

2.4 非臨床試験の概括評価
エテルカルセチド塩酸塩

2.4 非臨床試験の概括評価

小野薬品工業株式会社

目次

2.4	非臨床試験の概括評価.....	5
2.4.1	非臨床試験計画概略.....	6
2.4.2	薬理試験.....	8
2.4.2.1	効力を裏付ける試験.....	8
2.4.2.2	副次的薬理試験.....	10
2.4.2.3	安全性薬理試験.....	10
2.4.2.4	薬力学的薬物相互作用試験.....	11
2.4.3	薬物動態試験.....	12
2.4.3.1	吸収.....	12
2.4.3.2	分布.....	12
2.4.3.3	代謝.....	12
2.4.3.4	排泄.....	13
2.4.3.5	薬物動態学的薬物相互作用.....	13
2.4.4	毒性試験.....	15
2.4.4.1	単回投与毒性試験.....	15
2.4.4.2	反復投与毒性試験.....	15
2.4.4.3	遺伝毒性試験.....	16
2.4.4.4	がん原性試験.....	16
2.4.4.5	生殖発生毒性試験.....	16
2.4.4.6	局所刺激性試験.....	17
2.4.4.7	その他の毒性試験.....	17
2.4.5	総括及び結論.....	19
2.4.6	参考文献.....	21

2.4 非臨床試験の概括評価
エテルカルセチド塩酸塩

略号一覧

略号	略さない表現又は説明
Ac	アセチル基
Ala	アラニン
Ames 試験	細菌を用いた復帰突然変異試験
Arg	アルギニン
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSEP	Bile salt export pump
Ca×P 積	カルシウム・リン濃度積
CaSR	カルシウム受容体
CKD	慢性腎臓病
CL	クリアランス
Cmax	最高濃度
Cxmin	投与後 x 分における濃度
CYP	チトクロム P450
Cys	システイン
Cys 482	482 番目のシステイン
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPRT	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
IP-1	イノシトール-1-リン酸
LC/MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム型質量分析
LSC	液体シンチレーションカウンター
MAD 制度	GLP データ相互受入れ制度
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
OECD	経済協力開発機構
PEPT	Peptide transporter
P-gp	P-糖蛋白質
PTH	副甲状腺ホルモン
QTc	補正 QT
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー
Radio-HPLC	放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー
Ser 482	482 番目のセリン
SH	チオール
SHPT	二次性副甲状腺機能亢進症
T1/2	消失半減期
Tyr 482	482 番目のチロシン
VD	ビタミン D

2.4 非臨床試験の概括評価
エテルカルセチド塩酸塩

関連化合物の一覧

名称	構造	説明及びその他の名称
エテルカルセチド塩酸塩		N-アセチル-S-[(2R)-2-アミノ-2-カルボキシエチルスルファニル]-D-システイニル-D-アラニル-D-アルギニル-D-アルギニル-D-アルギニル-D-アラニル-D-アルギニンアミド塩酸塩
エテルカルセチド		エテルカルセチド (フリー体)
KP-2067		エテルカルセチドのD-アミノ酸ペプチド体 (L-Cys 脱離体), M11
KP-2140	Ac-arrar-NH ₂	KP-2067 から D-Cys を欠損したペプチド体
SAPC		エテルカルセチドのD-アミノ酸ペプチド体と血清アルブミンとの複合体 (Serum albumin peptide conjugate)
ホモダイマー	Ac-c(Ac-carrar-NH ₂)arrar-NH ₂	KP-2067 の二量体
脱アミド体	Ac-c(C)arrar-OH	エテルカルセチドのC末端アミド基の脱アミド体
*不純物B		
*不純物C		
*不純物D		

S-S: ジスルフィド結合, A : L-Ala, a: D-Ala, C : L-Cys, c: D-Cys, r: D-Arg

2.4 非臨床試験の概括評価

エテルカルセチド塩酸塩は、米国 KAI Pharmaceuticals, Inc. (現, Amgen 社) で創製された CaSR 作動薬である。エテルカルセチド塩酸塩は、副甲状腺細胞表面の CaSR を作動し、CKD 患者にとって重大な合併症である SHPT による副甲状腺細胞からの PTH の過剰分泌を抑制する。更に、副甲状腺細胞の増殖を抑制することで SHPT の治療に寄与する。

CKD 患者では、腎臓からの P の排泄低下に伴う高リン血症と、活性型 VD の欠乏に伴う消化管からの Ca 吸収不良による血中 Ca の低下に起因して、PTH の過剰分泌が生じる¹⁾。その結果、骨組織から血中への Ca や P の放出が優勢になり、血中の Ca, P 及び Ca×P 積を増加させる¹⁾。PTH の過剰分泌が持続すると、副甲状腺の過形成が生じ、SHPT の病態を更に進行させる。慢性的な PTH の過剰分泌は、高代謝回転型の骨代謝異常である線維性骨炎を招き、骨痛や骨折を生じやすくさせる。慢性的なミネラル代謝異常は、心血管の異所性石灰化のリスクを増加させることが知られており、生命予後にも影響を与える^{2) 3)}。

SHPT に対する内科的治療としては、発症主因である活性型 VD の欠乏、高リン血症及び低カルシウム血症に対する処置が行われる。また、PTH の過剰分泌に対して活性型 VD 製剤及び CaSR 作動薬であるシナカルセト塩酸塩が用いられる。活性型 VD 製剤は、消化管からの Ca 吸収を促進して血中 Ca を是正する作用に加えて、核内の VD 受容体を介して PTH の生合成を抑制する。しかし、PTH の低下作用を得るには高投与量が必要とされ、副作用として高カルシウム血症を引き起こすリスクがある⁴⁾。また、活性型 VD 製剤は消化管からの P の吸収も促進することから、血中 P が高い患者では十分量の VD 製剤を投与できない場合や投与を中止せざるを得ない場合がある⁵⁾。一方、シナカルセト塩酸塩は、副甲状腺細胞の CaSR に直接作用して、PTH の分泌を抑制することにより血中の Ca, P 及び Ca×P 積を低下させる^{6) 7)}。そのため、活性型 VD 製剤と異なり、高リン血症のみならず、これまで有効な治療選択肢のなかった高カルシウム血症を併発した SHPT 患者にも使用しやすいという利点がある。近年、シナカルセト塩酸塩がメンケベルグ型と呼ばれる血管中膜の石灰化病変に対して有効性を示し、生命予後の改善効果を示すことも報告されている⁸⁾。しかし、悪心や嘔吐、下痢などの消化器系の副作用のため、シナカルセト塩酸塩を十分量投与できない患者や服薬コンプライアンスが守られない患者が存在する^{9) 10)}。更に、シナカルセト塩酸塩は肝初回通過代謝の飽和により非線形を示し、代謝酵素を介した薬物間相互作用の懸念もある¹¹⁾ため、定期的に血中の PTH 及び Ca をモニターして慎重に用量調節する必要がある。治療管理を煩雑にする一因とされている。したがって、患者負担と治療管理の煩雑さの観点から頭在化しているこれらの課題を克服し得る、新たな SHPT 治療薬が求められている。

