カーバグル分散錠 200 mg

医薬品製造販売承認申請書　添付資料

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

株式会社ポーラファルマ

カーバグル分散錠 200 mg

医薬品製造販売承認申請書　添付資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6.1　緒　言

株式会社ポーラファルマ

目 次

2.6.1 緒言 3

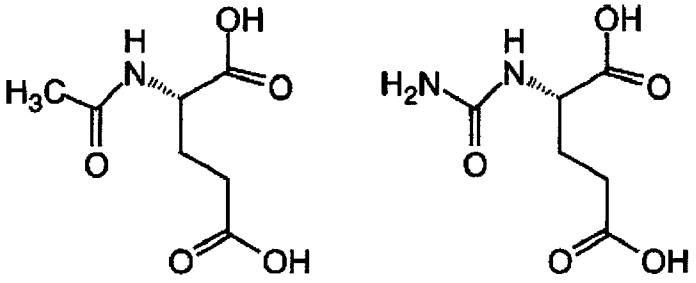
略語一覧表

略語	定義（英語）	定義（日本語）
CPS I	Carbamoyl phosphate synthetase I	カルバミルリン酸合成酵素 I
IVA	Isovaleric acidaemia	イソ吉草酸血症
MMA	Methylmalonic acidaemia	メチルマロン酸血症
NAGA	N-acetyl-L-glutamic acid	N-アセチル-L-グルタミン酸
NCGA	N-carbamoyl-L-glutamic acid	N-カルバミル-L-グルタミン酸
NAGS	N-acetylglutamate synthase	N-アセチルグルタミン酸合成酵素
PA	Propionic acidaemia	プロピオン酸血症

2.6.1 緒言

カルグルミン酸（N-carbamoyl-L-glutamic acid : NCGA）は、Carbaglu®（以下、本剤）の有効成分で、経口投与により、NAGS 欠損症あるいは MMA、PA 及び IVA の有機酸代謝異常症において欠損あるいは減少した NAGA に代わって CPS I を活性化し、尿素サイクルを始動あるいは活性化させることによって、蓄積したアンモニアを低減する。

カルグルミン酸の化学構造は NAGA と類似しており、その作用はいわゆる構造類似性（**図 1**）によるものと考えられる *(Caldovic 2003)*。



N-acetyl-L-glutamic acid(NAGA)　　N-carbamoyl-L-glutamic acid（カルグルミン酸）

図 1 NAGA 及びカルグルミン酸の化学構造 *(Caldovic 2003)*

本剤は、欧州において、2003 年に NAGS 欠損症による高アンモニア血症の、2011 年に MMA、PA 及び IVA による高アンモニア血症の治療薬として承認された。米国においては、2010 年に CPS I の活性化剤として、NAGS 欠損による急性高アンモニア血症に対する補助療法及び慢性高アンモニア血症に対する維持療法として承認された。

本剤について予定している効能・効果（案）及び用法・用量（案）を以下に示す。

1. 効能・効果

下記疾患による高アンモニア血症

- N-アセチルグルタミン酸合成酵素欠損症
- イソ吉草酸血症
- メチルマロン酸血症
- プロピオン酸血症、

2. 用法・用量

通常、1 日に体重 kg あたり 100 mg～250 mg より開始し、1 日 2～4 回に分けて、用時、水に分散して経口投与する。その後は患者の状態に応じて適宜増減する。

参考文献

Caldovic L and Tuchman M: N-Acetylglutamate and its changing role through evolution. Biochem.J. 2003; 372: 279-290.

カーバグル分散錠 200 mg

医薬品製造販売承認申請書　添付資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6.2　薬理試験の概要文

株式会社ポーラファルマ

目 次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.3 副次的薬理試験 13
2.6.2.4 安全性薬理試験 14
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 17
2.6.2.6 考察及び結論 17
2.6.2.7 図表 19

略語一覧表

略語	定義（英語）	定義（日本語）
ADP	Adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
APA	Action potential amplitude	活動電位幅
APD	Action potential duration	活動電位持続時間
APD50	APD of 50% repolarization	50%再分極時の活動電位持続時間
APD70	APD of 70% repolarization	70%再分極時の活動電位持続時間
APD90	APD of 90% repolarization	90%再分極時の活動電位持続時間
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
CMC	Carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロース
CPS I	Carbamoyl phosphate synthetase I	カルバミルリン酸合成酵素 I
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
IVA	Isovaleric acidaemia	イソ吉草酸血症
MMA	Methylmalonic acidaemia	メチルマロン酸血症
NAGA	N-acetyl-L-glutamic acid	N-アセチル-L-グルタミン酸
NCGA	N-carbamoyl-L-glutamic acid	N-カルバミル-L-グルタミン酸
NAGS	N-acetylglutamate synthase	N-アセチルグルタミン酸合成酵素
PA	Propionic acidaemia	プロピオン酸血症
V_{max}	Maximal rate of depolarization	最大立ち上がり速度

2.6.2 薬理試験の概要文

カルグルミン酸の薬理作用に関しては、Orphan Europe 社が開発に着手する十数年前からすでに臨床使用されていたことから、それまで使用されていた　　C*　　社製試薬及び　　A*　社提供品と Orphan Europe 社提供品（　　B*　社製）との *in vitro* CPS I 活性比較試験を実施した。効力を裏付ける *in vivo* の試験については、公表論文で評価した。

公表論文では、N-Carbamoyl-L-Glutamate あるいは N-carbamylglutamate と記載されているが、本資料では Orphan Europe 社提供以外については NCGA とし、原薬を意味するカルグルミン酸と区別した。

安全性薬理試験として、ラットを用いた中枢神経系試験（Irwin 行動観察と体温）、イヌを用いた *in vivo* 心血管系試験、摘出イヌプルキンエ線維を用いた *in vitro* 心血管系試験、ラットを用いた呼吸器系試験をコアバッテリー試験として実施した。

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

1. 作用機序

ラット肝の CPS I を用いた *in vitro* 試験において、カルグルミン酸は NAGA と同様に CPS I を活性化した。ミカエリス定数（K_M）は、カルグルミン酸及び NCGA で 1.18±0.06～1.67±0.11mM、NAGA で 0.097±0.013～0.11±0.01mM であった。*In vitro* における NAGA の CPS I 活性化作用は、カルグルミン酸及び NCGA の 12～15 倍であった。また、カルグルミン酸及び NCGA の活性に差はなかった。

2. 正常動物を用いた試験

(1) ラットにおける致死用量の酢酸アンモニウムに対する NCGA の作用

24 時間絶食したラット(SD 系)に NCGA 1mmol/kg 又は 4mmol/kg を腹腔内投与した 1 時間後に、致死用量($LD_{99.9}$)の酢酸アンモニウム 10.8mmol/kg を腹腔内投与し,30 分を超えて生存した数を評価した。比較対照群として、L-アルギニン 1mmol/kg 又は 4mmol/kg、NAGA 4mmol/kg、L-グルタミン酸 4mmol/kg を NCGA と同様に投与した。また、アンモニア毒性に対する保護作用が認められた NCGA 及び L-アルギニンに関しては、併用による効果を検討した。

