形成速度では、0.015及び0.03 µg/kg で有意な低下が認められた。しかし、骨代謝回転のパラメータである骨単位活性化率 (Ac.f) は、0.015及び0.03 µg/kg では抑制されたものの、Sham 対照群以下には低下せず、骨組織像においても ED-71投与による異常は認められなかった。これらのことから、ED-71は OVX によって亢進した骨代謝回転を抑制するこ

とが示された。

(10) 骨粗鬆症リモデリング動物 (OVX サル) に対する効果

OVX サルに ED-71 (0.0175, 0.035, 0.07 µg/kg/日) を16カ月間反復経口投与し、本薬の薬理効果を評価した。骨密度の経時的な検討 (投与3, 6, 11, 16カ月後) において、ED-71はOVXによる骨密度減少を有意に抑制した。投与6カ月後では、最高用量の0.07 µg/kgでOVXにより減少した腰椎 (L₁₋₄) 及び大腿骨 (近位部) 骨密度の有意な抑制がみられた。投与11カ月後でも、0.07 µg/kgで大腿骨骨密度減少の有意な抑制が認められた。投与16カ月後では有意な抑制はみられなかったが、0.07 µg/kg投与群の腰椎及び大腿骨骨密度はともにOVX対照群を下回らなかった。投与16カ月の腰椎 (L₃₋₄) での圧迫試験及び大腿骨での3点曲げ強度試験において、ED-71投与群の最大負荷はいずれの用量でもOVX対照群とほぼ同じであり、骨強度の増加効果はみられなかった。しかし、その際に骨強度を低下させるなどの悪影響はみられず、骨組織像にも異常は認められなかった。また、OVX対照群、ED-71投与群、両群のデータを併せて、腰椎 (L₃₋₄) 及び大腿骨骨密度と骨強度との関係を検討したところ、正の相関が認められた。

骨吸収マーカー [血清 I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (CTX), 尿中 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTX)] 及び骨形成マーカー [血清オステオカルシン (OC), 血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP)] の検討結果から、ED-71はOVXによって亢進した骨代謝回転を抑制することが示唆された。最高用量の0.07 µg/kgでは、投与3カ月後の血清CTX、及び投与6カ月後の血清BAPに有意な低下が認められた。骨組織の検討では、骨代謝回転のパラメータである骨単位活性化率はいずれの用量でもSham対照群以下には低下しなかった。

(11) 骨折モデルラットの骨折治癒過程に及ぼす影響

骨折モデルラットを用いて、ED-71の骨折治癒過程に及ぼす影響を検討した。ED-71 (0.015, 0.05 µg/kg/日) の骨折手術前4週間、骨折手術後16週間の反復経口投与は、骨折部位の形状、力学的強度及び固有材料特性値に影響を与えなかった。

骨折モデルラットの仮骨リモデリングに対するED-71 (0.025, 0.05 µg/kg/日、経口投与) の影響を層板骨形成 (Lamella/Callus Area (%)) 及び仮骨面での骨形成速度 (BFR/Ca.S (mm³/mm²/year)) を指標に検討し、アレンドロネート (ALN) と比較した (参考資料)。ED-71は、骨折6週後において層板骨形成を抑制したが、骨折16週後においては0.05 µg/kg群であっても抑制作用をほとんど示さなかった (対照群99.2%に対し97.8%)。一方、ALNは、10 µg/kg投与群で58.4%となり、ED-71よりも有意に強い抑制作用を示した。また、骨形成速度は、骨折16週後においてED-71 0.05 µg/kg投与群では0.142 mm³/mm²/yearとなり対照群よりも低値を示したが、ALN (10 µg/kg群: 0.04 mm³/mm²/year) に比べて抑制作用は弱かった。

副次的薬理試験

該当無し。

安全性薬理試験 (GLP 試験として実施した「hERG チャンネルに及ぼす影響」試験を除き、一般薬理試験として実施)

中枢神経系において、ED-71の1 µg/kg までの単回経口投与では、マウスの一般症状、自発運動、正常体温、ヘキソバルビタール睡眠、電撃刺激痙攣、及びラットの疼痛閾値に対して影響を及ぼさなかった。心血管系では、ED-71の1 µg/kg までの単回静脈内投与は、麻酔イヌの血圧、心拍数、左心室内圧、左心室内圧最大上昇速度、血流量、総末梢血管抵抗、及び心電図等に対し影響を及ぼさなかった。hERG 強制発現 CHO 細胞では、ED-71は K⁺電流を阻害し、そのIC₂₀値は2.84 µmol/Lであった。呼吸系では、ED-71の1 µg/kg までの単回静脈内投与では、麻酔イヌの呼吸数に影響を及ぼさなかった。腎/泌尿器系では、ED-71の1 µg/kg までの単回経口投

与は、ラットの尿量、尿 pH、尿浸透圧、尿中電解質排泄量に対し影響を及ぼさなかった。胃腸管系についても、ED-71の1 µg/kg までの単回経口投与は、小腸輸送能に影響を及ぼさなかった。モルモット摘出回腸では、 1×10^{-8} g/mL までの濃度の ED-71は、摘出回腸標本の自発収縮、及び回腸縦走筋標本の acetylcholine, histamine 並びに BaCl₂による刺激収縮に対し影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の中で、「2.6.2.2.4 骨粗鬆症モデリング動物（OVX ラット）の骨量減少に対する効果」, 「2.6.2.2.5 骨粗鬆症リモデリング動物（OVX サル）の骨量減少に対する効果」及び「2.6.2.2.6.1 骨の形状、力学的強度及び固有材料特性値に及ぼす影響」は、「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて（医薬審発第742号，平成11年4月15日）」¹⁾に従い実施した。

2.6.2.2.1 活性型ビタミン D₃作用

2.6.2.2.1.1 ビタミン D 受容体（VDR）に対する結合能

（資料番号4.2.1.1-1）

Wecksler ら²⁾の方法を用いて、rhVDR に対する1α,25(OH)₂D₃, ED-71及び3種類の ED-71代謝物（ED-138, 24S(OH)ED-71, 24R(OH)ED-71）の結合能を算出した。各化合物の結合能は、VDR と1α,25-Dihydroxy[26,27-methyl-³H]cholecalciferol の結合を50%阻害する濃度（IC₅₀）を指標に評価した。

1α,25(OH)₂D₃, ED-71及び ED-138の rhVDR に対する結合阻害活性は高く、IC₅₀値はそれぞれ3.9, 9.8及び6.3 nmol/L であった。24S(OH)ED-71及び24R(OH)ED-71の阻害活性は低く、IC₅₀値はそれぞれ3600及び230 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-1）。

表 2.6.2.2.1.1-1 1α, 25(OH)₂D₃, ED-71, ED-138, 24S(OH)ED-71, 24R(OH)ED-71の rhVDR に対する結合能（IC₅₀）

Compounds	1α,25(OH) ₂ D ₃	ED-71	ED-138	24S(OH)ED-71	24R(OH)ED-71
IC ₅₀ (nmol/L)	3.9	9.8	6.3	3600	230

各値は平均値 (n = 3) を示す。

(4.2.1.1-1, Table 1を改変)

2.6.2.2.1.2 ビタミン D 応答配列（VDRE）を介した転写活性促進能

（資料番号4.2.1.1-2）

ヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63及びヒト腸管様細胞株 Caco-2における VDRE 含有プロモーターを用いたレポータージェンアッセイにて、1α,25(OH)₂D₃, ED-71及び3種類の ED-71代謝物（ED-138, 24S(OH)ED-71, 24R(OH)ED-71）の VDRE を介した転写活性促進能（EC₅₀）を検討した。

MG-63細胞での1α,25(OH)₂D₃, ED-71, ED-138, 24S(OH)ED-71及び24R(OH)ED-71の EC₅₀値はそれぞれ77, 8.2, 64, 36及び130 nmol/L であり、Caco-2細胞での EC₅₀値はそれぞれ0.2, 1.2, 1.5, 13及び5.1 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.2-1）。

表 2.6.2.2.1.2-1 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ED-71, ED-138, 24S(OH)ED-71, 24R(OH)ED-71の
MG-63及びCaco-2細胞における転写活性促進能 (EC_{50})

a) MG-63細胞

Compounds	$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	ED-71	ED-138	24S(OH)ED-71	24R(OH)ED-71
EC_{50} (nmol/L)	77	8.2	64	36	130

各値は平均値 (n = 6) を示す。

(4.2.1.1-2, Table 1を改変)

b) Caco-2細胞

Compounds	$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	ED-71	ED-138	24S(OH)ED-71	24R(OH)ED-71
EC_{50} (nmol/L)	0.2	1.2	1.5	13	5.1

各値は平均値 (n = 6) を示す。

(4.2.1.1-2, Table 4を改変)

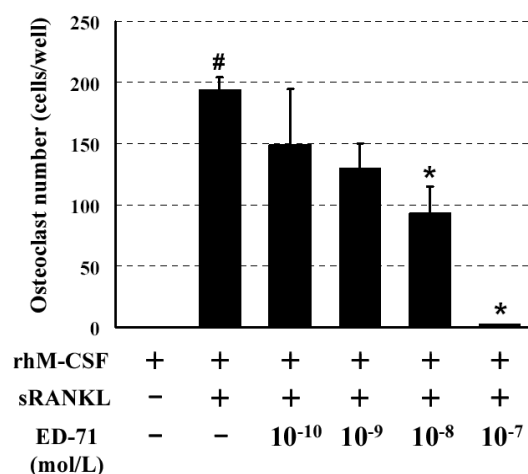
2.6.2.2.1.3 破骨細胞形成抑制活性

(資料番号4.2.1.1-3)

ヒト破骨前駆細胞にリコンビナントヒトマクロファージコロニー刺激因子 (rhM-CSF, 33 ng/mL) 及び可溶型 RANK リガンド (sRANKL, 100 ng/mL) を添加し破骨細胞を形成させる系を用いて, ED-71 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L) の破骨細胞形成抑制活性を評価した。

rhM-CSF のみで刺激した群では破骨細胞が全く形成されなかった。一方, rhM-CSF に sRANKL を加えて刺激した群では, 破骨細胞の形成が認められた。ED-71は rhM-CSF と sRANKL 刺激による破骨細胞形成を濃度依存的に抑制し, 1×10^{-8} 及び 1×10^{-7} mol/L では有意な抑制作用が認められた (図 2.6.2.2.1.3-1)。

図 2.6.2.2.1.3-1 ヒト破骨細胞形成に対する ED-71 の抑制作用



各カラムは mean + SE (n = 6)。[#] P < 0.05 vs rhM-CSF 処理群 (unpaired t-test) ,

^{*} P < 0.05 vs rhM-CSF + sRANKL 処理群 (Dunnett's multiple range test)。

(4.2.1.1-3, Fig. 1を改変)

2.6.2.2.1.4 腸管からの Ca 吸収促進作用

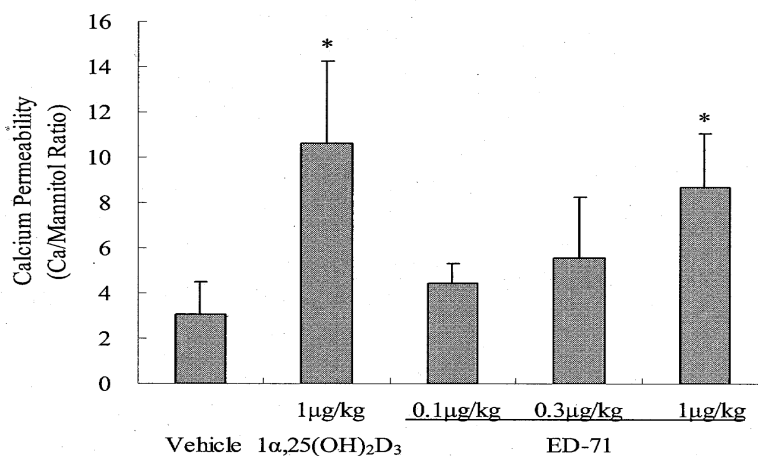
(資料番号4.2.1.1-4)

ラット腸管を用いた Ussing chamber 法³⁾により, ED-71 の Ca 吸収促進作用を検討した。

ED-71 (0.1, 0.3, 1 μg/kg) 及び 1α,25(OH)₂D₃ (1 μg/kg) を雄 SD ラット (7週齢) に単回経口投与し, 投与6時間後に空腸を採取しチャンバーにセットした。⁴⁵Ca 及び Mannitol, D-[1-³H(N)] の経時的な透過量を液体シンチレーションカウンターにて測定し, 細胞膜を介した Ca 透過率を細胞間隙マーカーである Mannitol との比により算出した。

ED-71 の投与量の増加に伴って Ca 透過は促進され, 最高用量の 1 μg/kg では有意な Ca 透過促進作用が認められた (図 2.6.2.2.1.4-1)。1α,25(OH)₂D₃ の 1 μg/kg においても, 有意な Ca 透過促進作用が認められた。

図 2.6.2.2.1.4-1 ラット腸管における Ca 吸収促進作用



各カラムは mean + SD (n = 4)。^{*} P < 0.05 vs Vehicle 群 (Dunnett's multiple range test)。

(4.2.1.1-4, Fig. 1を改変)

2.6.2.2.1.5 血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に及ぼす影響

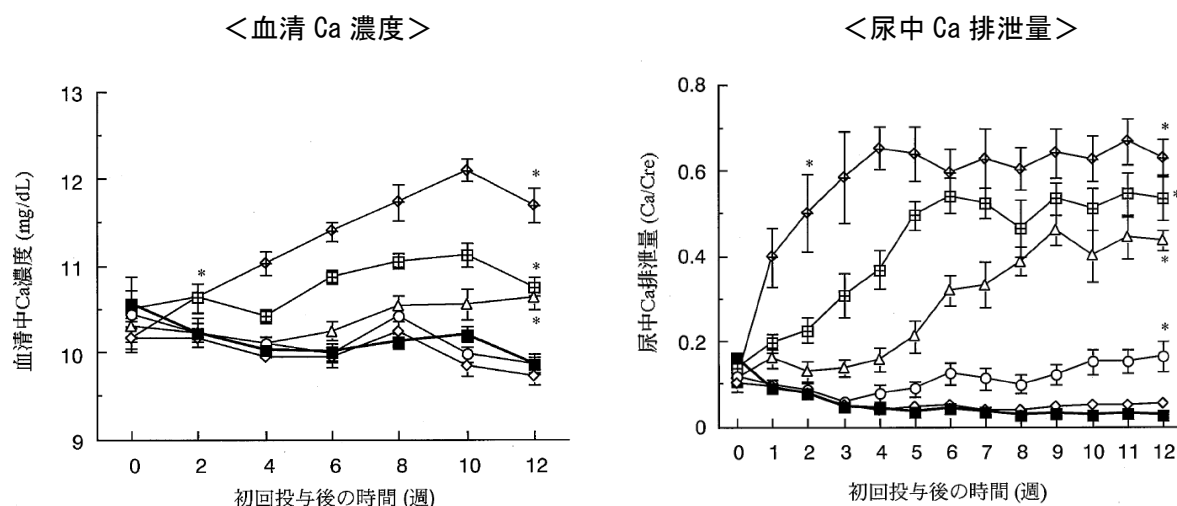
(資料番号4.2.1.1-5)

ED-71 (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/kg/日}$) を1日1回, 雄 SD ラット (6週齢) に12週間反復経口投与し, 本薬が血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に及ぼす影響を検討した。血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清 ED-71濃度の相関について, 投与12週後に採取したサンプルを用いて解析した。

1) 血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量の経時変化

最高用量の0.1 $\mu\text{g/kg}$ では, 投与2週後に血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量が vehicle 群に比べて有意に増加した (図 2.6.2.2.1.5-1)。0.05及び0.025 $\mu\text{g/kg}$ では, 投与12週後に血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量が有意に増加した。0.01 $\mu\text{g/kg}$ においても, 投与12週後に尿中 Ca 排泄量に有意な増加がみられたが, 血清 Ca 濃度に有意な差は認められなかった。0.005 $\mu\text{g/kg}$ では, 投与2週後, 12週後いずれにおいても血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に有意な差は認められなかった。

図 2.6.2.2.1.5-1 ED-71反復投与による血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量の経時変化



■ : Vehicle (n = 8), ◇ : 0.005 $\mu\text{g/kg}$ (n = 8), ○ : 0.01 $\mu\text{g/kg}$ (n = 7~8), △ : 0.025 $\mu\text{g/kg}$ (n = 7~8), □ : 0.05 $\mu\text{g/kg}$ (n = 7~8), ◆ : 0.1 $\mu\text{g/kg}$ (n = 8), 各データは mean $\pm$ SE。

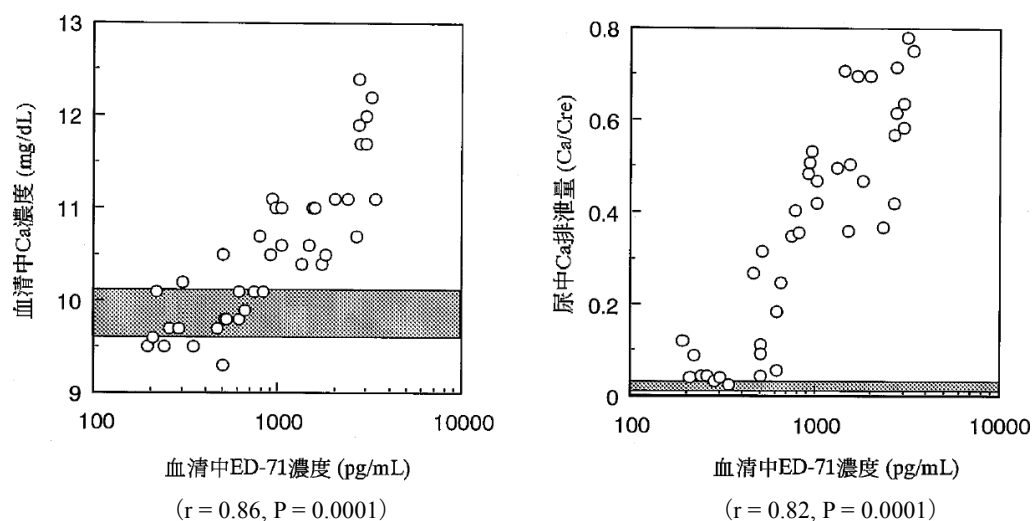
* P < 0.05 (投与2週後あるいは12週後における vehicle 群と各 ED-71投与群間での投与前値 (0週目) を共変量とした共分散分析。Dunnett-Hsu の方法により多重性を調整)

(4.2.1.1-5, 図1 (左), 図4 (右) を改変)

2) 血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清中 ED-71濃度の相関

血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清中 ED-71濃度の相関について, 投与12週後に採取したサンプルを用いて解析した。その結果, 血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清中 ED-71濃度との間には正の相関が認められた (図 2.6.2.2.1.5-2)。

図 2.6.2.2.1.5-2 投与12週後の血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清中 ED-71濃度の相関
 <血清 Ca 濃度> <尿中 Ca 排泄量>



血清 Ca 濃度, 尿中 Ca 排泄量いずれも $n = 40$,

網掛けの範囲は vehicle 群の血清 Ca 濃度 (図左) あるいは尿中 Ca 排泄量 (図右) の mean $\pm$ SD。

(4.2.1.1-5, 図 7 を改変)

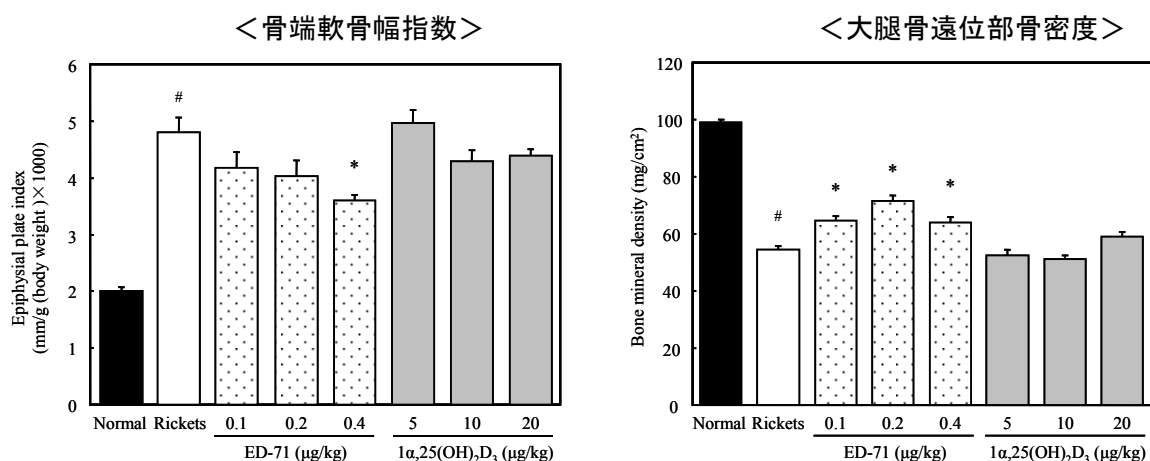
2.6.2.2.1.6 抗クル病作用

(資料番号4.2.1.1-6)

