2.6.6 毒性試験の概要文

小野薬品工業株式会社

目次

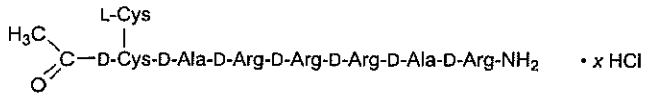
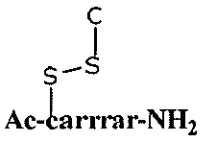
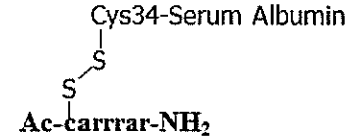
2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 12
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 13
2.6.6.4 遺伝毒性試験 28
2.6.6.5 がん原性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 34
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 40
2.6.6.7 局所刺激性試験 48
2.6.6.8 その他の毒性試験 48
2.6.6.9 考察及び結論 58
2.6.6.10 図表 75
2.6.6.11 参考文献 76

略号一覧

略号	略さない表現又は説明
A/G 比	アルブミン／グロブリン比
Ala	アラニン
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
Ames 試験	細菌を用いた復帰突然変異試験
Arg	アルギニン
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
BUN	血中尿素窒素
CaSR	カルシウム受容体
CByB6F1	雌 BALB/cByJ マウスと雄 C57BL/6J マウスの交雑仔
CD2F1	雌 BALB/c マウスと雄 DBA/2 マウスの交雑仔
CDER	医薬品評価研究センター
CK	クレアチンキナーゼ
Cmax	最高濃度
Cxmin	投与後 x 分における濃度
Cys	システイン
FDA	アメリカ食品医薬品局
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
Hb	ヘモグロビン濃度
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
HPRT 試験	ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験
Ht	ヘマトクリット値
LDH	乳酸脱水素酵素
MAD 制度	GLP データ相互受入れ制度
NZW	New Zealand White
OECD	経済協力開発機構
PTH	副甲状腺ホルモン
PTHrP	副甲状腺ホルモン関連蛋白
QTc	補正 QT
QTca	以下の式で補正した QT [1)] $QTca = QT\ 間隔[ms] / (RR\ 間隔[ms] / 750)^{0.273}$
QTcF	Fridericia 法で補正した QT
RBC	赤血球数
RRT	エテルカルセチドに対する相対保持時間
S9	組織ホモジネート 9000g 上清
SD	Sprague Dawley
SH	チオール
SHPT	二次性副甲状腺機能亢進症
SOD	スーパーオキサイドディスムターゼ
TK	トキシコキネティクス

2.6.6 毒性試験の概要文
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*-[(2*R*)-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-2326	Ac-c(C)rrarar-NH_2	エテルカルセチドの2位D-Alaと4位D-Argを入れ替えたペプチド
KP-2140	**Ac-arrrar-NH_2**	エテルカルセチドのD-Cys及びL-Cys脱離体
KP-2067		エテルカルセチドのL-Cys脱離体（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）
ホモダイマー	Ac-c(**Ac-carrrar-NH_2**)arrrar-NH_2	エテルカルセチドのL-Cys脱離体の二量体
脱アミド体	Ac-c(C)arrrar-**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	[redacted]	
*不純物C		
*不純物D		

a：D-Ala，A：L-Ala，Ac：アセチル化されたN末端アミノ酸，c：D-Cys，C：L-Cys，
NH_2：アミド化されたC末端アミノ酸，r：D-Arg

*新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.6 毒性試験の概要文

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．

2.6.6.1 まとめ

エテルカルセチドの安全性を評価するため，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（表 2.6.6.1-1）．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，本薬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本薬の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．