その結果、NCGA 1mmol/kg群では61%（14/23匹）、4mmol/kg群では76%（29/38匹）が30分を超えて生存し、NCGAのアンモニア毒性に対する保護作用が認められた。同様に、L-アルギニン4mmol/kg群では85%（22/26匹）が30分を超えて生存し、アンモニア毒性に対する保護作用が認められた。一方、NAGA 4mmol/kg群では22%（7/32匹）が、L-アルギニン1mmol/kg群では24%（5/21匹）が、L-グルタミン酸4mmol/kg群では8%（1/13匹）が30分を超えて生存したに過ぎず、アンモニア毒性に対する保護作用は弱かった。また、NCGAとL-アルギニンの併用効果に関しては、生存率はL-アルギニン1mmol/kg＋NCGA 0.5mmol/kg群

＊新薬承認情報提供時に置き換えた

で89%（23/26匹）、L-アルギニン1 mmol/kg＋NCGA 1 mmol/kg群で100%（30/30匹）と高かった。

(2) 部分肝切除ラットにおける酢酸アンモニウム負荷後の血中アンモニア濃度に及ぼすNCGAの影響

ラット(SD系)の中間葉及び外側左葉を切除して、2/3部分肝切除ラットを作製した。切除13時間後、NCGA 1 mmol/kg又はL-アルギニン1 mmol/kgを腹腔内に投与し、その1時間後に酢酸アンモニウム3.4 mmol/kg（ラット致死用量の約1/3）を腹腔内に投与した。NCGA、L-アルギニン及び酢酸アンモニウムはいずれもリン酸緩衝液に溶解した。対照群にはリン酸緩衝液を投与した。酢酸アンモニウム投与30分後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血し血中アンモニア濃度を測定した。また、NCGAとL-アルギニンの併用効果も検討した。

その結果、対照群の血中アンモニア濃度415.72±166.38 μmol/L(n=11)に対して、NCGA 1 mmol/kg群は、278.09±60.02 μmol/L(n=11)と有意に低い血中アンモニア濃度を示した($p<0.05$)。L-アルギニン1 mmol/kg単独では血中アンモニア濃度に影響を示さなかったが、NCGA1 mmol/kgとの併用群は225.09±107.69 μmol/L（n=13）と有意に低い血中アンモニア濃度を示した（$p<0.01$）。

3. NAGS欠損（*Nags*$^{-/-}$）モデルマウスを用いた試験

生化学的処置（カルグルミン酸及びL-シトルリンの投与）により生存した雌雄6週齢の*Nags*$^{-/-}$マウスを用いて検討した。*Nags*$^{-/-}$マウスに水、カルグルミン酸水溶液、L-シトルリン水溶液及びカルグルミン酸とL-シトルリン併用水溶液をそれぞれ摂取させた。カルグルミン酸及びL-シトルリンの濃度は、それぞれ約150 mg/kg/日の投与量になるように調製した。

無処置対照群（水摂取のみ）では24時間以内に全例が死亡し、L-シトルリン水溶液を摂取した群では、24～48時間以内に全例が死亡した。カルグルミン酸水溶液及びカルグルミン酸とL-シトルリン併用水溶液を摂取した群での14日の時点の生存率はそれぞれ50%及び89%であった。また、カルグルミン酸水溶液群及びカルグルミン酸とL-シトルリン併用水溶液群は30日を超えて生存した。

生化学的処置（カルグルミン酸及びL-シトルリンの投与）で生存した生後2カ月の*Nags*$^{-/-}$マウスに対する生化学的処置を中止し、重篤な高アンモニア血症の症状（嗜眠、けいれん、横臥、除脳姿勢）が発現した時点で屠殺し、血漿中のアンモニア濃度を測定した。生化学的処置を中止した全ての*Nags*$^{-/-}$マウスは、10～28時間の間に重篤な高アンモニア血症の症状を発現した。

Nags$^{+/+}$マウス、*Nags*$^{+/-}$マウス、カルグルミン酸処置*Nags*$^{-/-}$マウス及びカルグルミン酸+L-シトルリン処置*Nags*$^{-/-}$マウスの血漿中アンモニア濃度に有意な差は認められなかったが、生化学的処置を中止後、無処置の*Nags*$^{-/-}$マウスの血漿中アンモニア濃度は他の群に比べ有意に高く($p<0.0001$)、約10倍の濃度を示した。カルグルミン酸はNAGS欠損モデルマウスにお

いて、血漿中アンモニア濃度を正常マウスのレベルにまで抑制していること示した。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

1. 中枢神経系に対する影響

Irwin 行動観察及び体温により、雌雄ラットの中枢神経系に対するカルグルミン酸（250、500 及び 1000 mg/kg）の単回経口投与の影響を、溶媒対照群及び陽性対照群（クロニジン：3 mg/kg 単回経口投与）と比較検討した。

カルグルミン酸は雌雄ラットへの 250、500 及び 1000 mg/kg 単回経口投与で有意な神経行動、自律神経、神経毒性及び向精神作用を示さず、体温低下も示さなかった。一方、陽性対照のクロジニンは同一条件下で典型的な鎮静と自律神経作用を示し、体温低下も示した。

2. 心血管系に対する影響

(1) 覚醒イヌにおける単回経口投与後の血圧、心拍数及び心電図に対する影響

覚醒イヌの血圧、心拍数及び心電図に対するカルグルミン酸（250、500 及び 1000 mg/kg）の単回経口投与の影響を、溶媒対照群と比較検討した。

カルグルミン酸の250、500及び1000 mg/kg単回経口投与において、血圧、心電図PR間隔、QT間隔あるいはQRS持続時間に有意な作用を示さなかったが、250 mg/kg投与でのみ心拍数の有意な減少が認められた。この心拍数の変化は投与後20時間と24時間において認められたが、500と1000 mg/kgの高用量において確認できなかったことから、カルグルミン酸の作用によるものではないと考えられた。

カルグルミン酸の250、500及び1000 mg/kg単回経口投与において、心電図(第II誘導)及びT波には変化を示さず、その他の6誘導（I、II、III、aVL、aVR、aVF）につても1000 mg/kg投与後2時間で変化を示さなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸は 250～1000 mg/kg 単回経口投与において動脈血圧、心拍数及び心伝導時間に影響を及ぼさないと考えられた。また、覚醒イヌにおける単回経口投与によるカルグルミン酸の無作用量は少なくとも 1000 mg/kg と考えられた。

(2) 摘出イヌプルキンエ線維の心活動電位に対する作用

摘出イヌプルキンエ線維を用い、活動電位パラメータ（振動、静止電位、脱分極最大速度及び活動電位持続時間APD50、APD70及びAPD90）を測定した。陽性対照としてシサプリドを用いた。

カルグルミン酸は、10^{-7} M、10^{-6} M、10^{-5} M及び10^{-4} Mで60パルス/分あるいは20パルス/分の刺激速度における活動電位パラメータに作用を示さなかった。いずれの濃度においても

期後脱分極は観察されなかった。この結果は、カルグルミン酸が10^{-7}M～10^{-4}Mで活動電位持続時間、特にAPD90に影響を及ぼさないことを示唆するものと考えられた。一方、陽性対照であるシサプリドは3×10^{-7}Mにおいて典型的な電気生理学的作用、即ち、活動電位持続時間の延長を示した。

3. 呼吸系に対する影響

無拘束覚醒ラットの呼吸に対するカルグルミン酸（250、500及び1000mg/kg）の単回経口投与の影響を検討した。溶媒対照群及び陽性対照群（カルバミルコリン：30mg/kg単回経口投与）と比較検討した。