エテルカルセチドは主に腎から消失する動態特性を有し、かつ注射剤として開発された CaSR 作動薬である。エテルカルセチドは、N 末端をアセチル化で保護した D-Cys から C 末

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

端方向に D-Arg 及び D-Ala を配置した 7 つの D-アミノ酸ペプチドに、L-Cys が D-Cys 残基とジスルフィド結合した構造を有する。エテルカルセチドの D-Cys の SH 基が CaSR の Cys 482 とジスルフィド結合することにより、アロステリック効果により細胞外 Ca の作用を増強し CaSR に対する作動活性を示す。その結果、副甲状腺からの PTH 分泌を抑制し、SHPT 患者において、血中の PTH のみならず、Ca、P 及び Ca×P 積を低下させることが期待できる。以上の薬理学的特性により、エテルカルセチド塩酸塩は、血液透析下の SHPT に対する治療薬として開発された。同種同効薬のシナカルセト塩酸塩は 1 日 1 回投与の経口剤であるが、エテルカルセチド塩酸塩は毎透析後に透析用血液回路から必要量を直接血中に投薬する注射剤であることから、患者への新たな負担なく、毎透析終了時に医師の管理下で確実に投与することが可能である。シナカルセト塩酸塩で重要な特定されたリスクとされている上部消化器症状については¹²⁾、エテルカルセチド塩酸塩の国内臨床試験の結果からリスクとする必要性がない。また、エテルカルセチドの薬物動態は線形を示し、薬物間相互作用の懸念も低い。更に、血液透析下の SHPT 患者では透析回路から排泄されるまで血中に安定して存在／維持され、持続的に効果を発揮することが期待できる。以上より、エテルカルセチド塩酸塩は既存治療の課題を克服した新規 SHPT 治療薬になると考えられた。

2.4.1 非臨床試験計画概略

今回、本邦での申請にあたり、エテルカルセチドの薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的特徴を明らかにする目的のため、以下の各種非臨床試験を実施した。なお、各試験において、エテルカルセチドの塩酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩あるいはフリー体を使用した。本資料では、投与量及び薬物濃度はすべてフリー体の量として表記した。

薬理試験

効力を裏付ける *in vitro* 試験として、CaSR 作動活性及び副甲状腺からの PTH 分泌に対する抑制作用を検討した。CaSR 作動活性試験では、ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 Ca 及び IP-1 含量に対する作用並びに CaSR に対する作用様式を検討し、副甲状腺からの PTH 分泌に対する抑制作用の試験では、ラット副甲状腺初代培養細胞及び組織からの PTH 分泌に対する抑制作用を検討した。

効力を裏付ける *in vivo* 試験として、正常イヌ、正常ラット並びに急性及び慢性腎障害ラットを用い、血中 PTH あるいは Ca の低下作用を評価した。また、慢性腎障害ラットにおける副甲状腺過形成、組織石灰化並びに骨障害に対する予防的あるいは治療的效果を評価した。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

副次的薬理試験として、CaSR の組織分布並びにエテルカルセチドの各種受容体、チャンネル及びトランスポーターに対する結合選択性を検討した。安全性薬理試験として、ICH S7A「安全性薬理試験ガイドラインについて」（医薬審発第 902 号，平成 13 年 6 月 21 日）及び ICH S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価について」（薬食審査発 1023 第 4 号，平成 21 年 10 月 23 日）に基づき、コアバッテリー試験及び補足的安全性薬理試験を GLP に準拠して実施した。薬力学的薬物相互作用試験として、シナカルセト塩酸塩との併用効果を *in vitro* で検討した。

薬物動態試験

薬物動態試験として、「非臨床薬物動態試験ガイドライン」（医薬審第 496 号，平成 10 年 6 月 26 日）に基づき、放射性標識体及び非標識体を用いた種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。*In vivo* 試験は、薬効薬理試験、安全性薬理試験及び毒性試験で用いたラット及びイヌを使用し、投与経路は臨床投与経路である静脈内投与とした。血漿中エテルカルセチド濃度の測定及びエテルカルセチド生体内変換物質の分析には LC/MS/MS を用いた。生体試料中放射能濃度の測定には LSC を、試料中放射能の組成分析には Radio-HPLC 及び LC/MS/MS を、組織分布試験の分析には QWBA を用いた。薬物動態パラメータはノンコンパートメント法により算出した。

毒性試験

毒性試験として、ICH ガイドラインに基づき、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* での遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、rasH2 トランスジェニックマウス (Tg.rasH2 マウス) 及びラットを用いたがん原性試験並びにイヌを用いた局所刺激性試験を実施した。また、エテルカルセチド塩酸塩の原薬及び製剤中の主な不純物を含有する原薬を用いて、ラットにおける 4 週間反復投与毒性試験を実施した。

ラット及びイヌは、いずれもエテルカルセチドが CaSR 作動活性を示し、血中の PTH 及び Ca を低下させる動物種であり、エテルカルセチドの安全性を評価するのに適した動物種であると考えられた。主な毒性試験の投与経路は臨床適用経路である静脈内投与とし、ラット及びイヌの反復投与毒性試験ではそれぞれ最長 6 カ月間まで反復投与した。また、長期の静脈内反復投与は困難であるため、がん原性試験は皮下投与で実施した。上記の重要な毒性試験はいずれも GLP に準拠して実施した。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

エテルカルセチドはヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 Ca 及び IP-1 含量を濃度に応じて増加させた [2.6.2.2.1.1, 2.6.2.2.1.2]¹³⁾。CaSR を発現していない親細胞では、細胞内 Ca 及び IP-1 含量は変化しなかった [2.6.2.2.1.1, 2.6.2.2.1.2]¹³⁾。また、エテルカルセチドは、ラット副甲状腺初代培養細胞及び摘出組織からの PTH 分泌を濃度に応じて抑制した [2.6.2.2.1.4, 2.6.2.2.1.5]。したがって、エテルカルセチドは、CaSR の作動活性を介して、副甲状腺からの PTH 分泌を抑制すると考えられた。CaSR 強制発現細胞におけるエテルカルセチドの CaSR 作動活性は細胞外 Ca 濃度に応じて発現し、Ca 存在下では低濃度域から CaSR を活性化させたが、Ca 非存在下では高濃度域でのみわずかに CaSR を活性化した [2.6.2.2.1.2]¹³⁾。同様に、ラット副甲状腺摘出組織からの PTH 分泌抑制作用も細胞外 Ca 濃度に応じて発現した [2.6.2.2.1.5]。したがって、エテルカルセチドはシナカルセト塩酸塩と同様¹⁴⁾、アロステリック効果により CaSR 作動活性を発揮すると考えられた。

エテルカルセチドは、分子内の L-Cys と生体内 SH 基含有物質との非酵素的なジスルフィド置換反応により、ジスルフィド結合を有する生体内変換物質を生成することが示されている。エテルカルセチドの D-アミノ酸ペプチド体 (L-Cys 脱離体: KP-2067) は CaSR 作動活性を示すのに対し、KP-2067 から N 末端の D-Cys を欠損させた KP-2140 は、CaSR 作動活性を示さなかった [2.6.2.2.1.3]¹⁵⁾。また、ヒト CaSR の Cys 482 を Ser 482 あるいは Tyr 482 に置換した変異 CaSR 発現細胞に対して、エテルカルセチドは作動活性を示さなかった [2.6.2.2.1.3]¹⁵⁾。したがって、エテルカルセチドは、CaSR の Cys 482 に、分子内の D-Cys を介してジスルフィド結合し、アロステリック効果により細胞外 Ca の作用を増強すると考えられた (図 2.4.2.1.1-1)。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

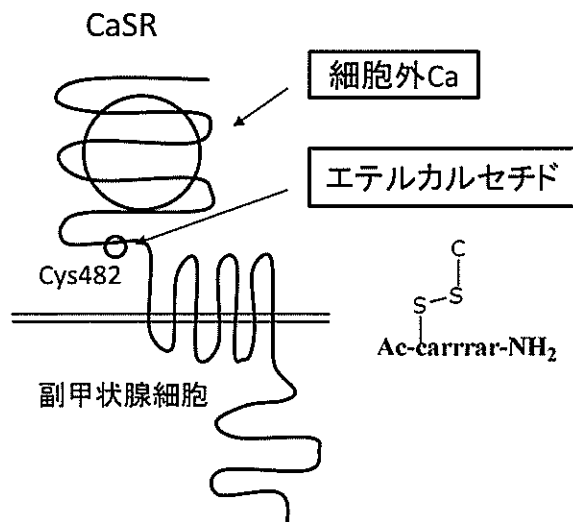


図 2.4.2.1.1-1 エテルカルセチドの推定作用機序^{15) 16)}

エテルカルセチドの D-Cys と CaSR の Cys 482 がジスルフィド結合し、アロステリック効果により細胞外 Ca の作用を増強すると考えられた。

S-S: ジスルフィド結合, a: D-Ala, C: L-Cys, c: D-Cys, r: D-Arg

2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

エテルカルセチドは、正常イヌの血漿 PTH を単回静脈内投与により速やかに低下させ [2.6.2.2.2.1]，その作用持続は血漿中エテルカルセチド濃度と相関した [2.6.2.2.2.1]。正常ラット，急性及び慢性腎障害ラットにおいても，エテルカルセチドは単回静脈内投与により速やかに血漿 PTH を低下させた [2.6.2.2.2.2, 2.6.2.2.2.3, 2.6.2.2.2.4]。慢性腎障害ラットにおいて，エテルカルセチドは予防的あるいは治療的反復投与により血中の PTH を低下させた [2.6.2.2.2.5, 2.6.2.2.2.6, 2.6.2.2.2.7, 2.6.2.2.2.8, 2.6.2.2.2.9, 2.6.2.2.2.10]。また，エテルカルセチドは，正常イヌ，急性及び慢性腎障害ラットの血清 Ca を，血漿 PTH と同様に低下させた [2.6.2.2.2.1, 2.6.2.2.2.3, 2.6.2.2.2.4, 2.6.2.2.2.5]。

エテルカルセチドは慢性腎障害ラットの副甲状腺細胞増殖及び副甲状腺重量の増加を抑制した [2.6.2.2.2.6, 2.6.2.2.2.8, 2.6.2.2.2.10]。これらの効果は，SHPT 病態発症後からの治療的投与においても認められた。したがって，エテルカルセチドは臨床の SHPT 病態で形成される副甲状腺過形成を改善する効果が期待できる。

エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットの血管における組織中の Ca 及び P 含量を低下させた [2.6.2.2.2.7, 2.6.2.2.2.8]。したがって，エテルカルセチドは臨床の SHPT 病態で形成される血管での異所性石灰化を抑制する効果が期待できる。

エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットにおいて，骨代謝回転の指標である骨吸収及び骨形成パラメータを低下させた [2.6.2.2.2.9]。更に，エテルカルセチドは治療的投与により，慢性腎障害ラットにおける皮質骨多孔率，最大荷重，破断エネルギー及び靱性を改善した

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

[2.6.2.2.2.10] . したがって、エテルカルセチドは臨床の SHPT 病態で発現する高代謝回転型骨障害を改善し、骨強度の低下を抑制する効果が期待できる。

エテルカルセチドの SHPT 病態に対するこれら一連の作用は、エテルカルセチドが CaSR を介して血中 PTH 並びに Ca を低下させた結果と考えられた。シナカルセト塩酸塩においては基礎だけでなく¹⁴⁾、臨床においても副甲状腺過形成⁶⁾及び骨障害¹⁷⁾に対する抑制作用に加えて、血管石灰化の抑制作用¹⁸⁾が報告されている。以上より、エテルカルセチドも臨床において、CaSR 作動活性を介して血中 PTH 並びに Ca を低下させることで、SHPT における各病態に対する治療効果を発揮すると期待される。

2.4.2.2 副次的薬理試験

In situ ハイブリダイゼーション法あるいは RNA sequence 法を用いて、各種動物組織における CaSR の mRNA の発現を検討した。マウスでは、副甲状腺の他、腎尿細管ヘンレループの太い上行脚及び膵島細胞などに発現が認められた [2.6.2.3.1.1, 2.6.2.3.1.2] . ラットでは、副甲状腺/甲状腺複合組織及び腎臓において CaSR の発現が認められた [2.6.2.3.1.2] . カニクイザルでは、副甲状腺の他、腎尿細管ヘンレループの太い上行脚、視床下部、十二指腸 (Brunner 腺、陰窩及び絨毛) 及び膵島細胞などに発現が認められた [2.6.2.3.1.1, 2.6.2.3.1.2] .