GLP に準拠して実施した試験で使用したエテルカルセチド投与液の媒体の組成を表 2.6.6.1-2 に示す．

表 2.6.6.1-1　毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与方法	動物種/系統	GLP 適用
反復投与毒性試験：げっ歯類			
［7 日間］	静脈内急速	ラット/SD	非適用
［4 週間］	静脈内急速	ラット/SD	適用 [1) 2)]
［3 カ月間／6 カ月間］	静脈内急速	ラット/SD	適用 [1)]
6 カ月間	静脈内急速	ラット/SD	適用
反復投与毒性試験：非げっ歯類			
［2 日間／3 日間／7 日間］	静脈内急速	ビーグル犬	非適用
［4 週間］	静脈内急速	ビーグル犬	適用 [1)]
6 カ月間	静脈内急速	ビーグル犬	適用
［3 カ月間／9 カ月間］	静脈内急速	ビーグル犬	適用 [1)]
遺伝毒性試験			
Ames 試験	*In vitro*	*S. typhimurium*, *E. coli*	適用
ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験	*In vitro*	CHO-K_1 細胞	適用
トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験	皮下	Muta マウス	適用
染色体異常試験	*In vitro*	ヒトリンパ球	適用
小核試験	静脈内持続	ラット/SD	適用
がん原性試験：トランスジェニックマウス			
［4 週間用量設定試験］	皮下	マウス/CByB6F1	適用
26 週間がん原性試験	皮下	マウス/Tg.rasH2	適用
がん原性試験：ラット			
［4 週間用量設定試験］	皮下	ラット/SD	適用 [3)]
［13 週間用量設定試験］	皮下	ラット/SD	適用 [3)]
2 年間がん原性試験	皮下	ラット/SD	適用
生殖発生毒性試験			
［ラット受胎能試験］	静脈内急速	ラット/SD	適用 [3)]
［ラット胚・胎児発生　用量設定試験］	静脈内急速	ラット/SD	適用 [3)]
［ラット胚・胎児発生試験］	静脈内急速	ラット/SD	適用 [3)]
ラット受胎能及び胚・胎児発生試験	静脈内急速	ラット/SD	適用
［ウサギ胚・胎児発生　用量設定試験］	静脈内急速	ウサギ/NZW	適用 [3) 4)]
［ウサギ胚・胎児発生］	静脈内急速	ウサギ/NZW	適用 [3)]
ウサギ胚・胎児試験	静脈内急速	ウサギ/NZW	適用
ラット出生前後試験	静脈内急速	ラット/SD	適用
局所刺激性試験	静脈内急速 皮下	ビーグル犬	適用
その他の毒性試験			
［Ames 陽性反応に対する機序検討試験］	*In vitro*	*S. typhimurium*	非適用
不純物を含有する原薬の毒性試験	静脈内急速	ラット/SD	適用
原料由来不純物の復帰突然変異試験	*In vitro*	*S. typhimurium*	適用
［不純物を含有する液剤の毒性試験］	静脈内急速	ビーグル犬	適用 [1)]
［不純物を含有する原薬のほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験］	*In vitro*	V79 細胞	非適用

［　］：参考資料
1）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）PTH の測定は GLP 非適用，3）投与液の濃度分析を 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）TK 測定は GLP 非適用

表 2.6.6.1-2　毒性試験で使用したエテルカルセチド投与液の媒体の組成

成分	組成 A	組成 B	組成 C	臨床製剤
コハク酸	10 mmol/L	10 mmol/L	10 mmol/L	10 mmol/L
マンニトール	2%	2%	-	-
グリシン	1%	1%	-	-
トレハロース	1%	1%	-	-
ベンジルアルコール	-	0.9%	-	-
塩化ナトリウム	-	-	0.85%	0.85%
pH	4.4～4.6	4.4～4.6	2.8～3.8	2.8～3.8

局所刺激性試験では，組成 C を投与液の媒体として使用した．その他の毒性試験では，組成 A 又は組成 B を投与液の媒体として使用した．
また，GLP 非適用の試験では，上記媒体以外に生理食塩液又は 20 mmol/L コハク酸緩衝液を *in vivo* 試験の投与液の媒体として使用した．

2.6.6.1.1 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，本薬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，投与 2 日以降には痙攣や体重減少も認められた．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．

2.6.6.1.2 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．

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，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，薬理作用に基づく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，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．

2.6.6.1.3 遺伝毒性試験

Ames 試験において一部の菌株で陽性反応が認められたが，チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K_1 細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT 試験）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の結果はいずれも陰性であり，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及びラットを用いた小核試験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．

2.6.6.1.4 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及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験を 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．

2.6.6.1.5 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いずれの投与量においても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．

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．

2.6.6.1.6 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．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．

