2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

小野薬品工業株式会社

目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 構造及び薬理学的特性 4
2.6.1.2 効能・効果及び用法・用量 5
2.6.1.3 参考文献 6

2.6.1 緒言
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
Ala	アラニン
Arg	アルギニン
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
Cys	システイン
PTH	副甲状腺ホルモン
SHPT	二次性副甲状腺機能亢進症

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 構造及び薬理学的特性

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，CaSR に対するアロステリック効果により細胞外の Ca の作用を増強し，副甲状腺細胞表面の CaSR を作動して PTH の分泌を抑制する SHPT 治療薬である．

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．エテルカルセチド塩酸塩の化学名を以下に示す．

N-Acetyl-*S*-[(2*R*)-2-amino-2-carboxyethylsulfanyl]-D-cysteinyl-D-alanyl-D-arginyl-D-arginyl-D-arginyl-D-alanyl-D-argininamide hydrochloride

エテルカルセチド塩酸塩の化学構造を図 2.6.1.1-1 に示す．

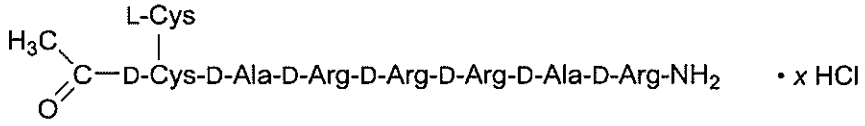


図 2.6.1.1-1 エテルカルセチド塩酸塩の化学構造

エテルカルセチド塩酸塩は CaSR を作動し，血液透析下の 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．更には，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．

CaSR は，G-蛋白共役受容体であり，活性化により細胞内 Ca を増加させ，PTH の分泌を制御する[1]．PTH の過剰分泌は，骨組織からは血中への Ca や P の放出を亢進し，消化管からは PTH の刺激により Ca 及び P の吸収を亢進し，血中の Ca，P 及び Ca×P 積を増加させる[2]．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，持続的に血中で過剰になった Ca と P による異所性石灰化を起こし，心筋の機能異常や動脈硬化などの生命予後に重大な影響を与える疾患へと繋がる[3] [4]．

エテルカルセチド塩酸塩は，主活性部位の D-アミノ酸ペプチドが CaSR の 482 番目の Cys に可逆的に結合し，CaSR 作動活性を示す．その結果，血中 Ca を感知して PTH の分泌を抑制し，PTH の過剰分泌に伴う骨代謝異常とミネラル代謝異常を是正する．

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 に対する治療薬となることが期待される．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経管的に投与する注射剤である．エテルカルセチド塩酸塩は，国内では小野薬品工業株式会社が，また米国及び欧州では Amgen 社が，それぞれ開発を進めている．

2.6.1.2 効能・効果及び用法・用量

エテルカルセチド塩酸塩の効能・効果（案）及び用法・用量（案）を以下に示す．

・効能・効果（案）

血液透析下の二次性甲状腺機能亢進症

・用法・用量（案）

通常，成人には，エテルカルセチドとして 1 回 5 mg を開始用量とし，週 3 回，透析終了時の返血時に透析回路静脈側に注入する．

以後は，患者の PTH 及び血清カルシウム濃度の十分な観察のもと，1 回 2.5～15 mg の範囲内で適宜用量を調整し，週 3 回，透析終了時の返血時に投与する．

2.6.1.3 参考文献

1) Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+}-sensing receptor from bovine parathyroid. Nature 1993;366:575-80.

2) 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.

3) Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. Association of Elevated Serum PO_4, Ca x PO_4 Product, and Parathyroid Hormone with Cardiac Mortality Risk in Chronic Hemodialysis Patients. J Am Soc Nephrol. 2001;12:2131-8.

4) 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.

2.6.2 薬理試験の概要文

小野薬品工業株式会社

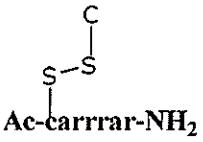
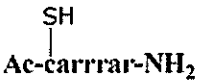
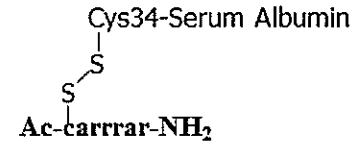
目次

2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
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 28
2.6.2.4 安全性薬理試験 30
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 35
2.6.2.6 考察及び結論 37
2.6.2.7 図表 40
2.6.2.8 参考文献 40

略号一覧

略号	略さない表現又は説明
1K1C	one-kidney one-clip
5/6 Nx	6 分の 5 腎臓摘出
BFR/BS	骨形成速度
BLQL	定量下限未満
BrdU	ブロモデオキシウリジン
CaSR	カルシウム受容体
CKD	慢性腎臓病
Cmax	最高濃度
Cxmin	投与後 x 分における濃度
Cys	システイン
Cys 482	482 番目のシステイン
EC_{50}	50%効果濃度
EGTA	グリコールエーテルジアミン四酢酸
FGF23	線維芽細胞増殖因子 23
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G タンパク質共役受容体
HEK 細胞	ヒト胎児由来腎臓細胞
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IP-1	イノシトール-1-リン酸
IP-3	イノシトール-1，4，5-三リン酸
Mlt	骨石灰化遅延時間
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
MS/BS	骨石灰化面
Oc.S/BS	破骨細胞面
OS/BS	類骨面
OV/BV	類骨量
PBS	リン酸緩衝生理食塩液
PTG	副甲状腺
PTH	副甲状腺ホルモン
QOL	クオリティ・オブ・ライフ
QTc	補正 QT
QTcF	Fridericia 法で補正した QT
RNA	リボ核酸
SD	Sprague-Dawley
Ser 482	482 番目のセリン
SHPT	二次性副甲状腺機能亢進症
Tyr	チロシン
Tyr 482	482 番目のチロシン
VD	ビタミン D

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		エテルカルセチド（フリー体），AMG 416，ONO-5163，KAI-4169，Velcalcetide
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-arrrar-NH_2**	KP-2067 の D-Cys を欠損した D-アミノ酸ペプチド体
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）
M10		ジスルフィド結合を介したグルタチオン抱合体

Ac-carrrar-NH_2 = *N*-Acetyl-D-cysteinyl-D-alanyl-D-arginyl-D-arginyl-D-arginyl-D-alanyl-D-argininamide，C＝L-Cys，S＝硫黄.

2.6.2 薬理試験の概要文

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が，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．

2.6.2.1 まとめ

薬理試験では *in vitro* 及び *in vivo* 試験でエテルカルセチドの作用を検討した．

In vitro 試験で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 含量を増加させた．一方，CaSR を強制発現していない親細胞には作用しなかった．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組織からの PTH 分泌を濃度依存的に抑制した．エテルカルセチドの CaSR 作動活性及び PTH 分泌抑制作用は細胞外 Ca 濃度に応じて発揮された．エテルカルセチドは，N 末端の D-Cys と CaSR の Cys 482 とのジスルフィド結合を介した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．

In vivo 試験でエテルカルセチドは，正常イヌにおいて，単回静脈内投与により速やかに血漿 PTH を低下させ，その作用は血漿中エテルカルセチド濃度の低下とともに消失した．また，エテルカルセチドは，正常イヌあるいは急性又は慢性腎障害ラットへの単回静脈内あるいは反復静脈内投与により，血中 PTH を低下させるとともに，血清 Ca を低下させた．更に，エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットへの反復皮下投与により血中 PTH を低下させることで，副甲状腺過形成，血管石灰化及び骨障害を抑制した．

エテルカルセチドは，34 種類の受容体，チャネル及びトランスポーターのリガンド結合に対して，10 μmol/L の濃度において，検討したいずれの分子標的に対しても結合阻害率が 50%を超える作用を示さなかった．

安全性薬理試験では，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を評価し，イヌを用いて中枢神経系，心血管系及び呼吸系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* でヒト血液を用いて溶血性に対する作用を評価した．評価資料とした試験はいずれも GLP に準拠して実施した．

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 で顕著な血清 Ca の低値が認められ，これに伴い振戦，QTc の延長，体温上昇，血圧及び心拍数の上昇などが認められた．一方，エテルカルセチドは呼吸数及び血液ガスに影響せず，hERG チャネル電流阻害やヒト血液に対する溶血性も示さなかった．以上より，エテルカルセチドの中枢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 であると判断した．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

In vitro ヒト 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，*in vitro* PTH 分泌抑制作用試験では，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．*In vivo* 試験では正常イヌ，正常ラット，急性及び慢性腎障害ラットを用いて血中 PTH 又は血清 Ca の低下作用を評価し，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抑制作用を評価した．

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 Ca に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-1］

ヒト CaSR 強制発現細胞（CaSR/HEK-293T 細胞）の細胞内 Ca に対するエテルカルセチドの作用を *in vitro* にて検討した．

CaSR/HEK-293T 細胞に，1.0 mmol/L の Ca 存在下でエテルカルセチドを添加し，細胞内 Ca を指標に CaSR 作動活性を評価した．

エテルカルセチドは，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の細胞内 Ca を増加させ，その EC_{50} 値は 0.53 μmol/L であった（図 2.6.2.2.1.1-1）．一方，CaSR を発現していない親細胞の HEK-293T 細胞に対して，エテルカルセチドは作用を示さなかった．

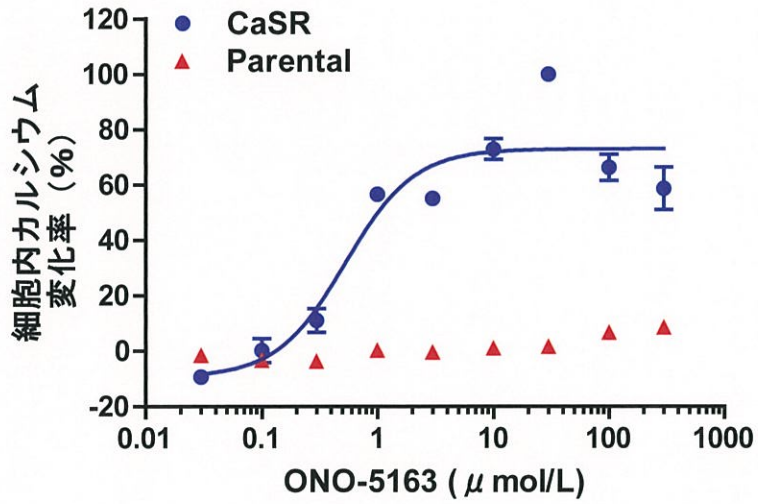


図 2.6.2.2.1.1-1 ヒト CaSR に対するエテルカルセチドの作用（指標：細胞内 Ca）
細胞内 Ca 変化率は平均値±標準誤差を示す．
ヒト CaSR 強制発現細胞（●，CaSR：n=3）及び親細胞（▲，Parental：n=3）
ONO-5163：エテルカルセチド

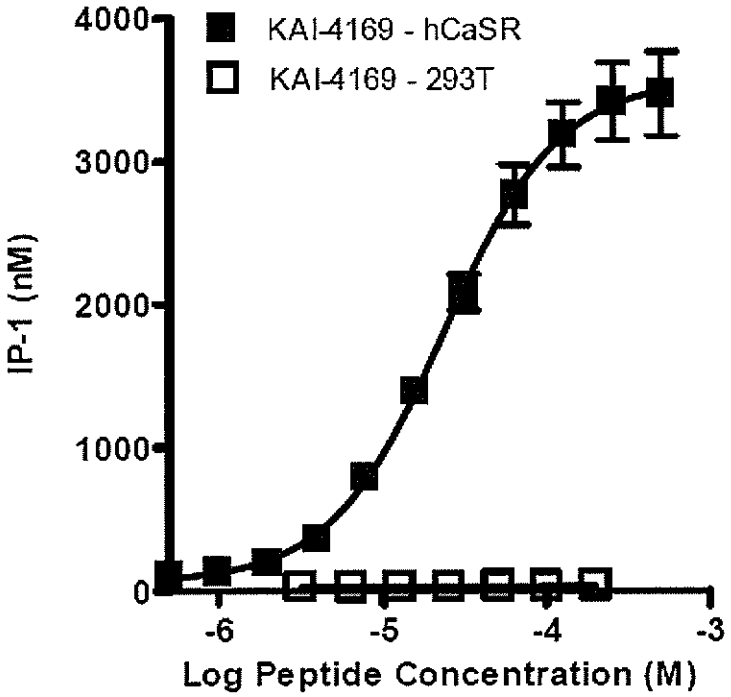
2.6.2.2.1.2　　ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 IP-1 含量に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-2］

ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 IP-1 含量に対するエテルカルセチドの作用を *in vitro* にて検討した.

CaSR/HEK-293T 細胞に，1.2 mmol/L の Ca 存在下又は非存在下でエテルカルセチドを添加し，細胞内情報伝達物質 IP-3 の代謝物である IP-1 の細胞内含量を指標に CaSR 作動活性を評価した.

Ca 存在下においてエテルカルセチドは，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の IP-1 含量を増加させ，その EC_{50} 値は 25 μmol/L であった（図 2.6.2.2.1.2-1）．一方，親細胞の HEK-293T 細胞に対して，エテルカルセチドは作用を示さなかった．また，エテルカルセチドは Ca 存在下では低濃度域から IP-1 含量を増加させたが，Ca 非存在下では高濃度域でのみわずかに IP-1 含量を増加させた [1)]．



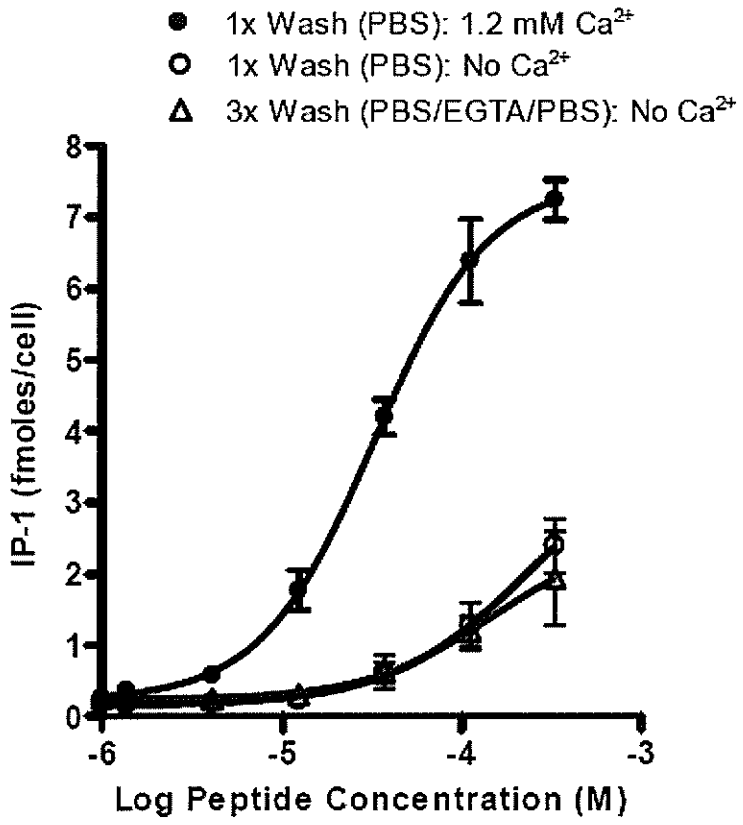


図 2.6.2.2.1.2-1　ヒト CaSR に対するエテルカルセチドの作用（指標：細胞内 IP-1）
IP-1 含量は平均値±標準誤差を示す．上図：CaSR/HEK-293T 細胞（■）と HEK-293T 細胞（□）との比較，下図：Ca 存在下（●）又は非存在下（○，△）での比較．KAI-4169：エテルカルセチド

2.6.2.2.1.3　　CaSR への結合様式

［評価資料：4.2.1.1-3］

エテルカルセチドの CaSR 作動活性に対する D-Cys 欠損の影響を検討した．

CaSR/HEK-293T 細胞に，1.2 mmol/L の Ca 存在下で，エテルカルセチドの D-アミノ酸ペプチド体（L-Cys 脱離体）である KP-2067，KP-2067 から更に D-Cys を欠損した KP-2140 あるいは細胞外 Ca を増加させる目的で用いた外因性 Ca（Ca リガンド）を添加し，IP-1 の細胞内含量を指標に CaSR 作動活性を評価した．

KP-2067 及び Ca リガンドは，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の IP-1 含量を増加させた（図 2.6.2.2.1.3-1）．一方，KP-2140 は IP-1 含量を増加させなかった．

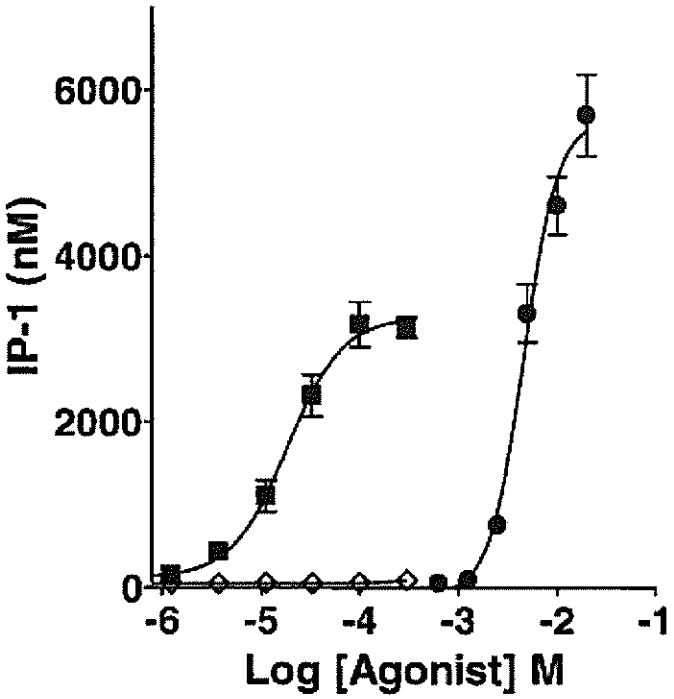


図 2.6.2.2.1.3-1　エテルカルセチドの CaSR 作動活性に対する D-Cys 欠損の影響
IP-1 含量は平均値±標準誤差を示す.
KP-2067（■），KP-2140（◇）及び Ca リガンド（●）

次に，エテルカルセチドのヒト CaSR に対する結合部位を検討した．エテルカルセチドをミニブタに投与しても，血清 Ca の低下作用が認められなかったことから，各動物種の CaSR とアミノ酸配列を比較したところ，ヒト，イヌ及びラットで保存されている 482 番目の Cys が，ミニブタでは，Tyr であった[2)]．そこで，ヒト CaSR の Cys 482 を，Ser 482 あるいは Tyr 482 に置換したヒト変異 CaSR を作製し，実験に供した.