カルグルミン酸250、500、1000mg/kgの単回経口投与では呼吸機能に対して統計的に有意な影響を及ぼさなかった。また、雄雌ラットにおける個別データにおいても呼吸パラメータへの変化は認められなかった。一方、陽性対照であるカルバミルコリンは典型的な気管支収縮作用（主に、気道抵抗の増大と呼吸数、最大吸気・呼気流量と一回換気量の増大及び呼気時間の減少）を示した。

2.6.2.1.4 薬力学的相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 作用機序（添付資料 4.2.1.1-1 参考資料）

[目的]

カルグルミン酸の肝由来 CPS I に対する活性化作用を、生体内 CPS I 活性化因子である NAGA と比較検討した。

[方法]

ラット肝の CPS I 活性を、補助酵素としてピルビン酸キナーゼ及び指示酵素として乳酸脱水素酵素を用いた共役酵素反応における ADP の生成を指標とした。

基質として、5mM の ATP、50mM の $KHCO_3$ 及び 70mM の NH_4^+を用い、15mM の Mg^{2+}存在下、精製した CPS I の濃度は一定とし、各種濃度のカルグルミン酸（0～約 20mM）または NAGS（0～約 3mM）を加え、反応を開始させた。3 分間以上、340nm における吸光度の変化を測定し、酵素反応に対応する吸光度変化の直線部分の傾きを求めた。反応温度は 37℃とした。試験は 2 回行った。カルグルミン酸は、Orphan Europe 社（　　B*　社：batch 040307102）、　A*　社（batch KLA 1028B）、　C*　社（実験用試薬）の 3 社のものを用いた。なお、　A*　社及び　C*　社のものは NCGA と表記した。

＊新薬承認情報提供時に置き換えた

[結果]

酵素反応速度は、NAGA の濃度に比例して増加し、およそ 1mM 以上の濃度で V_{max} 示した。同様に、カルグルミン酸の場合も、濃度に比例して増加し、およそ 10mM 以上の濃度で V_{max} を示した。NCGA はカルグルミン酸と同様の反応性を示した。一回目の酵素反応曲線を図 2.6.2-1 に示す。ミカエル・メンテン式から求めたミカエリス定数（K_M）は、一回目の測定で、カルグルミン酸及び NCGA の場合、1.67±0.11mM、NAGA の場合、0.11±0.01mM であった。二回目の測定では、それぞれ 1.18±0.06mM、0.097±0.013mM であった。

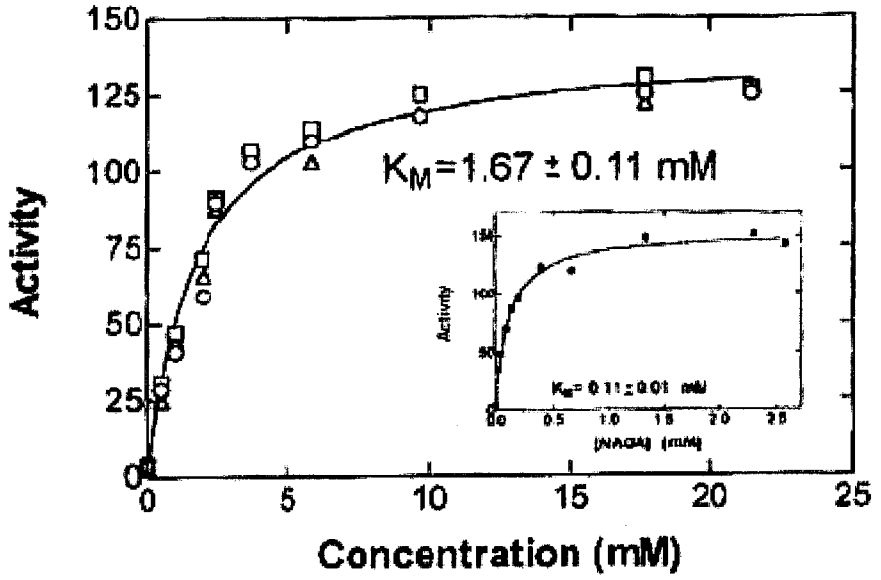


図 2.6.2-1 カルグルミン酸、NCGA 及び NAGA の CPS I 活性化作用

○：　A*　社製、□：　B*　社製、△：　C*　社試薬

[結論]

カルグルミン酸は、ラット肝の CPS I を用いた *in vitro* 試験において、生体内 CPS I の活性化因子である NAGA と同様に CPS I を活性化する。*In vitro* における CPS I 活性化作用は、NAGA がカルグルミン酸や NCGA より 12～15 倍高かった。また、カルグルミン酸と他の NCGA には差がなかった。

2.6.2.2.2　ラットにおける致死用量の酢酸アンモニウムに対する NCGA の作用（添付資料 4.2.1.1-2 参考資料）

[目的]

正常ラットにおける致死用量の酢酸アンモニウムに対する、NCGA、L-アルギニン、NCGA と L-アルギニンの併用、NAGA 及び L-グルタミン酸による保護作用を検討した。

＊新薬承認情報提供時に置き換えた

[方法]

24時間絶食（水は自由摂取）した雄ラット（SD系）に、NCGA 1mmol/kg又は4mmol/kg、L-アルギニン 1mmol/kg又は4mmol/kg、NAGA 4mmol/kg、L-グルタミン酸 4mmol/kg相当量の水溶液を2.5mL腹腔内にそれぞれ投与した。その1時間後にラットに対する酢酸アンモニウムの致死用量（$LD_{99.9}$：30分以内に死亡）10.8mmol/kg相当量を腹腔内に投与し、30分を超えて生存するラット数を測定した。同様に、NCGAとL-アルギニンの併用効果についても検討した。NCGAは　C* 社の試薬を水で再結晶して用いた。

別に、ブタ腎臓由来のacylase I（　C* 社）を用い、NCGAおよびNAGAに対する加水分解の程度を検討した。この試験は、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）0.5mL、0.1MNAGA又はNCGA溶液0.5mL（NaOHでpH7.0に調整）及びAcylase I調製溶液0.5mLの反応液系で、37℃で10分間行った。

[結果]

各種薬剤の投与1時間後に、致死用量の酢酸アンモニウム投与後、30分を超えて生存したラット数を**表2.6.2-1**に示す。

表2.6.2-1 致死用量（$LD_{99.9}$）の酢酸アンモニウムに対する各種化合物の生存率に及ぼす効果

Compound	Dose (mmol/kg of body weight)	No. of animals	No. of animals survived	Survived (%)
L-Arginine	4	26	22	85
	1	21	5	24
N-Carbamoyl-L-glutamate	4	38	29	76
	1	23	14	61
N-Acetyl-L-glutamate	4	32	7	22
L-Glutamate	4	13	1	8

NCGA 1mmol/kg群では61%（14/23匹）、4mmol/kg群では76%（29/38匹）が30分を超えて生存した。同様に、L-アルギニン4mmol/kg群では85%（22/26匹）が30分を超えて生存した。一方、NAGA 4mmol/kg群では22%（7/32匹）が、L-アルギニン1mmol/kg群では24%（5/21匹）が、L-グルタミン酸4mmol/kg群では8%（1/13匹）が30分を超えて生存したに過ぎなかった。