更に、ヒトでは、副甲状腺/甲状腺複合組織、膵臓 (膵頭、膵ランゲルハンス島及び膵尾部)、十二指腸、空腸及び腎臓 (腎皮質及び腎髄質) において発現が認められた [2.6.2.3.1.2] .

合計 34 種類の受容体、チャネル及びトランスポーターに対するリガンド結合実験の結果、エテルカルセチドは 10 μ mol/L の濃度で、ムスカリン M₂ 受容体、シグマ σ_2 受容体及びアドレナリン α_{1A} 受容体に対して、30% 以上のリガンド結合阻害率を示したが、結合阻害率が 50% を超える標的分子はなかった [2.6.2.3.2] .

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験のコアバッテリー試験として、*in vitro* で hERG チャネル電流に対する作用 [2.6.2.4.2.1] を評価し、イヌを用いて中枢神経系 [2.6.2.4.1]、心血管系 [2.6.2.4.2.2] 及び呼吸系 [2.6.2.4.3] に対する作用を評価した。また、補足的安全性薬理試験として、*in vitro* でヒト血液を用いた溶血性に対する作用 [2.6.2.4.4.1, 2.6.2.4.4.2] を評価した。

イヌにエテルカルセチドを単回静脈内急速投与した結果、1.5 mg/kg で血清 Ca が約 30% 低下し、これに伴い中枢神経系では振戦や体温上昇が認められ、心血管系では QTc の延長、一過性の心拍数増加及び血圧上昇が認められた。いずれの変化も Ca の補充又は血清 Ca の

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

回復により軽減又は消失した。エテルカルセチドは *in vitro* で最高濃度の 10 μ g/mL まで hERG チャンネル電流に影響しなかったことから、エテルカルセチドの QTc 延長は hERG チャンネル阻害に基づく影響ではないと考えられた。また、エテルカルセチドは 1.5 mg/kg まで呼吸数及び血液ガスに影響せず、呼吸系に対して作用を示さなかった。以上より、エテルカルセチドの中樞神経系及び心血管系に対する無影響量は 0.3 mg/kg、呼吸系に対する無影響量は 1.5 mg/kg であった。

エテルカルセチドは、最高濃度の 30 mg/mL までヒト血液に対して溶血性を示さなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

エテルカルセチドとシナカルセト塩酸塩との併用効果を、ヒト CaSR 強制発現細胞における細胞内 IP-1 含量を指標に検討した結果、相加的に細胞内 IP-1 含量は増加した [2.6.2.5.1]。したがって、エテルカルセチドとシナカルセト塩酸塩との併用は CaSR を相加的に活性化すると考えられた。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

[¹⁴C]エテルカルセチドを正常ラットに単回静脈内急速投与したときの血漿中放射能の T1/2 は 5.78 時間であった。一方、両腎摘ラットにおける T1/2 は 23.1 時間に遅延した [2.6.4.3.2.1]。正常ラット及び両腎摘ラットにエテルカルセチドを単回静脈内急速投与したときの血漿中エテルカルセチド濃度は投与量に比例して増加し、両腎摘ラットにおける全身 CL は、正常ラットの 0.3 倍であった [2.6.4.3.2.1]。したがって、エテルカルセチドの血中からの消失には腎 CL の寄与が大きいと考えられた。

エテルカルセチドをラット及びイヌに反復静脈内急速投与したときの血漿中エテルカルセチド濃度は、それぞれ投与量に比例して増加した [2.6.4.3.3.1, 2.6.4.3.3.2]。ラットの血漿中エテルカルセチド濃度推移は雄に比べて雌で若干高かったものの、イヌでは雌雄間で差はなかった。エテルカルセチドをラット又はイヌに、6 カ月間又は 9 カ月間反復静脈内急速投与したときの血漿中エテルカルセチド濃度に顕著な蓄積性は認められなかった。

2.4.3.2 分布

[¹⁴C]エテルカルセチドをラットに単回静脈内急速投与したとき、血漿を含む多くの組織で投与後 1 時間までに Cmax を示し、血球、中枢組織及び生殖器における放射能分布は低かった [2.6.4.4.1.1, 2.6.4.4.1.2]。骨端線、軟骨、腎臓などで、血漿と比較して高濃度の放射能が分布し、ハーダー氏腺、甲状腺、骨髄などで T1/2 が血漿より長かった。メラニンに対する親和性は低く、放射能組織分布に性差は認められなかった。また、エテルカルセチドを妊娠ラットに反復静脈内急速投与したときの胎児移行性は低かった [2.6.4.4.4]。

エテルカルセチド (50~10000 ng/mL) の非共有結合による *in vitro* 血漿蛋白結合率は、ラットで 16~28%、イヌで 30~39%、健康成人で 42~52% 及び CKD 患者で 37~44% であり低かった [2.6.4.4.2]。また、血球移行性も低かった。血中のエテルカルセチドは可逆的な共有結合によって大部分が血清アルブミンとの複合体 (SAPC) を形成した。血中に多く存在する SAPC は、エテルカルセチドを体内にプールする役割を担っていると考えられた。

2.4.3.3 代謝

エテルカルセチドは、CYP などの代謝酵素による影響をほとんど受けず、分子内ジスルフィド結合と生体内 SH 基含有物質との可逆的なジスルフィド交換反応により、非酵素的に種々の物質に変換された。ラット及びヒトの肝及び腎試料では、グルタチオン抱合体 (M10)、L-Cys が脱離した D-アミノ酸ペプチド体 (M11)、M11 の二量体 (M12) などが認められた [2.6.4.5.2]。ラット及びヒトの血液試料中で最も多く認められた生体内変換物