ヒト CaSR（Cys 482）あるいはヒト変異 CaSR（Ser 482 あるいは Tyr 482）を発現させた HEK-293T 細胞に，1.2 mmol/L の Ca 存在下で Ca リガンドあるいはエテルカルセチドを添加し，IP-1 の細胞内含量を指標に CaSR 作動活性を評価した.

Ca リガンドは，添加濃度に応じてヒト CaSR 又はヒト変異 CaSR を強制発現させた各細胞の IP-1 含量を増加させた（図 2.6.2.2.1.3-2）．一方，エテルカルセチドは，ヒト CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量を増加させたが，ヒト変異 CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量は増加させなかった（図 2.6.2.2.1.3-2）.

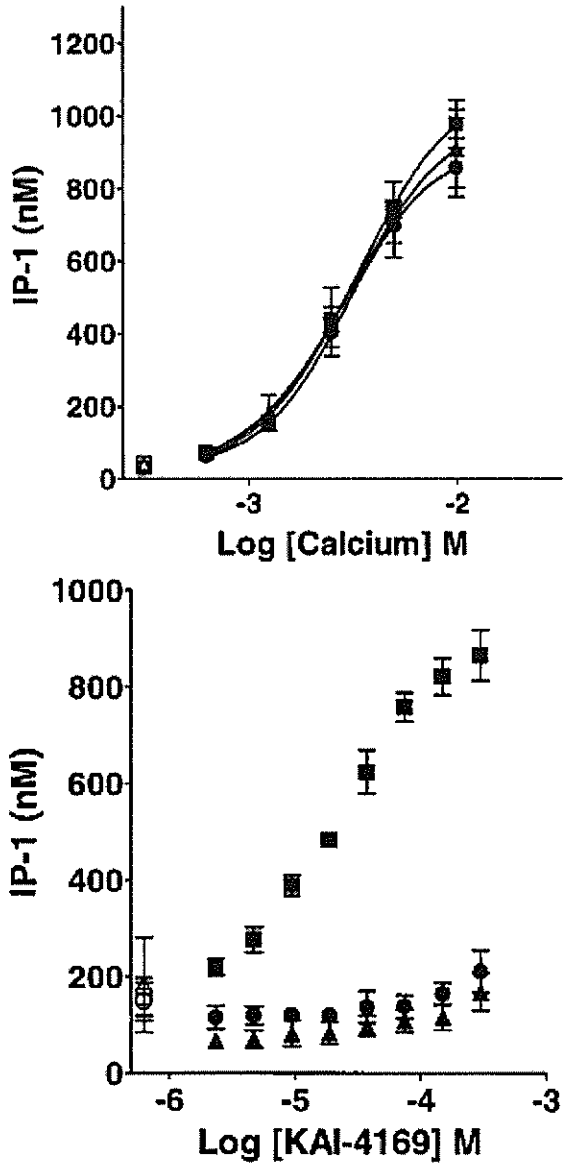


図 2.6.2.2.1.3-2　ヒト CaSR 及び変異 CaSR に対する Ca リガンド及びエテルカルセチドの作用

IP-1 含量は平均値±標準誤差（上図：Ca リガンドの作用）又は平均値±標準偏差（下図：エテルカルセチドの作用）を示す．ヒト CaSR（Cys 482，■/□），ヒト変異 CaSR（Tyr 482，▲/△），ヒト変異 CaSR（Ser 482，●/○）．■/▲/●：各濃度の Ca リガンド又はエテルカルセチド存在下，□/△/○：Ca リガンド又はエテルカルセチド非存在下．KAI-4169：エテルカルセチド

なお，ブタ CaSR（Tyr 482）あるいはブタ変異 CaSR（Cys 482）を強制発現させた HEK-293T 細胞を用いた試験において，Ca リガンドはいずれの発現細胞においても IP-1 含量を増加させた．一方，エテルカルセチドはブタ CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量を増加させなかったが，ブタ変異 CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量を増加させた [2)]．

ヒト CaSR の Cys 482 に対する化合物の結合の有無を検討した．

CaSR/HEK-293T 細胞の懸濁液に，KP-2067 を添加し反応させた後，キモトリプシン消化を行い，結合の有無を液体クロマトグラフィー質量分析法で定量した．

25 及び 80 μmol/L の KP-2067 を添加したとき，CaSR の Cys 482 への結合が認められ，結合率はそれぞれ，5.3 及び 12.1%であった[2)]．

2.6.2.2.1.4　　ラット副甲状腺細胞からの PTH 分泌に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-4］

エテルカルセチドの PTH 分泌に対する抑制作用を *in vitro* にて検討した．

実験には，正常ラットから摘出した副甲状腺をコラゲナーゼ処理して得られた，副甲状腺初代培養細胞を用いた．1.0 mmol/L の Ca 存在下でエテルカルセチドを添加し，培養液中の PTH 濃度を指標に，エテルカルセチドの PTH 分泌抑制作用を評価した．

エテルカルセチドは添加濃度に応じてラット副甲状腺初代培養細胞の PTH 分泌を抑制し，その EC_{50} 値は 0.36 μmol/L であった（図 2.6.2.2.1.4-1）．

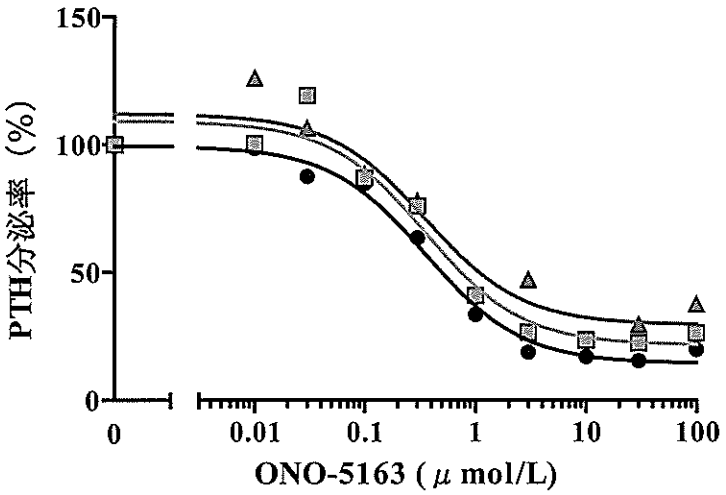


図 2.6.2.2.1.4-1　ラット副甲状腺初代培養細胞からの PTH 分泌に対するエテルカルセチドの作用

PTH 分泌率は 3 プレート分（●，▲，▩）の結果を示す．エテルカルセチドの EC_{50} 値は，各プレートの $LogEC_{50}$ 値を共有化することで推定した．ONO-5163：エテルカルセチド

2.6.2.2.1.5　　ラット副甲状腺組織からの PTH 分泌に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-5］

エテルカルセチドの PTH 分泌に対する抑制作用を *in vitro* にて検討した．

実験には，正常ラットから摘出した副甲状腺を用いた．0.8，1.0 及び 1.25 mmol/L の Ca 存在下でエテルカルセチドを添加し，培養液中の PTH 濃度を指標に，エテルカルセチドの PTH 分泌抑制作用を評価した．

Ca 単独では添加濃度に応じてラット副甲状腺の PTH 分泌を抑制した（図 2.6.2.2.1.5-1）．エテルカルセチドは添加濃度に応じてラット副甲状腺の PTH 分泌を抑制し，0.8，1.0 及び 1.25 mmol/L の Ca 存在下における EC_{50} 値はそれぞれ 1.2，0.7 及び 0.4 μ mol/L であった．

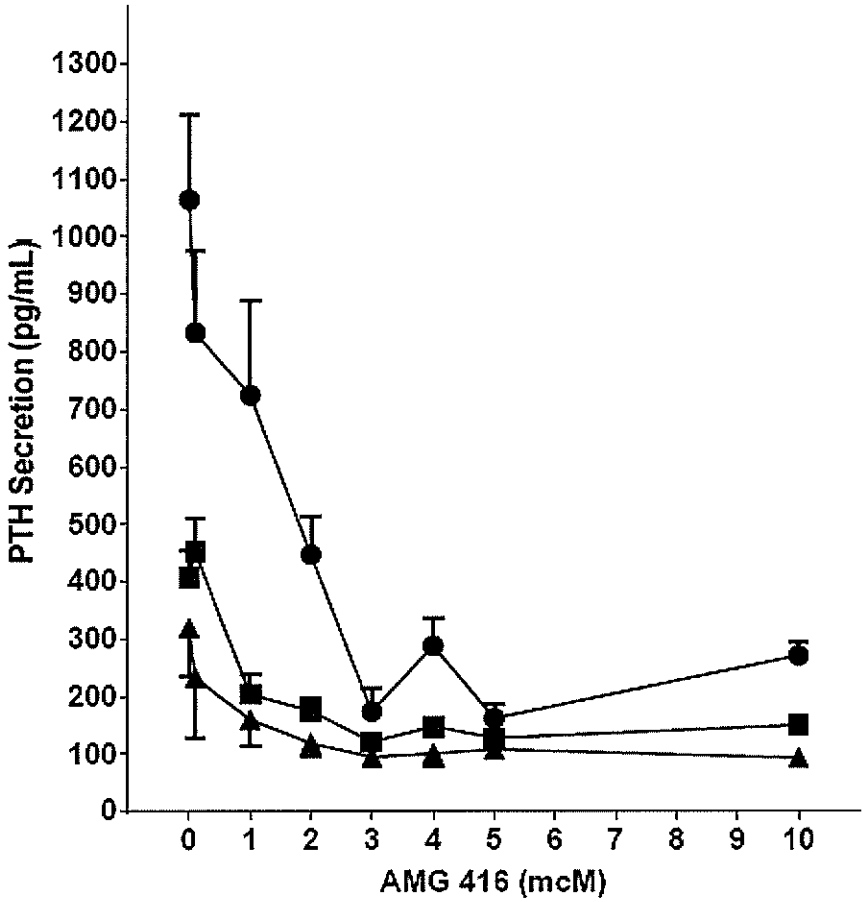


図 2.6.2.2.1.5-1　ラット副甲状腺組織からの PTH 分泌に対するエテルカルセチドの作用
PTH 濃度は平均値±標準誤差を示す．0.8 mmol/L（●：n=5～11），1.0 mmol/L（■：n=6～12）あるいは 1.25 mmol/L の Ca 存在下（▲：n=6～12）．AMG 416：エテルカルセチド

2.6.2.2.2　*In vivo* 試験

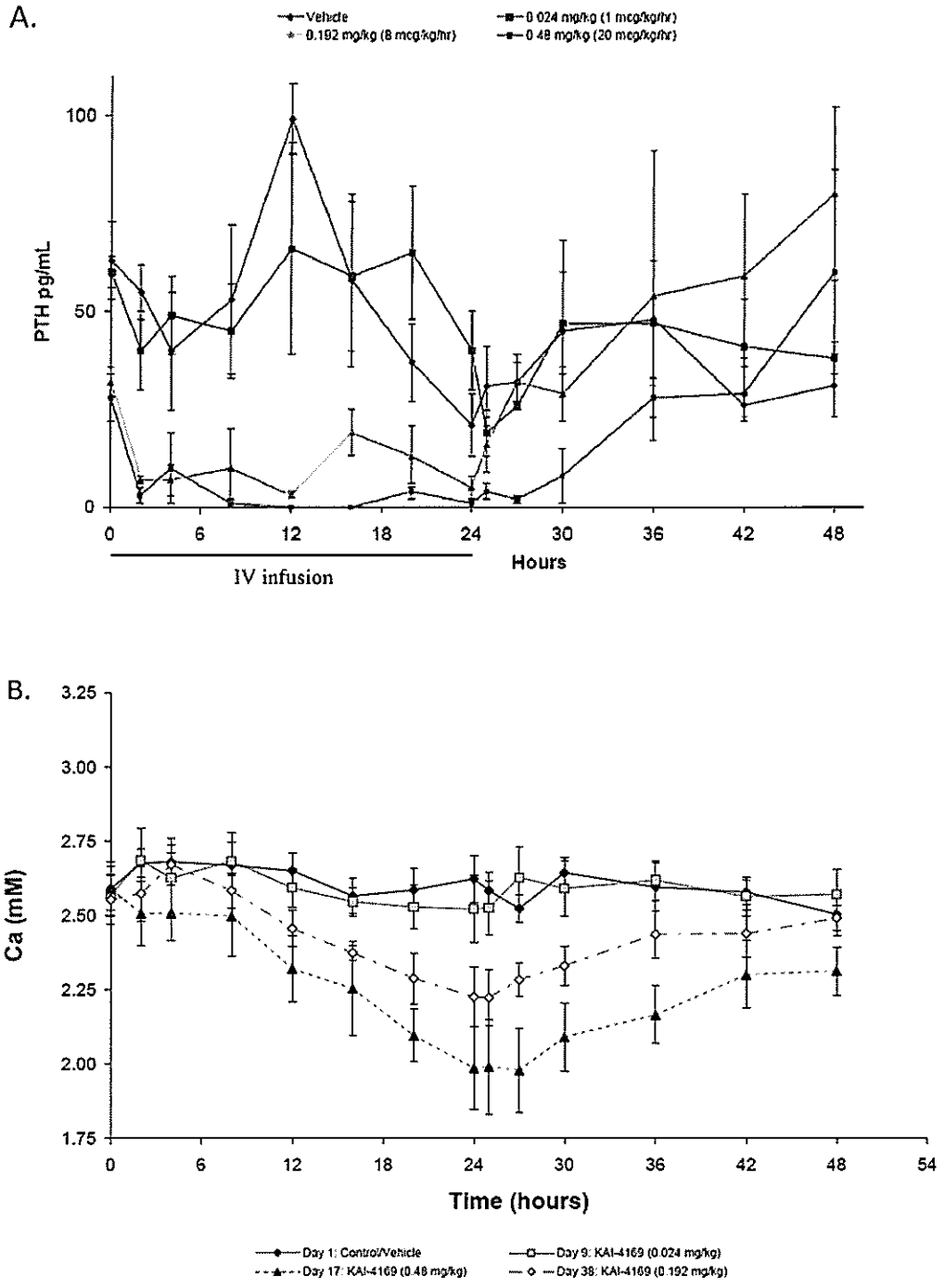
2.6.2.2.2.1　正常イヌの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-6］

正常イヌを用い，エテルカルセチドの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用を検討した．

雄ビーグル犬にエテルカルセチドを 0.024，0.192 及び 0.48 mg/kg（1，8 及び 20 μ g/kg/h）の投与量で 24 時間かけて単回静脈内持続投与し，対照群には媒体である 20 mmol/L コハク酸緩衝液（塩化ナトリウム 0.81%含有，pH 4.5）を投与した．対照群及びエテルカルセチド投与群は，投与前及び投与開始後 2，4，8，12，16，20 及び 24 時間まで並びに投与終了後 1，3，6，12，18 及び 24 時間までの血漿 PTH，血清 Ca を測定した．また，エテルカルセチド投与群においては，同時点の血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

エテルカルセチドの 0.192 及び 0.48 mg/kg は，投与開始後 1 時間から 24 時間の投与終了まで，持続して血漿 PTH を低下させた（図 2.6.2.2.2.1-1）．また，血漿 PTH の低下に伴い，血清 Ca も低下した．エテルカルセチドの投与終了後，血漿中濃度は低下し，それに伴って血漿 PTH 及び血清 Ca は回復性を示した．



C.