NCGAとL-アルギニンの各種濃度の併用投与1時間後に、致死用量の酢酸アンモニウム投与後、30分を超えて生存したラット数を**表2.6.2-2**に示す。

＊新薬承認情報提供時に置き換えた

表2. 6. 2-2 致死用量（$LD_{99.9}$）の酢酸アンモニウムに対するNCGAとL-アルギニンの併用効果

Mixture*	No. of animals	No. of animals survived	Survived (%)
0.5 mmol L-arginine + 0.5 mmol *N*-carbamoyl-L-glutamate	24	7	29
0.5 mmol L-arginnine + 1.0 mmol *N*-carbamoyl-L-glutamate	16	9	56
1.0 mmol L-arginine + 0.5 mmol *N*-carbamoyl-L-glutamate	26	23	89
1.0 mmol L-arginine + 1.0 mmol *N*-carbamoyl-L-glutamate	30	30	100

NCGAとL-アルギニンの併用効果に関しては、生存率はL-アルギニン1 mmol/kg＋NCGA 0.5 mmol/kg群で89%（23/26匹）、L-アルギニン1 mmol/kg＋NCGA 1 mmol/kg群で100%（30/30匹）と高かった。

NCGA 及び NAGA に対するブタ腎臓由来の acylase I の影響を表 2.6.2-3 に示す。

表 2. 6. 2-3 NCGA 及び NAGA に対するブタ腎臓由来の acylase I の影響

Substrate used	Amount of acylase I used (mg)	μmol of substrate hydrolyzed/hr per mg of enzyme
N-Acetyl-L-glutamate	0.02	182
N-Carbamoyl-L-glutamate	0.50	0

生体内 CPS I 活性化因子である NAGA は、acylase I 0.02 mg で加水分解されたが、NCGA は、25 倍の 0.50 mg でも加水分解を受けなかった。

[結論]

NCGA は、予防投与（腹腔内）によってラットの急性アンモニア毒性に対して 1 mmol/kg

以上の用量で保護作用を示した。同様に、L-アルギニンは4 mmol/kgで保護作用を示した。また、NCGAとL-アルギニンの併用は、それぞれの単独投与時の生存率を上回る生存率を示した。一方、生体内CPS I活性化因子であるNAGAは、4 mmol/kgの投与においても生存率は22%であり、*in vivo*の作用はNCGAに比べ弱かった。これは、NAGAがNCGAに比べ、生体内組織中のacylaseによって加水分解を受けやすいことが一因と考えられた。

2.6.2.2.3 部分肝切除ラットにおける酢酸アンモニウム負荷後の血中アンモニア濃度に及ぼすNCGAの影響（添付資料4.2.1.1-3参考資料）

[目的]

部分肝切除ラットにおける、致死用量以下の酢酸アンモニウム負荷後の血中アンモニア濃度に及ぼすNCGA、L-アルギニン及びNCGAとL-アルギニンの併用による影響を検討した。

[方法]

雄ラット（SD系）の中間葉及び外側左葉を切除し、2/3部分肝切除ラットを作成した。肝切除13時間後、NCGA 1 mmol/kg又はL-アルギニン1 mmol/kg相当量のリン酸緩衝溶液を体重200 gあたり1.0 mL腹腔内に投与した。その1時間後に酢酸アンモニウム3.4 mmol/kg（$LD_{99.9}$の約1/3）相当量のリン酸緩衝溶液を腹腔内に投与し、30分後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血し血中アンモニア濃度を測定した。同様に、NCGA 1 mmol/kgとL-アルギニン1 mmol/kgの併用効果についても検討した。対照群にはリン酸緩衝液を投与した。

[結果]

対照群の血中アンモニア濃度415.72±166.38 μmol/L(n=11)に対しNCGA1 mmol/kg群は278.09±60.02 μmol/L(n=11)と有意に低い血中アンモニア濃度を示した($p<0.05$)。L-アルギニン1 mmol/kg単独では有意な血中アンモニア濃度減少を示さなかったが、NCGA1 mmol/kgとの併用群は225.08±107.69 μmol/L(n=12)と有意に低い血中アンモニア濃度を示した($p<0.01$)。

[結論]

NCGAは、予防投与（腹腔内）によって部分肝切除ラットにおいて上昇した血中アンモニアを1 mmol/kgの用量で有意に低下させた。L-アルギニン1 mmol/kg単独では、有意な低下効果を示さなかったが、NCGA 1 mmol/kgとの併用で血中アンモニアを有意に低下させた。

これらの結果は、NCGAの投与が致死用量の酢酸アンモニウムに対して保護作用を示したことを反映していると考えられた。

2.6.2.2.4 NAGS欠損（*Nags*$^{-/-}$）モデルマウスを用いた試験（添付資料4.2.1.1-4参考資料）

[目的]

生化学的処置により生存した NAGS 欠損マウスにおける、カルグルミン酸、L-シトルリン及びカルグルミン酸と L-シトルリンの併用による生存率及び血漿中アンモニア濃度に及ぼす影響を検討した。

[方法]

1. NAGS 欠損（*Nags*$^{-/-}$）モデルマウスの作成と生化学的処置

Nags$^{+/-}$C57BL/6N と野生型（Swiss-Webster 系）を交配させ、ヘテロ接合体の交配対を作製した。ヘテロ接合体の交配対にはカルグルミン酸（1.0 g/L）及び L-シトルリン（1.0 g/L）を含んだ飲水を与えた。ヘテロ接合体対からホモ接合体の *Nags*$^{-/-}$が得られた。胎児を保護するため母動物にカルグルミン酸及び L-シトルリンを摂取させたが、*Nags*$^{-/-}$の新生児は 24～48 時間以内に死亡した。そこで、出生後 2～3 時間以内から、カルグルミン酸及び L-シトルリンの乳酸リンゲル溶液を離乳期まで 1 日 1 回腹腔内投与した。初回投与量は、カルグルミン酸：250 mg/kg/日、L-シトルリン：1000 mg/kg/日とした。成長にしたがって投与量はカルグルミン酸を 130 mg/kg/日、L-シトルリンを 525 mg/kg/日まで漸減した。離乳期までの生存率は、カルグルミン酸単独では 50%、カルグルミン酸と L-シトルリンの併用では 85%であった。離乳後（通常 21 日）は、成熟期及び繁殖期まで生存できるようにカルグルミン酸（1.0 g/L）及び L-シトルリン（1.0 g/L）を含有した飲水を摂取させた。*Nags*$^{-/-}$新生児の離乳期までの生存率推移を**図 2. 6. 2-2** に示す。