雄幼若 SD ラット (3週齢) にビタミン D を含まない催クル病飼料 () を与え, 紫外線の当たらない飼育室で2週間飼育することにより, クル病モデルラットを作製した。本ラットに催クル病食を給餌しながら, ED-71 (0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{g/kg/日}$) 及び $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (5, 10, 20 $\mu\text{g/kg/日}$) を1日1回, 2週間反復経口投与し, 最終投与翌日に下腿骨の骨端軟骨幅指数及び大腿骨遠位部骨密度を測定し両薬の抗クル病作用を検討した。

ED-71は骨端軟骨幅指数を低下させ, 最高用量の0.4 $\mu\text{g/kg}$ では Rickets-control (クル病対照) 群に比べて有意な低下が認められた。また, ED-71はすべての用量で大腿骨遠位部骨密度を有意に増加させた。これらの結果から, ED-71は抗クル病作用を有することが示された。一方, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は大腿骨遠位部骨密度を増加させなかったが, 骨端軟骨幅指数を低下させる傾向を示した (図 2.6.2.2.1.6-1)。

図 2.6.2.2.1.6-1 骨端軟骨幅指数及び大腿骨遠位部骨密度に対する ED-71 及び $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果（クル病ラットモデル）



Normal : 正常対照群, Rickets : クル病対照群。各カラムは mean + SE (n = 10)。

[#] P < 0.05 vs 正常対照群 (unpaired t-test) , ^{*} P < 0.05 vs クル病対照群 (Dunnett's multiple range test) 。

(4.2.1.1-6, Fig. 1 (左) , Fig. 2 (右) を改変)

2.6.2.2.2 骨量増加効果

ED-71の骨粗鬆症モデル（OVX ラット）における骨量増加効果を、卵巣摘出（OVX）の翌日から投与を開始する予防系モデル（2.6.2.2.2.1）及び OVX により既に骨量が減少した時点（OVX から15週後）から投与を開始する治療系モデル（2.6.2.2.2.2）を用いて検討した。対照群として、偽手術を施した Sham 対照群及び OVX 後に vehicle を投与した OVX 対照群を設定した。

2.6.2.2.2.1 予防系モデルに対する効果

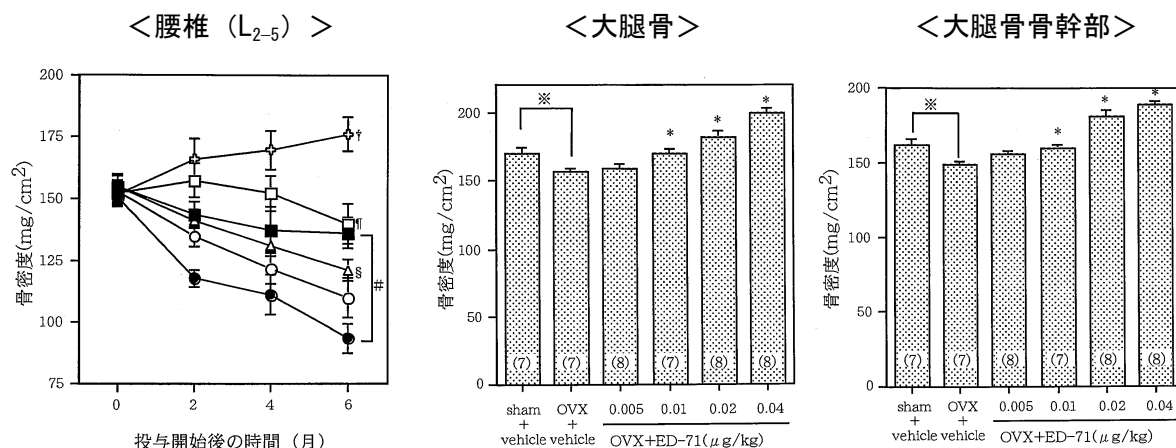
(資料番号4.2.1.1-9)

雌 Wistar-Imamichi ラット（41週齢）の両卵巣を摘出し、OVX 翌日から ED-71（0.005, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg/日）を週5回、6カ月間経口投与した。腰椎骨密度はほぼ2カ月ごとに測定し、大腿骨骨密度は投与6カ月後に測定した。骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA の測定値から評価した。投与6カ月後には腰椎及び大腿骨を摘出し、骨強度の測定を行った。骨強度は、腰椎では圧迫試験、大腿骨では3点曲げ強度試験にて最大荷重を算出することにより評価した。血清 Ca 濃度は2カ月ごとに測定した。

1) 骨密度（腰椎、大腿骨）に対する効果

ED-71は用量依存的に腰椎 L₂₋₅（第2腰椎 L₂から第5腰椎 L₅までの平均値）及び大腿骨の骨密度を増加させ、両部位共に0.01 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた。大腿骨骨幹部においても、0.01 µg/kg 以上で有意な増加が認められた（図 2.6.2.2.2.1-1）。

図 2.6.2.2.1-1 腰椎、大腿骨及び大腿骨骨幹部の骨密度に対する ED-71 の効果
(予防系ラットモデル)



各データは mean ± SE (n = 7~8), ■ : Sham (偽手術) 対照群, ● : OVX 対照群, ○ : ED-71 0.005 µg/kg, △ : ED-71 0.01 µg/kg, □ : ED-71 0.02 µg/kg, ◇ : ED-71 0.04 µg/kg, カッコ内は例数,

§, †, * P < 0.05 vs OVX 対照群 (Dunnett-Hsu test),

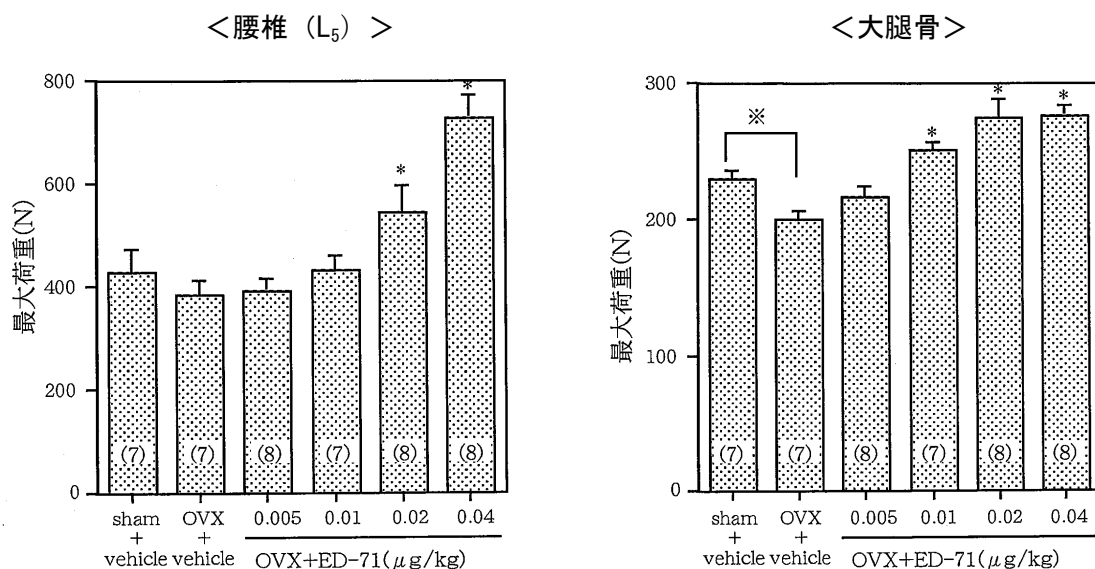
#, ※ P < 0.05 (投与6カ月後における Sham 対照群と OVX 対照群の間の Student の t 検定)。

(4.2.1.1-9, 図 1A (左), 図 2A (中), 図 3A (右) を改変)

2) 骨強度 (腰椎, 大腿骨) に対する効果

ED-71は腰椎 (L₅) 及び大腿骨の骨強度 (最大荷重) を増加させ, 腰椎では0.02 µg/kg 以上, 大腿骨では0.01 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた (図 2.6.2.2.1-2)。

図 2.6.2.2.1-2 腰椎及び大腿骨の骨強度に対する ED-71 の効果
(予防系ラットモデル)



各データは mean + SE (n = 7~8), カッコ内は例数, * P < 0.05 vs OVX 対照群 (Dunnett 多重比較),

※ P < 0.05 (投与6カ月後における Sham 対照群と OVX 対照群の間の Student の t 検定)。

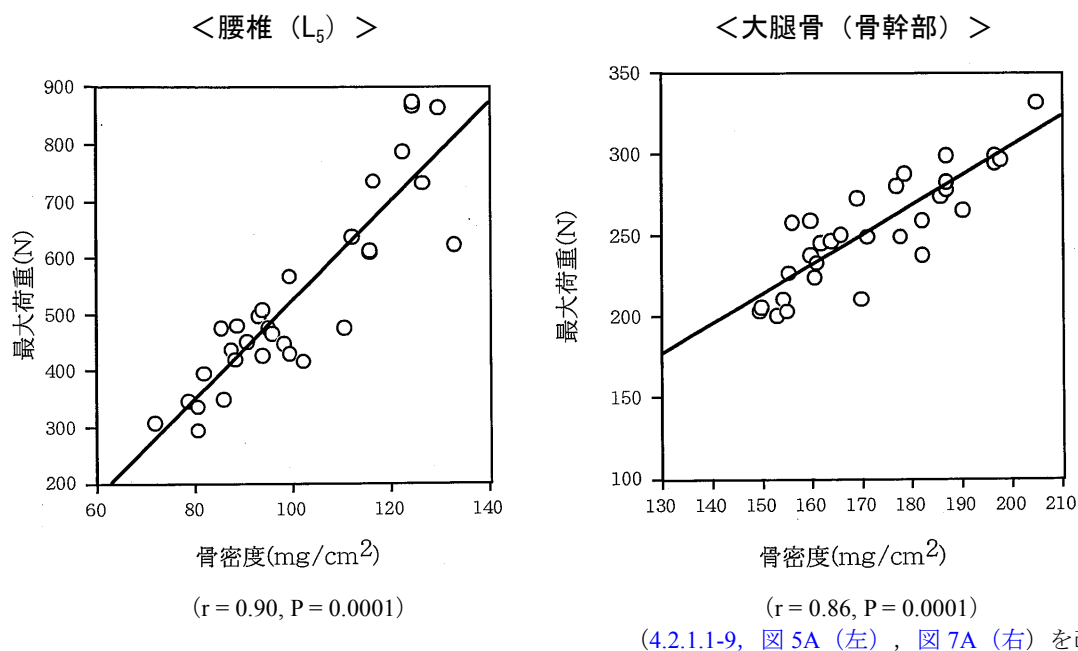
(4.2.1.1-9, 図 4A (左), 図 6A (右) を改変)

3) 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

ED-71投与群の腰椎 (L₅) 骨密度と骨強度の相関を検討した結果, 骨密度と骨強度との間には正の相関が認められた。大腿骨 (骨幹部) 骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた

([図 2.6.2.2.1-3](#))。

図 2.6.2.2.1-3 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関
(予防系ラットモデル)



4) 血清 Ca 濃度に対する影響

ラット予防系モデルにおいて、血清 Ca 濃度を2カ月ごとに測定した。Sham 対照群と比較して、ED-71のいずれの投与群においても血清 Ca の有意な増加は認められなかった。

2.6.2.2.2.2 治療系モデルに対する効果

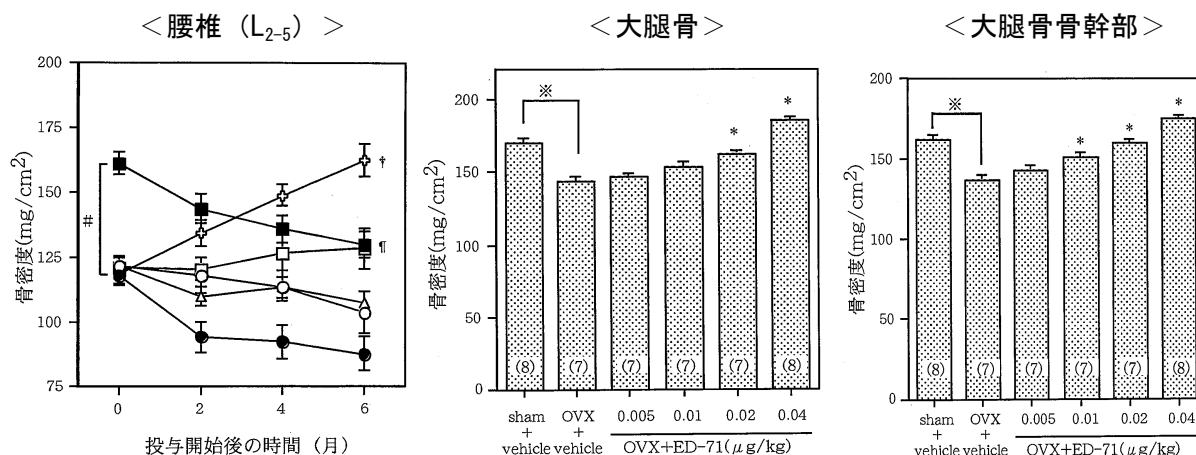
(資料番号4.2.1.1-9)

雌 Wistar-Imamichi ラット (33週齢) の両卵巣を摘出し、OVX 15週後から ED-71 (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 $\mu\text{g/kg/日}$) を週5回、6カ月間経口投与した。腰椎骨密度はほぼ2カ月ごとに測定し、大腿骨骨密度は投与6カ月後に測定した。骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA の測定値から評価した。投与6カ月後には腰椎及び大腿骨を摘出し、骨強度の測定を行った。骨強度は、腰椎では圧迫試験、大腿骨では3点曲げ強度試験にて最大荷重を算出することにより評価した。血清 Ca 濃度は2カ月ごとに測定した。

1) 骨密度 (腰椎, 大腿骨) に対する効果

ED-71は腰椎 (L₂₋₅) 及び大腿骨の骨密度を増加させ、両部位に0.02 $\mu\text{g/kg}$ 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた。大腿骨骨幹部においても、0.01 $\mu\text{g/kg}$ 以上で有意な増加が認められた ([図 2.6.2.2.2-1](#))。

図 2.6.2.2.2-1 腰椎、大腿骨及び大腿骨骨幹部の骨密度に対する ED-71 の効果
(治療系ラットモデル)



各データは mean + SE (n = 7~8), ■ : Sham (偽手術) 対照群, ● : OVX 対照群, ○ : ED-71 0.005 $\mu\text{g/kg}$, △ : ED-71 0.01 $\mu\text{g/kg}$, □ : ED-71 0.02 $\mu\text{g/kg}$, ◇ : ED-71 0.04 $\mu\text{g/kg}$, カッコ内は例数,

†, * P < 0.05 vs OVX 対照群 (Dunnett-Hsu test),

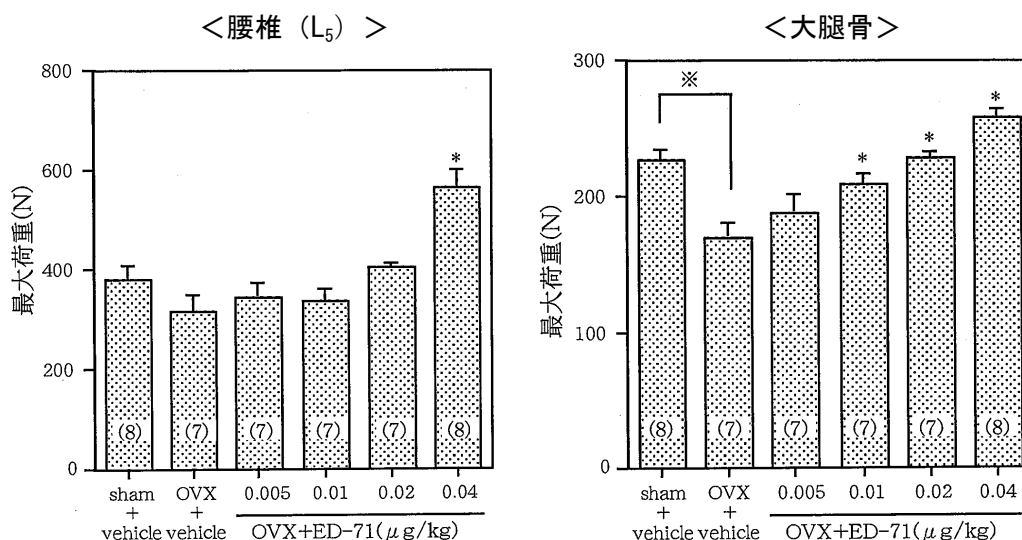
#, * P < 0.05 (投与6カ月後における Sham 対照群と OVX 対照群の間の Student の t 検定)。

(4.2.1.1-9, 図 1B (左), 図 2B (中), 図 3B (右) を改変)

2) 骨強度 (腰椎, 大腿骨) に対する効果

ED-71は腰椎 (L₅) 及び大腿骨の骨強度 (最大荷重) を増加させ, 腰椎では0.04 $\mu\text{g/kg}$, 大腿骨では0.01 $\mu\text{g/kg}$ 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた (図 2.6.2.2.2-2)。

図 2.6.2.2.2-2 腰椎及び大腿骨の骨強度に対する効果
(治療系ラットモデル)



各データは mean + SE (n = 7~8), カッコ内は例数, * P < 0.05 vs OVX 対照群 (Dunnett 多重比較),

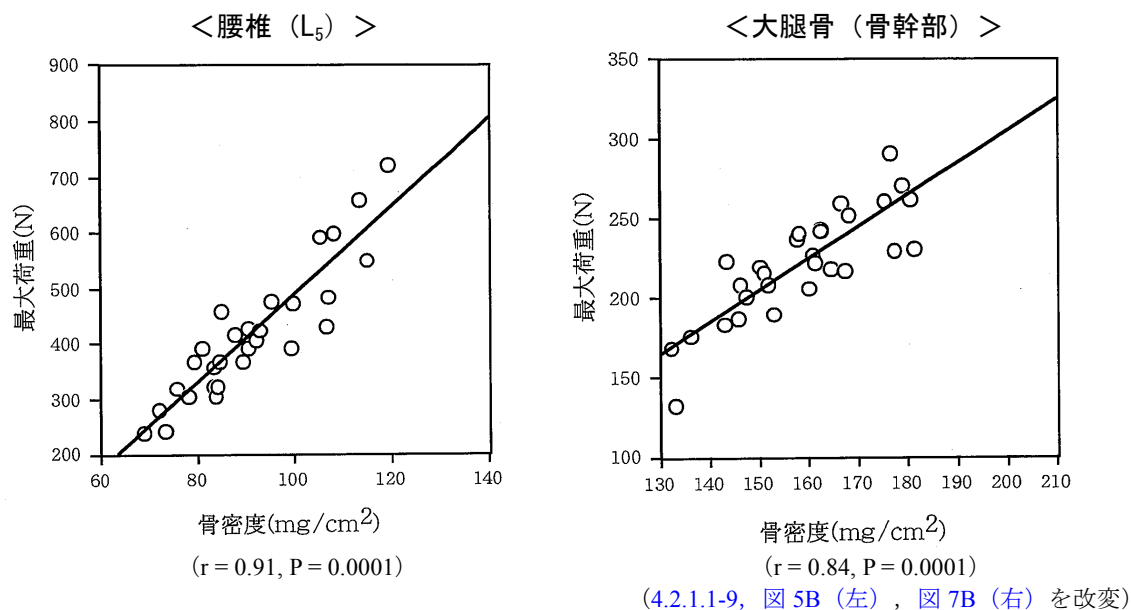
* P < 0.05 (投与6カ月後における Sham 対照群と OVX 対照群の間の Student の t 検定)。

(4.2.1.1-9, 図 4B (左), 図 6B (右) を改変)

3) 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

ED-71投与群の腰椎 (L₅) 骨密度と骨強度の相関を検討した結果, 骨密度と骨強度との間には正の相関が認められた。大腿骨 (骨幹部) 骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた (図 2.6.2.2.2-3)。

図 2.6.2.2.2-3 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関
(治療系ラットモデル)



4) 血清 Ca 濃度に対する影響

ラット治療系モデルにおいて、血清 Ca 濃度を2カ月ごとに測定した。Sham 対照群と比較して、ED-71のいずれの投与群においても血清 Ca 濃度の有意な増加は認められなかった。

2.6.2.2.3 ALF との効力比較

(1) ALF との効力比較のための用量設定試験

(資料番号4.2.1.1-7)