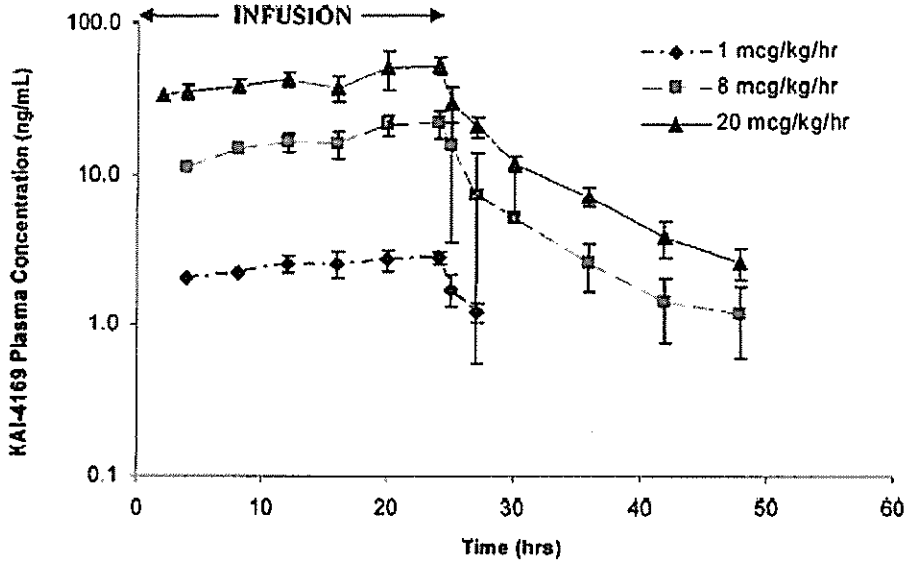


図 2.6.2.2.2.1-1　正常イヌの血漿 PTH 及び血清 Ca に対するエテルカルセチドの作用（静脈内持続投与）

（A）血漿 PTH は平均値±標準誤差を示し，（B）血清 Ca 及び（C）血漿中エテルカルセチド濃度は平均値±標準偏差を示す（n=4／群）．KAI-4169：エテルカルセチド，INFUSION：静脈内持続投与

2.6.2.2.2.2　正常ラットの血漿 PTH に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-2，評価資料：4.2.1.1-3］

正常ラットを用い，エテルカルセチドの血漿 PTH に対する作用を検討した．

雄 SD 系ラットにエテルカルセチドを 0.1，0.3，0.5 及び 1 mg/kg の投与量で単回静脈内投与し，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．投与前，投与後 1，2，3 及び 4 時間の血漿 PTH を測定し，投与前の血漿 PTH に対する百分率を算出した（相対血漿 PTH）．投与前の平均血漿 PTH は約 230 pg/mL であった．

エテルカルセチド投与後 1 時間において，0.1 及び 0.3 mg/kg での相対血漿 PTH は，それぞれ投与前の 61 及び 11%まで低下し，0.5 mg/kg 以上の投与量では投与前の 10%以下に低下した．0.3 及び 0.5 mg/kg における相対血漿 PTH は投与後 1 時間以降に徐々に増加し，投与後 4 時間では，それぞれ投与前の 63 及び 45%まで回復した．1 mg/kg では，投与後 4 時間においても相対血漿 PTH は投与前の 10%以下であった．

なお，*in vitro* でヒト CaSR 作動活性が認められた KP-2067 は，正常ラットの PTH を抑制し，ヒト CaSR 作動活性が認められなかった KP-2140 は，PTH を抑制しなかった[2)]．

2.6.2.2.2.3 急性腎障害ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-2］

急性腎障害モデルの 1K1C ラットを用い，エテルカルセチドの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用を検討した．

1K1C ラットは，雄 SD 系ラットの右腎を摘出し，左腎を 45 分間の虚血後，再灌流して作製した．再灌流後 48 時間にエテルカルセチドを 0.3，0.5，1 及び 3 mg/kg の投与量で単回静脈内投与し，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．投与前，投与後 1，16 及び 24 時間の血漿 PTH を測定し，投与前の血漿 PTH に対する百分率を算出した（相対血漿 PTH）．投与前の平均血漿 PTH は約 800 pg/mL であった．エテルカルセチド投与群に関しては，血漿 PTH 測定と同時点での血清 Ca も測定した．

エテルカルセチド投与後 1 時間において，0.3 mg/kg の相対血漿 PTH は投与前の約 30%まで低下し，0.5 mg/kg 以上では投与前の 10%以下に低下した．その後，相対血漿 PTH は徐々に増加し，投与後 24 時間における相対血漿 PTH は，0.3 mg/kg で投与前の 105%，0.5 mg/kg で 53%及び 1 mg/kg で 28%まで回復した．3 mg/kg では，投与後 24 時間においても相対血漿 PTH は投与前の 10%以下であった．また，エテルカルセチド投与後 16 及び 24 時間における血清 Ca は投与前値と比較して低値傾向であった．

2.6.2.2.2.4 高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用（単回投与）

［評価資料：4.2.1.1-7］

慢性腎障害モデルの 5/6 腎摘ラットを用い，エテルカルセチドの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用を検討した．

5/6 腎摘ラットは，雄 SD 系ラットの左腎の 3 分の 2 を摘出した 1 週間後に，右腎を全摘出して作製した．5/6 腎摘ラット作製 1 週間後より，高 P 食（1.0%P 含有）を摂取させ，SHPT 病態を促進した．5/6 腎摘ラット作製 4 週間後より，エテルカルセチドを 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で単回静脈内投与し，対照群には媒体である 0.27%コハク酸緩衝液（グリシン 1.0%，トレハロース 1.0%，マンニトール 2.0%及びベンジルアルコール 0.9%含有，pH 4.5）を投与した．投与前日，投与後 1，6，24 及び 48 時間における血漿 PTH を測定し，投与前日の血漿 PTH に対する百分率を算出した（相対血漿 PTH）．また，血清 Ca 及び血漿 P を測定した．なお，投与前日の平均血漿 PTH は約 1000 pg/mL であった．

エテルカルセチド投与群の相対血漿 PTH は，投与後 1 及び 6 時間において，対照群と比較して，すべての投与量で有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.4-1）．その作用は，3 mg/kg では投与後 24 時間まで持続した．

エテルカルセチド投与群の血清 Ca は，1 及び 3 mg/kg で投与後 1 時間において，対照群と比較して有意に低値を示し，その作用は投与後 48 時間まで持続した（図 2.6.2.2.2.4-2）．また，0.3 mg/kg では投与後 6 時間において，対照群と比較して，有意に低値であった．

エテルカルセチド投与後 6 時間における血漿 P は，対照群と比較して，すべての群で有意に高値であった．

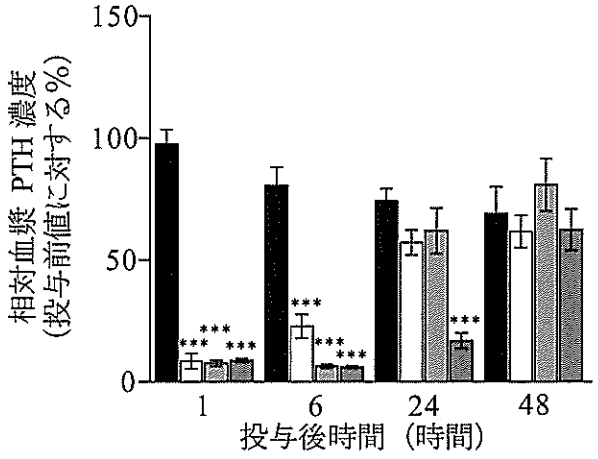


図 2.6.2.2.2.4-1　高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの血漿 PTH に対するエテルカルセチドの作用（単回投与）

相対血漿 PTH は平均値±標準誤差を示す．対照（■：n=8），0.3 mg/kg（□：n=8），1 mg/kg（▩：n=8），3 mg/kg（▩：n=8）

***p<0.001：対照に対する t 検定，エテルカルセチド　3 mg/kg からの下降閉手順

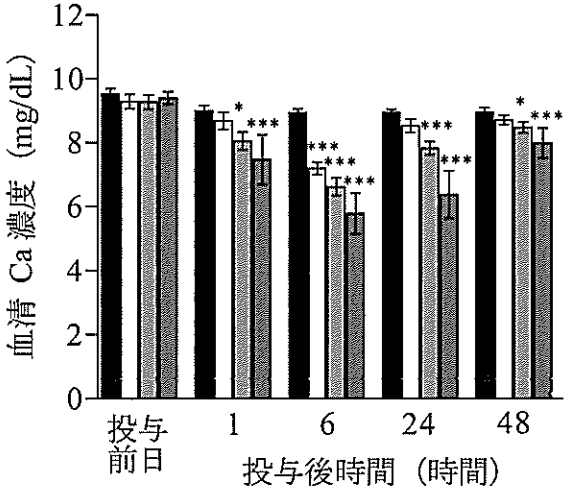


図 2.6.2.2.2.4-2　高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの血清 Ca に対するエテルカルセチドの作用（単回投与）

血清 Ca は平均値±標準誤差を示す．対照（■：n=8），0.3 mg/kg（□：n=8），1 mg/kg（▩：n=8），3 mg/kg（▩：n=8）

*p<0.05，***p<0.001：対照に対する t 検定，エテルカルセチド　3 mg/kg からの下降閉手順

2.6.2.2.2.5　5/6 腎摘ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用（反復投与）

［参考資料：4.2.1.1-2］

慢性腎障害モデルの 5/6 腎摘ラットを用い，エテルカルセチドの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用を検討した．

5/6 腎摘ラットは，雄 SD 系ラットの右腎の 3 分の 2 を摘出した 1 週間後に，左腎を全摘出して作製した．5/6 腎摘ラット作製 1 週間後より，エテルカルセチドを 1 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 28 日間反復静脈内投与し，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．また，CaSR 作動活性を有する同種同効薬のシナカルセト塩酸塩を 10 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 28 日間反復経口投与した．初回投与前，反復投与 7，14，21 及び 28 日目の投与前，投与後 6 及び 16 時間並びに反復投与 28 日目の投与後 48 時間の血漿 PTH を測定し，初回投与前の血漿 PTH に対する百分率を算出した（相対血漿 PTH）．初回投与前の平均血漿 PTH は約 450 pg/mL であった．また，初回投与前，反復投与 7，14，21 及び 28 日目の投与前の血清 Ca を測定した．

反復投与 28 日目のエテルカルセチド投与後 6，16 及び 48 時間における相対血漿 PTH は対照群と比較して有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.5-1）．一方，シナカルセト塩酸塩では投与後 6 時間の血漿 PTH は対照群と比較して有意に低値を示したが，投与後 16 及び 48 時間では対照群と同程度であった [3)]．なお，反復投与 7，14 及び 21 日目においても，反復投与 28 日目と同様のエテルカルセチド及びシナカルセト塩酸塩の相対血漿 PTH に対する作用が認められた．

エテルカルセチド投与群の血清 Ca は，対照群と比較して低値傾向であった（図 2.6.2.2.2.5-2）．一方，シナカルセト塩酸塩投与群の血清 Ca は対照群と同程度であった．

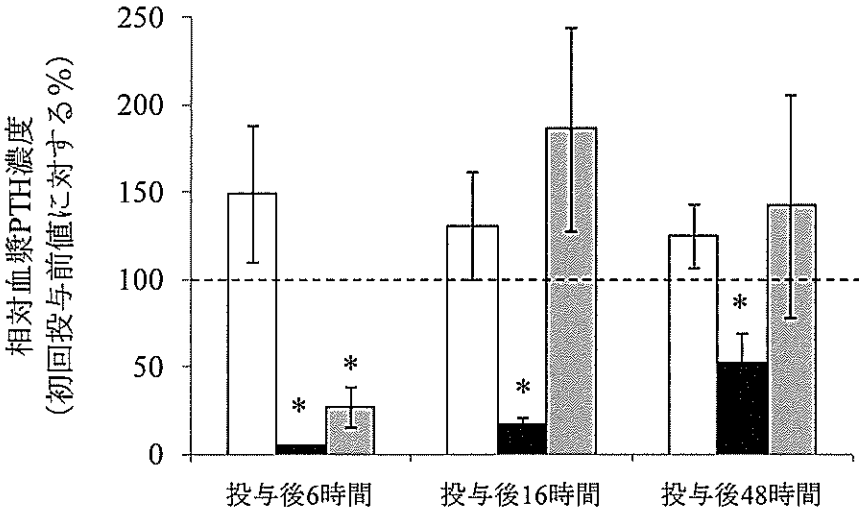


図 2.6.2.2.2.5-1　5/6 腎摘ラットの血漿 PTH に対するエテルカルセチドの作用（反復投与 28 日目）

相対血漿 PTH は平均値±標準誤差を示す．対照（□：n=7），エテルカルセチド 1 mg/kg（■：n=9），シナカルセト塩酸塩 10 mg/kg（▩：n=6）
*p<0.05：対照に対する t 検定

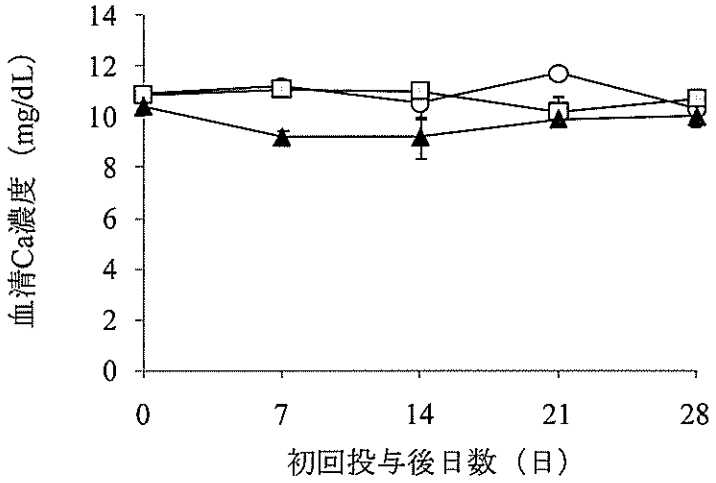


図 2.6.2.2.2.5-2　5/6 腎摘ラットの血清 Ca に対するエテルカルセチドの作用

血清 Ca は平均値±標準誤差を示す．
対照（○：n=7～12），エテルカルセチド 1 mg/kg（▲：n=9～12），シナカルセト塩酸塩 10 mg/kg（▩：n=6～12）

2.6.2.2.2.6 高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの副甲状腺過形成に対する作用（予防投与）

［評価資料：4.2.1.1-8］

慢性腎障害モデルの 5/6 腎摘ラットを用い，エテルカルセチドの副甲状腺過形成に対する作用を検討した．

2.6.2.2.2.5 項と同様の方法で作製した 5/6 腎摘ラットに高 P 食（1.3%P 含有）を 8 週間摂取させ，副甲状腺過形成を促進した．5/6 腎摘ラット作製 2 週間後より，エテルカルセチドを 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で 1 週間に 3 回，6 週間反復皮下投与し，対照群には媒体である 0.24%コハク酸緩衝液（グリシン 1.8%及びトレハロース 0.9%含有，pH 5.0）を投与した．初回投与前，反復投与 2，4 及び 6 週目の投与後 48 時間の血漿 PTH を測定し，初回投与前の血漿 PTH に対する百分率を算出した（相対血漿 PTH）．初回投与前の平均血漿 PTH は約 1100 pg/mL であった．6 週間投与後に副甲状腺を摘出した．なお，摘出の 24 時間及び 2 時間前に BrdU を腹腔内投与し，増殖細胞を標識した．摘出した副甲状腺は抗 BrdU 抗体で免疫組織化学染色して抗 BrdU 抗体陽性細胞数を計数した．

媒体投与後 2～6 週目時点の相対血漿 PTH は，初回投与前と比較して増大した．エテルカルセチドは，投与後 2 週目時点より投与量に応じて相対血漿 PTH の増大を抑制し，3 mg/kg は 2 及び 6 週時点で対照群と比較して相対血漿 PTH を有意に低下させた．