2.6.6.1.7 その他の毒性試験

2.6.6.1.7.1 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．エテルカルセチド分子内の SH 基を有するアミノ酸（D-Cys 及び L-Cys）を脱離させることで，TA1535 に対する陽性反応は消失又は減弱し，また，酸化剤が活性酸素種の生成を介して TA100 及び TA1535 に対して陽性反応を示したことから，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可能性が考えられた．

2.6.6.1.8 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）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（薬食審査発 0219 第 4 号，平成 22 年 2 月 19 日）（以下，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．

2.6.6.1.9 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 ，*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

*新薬承認情報提供時に置換えた

られなかった．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．

2.6.6.2 単回投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-1，4.2.3.2-5］

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及びラット小核試験の用量設定試験における投与初期の所見に基づき，本薬の急性毒性を評価した．

ラットの 7 日間反復静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.1）では，0.5，2 及び 5 mg/kg の投与量を 1 日 1 回，静脈内急速投与した．その結果，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，5 mg/kg では対照群と比較して 23～28%の血清 Ca の低値が認められたが，投与 3 日まで一般状態の変化や死亡例は認められなかった．

ラット小核試験の用量設定試験（2.6.6.4.3.1）では，5，7.5，10 及び 12.5 mg/kg の投与量を 1 日 1 回，30 分間静脈内持続投与した．その結果，初回投与後より 7.5 mg/kg 以上で嗜眠，立毛及び死亡が認められ，投与 2 日以降には痙攣や体重減少も認められた．

イヌの 7 日間反復静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.5）では，0.5，2 及び 5 mg/kg の投与量を 1 日 1 回，静脈内急速投与した．その結果，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，2 及び 5 mg/kg では対照群と比較して 30%以上の顕著な血清 Ca の低値が認められた．5 mg/kg の雄 1 例及び雌 2 例では嘔吐が認められた．投与 2 日以降，血清 Ca の低値はより顕著となり，これに伴い 2 mg/kg 以上で嗜眠，振戦，痙攣，平伏姿勢，呼吸困難，流涎，嘔吐又は摂餌や飲水行動の減少（廃絶）が認められた．休薬によりこれらの症状はいずれも消失し，死亡例は認められなかった．

以上より，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．

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

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．

重要な毒性試験は，いずれも GLP に準拠して実施した．その他の GLP 非適用あるいは OECD 非加盟かつ MAD 制度非参加国で実施した試験は，いずれも参考資料とした．

2.6.6.3.1 ラットにおける 7 日間反復静脈内投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-1］

SD 系ラット（雌雄各 4 例／群）にエテルカルセチドを 0.5，2 及び 5 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，7 日間反復静脈内急速投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．また，サテライト動物を設け，血漿 PTH 及び血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，0.5 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，0.5 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.1-1 に示す．5 mg/kg では持続的な血清 Ca の低値が認められ，投与 7 日の血清 Ca は対照群と比較して投与後 6 時間で約 40%，投与 8 日の剖検時（投与後約 24 時間）で 18%の低値を示した．

表 2.6.6.3.1-1 ラット 7 日間反復静脈内投与における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		0.5	2	5	0.5	2	5
血漿 PTH 変化率（%）[a]	投与 1 日　投与後 6 時間	-49	-92	-94	-72	-96	-94
	投与 7 日　投与前	32	42	-59	66	156	-30
	投与後 6 時間	-45	-79	-94	-67	-76	-87
	投与 8 日　剖検時	-26	19	-21	18	32	-49
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日　投与後 6 時間	-10	-20	-28	-9	-18	-23
	投与 7 日　投与後 6 時間	-13	-28	-41	-8	-16	-36
	投与 8 日　剖検時	-3	-4	-18	-1	-1	-18

a：対照群に対する変化率

死亡例は，5 mg/kg の雌 1 例で投与 7 日に認められた．同投与量では，投与 4 日以降に自発運動減少，振戦，痙攣，運動協調性の欠如及び浅速呼吸，投与 5 日以降には歩行失調や腹臥位などが認められた．また，体重及び摂餌量の減少，投与期間終了時に脱水症状を示唆する皮膚の張りの低下も認められた．5 mg/kg で認められた死亡及び一般状態の悪化は，同投