ED-71は活性型ビタミン D₃誘導体であることから、高用量投与あるいは長期投与により高 Ca 血症を引き起こされる (2.6.2.2.1.5)。骨粗鬆症モデル (OVX ラット) を用いた ED-71と ALF の効力比較試験に先立ち、高 Ca 血症を引き起こさずに骨密度を増加させる用量を予備検討した。ED-71 (0.0075, 0.015, 0.03 µg/kg/日) 及び ALF (0.01875, 0.0375, 0.075 µg/kg/日) を1日1回、4週間反復経口投与し、投与後の血清 Ca 濃度及び大腿骨の骨密度を測定した。ED-71及び ALF 投与群の血清 Ca 濃度は、最高用量でも Sham 対照群と同程度であった。骨密度に対しては、ED-71は最高用量の0.03 µg/kg で大腿骨骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。一方、ALFは最高用量でも骨密度を有意に増加させなかった。

以上の結果から、両薬の効力を比較する試験において、検討した用量での最適用量は、ED-71 0.03 µg/kg/日、ALF 0.075 µg/kg/日と考えられた。

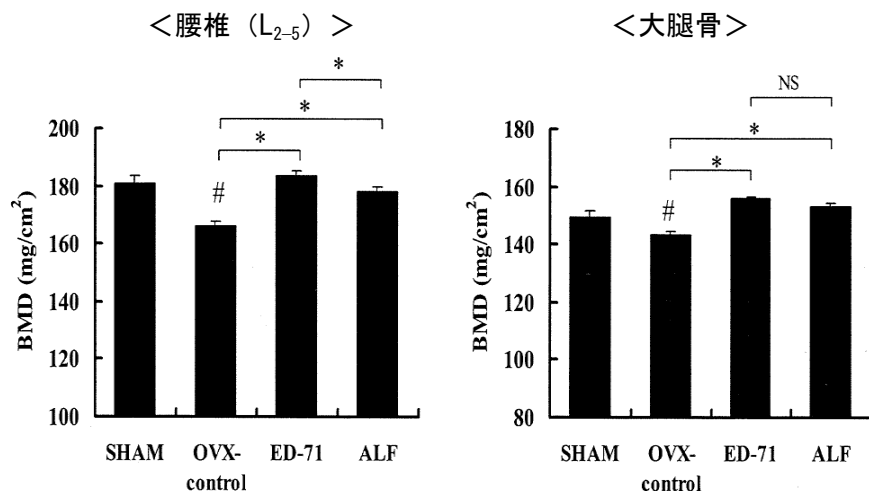
(2) ALF との効力比較試験

(資料番号4.2.1.1-8)

雌 Wistar-Imamichi ラット (33週齢) の両卵巣を摘出し、OVX 翌日から ED-71 (0.03 µg/kg/日) 及び ALF (0.075 µg/kg/日) の4週間反復経口投与を行った。ED-71及び ALF の用量は、事前に実施した用量設定試験の結果から、ED-71 0.03 µg/kg/日、ALF 0.075 µg/kg/日 (2.6.2.2.3(1)) を設定した。また、ED-71及び ALF 投与群の動物数は、一群22匹を使用した。最終投与後に腰椎及び大腿骨骨密度、骨吸収マーカー (尿中 DPD) 及び血清 Ca 濃度を測定し、両薬の効力比較を行った。骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA を用いて測定した。

ED-71及び ALF はともに OVX による腰椎 (L₂₋₅) 及び大腿骨の骨密度減少を有意に抑制したが、腰椎骨密度に対する効果は ED-71の方が ALF に比べて有意に強かった (図 2.6.2.2.3-1)。

図 2.6.2.2.3-1 腰椎及び大腿骨の骨密度に対する ED-71 と ALF の効果



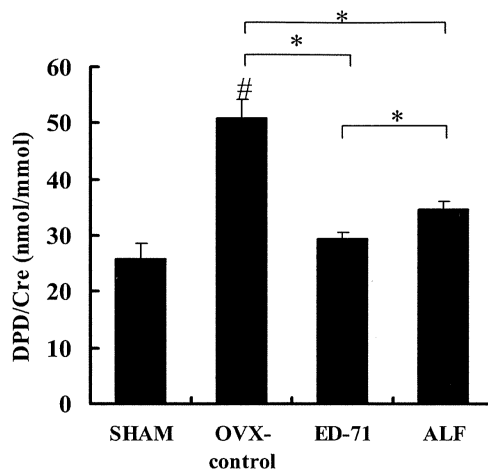
各データは mean + SE, Sham 及び OVX 対照群 (n = 12), ED-71 投与群 (n = 21), ALF 投与群 (n = 22), [#] P < 0.05 vs Sham 対照群 (unpaired t-test),

* P < 0.05 (unpaired t-test with Bonferroni correction), NS: Not Significant.

(4.2.1.1-8, Fig. 1を改変)

骨吸収マーカーである尿中 DPD 排泄量においても ED-71 及び ALF はともに尿中 DPD 排泄量を有意に低下させたが、その作用も ED-71 の方が ALF に比べて有意に強かった (図 2.6.2.2.3-2)。ED-71 及び ALF 投与群の血清 Ca 濃度はそれぞれ 10.3 ± 0.1 及び 10.5 ± 0.1 mg/dL とほぼ同等であった。この試験での Sham 対照群の濃度は 9.9 ± 0.1 mg/dL であった。

図 2.6.2.2.3-2 尿中 DPD 排泄量に対する作用



各データは mean + SE, Sham 及び OVX 対照群 (n = 12), ED-71 投与群 (n = 21), ALF 投与群 (n = 22),

[#] P < 0.05 vs Sham 対照群 (unpaired t-test),

* P < 0.05 vs (unpaired t-test with Bonferroni correction)。

(4.2.1.1-8, Fig. 2を改変)

以上, ED-71 (0.03 µg/kg) と ALF (0.075 µg/kg) の効力を比較した試験において, ED-71 の腰椎骨密度増加効果及び骨吸収マーカー (尿中 DPD 排泄量) 抑制効果は ALF を有意に上回っていた。その際, 両投与群の血清 Ca 濃度はほぼ同等であり, 血清 Ca 濃度を基準として比較した時に, ED-71 の効力は ALF よりも優れていることが明らかとなった。

2.6.2.2.4 骨粗鬆症モデリング動物（OVX ラット）の骨量減少に対する効果

(1) OVX ラットを用いた薬効評価のための用量設定

(資料番号4.2.1.1-9)

骨粗鬆症モデリング動物として知られている OVX ラットでの12カ月間反復経口投与試験に先立ち、高 Ca 血症を引き起こさずに骨密度・骨強度を増加させる ED-71の至適用量を予防系（2.6.2.2.2.1）及び治療系 OVX モデル（2.6.2.2.2.2）の試験成績から推定した。予防系及び治療系モデルともに、ED-71（0.005, 0.01, 0.02, 0.04 $\mu\text{g/kg/日}$ を6カ月投与）群の血清 Ca 濃度はいずれの用量でも Sham 対照群に比べて有意な増加を示さなかった。また、0.02 $\mu\text{g/kg}$ 以上では予防系及び治療系ともに OVX 対照群に対して大腿骨骨密度の有意な増加効果が認められている。より投与期間が長い12カ月間投与試験においては、ED-71の至適用量は0.02 $\mu\text{g/kg}$ 付近であると推定された。

(2) OVX ラットに対する効果

(資料番号4.2.1.1-10)

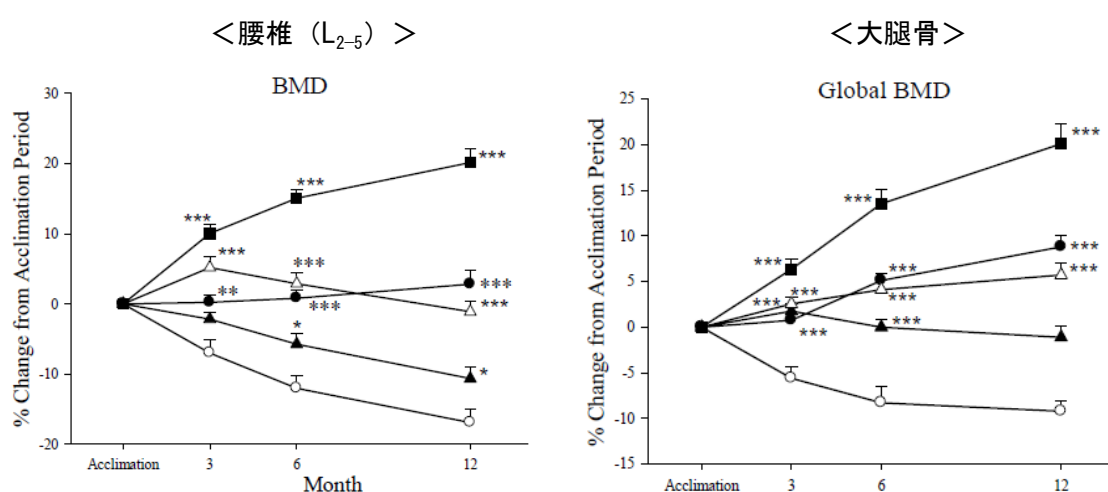
OVX ラット（雌 Wistar-Imamichi ラット、約6カ月齢）に ED-71を12カ月間反復経口投与し、本薬の骨密度、骨強度、骨代謝マーカー、骨組織及び血清 Ca 濃度に対する作用を検討した。ED-71の用量は、予防系及び治療系モデルでの試験結果を踏まえて（ED-71の至適用量：0.02 $\mu\text{g/kg}$ 付近、2.6.2.2.4(1)）、0.0075, 0.015, 0.03 $\mu\text{g/kg/日}$ を設定した。投与は OVX の翌日から開始し、腰椎及び大腿骨骨密度、骨代謝マーカー〔骨形成マーカー（血清 ALP）, 骨吸収マーカー（尿中 DPD）〕及び血清 Ca 濃度などを経時的（投与3, 6, 12カ月後）に測定した。投与12カ月後に腰椎及び大腿骨を摘出し、これらの骨強度測定及び骨組織評価を行った。

骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA 又は pQCT（peripheral Quantitative Computed Tomography）にて測定した。骨強度パラメータである剛性、最大負荷及び吸収エネルギーは、腰椎では圧迫試験、大腿骨では3点曲げ強度試験の結果から算出した。

1) 骨密度（腰椎、大腿骨）に対する効果

ED-71は腰椎（L₂₋₅）及び大腿骨骨密度を用量依存的に増加させた。投与12カ月後では、すべての用量で腰椎骨密度が OVX 対照群に比べて有意に増加し、大腿骨でも0.015及び0.03 $\mu\text{g/kg}$ で有意な増加が認められた（図 2.6.2.2.4-1）。

図 2.6.2.2.4-1 腰椎及び大腿骨の骨密度に対する効果



各データは mean + SE (n = 12~15), ● : Sham 対照群, ○ : OVX 対照群, ▲ : ED-71 0.0075 $\mu\text{g/kg}$, △ : ED-71 0.015 $\mu\text{g/kg}$, ■ : ED-71 0.03 $\mu\text{g/kg}$,

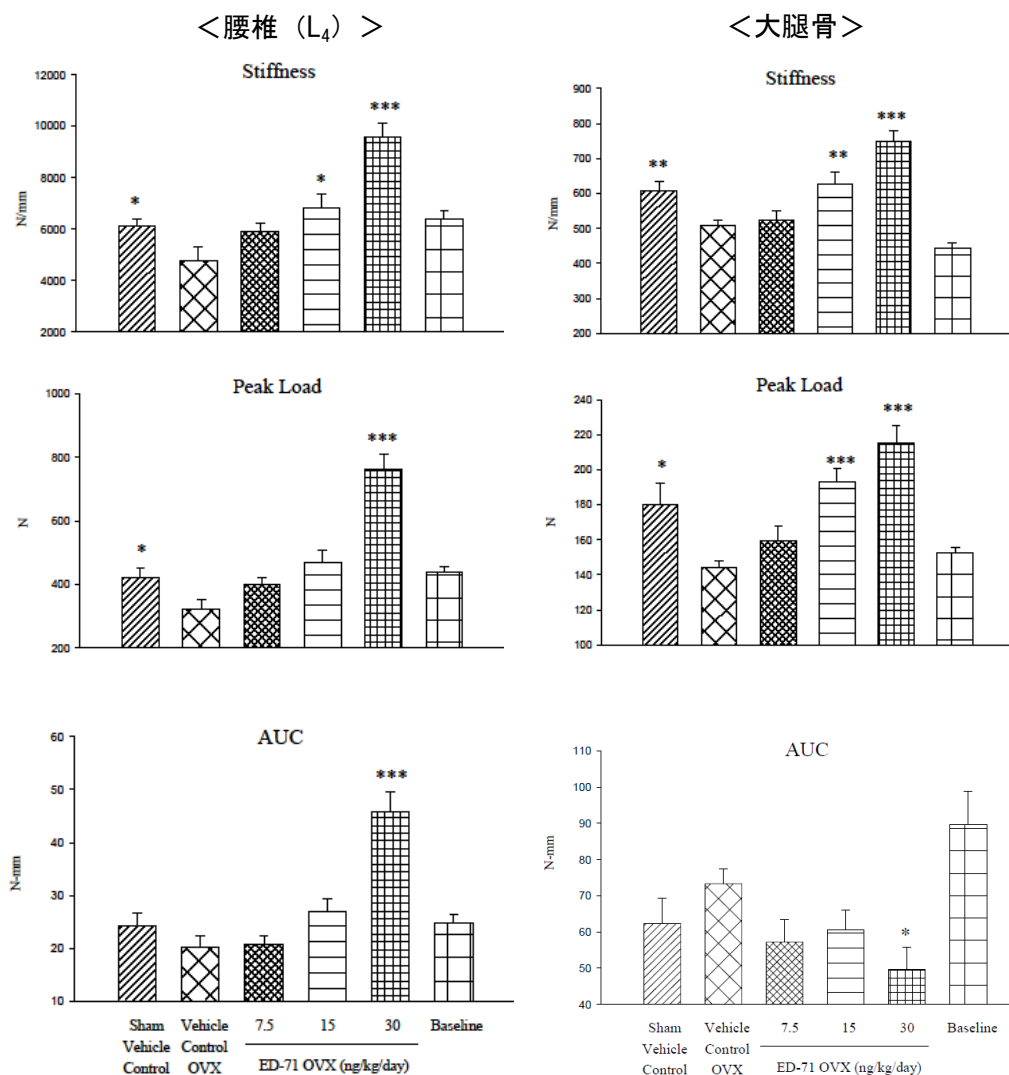
* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-10, Appendix 8 Text Fig. 9 (左), Text Fig. 10 (右) を改変)

2) 骨強度（腰椎、大腿骨）に対する効果

腰椎（L₄）の剛性、最大負荷及び吸収エネルギーにおいて、ED-71は用量依存的な改善効果を示した。0.015 µg/kg 以上では剛性（Stiffness）を、最高用量の0.03 µg/kg では、剛性に加えて最大負荷（Peak Load）及び吸収エネルギー（AUC）を OVX 対照群に比べて有意に増加させた（図 2.6.2.2.4-2）。大腿骨においては、吸収エネルギーに対する改善効果は認められなかったが、0.015 µg/kg 以上で剛性及び最大負荷を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。

図 2.6.2.2.4-2 腰椎及び大腿骨の骨強度に対する効果

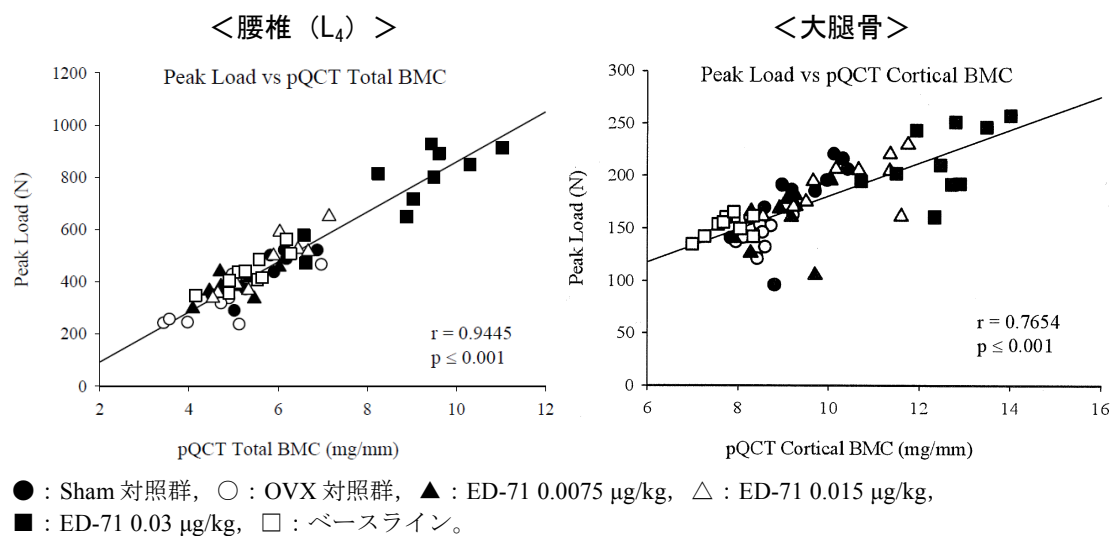


各カラムは mean + SE (n = 9~10), * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。
(4.2.1.1-10, Appendix 8 Text Fig. 18 (左), Text Fig. 13 (右) を改変)

3) 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

OVX 対照群及び ED-71投与群の骨密度と骨強度（最大負荷）との相関を検討した。腰椎（L₄）骨密度と骨強度との間には正の相関が認められた。また、大腿骨骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた（図 2.6.2.2.4-3）。

図 2.6.2.2.4-3 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

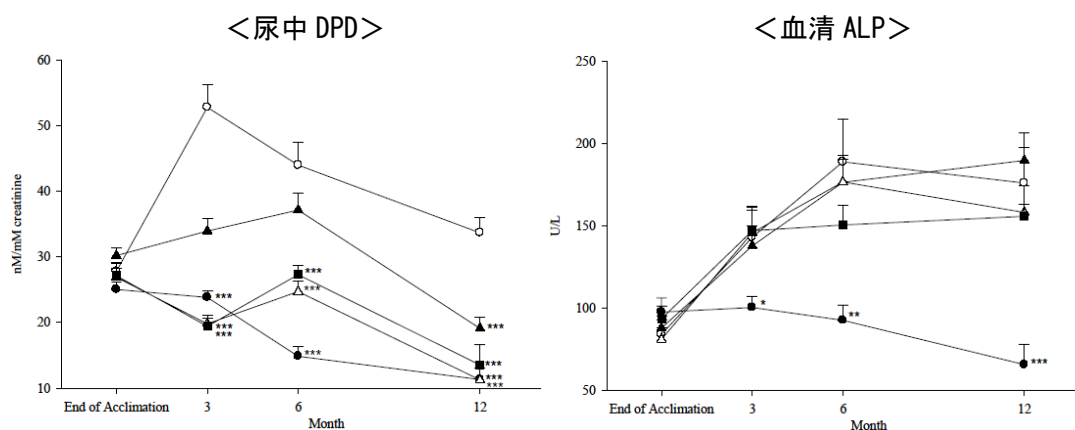


(4.2.1.1-10, Appendix 8 Text Fig. 19 (左), Text Fig. 14 (右) を改変)

4) 骨代謝マーカー（骨吸収マーカー，骨形成マーカー）に対する作用

ED-71はすべての用量で、投与12カ月後の骨吸収マーカー（尿中 DPD）を OVX 対照群に比べて有意に低下させた。骨形成マーカーである血清 ALP には有意な差は認められなかった（図 2.6.2.2.4-4）。

図 2.6.2.2.4-4 骨代謝マーカーに対する作用



各データは mean + SE (n = 9~10), ● : Sham 対照群, ○ : OVX 対照群, ▲ : ED-71 0.0075 µg/kg, △ : ED-71 0.015 µg/kg, ■ : ED-71 0.03 µg/kg,

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-10, Appendix 8 Text Fig. 6 (左), Text Fig. 4 (右) を改変)

5) 骨組織に対する影響

投与完了後に摘出した海綿骨（腰椎 L₃）及び皮質骨（脛骨）の骨構造パラメータ及び骨代謝関連パラメータを骨形態計測し、ED-71の骨組織に対する影響を評価した。

① 海綿骨（腰椎 L₃）

骨構造パラメータにおいて、ED-71は、OVX 対照群に比べて骨量及び骨梁数を0.015, 0.03 µg/kg で、骨梁幅を0.03 µg/kg で有意に増加させ、骨梁間隙を0.015, 0.03 µg/kg で有意に減少させた（表 2.6.2.2.4-1）。これらのことから、ED-71は骨梁の数と幅を増加させることで骨量を増加させ、海綿骨の骨微細構造を改善すると考えられた。骨代謝関連パラメー