対照群，エテルカルセチドの 0.3，1 及び 3 mg/kg の副甲状腺の抗 BrdU 抗体陽性細胞数は，それぞれ 127，109，74 及び 52 個であり，3 mg/kg は対照群と比較して有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.6-1）．

対照群，エテルカルセチドの 0.3，1 及び 3 mg/kg の体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，それぞれ 5.6，5.3，5.1 及び 4.4 mg/kg であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して低値傾向であった（図 2.6.2.2.2.6-2）．

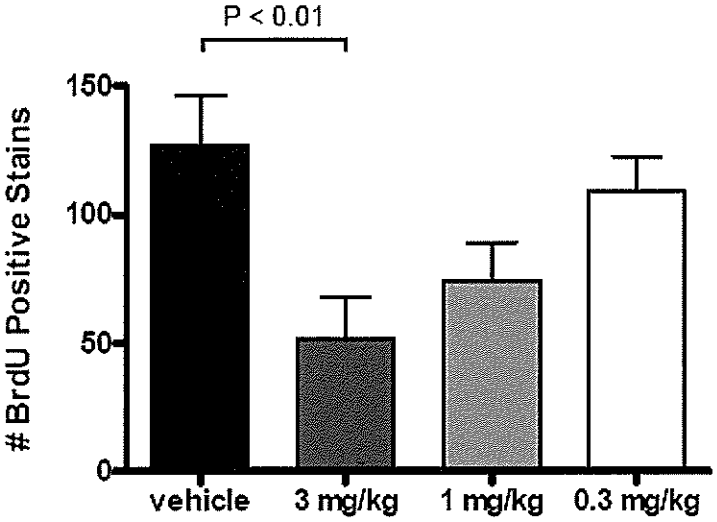


図 2.6.2.2.2.6-1　高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの副甲状腺細胞増殖に対するエテルカルセチドの作用

副甲状腺 BrdU 陽性細胞数は平均値±標準誤差を示す．対照（n=12），3 mg/kg（n=12），1 mg/kg（n=11），0.3 mg/kg（n=11）．統計解析は一元配置分散分析，事後検定として Bonferroni 型の多重比較を行った．

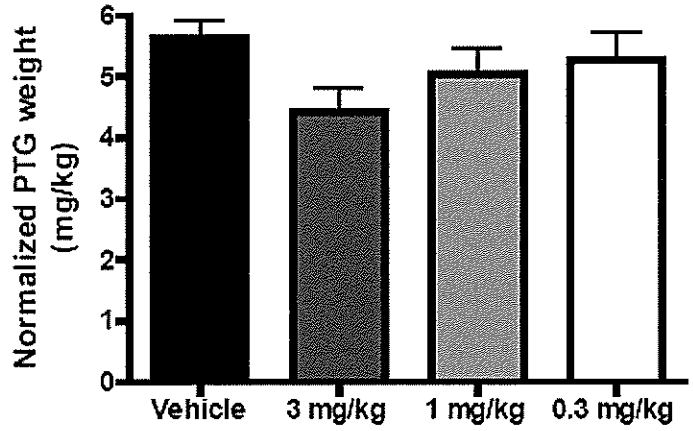


図 2.6.2.2.2.6-2　高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの副甲状腺重量に対するエテルカルセチドの作用

体重当たりの副甲状腺重量は平均値±標準誤差を示す．対照（n=12），3 mg/kg（n=12），1 mg/kg（n=11），0.3 mg/kg（n=11）．PTG；副甲状腺

2.6.2.2.2.7　VD 欠乏及び高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの組織石灰化に対する作用（予防投与）

［評価資料：4.2.1.1-8］

慢性腎障害モデルの 5/6 腎摘ラットを用い，エテルカルセチドの組織石灰化に対する作用を検討した．

2.6.2.2.2.5 項と同様の方法で作製した 5/6 腎摘ラットに，VD 欠乏及び高 P 食（1.25%P 含有）を 8 日間摂取させた後，高 P 食（1.3%P 含有）を 7 週間摂取させ，組織石灰化を促進した．5/6 腎摘ラット作製 2 週間後より，エテルカルセチドを 3 mg/kg の投与量で 1 週間に 3 回，6 週間反復皮下投与し，対照群は無処置とした．初回投与前，反復投与 2 及び 4 週目の投与後 48 時間の血漿 PTH を測定し，初回投与前の血漿 PTH に対する百分率を算出した（相対血漿 PTH）．初回投与前の平均血漿 PTH は約 800 pg/mL であった．6 週間投与後に心臓，大動脈弓及び腎臓を摘出した．摘出した各組織は，脱脂及び脱水処理した後，重量測定し，炎光光度分析により組織中の Ca 及び P 含量を算出した．

エテルカルセチド投与群の相対血漿 PTH は，投与後 2 及び 4 週時点で対照群と比較して有意に低値であった．

対照群並びにエテルカルセチド投与群の心臓，大動脈弓及び腎臓組織中 Ca 含量は，それぞれ 1.4，9.1 及び 6.7 mg/g of tissue 並びに 0.18，0.99 及び 3.1 mg/g of tissue であり，エテルカルセチド投与群の大動脈弓 Ca 含量は対照群と比較して有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.7-1）．対照群並びにエテルカルセチド投与群の心臓，大動脈弓及び腎臓組織中 P 含量は，それぞれ 7.2，11.6 及び 13.8 mg/g of tissue 並びに 6.3，6.3 及び 11.6 mg/g of tissue であり，エテルカルセチド投与群の心臓及び大動脈弓 P 含量は対照群と比較して有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.7-1）．

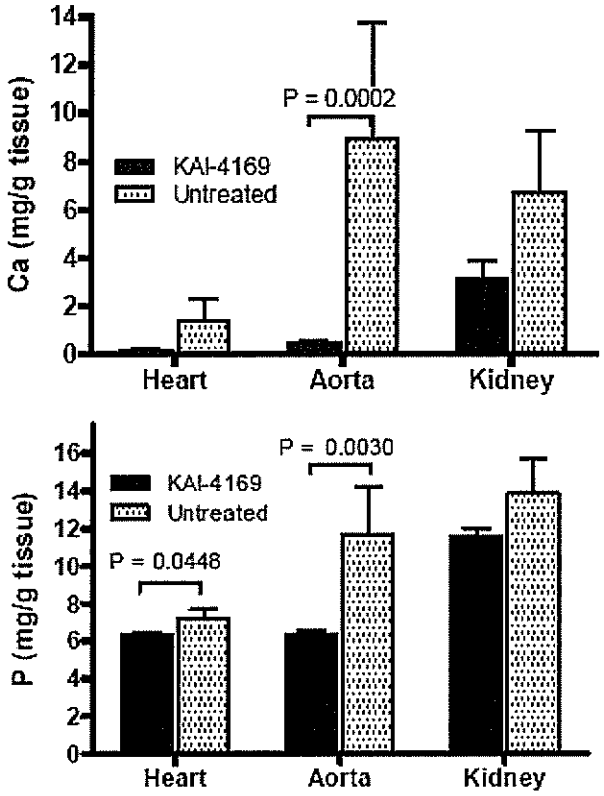


図 2.6.2.2.2.7-1　VD 欠乏及び高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの組織中 Ca 及び P 含量に対するエテルカルセチドの作用

心臓，大動脈弓，腎臓重量当たりの Ca 及び P 含量は平均値±標準誤差を示す．
KAI-4169（n=11），対照（心臓及び腎臓 n=10，大動脈弓 n=9）
統計解析は，対応のない t 検定及び Mann-Whitney 検定を行った．KAI-4169：エテルカルセチド

2.6.2.2.2.8　　アデニン食負荷ラットの血管石灰化に対する作用（予防投与）

［評価資料：4.2.1.1-9］

慢性腎障害モデルのアデニン食負荷ラットを用い，エテルカルセチドの血管石灰化に対する作用を検討した．

雄 Wistar 系ラットに低蛋白食（2.5%蛋白含有）を 1 週間摂取させた後，惹起群ラットには，アデニン食（0.75%アデニン含有の低蛋白食）を 4 週間摂取させ，血管石灰化を促進した．非惹起群（非アデニン食負荷）ラットには，低蛋白食を試験終了まで摂取させた．アデニン食の摂取開始日より，エテルカルセチドを 0.3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 4 週間反復皮下投与し，対照群並びに非惹起群には媒体である 0.24%コハク酸緩衝液（グリシン 1.8%及びトレハロース 0.9%含有，pH 5.0）を投与した．初回投与前，反復投与 2 及び 4 週目の投与後約 24 時間の血漿 PTH を測定した．4 週間投与後に副甲状腺及び下行大動脈を摘出し，各組織の重量を測定した後，摘出した副甲状腺は，抗 Ki-67 抗体で免疫組織化学染色して抗

Ki-67 抗体陽性細胞数を計数した．摘出した血管は，塩酸で浸漬後，上清中の Ca 及び P を測定し，血管組織中の Ca 及び P 含量を算出した．

エテルカルセチド投与群の血漿 PTH は，投与後 4 週時点で対照群と比較して有意に低値であった．

非惹起群，対照群及びエテルカルセチド投与群の体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，それぞれ 1.25，2.49 及び 1.61 mg/kg であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった．

非惹起群，対照群及びエテルカルセチド投与群の面積当たりの副甲状腺 Ki-67 陽性細胞数は，それぞれ 0.118，0.397 及び 0.041 cells/μm^2（×1000）であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった．

血管組織中 Ca 含量は，対照群では非惹起群と比較して有意に高値であり，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して有意に低値であった（表 2.6.2.2.2.8-1）．血管組織中の P 含量は，非惹起群及びエテルカルセチド投与群において，全例が定量下限未満であった．対照群は，24 例中 18 例で定量下限未満であり，残り 6 例の血管組織中 P 含量は，1725 μg/g of tissue であった．

表 2.6.2.2.2.8-1　アデニン食負荷ラットの血管組織中 Ca 及び P 含量に対するエテルカルセチドの作用

			Extracts of Aorta Segment	
Adenine	Treatment	n	Calcium (ug/g of tissue)	Phosphorus (ug/g of tissue)
−	Vehicle	23	65.2± 4.5	BLQL
+	Vehicle	24	631.3 ± 326.4[a]	1725 ± 941
+	Velcalcetide	24	47.5 ± 3.3[b]	BLQL

血管組織重量当たりの Ca 及び P 含量は平均値±標準誤差を示す．
非惹起及びエテルカルセチドの P 含量は全例で定量下限未満（BLQL），対照は 24 例中 6 例の結果を示す．
統計解析は Kruskal-Wallis 検定，事後検定として Dunns 多重比較を行った．
[a]$p<0.05$：非惹起との比較，Dunns 多重比較，[b]$p<0.05$：対照との比較，Dunns 多重比較
Velcalcetide：エテルカルセチド

2.6.2.2.2.9　　5/6 腎摘ラットの骨形態パラメータに対する作用（治療投与）

［評価資料：4.2.1.1-10］

慢性腎障害モデルの 5/6 腎摘ラットを用い，エテルカルセチドの骨形態パラメータに対する作用を検討した．

5/6 腎摘ラットは，雄 SD 系ラットの左腎の 3 分の 2 を摘出した 1 週間後に，右腎を全摘出して作製した．また，偽手術を施し，sham 群を作製した．5/6 腎摘ラット作製 8 週間後より，エテルカルセチドを 0.3 mg/kg 及び 1/0.6 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 6 週間反復皮下投与し，sham 群及び対照群（皮下投与）には媒体である 0.24%コハク酸緩衝液（グリシン 1.8%及びトレハロース 0.9%含有，pH 5.0）を皮下投与した．なお，エテルカルセチド 1 mg/kg の投与で体重減少が認められたため，投与 15 日目よりエテルカルセチドの投与量を 0.6 mg/kg に変更し，試験を継続した．また，同種同効薬のシナカルセト塩酸塩を 3 及び 15 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 6 週間反復経口投与し，対照群（経口投与）には媒体である 0.5%メチルセルロース溶液を経口投与した．初回投与前，反復投与 1 及び 42 日目の投与後 4 時間の血漿 PTH 並びに反復投与 14 及び 28 日目の投与後 23 時間の血漿 PTH を測定した．初回投与前の平均血漿 PTH は sham 群で約 160 pg/mL，5/6 腎摘ラットの各投与群で約 200 pg/mL であった．また，6 週間投与後に副甲状腺及び右脛骨を摘出した．摘出した副甲状腺は重量測定し，右脛骨は骨形態計測を実施した．

媒体投与 1 日目より，各対照群の血漿 PTH は，sham 群と比較して有意に高値を示し，反復投与 42 日目においても，有意に高値であった．各投与量のエテルカルセチド並びにシナカルセト塩酸塩投与群は，反復投与 1 及び 42 日目の投与後 4 時間の血漿 PTH が，各対照群と比較して有意に低値であった．また，シナカルセト塩酸塩 15 mg/kg は反復投与 28 日目の投与後 23 時間の血漿 PTH が，対照群と比較して有意に低値であった．

体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，sham 群，対照群（皮下投与），エテルカルセチド 0.3 及び 1/0.6 mg/kg 投与群，対照群（経口投与），シナカルセト塩酸塩 3 及び 15 mg/kg 投与群において，それぞれ 0.90，1.57，1.74，1.03，1.37，1.72 及び 1.25 mg/kg であり，エテルカルセチド 1/0.6mg/kg 投与群は対照群（皮下投与）と比較して有意に低値であった．

エテルカルセチド投与群の破骨細胞面は，対照群（皮下投与）と比較して低値傾向であった（表 2.6.2.2.2.9-1）．また，エテルカルセチド 0.3 mg/kg 投与群の骨石灰化面及びエテルカルセチド 1/0.6 mg/kg 投与群の類骨面，骨石灰化面，骨形成速度，類骨量及び骨石灰化遅延時間は，対照群（皮下投与）と比較して有意に低値であった．シナカルセト塩酸塩 3 及び 15 mg/kg 投与群の骨形態パラメータは対照群（経口投与）と比較して有意差はなかった．

表 2.6.2.2.2.9-1 5/6 腎摘ラットの骨形態パラメータに対するエテルカルセチド及びシナカルセト塩酸塩の作用

Surgery	Treatment	n	Oc.S/BS (%)	OS/BS (%)	MS/BS (%)	BFR/BS (μm³/μm²/day)	OV/BV (%)	Mlt (day)
Sham	Vehicle (SC)	12	1.43 ± 0.21	9.45 ± 1.33	37.07 ± 1.88	0.47 ± 0.03	1.34 ± 0.22	1.05 ± 0.16
5/6 Nx	Vehicle (SC)	12	1.22 ± 0.11	10.81 ± 2.12	43.63 ± 1.64	0.56 ± 0.04	1.65 ± 0.38	0.94 ± 0.14
5/6 Nx	AMG 416 0.3 mg/kg	12	0.95 ± 0.28	6.67 ± 1.65	36.39 ± 1.77[b]	0.46 ± 0.03	1.00 ± 0.30	0.68 ± 0.16
5/6 Nx	AMG 416 1/0.6 mg/kg	11	0.83 ± 0.16	3.63 ± 0.70[b]	30.60 ± 2.43[b]	0.35 ± 0.04[b]	0.48 ± 0.08[b]	0.41 ± 0.06[a,b]
5/6 Nx	Vehicle (PO)	13	1.15 ± 0.10	12.54 ± 2.00	34.70 ± 1.88	0.45 ± 0.03	2.46 ± 0.88	1.52 ± 0.40
5/6 Nx	Cinacalcet 3 mg/kg	10	1.36 ± 0.27	10.07 ± 2.08	33.88 ± 1.71	0.41 ± 0.03	1.89 ± 0.54	1.18 ± 0.29
5/6 Nx	Cinacalcet 15 mg/kg	10	1.43 ± 0.11	12.06 ± 2.64	31.51 ± 1.99	0.42 ± 0.05	1.81 ± 0.45	1.29 ± 0.23

骨形態パラメータは，破骨細胞面（Oc.S/BS），類骨面（OS/BS），骨石灰化面（MS/BS），骨形成速度（BFR/BS），類骨量（OV/BV），骨石灰化遅延時間（Mlt）で表し，平均値±標準誤差を示す．
統計解析は一元配置分散分析，事後検定として Tukey 検定を行った．
[a]$p<0.05$：sham との比較，Tukey 検定，[b]$p<0.05$：各対照との比較，Tukey 検定
AMG 416：エテルカルセチド，cinacalcet：シナカルセト塩酸塩，sham：偽手術，5/6 Nx：6 分の 5 腎臓摘出