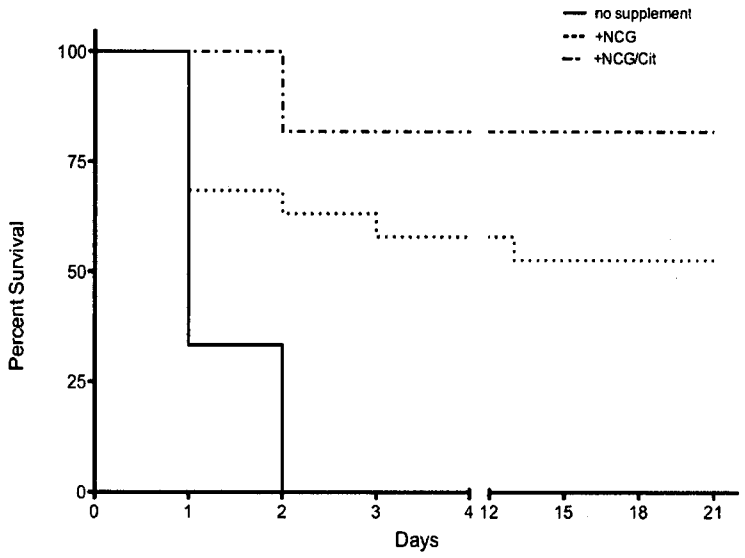


図 2. 6. 2-2　*Nags*$^{-/-}$新生児の離乳期までの Kaplan-Meier 生存曲線

no supplement：無処置、+NCG：カルグルミン酸腹腔内投与

NCG/Cit：カルグルミン酸と L-シトルリン併用腹腔内投与

2. *Nags*$^{-/-}$マウスに対する生化学的処置中止後の生存率に及ぼすカルグルミン酸の影響

生化学的処置により生存した成熟期におけるカルグルミン酸及び L-シトルリンの効果について、雌雄 6 週齢の *Nags*$^{-/-}$マウスを用いて検討した。生化学的処置を中断した *Nags*$^{-/-}$マウスに、水、カルグルミン酸水溶液、L-シトルリン水溶液及びカルグルミン酸と L-シトルリン併用水溶液をそれぞれ経口摂取させ、生存率を検討した。カルグルミン酸及び L-シトルリンの濃度は、約 150 mg/kg/日の投与量になるように調製した。

3. *Nags*$^{-/-}$マウスに対する生化学的処置中止による血漿中アンモニア濃度に対する影響

生化学的処置により生存した生後 2 ヵ月の雌雄 *Nags*$^{-/-}$マウスに対する生化学的処置を中止し、重篤な高アンモニア血症の症状（嗜眠、けいれん、横臥、除脳姿勢）が発現した時点で屠殺し、血漿中アンモニア濃度を測定した。同時に、*Nags*$^{+/+}$マウス、*Nags*$^{+/-}$マウス、*Nags*$^{-/-}$マウス（カルグルミン酸と L-シトルリン併用群）の血漿中アンモニア濃度を測定し比較検討した。

[結果]

1. *Nags*$^{-/-}$マウスに対する生化学的処置中止後の生存率に及ぼすカルグルミン酸の影響

無処置対照群（水摂取のみ）では24時間以内に全例が死亡し、L-シトルリン水溶液を摂取した群では、48時間以内に全例が死亡した。カルグルミン酸水溶液及びカルグルミン酸と L-シトルリン併用水溶液を摂取した群での14日の時点の生存率はそれぞれ50%及び89%であった。また、カルグルミン酸水溶液群及びカルグルミン酸とL-シトルリン併用水溶液群は30日を超えて生存する個体があった。各処置群の生存率推移を**図2. 6. 2-3**に示す。

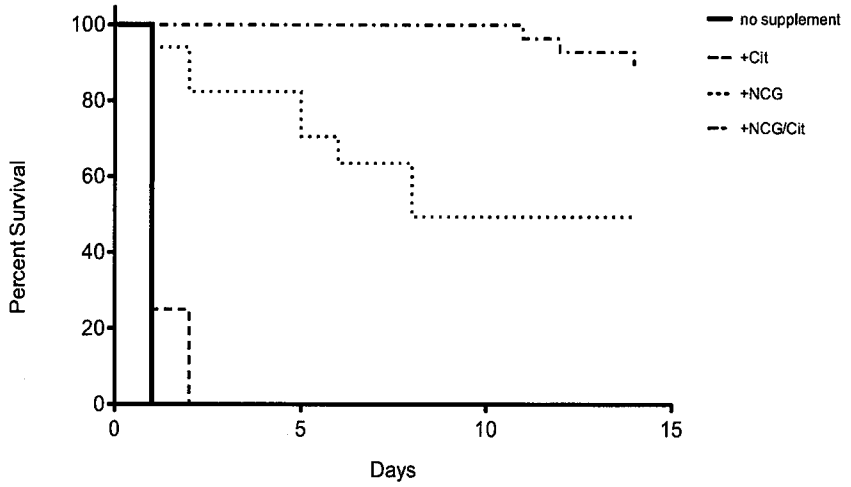


図 2. 6. 2-3　*Nags*$^{-/-}$6 週齢マウスの Kaplan-Meier 生存率曲線

no supplement：水、+Cit：L-シトルリン水溶液、+NCG：カルグルミン酸水溶液
+NCG/Cit：カルグルミン酸と L-シトルリン併用水溶液

2. *Nags*$^{-/-}$マウスに対する生化学的処置中止による血漿中アンモニア濃度に対する影響

生化学的処置を中止した全ての*Nags*$^{-/-}$マウスは、10～28時間の間に重篤な高アンモニア血症の症状を発現した。

Nags$^{+/+}$マウス、*Nags*$^{+/-}$マウス、カルグルミン酸処置 *Nags*$^{-/-}$マウス及びカルグルミン酸とL-シトルリン併用処置 *Nags*$^{-/-}$マウスの血漿中アンモニア濃度に有意な差は認められなかったが、生化学的処置中止後の *Nags*$^{-/-}$マウスの血漿中アンモニア濃度は 1000～3000 μmol/L と他の群に比べ有意に高く($p<0.0001$)、約 10 倍の濃度を示した。カルグルミン酸は NAGS 欠損モデルマウスにおいて、血漿中アンモニア濃度を正常マウスのレベルにまで抑制した。各 *Nags* マウスの血漿中アンモニア濃度を**図 2. 6. 2-4** に示す。

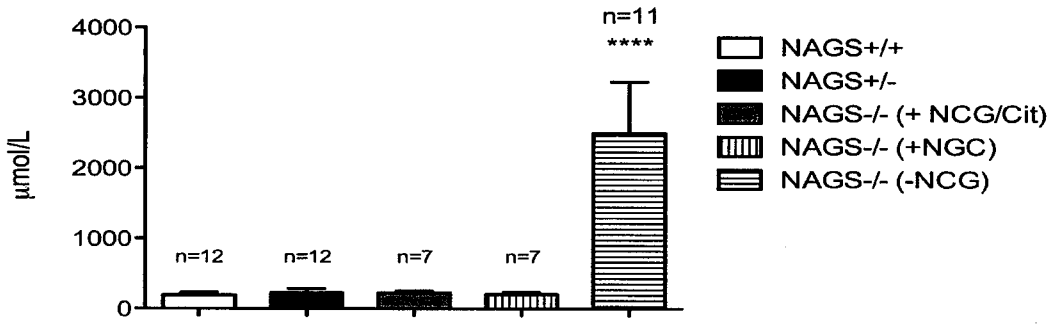


図 2. 6. 2-4　各 *Nags* マウスの血漿中アンモニア濃度

+NCG/Cit：カルグルミン酸と L-シトルリン併用水溶液、+NGC：カルグルミン酸水溶液、-NCG：カルグルミン酸の生化学的処置を中止、****：$p<0.0001$（Bonferroni Post-test、**多重比較**）

[結論]

カルグルミン酸は、約 150 mg/kg/日の経口摂取で生化学的処置を中止した NAGS 欠損（*Nags*$^{-/-}$）モデルマウスの生存率を増加させた。生存率の増加は、カルグルミン酸が NAGS 欠損モデルマウスの血漿中アンモニア濃度を正常マウスのレベルにまで抑制していることが寄与していると考えられた。また、L-シトルリン単独では生存率にほとんど影響を与えなかったが、カルグルミン酸との併用により、カルグルミン酸単独よりも高い生存率を示した。