タにおいて、ED-71は、OVX 対照群に比べて骨吸収パラメータである破骨細胞面や破骨細胞数を0.03 $\mu\text{g/kg}$ で、及び骨形成パラメータである骨形成速度を0.015, 0.03 $\mu\text{g/kg}$ で有意に減少させた。また、骨代謝回転パラメータである骨単位活性化率も、0.015, 0.03 $\mu\text{g/kg}$ で有意に減少させたことから、ED-71は骨代謝回転を抑制することで海綿骨を増加させると考えられた。加えて、ED-71は骨石灰化速度に変化を与えず、類骨量を OVX 対照群に比べて0.015, 0.03 $\mu\text{g/kg}$ で有意に減少させた。このことから、ED-71による骨の石灰化障害や類骨の蓄積等の異常な骨の形成はないと考えられた。

表 2.6.2.2.4-1 骨組織（海綿骨（腰椎 L₃））に対する影響

	Sham 対照群	OVX 対照群	OVX ED-71 (0.0075 $\mu\text{g/kg}$)	OVX ED-71 (0.015 $\mu\text{g/kg}$)	OVX ED-71 (0.03 $\mu\text{g/kg}$)
骨構造パラメータ					
骨量 BV/TV (%)	39.1	26.4 ^{###}	28.3	35.7 ^{***}	61.4 ^{***}
骨梁幅 Tb.Th (μm)	88.9	90.3	85.3	94.5	141.4 ^{***}
骨梁間隙 Tb.Sp (μm)	141.5	257.1 ^{###}	217.6	175.1 [*]	88.2 ^{***}
骨梁数 Tb.N (mm^{-1})	4.4	2.9 ^{###}	3.3	3.8 ^{***}	4.4 ^{***}
骨代謝関連パラメータ					
破骨細胞面 Oc.S/BS (%)	0.5	1.3 ^{SS}	1.3	0.7	0.2 ^{***}
破骨細胞数 N.Oc/BS (#/mm)	0.1	0.3 ^S	0.4	0.2	0.1 ^{***}
類骨面 OS/BS (%)	1.4	12.9 ^{SS}	7.8 [*]	3.3 ^{***}	4.5 ^{***}
類骨量 OV/BV (%)	0.0	0.4 ^{SS}	0.2	0.1 ^{***}	0.1 [*]
骨石灰化面 MS/BS (%)	8.1	14.9 ^{###}	9.1	4.1 ^{***}	3.2 ^{***}
骨石灰化速度 MAR ($\mu\text{m/day}$)	1.5	1.7	1.5	1.4	1.7
骨形成速度 BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{yr}$)	45.7	94.7 ^{###}	49.5	20.1 ^{***}	19.6 ^{***}
骨単位活性化率 Ac.f (yr^{-1})	0.6	5.1 ^{SS}	2.9	1.3 ^{**}	1.3 ^{**}

各データは平均値 (n=10) , ^{###}P<0.001 vs Sham 対照群 (t-test) ,

^SP<0.05, ^{SS}P<0.01 vs Sham 対照群 (Wilcoxon test) ,

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test) ,

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001 vs OVX 対照群 (Dunn's test) 。

(4.2.1.1-10, Table 23を改変)

② 皮質骨（脛骨）

骨構造パラメータにおいて、ED-71は、OVX 対照群に比べて皮質骨面及び皮質骨幅を0.015, 0.03 $\mu\text{g/kg}$ で有意に増加させ、骨髄腔面を0.03 $\mu\text{g/kg}$ で有意に減少させた（表 2.6.2.2.4-2）。骨代謝関連パラメータにおいて、ED-71は、OVX 対照群に比べて骨内膜面における骨形成速度をすべての用量で有意に減少させた。一方、骨外膜面では骨形成速度に有意な変化を与えなかった。

表 2.6.2.2.4-2 骨組織（皮質骨（脛骨））に対する影響

	Sham 対照群	OVX 対照群	OVX ED-71 (0.0075 µg/kg)	OVX ED-71 (0.015 µg/kg)	OVX ED-71 (0.03 µg/kg)
骨構造パラメータ					
皮質骨面 Ct.Ar (mm ²)	4.05	4.18	4.21	4.75**	5.18***
骨髓腔面 Me.Ar (mm ²)	1.68	2.07 ^{##}	1.88	2.05	1.74*
皮質骨幅 Ct.Wi (µm)	616.71	600.98	617.91	667.84**	738.30***
骨代謝関連パラメータ					
骨内膜面					
破骨細胞面 Ec.Oc.Pm/Ec.Pm (%)	1.66	1.87	1.41	1.80	1.26
破骨細胞数 Ec.N.Oc/Ec.Pm (#/mm)	0.47	0.45	0.36	0.49	0.37
骨標識面 Ec.L.Pm/Ec.Pm (%)	5.82	13.16 [#]	3.14***	5.58*	4.56**
骨石灰化速度 Ec.MAR (µm/day)	0.66	1.25 ^{SS}	0.52***	0.71**	0.61***
骨形成速度 Ec.BFR/BS (µm ³ /µm ² /yr)	16.10	65.33 ^{###}	6.44***	17.46*	10.82**
骨外膜面					
骨標識面 Ps.L.Pm/Ps.Pm (%)	1.89	10.60 ^{SS}	8.43	17.82	8.33
骨石灰化速度 Ps.MAR (µm/day)	0.53	0.72	0.64	0.83	0.66
骨形成速度 Ps.BFR/BS (µm ³ /µm ² /yr)	4.00	31.48 ^{SS}	22.91	57.21	24.24

各データは平均値 (n=10), [#]P<0.05, ^{##}P<0.01, ^{###}P<0.001 vs Sham 対照群 (t-test),

^{SS}P<0.01, ^{SSS}P<0.01 vs Sham 対照群 (Wilcoxon test),

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test),

※P<0.05, ※※P<0.01, ※※※P<0.001 vs OVX 対照群 (Dunn's test)。

(4.2.1.1-10, Table 23を改変)

6) 血清 Ca 濃度に対する影響

ED-71の投与により、最高用量の0.03 µg/kg では投与3, 6, 12カ月後の血清 Ca 濃度が OVX 対照群に比べて有意に増加した。0.015 µg/kg 投与でも投与6, 12カ月後の血清 Ca 濃度の有意な増加が認められた。しかし、0.03及び0.015 µg/kg 投与群の血清 Ca 濃度は10.57~11.0 mg/dL の範囲であり、Sham 対照群との間に有意な差は認められなかった。

以上、OVX ラットの試験成績から、ED-71は骨代謝回転を抑制することにより、骨密度及び骨強度を改善することが推定された。骨組織の評価結果からは、ED-71は骨微細構造を改善すること、ED-71による骨の石灰化障害や類骨の蓄積はないことが示された。これらのことから、ED-71は骨質に対して異常な影響を与えないと考えられた。血清 Ca 濃度は、OVX 対照群に比べて有意に増加するものの、最高用量の0.03 µg/kg 群でも Sham 対照群との間では有意な差を認めなかった。

2.6.2.2.5 骨粗鬆症リモデリング動物（OVX サル）の骨量減少に対する効果

2.6.2.2.5.1 OVX サルを用いた薬効評価試験のための用量設定試験（I）

（資料番号4.2.1.1-11）

骨粗鬆症リモデリング動物として知られている OVX サルでの16カ月間反復経口投与試験（2.6.2.2.5.3）に先立ち、サルに高 Ca 血症を引き起こさずに骨密度・骨強度を増加させる ED-71の至適用量を検討するための用量設定試験を実施した。

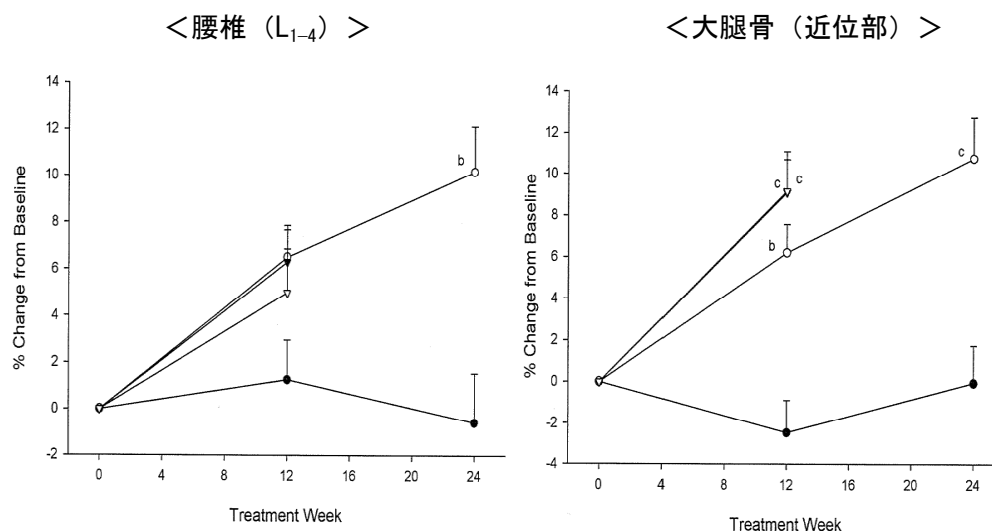
本用量設定試験（I）では、当初、ED-71（0.3, 0.75, 1.5 $\mu\text{g/kg}$ ）を26週間反復経口投与する予定であった。しかしながら、試験に用いたいずれの用量でも高 Ca 血症が認められ、1.5及び0.75 $\mu\text{g/kg}$ では投与11週後に血清 Ca 濃度が OVX 対照群に比べて有意に増加し、投与13週後ではその濃度は更に増加した（投与13週後の血清 Ca 濃度：14.43～15.56 mg/dL）。一方、最低用量の0.3 $\mu\text{g/kg}$ では投与18週後に血清 Ca 濃度が有意に増加し12.78 mg/dL となったが、投与23/24週後にその濃度が増加することはなかった（投与23/24週後の血清 Ca 濃度：12.46 mg/dL）。そのため、投与24週間後での薬効評価は0.3 $\mu\text{g/kg}$ 投与群のみを対象として実施した。

雌カニクイザル（9歳齢以上）の両側卵巣を摘出し、OVX 後に ED-71（0.3, 0.75, 1.5 $\mu\text{g/kg/日}$ ）を反復経口投与した。投与開始後12, 24週目に腰椎及び大腿骨骨密度並びに血清 Ca 濃度を測定した。骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA 又は pQCT にて測定した。骨強度パラメータである最大負荷は、腰椎では圧迫試験、大腿骨では3点曲げ強度試験の結果から算出した。

1) 骨密度（腰椎、大腿骨）に対する効果

ED-71の0.3 $\mu\text{g/kg}$ 投与は、投与24週後の腰椎（L₁₋₄）及び大腿骨（近位部）骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた（図 2.6.2.2.5.1-1）。

図 2.6.2.2.5.1-1 腰椎及び大腿骨の骨密度に対する増加効果



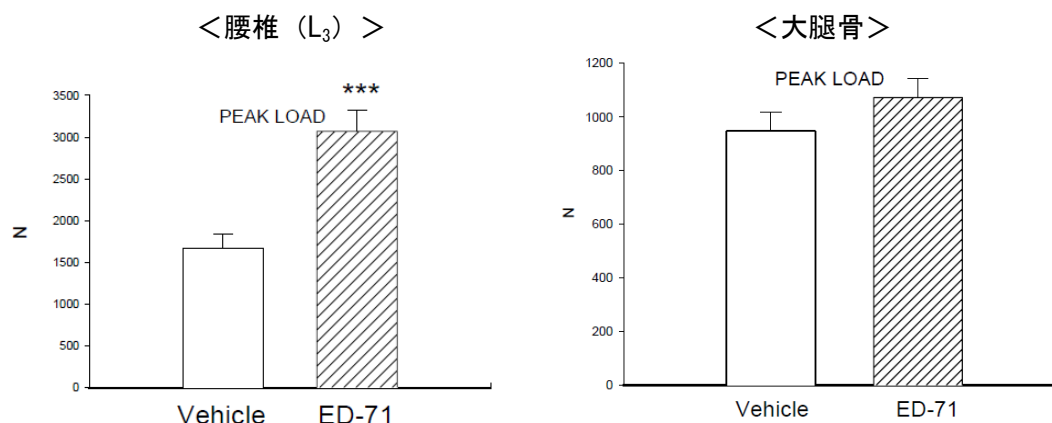
各データは mean + SE (n = 9~10), ● : OVX 対照群, ○ : ED-71 0.3 $\mu\text{g/kg}$, ▼ : ED-71 0.75 $\mu\text{g/kg}$,
 ▽ : ED-71 1.5 $\mu\text{g/kg}$, ^b P ≤ 0.01, ^c P ≤ 0.001 vs OVX 対照群。

(4.2.1.1-11, Text Fig. 4を改変)

2) 骨強度（腰椎、大腿骨）に対する効果

骨強度においても、ED-71の0.3 $\mu\text{g/kg}$ は腰椎（L₃）の最大負荷（Peak Load）を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。大腿骨の最大負荷では有意な増加はみられなかったが、増加傾向が認められた（図 2.6.2.2.5.1-2）。

図 2.6.2.2.5.1-2 腰椎及び大腿骨の骨強度（最大負荷）に対する効果



Vehicle : OVX 対照群, ED-71: 0.3 $\mu\text{g/kg}$, 各カラムは mean + SE (n = 7~10),

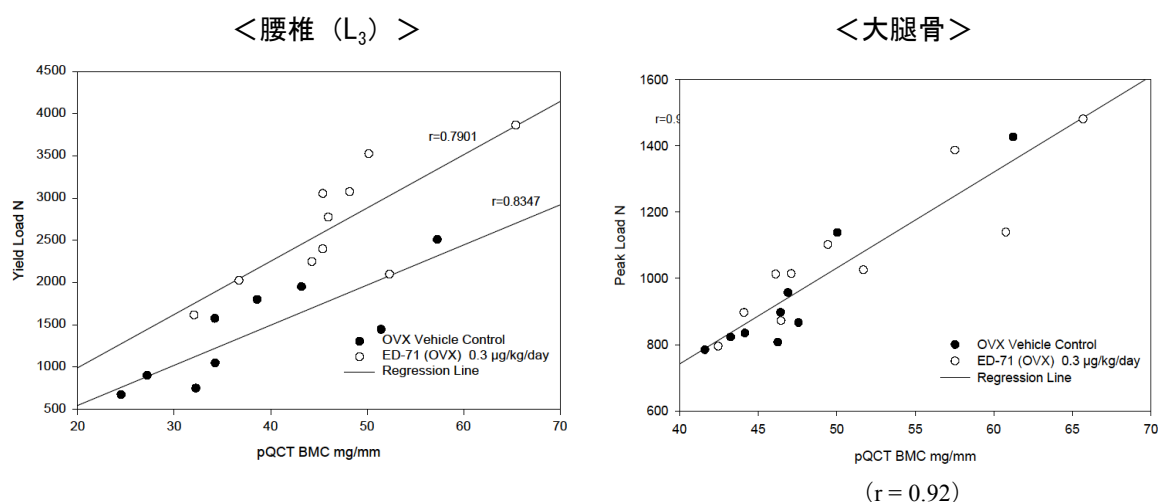
*** $P \leq 0.001$ vs OVX 対照群 (t-test)。

(4.2.1.1-11, Appendix No. 31 Fig. 6 (左), No. 31 Fig. 1 (右) を改変)

3) 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

OVX 対照群及び ED-71の0.3 $\mu\text{g/kg}$ 投与群の腰椎 (L₃) 骨密度と骨強度との間には正の相関が認められた。大腿骨骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた (図 2.6.2.2.5.1-3)。

図 2.6.2.2.5.1-3 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関



(4.2.1.1-11, Appendix No. 31 Fig. 7 (左), Fig. 2 (右) を改変)

4) 血清 Ca 濃度に対する影響

ED-71のいずれの用量 (0.3, 0.75, 1.5 $\mu\text{g/kg}$) でも高 Ca 血症が認められた。1.5及び0.75 $\mu\text{g/kg}$ では投与11及び13週後に血清 Ca 濃度が有意に増加し、その濃度は投与13週後で14.43~15.56 mg/dL と高レベルであった。最低用量の0.3 $\mu\text{g/kg}$ では投与18週後に血清 Ca 濃度が有意に増加したがその濃度は12.78 mg/dL であり、投与23/24週後においてもその濃度は12.46 mg/dL で、増加することはなかった。

以上、ED-71は本試験の最低用量である0.3 $\mu\text{g/kg}$ で骨密度及び骨強度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。しかしながら、0.3 $\mu\text{g/kg}$ でも高 Ca 血症が認められたことから、投与期間が18週以上の場合に ED-71の至適用量は0.3 $\mu\text{g/kg}$ 以下であると考えられた。

2.6.2.2.5.2 OVXサルを用いた薬効評価試験のための用量設定試験（Ⅱ）

（資料番号4.2.1.1-12）

用量設定試験（Ⅰ）では最低用量の0.3 $\mu\text{g/kg}$ でも高 Ca 血症が生じたため（2.6.2.2.5.1 4），OVX サルでの16カ月間反復経口投与試験（2.6.2.2.5.3）の適切な用量を設定することができなかった。したがって、本用量設定試験（Ⅱ）では更に低い用量（0.01, 0.03, 0.1 $\mu\text{g/kg/day}$ ）で反復投与試験を実施することにより、ED-71の至適用量を推定した。

本試験では、最高用量の0.1 $\mu\text{g/kg}$ で血清 Ca 濃度が3回連続で11.0 mg/dL 以上になった個体が10例中2例みられ、内1例では12.3 mg/dLに達した。しかし、投与期間を通じて著名な副作用はみられなかったので、薬効評価はすべての群について行った。

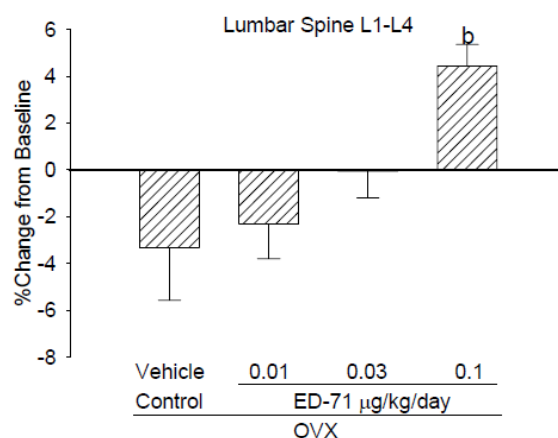
雌カニクイザル（9歳齢以上）の両側卵巣を摘出し、OVX 翌日から ED-71を26週間反復経口投与し、投与4, 8, 13, 26週後に血清 Ca 濃度を経時的に測定した。投与26週後に腰椎及び大腿骨の骨密度及びその骨強度、骨代謝マーカー〔骨形成マーカー（血清 OC, 血清 BAP）, 骨吸収マーカー（血清 CTX, 尿中 NTX）〕を測定した。

骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA 又は pQCT にて測定した。骨強度パラメータである最大負荷、剛性及び吸収エネルギーは、腰椎では圧迫試験、大腿骨では3点曲げ強度試験の結果から算出した。

1) 骨密度（腰椎、大腿骨）に対する効果

ED-71は用量依存的に腰椎（L₁₋₄）骨密度を増加させ、最高用量の0.1 $\mu\text{g/kg}$ では OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた（図 2.6.2.2.5.2-1）。なお、データは記載していないが、大腿骨では、ED-71による骨密度増加は認められなかった。

図 2.6.2.2.5.2-1 腰椎（L₁₋₄）の骨密度に対する効果



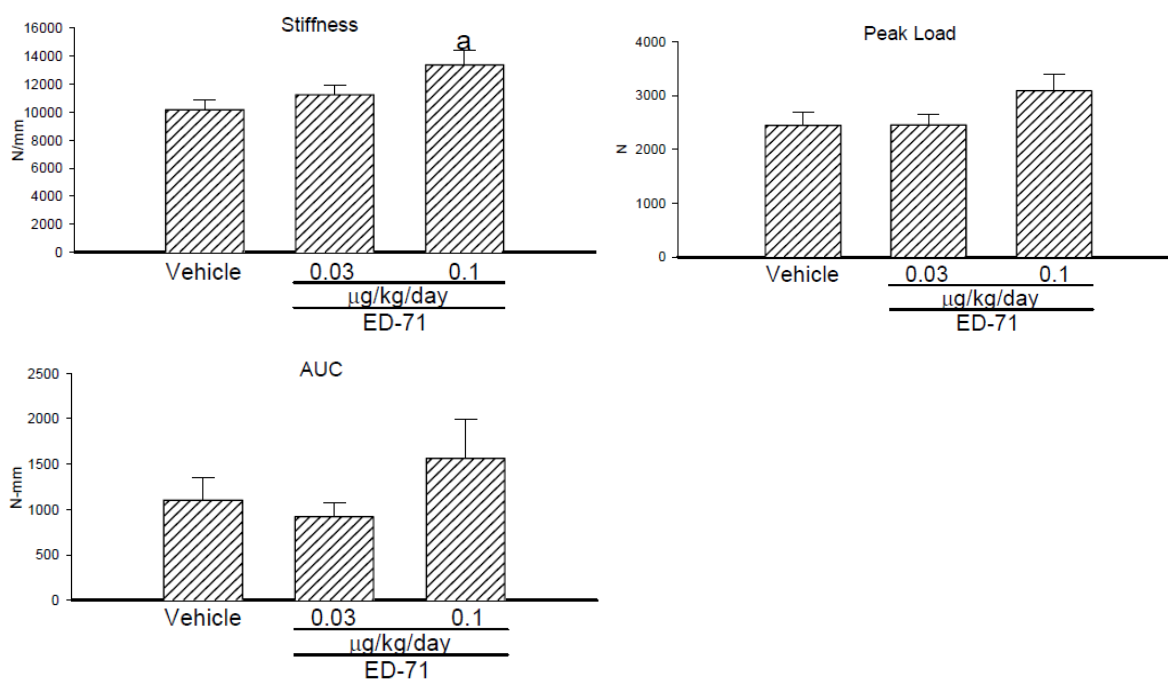
Vehicle : OVX 対照群, 各データは mean + SE (n = 9~10),