2.6.2.2.2.10 高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの発症後 SHPT 病態に対する作用（治療投与）

［評価資料：4.2.1.1-11］

SHPT を発症させた慢性腎障害モデルの 5/6 腎摘ラットを用い，エテルカルセチドの SHPT 病態（PTH，副甲状腺，FGF23 及び骨）に対する作用を検討した．

5/6 腎摘ラットは，雄 SD 系ラットの左腎動脈を結紮（3 分の 2 腎臓摘出に相当）した 1 週間後に，右腎を全摘出して作製した．また，偽手術を施し，sham 群を作製した．5/6 腎摘ラット作製 3 週間後より，sham 群も含めて高 P（0.9%P 含有）及び低 Ca（0.6%Ca 含有）食を 14 週間摂取させ，SHPT 病態を促進した．高 P 及び低 Ca 食負荷 8 週間後より，エテルカルセチドを 1/0.6 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 6 週間反復皮下投与し，対照群及び sham 群には媒体である 0.24%コハク酸緩衝液（グリシン 1.8%及びトレハロース 0.9%含有，pH 5.0）

を投与した．なお，エテルカルセチド 1 mg/kg の投与で体重減少が認められたため，投与 12 日目よりエテルカルセチドの投与量を 0.6 mg/kg に変更し，試験を継続した．初回投与前，反復投与 2 及び 42 日目の投与後 4 時間並びに反復投与 14 及び 28 日目の投与後 23 時間の血清 PTH 及び血清 FGF23 を測定した．6 週間投与後に副甲状腺及び左大腿骨を摘出した．摘出した副甲状腺は重量測定した後，抗 Ki-67 抗体で免疫組織化学染色して抗 Ki-67 抗体陽性細胞数を計数した．摘出した左大腿骨は micro-CT 法によって骨構造の指標となる皮質骨多孔率を評価した後，3 点曲げ試験によって骨強度の指標である最大荷重，破断エネルギー及び靭性を評価した．

Sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群の血清 PTH は，初回投与前の時点では，147，791 及び 686 pg/mL であり，対照群及びエテルカルセチド投与群は sham 群と比較して有意に高値であった．反復投与 42 日目の投与後 4 時間では，168，2205 及び 90 pg/mL であり，対照群では sham 群と比較して有意に高値であった．また，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して有意に低値であった．

体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群で，それぞれ 0.88，5.91 及び 2.76 mg/kg であり，対照群は sham 群と比較して有意に高値であった．また，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった．

面積当たりの副甲状腺 Ki-67 陽性細胞数は，sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群で，それぞれ 0.160，0.323 及び 0.226 cells/μm^2（×1000）であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して低値傾向であった．

血清 FGF23 は，初回投与前の時点では，対照群及びエテルカルセチド投与群は sham 群と比較して有意に高値であった（表 2.6.2.2.2.10-1）．反復投与 42 日目までの全ての評価時点で，対照群では sham 群と比較して有意に高値であり，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して有意に低値であった．

皮質骨多孔率は，sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群で，それぞれ 0.072，8.256 及び 2.273%であり，対照群は sham 群と比較して有意に高値であった（図 2.6.2.2.2.10-1）．エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった．

最大荷重は，対照群では sham 群と比較して有意に低値であり，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して高値傾向であった（表 2.6.2.2.2.10-2）．破断エネルギー及び靭性は，対照群では sham 群と比較して低値傾向であり，エテルカルセチド投与群では，対照群と比較して有意に高値であった．

表 2.6.2.2.2.10-1　SHPT 発症後 5/6 腎摘ラットの血清 FGF23 に対するエテルカルセチドの作用

Surgery	Treatment	n	Serum FGF23 (pg/mL) Predose	Day 2 – 4 h	Day 14 – 23 h	Day 28 – 23 h	Day 42 – 4 h
Sham	Vehicle	10	62 ± 7	83 ± 7	80 ± 9	88 ± 4	100 ± 6
5/6 Nx	Vehicle	12	823 ± 102[a]	708 ± 127[a]	1426 ± 284[a]	1823 ± 337[a]	2430 ± 552[a]
5/6 Nx	AMG 416	13	1002 ± 177[a]	374 ± 63[b]	648 ± 119[b]	861 ± 164[b]	874 ± 250[b]

血清 FGF23 は平均値±標準誤差を示す.
統計解析は一元配置分散分析，事後検定として Tukey 検定を行った.
[a]p<0.05：sham との比較，Tukey 検定，[b]p<0.05：対照との比較，Tukey 検定
AMG 416：エテルカルセチド，sham：偽手術，5/6 Nx：6 分の 5 腎臓摘出，4h：投与後 4 時間，23h：投与後 23 時間

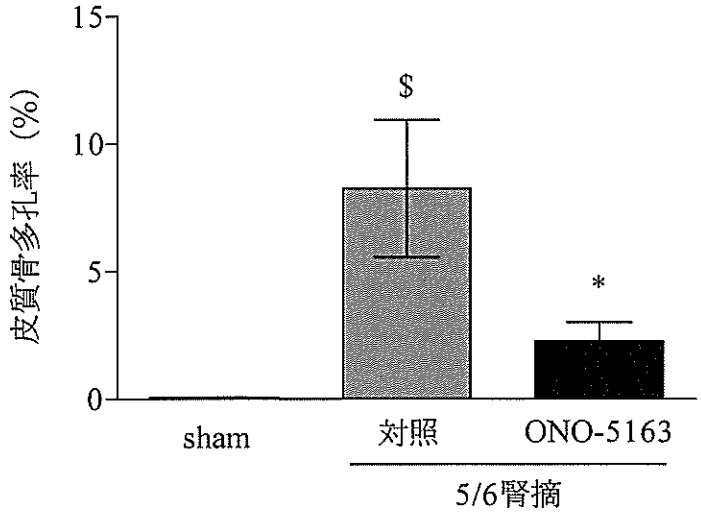


図 2.6.2.2.2.10-1　SHPT 発症後 5/6 腎摘ラット大腿骨の皮質骨多孔率に対するエテルカルセチドの作用

皮質骨多孔率は平均値±標準誤差を示す.
sham（n=10），対照（n=12），エテルカルセチド（n=13）
統計解析は一元配置分散分析，事後検定として Tukey 検定を行った.
$p<0.05：sham との比較，Tukey 検定，*p<0.05：対照との比較，Tukey 検定
ONO-5163：エテルカルセチド

表 2.6.2.2.2.10-2 SHPT 発症後 5/6 腎摘ラット大腿骨の骨強度に対するエテルカルセチドの作用

部位	評価項目	単位	Sham Vehicle n=10	5/6 Nx Vehicle n=12	5/6 Nx AMG 416 n=13
大腿骨骨幹部	最大荷重	(N)	195.6 ± 4.6	156.3 ± 7.7[a]	178.1 ± 7.8
	破断エネルギー	(N.mm)	101.7 ± 7.2	71.3 ± 8.1	109.6 ± 10.8[b]
	靭性	(MPa)	5.67 ± 0.44	4.21 ± 0.47	6.05 ± 0.42[b]

骨強度パラメータは，最大荷重（N），破断エネルギー（N.mm）及び靭性（MPa）で表し，平均値±標準誤差を示す.
統計解析は一元配置分散分析，事後検定として Tukey 検定を行った.
[a]$p<0.05$：sham との比較，Tukey 検定，[b]$p<0.05$：対照との比較，Tukey 検定
AMG 416：エテルカルセチド，sham：偽手術，5/6 Nx：6 分の 5 腎臓摘出

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験として，CaSR の組織分布及びエテルカルセチドの各分子標的に対する選択性を検討した.

2.6.2.3.1 CaSR の組織分布

2.6.2.3.1.1 *In situ* ハイブリダイゼーション法を用いた解析

［評価資料：4.2.1.2-1］

雌雄マウス及び雌雄カニクイザルの各組織サンプルを用いて，CaSR の mRNA の発現を，*in situ* ハイブリダイゼーション法にて検討した.

マウス組織では，副甲状腺に強いシグナルが，腎尿細管ヘンレループの太い上行脚及び膵島細胞に中程度のシグナルが，脳（視床下部，海馬），食道，胃腺部，十二指腸陰窩及び卵管上皮細胞に弱いシグナルが認められた.

サル組織では，副甲状腺に強いシグナルが，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，絨毛）及び膵島細胞に中程度のシグナルが，胃腺部，空腸陰窩基底部，甲状腺 C 細胞及び副腎髄質に弱いシグナルが認められた.

2.6.2.3.1.2 RNA sequence 法を用いた解析

［評価資料：4.2.1.2-2］

雌雄マウス，雌雄ラット，雌雄カニクイザル及び雌雄ヒトの各組織サンプルを用いて，CaSR の mRNA の発現を，RNA sequence 法にて検討した.

マウス組織では，下垂体，副甲状腺／甲状腺複合組織，食道，皮膚，腓腹筋，坐骨神経，気管及び腎臓において CaSR の発現が認められた．ラット組織では，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．サル組織では，膵臓，副甲状腺／甲状腺複合組織，唾液腺，胃幽門部，眼及び腎臓において CaSR の発現が認められた．ヒト組織では，膵臓（膵頭，膵ランゲルハンス島及び膵尾部），副甲状腺／甲状腺複合組織，十二指腸，空腸及び腎臓（腎皮質及び腎髄質）において CaSR の発現が認められた．

2.6.2.3.2　　各分子標的に対する作用

［評価資料：4.2.1.2-3］

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の阻害作用を検討した．

エテルカルセチドは 10 μmol/L の濃度で，ムスカリン M_2 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%を超える標的は認められなかった．

2.6.2.3.3　　生体内変換物質の作用

［評価資料：4.2.1.2-4］

ヒトマスバランス試験において，ヒト血中におけるエテルカルセチドの主要な生体内変換物質として SAPC が，その他の生体内変換物質として，エテルカルセチドの D-アミノ酸ペプチド体（L-Cys 脱離体）である KP-2067 及びグルタチオン抱合体である M10 が，それぞれ検出された［5.3.3.2-2］．そこで，ヒト CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量に対する各生体内変換物質の作用を *in vitro* にて検討した．

エテルカルセチド及び M10 は，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の IP-1 含量を増加させ，その EC_{50} 値はそれぞれ 26 及び 66 μmol/L であった（図 2.6.2.3.3-1）．一方，SAPC は，100 μmol/L において，エテルカルセチドの 14%未満の活性であった．グルタチオンは，IP-1 含量をほとんど増加させなかった．

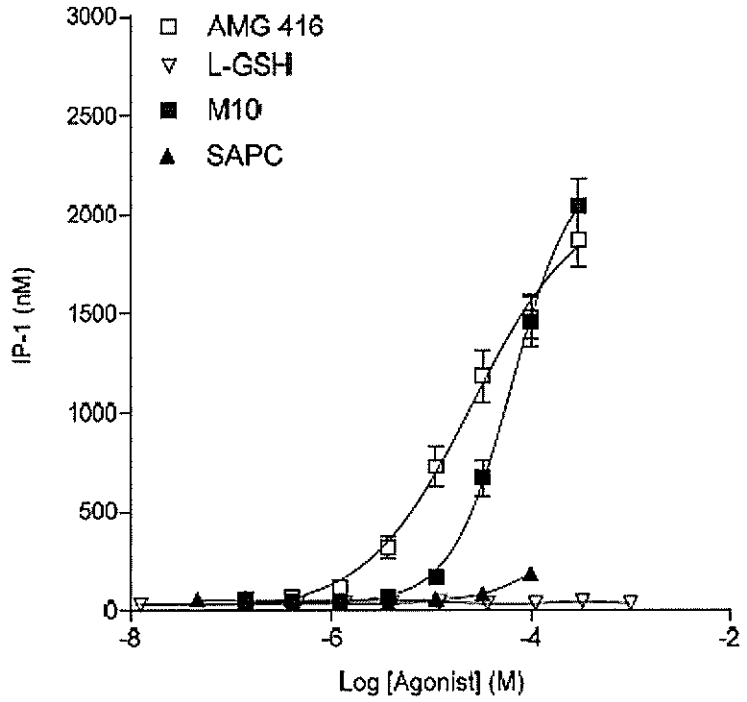


図 2.6.2.3.3-1　ヒト CaSR に対する生体内変換物質の作用
IP-1 含量は平均値±標準誤差を示す．AMG 416：エテルカルセチド，L-GSH：グルタチオン，M10：グルタチオン抱合体，SAPC：エテルカルセチドの D-アミノ酸ペプチド体と血清アルブミンとの複合体

2.6.2.4　　安全性薬理試験

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として，*in vitro* で hERG チャネル電流に対する作用を評価し，イヌを用いて中枢神経系，心血管系及び呼吸系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* でヒト血液を用いて溶血性に対する作用を評価した．評価資料とした試験はいずれも GLP に準拠して実施した．なお，一部の *in vitro* 試験では，投与液の濃度測定のみを OECD 非加盟かつ MAD 制度非参加国において GLP に準拠して実施したが，申請者による試験関係資料の確認及び施設の現地調査の結果から，試験の信頼性に問題はないと判断した．また，当該測定施設は本試験の実施前後（2009 年及び 2013 年）に FDA より GLP 適合性が確認されている．

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

ビーグル犬（雄 4 例／群）に，エテルカルセチドを 0（媒体），0.3 及び 1.5 mg/kg の順に，各投与量を 7 又は 8 日間隔で単回静脈内急速投与し（検討 1），42 日間の休薬後に 1.5 mg/kg の投与量を再び単回静脈内急速投与した（検討 2）．検討 1 では，各投与量において，一般状態観察を投与前及び投与日の午後に 1 回実施し，テレメトリーシステムにより体温を投与前及び投与後 48 時間まで経時的に測定した．また，媒体の投与前及び 1.5 mg/kg の投与後約 72 時間に神経行動学的検査を実施した．検討 2 では，一般状態観察を投与前及び 1.5 mg/kg の投与後 48 時間まで 3 時間間隔で実施した．投与容量はいずれも 0.5 mL/kg とし，エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（マンニトール 2%，グリシン 1%，トレハロース 1%含有）に溶解させた．また，薬理作用の指標として血漿 PTH 及び血清電解質（Ca，P 及び Mg）を測定し，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

その結果，本薬の薬理作用に基づき，0.3 mg/kg 以上で投与量に応じた血漿 PTH の低値が認められた．また，血漿 PTH の低下に伴い，0.3 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca 及び血清 Mg の低値が認められ，血清 P の高値も認められた．1.5 mg/kg では，投与後 24 時間にかけて持続的な血漿 PTH 及び血清 Ca の低下が認められ，投与後 24 時間における血清 Ca は投与前値と比較して約 30%低下した．各投与量における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移を表 2.6.2.4.1-1，血漿中エテルカルセチド濃度を表 2.6.2.4.1-2 に示す．

一般状態観察では，検討 1 において 1.5 mg/kg の 2 例で振戦が認められた．検討 2 において 1.5 mg/kg で経時的な一般状態観察を実施した結果，振戦は，血清 Ca が最も低値を示す投与後 18 時間から 24 時間にかけて認められた．強い振戦症状を示した動物では，血清 Ca の低値も顕著であり，投与後 24 時間以内に足のこわばり，浅速呼吸や後肢の震えなども認められた．これらの動物に乳酸リンゲル液を静脈内投与し，Ca 補充した結果，振戦を含むこれらの症状は消失した．また，Ca 補充しなかった動物でも，血清 Ca の回復に伴い，振戦症状は消失し，いずれの動物においても 1.5 mg/kg の投与後約 72 時間に実施した神経行動学的検査で異常は認められなかった．以上のことから，本薬の投与により生じた振戦やその他の一般状態変化は血清 Ca の低下に伴う二次的変化と考えられた．

体温測定では，1.5 mg/kg の投与後 20 時間から 27 時間にかけて軽度な体温上昇が認められた．体温上昇は，振戦や顕著な血清 Ca の低下が認められる時間帯に生じており，振戦症状の強い動物で顕著であったことから，血清 Ca の低下あるいは振戦による二次的変化と考えられた．

以上より，1.5 mg/kg で振戦や軽度な体温上昇が認められ，イヌにおける中枢神経系に対する無影響量は 0.3 mg/kg と判断した．

表 2.6.2.4.1-1　イヌを用いた安全性薬理試験における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移

	投与量 (mg/kg)	投与前値 (実測値)	投与前値に対する変化率（%）							
			投与後（時間）							
			3	6	9	12	18	24	36	48
PTH	0.3 [a]	67 pg/mL	-	-100	-			14	-	29
	1.5 [a]	61 pg/mL		-98				-79		0
	1.5 [b]	38 pg/mL	-82	-100	-100	-100	-100	-66	39	40
Ca	0.3 [a]	9.9 mg/dL	-	-9	-			-9	-	-2
	1.5 [a]	9.9 mg/dL		-12				-29		-11
	1.5 [b]	10 mg/dL	-12	-16	-19	-22	-27	-32	-16	-10

[a]：検討 1　　[b]：検討 2　　-：評価しなかった.