2.6.2.3　副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系への影響（添付資料 4.2.1.3-1）

ラットにおける単回経口投与後の Irwin 行動観察と体温に対する作用を検討した。

雌雄ラット（SD 系）を各 4 匹 5 群（溶媒対照投与群、カルグルミン酸投与 3 群、陽性対照群）に分け、溶媒対照（1% CMC）、カルグルミン酸（250、500、1000 mg/kg）及び陽性対照のクロニジン 3 mg/kg をそれぞれ単回経口投与した。Irwin スコアと体温は、薬物投与前、薬物投与 60、120、180、240、360 分、24 時間後に測定した。

カルグルミン酸を投与した雄雌ラットへの 250、500 及び 1000 mg/kg の単回経口投与では有意な神経行動、自律神経、神経毒性及び向精神作用を示さず、体温低下も示さなかった。一方、陽性対照であるクロジニン（3 mg/kg 経口投与）では、典型的な鎮静と自律神経作用を示し、体温低下も示した。各種薬剤投与後の体温の経時的推移を**表 2.6.2-4** に示す。

表 2.6.2-4 カルグルミン酸のラット体温に対する影響

Treatment		Predose values	t=60min (Var.)	t=120min (Var.)	t=180min (Var.)	t=240min (Var.)	t=360min (Var.)	t=24h (Var.)	Emax Var.	Tmax
VEHICLE	Mean	37.6	0.5	0.4	0.6	0.2	-0.1	0.2	+0.6	t=180min
	SEM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2		
	N	8	8	8	8	8	8	8		
CLONIDINE 3 mg/kg	Mean	37.5	-2.5	-2.8	-2.4	-2.0	-1.8	0.3	-2.8	t=120min
	SEM	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		
	N	8	8	8	8	8	8	8		
		NS	**	**	**	**	**	NS		
N-CARBAMYL-L GLUTAMIC ACID 250 mg/kg	Mean	37.5	0.4	0.4	0.4	0.1	-0.1	0.6	+0.6	t=24h
	SEM	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
	N	8	8	8	8	8	8	8		
		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
N-CARBAMYL-L GLUTAMIC ACID 500 mg/kg	Mean	37.6	0.3	0.4	0.5	0.2	-0.2	0.3	+0.5	t=180min
	SEM	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		
	N	8	8	8	8	8	8	8		
		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
N-CARBAMYL-L GLUTAMIC ACID 1000 mg/kg	Mean	37.8	0.2	0.6	0.6	0.0	-0.2	-0.1	+0.6	t=120min
	SEM	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2		
	N	8	8	8	8	8	8	8		
		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

SEM：標準誤差、NS：$p>0.05$、**：$p\leq0.01$（Newman-Keuls test、Vehicle 対照）

2.6.2.4.2 心血管系への影響（添付資料 4.2.1.3-2、4.2.1.3-3）

1. 覚醒下イヌにおける血圧、心拍数、心電図への影響

イヌにおける単回経口投与後の血圧、心拍数及び心電図に対する作用を検討した。

トランスミッターを埋め込んだ雌雄覚醒イヌ（ビーグル、雌雄各 3 頭、計 6 頭）において、テレメーターを用いて血圧、心拍数と心電図を 24 時間測定した。トランスミッターは腹腔内に埋め込み、センサーカテーテルは大腿動脈内に導入した。埋め込み手術は無菌状

態、麻酔下で試験の少なくとも 10 日前に行った。

溶媒対照（1% CMC）及びカルグルミン酸（250、500、1000 mg/kg）をそれぞれ強制単回経口投与した。

カルグルミン酸の 250、500 及び 1000 mg/kg 単回経口投与において、血圧、心電図 PR 間隔、QT 間隔あるいは QRS 持続時間に有意な作用を示さなかったが、250 mg/kg 投与でのみ心拍数の有意な減少が認められた。この心拍数の変化は投与後 20 時間と 24 時間において認められたが、500 と 1000 mg/kg の高用量において確認できなかったことから、カルグルミン酸の作用によるものではないと考えられた。カルグルミン酸投与後の心拍数の経時推移を図 2. 6. 2-5 に示す。

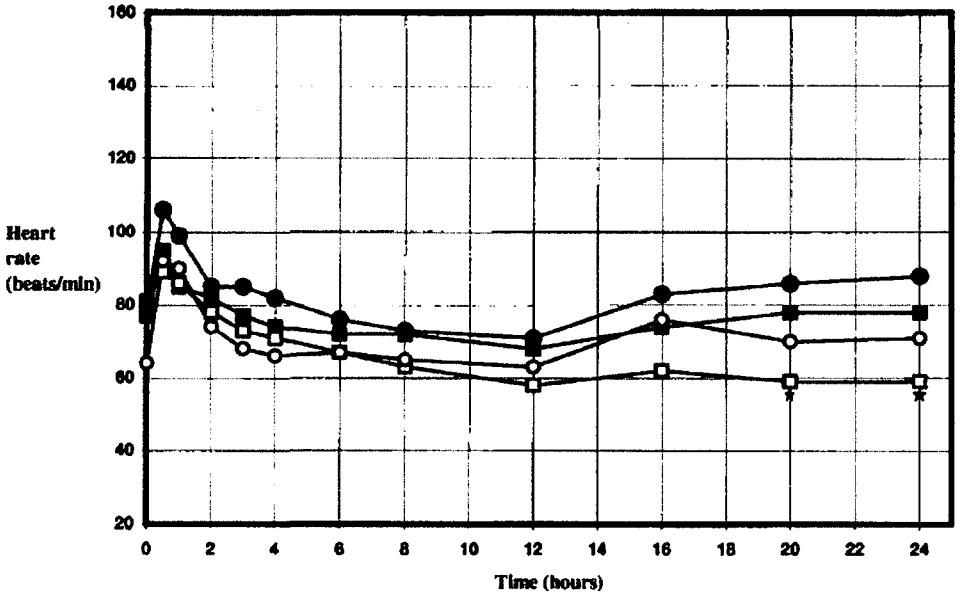


図 2. 6. 2-5　カルグルミン酸の覚醒イヌにおける心拍数に対する影響

■：溶媒対照（1% CMC）、□：カルグルミン酸 250 mg/kg、●：カルグルミン酸 500 mg/kg、○：カルグルミン酸 1000 mg/kg

*：$p \leq 0.05$（Newman-Keuls test、溶媒対照）

2 週間のウオッシュアウト期間後、溶媒対照（1% CMC）及びカルグルミン酸（250、500、1000 mg/kg）をそれぞれ強制単回経口投与し、投与 2 時間後の心電図（第 II 誘導）及び T 波、その他の 6 誘導（I、II、III、aVL、aVR、aVF）への影響を検討した。また、投与 2 時間後のカルグルミン酸の血漿中濃度を測定した。

カルグルミン酸 250、500 及び 1000 mg/kg 単回経口投与において、心電図(第 II 誘導)及び T 波、その他の 6 誘導(I、II、III、aVL、aVR、aVF)について、投与後 2 時間で変化を示さなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸は 250～1000 mg/kg 単回経口投与において動脈血圧、