^b P ≤ 0.01 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-12, Text Fig. 3を改変)

2) 腰椎及び大腿骨の骨強度に対する効果

最高用量の0.1 $\mu\text{g/kg}$ では、腰椎（L₃）での剛性（Stiffness）が OVX 対照群に比べて有意に増加した。最大負荷（Peak Load）及び吸収エネルギー（AUC）では有意な増加はみられなかったが、増加傾向が認められた（図 2.6.2.2.5.2-2）。なお、データは記載していないが、大腿骨では、ED-71による骨強度増加は認められなかった。

図 2.6.2.2.5.2-2 腰椎 (L₃) の骨強度に対する効果

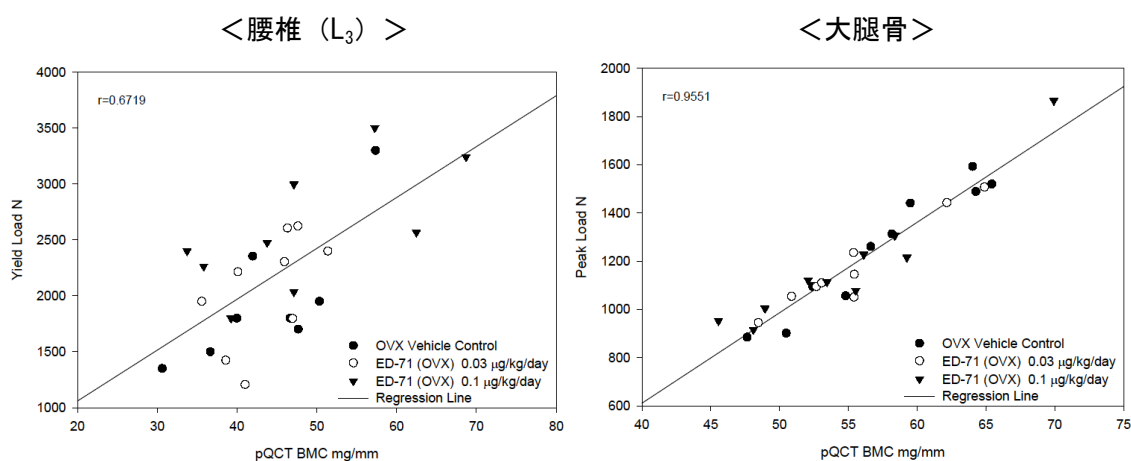
Vehicle : OVX 対照群, 各データは mean + SE (n = 8~9)。^a P ≤ 0.05 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-12, Text Fig. 6を改変)

3) 腰椎及び大腿骨骨密度と骨強度の相関

OVX 対照群及び ED-71 (0.03, 0.1 µg/kg) 投与群のデータを併せて, 腰椎 (L₃) 骨密度と骨強度との関係を検討したところ, 正の相関が認められた。大腿骨骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた (図 2.6.2.2.5.2-3)。

図 2.6.2.2.5.2-3 腰椎及び大腿骨における骨密度と骨強度との相関

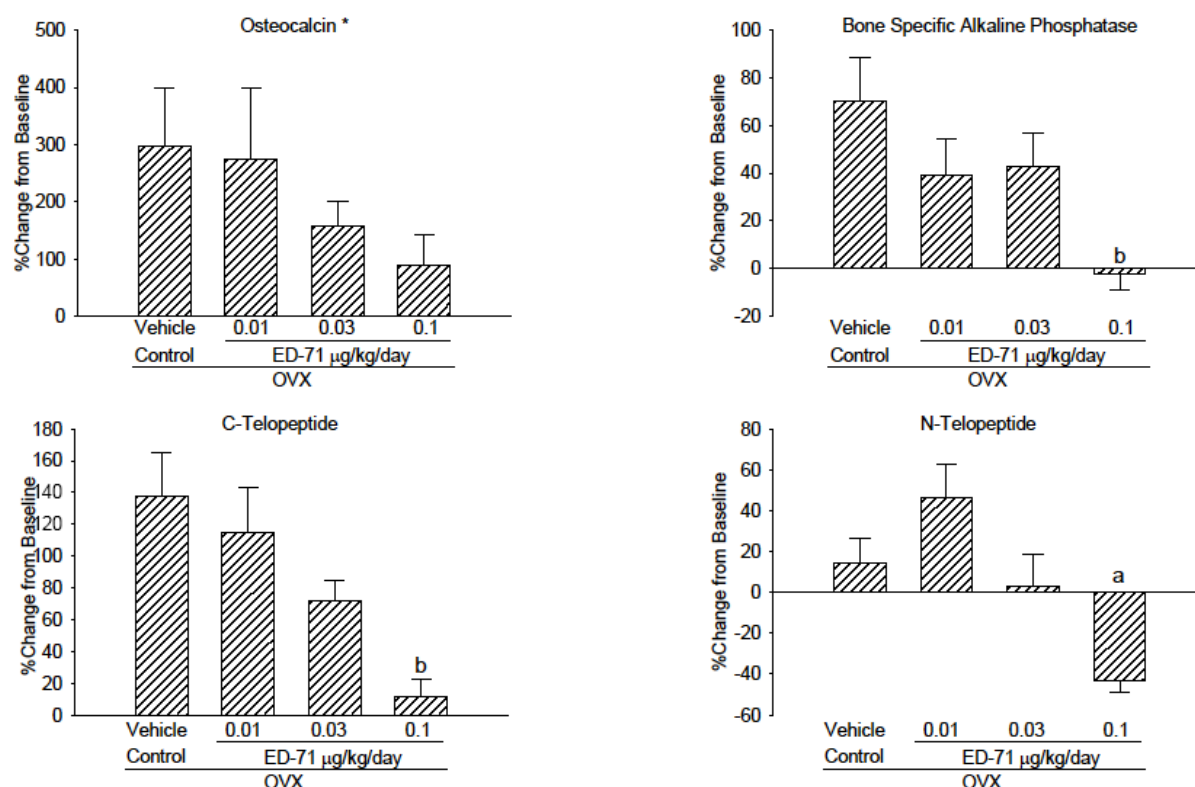


(4.2.1.1-12, Appendix 11 Text Fig. 11 (左), Text Fig. 4 (右) を改変)

4) 骨代謝マーカー (骨吸収マーカー, 骨形成マーカー) に対する作用

ED-71投与により, すべての骨吸収マーカー (血清 CTX, 尿中 NTX) 及び骨形成マーカー (血清 OC, 血清 BAP) は低下し, OVX によって亢進した骨代謝回転が抑制された。0.1 µg/kg では OVX 対照群に比べて骨吸収マーカー (血清 CTX, 尿中 NTX) 及び骨形成マーカー (血清 BAP) の有意な低下が認められた (図 2.6.2.2.5.2-4)。

図 2.6.2.2.5.2-4 骨代謝マーカーに対する作用



Osteocalcin : 血清 OC, Bone Specific Alkaline Phosphatase : 血清 BAP, C-Telopeptide : 血清 CTX, N-Telopeptide : 尿中 NTX, Vehicle : OVX 対照群, 各データは mean + SE (n = 6~10),

^a P ≤ 0.05, ^b P ≤ 0.01 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-12, Text Fig. 2を改変)

5) 血清 Ca 濃度に対する影響

試験期間を通じて、ED-71 (0.01, 0.03, 0.1 µg/kg) 投与群と OVX 対照群の血清 Ca 濃度の間には有意な差は認められなかった。個体レベルでは、最高用量の0.1 µg/kg で血清 Ca 濃度が3回連続で11.0 mg/dL 以上になった個体が10例中2例みられ、内1例では12.3 mg/dL に達した。

以上、ED-71 (0.01, 0.03, 0.1 µg/kg) の26週間反復投与は骨密度及び骨強度を増加させ、最高用量の0.1 µg/kg では OVX 対照群に比べて有意な増加効果が認められた。この試験結果から、投与期間が26週以上の長期に渡る場合には、0.1 µg/kg 以下の用量でも有意な効果を示すことが推察された。

一方、血清 Ca 濃度では、最高用量の0.1 µg/kg で血清 Ca 濃度が3回連続で11.0 mg/dL 以上になった個体が10例中2例みられ、内1例では12.3 mg/dL に達した。

これらのことから、投与期間が26週以上の場合に ED-71の至適用量は0.1 µg/kg よりも若干低い用量であると考えられた。

2.6.2.2.5.3 OVX サルに対する効果

(資料番号4.2.1.1-13)

OVX サル (雌カニクイザル, 10~17歳齢) に ED-71を16カ月間反復経口投与し、本薬の骨密度、骨強度、骨代謝マーカー及び骨組織並びに血清生化学値に対する効果を検討した。ED-71の用量は OVX サルでの用量設定試験 (Ⅱ) の結果 (至適用量 : <0.1 µg/kg/日, 2.6.2.2.5.2)

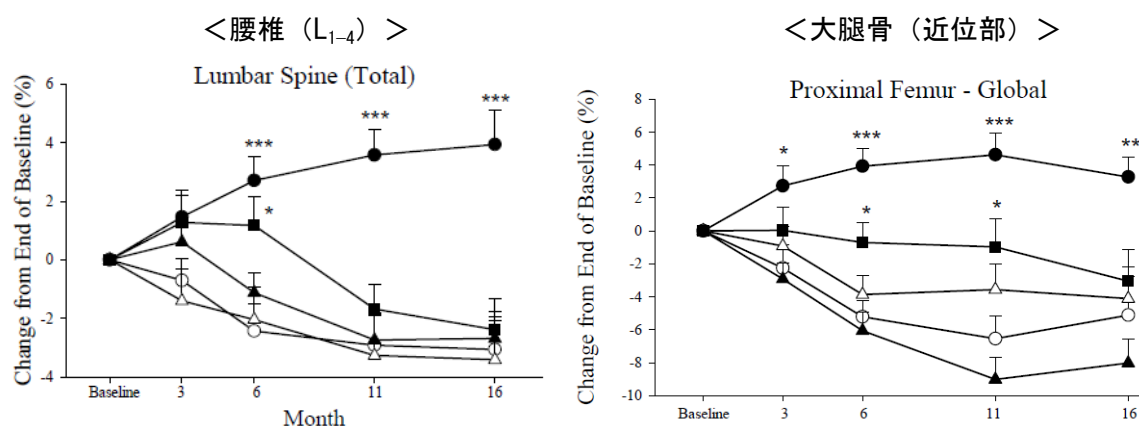
を踏まえて、0.0175, 0.035, 0.07 $\mu\text{g/kg}$ /日を設定した。投与は OVX の翌日から開始し、腰椎及び大腿骨骨密度、骨代謝マーカー〔骨形成マーカー（血清 OC, 血清 BAP）, 骨吸収マーカー（血清 CTX, 尿中 NTX）〕及び血清 Ca 濃度並びに血清骨代謝ホルモン（ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH）濃度を経時的（投与3, 6, 11, 16カ月後）に測定した。投与16カ月後に腰椎及び大腿骨を摘出し、これらの骨強度測定及び骨組織評価を行った。

骨密度は、腰椎及び大腿骨ともに DXA 又は pQCT にて測定した。骨強度パラメータである最大負荷、剛性及び吸収エネルギーは、腰椎では圧迫試験、大腿骨では3点曲げ強度試験の結果から算出した。

1) 骨密度（腰椎、大腿骨）に対する効果

ED-71は OVX による腰椎（ L_{1-4} ）及び大腿骨（近位部）の骨密度減少を抑制した。投与6カ月後では、最高用量の0.07 $\mu\text{g/kg}$ で腰椎及び大腿骨骨密度が OVX 対照群に比べて有意に高かった。投与11カ月後では、腰椎骨密度減少に対する有意な抑制効果はみられなかったが、大腿骨では0.07 $\mu\text{g/kg}$ で有意な抑制効果が認められた。投与16カ月後では、腰椎及び大腿骨ともに骨密度減少に対する有意な抑制効果はみられなかったが、0.07 $\mu\text{g/kg}$ 群の腰椎及び大腿骨骨密度はともに OVX 対照群の骨密度を下回ることにはなかった。（図 2.6.2.2.5.3-1）。

図 2.6.2.2.5.3-1 腰椎及び大腿骨の骨密度に対する効果



各データは mean + SE (n = 16~19), ● : Sham 対照群, ○ : OVX 対照群,

▲ : ED-71 0.0175 $\mu\text{g/kg}$, △ : ED-71 0.035 $\mu\text{g/kg}$, ■ : ED-71 0.07 $\mu\text{g/kg}$,

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-13, Text Fig. 7 (左), Text Fig. 9 (右) を改変)

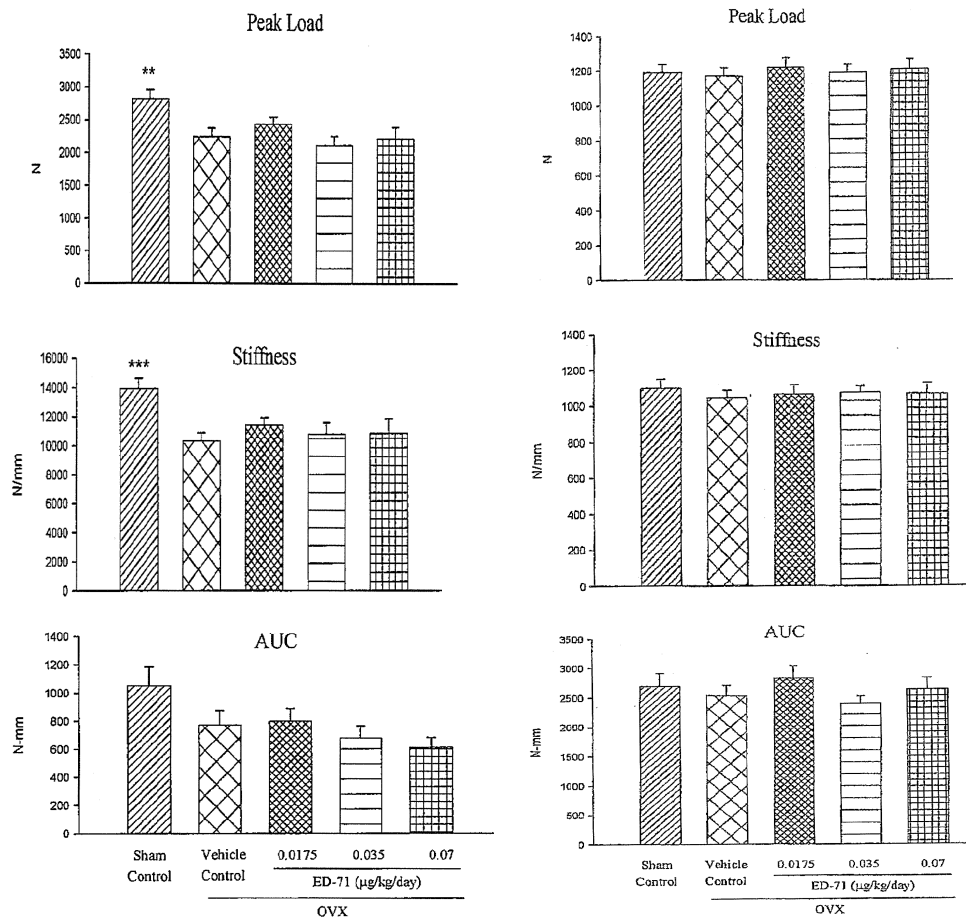
2) 骨強度（腰椎、大腿骨）に対する効果

ED-71はいずれの用量でも腰椎（ L_{3-4} ）及び大腿骨の骨強度パラメータ〔最大負荷（Peak Load）, 剛性（Stiffness）, 吸収エネルギー（AUC）〕を増加させなかった（図 2.6.2.2.5.3-2）。しかしながら、骨強度を低下させるなどの悪影響は認められなかった。

図 2.6.2.2.5.3-2 腰椎及び大腿骨に対する効果

<腰椎 (L₃₋₄)>

<大腿骨>



Sham-Control : Sham 対照群, Vehicle-Control : OVX 対照群, 各データは mean + SE (n = 16~19)。

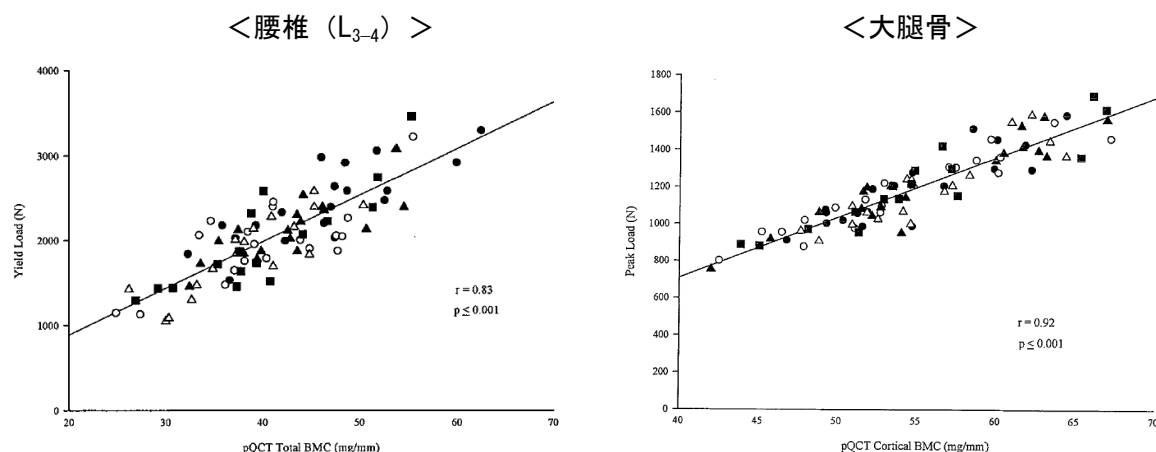
** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-13, Text Fig. 26 (左), Text Fig. 18 (右) を改変)

3) 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

OVX 対照群及び ED-71投与群の腰椎 (L₃₋₄) 骨密度と骨強度との間には正の相関が認められた。大腿骨骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた (図 2.6.2.2.5.3-3)。

図 2.6.2.2.5.3-3 腰椎及び大腿骨の骨密度と骨強度との相関

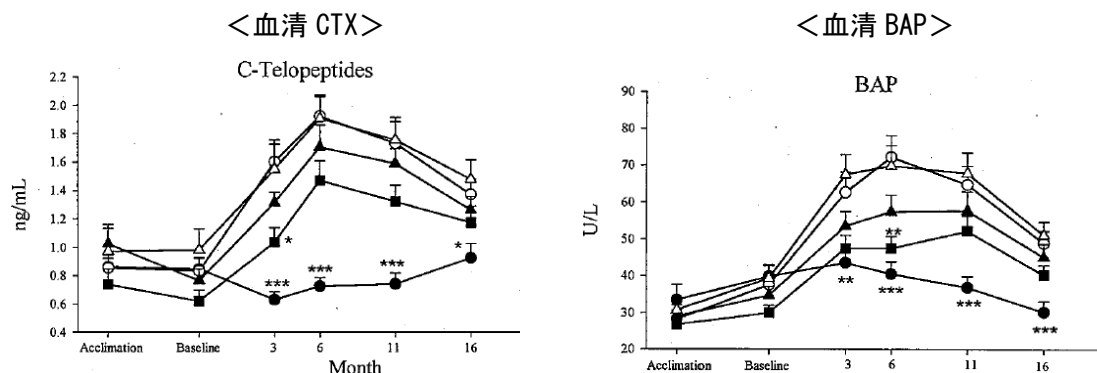


● : Sham 対照, ○ : OVX 対照, ▲ : ED-71 0.0175 $\mu\text{g/kg}$, △ : ED-71 0.035 $\mu\text{g/kg}$, ■ : ED-71 0.07 $\mu\text{g/kg}$.
(4.2.1.1-13, Text Fig. 27 (左), Text Fig. 19 (右) を改変)