表 2.6.2.4.1-2　イヌを用いた安全性薬理試験におけるトキシコキネティクス測定の成績

投与量 (mg/kg)	血漿中エテルカルセチド濃度（ng/mL）						
	投与直後 (C2min)	投与後（時間）					
		3	6	9	12	24	48
0.3 [a]	627.8	-	29.3	-	-	5.2	-
1.5 [a]	3412.5	-	179.8	-	-	29.6	-
1.5 [b]	-	315.3	147.8	91.7	68.9	24.2	5.4

[a]：検討 1　　[b]：検討 2　　-：評価しなかった.

2.6.2.4.2　心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1　hERG チャネル電流に対する作用

エテルカルセチドの hERG チャネル電流に対する作用を以下の 2 試験で評価した．なお，試験 2 は，試験実施施設の GLP 適合性を確認できなかったため，参考資料とした.

1)　hERG チャネル電流に対する作用（試験 1）

［評価資料：4.2.1.3-5］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3～4 標本／濃度）を用いて，エテルカルセチドの hERG チャネル電流に対する作用を検討した．蒸留水に溶解させたエテルカルセチドを灌流液に添加し，0.1，0.3，1，3 及び 10 μg/mL（それぞれ 0.0954，0.286，0.954，2.86 及び 9.54 μmol/L）の濃度で試験を実施した.

その結果，エテルカルセチドは最高濃度の 10 μg/mL（9.54 μmol/L）まで hERG チャネル電流に対する影響を示さなかった.

2) hERG チャネル電流に対する作用（試験 2）

［参考資料：4.2.1.3-2］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（5 標本／濃度）を用いて，エテルカルセチドの hERG チャネル電流に対する作用を検討した．イオン交換水に溶解させたエテルカルセチドを灌流液に添加し，0.1，0.3，1，3 及び 10 μg/mL（それぞれ 0.0954，0.286，0.954，2.86 及び 9.54 μmol/L）の濃度で試験を実施した．

その結果，エテルカルセチドは最高濃度の 10 μg/mL（9.54 μmol/L）まで hERG チャネル電流に対する影響を示さなかった．

2.6.2.4.2.2 イヌの心血管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

ビーグル犬（雄 4 例／群）に，エテルカルセチドを 0（媒体），0.3 及び 1.5 mg/kg の順に，各投与量を 7 又は 8 日間隔で単回静脈内急速投与した．テレメトリーシステムにより無麻酔・非拘束下で，平均血圧，心拍数及び心電図（RR 間隔，QT 間隔及び QTcF）を投与前及び投与後 48 時間まで経時的に測定した．投与容量は 0.5 mL/kg とし，エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（マンニトール 2%，グリシン 1%，トレハロース 1%含有）に溶解させた．

各投与量における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移を表 2.6.2.4.1-1，血漿中エテルカルセチド濃度を表 2.6.2.4.1-2 に示す．

その結果，1.5 mg/kg では，平均血圧の上昇が投与後 22 時間から 26 時間にかけて認められ，心拍数の軽度な上昇が投与後 20 時間から 27 時間にかけて認められた．また，QTcF の延長が投与後 16 時間から 40 時間にかけて断続的に認められ，対照群と比較して最大 21%の延長であった（図 2.6.2.4.2.2-1）．いずれも血清 Ca が最も低値を示す投与後 24 時間前後で認められ，血清 Ca の回復に伴い回復したことから，血清 Ca の低下に伴う二次的変化であると考えられた．

以上より，1.5 mg/kg で QTcF の延長，一過性の心拍数増加及び血圧上昇が認められ，イヌにおける心血管系に対する無影響量は 0.3 mg/kg と判断した．

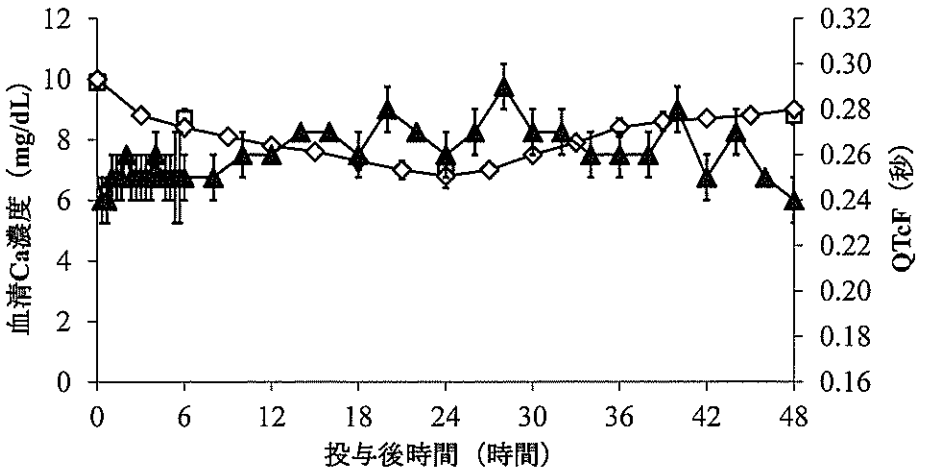


図 2.6.2.4.2.2-1　イヌにおけるエテルカルセチド（1.5 mg/kg）投与後の血清 Ca 及び QTcF の推移

血清 Ca 及び QTcF は平均値±標準偏差（3～4 例 [a]）を示す.
QTcF（▲），血清 Ca（▨：QTcF 評価時の測定値，◇：QTcF 評価後（42 日間休薬後）の測定値）
a：投与後 20 及び 100 分，5，20～24 及び 38 時間の各 1 例で QTcF を算出できなかった.

2.6.2.4.3　　呼吸系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

ビーグル犬（雄 4 例／群）に，エテルカルセチドを 0（媒体），0.3 及び 1.5 mg/kg の順に，各投与量を 7 又は 8 日間隔で単回静脈内急速投与した．呼吸数及び血液ガス（動脈血酸素分圧，動脈血炭酸ガス分圧，動脈血 pH 及びヘモグロビン酸素飽和度）を投与前及び投与後 6，24 及び 48 時間に測定した．投与容量は 0.5 mL/kg とし，エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（マンニトール 2%，グリシン 1%，トレハロース 1%含有）に溶解させた.

各投与量における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移を表 2.6.2.4.1-1，血漿中エテルカルセチド濃度を表 2.6.2.4.1-2 に示す.

その結果，エテルカルセチドは最高投与量である 1.5 mg/kg まで呼吸数及び血液ガスに対する影響を示さず，イヌにおける呼吸系に対する無影響量は 1.5 mg/kg と判断した.

2.6.2.4.4　　補足的安全性薬理試験

エテルカルセチドの溶血性について，毒性試験で使用した媒体（マンニトール 2%，グリシン 1%，トレハロース 1%含有 10 mmol/L コハク酸緩衝液）及び臨床製剤と同組成の媒体（塩化ナトリウム 0.85%含有 10 mmol/L コハク酸緩衝液）を用いて評価した.

2.6.2.4.4.1　　ヒト血液を用いた溶血性試験（*in vitro*）

［評価資料：4.2.1.3-3］

ヒト血液（3 名／濃度）を用いて，エテルカルセチドの溶血性を評価した．毒性試験で使用した媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（マンニトール 2%，グリシン 1%，トレハロース 1%含有）にエテルカルセチドを溶解させ，ヒト血液と 1：1 の割合で混和し，0.1～30 mg/mL の濃度で試験を実施した．エテルカルセチドを混和したヒト血液を 37℃で 40～45 分間インキュベーションし，遠心処理した後，上清中のヘモグロビン濃度を測定した．

その結果，最高濃度である 30 mg/mL までヘモグロビン濃度の変動は認められず，エテルカルセチドは溶血性を示さなかった．

2.6.2.4.4.2　　ヒト血液を用いた溶血性試験（*in vitro*）

［評価資料：4.2.1.3-4］

ヒト血液（3 名／濃度）を用いて，エテルカルセチドの溶血性を評価した．臨床製剤と同組成の媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（塩化ナトリウム 0.85%含有）にエテルカルセチドを溶解させ，ヒト血液と 1：1 の割合で混和し，0.05～5 mg/mL の濃度で試験を実施した．エテルカルセチドを混和したヒト血液を 37℃で 41 分間インキュベーションし，遠心処理した後，上清中のヘモグロビン濃度を測定した．

その結果，最高濃度である 5 mg/mL までヘモグロビン濃度の変動は認められず，エテルカルセチドは溶血性を示さなかった．

2.6.2.5　　薬力学的薬物相互作用試験

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検討した．

2.6.2.5.1　　シナカルセト塩酸塩との併用

［評価資料：4.2.1.4-1］

ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 IP-1 含量に対するシナカルセト塩酸塩とエテルカルセチドの併用効果を *in vitro* にて検討した．

2 種類の CaSR/HEK-293T 細胞に，1.2 mmol/L の Ca 存在下で CaSR を低度又は中等度活性化させる濃度のエテルカルセチド又はシナカルセト塩酸塩を，あるいは両化合物を添加し，IP-1 の細胞内含量を指標に CaSR 作動活性を評価した．なお，併用時の相加的作用の指標として，各化合物単独処置時の細胞内 IP-1 含量の総和を算出した（理論値）．

いずれの試験においても，各化合物の単独処置によって，CaSR の作動活性が確認された．更に，4 試験中 3 試験において，エテルカルセチド及びシナカルセト塩酸塩の共処置によっ

て細胞内 IP-1 含量は増大し，理論値と同程度であった．1 試験は，理論値よりもわずかに高値を示した．

2.6.2.6 考察及び結論

エテルカルセチドは，ヒト CaSR 強制発現細胞において，Ca 及び IP-1[1] の細胞内含量を添加濃度に応じて増加させた．一方，エテルカルセチドは CaSR を強制発現していない親細胞の Ca 及び IP-1[1] の細胞内含量は増加させなかった．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組織からの PTH 分泌を添加濃度に応じて抑制した．CaSR は副甲状腺からの PTH 分泌を制御していることから [4]，エテルカルセチドは，CaSR を活性化させることで，副甲状腺からの PTH 分泌を抑制したと考えられた．なお，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 濃度に応じて発揮され，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 を活性化させた [1]．同様に，ラット副甲状腺組織からの PTH 分泌抑制作用も細胞外 Ca 濃度に応じて発揮された．したがって，エテルカルセチドの CaSR 作動活性は，シナカルセト塩酸塩と同様 [4]，アロステリック作動活性に基づくものと考えられた．

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［2.6.4.5.2］．これらを還元処理すると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，M11）となるが，KP-2067 が CaSR 作動活性を示すのに対し，KP-2067 の N 末端の D-Cys を欠損した KP-2140 は，CaSR 作動活性を示さなかった．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 や，Tyr 482 型であるミニブタ CaSR に対してエテルカルセチドは作動活性を示さなかったことから，エテルカルセチドの D-Cys と CaSR の Cys 482 とのジスルフィド結合により CaSR 作動活性が発揮されるものと考えられた．なお，Ca リガンドは，ヒト変異 CaSR 及びミニブタ CaSR に対しても作動活性を示したことから，エテルカルセチドは，Ca リガンドとは異なる結合部位に結合すると考えられた．また，CaSR の Cys 482 は細胞外ドメインに存在することから，エテルカルセチドは CaSR の細胞外ドメインに結合すると考えられるのに対し，シナカルセト塩酸塩は他の calcimimetics と同様に CaSR の膜貫通部分に結合すると考えられており [4] [5]，エテルカルセチドの CaSR に対する結合部位はシナカルセトと異なるために，エテルカルセチドとシナカルセトを併用することで相加的な作用が認められたと考えられた．

エテルカルセチドは，34 種類の受容体，チャネル及びトランスポーターのリガンド結合に対して作用しなかった．CaSR は GPCR のクラス C に分類されるが，細胞外ドメインの相同性領域に位置する Cys 482 は，CaSR に特徴的であり，他の GPCR には認められない [2]．したがって，エテルカルセチドは，CaSR に特徴的な Cys 482 に結合することで高い選択性を示すと考えられた．

エテルカルセチドは，正常イヌにおいて，単回静脈内投与により血漿中エテルカルセチド濃度に応じて速やかに血漿 PTH を低下させ，その作用は血漿中エテルカルセチド濃度の低下とともに消失した．エテルカルセチドは，正常ラット，急性及び慢性腎障害ラットにおいて，単回あるいは反復投与により速やかに血中 PTH を低下させ，その作用は予防的又は治療的投与のいずれにおいても認められた．すなわち，エテルカルセチドは血漿 PTH あるいは腎障害の程度にかかわらず，血漿 PTH を低下させることが確認された．同様に，正常イヌ，急性及び慢性腎障害ラットにおいて，エテルカルセチドは血清 Ca を低下させた．これは，エテルカルセチドの PTH 分泌抑制作用により骨吸収が抑制され，血中への Ca 放出が抑制された結果と考えられた．なお，エテルカルセチドは，正常イヌ，正常ラット［2.6.6.9］並びに慢性腎障害ラットの血中 P を増加させた．PTH の生理作用として，腎尿細管の II 型ナトリウム依存性 P 輸送担体からの P 再吸収を抑制することが報告されている [6]．したがって，エテルカルセチド投与による血中 P の増加は，エテルカルセチドの血中 PTH の低下に基づく腎尿細管からの P 再吸収促進によるものと考察された．一方，エテルカルセチドは透析中の SHPT 患者の血清 P を低下させる［2.7.3.3.2.3］．これは，PTH の P 再吸収抑制機構が両動物では残存しているが，SHPT 患者では破綻していることに基づくと考えられた．同様に，上記の血中 P の反応性の違いは，同種同効薬のシナカルセト塩酸塩においても報告されている [7]．したがって，残腎機能がある動物の血中 P の増加作用は，SHPT 患者への外挿性が低いと考えられた．

エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットで生じる副甲状腺細胞増殖に伴う重量増加を抑制した．本作用は，予防的又は治療的投与のいずれにおいても認められ，エテルカルセチドは SHPT で認められる副甲状腺過形成を抑制すると考えられた．

エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットの大動脈における組織中 Ca あるいは P 含量を低下させた．これは，持続的に血中で過剰になった Ca をエテルカルセチドが抑制したことにより，異所性石灰化が抑制されたものと考えられた．更に，エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットの血清 FGF23 を低下させた．CKD 患者では，血中 FGF23 の増大によって SHPT の病態が進展し，血管及び組織石灰化の発症に繋がると考えられている [8]．したがって，エテルカルセチドの血中 FGF23 の低下作用も，SHPT の進展や石灰化の抑制に寄与するものと考えられた．

エテルカルセチドは，慢性腎障害ラットの骨吸収及び骨形成パラメータを低下させた．更に，エテルカルセチドは SHPT 発症後の慢性腎障害ラットの皮質骨多孔率，最大荷重，破断エネルギー及び靭性を改善した．対照群において，媒体の最終投与後 4 時間における血清 PTH に対し，皮質骨多孔率は正の相関関係を（R^2＝0.92），血清 PTH と最大荷重又は破断エネルギーは負の相関関係を（R^2＝0.70 又は 0.75），それぞれ示した．また，皮質骨多孔率

と，最大荷重又は破断エネルギーは，それぞれ負の相関関係を示した（R^2=0.73 又は 0.80）．これらのことから，本病態モデルの骨強度の低下は，PTH の増加に伴う骨代謝回転の亢進に基づく皮質骨多孔化によるものと考えられた．以上より，エテルカルセチドは，血中 PTH 低下作用を介して，骨代謝回転を低下させることで皮質骨多孔化を改善することにより，骨強度の低下を抑制すると考えられた．

以上，エテルカルセチドの SHPT 病態モデルに対するこれら一連の作用は，エテルカルセチドが CaSR を介して予防的あるいは治療的に血中 PTH 及び Ca を低下させた結果と考えられた．SHPT 患者における副甲状腺過形成に伴う PTH の過剰分泌は，骨吸収の亢進に伴う高骨代謝回転を促し，血中への Ca，P あるいは FGF23 の放出を亢進させることで血管及び軟組織石灰化並びに線維性骨炎を引き起こす．その結果，骨折あるいは心血管系合併症のリスクが増大し患者の QOL が低下する [9]．シナカルセト塩酸塩は基礎だけでなく [4]，臨床においても副甲状腺過形成 [10]，骨障害 [11] 及び血管石灰化 [12] に対して抑制作用を示す．したがって，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 病態に対する治療効果を発揮すると期待される．