心拍数及び心伝導時間に影響を及ぼさないと考えられた。

2. 摘出プルキンエ線維を用いた心活動電位に対する影響

雄イヌ3頭（ビーグル）から摘出したプルキンエ線維（6検体）を用い、活動電位パラメータ（振幅、静止電位、脱分極最大速度及び活動電位持続時間 APD50、APD70 及び APD90）を測定した。カルグルミン酸は 0.1%DMSO に溶解した。陽性対照としてシサプリドを用いた。シサプリドは 0.6%酢酸を含む滅菌水に溶解した。

カルグルミン酸は、10^{-7}M、10^{-6}M、10^{-5}M 及び 10^{-4}M で 60 パルス/分あるいは 20 パルス/分の刺激速度における活動電位パラメータに作用を示さなかった。いずれの濃度においても早期後脱分極は観察されなかった。この結果は、カルグルミン酸が 10^{-7}M～10^{-4}M で活動電位持続時間、特に APD90 に影響を及ぼさないと考えられた。一方、陽性対照であるシサプリドは 3×10^{-7} M において典型的な電気生理学的作用、即ち、活動電位持続時間の延長を示した。刺激速度 60 パルス/分におけるカルグルミン酸のイヌプルキンエ線維の活動電位パラメータに及ぼす影響を**表 2.6.2-5** に、同様に、シサプリドの影響を**表 2.6.2-6** に示す。

表 2.6.2-5 イヌプルキンエ線維の活動電位パラメータに及ぼすカルグルミン酸の影響 (60ppm)

TREATMENT		APA (mV)	RP (mV)	Vmax (V/s)	APD50 (ms)	APD70 (ms)	APD90 (ms)
Predose	Mean	126	-92	462	228	274	311
values	SEM	2	0	17	10	10	10
(Tyrode)	N	6	6	6	6	6	6
0.1% DMSO	Mean	-4	1	-19	-2	-4	-3
in Tyrode	SEM	3	0	9	4	1	1
	N	6	6	6	6	6	6
N-carbamyl	Mean	-2	1	-14	-6	-8	-9
L-glutamic	SEM	2	0	13	5	2	2
acid	N	6	6	6	6	6	6
10^{-7}M	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-carbamyl	Mean	-2	1	-20	-3	-4	-4
L-glutamic	SEM	1	0	15	4	3	4
acid	N	6	6	6	6	6	6
10^{-6}M	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-carbamyl	Mean	-1	1	-8	-9	-6	-2
L-glutamic	SEM	1	0	18	4	4	4
acid	N	6	6	6	6	6	6
10^{-5}M	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-carbamyl	Mean	-2	0	-7	-7	-4	-2
L-glutamic	SEM	2	0	7	5	6	6
acid	N	6	6	6	6	6	6
10^{-4}M	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS

SEM：標準誤差、NS：p>0.05（Newman-Keuls test、0.1% DMSO 対照）

表 2.6.2-6 イヌプルキンエ線維の活動電位パラメータに及ぼすシサプリドの影響
(60ppm)

TREATMENT		APA (mV)	RP (mV)	Vmax (V/s)	APD50 (ms)	APD70 (ms)	APD90 (ms)
Predose values (Tyrode)	Mean	126	-92	462	228	274	311
	SEM	2	0	17	10	10	10
	N	6	6	6	6	6	6
Tyrode	Mean	-1	0	-9	-8	-1	1
	SEM	1	0	18	4	5	5
	N	6	6	6	6	6	6
Cisapride $3x10^{-7}$M	Mean	-1	1	-4	39	73	88
	SEM	1	0	17	10	14	18
	N	6	6	6	6	6	6
	P	NS	NS	NS	**	**	**

SEM：標準誤差、NS：p>0.05、**：p≤0.01（Newman-Keuls test、Tyrode 対照）

2.6.2.4.3 呼吸系への影響（添付資料 4.2.1.3-4）

無拘束覚醒ラットにおける単回経口投与後の呼吸に対する作用を検討した。

雌雄ラット（Wistar 系）を各 4 匹 5 群に分け、溶媒対照（1% CMC）、カルグルミン酸（250、500、1000 mg/kg）及び陽性対照のカルバミルコリン 30mg/kg を、それぞれ単回経口投与した。薬物投与開始から 4 時間後まで、呼吸数、最大吸気流量、最大呼気流量、吸気時間、呼気時間、一回換気量及び気道抵抗を測定した。

カルグルミン酸 250、500、1000 mg/kg の単回経口投与では呼吸機能に対して統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。また、雄雌ラットにおける個別データにおいても呼吸パラメータの変化は認められなかった。

一方、陽性対照であるカルバミルコリンは典型的な気管支収縮作用（主に、気道抵抗の増大と呼吸数、最大吸気・呼気流量と一回換気量の増大及び呼気時間の減少）を示した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

哺乳類の生体内で発生した過剰なアンモニアは、肝細胞における尿素サイクルによって無毒な尿素に変換され、体外に排出される。尿素サイクルの最初の生化学反応は、アンモニアをカルバモイルリン酸に変換するステップである。このステップでは、カルバモイルリン酸合成酵素 1（CPS I）の酵素作用が必要であるが、CPS I の酵素活性には co-factor で

ある NAGA の存在が必須である。NAGA は、L-グルタミン酸とアセチル CoA から NAGS の酵素作用で生合成される。また、これらの生化学反応は、肝細胞のミトコンドリア内で行われる *(Caldovic 2003、Daniotti 2011)*。

CPS I の活性は co-factor である NAGA 濃度に依存し、NAGA の生成は NAGS の酵素活性によってコントロールされることから、NAGS は尿素サイクルにおける律速酵素となる。

極めて稀ではあるが先天性の NAGS 欠損症では、内因性の NAGA を生成することが出来ないため尿素サイクルが機能せず、アンモニアの過剰な蓄積により高アンモニア血症を発症する。また、先天性有機酸代謝異常症であるメチルマロン酸血症（MMA）、プロピオン酸血症（PA）、イソ吉草酸血症（IVA）では、蓄積したメチルマロニル CoA、プロピオニル CoA、イソバレリル CoA が NAGS の酵素活性を拮抗阻害することにより NAGS の酵素活性を減弱させ、NAGA の生成が減少し、十分な尿素サイクルが機能せず、NAGS 欠損症と同様に、高アンモニア血症を発症する *(Caldovic 2003、Daniotti 2011、Coude 1979)*。

カルグルミン酸は、Carbaglu®の有効成分で、経口投与により、NAGS 欠損症あるいは MMA、PA 及び IVA の有機酸代謝異常症において欠損あるいは減少した NAGA に代わって CPS I を活性化し、尿素サイクルを始動あるいは活性化させることによって、蓄積したアンモニアを低減する。

効力を裏付ける試験における、ラット肝の CPS I を用いた *in vitro* 試験において、カルグルミン酸は CPS I を活性化した。正常動物を用いた *in vivo* 試験では、カルグルミン酸 1 mmol/kg 及び 4 mmol/kg を腹腔内に投与した後、致死量（10.8 mmol/kg）の酢酸アンモニウムを静脈内投与したラットの生存率は、それぞれ 61%及び 76%であり、アンモニア毒性に対する保護作用を示した。また、肝部分切除ラットにカルグルミン酸 1 mmol/kg を腹腔内投与した後、酢酸アンモニウム 3.4 mmol/kg を腹腔内投与した時の血中アンモニア濃度は、溶媒対照投与群（415.72±166.38 μmol/L）に比べ 278.09±60.02 μmol/L と有意に低い値を示した($p<0.05$)。NAGS 欠損（$Nags^{-/-}$）モデルマウスでは、カルグルミン酸の経口摂取（約 150 mg/kg/日）により、生化学的処置を中止した NAGS 欠損モデルマウスの生存率が増加した。また、カルグルミン酸の経口摂取により、NAGS 欠損モデルマウスの血漿中アンモニア濃度が正常マウスのレベルにまで低下していることが示された。