4) 骨代謝マーカー（骨吸収マーカー，骨形成マーカー）に対する作用

ED-71は，OVX によって亢進した骨吸収マーカー（血清 CTX，尿中 NTX）及び骨形成マーカー（血清 OC，血清 BAP）を抑制する傾向を示した。最高用量の0.07 $\mu\text{g/kg}$ では，投与3カ月後の血清 CTX，及び投与6カ月後の血清 BAP に有意な低下が認められた（図 2.6.2.2.5.3-4）。

図 2.6.2.2.5.3-4 骨代謝マーカーに対する作用



各データは mean + SE (n = 20), ● : Sham 対照群, ○ : OVX 対照群,
▲ : ED-71 0.0175 $\mu\text{g/kg}$, △ : ED-71 0.035 $\mu\text{g/kg}$, ■ : ED-71 0.07 $\mu\text{g/kg}$,
* P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-13, Text Fig. 5を改変)

5) 骨組織に対する影響

投与完了後に摘出した大腿骨の海綿骨及び皮質骨（脛骨）の骨構造パラメータ及び骨代謝関連パラメータを骨形態計測し，ED-71の骨組織に対する影響を評価した。

① 大腿骨

骨構造パラメータにおいて，ED-71は，骨量，骨梁幅，骨梁間隙及び骨梁数の骨構造パラメータに変化を与えなかった（表 2.6.2.2.5.3-1）。骨代謝関連パラメータにおいて，各パラメータに有意な変化は認められなかった。また，類骨の有意な蓄積や石灰化障害等の骨の異常は認められなかった。

表 2.6.2.2.5.3-1 骨組織（大腿骨）に対する影響

	Sham 対照群	OVX 対照群	OVX ED-71 (0.0175 µg/kg)	OVX ED-71 (0.035 µg/kg)	OVX ED-71 (0.07 µg/kg)
骨構造パラメータ					
骨量 BV/TV (%)	21.2	22.3	19.4	20.8	21.2
骨梁幅 Tb.Th (µm)	120	130	115	129	119
骨梁間隙 Tb.Sp (µm)	479	484	531	560	494
骨梁数 Tb.N (mm ⁻¹)	1.76	1.71	1.66	1.58	1.82
骨代謝関連パラメータ					
破骨細胞面 Oc.S/BS (%)	0.25	0.35	0.32	0.60	0.17
類骨面 OS/BS (%)	7.4	11.0	12.1	11.1	9.1
類骨量 OV/BV (%)	0.53	0.63	1.00	0.70	0.51
骨石灰化面 MS/BS (%)	5.8	8.4	8.4	9.8	6.8
骨石灰化速度 MAR (µm/day)	0.49	0.70	0.71	0.80	0.81
骨形成速度 BFR/BS (µm ³ /µm ² /yr)	13.9	25.3	21.9	33.8	20.4
骨単位活性化率 Ac.f (yr ⁻¹)	0.90	1.82	1.34	2.16	1.38

各データは平均値 (n=15~19)。

(4.2.1.1-13, Table 38を改変)

② 皮質骨（脛骨）

骨構造パラメータにおいて、ED-71は、皮質骨面、骨髓腔面、及び皮質骨幅に変化を与えなかった（表 2.6.2.2.5.3-2）。骨代謝関連パラメータにおいて、ED-71は、OVX 対照群に比べて骨外膜面の骨形成速度及びハバース管の骨単位活性化率に有意な変化を与えなかった。また、石灰化障害等の骨の異常は認められなかった。

表 2.6.2.2.5.3-2 骨組織（皮質骨（脛骨））に対する影響

	Sham 対照群	OVX 対照群	OVX ED-71 (0.0175 µg/kg)	OVX ED-71 (0.035 µg/kg)	OVX ED-71 (0.07 µg/kg)
骨構造パラメータ					
皮 質 骨 面 Ct.Ar (mm ²)	34.72	35.00	36.50	34.42	36.63
骨 髄 腔 面 Me.Ar (mm ²)	10.28	10.33	11.19	10.76	9.59
皮 質 骨 幅 Ct.Wi (mm)	1.94	1.96	1.98	1.91	2.05
骨代謝関連パラメータ					
骨内膜面					
骨 標 識 面 Ec.L.Pm/Ec.Pm (%)	1.6	6.6	7.3	6.6	4.0
骨 石 灰 化 速 度 Ec.MAR (µm/day)	0.37**	0.84	0.84	1.12	0.61
骨 形 成 速 度 Ec.BFR/BS (µm ³ /µm ² /yr)	3.2***	26.0	26.9	32.3	11.9
骨外膜面					
骨 標 識 面 Ps.L.Pm/Ps.Pm (%)	3.5	3.0	2.6	4.5	3.1
骨 石 灰 化 速 度 Ps.MAR (µm/day)	0.39	0.50	0.43	0.50	0.36
骨 形 成 速 度 Ps.BFR/BS (µm ³ /µm ² /yr)	9.3	8.6	5.9	9.9	7.8
ハバース管					
骨単位活性化率 H.Ac.f (yr ⁻¹)	1.6****	10.7	9.3	13.0	9.1

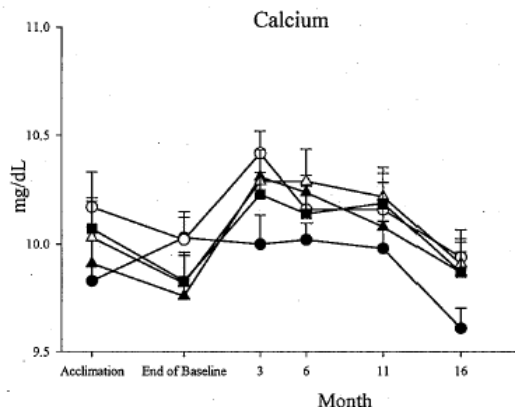
各データは平均値 (n=16~19) **P≤0.01, ***P≤0.001 vs OVX 対照群 (Dunn's test)。

(4.2.1.1-13, Table 38を改変)

6) 血清 Ca 濃度に対する影響

ED-71は、OVX 対照群に比べていずれの用量でも血清 Ca 濃度に対し有意な差を示さなかった (図 2.6.2.2.5.3-5)。

図 2.6.2.2.5.3-5 血清 Ca 濃度に対する影響



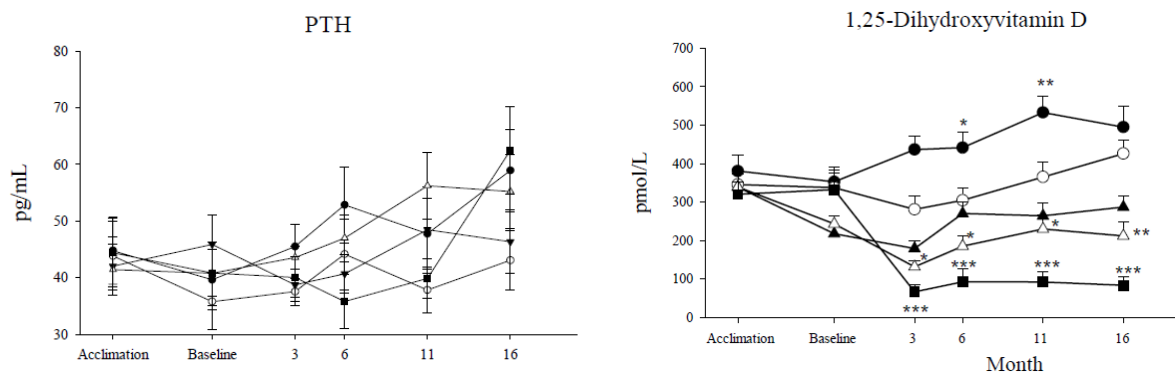
各データは mean + SE (n = 16~19), ● : Sham 対照群, ○ : OVX 対照群,

▲ : ED-71 0.0175 µg/kg, △ : ED-71 0.035 µg/kg, ■ : ED-71 0.07 µg/kg。

(4.2.1.1-13, Text Fig. 2を改変)

7) 骨代謝ホルモン (PTH 及び $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) に対する影響

ED-71は、OVX 対照群に比べていずれの用量でも血清 PTH 濃度に対し有意な差を示さなかった。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度に対し、ED-71は用量依存的にその濃度を減少させ、最高用量の0.07及び0.035 µg/kg では投与3~16カ月後に有意な減少が認められた (図 2.6.2.2.5.3-6)。

図 2.6.2.2.5.3-6 PTH 及び $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度に対する作用

各データは mean (n = 20) ± SD, ● : Sham 対照群, ○ : OVX 対照群,

▲ : ED-71 0.0175 µg/kg, △ : ED-71 0.035 µg/kg, ■ : ED-71 0.07 µg/kg,

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs OVX 対照群 (Dunnett's test)。

(4.2.1.1-13, Text Fig. 4を改変)

以上、OVX サルでの試験成績から、ED-71は OVX による骨密度減少を抑制することが示唆された。ED-71による骨強度の改善効果は認められなかったが、骨組織の評価結果からは、ED-71による類骨の蓄積や石灰化障害等の骨の異常はみられず、本薬は骨質に対して異常な影響を与えないと考えられた。

2.6.2.2.6 骨折モデルラットの骨折治癒過程に及ぼす影響

2.6.2.2.6.1 骨の形状、力学的強度及び固有材料特性値に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.1-14)

骨折モデルラットを用いて、ED-71の骨折治癒過程時の骨の形状、力学的強度及びその固有材料特性値に対する影響を検討した。

雌 SD ラット（8週齢）の骨折手術4週前から ED-71（0.015, 0.05 µg/kg/日）の反復経口投与を行った。左大腿骨の骨折手術後に、引き続き ED-71の16週間反復経口投与を行い、骨折16週後に骨折面を含む大腿骨を摘出した。骨折治癒過程に対する ED-71の影響は、骨折部位の骨の形状、骨折面の力学的強度及び固有材料特性値を測定することにより評価した。

骨折部位の形状は、軟 X 線撮影像にて評価した。骨折面の力学的強度（最大負荷、剛性、吸収エネルギー）及びその固有材料特性値（最大応力、ヤング率、靱性）は3点曲げ強度試験及び骨密度測定装置による測定結果から算出した。

ED-71はいずれの用量でも骨折部位の骨の形状に対して影響を示さなかった。骨折部位の力学的強度（最大負荷、剛性、吸収エネルギー）及び固有材料特性値（最大応力、ヤング率、靱性）においても、ED-71は対照群に比べて有意な差を示さなかった（表 2.6.2.2.6.1-1）。

以上、ED-71は骨折治癒過程に対して治癒遅延等の悪影響を与えないことが示された。

表 2.6.2.2.6.1-1 力学的強度及び固有材料特性値に対する影響

a) 力学的強度（最大負荷，剛性，吸収エネルギー）

	用量 ($\mu\text{g/kg}$)	最大負荷 Ultimate Load (N)	剛性 Stiffness (N/mm)	吸収エネルギー Energy absorption (mJ)
対照群	0	154.20 $\pm$ 12.47	514.41 $\pm$ 70.87	38.11 $\pm$ 4.62
ED-71	0.015	180.85 $\pm$ 15.16	738.35 $\pm$ 30.37	36.49 $\pm$ 6.88
	0.05	194.30 $\pm$ 17.58	643.73 $\pm$ 86.49	44.44 $\pm$ 5.92

各データは mean $\pm$ SE (n = 9~10), No significance difference among the group by ANOVA。

(4.2.1.1-14, Table 1を改変)

b) 固有材料特性値（最大応力，ヤング率，靱性）

	用量 ($\mu\text{g/kg}$)	最大応力 Ultimate Stress (MPa)	ヤング率 Young's Modulus (MPa)	靱性 Toughness (mJ/m ³)
対照群	0	82.74 $\pm$ 3.95	1752.36 $\pm$ 270.17	3.53 $\pm$ 0.53
ED-71	0.015	89.35 $\pm$ 5.67	2493.37 $\pm$ 275.85	2.71 $\pm$ 0.44
	0.05	88.54 $\pm$ 5.37	1890.42 $\pm$ 280.68	3.23 $\pm$ 0.48

各データは mean $\pm$ SE (n = 9~10), No significant difference among the groups by ANOVA。

(4.2.1.1-14, Table 1を改変)

2.6.2.2.6.2 仮骨リモデリングに及ぼす影響

(資料番号4.2.1.1-15)

骨折モデルラットを用いて，ED-71の仮骨リモデリングに及ぼす影響を検討した。仮骨リモデリングに対する影響は，骨折治癒過程時の層板骨形成及び骨形成速度を指標に評価した（参考資料）。

雌 SD ラット（8週齢）の骨折手術4週前から，ED-71（0.025，0.05 $\mu\text{g/kg/日}$ ，経口投与）及びアレンドロネート（ALN：5，10 $\mu\text{g/kg/日}$ ，皮下投与）の反復投与を行った。左大腿骨の骨折手術後に，引き続き ED-71及び ALN の16週間反復投与を行い，骨折6及び16週後に骨折面を含む大腿骨を摘出した。骨折治癒過程における仮骨部位での層板骨形成（Lamella/Callus Area (%)）及び骨形成速度（BFR/Callus Surface ($\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$)) を測定し，ED-71と ALN の影響を比較した。

ED-71は，骨折6週後において層板骨形成を抑制したが，骨折16週後においては0.05 $\mu\text{g/kg}$ 群であっても抑制作用をほとんど示さなかった（対照群99.2%に対し97.8%）。一方，ALN は，10 $\mu\text{g/kg}$ 投与群で58.4%となり，ED-71と比べて有意であった。また，骨形成速度は，骨折16週後において ED-71 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では0.142 $\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$ となり対照群よりも低値を示したが，ALN（10 $\mu\text{g/kg}$ 群：0.04 $\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$ ）に比べて抑制作用は弱かった（表 2.6.2.2.6.2-1）。

以上，ED-71の層板骨形成及び骨形成速度に対する作用は ALN に比べて有意に弱く，仮骨リモデリングに対する ED-71の抑制作用は ALN に比べて小さいことが示された。

表 2.6.2.2.6.2-1 仮骨リモデリング（層板骨形成，骨形成速度）に及ぼす影響

	対照群	ED-71 0.025 µg/kg	ED-71 0.05 µg/kg	ALN 5 µg/kg	ALN 10 µg/kg
骨折後6週目					
層板骨形成 Lamella/Callus Area (%)	56.6 ± 1.3	43.4 ± 2.3	35.2 ± 1.1	12 ± 0.9 ^{*,#}	11.2 ± 1.2 ^{*,#}
骨形成速度 BFR/Ca.S (mm ³ /mm ² /year)	0.235 ± 0.013	0.272 ± 0.040	0.282 ± 0.040	0.082 ± 0.016 ^{*,#}	0.036 ± 0.012 ^{*,#}
骨折後16週目					
層板骨形成 Lamella/Callus Area (%)	99.2 ± 0.3	98.5 ± 0.8	97.8 ± 0.7	78.8 ± 1.6 ^{*,#}	58.4 ± 3.4 ^{*,#}
骨形成速度 BFR/Ca.S (mm ³ /mm ² /year)	0.256 ± 0.026	0.266 ± 0.069	0.142 ± 0.030	0.09 ± 0.016 [*]	0.04 ± 0.004 [*]

各データは mean ± SE, ^{*} P < 0.05 v.s. ED-71 (0.025 µg/kg), [#] P < 0.05 v.s. ED-71 (0.05 µg/kg)
(Fisher's projected least significant difference)。

(4.2.1.1-15, Table 4を改変)

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当無し。

2.6.2.4 安全性薬理試験

一般薬理試験として、中枢神経系、心血管系、呼吸系、腎/泌尿器系、胃腸管系、及び平滑筋に及ぼす影響を検討した。これらの一般薬理試験は、hERG チャネル試験を除き、19年10月～19年2月に実施した。そのため、これらの試験については安全性薬理試験ガイドライン（平成13（2001）年6月21日医薬審発第902号）に沿っておらず、一般薬理試験（非 GLP）として実施されている。hERG チャネル試験については20年に GLP に従って実施した。

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

(1) マウスの一般症状に及ぼす影響（Irwin の多元観察法）

(資料番号4.2.1.3-1)

雄 ddY マウス（一群3例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 µg/kg）を単回経口投与した。対照群には、溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。投与8時間後まで Irwin の多元観察法に準じて、マウスの一般症状及び行動を観察した。観察は投与1時間後までは連続的に行い、その後は1時間ごとに8時間後まで間歇的に行った。

ED-71はいずれの用量においても、投与直後から8時間後までマウスの一般症状及び行動に影響を及ぼさなかった。

(2) マウスの自発運動に及ぼす影響（ANIMEX 法）

(資料番号4.2.1.3-2)

一夜絶食させた雄 ddY マウス（一群8例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 µg/kg）を単回経口投与した。対照群には、溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。投与3及び5時間後に10分間自発運動量を測定した。

ED-71はいずれの用量においても、投与3及び5時間後の自発運動量に影響を与えなかった。

(3) マウスの正常体温に及ぼす影響（直腸法）

(資料番号4.2.1.3-2)

一夜絶食させた雄 ddY マウス（一群8例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 $\mu\text{g/kg}$ ）を単回経口投与した。対照群には，溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。投与3及び5時間後に直腸温を測定した。

ED-71はいずれの用量においても，投与3及び5時間後の正常体温に影響を及ぼさなかった。

(4) マウスのヘキソバルビタール睡眠に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-3)

雄 ddY マウス（一群8例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 $\mu\text{g/kg}$ ）を単回経口投与した。対照群には，溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。投与3及び5時間後にヘキソバルビタール（100 mg/kg）を腹腔内投与し，正向反射の消失から回復までの時間を測定した。

ED-71はいずれの用量においても，投与3及び5時間後のヘキソバルビタール睡眠に影響を及ぼさなかった。

(5) マウスの電撃刺激痙攣に及ぼす影響（最大電撃痙攣法）

(資料番号4.2.1.3-3)

雄 ddY マウス（一群8例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 $\mu\text{g/kg}$ ）を単回経口投与した。対照群には，溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。投与3及び5時間後に角膜通電（40 mA，0.5 msec，50 Hz，1 sec）を加え，強直性痙攣の有無を観察した。

対照群及び ED-71の強直性痙攣発現率はいずれの用量においても100%であり，ED-71の抗痙攣作用は認められなかった。

(6) ラットの疼痛閾値に及ぼす影響（鎮痛試験：Randall-Selitto 法）

(資料番号4.2.1.3-3)

雄 SD ラット（一群8例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 $\mu\text{g/kg}$ ）を単回経口投与した。対照群には，溶媒（0.25% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。投与3及び5時間後にラット後肢に圧刺激を加え，疼痛閾値を測定した。

ED-71はいずれの用量においても，投与3及び5時間後の疼痛閾値に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

(1) 麻酔イヌの血圧，心拍数，左心室内圧，左心室内圧最大上昇速度，血流量，総末梢血管抵抗，及び心電図に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-4)

雄ビーグル犬（一群4例，12カ月齢）を sodium pentobarbital（35 mg/kg，静脈内投与）により麻酔し，気管チューブを挿入後に固定した。麻酔を sodium pentobarbital（6 mg/kg/hour，静脈内投与）により維持し，その後，ED-71（0.04，0.2，1 $\mu\text{g/kg}$ ）を橈側皮静脈から単回静脈内投与した。対照群には，溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有生理食塩液）のみを同様に投与した。薬物投与前と投与1，3，5，10，20，30分後に平均血圧，心拍数，左心室内圧，左心室内圧最大上昇速度，大動脈血流量，総末梢血管抵抗，腎血流量，腎血管抵抗，大腿動脈血流量，大腿動脈血管抵抗，及び心電図を測定した。

ED-71はいずれの用量においても、平均血圧、心拍数、左心室内圧、左心室内圧最大上昇速度、大動脈血流量、総末梢血管抵抗、腎血流量、腎血管抵抗、大腿動脈血流量、大腿動脈血管抵抗、及び心電図に影響を及ぼさなかった。

(2) hERG チャンネルに及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-5)

hERG チャンネル強制発現 CHO 細胞を用いて、hERG チャンネルに対する ED-71の作用を検討した。ED-71の濃度は0.1～3.13 $\mu\text{mol/L}$ とし、陽性対照薬物として hERG チャンネル阻害薬 E-4031 (0.3 $\mu\text{mol/L}$) を用いた。 K^+ 電流はパッチクランプ法により測定した。

ED-71は hERG チャンネルを介した K^+ 電流を濃度依存的に阻害し IC_{20} 値は2.84 $\mu\text{mol/L}$ であった。この IC_{20} 値は臨床推奨用量 (0.75 $\mu\text{g}/\text{日}$, 経口投与) を投与したヒトの C_{max} 値9.3 pg/mL (18.9 pmol/L) [ヒト蛋白質結合率96.2%を考慮して、ヒト C_{max} 値243.5 pg/mL (2.7.2.2.2.7(3)2)) からフリー体濃度を算出] の150000倍以上であった。

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響

麻酔イヌの呼吸数に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-4)