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

質は SAPC であった [2.6.4.5.3]。ヒトで検出された生体内変換物質はラットでも認められ、種差はなかった。生体内変換物質を還元処理すると M11 に変換され、ほとんどの生体内変換物質では主活性部位である D-アミノ酸ペプチド骨格が保持されていることが示された (図 2.4.3.3-1)。[¹⁴C]エテルカルセチドをラットに単回静脈内急速投与したときの血漿中には、*in vitro* 試験と同じ生体内変換物質が認められた [2.6.4.5.5]。エテルカルセチドから SAPC 及びそれ以外の生体内変換物質の生成速度定数はその逆反応よりも大きかった [2.6.4.8.1]。

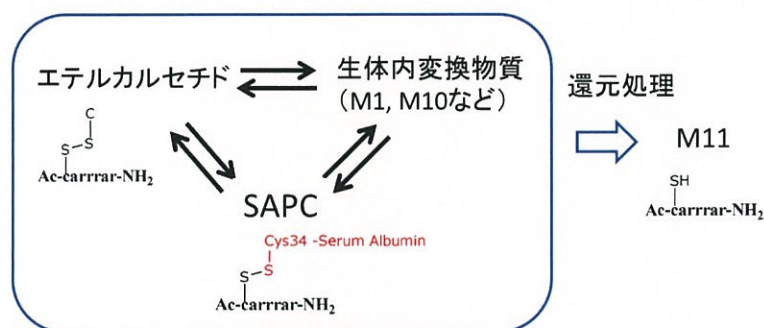


図 2.4.3.3-1 エテルカルセチドの生体内変換プロファイル
S-S: ジスルフィド結合, a: D-Ala, C: L-Cys, c: D-Cys, r: D-Arg

2.4.3.4 排泄

[¹⁴C]エテルカルセチドをラットに単回静脈内急速投与したとき、投与した放射能の約 80%が尿中に排泄された [2.6.4.5.5, 2.6.4.6.1]。一方、両腎摘ラットでは投与した放射能はほとんど排泄されず、主排泄経路は腎排泄であった。*In vitro* 透析試験では、血漿蛋白非結合型の成分が透析回路を通じて速やかに除去された [2.6.4.8.2]。エテルカルセチドは CKD 患者の体内から血液透析により除去されると考えられた。

[¹⁴C]エテルカルセチドを授乳中雌ラットに単回静脈内急速投与したとき、乳汁中に放射能が確認された [2.6.4.6.2]。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

エテルカルセチドは CYP などの代謝酵素による影響をほとんど受けなかった。更に、エテルカルセチドは CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 及び CYP3A) に対して阻害作用を示さず [2.6.4.7.1]、CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4) に対する誘導作用も示さなかった [2.6.4.7.2]。また、エテルカルセチドはトランスポーター (P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1, OAT3, PEPT1 又は PEPT2) の基質ではなく、トランスポーター (P-gp, BCRP,

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1, OAT3 又は BSEP) に対する阻害作用を示さなかった [2.6.4.7.3, 2.6.4.7.4] . 以上から, エテルカルセチドは薬物動態学的薬物相互作用を引き起こさないと考えられた.

2.4 非臨床試験の概括評価

エテルカルセチド塩酸塩

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

エテルカルセチドの単回投与毒性試験を実施しなかったが、臨床適用経路である静脈内投与により実施したラット及びイヌの7日間反復投与毒性試験 [2.6.6.3.1, 2.6.6.3.5] 及びラット小核試験の用量設定試験 [2.6.6.4.3.1] の投与初期の所見に基づき、エテルカルセチドの急性毒性を評価した。ラット及びイヌに0.5, 2及び5 mg/kgを静脈内急速投与した結果、初回投与後より投与量に応じた血清Caの低値が認められ、イヌでは2 mg/kg以上で顕著な血清Caの低下に伴い、振戦、痙攣や嘔吐などが認められた。また、ラットに5, 7.5, 10及び12.5 mg/kgを静脈内持続投与した結果、初回投与後より7.5 mg/kg以上で嗜眠、立毛及び死亡例が認められた。ラット及びイヌの静脈内投与による概略の致死量は、それぞれ7.5 mg/kg及び5 mg/kgを超える量であると判断した。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

エテルカルセチドの反復投与毒性試験は雌雄のラット及びイヌを用い、ラットでは1日1回、静脈内急速投与により最長6カ月間まで反復投与し、イヌでは2日に1回、静脈内急速投与により最長6カ月間まで反復投与した。いずれの試験においても、エテルカルセチドの投与により生じた毒性変化は血清Caの低下による直接的あるいは二次的な影響であり、休薬により回復する可逆的な変化であった。

ラットにエテルカルセチドを6カ月間反復投与（投与量：0.3, 1及び3 mg/kg）した結果 [2.6.6.3.4]、本薬の薬理作用に基づき、0.3 mg/kg以上で血清Caの低値及び血清Pの高値が認められた。3 mg/kgでは顕著な血清Caの低下に伴い、振戦、自発運動減少、平伏姿勢、摂餌量の減少や体重増加抑制などが認められ、雄1例を痙攣のため切迫剖検した。その他、血清Caの低下によるストレスに関連して、1 mg/kg以上で好中球数の高値及び脾臓重量の低値、3 mg/kgでリンパ球数の低値、胃粘膜のびらんなども認められた。0.3及び1 mg/kgで認められた変化はいずれも軽微な変化であり、薬理作用に伴う二次的な変化であったことから、ラットにおける無毒性量は雌雄ともに1 mg/kgと判断した。

イヌにエテルカルセチドを6カ月間反復投与（投与量：0.2, 0.5及び0.9 mg/kg）した結果 [2.6.6.3.7]、本薬の薬理作用に基づき、0.2 mg/kg以上で血清Caの低値及び血清Pの高値が認められた。0.5 mg/kg以上では顕著な血清Caの低下に伴い、嘔吐、流涎、摂餌の減少、体重増加抑制やQTcの延長（最大14%の延長）などが認められ、0.9 mg/kgでは振戦も認められた。0.2 mg/kgで認められた変化は薬理作用による軽度な血清Ca及びPの変動であったことから、イヌにおける無毒性量は雌雄ともに0.2 mg/kgと判断した。