与量では血清 Ca の低下が反復投与により顕著となったことから，顕著な血清 Ca の低下により生じたと考えられた．

血液学的検査では，5 mg/kg で白血球及びリンパ球数の低値が認められた．その他，5 mg/kg では RBC 及び血小板数の高値が認められたが，いずれもわずかな変動であり，上述した脱水と関連する可能性が考えられた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血漿 PTH，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

器官重量測定では，5 mg/kg で副腎重量の高値，脾臓及び胸腺重量の低値が認められた．

剖検では，5 mg/kg で胸腺の小型化及び胃粘膜の暗色化が認められた．

病理組織学的検査では，5 mg/kg で胸腺のリンパ組織萎縮／リンパ球枯渇，胃粘膜の炎症細胞浸潤を伴うびらんが認められた．

TK 測定の結果，投与後 5 分の血漿中エテルカルセチド濃度は投与量に応じて増加した．血漿中のエテルカルセチドは投与後速やかに消失し，投与後 3 時間では，ほとんどの動物で投与後 5 分値の 10%未満に低下した．反復投与による血漿中濃度への影響は認められなかった．

以上，5 mg/kg で顕著な血清 Ca の低下による振戦や痙攣，更に死亡例が認められ，体重及び摂餌量の減少も認められたことから，5 mg/kg は忍容性のない投与量と判断した．一方，2 mg/kg では血清 Ca の低下に伴う変化を含め，毒性学的意義のある変化は認められず，忍容であった．

2.6.6.3.2　　ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-2］

SD 系ラット（雌雄各 10 又は 15 例／群）にエテルカルセチドを 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，4 週間反復静脈内急速投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）を投与した．4 週間反復投与後に雌雄各 10 例／群を剖検した．また，4 週間の休薬後に対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例／群を剖検し，回復性を評価した．更に，サテライト動物を設け，血漿 PTH 及び血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

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 の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.2-1 に示す．投与期間を通じて，3 mg/kg の投与後 8 時間における血清 Ca は，対照群と比較して約 20%又はそれ以上の低値を示した．

表 2.6.6.3.2-1　ラット 4 週間反復静脈内投与における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移

性別			雄			雌		
投与量（mg/kg）			0.3	1	3	0.3	1	3
血漿 PTH 変化率（%）[a, b]	投与 1 日	投与後 5 分	-60	-68	-83	-78	-31	-51
		投与後 2 時間	-78	-91	-93	-100	-92	-81
		投与後 5 時間	-37	-15	-88	-55	-91	-66
		投与後 8 時間	20	-22	-79	-32	-61	-67
	投与 28 日	投与後 5 分	-53	-79	-84	-47	-64	-80
		投与後 2 時間	-98	-93	-94	-73	-65	-93
		投与後 5 時間	115	-51	-96	133	-87	-98
		投与後 8 時間	137	-10	-93	102	-13	-98
血清 Ca 変化率（%）[c]	投与 1 日	投与後 8 時間	-3	-10	-25	-4	-14	-23
	投与 28 日	投与後 8 時間	-6	-12	-22	-3	-9	-19
	投与 29 日	剖検時	-2	-3	-7	-2	-3	-5

a：定量下限（3 pg/mL）未満は 0 として計算，b：個体毎の投与前値に対する変化率の平均，
c：対照群に対する変化率

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

一般状態観察では，3 mg/kg で振戦及び平伏姿勢が認められた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血漿 PTH，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

尿検査では，3 mg/kg で尿量の高値及び尿比重の低値が認められたが，腎臓に傷害性を示唆する病理組織学的変化が認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

器官重量測定では，3 mg/kg の雌で脾臓及び胸腺重量の低値が認められた．また，病理組織学的検査では 3 mg/kg の雌で胸腺のリンパ球枯渇が認められた．これらの変化は薬理作用に基づく血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられた．

上記の変化はいずれも回復性が確認された．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差及び反復投与による影響は認められなかった．

以上，3 mg/kg では顕著な血清 Ca の低下による振戦及び平伏姿勢が認められた．一方，1 mg/kg では血清 Ca の低下に伴う変化を含め，毒性学的意義のある変化は認められなかった．したがって，無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と判断した．