カルグルミン酸は、非臨床薬理試験において、CPS I を活性化し、酢酸アンモニウム負荷モデル及び NAGS 欠損モデルにおいて生存率の増加及び血中アンモニア濃度の低下作用を示したことから、高アンモニア血症を発症する NAGS 欠損症、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症及びイソ吉草酸血症に対して効果が期待できることが示唆された。

安全性薬理試験において、安全性薬理コアバッテリーとして、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響を検討した。

・中枢神経系への影響

雌雄ラットにカルグルミン酸 250～1000 mg/kg を単回経口投与した結果、Irwin スコアと

体温に有意な変化は認められなかった。

・心血管系への影響

雌雄イヌに覚醒下でカルグルミン酸 250～1000 mg/kg を単回経口投与した結果、血圧、心拍数、心電図（PR 間隔、QT 間隔及び QRS 持続時間）に有意な変化はなかった。また、カルグルミン酸は 10^{-7} M～10^{-4} M の濃度範囲で、摘出イヌプルキンエ線維の活動電位パラメータに影響を及ぼさなかった。

・呼吸器系への影響

雌雄ラットに覚醒下でカルグルミン酸 250～1000 mg/kg を単回経口投与した結果、呼吸数、最大吸気流量、最大呼気流量、吸気時間、一回換気量、気道抵抗の各呼吸パラメータに変化はなかった。

各試験における最大用量である 1000 mg/kg 群の曝露量は、心血管系への影響において、C_{max}（T_{max} 付近である投与後 2 時間の血漿中薬物濃度）は、雄で 85.1 μg/mL、雌で 202 μg/mL であった。中枢神経系及び呼吸器系への影響においては、同じ動物種（ラット）にて曝露量を検討した試験（添付資料番号：4.2.2-2）から、初回経口投与後の C_{max} は雄で 85.9 μg/mL、雌で 95.5 μg/mL、AUCt は雄で 882.2 μg･h/mL、雌で 996.9 μg･h/mL であった。一方、健常人におけるカルグルミン酸 250 mg/kg 投与後の推定 C_{max} 及び AUCt は、それぞれ 6.77 μg/mL 及び 52.82 μg･h/mL であった（添付資料番号：5.3.1.2 参考資料からシミュレーションにより算出）。

各安全性薬理試験の曝露量と健常人の曝露量を比較すると 13～30 倍となるが、カルグルミン酸 1000 mg/kg 単回経口投与では何れの試験でも影響は認められなかった。

2.6.2.7 図表

各項目に記載した。

参考文献

Caldovic L and Tuchman M: N-Acetylglutamate and its changing role through evolution. Biochem.J. 2003; 372: 279-290.

Coude FX, Sweetman L, Nyhan WL. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. J Clin Invest. 1979 Dec; 64(6): 1544-1551.

Daniotti M, la Marca G, Fiorini P, Filippi L. New developments in the treatment of

hyperemmonemia: emerging use of carglumic acid. International Journal of General Medicine. 2011; 4: 21-28.

カーバグル分散錠 200 mg

医薬品製造販売承認申請書　添付資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6.3　薬理試験概要表

株式会社ポーラファルマ

目　次

2.6.3　薬理試験概要表 …… 2
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 …… 2
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 …… 3
2.6.3.3　副次的薬理試験 …… 3
2.6.3.4　安全性薬理試験 …… 3
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 …… 4

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号又は文献著者	資料番号/資料区分
効力を裏付ける試験					
カルグルミン酸及びNCGAのCPS I活性化作用	ラット/肝 CPS I	*In vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-1/参考資料
致死用量の酢酸アンモニウムに対するNCGAの予防効果	ラット/SD	腹腔内	Temple University School of Medicine	Sagduk Kim et al, 1972	4.2.1.1-2/参考資料
部分肝切除ラットにおける酢酸アンモニウム負荷後の血中アンモニア濃度に及ぼすNCGAの効果	ラット/SD	腹腔内	Korea University	Jae-Ho-Lee et al, 1998	4.2.1.1-3/参考資料
NAGS欠損（*Nags*$^{-/-}$）モデルマウスに対するカルグルミン酸の効果	マウス/ *Nags*$^{-/-}$ *Nags*$^{+/-}$C57BL/6Nと野生型（Swiss-Webster系）の交配マウス	経口摂取	University of Maryland、Children's National Medical Center	Emilee Senkevitch et al, 2012	4.2.1.1-4/参考資料
安全性薬理試験					
中枢神経系への影響（Irwin行動、体温）	ラット/ SD	経口	[redacted]	[redacted]0366P	4.2.1.3-1
心血管系への影響（血圧、心拍数、心電図）	イヌ/ビーグル	経口	[redacted]	[redacted]0429P	4.2.1.3-2
心血管系への影響（心活動電位）	イヌ/プルキンエ線維	*In vitro*	[redacted]	[redacted]0264 PECM	4.2.1.3-3
呼吸系への影響	ラット/Wistar	経口	[redacted]	[redacted]0367P	4.2.1.3-4

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

被験物質：カルグルミン酸

概要文中に記載した。

2.6.3.3　副次的薬理試験

該当資料なし。

2.6.3.4　安全性薬理試験

被験物質：カルグルミン酸

評価対象となる組織	動物種/系統	投与方法	濃度又は投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
中枢神経系	ラット/SD（無麻酔）	経口	0、250、500、1000 mg/kg	雌雄各4匹/群	カルグルミン酸は、250、500及び1000 mg/kg投与群において、有意な神経行動、自律神経、神経毒性、向精神作用及び体温に影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]0366P
心血管系（ﾃﾚﾒﾄﾘｰ法）	イヌ/ビーグル（無麻酔）	経口	0、250、500、1000 mg/kg	雌雄各3匹/群	カルグルミン酸は、250、500及び1000 mg/kg投与群において、血圧、心電図PR間隔、QT間隔あるいはQRS持続時間に有意な影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]0429P
摘出ﾌﾟﾙｷﾝｴ線維	イヌ/ビーグル	*In vitro*	0、1×10^{-7}、1×10^{-6}、1×10^{-5}、1×10^{-4} mol/L	雄3頭から6線維	カルグルミン酸は、1×10^{-7}、1×10^{-6}、1×10^{-5}及び1×10^{-4} mol/Lの濃度において、60パルス/分あるいは20パルス/分の刺激速度の活動電位パラメータに影響を及ぼさなかった。早期後脱分極は何れの濃度でも見られなかった。カルグルミン酸は、1×10^{-7}、1×10^{-6}、1×10^{-5}及び1×10^{-4} mol/Lの濃度で活動電位持続時間、特にAPD90に作用しなかった。	適	[redacted]0264 PECM
呼吸機能	ラット/Wister（無麻酔）	経口	0、250、500、1000 mg/kg	雌雄各4匹/群	カルグルミン酸は、250、500及び1000 mg/kg投与群において、呼吸数、最大吸気流量、最大呼気流量、吸気時間、呼気時間、一回換気量及び気道抵抗に影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]0367P

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。