雄ビーグル犬 (一群4例, 12カ月齢) を sodium pentobarbital (35 mg/kg , 静脈内投与) により麻酔し、気管チューブを挿入後に固定した。麻酔を sodium pentobarbital (6 mg/kg/hour , 静脈内投与) により維持し、その後、ED-71 (0.04, 0.2, 1 $\mu\text{g/kg}$) を橈側皮静脈より単回静脈内投与した。対照群には、溶媒 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有生理食塩液) のみを同様に投与した。薬物投与前と投与1, 3, 5, 10, 20, 30分後に呼吸数を測定した。

ED-71はいずれの用量においても、呼吸数に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.4 腎/泌尿器系に及ぼす影響

ラットの腎機能に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-6)

雄 SD ラット (一群8例, 7週齢) は実験前日より一夜絶食させ、実験中は絶食・絶水とした。強制排尿したラットに ED-71 (0.04, 0.2, 1 $\mu\text{g/kg}$) を単回経口投与し、薬物投与後に生理食塩水 (2 $\text{mL}/100 \text{ g}$) を経口投与し採尿を開始した。対照群には、溶媒 (0.25% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有蒸留水) 投与後に、生理食塩水を投与した。薬物投与6時間後に強制排尿により採尿を終了した。採取した尿について、尿量、尿 pH, 尿浸透圧、尿中 Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , 及び無機リン (IP) 排泄量を求めた。

ED-71はいずれの用量においても、尿量、尿 pH, 尿浸透圧、尿中 Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , 及び IP 排泄量に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.5 胃腸管系に及ぼす影響

マウスの胃腸管内輸送能に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-7)

一夜絶食させた雄 ddY マウス（一群8例，5週齢）に ED-71（0.04，0.2，1 $\mu\text{g/kg}$ ）を単回経口投与した。対照群には，溶媒（0.05% ethanol，0.1% ポリソルベート20含有蒸留水）のみを同様に投与した。薬物投与3あるいは5時間後に50% BaSO₄を経口投与（0.2 mL/head）し，BaSO₄投与30分後に小腸を摘出した。小腸全長と幽門部から BaSO₄移動先端部までの距離を測定して，小腸全長に対する BaSO₄の移動率（%）を算出した。

ED-71はいずれの用量においても，投与3及び5時間後の小腸 BaSO₄輸送に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.6 平滑筋に及ぼす影響

(1) モルモット摘出回腸の自発収縮に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-8)

実験はモルモット摘出回腸標本を栄養液（118 mM NaCl，4.7 mM KCl，2.5 mM CaCl₂，1.2 mM KH₂PO₄，1.2 mM MgSO₄，25 mM NaHCO₃，10 mM glucose を含む Krebs-Henseleit 液）に30分以上放置し，自発収縮の安定性を確認した後に実施した。自発収縮が安定化した回腸標本に，ED-71（ 1×10^{-9} ， 3×10^{-9} ， 1×10^{-8} g/mL）を累積添加し，本薬の自発収縮に及ぼす影響を検討した。

ED-71はいずれの濃度においても，摘出回腸標本の自発収縮に影響を及ぼさなかった。

(2) モルモット摘出回腸縦走筋の収縮反応に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-8)

実験はモルモット摘出回腸縦走筋標本に acetylcholine（ 3×10^{-6} M），histamine（ 3×10^{-6} M）あるいは BaCl₂（ 1×10^{-3} M）の各収縮薬を適用し，それぞれの薬物による収縮反応が安定した後に実施した。各収縮薬を適用し対照とする収縮を得た後，ED-71を約3分間適用した状態で再び収縮薬を与えた。ED-71（ 1×10^{-9} ， 3×10^{-9} ， 1×10^{-8} g/mL）は低濃度から順次適用した。ED-71添加前の収縮高を100%として，ED-71添加後の収縮率を算出した。

ED-71はいずれの濃度においても，回腸縦走筋の acetylcholine，histamine あるいは BaCl₂刺激収縮に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当無し。

2.6.2.6 考察及び結論

ED-71の活性型ビタミン D₃製剤としての薬理学的特性については *in vitro* 試験及びラット *in vivo* 試験（経口投与）から，骨密度及び骨強度改善効果についてはラット及びサルの骨粗鬆症モデル動物（経口投与）を用いて検討した。

In vitro 試験において，ED-71はヒト VDR に結合し（IC₅₀：9.8 nmo/L），ヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63及びヒト腸管様細胞株 Caco-2の VDRE を介した転写活性をそれぞれ EC₅₀値8.2及び1.2 nmol/Lで促進した。ヒト破骨前駆細胞に対し，ED-71は10及び100 nmo/Lで破骨細胞形成を有意に抑制した。これらの *in vitro* 試験での ED-71の VDR 結合能及び VDRE を介した転写活性促進能は1 α ,25(OH)₂D₃と同程度であり，ED-71は VDR を介して標的組織の蛋白発現を制御して

いると推定された。

腸管からの Ca 吸収において、ED-71 (1 µg/kg) は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1 µg/kg) と同様にラット腸管の Ca 透過を有意に促進した。また、ED-71 (0.025~0.1 µg/kg/日) は、ラットの血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量を有意に増加させた。クル病ラットモデルでは、ED-71 (0.4 µg/kg/日) の抗クル病作用が確認された。

活性型ビタミン D_3 は薬理学的特性として、VDR 結合能、VDRE を介した転写活性促進能、破骨細胞形成抑制活性、血清 Ca 濃度増加作用、抗クル病作用などを示すことが知られている。*In vitro* 及びラットを用いた *in vivo* 試験での検討結果から、ED-71 は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と同様の薬理学的特性を有することが明らかとなり、本薬は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と同様な作用機序で骨に作用するものと推定された。

ED-71 の骨粗鬆症モデルにおける骨量増加効果を、OVX 直後から投与を開始する予防系ラットモデル及び OVX により既に骨量が減少した時点 (OVX から 15 週後) から投与を開始する治療系ラットモデルを用いて検討した結果、ED-71 (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg/日) の週 5 回、6 カ月間経口投与は、腰椎 (L_{2-5}) 及び大腿骨の両骨密度を、予防系モデルでは 0.01 µg/kg 以上、治療系モデルでは 0.02 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意に増加させた。骨強度においても、腰椎 (L_5) 及び大腿骨の両骨強度は、予防系では 0.02 µg/kg 以上、治療系では 0.04 µg/kg で OVX 対照群に比べて有意に増加した。

骨粗鬆症モデル動物 (OVX ラット) での 4 週間反復投与試験において、ED-71 (0.03 µg/kg/日) 及び活性型ビタミン D_3 製剤の ALF (0.075 µg/kg/日) はともに腰椎 (L_{2-5}) 及び大腿骨の骨密度を増加させたが、その効力は ED-71 の方が ALF に比べて有意に高かった。骨吸収マーカー (尿中 DPD) の低下作用でも、ED-71 の方が ALF に比べて有意に高かった。

骨粗鬆症モデリング動物として知られている OVX ラットの 12 カ月間反復投与試験では、ED-71 (0.0075, 0.015, 0.03 µg/kg/日) は、すべての用量で投与 12 カ月後の腰椎 (L_{2-5}) の骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させるとともに、大腿骨の骨密度も 0.015 及び 0.035 µg/kg で有意に増加させた。腰椎 (L_4) 及び大腿骨骨強度でも、最高用量の 0.03 µg/kg は投与 12 カ月後の剛性及び最大負荷を有意に増加させた。腰椎 (L_3) の骨組織を検討した結果から、ED-71 は OVX によって亢進した骨代謝回転を抑制することが示された。骨代謝マーカーにおいては、ED-71 投与による骨形成マーカー (血清 ALP) に対する有意な作用は認められなかったが、試験に用いたすべての用量で OVX によって亢進した骨吸収マーカー (尿中 DPD) を有意に低下させた。

骨粗鬆症リモデリング動物として知られている OVX サルの 16 カ月間反復投与試験では、ED-71 は最高用量 (0.07 µg/kg/日) で投与 6 カ月後の腰椎 (L_{1-4}) 骨密度、及び投与 6, 11 カ月後の大腿骨骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。投与 16 カ月後では骨密度に有意な増加効果はみられなかったが、ED-71 を 16 カ月間投与した後でも骨強度を低下させる等の悪影響は認められなかった。骨代謝マーカーにおいて、ED-71 は最高用量の 0.07 µg/kg で投与 3 カ月後の骨吸収マーカー (血清 CTX)、及び投与 6 カ月後の骨形成マーカー (血清 BAP) を OVX 対照群に比べて有意に低下させた。

活性型ビタミン D_3 及びその誘導体は OVX によって亢進した骨粗鬆症モデル動物の骨代謝回転を抑制することにより、骨量を増加させることが知られている^{4),5)}。骨粗鬆症モデリング動物及び骨粗鬆症リモデリング動物での検討結果から、ED-71 も活性型ビタミン D_3 と同様に OVX によって亢進した骨代謝回転を抑制することにより骨密度及び骨強度を改善することが推定された。

骨折モデルラット試験において、ED-71 (0.015, 0.05 µg/kg/日) 投与群と vehicle 投与群の骨折部位の形状、力学的強度及び固有材料特性値を比較したところ、両者の間に有意な差は認められなかった。これらのことから、ED-71 は骨折治癒過程時に治癒遅延等の悪影響を与えない

ことが示された。また、骨折モデルラットの層板骨形成及び仮骨面での骨形成速度を指標に、ED-71 (0.025, 0.05 µg/kg/日) と ALN (5, 10 µg/kg/日, 皮下投与) の仮骨リモデリングに対する影響を比較した試験では、ED-71の仮骨リモデリングに対する抑制作用は ALN に比べて有意に弱いことが示された。

安全性薬理試験からは、hERG 試験において ED-71が K⁺電流を阻害することが示されたが、その IC₂₀値2.84 µmol/L は臨床推奨用量 (0.75 µg/日 p.o.) を投与したヒトの C_{max} 値9.3 pg/mL (18.9 pmol/L) [ヒト蛋白質結合率96.2%を考慮して、ヒト C_{max} 値 243.5 pg/mL (2.7.2.2.2.7(3)2)) からフリー体濃度を算出] の150000倍以上であり、臨床において本薬が心臓の刺激伝達系に重篤な副作用を発現させる可能性は低いと考えられた。その他の中枢系、心血管系、呼吸系、腎/泌尿器系及び胃腸管系等において、ED-71の影響は認められなかった。

以上、非臨床薬理試験成績から、ED-71が骨粗鬆症モデル動物に対して骨密度及び骨強度改善効果を有することが示された。臨床においても、ED-71は骨粗鬆症治療薬として優れた効果を示すことが期待された。

2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

- 1) 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」医薬審発第742号，平成11年4月15日
- 2) Wecksler WR, Norman AW. An hydroxylapatite batch assay for the quantitation of 1α,25-dihydroxyvitamin D₃-receptor complexes. Anal Biochem 1979;92:314-23.
- 3) 後藤康雅. 実験方法シリーズ：Ussing chamber を用いた化合物の膜透過性評価実験，Drug Metab Pharmacokinet 2007; 22(1):ニュースレター19-24.
- 4) Erben RG, Mosekilde L, Thomsen JS, Weber K, Stahr K, Leyshon A, et al. Prevention of bone loss in ovariectomized rats by combined treatment with risedronate and 1α,25-dihydroxyvitamin D₃. J Bone Miner Res 2002;17:1498-511.
- 5) Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, et al. ED-71, a vitamin D analog, is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. Bone 2002;30:582-8.

エディロールカプセル0.5 µg
エディロールカプセル0.75 µg
(エルデカルシトール)
[骨粗鬆症]

第2部 (モジュール 2)
CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英語名	和名
ALF	Alfacalcidol	アルファカルシドール
ALN	Alendronate	アレンドロネート；アレンドロン酸ナトリウム水和物
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
BAP	Bone-specific alkaline phosphatase	骨型アルカリホスファターゼ
BFR	Bone Formation Rate	骨形成速度
BS	Bone Surface	単位骨梁面
CHO細胞	Chinese hamster ovary細胞	チャイニーズハムスター卵巣細胞
CTX	Type I collagen cross-linked C-telopeptide	I型コラーゲン架橋C-テロペプチド
DPD	Deoxyypyridinoline	デオキシピリジノリン
EC ₅₀	50% effective concentration	50%有効濃度
hERG	human ether-a-go-go-related gene	—
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
i.v.	Intravenous	静脈内
NTX	Type I collagen cross-linked N-telopeptide	I型コラーゲン架橋N-テロペプチド
rhVDR	recombinant human Vitamin D receptor	リコンビナントヒトビタミンD受容体
VDR	Vitamin D receptor	ビタミンD受容体
VDRE	Vitamin D Responsive Element	ビタミンD応答配列
OVX	Ovariectomized	卵巣摘出
1 α , 25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxycholecalciferol	活性型ビタミンD ₃
p.o.	per os	経口
s.c.	Subcutaneous	皮下

目次

	頁
2.6.3 薬理試験概要表	4
2.6.3.1 効力を裏付ける試験一覧表	4
2.6.3.2 副次的薬理試験一覧表	6
2.6.3.3 安全性薬理試験一覧表	7
2.6.3.4 薬力学的相互作用試験一覧表	8
2.6.3.5 効力を裏付ける試験	9
2.6.3.5.1 活性型ビタミン D ₃ 作用	9
2.6.3.5.2 骨量増加効果	11
2.6.3.5.3 ALF との効力比較	12
2.6.3.5.4 骨粗鬆症モデリング動物 (OVX ラット) の骨量減少に対する効果	13
2.6.3.5.5 骨粗鬆症リモデリング動物 (OVX サル) の骨量減少に対する効果	15
2.6.3.5.6 骨折モデルラットの骨折治癒過程に及ぼす影響	17
2.6.3.6 副次的薬理試験	17
2.6.3.7 安全性薬理試験 (GLP 試験として実施した「hERG チャンネルに及ぼす影響」試験を除き、一般薬理試験として実施)	18
2.6.3.7.1 中枢神経系に及ぼす影響	18
2.6.3.7.2 心血管系に及ぼす影響	19
2.6.3.7.3 呼吸系に及ぼす影響	19
2.6.3.7.4 腎/泌尿器系に及ぼす影響	20
2.6.3.7.5 胃腸管系に及ぼす影響	20
2.6.3.7.6 平滑筋に及ぼす影響	21
2.6.3.8 薬力学的薬物相互作用試験	21

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 効力を裏付ける試験一覧表

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法	実施施設	試験番号	記載箇所 (資料番号)
活性型ビタミンD₃作用					
ビタミンD受容体（VDR）に対する結合能	リコンビナントヒトVDR（rhVDR）	<i>in vitro</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0009	4.2.1.1-1
ビタミンD応答配列（VDRE：Vitamin D Responsive Element）を介した転写活性促進能	ヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63，ヒト腸管様細胞株 Caco-2	<i>in vitro</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0050	4.2.1.1-2
破骨細胞形成抑制活性	ヒト破骨前駆細胞	<i>in vitro</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0253	4.2.1.1-3
腸管からのCa吸収促進作用	SDラット摘出腸管	<i>ex vivo</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0088	4.2.1.1-4
血清Ca濃度及び尿中Ca排泄量に及ぼす影響	SDラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	実X*-777	4.2.1.1-5
抗クル病作用	クル病ラットモデル	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0163	4.2.1.1-6

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

効力を裏付ける試験一覧表（続）

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法	実施施設	試験番号	記載箇所 (資料番号)
骨量増加効果					
予防系モデルに対する効果	卵巣摘出（OVX）ラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	実X*-0778	4.2.1.1-9
治療系モデルに対する効果	OVX ラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	実X*-0778	4.2.1.1-9
アルファカルシドール（ALF）との効力比較					
ALF との効力比較のための用量設定試験	OVX ラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0252	4.2.1.1-7
ALF との効力比較	OVX ラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0215	4.2.1.1-8
骨粗鬆症モデリング動物（OVX ラット）の骨量減少に対する効果					
OVX ラットを用いた薬効評価のための用量設定	OVX ラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	実X*-0778	4.2.1.1-9
OVX ラットに対する効果（GLP 適用試験）*	OVX ラット	<i>in vivo</i>		PN670124	4.2.1.1-10

* 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に従って実施。

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

効力を裏付ける試験一覧表（続）

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法	実施施設	試験番号	記載箇所 (資料番号)
骨粗鬆症リモデリング動物（OVX サル）の骨量減少に対する効果					
OVX サルを用いた薬効評価のための用量設定試験（Ⅰ）（GLP 適用試験）	OVX サル	<i>in vivo</i>	■■■■■	PN89803	4.2.1.1-11
OVX サルを用いた薬効評価のための用量設定試験（Ⅱ）（GLP 適用試験）	OVX サル	<i>in vivo</i>	■■■■■	PN800319	4.2.1.1-12
OVX サルに対する効果（GLP 適用試験）*	OVX サル	<i>in vivo</i>	■■■■■	PN77321	4.2.1.1-13
骨折モデルラットの骨折治癒過程に及ぼす影響					
骨の形状、力学的強度及び固有材料特性値に及ぼす影響*	骨折モデルラット	<i>in vivo</i>	中外製薬株式会社	PHMX*-0103	4.2.1.1-14
仮骨リモデリングに及ぼす影響	骨折モデルラット	<i>in vivo</i>	■■■■■		4.2.1.1-15

* 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に従って実施。

2.6.3.2 副次的薬理試験一覧表

該当無し。

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.3 安全性薬理試験一覧表

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法	実施施設	試験番号	記載箇所 (資料番号)
安全性薬理試験（GLP 試験として実施した「hERG チャンネルに及ぼす影響」試験を除き、一般薬理試験として実施）					
中枢神経系に及ぼす影響					
マウスの一般症状に及ぼす影響（Irwin の多元観察法）	ddY マウス	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0050	4.2.1.3-1
マウスの自発運動に及ぼす影響（ANIMEX 法）	ddY マウス	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0015	4.2.1.3-2
マウスの正常体温に及ぼす影響（直腸法）	ddY マウス	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0015	4.2.1.3-2
マウスのヘキソバルビタール睡眠に及ぼす影響	ddY マウス	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0176	4.2.1.3-3
マウスの電撃刺激痙攣に及ぼす影響（最大電撃痙攣法）	ddY マウス	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0176	4.2.1.3-3
ラットの疼痛閾値に及ぼす影響（鎮痛試験：Randall-Selitto 法）	SD ラット	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0176	4.2.1.3-3
心血管系に及ぼす影響					
麻酔イヌの血圧、心拍数、左心室内圧、左心室内圧最大上昇速度、血流量、総末梢血管抵抗、及び心電図に及ぼす影響	ビーグル犬	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 静脈内投与	中外製薬株式会社	実X*-0086	4.2.1.3-4
hERG チャンネルに及ぼす影響（GLP 適用試験）	hERG 強制発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TOXx*-0052	4.2.1.3-5

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

安全性薬理試験一覧表（続）

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法	実施施設	試験番号	記載箇所 (資料番号)
呼吸系に及ぼす影響					
麻酔イヌの呼吸数に及ぼす影響	ビーグル犬	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0086	4.2.1.3-4
腎/泌尿器系に及ぼす影響					
ラットの腎機能に及ぼす影響	SD ラット	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0043	4.2.1.3-6
胃腸管系に及ぼす影響					
マウスの胃腸管内輸送能に及ぼす影響	ddY マウス	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg 経口投与	中外製薬株式会社	実X*-0051	4.2.1.3-7
平滑筋に及ぼす影響					
モルモット摘出回腸の自発収縮及び摘出回腸縦走筋の収縮反応に及ぼす影響	摘出モルモット回腸, 摘出モルモット回腸縦走筋	<i>in vitro</i>	中外製薬株式会社	実X*-0180	4.2.1.3-8

2.6.3.4 薬力学的相互作用試験一覧表

該当無し。

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.5 効力を裏付ける試験

2.6.3.5.1 活性型ビタミン D₃作用

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
VDR に対する結合能	rhVDR	<i>in vitro</i> ED-71, 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ (0.01～1000 nmol/L)	rhVDR と活性型ビタミン D₃の³H 標識体との結合に対する ED-71及び1α,25(OH)₂D₃の結合阻害活性 (IC₅₀) はそれぞれ9.8及び3.9 nmol/Lであった。	4.2.1.1-1 (PHMx*-0009)
VDRE を介した転写活性促進能	ヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63, ヒト腸管様細胞株 Caco-2	<i>in vitro</i> ED-71, 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ (0.01～1000 nmol/L)	<MG-63細胞> - ED-71及び1α,25(OH)₂D₃の VDRE を介した転写活性促進能 (50%有効濃度 (EC₅₀)) はそれぞれ8.2及び77 nmol/L であった。 <Caco-2細胞> - ED-71及び1α,25(OH)₂D₃の EC₅₀値はそれぞれ1.2及び0.2 nmol/L であった。	4.2.1.1-2 (PHMx*-0050)
破骨細胞形成抑制活性	ヒト破骨前駆細胞	<i>in vitro</i> ED-71 (0.1～100 nmol/L)	ED-71は濃度依存的に破骨細胞の形成を抑制し, 10及び100 nmol/L では有意な抑制作用を示した。	4.2.1.1-3 (PHMx*-0253)
腸管からの Ca 吸収促進作用	SD ラット (7週齢) を用いた Ussing chamber 法	ED-71 (0.1, 0.3, 1 μ g/kg) 又は 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ (1 μ g/kg) を単回経口投与	ED-71の投与量の増加に伴って Ca 吸収は促進され, 1 μg/kg では1α,25(OH)₂D₃と同様に有意な Ca 吸収促進が認められた。	4.2.1.1-4 (PHMx*-0088)