安全性薬理試験において，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 では投与後 24 時間にかけて血清 Ca が約 30%低下し，投与後 24 時間前後で振戦，QTc の延長，体温上昇，心拍数及び平均血圧の上昇などが認められた．一方，エテルカルセチドはイヌにおいて 1.5 mg/kg まで呼吸系に影響せず，*in vitro* で hERG チャネル電流阻害やヒト血液に対する溶血性も示さなかった．

振戦については，血清 Ca の低下により末梢神経線維の興奮性が亢進し，骨格筋の攣縮（テタニー）が生じることが知られている [13]．本試験で認められた振戦などの症状変化は，血清 Ca が最も低値を示す時間帯の前後で認められ，乳酸リンゲル液による Ca の補充や血清 Ca の回復により軽減又は消失したことから，エテルカルセチドの薬理作用に基づく血清 Ca の低下により生じたテタニー症状と考えられた．

QTc の延長についても，血清 Ca の低下により生じることが知られている [14]．本薬の QTc の延長は 1.5 mg/kg の投与後 16 時間から 40 時間にかけて断続的に認められ，対照群と比較して最大 21%の延長であった．QTc の延長は血清 Ca が最も低値を示す時間帯を中心に認められ，血清 Ca の回復に伴い QTc の延長も回復したことから，血清 Ca の低下に伴う二次的変化と考えられた．また，1.5 mg/kg の静脈内急速投与直後の血漿中エテルカルセチド濃度（C2min）は 3.4 μg/mL（非蛋白結合濃度：2.3 μg/mL）であり，エテルカルセチドの hERG チャネル電流に対する無影響量（10 μg/mL）未満であることから，本薬の QTc の延長は hERG チャネル阻害に基づく影響ではないと考えられた．なお，本薬と同様の QTc 延長作用は，同種同効薬のシナカルセト塩酸塩でもイヌで認められている [15]．その他，1.5

mg/kg で認められた軽度な体温上昇や心拍数及び平均血圧の上昇も，血清 Ca の低下や振戦と同様のタイミングで認められていることから，血清 Ca の低下あるいは振戦に伴う二次的変化であると考えられた．

以上より，エテルカルセチドの中枢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．イヌの無影響量（0.3 mg/kg）における C2min は 0.63 μg/mL であり，臨床最大用量（15 mg/person）での定常状態における推定 Cmax（約 1.1 μg/mL）との安全域は 1 倍未満であった（表 2.6.2.6-1）が，いずれもエテルカルセチドの薬理作用に基づく血清 Ca の低下による二次的変化であり，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することで，安全に使用することが可能と考えられた．

以上，エテルカルセチドは有用な SHPT 治療薬になると考えられた．

表 2.6.2.6-1 イヌの無影響量（0.3 mg/kg）と臨床の用法・用量（15 mg/person）との血漿中エテルカルセチド濃度の比較

種	投与量	性	Cmax[d] (ng/mL)	Cmax 比 (動物／ヒト)
ヒト[a]	15 mg/person	-	1068	-
イヌ[b]	0.3 mg/kg[c]	雄	627.8	0.59
	1.5 mg/kg		3412.5	3.20

a：日本人 SHPT 患者にエテルカルセチドを 5 mg/person の用量で週 3 回静脈内急速投与したときの投与 27～29 日の Cmax に基づく推定値［表 2.7.2.2-4］
b：イヌを用いた安全性薬理試験における単回静脈内急速投与の C2min（表 2.6.2.4.1-2）
c：無影響量
d：イヌでは C2min

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した．

2.6.2.8 参考文献

1) 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 Treatment of Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis Patients. J Pharmacol Exp Ther. 2013;346:229-40.

2) 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.

3) Walter S, Baruch A, Alexander ST, Janes J, Sho E, Dong J, et al. Comparison of AMG 416 and cinacalcet in rodent models of uremia. BMC Nephrol. 2014;15:81.

4) 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.

5) Miedlich SU, Gama L, Seuwen K, Wolf RM, Breitwieser GE. Homology Modeling of the Transmembrane Domain of the Human Calcium Sensing Receptor and Localization of an Allosteric Binding Site. J Biol Chem. 2004;279:7254-63.

6) Zhao N, Tenenhouse HS. Npt2 Gene Disruption Confers Resistance to the Inhibitory Action of Parathyroid Hormone on Renal Sodium-Phosphate Cotransport. Endocrinology. 2000;141:2159-65.

7) 永野伸郎, 安藤哲郎, 伊藤恭子, 安藤義孝. シナカルセト塩酸塩とリン代謝. Clin Calcium. 2012;22:1567-76.

8) Kovesdy CP, Quarles LD. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. Nephrol Dial Transplant. 2013;28:2228-36.

9) 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.

10) 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.

11) Behets GJ, Spasovski G, Sterling LR, Goodman WG, Spiegel DM, De Broe ME, et al. Bone histomorphometry before and after long-term treatment with cinacalcet in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. Kidney Int. 2015;87:846-56.

12) 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.

13) Hall JE. Chapter 79, Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phosphate Metabolism, Vitamin D, Bone, and Teeth. Hypocalcemia Causes Nervous System Excitement and Tetany. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th. 2011:956.

14) Scheidegger D, Drop LJ. The Relationship Between Duration of Q-T Interval and Plasma Ionized Calcium Concentration: Experiments with Acute, Steady-state [Ca^{++}] Changes in the Dog. Anesthesiology. 1979;51:143-8.

15) レグパラ錠 25mg，同錠 75mg 申請資料概要 2.4 非臨床試験の概括評価.

2.6.3 薬理試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.3.3 副次的薬理試験 21
2.6.3.4 安全性薬理試験 24
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 26

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：エテルカルセチド

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 Ca に対する作用	ヒト CaSR 強制発現細胞株及び親細胞株	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]QA001	4.2.1.1-1
ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 IP-1 含量に対する作用	ヒト CaSR 強制発現細胞株及び親細胞株	*In vitro*	KAI Pharmaceuticals, Inc.	4169-NC-120	4.2.1.1-2 (参考資料)
CaSR への結合様式	ヒト CaSR 強制発現細胞株, ヒト変異 CaSR 強制発現細胞株, ブタ CaSR 強制発現細胞株, 又はブタ変異 CaSR 強制発現細胞株	*In vitro*	KAI Pharmaceuticals, Inc.	4169-NC-160	4.2.1.1-3
ラット副甲状腺細胞からの PTH 分泌に対する作用	ラット副甲状腺初代培養細胞	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]QA002	4.2.1.1-4
ラット副甲状腺組織からの PTH 分泌に対する作用	ラット副甲状腺摘出組織	*In vitro*	[redacted]	R[redacted]0052	4.2.1.1-5
正常イヌの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用	正常イヌ	静脈内持続	ITR Laboratories Canada Inc.他	4169-NC-103	4.2.1.1-6
正常ラットの血漿 PTH に対する作用	正常ラット	静脈内急速	KAI Pharmaceuticals, Inc.	4169-NC-120 4169-NC-160	4.2.1.1-2 (参考資料) 4.2.1.1-3
急性腎障害ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用	1K1C ラット	静脈内急速	KAI Pharmaceuticals, Inc.	4169-NC-120	4.2.1.1-2 (参考資料)

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用（単回投与）	高 P 食負荷 5/6 腎摘ラット	静脈内急速	小野薬品工業株式会社	E[redacted]QA001	4.2.1.1-7
5/6 腎摘ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用（反復投与）	5/6 腎摘ラット	静脈内急速	Charles River Laboratories 他	4169-NC-120	4.2.1.1-2（参考資料）
高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの副甲状腺過形成に対する作用（予防投与）	高 P 食負荷 5/6 腎摘ラット	皮下	KAI Pharmaceuticals, Inc.	4169-NC-145	4.2.1.1-8
VD 欠乏及び高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの組織石灰化に対する作用（予防投与）	VD 欠乏及び高 P 食負荷 5/6 腎摘ラット	皮下	KAI Pharmaceuticals, Inc.他	4169-NC-145	4.2.1.1-8
アデニン食負荷ラットの血管石灰化に対する作用（予防投与）	アデニン食負荷ラット	皮下	Amgen Inc.	R[redacted]0076	4.2.1.1-9
5/6 腎摘ラットの骨形態パラメータに対する作用（治療投与）	5/6 腎摘ラット	皮下	Amgen Inc.	R[redacted]0074	4.2.1.1-10
高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの発症後 SHPT 病態に対する作用（治療投与）	高 P 及び低 Ca 食負荷 5/6 腎摘ラット	皮下	Amgen Inc.	R[redacted]0075	4.2.1.1-11

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
副次的薬理試験					
In situ ハイブリダイゼーション法を用いた解析	CaSR 組織分布	*In vitro*	Amgen Inc.	R[redacted]084	4.2.1.2-1
RNA sequence 法を用いた解析	CaSR 組織分布	*In vitro*	Amgen Inc.	119880	4.2.1.2-2
各分子標的に対する作用	34 種類の受容体・チャネル・トランスポーター／リガンド	*In vitro*	[redacted]	4169-NC-128	4.2.1.2-3
生体内変換物質の作用	ヒト CaSR 強制発現細胞株	*In vitro*	Amgen Inc.	R[redacted]0023	4.2.1.2-4

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
安全性薬理試験					
中枢神経系に対する作用	ビーグル犬 [1)]	静脈内急速	[redacted]	4169-NC-102	4.2.1.3-1
心血管系に対する作用	HEK293 細胞 [2)]	*In vitro*	[redacted]	122036	4.2.1.3-5
	HEK293 細胞 [3)]	*In vitro*	[redacted] [4)]	4169-NC-151	4.2.1.3-2 (参考資料)
	ビーグル犬 [1)]	静脈内急速	[redacted]	4169-NC-102	4.2.1.3-1
呼吸系に対する作用	ビーグル犬 [1)]	静脈内急速	[redacted]	4169-NC-102	4.2.1.3-1
補足的安全性薬理試験	ヒト血液 [2)]	*In vitro*	[redacted]	4169-NC-111	4.2.1.3-3
	ヒト血液 [3)]	*In vitro*	[redacted]	4169-NC-154	4.2.1.3-4
[redacted]					

1) GLP 適用試験（PTH 測定は GLP 非適用）
2) GLP 適用試験
3) GLP 適用試験（投与液の濃度測定は，OECD 非加盟かつ MAD 制度非参加国（中国）において GLP に準拠して実施）
4) 試験実施施設の GLP 適合性は確認されていない.

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
薬力学的薬物相互作用試験					
シナカルセト塩酸塩との併用	ヒト CaSR 強制発現細胞株	*In vitro*	Amgen Inc.	R[redacted]0030	4.2.1.4-1

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：エテルカルセチド

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 Ca に対する作用	ヒト CaSR 強制発現細胞株又は親細胞株	*In vitro*	0.03～300 μ mol/L	エテルカルセチドは，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の細胞内 Ca を増加させ，その EC_{50} 値は 0.53 μ mol/L であった．一方，CaSR を発現していない親細胞の HEK-293T 細胞に対して，エテルカルセチドは作用を示さなかった．	E[redacted]QA001	4.2.1.1-1
ヒト CaSR 強制発現細胞の細胞内 IP-1 含量に対する作用	ヒト CaSR 強制発現細胞株又は親細胞株	*In vitro*	0.5～500 μ mol/L	Ca 存在下においてエテルカルセチドは，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の IP-1 含量を増加させ，その EC_{50} 値は 25 μ mol/L であった．一方，親細胞の HEK-293T 細胞に対して，エテルカルセチドは作用を示さなかった．また，エテルカルセチドは Ca 存在下では低濃度域から IP-1 含量を増加させたが，Ca 非存在下では高濃度域でのみわずかに IP-1 含量を増加させた．	4169-NC-120	4.2.1.1-2（参考資料）

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
CaSR への結合様式	ヒト CaSR 強制発現細胞株， ヒト変異 CaSR 強制発現細胞株， ブタ CaSR 強制発現細胞株， 又はブタ変異 CaSR 強制発現細胞株	*In vitro*	0.41～300 μmol/L（KP-2067，KP-2140） 0.63～20 mmol/L（Ca）	KP-2067 及び Ca リガンドは，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の IP-1 含量を増加させた．一方，KP-2140 は IP-1 含量を増加させなかった．	4169-NC-160	4.2.1.1-3
			2.3～300 μmol/L（エテルカルセチド） 0.63～10 mmol/L（Ca）	Ca リガンドは，添加濃度に応じてヒト CaSR 又はヒト変異 CaSR を強制発現させた各細胞の IP-1 含量を増加させた．一方，エテルカルセチドは，ヒト CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量を増加させたが，ヒト変異 CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量は増加させなかった．		
			2.3～300 μmol/L（エテルカルセチド） 0.63～10 mmol/L（Ca）	ブタ CaSR（Tyr 482）あるいはブタ変異 CaSR（Cys 482）を強制発現させた HEK-293T 細胞を用いた試験において，Ca リガンドはいずれの発現細胞においても IP-1 含量を増加させた．一方，エテルカルセチドはブタ CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量を増加させなかったが，ブタ変異 CaSR 強制発現細胞の IP-1 含量を増加させた．		
			8～80 μmol/L（KP-2067）	25 及び 80 μmol/L の KP-2067 を添加したとき，CaSR の Cys 482 への結合が認められ，結合率はそれぞれ，5.3 及び 12.1%であった．		

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ラット副甲状腺細胞からのPTH分泌に対する作用	ラット 副甲状腺 初代培養細胞	*In vitro*	0.01～ 100 μ mol/L	エテルカルセチドは添加濃度に応じてラット副甲状腺初代培養細胞のPTH分泌を抑制し，そのEC_{50}値は0.36 μ mol/Lであった.	E[redacted]QA002	4.2.1.1-4
ラット副甲状腺組織からのPTH分泌に対する作用	ラット 副甲状腺 摘出組織	*In vitro*	0.8～ 1.25 mmol/L (Ca) 0.1～ 10 μ mol/L (エテルカルセチド)	Ca単独では添加濃度に応じてラット副甲状腺のPTH分泌を抑制した．エテルカルセチドは添加濃度に応じてラット副甲状腺のPTH分泌を抑制し，0.8，1.0及び1.25 mmol/LのCa存在下におけるEC_{50}値はそれぞれ1.2，0.7及び0.4 μ mol/Lであった.	R[redacted]0052	4.2.1.1-5
正常イヌの血漿PTH及び血清Caに対する作用	イヌ／Beagle (雄各4例／群)	静脈内 持続	0.024，0.192，0.48 mg/kg (1，8，20 μ g/kg/h) (単回投与)	エテルカルセチドの0.192及び0.48 mg/kgは，投与開始後1時間から24時間の投与終了まで，持続して血漿PTHを低下させた．また，血漿PTHの低下に伴い，血清Caも低下した．エテルカルセチドの投与終了後，血漿中濃度は低下し，それに伴って血漿PTH及び血清Caは回復性を示した.	4169-NC-103	4.2.1.1-6
正常ラットの血漿PTHに対する作用	ラット／SD (雄各2～8例／群)	静脈内 急速	0.1，0.3，0.5，1 mg/kg (単回投与)	エテルカルセチド投与後1時間において，0.1及び0.3 mg/kgでの相対血漿PTHは，それぞれ投与前の61及び11%まで低下し，0.5 mg/kg以上の投与量では投与前の10%以下に低下した．0.3及び0.5 mg/kgにおける相対血漿PTHは投与後1時間以降に徐々に増加し，投与後4時間では，それぞれ投与前の63及び45%まで回復した．1 mg/kgでは，投与後4時間においても相対血漿PTHは投与前の10%以下であった.	4169-NC-120	4.2.1.1-2 (参考資料)

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
正常ラットの血漿 PTH に対する作用	ラット／SD（雄各 5～22 例／群）	静脈内急速	KP-2067 0.5，3 mg/kg （単回投与） KP-2140 3 mg/kg （単回投与）	*In vitro* でヒト CaSR 作動活性が認められた KP-2067 は，正常ラットの PTH を抑制し，ヒト CaSR 作動活性が認められなかった KP-2140 は，PTH を抑制しなかった.	4169-NC-160	4.2.1.1-3
急性腎障害ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用	1K1C ラット／SD（雄各 2～6 例／群）	静脈内急速	0.3，0.5，1，3 mg/kg （単回投与，PTH）	エテルカルセチド投与後 1 時間において，0.3 mg/kg の相対血漿 PTH は投与前の約 30%まで低下し，0.5 mg/kg 以上では投与前の 10%以下に低下した．その後，相対血漿 PTH は徐々に増加し，投与後 24 時間における相対血漿 PTH は，0.3 mg/kg で投与前の 105%，0.5 mg/kg で 53%及び 1 mg/kg で 28%まで回復した．3 mg/kg では，投与後 24 時間においても相対血漿 PTH は投与前の 10%以下であった.	4169-NC-120	4.2.1.1-2 （参考資料）
			0.3，0.5，1 mg/kg （単回投与，Ca）	エテルカルセチド投与後 16 及び 24 時間における血清 Ca は投与前値と比較して低値傾向であった.		