2.6.6.3.3　　ラットにおける 3 カ月間／6 カ月間反復静脈内投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-3］

SD 系ラット（雌雄各 20 又は 30 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，6 カ月間反復静脈内急速投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．3 カ月間反復投与後に雌雄各 10 例／群を剖検し（3 カ月投与群），2 週間の休薬後に対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例／群を剖検して回復性を評価した．また，6 カ月間反復投与後に雌雄各 10 例／群を剖検し（6 カ月投与群），4 週間の休薬後に対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例／群を剖検して回復性を評価した．更に，サテライト動物を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

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清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.3-1 に示す．投与期間を通じて，3 mg/kg の投与後 8 時間における血清 Ca は，対照群と比較して約 20%又はそれ以上の低値を示した．

表 2.6.6.3.3-1　ラット 6 カ月間反復静脈内投与における血清 Ca の推移

性別			雄			雌		
投与量（mg/kg）			0.3	1	3	0.3	1	3
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日	投与後 8 時間	-8	-12	-23	-6	-12	-21
	投与 45 日	投与前	-5	-6	-8	0	-2	-5
		投与後 8 時間	-6	-9	-20	-4	-8	-20
	投与 91 日	投与前	-4	-2	-7	1	2	-5
		投与後 8 時間	-6	-9	-22	-2	-5	-19
	投与 182 日	投与前	-5	-3	-8	-3	0	-8
		投与後 8 時間	-5	-10	-27	-4	-9	-24

a：対照群に対する変化率

毒性評価対象動物では，死亡例は認められなかった．なお，サテライト動物では，3 mg/kg の雄 1 例が投与 167 日に死亡した．当該動物では投与期間中，振戦，痙攣，呼吸困難及び平伏姿勢が認められており，過度な血清 Ca の低下により状態が悪化し，死亡に至ったと考えられた．

一般状態観察では，3 mg/kg で振戦が認められ，雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた．

血液学的検査では，3 カ月投与群の 3 mg/kg で好中球数の高値及びリンパ球数の低値が認められた．いずれも軽度な変動であり，血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

尿検査では，3 カ月投与群の 3 mg/kg で尿比重の低値，尿量の高値，尿色調変化（淡黄色又は無色尿）の頻度増加が認められ，6 カ月投与群の同じ投与量の雌でも同じ変化が認められた．しかし，腎臓に傷害性を示唆する病理組織学的変化が認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

器官重量測定では，3 カ月投与群の 3 mg/kg の雄で胸腺重量の低値が認められた．6 カ月投与群の 1 mg/kg 以上の雄では，脾臓重量の低値が認められた．

剖検では，3 カ月投与群の 3 mg/kg の雌で胃粘膜の暗赤色化が認められ，6 カ月投与群の同じ投与量の雌雄でも同じ変化が認められた．

病理組織学的検査では，3 カ月投与群の 1 mg/kg 以上で胸腺のリンパ球壊死／萎縮，3 mg/kg で胃粘膜のびらん，3 mg/kg の雄で赤脾髄の縮小，3 mg/kg の雌で卵胞嚢胞の頻度及び程度の増加が認められた．6 カ月投与群の雌雄でも同様の変化が認められた．これらの変化はいずれも，血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられた．

上記の変化はいずれも回復性が確認された．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差及び反復投与による影響は認められなかった．

以上，3 mg/kg では血清 Ca の顕著な低下による振戦，摂餌量の減少を伴う体重増加抑制などが認められた．一方，1 mg/kg では血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化が認められたのみであったことから，無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と判断した．

2.6.6.3.4　　ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.2-4］

SD 系ラット（雌雄各 15 又は 20 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，6 カ月間反復静脈内急速投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，眼科学的検査，血液学的検査（血液凝固検査含む），血液化学的検査，尿検査，器官重量測定，剖検及び病理組織学的検査を実施した．6 カ月間反復投与後に雌雄各 15 例／群を剖検し，4 週間の休薬後に対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例／群を剖検して回復性を評価した．更に，サテライト動物（雌雄各 6 例／群）を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

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清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.4-1 に示す．投与期間を通じ