2.4 非臨床試験の概括評価

エテルカルセチド塩酸塩

その他、上記のラット及びイヌの毒性試験では、腎臓の尿細管上皮に褐色色素沈着が認められたが、尿細管に傷害性変化は認められず、腎機能への影響も認められなかったことから、毒性学的意義はないと判断した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

Ames 試験 [2.6.6.4.1.1] において一部の菌株で陽性反応が認められたが、エテルカルセチド分子内の SH 基に起因した反応と推察された (2.4.4.7.1)。チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K₁ 細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT 試験) [2.6.6.4.2.2] 及びトランスジェニックマウス (Muta マウス) を用いた遺伝子突然変異試験 [2.6.6.4.3.2] の結果はいずれも陰性であったことから、エテルカルセチドはほ乳類細胞において遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断した。また、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 [2.6.6.4.2.1] 及びラットを用いた小核試験 [2.6.6.4.3.1] の結果はいずれも陰性であった。以上のことから、エテルカルセチドはヒトにおいて遺伝毒性を示さないと判断した。

2.4.4.4 がん原性試験

Tg.rasH2 マウスを用いた 26 週間のがん原性試験 [2.6.6.5.2] 及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験 [2.6.6.5.5] を 1 日 1 回の皮下投与により実施した。いずれの試験も最大耐量まで投与したが、エテルカルセチドはがん原性を示さなかった。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ラットを用いて受胎能及び初期胚発生に対する影響 [2.6.6.6.4] を評価した (投与量: 0.75, 1.5 及び 3 mg/kg)。その結果、雌雄ともに 1.5 mg/kg 以上で血清 Ca の低下が原因と考えられる振戦が認められたが、エテルカルセチドは受胎能及び初期胚発生に対する影響を示さなかった。受胎能及び初期胚発生に対する無毒性量は雌雄ともに 3 mg/kg であった。

ラット及びウサギを用いて胚・胎児発生に対する影響 [2.6.6.6.4, 2.6.6.6.7] を評価した (投与量: 0.75, 1.5 及び 3 mg/kg (ラット), 0.375, 0.75 及び 1.5 mg/kg (ウサギ))。その結果、妊娠動物への影響として、ラットでは 3 mg/kg で妊娠動物の体重増加抑制、摂餌量の減少及び性周期の延長が認められ、ウサギでは 1.5 mg/kg 以上で妊娠動物の体重増加抑制や摂餌量の減少などが認められたが、エテルカルセチドはいずれの動物種においても催奇形性や胚・胎児発生に対する影響を示さなかった。また、これらの用量設定試験 [2.6.6.6.2, 2.6.6.6.5] では、ラットの 4.5 mg/kg, ウサギの 2.25 mg/kg 以上で過度な薬理作用により母動物の死亡や流産が認められ、胎児体重の低値も認められたが、催奇形性は認められなかった。ラット及びウサギの胚・胎児発生に対する無毒性量はそれぞれ 3 及び 1.5 mg/kg であった。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

ラットを用いて出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する影響 [2.6.6.6.8] を評価した (投与量 : 0.75, 1.5 及び 3 mg/kg) . その結果, 1.5 mg/kg 以上で妊娠期間がわずかに延長し, 妊娠後期から授乳期間の母動物で振戦, 3 mg/kg で体重増加抑制や摂餌量の減少が認められた. 母動物への影響に伴い, 1.5 mg/kg 以上で授乳中の出生児の体重増加抑制, 3 mg/kg で生産児数及び授乳期間初期の出生児生存率の低値が認められたが, 離乳後の出生児の体重推移に影響は認められず, 出生児の性成熟, 行動機能や生殖機能に対する影響も認められなかった. エテルカルセチドの母体機能並びに出生児の生存及び発育に対する無毒性量はいずれも 0.75 mg/kg であり, 出生児の性成熟, 行動機能及び生殖機能に対する無毒性量は 3 mg/kg であった.

2.4.4.6 局所刺激性試験

エテルカルセチドを 5 mg/mL の濃度でイヌの静脈内及び静脈周囲の皮下に単回投与し, 投与部位の Draize 変法による観察, 剖検及び病理組織学的検査により, 局所刺激性を評価した [2.6.6.7.1] . その結果, エテルカルセチドは静脈内及び静脈周囲皮下において 5 mg/mL の濃度で局所刺激性を示さなかった.

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 エテルカルセチドの Ames 試験での陽性反応に対する機序検討

エテルカルセチドは Ames 試験で *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535 に対して陽性反応を示した [2.6.6.4.1.1] . エテルカルセチドは分子内に SH 基を有している. L-Cys やグルタチオンなどの分子内に SH 基を有するアミノ酸及びペプチドは TA100 で Ames 陽性反応を示し^{19) ~24)}, この陽性反応には SH 基を介した活性酸素種の生成が関与することが示唆されている^{25) 26)}. エテルカルセチドから SH 基 (D-Cys 又は L-Cys) を脱離させることで, エテルカルセチドの TA1535 に対する Ames 陽性反応は消失又は減弱し [2.6.6.8.4.1] , また活性酸素種を生成する酸化剤であるグリオキサールは, 活性酸素種の生成に起因して TA1535 に対する Ames 陽性反応を誘発した [2.6.6.8.4.5] . したがって, エテルカルセチドの Ames 陽性反応は, その分子内の SH 基を介して活性酸素種を生成したことに起因すると考えられ, ヒトで発がん性の懸念のないアミノ酸やペプチドでも細菌で特異的に認められる変化であることから, ヒトに対する遺伝毒性リスクを示唆するものではないと考えられた.