* ; 新薬承認情報提供時に置き換えた

活性型ビタミン D₃作用（続）

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に及ぼす影響	SD ラット (6週齢)	ED-71 (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 µg/kg/日) を12週間反復経口投与	• 最高用量の0.1 µg/kg では、投与2週後に血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量が vehicle 群に比べて有意に増加した。 • 0.05及び0.025 µg/kg では、投与12週後に血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量が有意に増加した。 • 0.01 µg/kg では、投与12週後に尿中 Ca 排泄量の有意な増加がみられたが、血清 Ca 濃度に有意な差は認められなかった。 • 0.005 µg/kg では、投与2週後、12週後いずれにおいても血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量に有意な差は認められなかった。 • 投与12週後の血清 Ca 濃度及び尿中 Ca 排泄量と血清中 ED-71濃度には正の相関が認められた。	4.2.1.1-5 (実x*-0777)
抗クル病作用	クル病ラットモデル	ED-71 (0.1, 0.2, 0.4 µg/kg/日) 又は1α,25(OH) ₂ D ₃ (5, 10, 20 µg/kg/日) を2週間反復経口投与	• ED-71は最高用量の0.4 µg/kg で骨端軟骨幅指数をクル病対照群に比べて有意に低下させた。また、ED-71はすべての用量で大腿骨遠位部骨密度を有意に増加させた。 • 1α,25(OH)₂D₃は骨密度を増加させなかったものの、骨端軟骨幅指数を減少させる傾向を示した。	4.2.1.1-6 (PHMx*-0163)

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.5.2 骨量増加効果

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
予防系モデル：OVX直後からED-71の投与を開始	OVX ラット (41週齢)	ED-71 (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg/日) を週5回, 6カ月間経口投与	- ED-71は用量依存的に腰椎 L₂₋₅ (第2腰椎 L₂から第5腰椎 L₅までの平均値) 及び大腿骨の骨密度を増加させ, 両部位共に0.01 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた。大腿骨骨幹部においても, 0.01 µg/kg 以上で有意な増加が認められた。 - ED-71投与群の腰椎 (L₅) 骨密度と骨強度の相関を検討した結果, 骨密度と骨強度の間には正の相関が認められた。大腿骨 (骨幹部) 骨密度と骨強度の間にも正の相関が認められた。 - ED-71のいずれの用量でも血清 Ca 濃度は Sham 対照群に比べて有意な増加を示さなかった。	4.2.1.1-9 (実x*-0778)
治療系モデル：OVX から15週後にED-71の投与を開始	OVX ラット (33週齢)	ED-71 (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg/日) を週5回, 6カ月間経口投与	- ED-71は腰椎 (L₂₋₅) 及び大腿骨の骨密度を増加させ, 両部位に0.02 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた。大腿骨骨幹部においても, 0.01 µg/kg 以上で有意な増加が認められた。 - ED-71投与群の腰椎 (L₅) 骨密度と骨強度の相関を検討した結果, 骨密度と骨強度の間には正の相関が認められた。大腿骨 (骨幹部) 骨密度と骨強度の間にも正の相関が認められた。 - ED-71のいずれの用量でも血清 Ca 濃度は Sham 対照群に比べて有意な増加を示さなかった。	4.2.1.1-9 (実x*-0778)

* ; 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.5.3 ALF との効力比較

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
ALF との効力比較のための用量設定試験	OVX ラット (35～36週齢)	ED-71 (0.0075, 0.015, 0.03 µg/kg/日) 又は ALF (0.01875, 0.0375, 0.075 µg/kg/日) を4週間反復経口投与	<骨密度に対する効果> - ED-71の最高用量0.03 µg/kg は、大腿骨骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。ALF は最高用量でも骨密度を有意に増加させなかった。 <血清 Ca 濃度に対する影響> - ED-71及び ALF 投与群の血清 Ca 濃度は、最高用量でも Sham 対照群と同程度であった。 - 以上の結果から、両薬の効力を比較する試験において検討した用量での最適用量は、ED-71 0.03 µg/kg/日、ALF 0.075 µg/kg/日と考えられた。	4.2.1.1-7 (PHMx*-0252)
ALF との効力比較	OVX ラット (33週齢)	ED-71 (0.03 µg/kg/日) 又は ALF (0.075 µg/kg/日) を4週間反復経口投与	<骨密度に対する効果> - ED-71及び ALF は共に OVX による腰椎 (L₂₋₃) 及び大腿骨骨密度の減少を有意に抑制したが、その効果は ALF に比べて ED-71が有意に強かった。 <骨吸収マーカーに対する作用> - ED-71及び ALF は共に骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン (DPD) 排泄量を有意に低下させたが、その作用も ALF に比べて ED-71が有意に強かった。	4.2.1.1-8 (PHMx*-0215)

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.5.4 骨粗鬆症モデリング動物（OVX ラット）の骨量減少に対する効果

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
OVX ラットを用いた薬効評価のための用量設定（骨量増加効果「予防系及び治療系モデル」を検討した試験と同じ試験 (2.6.3.5.2))	OVX ラット (予防系モデル41週齢, 治療系モデル33週齢)	ED-71 (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg/日) を週5回, 6カ月間反復経口投与	<骨密度に対する効果> - 予防系及び治療系モデルにおいて, ED-71の最高用量0.04及び0.02 µg/kg は大腿骨骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。 <血清 Ca 濃度に対する影響> - 予防系及び治療系の両モデルにおいて, ED-71のいずれの用量でも血清 Ca 濃度は Sham 対照群に比べて有意な増加を示さなかった。 - 以上の結果から, より投与期間が長い12カ月間投与試験の場合に ED-71の至適用量は0.02 µg/kg 付近であると推定された。	4.2.1.1-9 (実x*-0778)
OVX ラットに対する効果 (GLP 適用試験) *	OVX ラット (約6カ月齢)	ED-71 (0.0075, 0.015, 0.03 µg/kg/日) を12カ月間反復経口投与	<骨密度に対する効果> - 投与12カ月後の腰椎 (L₂₋₅) において, ED-71はすべての用量で腰椎骨密度を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。大腿骨でも, 0.015及び0.03 µg/kg で骨密度の有意な増加が認められた。 <骨強度 (剛性, 最大負荷, 吸収エネルギー) に対する効果> - 腰椎 (L₄) の剛性において, ED-71の0.015 µg/kg 以上で OVX 対照群に比べて有意な増加が認められた。最高用量の0.03 µg/kg では, 剛性に加えて最大負荷及び吸収エネルギーにも有意な増加が認められた。大腿骨でも, ED-71は0.015 µg/kg 以上で剛性及び最大負荷を OVX 対照群に比べて有意に増加させた。	4.2.1.1-10 (PN670124)

* 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に従って実施。

* ; 新薬承認情報提供時に置き換えた

骨粗鬆症モデリング動物（OVX ラット）の骨量減少に対する効果（続）

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
OVX ラットに対する効果（GLP 適用試験）*	OVX ラット (約6カ月齢)	ED-71 (0.0075, 0.015, 0.03 µg/kg/日) を12カ月間 反復経口投与	<骨密度と骨強度の相関> - OVX 対照群, ED-71投与群, 両群のデータを併せて, 腰椎 (L₄) 及び大腿骨骨密度と骨強度との関係を検討したところ, 正の相関が認められた。 <骨代謝マーカーに対する作用> - 骨形成マーカー (血清アルカリホスファターゼ : ALP) に有意な差はみられなかったが, ED-71はすべての用量で投与12カ月後の骨吸収マーカー (尿中 DPD) を OVX 対照群に比べて有意に低下させた。 <骨組織に対する影響> - 腰椎 (L₃) の骨吸収パラメータ (破骨細胞面, 破骨細胞数) において, 最高用量の0.03 µg/kg で OVX 対照群に比べて有意な低下が認められた。 - 骨形成パラメータ (骨形成速度) では, 0.015及び0.03 µg/kg で OVX 対照群に比べて有意な低下が認められた。 - 骨代謝回転パラメータ (骨単位活性化率) は, いずれの用量でも Sham 対照群以下には低下しなかった。 <血清 Ca 濃度に対する影響> - 最高用量0.03 µg/kg では, 投与3, 6, 12カ月後の血清 Ca 濃度が OVX 対照群に比べて有意に増加した。0.015 µg/kg でも, 投与6, 12カ月後の血清 Ca 濃度の有意な増加が認められた。しかし, 0.03及び0.015 µg/kg 投与群の血清 Ca 濃度と Sham 対照群の Ca 濃度との間には有意な差は認められなかった。	4.2.1.1-10 (PN670124)

* 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に従って実施。

2.6.3.5.5 骨粗鬆症リモデリング動物（OVX サル）の骨量減少に対する効果

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
OVX サルを用いた薬効評価のための用量設定試験（Ⅰ）（GLP 適用試験）	OVX サル (9歳齢以上)	ED-71 (0.3, 0.75, 1.5 µg/kg/日) を26週間反復経口投与（高 Ca 血症が観察されたため、ED-71 の投与は投与13あるいは23週後に終了）	- 腰椎（L₁₋₄）及び大腿骨（近位部）骨密度、並びに腰椎（L₃）骨強度（最大負荷）において、最低用量の0.3 µg/kg はこれらのレベルを OVX 対照群に比べて有意に増加させた。 - OVX 対照群及び ED-71 の0.3 µg/kg 投与群の腰椎（L₃）骨密度と骨強度との間には正の相関が認められた。大腿骨骨密度と骨強度との間にも正の相関が認められた。 - 血清 Ca 濃度においては、いずれの用量でも高 Ca 血症が認められた。 - 以上の結果から、投与期間が18週以上の場合に ED-71 の至適用量は 0.3 µg/kg 以下であると考えられた。	4.2.1.1-11 (PN89803)
OVX サルを用いた薬効評価のための用量設定試験（Ⅱ）（GLP 適用試験）	OVX サル (9歳齢以上)	ED-71 (0.01, 0.03, 0.1 µg/kg/日) を26週間反復経口投与	- 腰椎（L₁₋₄）骨密度及び腰椎（L₃）骨強度（剛性）において、最高用量の0.1 µg/kg はこれらのレベルを OVX 対照群に比べて有意に増加させた。 - OVX 対照及び ED-71 (0.03, 0.1 µg/kg) 投与群のデータを併せて、腰椎（L₃）及び大腿骨骨密度と骨強度との関係を検討したところ、正の相関が認められた。 - 骨形成マーカー（血清骨型アルカリホスファターゼ：BAP）及び骨吸収マーカー（血清Ⅰ型コラーゲン架橋 C-テロペプチド：CTX, 尿中Ⅰ型コラーゲン架橋 N-テロペプチド：NTX）において、最高用量の0.1 µg/kg はこれらのレベルを OVX 対照群に比べて有意に低下させた。 - 血清 Ca 濃度では、ED-71投与群と OVX 対照群との間に有意な差は認められなかった。最高用量の0.1 µg/kg では血清 Ca 濃度が3回連続で11.0 mg/dL 以上になった個体が10例中2例みられ、内1例では12.3 mg/dL に達した。 - 以上の結果から、投与期間が26週以上の場合に ED-71 の至適用量は 0.1 µg/kg よりも若干低い用量であると推定された。	4.2.1.1-12 (PN800319)

骨粗鬆症リモデリング動物（OVX サル）の骨量減少に対する効果（続）

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
OVX サルに対する効果 (GLP 適用試験)*	OVX サル (10～17歳齢)	ED-71 (0.0175, 0.035, 0.07 µg/kg/日) を16カ月間 反復経口投与	<骨密度に対する効果> - ED-71は OVX によって減少した腰椎 (L₁₋₄) 及び大腿骨 (近位部) の骨密度を増加させ、最高用量の0.07 µg/kg では投与6カ月後の腰椎骨密度、及び投与6, 11カ月後の大腿骨骨密度減少を有意に抑制した。投与16カ月後では有意な抑制効果はみられなかったが、0.07 µg/kg 群の腰椎及び大腿骨骨密度は共に OVX 対照群の骨密度を下回らなかった。 <骨強度に対する影響> - ED-71はいずれの用量でも腰椎 (L₃₋₄) 及び大腿骨の骨強度を増加させなかった。しかしながら、骨強度を低下させる等の悪影響は認められなかった。 <骨密度と骨強度の相関> - OVX 対照群, ED-71投与群, 両群のデータを併せて、腰椎 (L₃₋₄) 及び大腿骨骨密度と骨強度との関係を検討したところ、正の相関が認められた。 <骨代謝マーカーに対する作用> - 最高用量の0.07 µg/kg で、投与3カ月後の血清 CTX、及び投与6カ月後の血清 BAP が有意に低下した。 <骨組織（大腿骨）に対する影響> - 骨代謝回転パラメータ（骨単位活性化率）はいずれの用量でも Sham 対照群以下には低下せず、骨組織像でも ED-71による異常は認められなかった。 <血清 Ca 濃度に対する影響> - ED-71はいずれの用量でも、OVX 対照群と比べて血清 Ca 濃度に対して有意な差を示さなかった。	4.2.1.1-13 (PN77321)

* 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に従って実施。

2.6.3.5.6 骨折モデルラットの骨折治癒過程に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	試験系	試験方法/投与方法	結果	記載箇所 (試験番号)
骨の形状、力学的強度及び固有材料特性値に及ぼす影響*	骨折モデルラット (8週齢)	骨折手術前に ED-71 (0.015, 0.05 µg/kg/日) を4週間反復経口投与し、 骨折手術後に ED-71 (0.015, 0.05 µg/kg/日) を16週間反復経口投与	ED-71はいずれの用量でも、骨折部位の形状、力学的強度及び固有材料特性値に影響を与えなかった。	4.2.1.1-14 (PHMx*-0103)
仮骨リモデリングに及ぼす影響	骨折モデルラット (8週齢)	骨折手術前に ED-71 (0.025, 0.05 µg/kg/日 p.o.) 又はアレンドロネー ト (ALN : 5, 10 µg/kg/日 s.c.) を4週間反復投与 し、骨折手術後に ED-71 (0.025, 0.05 µg/kg/日 p.o.) 又は ALN (5, 10 µg/kg/日 s.c.) を16週間反 復投与	- ED-71 (0.025, 0.05 µg/kg/日) は層板骨形成 (Lamella/Callus Area (%)) を抑制したが、骨折16週後においては0.05 µg/kg 群であっても抑制作用をほとんど示さなかった (対照群99.2%に対し97.8%)。一方、ALN は、10 µg/kg 投与群で58.4%となり、ED-71よりも有意に強い抑制作用を示した。 - 骨形成速度 (BFR/BS) は、骨折16週後において ED-71 0.05 µg/kg 群では0.142 mm³/mm²/year となり対照群よりも低値を示したが、ALN (10 µg/kg 群 : 0.04 mm³/mm²/year) に比べて抑制作用は弱かった。 - 以上の結果から、仮骨リモデリングに対する ED-71の抑制作用はALN に比べて有意に少ないことが示された。	4.2.1.1-15

* 「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に従って実施。

2.6.3.6 副次的薬理試験

該当無し。

* ; 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.7 安全性薬理試験（GLP 試験として実施した「hERG チャンネルに及ぼす影響」試験を除き、一般薬理試験として実施）

2.6.3.7.1 中枢神経系に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	種系統	投与方法 (溶媒)	投与用量 又は 適用濃度	性別 (動物数/ 群)	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 (試験番号)
マウスの一般症状に及ぼす影響（Irwin の多元観察法）	ddY マウス	単回経口投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (3)	ED-71はいずれの用量においても投与直後から投与8時間後まで、一般症状及び行動に影響を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-1 (実x*-0050)
マウスの自発運動に及ぼす影響（ANIMEX 法）	ddY マウス	単回経口投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	ED-71はいずれの用量においても投与3及び5時間後の自発運動量に影響を及ぼさなかった	否	4.2.1.3-2 (実x*-0015)
マウスの正常体温に及ぼす影響（直腸法）	ddY マウス	単回経口投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	ED-71はいずれの用量においても投与3及び5時間後の正常体温に影響を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-2 (実x*-0015)
マウスのヘキソバルビタール睡眠に及ぼす影響	ddY マウス	単回経口投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	ED-71はいずれの用量においても投与3及び5時間後のヘキソバルビタール睡眠時間に影響を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-3 (実x*-0176)
マウスの電撃刺激痙攣に及ぼす影響（最大電撃痙攣法）	ddY マウス	単回経口投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	対照群の強直性痙攣の発現率は、100%であった。ED-71の強直性痙攣の発現率はいずれの用量でも100%であり抗痙攣作用は認められなかった。	否	4.2.1.3-3 (実x*-0176)
ラットの疼痛閾値に及ぼす影響（鎮痛試験：Randall-Selitto 法）	SD ラット	単回経口投与 (0.25% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	ED-71はいずれの用量においても投与3及び5時間後の痛覚閾値に影響を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-3 (実x*-0176)

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.7.2 心血管系に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	種系統	投与方法 (溶媒)	投与用量 又は 適用濃度	性別 (動物数/ 群)	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 (試験番号)
麻酔イヌの血圧，心拍数，左心室内圧，左心室内圧最大上昇速度，血流量，総末梢血管抵抗，及び心電図に及ぼす影響	ビーグル犬	単回静脈内投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg i.v.	雄 (4)	ED-71はいずれの用量においても投与30分後までの平均血圧，心拍数，左心室内圧，左心室内圧最大上昇速度，大動脈血流量，総末梢血管抵抗，腎血流量，腎血管抵抗，大腿動脈血流量，大腿動脈血管抵抗，及び心電図に影響を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-4 (実x*-0086)
hERG チャンネルに及ぼす影響	組換え型 hERG チャンネル発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i> 暴露	0.1～3.13 µmol/L	N/A	ED-71は hERG チャンネルを介した K ⁺ 電流を濃度依存的に阻害し，その IC ₂₀ 値は2.84 µmol/L であった。	適	4.2.1.3-5 (TOXX*-0052)

N/A：該当せず。

2.6.3.7.3 呼吸系に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	種系統	投与方法 (溶媒)	投与用量 又は 適用濃度	性別 (動物数/ 群)	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 (試験番号)
麻酔イヌの呼吸数に及ぼす影響	ビーグル犬	単回静脈内投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg i.v.	雄 (4)	ED-71はいずれの用量においても投与30分後までの呼吸数に影響を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-4 (実x*-0086)

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.7.4 腎/泌尿器系に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	種系統	投与方法 (溶媒)	投与用量 又は 適用濃度	性別 (動物数/ 群)	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 (試験番号)
ラットの腎機能に及ぼす影響	SD ラット	単回経口投与 (0.25% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	ED-71はいずれの用量においても投与6 時間後までの尿量, 尿 pH, 尿浸透 圧, 尿中 Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , 及び無 機リン (IP) 排泄量に影響を及ぼさな かった。	否	4.2.1.3-6 (実X*-0043)

2.6.3.7.5 胃腸管系に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	種系統	投与方法 (溶媒)	投与用量 又は 適用濃度	性別 (動物数/ 群)	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 (試験番号)
マウスの胃腸管内輸送 能に及ぼす影響	ddY マウス	単回経口投与 (0.05% ethanol, 0.1% ポリソルベート20含有 蒸留水)	0, 0.04, 0.2, 1 µg/kg p.o.	雄 (8)	ED-71はいずれの用量においても投与3 及び5時間後の胃腸管内輸送能に影響 を及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-7 (実X*-0051)

* ; 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.7.6 平滑筋に及ぼす影響

被験物質：ED-71

試験の種類	種系統	投与方法 (溶媒)	投与用量 又は 適用濃度	性別 (動物数/ 群)	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 (試験番号)
モルモット摘出回腸の 自発収縮及び摘出回腸 縦走筋の収縮反応に及 ぼす影響	摘出モルモ ット回腸， 摘出モルモ ット回腸縦 走筋	<i>in vitro</i> 暴露	$1 \times 10^{-9} \sim$ 1×10^{-8} g/mL	N/A	摘出回腸標本の自発収縮，摘出回腸縦 走筋標本における acetylcholine， histamine あるいは BaCl ₂ 刺激収縮に対 し，ED-71はいずれの濃度でも影響を 及ぼさなかった。	否	4.2.1.3-8 (実x*-0180)

N/A：該当せず。

2.6.3.8 薬力学的薬物相互作用試験

該当無し。

*；新薬承認情報提供時に置き換えた