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用（単回投与）	高 P 食負荷 5/6 腎摘ラット／SD（雄各 8 例／群）	静脈内急速	0.3，1，3 mg/kg（単回投与）	エテルカルセチド投与群の相対血漿 PTH は，投与後 1 及び 6 時間において，対照群と比較して，すべての投与量で有意に低値であった．その作用は，3 mg/kg では投与後 24 時間まで持続した． エテルカルセチド投与群の血清 Ca は，1 及び 3 mg/kg で投与後 1 時間において，対照群と比較して有意に低値を示し，その作用は投与後 48 時間まで持続した．また，0.3 mg/kg では投与後 6 時間において，対照群と比較して，有意に低値であった． エテルカルセチド投与後 6 時間における血漿 P は，対照群と比較して，すべての群で有意に高値であった．	E[redacted]QA001	4.2.1.1-7

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
5/6 腎摘ラットの血漿 PTH 及び血清 Ca に対する作用（反復投与）	5/6 腎摘ラット／SD（雄各 6～12 例／群）	静脈内 急速 経口	エテルカルセチド 1 mg/kg（4 週間連日投与） シナカルセト塩酸塩 10 mg/kg（4 週間連日投与）	反復投与 28 日目のエテルカルセチド投与後 6，16 及び 48 時間における相対血漿 PTH は対照群と比較して有意に低値であった．一方，シナカルセト塩酸塩では投与後 6 時間の血漿 PTH は対照群と比較して有意に低値を示したが，投与後 16 及び 48 時間では対照群と同程度であった．なお，反復投与 7，14 及び 21 日目においても，反復投与 28 日目と同様のエテルカルセチド及びシナカルセト塩酸塩の相対血漿 PTH に対する作用が認められた． エテルカルセチド投与群の血清 Ca は，対照群と比較して低値傾向であった．一方，シナカルセト塩酸塩投与群の血清 Ca は対照群と同程度であった．	4169-NC-120	4.2.1.1-2（参考資料）

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの副甲状腺過形成に対する作用（予防投与）	高 P 食負荷 5/6 腎摘ラット／SD（雄各 11～12 例／群）	皮下	0.3，1，3 mg/kg（週 3 回，6 週間投与）	媒体投与後 2～6 週目時点の相対血漿 PTH は，初回投与前と比較して増大した．エテルカルセチドは，投与後 2 週目時点より投与量に応じて相対血漿 PTH の増大を抑制し，3 mg/kg は 2 及び 6 週時点で対照群と比較して相対血漿 PTH を有意に低下させた． 対照群，エテルカルセチドの 0.3，1 及び 3 mg/kg の副甲状腺の抗 BrdU 抗体陽性細胞数は，それぞれ 127，109，74 及び 52 個であり，3 mg/kg は対照群と比較して有意に低値であった． 対照群，エテルカルセチドの 0.3，1 及び 3 mg/kg の体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，それぞれ 5.6，5.3，5.1 及び 4.4 mg/kg であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して低値傾向であった．	4169-NC-145	4.2.1.1-8

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
VD 欠乏及び高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの組織石灰化に対する作用（予防投与）	一時的に VD 欠乏食を負荷した高 P 食負荷 5/6 腎摘ラット／SD（雄各 9～12 例／群）	皮下	3 mg/kg（週 3 回，6 週間投与）	エテルカルセチド投与群の相対血漿 PTH は，投与後 2 及び 4 週時点で対照群と比較して有意に低値であった． 対照群並びにエテルカルセチド投与群の心臓，大動脈弓及び腎臓組織中 Ca 含量は，それぞれ 1.4，9.1 及び 6.7 mg/g of tissue 並びに 0.18，0.99 及び 3.1 mg/g of tissue であり，エテルカルセチド投与群の大動脈弓 Ca 含量は対照群と比較して有意に低値であった．対照群並びにエテルカルセチド投与群の心臓，大動脈弓及び腎臓組織中 P 含量は，それぞれ 7.2，11.6 及び 13.8 mg/g of tissue 並びに 6.3，6.3 及び 11.6 mg/g of tissue であり，エテルカルセチド投与群の心臓及び大動脈弓 P 含量は対照群と比較して有意に低値であった．	4169-NC-145	4.2.1.1-8

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
アデニン食負荷ラットの血管石灰化に対する作用（予防投与）	アデニン食負荷ラット／Wistar（雄各 15～24 例／群）	皮下	0.3 mg/kg（4 週間連日投与）	エテルカルセチド投与群の血漿 PTH は，投与後 4 週時点で対照群と比較して有意に低値であった． 非惹起群，対照群及びエテルカルセチド投与群の体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，それぞれ 1.25，2.49 及び 1.61 mg/kg であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった． 非惹起群，対照群及びエテルカルセチド投与群の面積当たりの副甲状腺 Ki-67 陽性細胞数は，それぞれ 0.118，0.397 及び 0.041 cells/μm^2（×1000）であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった． 血管組織中 Ca 含量は，対照群では非惹起群と比較して有意に高値であり，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して有意に低値であった．血管組織中の P 含量は，非惹起群及びエテルカルセチド投与群において，全例が定量下限未満であった．対照群は，24 例中 18 例で定量下限未満であり，残り 6 例の血管組織中 P 含量は，1725 μg/g of tissue であった．	R[redacted]0076	4.2.1.1-9

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
5/6 腎摘ラットの骨形態パラメータに対する作用（治療投与）	5/6 腎摘ラット／SD（雄各 8～13 例／群）	皮下	エテルカルセチド 0.3，1/0.6 mg/kg（6 週間連日投与）	媒体投与 1 日目より，各対照群の血漿 PTH は，sham 群と比較して有意に高値を示し，反復投与 42 日目においても，有意に高値であった．各投与量のエテルカルセチド並びにシナカルセト塩酸塩投与群は，反復投与 1 及び 42 日目の投与後 4 時間の血漿 PTH が，各対照群と比較して有意に低値であった．また，シナカルセト塩酸塩 15 mg/kg は反復投与 28 日目の投与後 23 時間の血漿 PTH が，対照群と比較して有意に低値であった． 体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，sham 群，対照群（皮下投与），エテルカルセチド 0.3 及び 1/0.6 mg/kg 投与群，対照群（経口投与），シナカルセト塩酸塩 3 及び 15 mg/kg 投与群において，それぞれ 0.90，1.57，1.74，1.03，1.37，1.72 及び 1.25 mg/kg であり，エテルカルセチド 1/0.6mg/kg 投与群は対照群（皮下投与）と比較して有意に低値であった．	R[redacted]0074	4.2.1.1-10
		経口	シナカルセト塩酸塩 3，15 mg/kg（6 週間連日投与）			

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
（続き） 5/6 腎摘ラットの骨形態パラメータに対する作用（治療投与）	5/6 腎摘ラット／SD （雄各 10～13 例／群）	皮下 経口	エテルカルセチド 0.3，1/0.6 mg/kg （6 週間連日投与） シナカルセト塩酸塩 3，15 mg/kg （6 週間連日投与）	エテルカルセチド投与群の破骨細胞面は，対照群（皮下投与）と比較して低値傾向であった．また，エテルカルセチド 0.3 mg/kg 投与群の骨石灰化面及びエテルカルセチド 1/0.6 mg/kg 投与群の類骨面，骨石灰化面，骨形成速度，類骨量及び骨石灰化遅延時間は，対照群（皮下投与）と比較して有意に低値であった．シナカルセト塩酸塩 3 及び 15 mg/kg 投与群の骨形態パラメータは対照群（経口投与）と比較して有意差はなかった．	R[redacted]0074	4.2.1.1-10

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの発症後 SHPT 病態に対する作用（治療投与）	高 P 及び低 Ca 食負荷 5/6 腎摘ラット／SD（雄各 9～13 例／群）	皮下	1/0.6 mg/kg（6 週間連日投与）	Sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群の血清 PTH は，初回投与前の時点では，147，791 及び 686 pg/mL であり，対照群及びエテルカルセチド投与群は sham 群と比較して有意に高値であった．反復投与 42 日目の投与後 4 時間では，168，2205 及び 90 pg/mL であり，対照群では sham 群と比較して有意に高値であった．また，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して有意に低値であった． 体重当たりの副甲状腺重量（相対重量）は，sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群で，それぞれ 0.88，5.91 及び 2.76 mg/kg であり，対照群は sham 群と比較して有意に高値であった．また，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった． 面積当たりの副甲状腺 Ki-67 陽性細胞数は，sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群で，それぞれ 0.160，0.323 及び 0.226 cells/μm^2（×1000）であり，エテルカルセチド投与群は対照群と比較して低値傾向であった．	R[redacted]0075	4.2.1.1-11

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
（続き） 高 P 食負荷 5/6 腎摘ラットの発症後 SHPT 病態に対する作用（治療投与）	高 P 及び低 Ca 食負荷 5/6 腎摘ラット／SD（雄各 10～13 例／群）	皮下	1/0.6 mg/kg （6 週間連日投与）	血清 FGF23 は，初回投与前の時点では，対照群及びエテルカルセチド投与群は sham 群と比較して有意に高値であった．反復投与 42 日目までの全ての評価時点で，対照群では sham 群と比較して有意に高値であり，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して有意に低値であった． 皮質骨多孔率は，sham 群，対照群及びエテルカルセチド投与群で，それぞれ 0.072，8.256 及び 2.273%であり，対照群は sham 群と比較して有意に高値であった．エテルカルセチド投与群は対照群と比較して有意に低値であった． 最大荷重は，対照群では sham 群と比較して有意に低値であり，エテルカルセチド投与群では対照群と比較して高値傾向であった．破断エネルギー及び靭性は，対照群では sham 群と比較して低値傾向であり，エテルカルセチド投与群では，対照群と比較して有意に高値であった．	R[redacted]0075	4.2.1.1-11

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：エテルカルセチド

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
In situ ハイブリダイゼーション法を用いた解析	雌雄マウス及び雌雄カニクイザルの各組織サンプル	*In vitro*	-	マウス組織では，副甲状腺に強いシグナルが，腎尿細管ヘンレループの太い上行脚及び膵島細胞に中程度のシグナルが，脳（視床下部，海馬），食道，胃腺部，十二指腸陰窩及び卵管上皮細胞に弱いシグナルが認められた． サル組織では，副甲状腺に強いシグナルが，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，絨毛）及び膵島細胞に中程度のシグナルが，胃腺部，空腸陰窩基底部，甲状腺 C 細胞及び副腎髄質に弱いシグナルが認められた．	R[redacted]084	4.2.1.2-1

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
RNA sequence 法を用いた解析	雌雄マウス，雌雄ラット，雌雄カニクイザル，雌雄ヒトの各組織サンプル	*In vitro*	-	マウス組織では，下垂体，副甲状腺／甲状腺複合組織，食道，皮膚，腓腹筋，坐骨神経，気管及び腎臓においてCaSRの発現が認められた． ラット組織では，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． サル組織では，膵臓，副甲状腺／甲状腺複合組織，唾液腺，胃幽門部，眼及び腎臓においてCaSRの発現が認められた． ヒト組織では，膵臓（膵頭，膵ランゲルハンス島及び膵尾部），副甲状腺／甲状腺複合組織，十二指腸，空腸及び腎臓（腎皮質及び腎髄質）においてCaSRの発現が認められた．	119880	4.2.1.2-2
各分子標的に対する作用	34種類の受容体，チャネル及びトランスポーター／リガンド	*In vitro*	10 μ mol/L	エテルカルセチドは10 μ mol/Lの濃度で，ムスカリンM_2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%を超える標的は認められなかった．	4169-NC-128	4.2.1.2-3

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
生体内変換物質の作用	ヒト CaSR 強制発現細胞株	*In vitro*	0.1～300 μ mol/L（エテルカルセチド） 0.5～1000 μ mol/L（L-GSH，グルタチオン） 0.1～300 μ mol/L（M10，エテルカルセチドの D-アミノ酸ペプチド体のグルタチオン抱合体） 0.05～100 μ mol/L（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）	エテルカルセチド及び M10 は，添加濃度に応じて CaSR/HEK-293T 細胞の IP-1 含量を増加させ，その EC_{50} 値はそれぞれ 26 及び 66 μ mol/L であった．一方，SAPC は，100 μ mol/L においてエテルカルセチドの 14%未満の活性であった．グルタチオンは，IP-1 含量をほとんど増加させなかった．	R[redacted]0023	4.2.1.2-4

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：エテルカルセチド

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
中枢神経系	ビーグル犬	静脈内急速	0.3，1.5 mg/kg	雄 4	一般状態観察及び体温測定（テレメトリーシステムによる経時測定）により評価，1.5 mg/kgについては投与後72時間に神経行動学的検査も実施	1.5 mg/kgで振戦，足のこわばり，浅速呼吸，後肢の震え，体温のわずかな上昇 神経行動学的検査では無影響	適用	4169-NC-102	4.2.1.3-1
心血管系	HEK293細胞	*In vitro*	0.1，0.3，1，3，10 μg/mL（0.0954，0.286，0.954，2.86，9.54 μmol/L）	各濃度3～4	hERGチャネル電流に対する作用を検討	無影響	適用	122036	4.2.1.3-5
	HEK293細胞	*In vitro*	0.1，0.3，1，3，10 μg/mL（0.0954，0.286，0.954，2.86，9.54 μmol/L）	各濃度5	hERGチャネル電流に対する作用を検討	無影響	適用 [1) 2)]	4169-NC-151	4.2.1.3-2（参考資料）
	ビーグル犬	静脈内急速	0.3，1.5 mg/kg	雄 4	平均血圧，心拍数及び心電図（RR間隔，QT間隔及びQTcF）について，テレメトリーシステムにより投与後48時間まで経時的に評価	1.5 mg/kgでQTcFの延長，心拍数，平均血圧の軽度上昇	適用	4169-NC-102	4.2.1.3-1

1）投与液の濃度測定は，OECD非加盟かつMAD制度非参加国（中国）においてGLPに準拠して実施
2）試験実施施設のGLP適合性は確認されていない．

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
呼吸系	ビーグル犬	静脈内急速	0.3，1.5 mg/kg	雄 4	投与後 6，24 及び 48 時間の呼吸数及び血液ガス（動脈血酸素分圧，動脈血炭酸ガス分圧，動脈血 pH，ヘモグロビン酸素飽和度）を測定	無影響	適用	4169-NC-102	4.2.1.3-1
補足的安全性薬理	ヒト血液	*In vitro*	0.2，0.63，2，6.32，20，60 mg/mL（終濃度 0.1，0.32，1，3.16，10，30 mg/mL）	各濃度 3	投与液とヒト血液を 1:1 の割合で混和し，37℃で 40～45 分間インキュベーションし，遠心処理した後，上清のヘモグロビン濃度を測定し溶血性を評価	無影響	適用	4169-NC-111	4.2.1.3-3
	ヒト血液	*In vitro*	0.1，0.3，1，3，10 mg/mL（終濃度 0.05，0.15，0.5，1.5，5 mg/mL）	各濃度 3	投与液とヒト血液を 1:1 の割合で混和し，37℃で 41 分間インキュベーションし，遠心処理した後，上清のヘモグロビン濃度を測定し溶血性を評価	無影響	適用 [1)]	4169-NC-154	4.2.1.3-4

1）投与液の濃度測定は，OECD 非加盟かつ MAD 制度非参加国（中国）において GLP に準拠して実施

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：エテルカルセチド，シナカルセト塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
シナカルセト塩酸塩との併用	ヒト CaSR 強制発現細胞株（KAI 社又は Amgen 社由来）	*In vitro*	KAI 社由来細胞株 10，28 μ mol/L（エテルカルセチド） 4，37 nmol/L（シナカルセト塩酸塩） 1.2，9.11 mmol/L（Ca） Amgen 社由来細胞株 27，194 μ mol/L（エテルカルセチド） 100，358 nmol/L（シナカルセト塩酸塩） 1.2，9.11 mmol/L （Ca）	いずれの試験においても，各化合物の単独処置によって，CaSR の作動活性が確認された．更に，4 試験中 3 試験において，エテルカルセチド及びシナカルセト塩酸塩の共処置によって細胞内 IP-1 含量は増大し，理論値と同程度であった．1 試験は，理論値よりもわずかに高値を示した．	R[redacted]0030	4.2.1.4-1