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

2.4.4.7.2 代謝物の安全性評価

エテルカルセチドは代謝酵素による影響をほとんど受けず、ヒト血漿中にエテルカルセチド関連物質の総曝露量の10%を超えるヒト代謝物は存在しなかったことから、ICH M3 (R2) ガイダンスに基づき、代謝物の毒性試験を実施しなかった。

なお、血中のエテルカルセチドの一部は非酵素的にアルブミンとの複合体である SACP に変換され、 $[^{14}\text{C}]$ エテルカルセチドを静脈内投与した CKD 患者の血漿中では総血漿中放射能濃度の約73%が SACP であった [2.7.2.2.3.4]。しかし、この複合体への変換はラットでも認められる可逆的な反応であり、エテルカルセチドの分布様式の一形態であると考えられた。非臨床試験及び臨床試験において、SACP の免疫原性を示唆する変化は認められなかった。また、臨床での血漿中エテルカルセチド濃度は血中アルブミン濃度の1/300以下であったことから、SACP がアルブミンの生理機能に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。SACP の CaSR 作動活性はエテルカルセチドの14%未満であり [2.6.2.3.3]、エテルカルセチドの薬理作用に基づく毒性を増強する可能性も低いと考えられた。以上のことから、SACP に安全性の懸念はないと判断した。

2.4.4.7.3 不純物の安全性評価

エテルカルセチド塩酸塩の原薬及び製剤中に含まれる可能性のある不純物のうち、規格として ICH Q3A「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」（医薬審発第1216001号、平成14年12月16日）及び ICH Q3B「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」（医薬審発第0624001号、平成15年6月24日）の安全性確認の閾値を超える不純物及び分解物は、ホモダイマー、脱アミド体、*不純物B 並びに*不純物C 及び*不純物D であった。これら不純物を含有する原薬を用いて、ラットにおける4週間反復投与毒性試験を静脈内急速投与により実施した結果、不純物特有の毒性変化は認められなかった [2.6.6.8.7.1]。また、これら不純物はいずれも [REDACTED] ことから、申請者は遺伝毒性の懸念はないと判断し、機構相談 [1.13.2.1.2] においても了承を得ている。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

2.4.5 総括及び結論

エテルカルセチドは、副甲状腺細胞表面に存在する CaSR を作動して PTH 分泌を抑制する CaSR 作動薬である。エテルカルセチドは、慢性腎障害ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca を低下させ、副甲状腺の過形成、骨障害を抑制するとともに、血管での異所性石灰化を抑制した。

エテルカルセチドは、CaSR 以外の受容体、チャネル及びトランスポーター合計 34 種に対して明らかな結合親和性を示さず、CaSR に対する高い選択性を示した。安全性薬理試験では、振戦や QTc 延長などが認められたが、いずれも顕著な血清 Ca の低下に起因した変化であった。

正常ラットの尿中には未変化体が排泄され、両腎摘ラットのエテルカルセチドの全身 CL は正常ラットと比べて著しく低下したことから、エテルカルセチドの消失には腎 CL の寄与が大きかった。エテルカルセチドの主活性部位は D-アミノ酸ペプチドで構成され生体内でほとんど代謝の影響を受けないため、両腎摘ラットにおいて血中に安定して維持された。これらのことは、血液透析下の SHPT 患者においてエテルカルセチドは透析により除去され、透析終了後から次の透析処置までエテルカルセチドの血漿中濃度が維持されることと一致している。エテルカルセチドは L-Cys-D-Cys 部位のジスルフィド結合部位と生体内 SH 基含有物質との非酵素的かつ可逆的なジスルフィド交換反応により、種々の物質に変換される。主な生体内変換物質は SAPC であった。ヒト血中において、エテルカルセチドと SAPC を含む生体内変換物質の濃度は平衡状態にあり、血液透析によりエテルカルセチドの血漿中濃度が低下すると、SAPC の D-アミノ酸ペプチド体はジスルフィド交換反応により未変化体に変換されると考えられた。エテルカルセチドは CYP に対して阻害及び誘導作用を示さず、更にトランスポーターの基質にならず阻害作用も示さないことから、臨床における薬物動態学的相互作用の懸念の低い薬剤であった。

ラット及びイヌを用いた毒性試験では、エテルカルセチドの薬理作用に基づき、血清 Ca の低下による直接的あるいは二次的な影響が認められた。主な毒性変化として、振戦、嘔吐、痙攣などの一般状態変化や QTc の延長が認められた。また、持続的な血清 Ca の低下によるストレスに関連して、摂餌量の減少や体重増加抑制などが認められた。いずれも可逆的かつ長期投与により増悪しない変化であり、毒性所見に明らかな性差や種差は認められなかった。ラット及びイヌの反復投与毒性試験の無毒性量はそれぞれ 1 及び 0.2 mg/kg であり、臨床での最大用量における曝露を下回ったが、いずれの毒性変化も血清 Ca の低下に基づくものであり、臨床では血清 Ca をモニターし、低カルシウム血症の症状に留意することで、安全に使用することが可能と考える。また、エテルカルセチドは 5 mg/mL の濃度まで局所刺激性を示さず、臨床で経管的に投与した際に局所刺激性が発現する可能性は低いと考える。

2.4 非臨床試験の概括評価 エテルカルセチド塩酸塩

エテルカルセチドは、ほ乳類を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の遺伝子突然変異試験、染色体異常試験並びに小核試験において陰性を示したことから、ヒトにおける遺伝毒性の懸念はないと判断した。また、エテルカルセチドは Tg.rasH2 マウス及びラットにおいてがん原性を示さなかった。

エテルカルセチドは、ラットにおいて受胎能に影響せず、ラット及びウサギにおいて催奇形性や胚・胎児発生に対する直接的な影響を示さなかった。母動物では血清 Ca の低下に伴う振戦、体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められ、これに伴い生産児数及びその生存率のわずかな低値や授乳期間中の出生児の一過性の体重増加抑制が認められた。また、母動物の妊娠期間のわずかな延長も認められた。しかし、離乳後の出生児の体重推移は正常であり、出生児の性成熟、行動機能、生殖機能に対する影響や母体機能への直接的な影響は認められなかった。また、エテルカルセチドは、授乳期の母動物への投与により乳汁移行が認められている。妊婦への投与は治療上の有益性が危険性を上回ると判断される場合のみとし、授乳婦に対しては授乳を中止させるべきである。

エテルカルセチド塩酸塩は、世界初の注射剤の CaSR 作動薬である。エテルカルセチドは、CaSR 作動活性により血漿 PTH 及び血清 Ca を低下させ、副甲状腺過形成、骨障害を抑制するとともに、血管での異所性石灰化を抑制した。エテルカルセチドの消失には腎 CL の寄与が大きく、代謝を受けにくいいため、腎臓を摘出した動物においては血漿中濃度は長時間持続した。血液透析下の SHPT 患者に透析後に投薬すると、次回透析まで血漿中濃度の持続が認められている。エテルカルセチドは、投薬に際して薬物動態学的相互作用に特段の留意を必要とせず、期待した薬効を安定して得ることが可能である。血清 Ca の低下に伴う毒性変化が認められたことから、臨床では血清 Ca をモニターしつつ、低カルシウム血症の症状に注意しながら、安全に使用することが可能と考えられる。

以上の非臨床成績から、エテルカルセチド塩酸塩は、血液透析下の SHPT 患者に対する有効な治療薬となることが期待できる。

2.4.6 参考文献

- 1) 社団法人日本透析医学会. 慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン. 日本透析医学会雑誌. 2012;45:301-56.
- 2) Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. Association of Elevated Serum PO_4 , $Ca \times PO_4$ Product, and Parathyroid Hormone with Cardiac Mortality Risk in Chronic Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2131-8.
- 3) Kimata N, Albert JM, Akiba T, Yamazaki S, Kawaguchi Y, Fukuhara S, et al. Association of mineral metabolism factors with all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients: The Japan dialysis outcomes and practice patterns study. *Hemodial Int*. 2007;11:340-8.
- 4) Coburn JW, Salusky IB, Norris KC, Goodman WG. Oral and Parenteral Calcitriol for the Management of End-Stage Renal Disease. *Contrib Nephrol* 1991;90:166-82.
- 5) Slatopolsky E, Finch J, Brown A. New vitamin D analogs. *Kidney Int*. 2003;63(Suppl85):S83-7.
- 6) Komaba H, Nakanishi S, Fujimori A, Tanaka M, Shin J, Shibuya K, et al. Cinacalcet Effectively Reduces Parathyroid Hormone Secretion and Gland Volume Regardless of Pretreatment Gland Size in Patients with Secondary Hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:2305-14.
- 7) 永野伸郎. 副甲状腺ホルモン分泌制御薬 : calcimimetics. *ホルモンと臨床*. 2007;55:649-55.
- 8) Wheeler DC, London GM, Parfrey PS, Block GA, Correa-Rotter R, Dehmel B, et al. Effects of Cinacalcet on Atherosclerotic and Nonatherosclerotic Cardiovascular Events in Patients Receiving Hemodialysis: the Evaluation Of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) trial. *J Am Heart Assoc*:2014;3:e001363.
- 9) 小岩文彦, 広瀬真. Cinacalcet による CKD-MBD 治療アルゴリズムと適切な投与方法. 医学図書出版. 2009;透析療法ネクストIX:98-109.
- 10) 伊達敏行. Cinacalcet の副作用とその対策. 医学図書出版. 2009;透析療法ネクストIX:123-32.
- 11) シナカルセチド塩酸塩 (レグパラ錠 12.5 mg, 25 mg, 75 mg. 協和発酵キリン株式会社), 医薬品インタビューフォーム. 2015年6月改訂
- 12) シナカルセチド塩酸塩, 審議結果報告書. 平成19年8月15日
- 13) Walter S, Baruch A, Dong J, Tomlinson JE, Alexander ST, Janes J, et al. Pharmacology of AMG 416 (Velcalcetide), a Novel Peptide Agonist of the Calcium-Sensing Receptor, for the

2.4 非臨床試験の概括評価
エテルカルセチド塩酸塩

- Treatment of Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis Patients. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;346:229-40.
- 14) 永野伸郎, 川田剛央, 和田倫斉. カルシウム受容体作動薬 (calcimimetics) の薬理・臨床試験成績 ; 維持透析下の二次性副甲状腺機能亢進症治療薬 (シナカルセト塩酸塩, レグパラ錠) . *日薬理誌.* 2008;132:301-8.
 - 15) Alexander ST, Hunter T, Walter S, Dong J, Maclean D, Baruch A, et al. Critical Cysteine Residues in Both the Calcium-Sensing Receptor and the Allosteric Activator AMG 416 Underlie the Mechanism of Action. *Mol Pharmacol.* 2015;88:853-65.
 - 16) Huang Y, Zhou Y, Castiblanco A, Yang W, Brown EM, Yang JJ. Multiple Ca²⁺-Binding Sites in the Extracellular Domain of the Ca²⁺-Sensing Receptor Corresponding to Cooperative Ca²⁺ Response. *Biochemistry.* 2009;48:388-98.
 - 17) Cunningham J, Danese M, Olson K, Klassen P, Chertow GM. Effects of the calcimimetic cinacalcet HCl on cardiovascular disease, fracture, and health-related quality of life in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2005;68:1793-800.
 - 18) Raggi P, Chertow GM, Torres PU, Csiky B, Naso A, Nossuli K, et al. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:1327-39.
 - 19) Glatt H, Protic-Sablji CM, Oesch F. Mutagenicity of Glutathione and Cysteine in the Ames Test. *Science.* 1983;220:961-3.
 - 20) Glatt H. Mutagenicity spectra in *Salmonella typhimurium* strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. *Mutagenesis.* 1989;4:221-7.
 - 21) Glatt H, Oesch F. Mutagenicity of Cysteine and Penicillamine and Its Enantiomeric Selectivity. *Biochem Pharmacol.* 1985;34:3725-8.
 - 22) Glatt H, Utesch D, Herbst M, Oesch F. Mutagenicity experiments on L-cysteine and D-penicillamine using V79 cells as indicators and for metabolic activation. *Mutat Res.* 1990;243:187-93.
 - 23) Ross D, Moldeus P, Sies H, Smith MT. Mechanism and relevance of glutathione mutagenicity. *Mutat Res.* 1986;175:127-31.
 - 24) Yamaguchi T, Yamashita Y. Activating Effect of Several Enzyme-Proteins on the Mutagenicity of Amino-thiol Compounds. *Agric Biol Chem.* 1981;45:2157-60.
 - 25) Stark AA, Pagano DA, Glass G, Kamin-Belsky N, Zeiger E. The effects of antioxidants and enzymes involved in glutathione metabolism on mutagenesis by glutathione and L-cysteine. *Mutat Res.* 1994;308:215-22.

2.4 非臨床試験の概括評価
エテルカルセチド塩酸塩

- 26) Stark AA, Zeiger E, Pagano DA. Glutathione mutagenesis in *Salmonella typhimurium* is a Gamma-glutamyltranspeptidase-enhanced process involving active oxygen species. *Carcinogenesis*. 1988;9:771-7.