て，3 mg/kg の投与後 8 時間における血清 Ca は，対照群と比較して約 20%又はそれ以上の低値を示した．

表 2.6.6.3.4-1　ラット 6 カ月間反復静脈内投与における血清 Ca の推移

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		0.3	1	3	0.3	1	3
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日　投与後 8 時間	-5	-13	-26	-3	-8	-25
	投与 170 日 投与後 8 時間	-7	-10	-25	-5	-9	-19
	投与 183 日 剖検時	1	-3	-11	-1	-5	-6

a：対照群に対する変化率

切迫剖検例は，3 mg/kg の雄 1 例で投与 114 日に認められた．本例では，痙攣が断続的に認められたが，剖検及び病理組織学的検査で中枢や末梢神経系を含めて本変化に関連すると考えられる異常は認められなかったことから，顕著な血清 Ca の低下により痙攣が生じたと考えられた．その他，0.3 mg/kg の雄 1 例が投与 103 日に死亡したが，一般状態，体重及び摂餌量への影響や剖検及び病理組織学的検査で異常は認められず，より高い投与量でも同様の死亡例は認められなかった．また，1 mg/kg の雌 1 例を一般状態の悪化により投与 70 日に切迫剖検したが，病理組織学的検査の結果，自然発生性のリンパ腫による影響であった．これらのことから，0.3 及び 1 mg/kg で認められた死亡及び切迫剖検例は，いずれも本薬の投与に関連しない事象と判断した．

一般状態観察では，3 mg/kg で振戦，自発運動減少，平伏姿勢，非協調運動，歩行異常，異常発声及び流涎などが認められ，体重増加抑制及び摂餌量の減少も認められた．また，1 mg/kg でも少数例に自発運動減少，振戦及び流涎が散見され，雄で 10%程度の体重増加抑制が認められた．

血液学的検査では，3 mg/kg で好中球数の高値，3 mg/kg の雄でリンパ球数の低値が認められた．その他，3 mg/kg の雄で RBC，Hb 及び Ht の高値が認められたが，いずれもわずかな変動であった．

血液化学的検査では，血清 Ca 及び血清 P の変動以外に，3 mg/kg の雄ではアルブミン及び A/G 比の高値並びに血清 K 及びグロブリンの低値が認められた．その他，主に 3 mg/kg でクレアチニン，BUN，AST，ALT 及び ALP の高値や血清 Cl の低値が認められたが，いずれも施設背景値の範囲内又は範囲をわずかに超える程度のわずかな変動であり，肝臓及び腎臓に傷害性を示唆する病理組織学的変化が認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

器官重量測定では，3 mg/kg で脾臓重量の低値が認められた．

剖検では，3 mg/kg の雄でびらんを伴う胃粘膜の黒色巣あるいは胃粘膜の陥凹が認められた．

病理組織学的検査では，3 mg/kg で胃粘膜のびらんが認められ，血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられた．また，0.3 mg/kg 以上で腎臓の尿細管上皮に褐色色素沈着が認められたが，褐色色素沈着に伴う機能的な影響を示唆する明らかな尿量，血清 Na 及び血清 K などの変動や尿細管の傷害性変化は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．1 mg/kg 以上で副甲状腺に主細胞の活性化を示唆する主細胞好酸性化が認められたが，血清 Ca の低値に伴う適応性変化と考えられた．その他，0.3 mg/kg 以上で投与部位（血管及び血管周囲）に炎症性変化が認められたが，対照群と同程度の変化であり，エテルカルセチドの投与に起因した変化ではないと考えられた．

上記の変化はいずれも回復性を示した．なお，4 週間の休薬後に BUN の高値が認められたが，投与期間終了時と同様にわずかな変動であり，腎臓に傷害性を示唆する病理組織学的変化は認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

尿検査，血液凝固系検査及び眼科学的検査においてエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，雌雄差及び反復投与による明らかな影響は認められなかった．

以上，3 mg/kg では顕著な血清 Ca の低下による自発運動減少，振戦，痙攣に伴う切迫剖検例が認められ，摂餌量の減少を伴う体重増加抑制も認められた．一方，1 mg/kg でも自発運動減少，振戦及び流涎が散見され，雄で体重増加抑制が認められたが，いずれも薬理作用に基づく血清 Ca の低下に伴う変化であり，少数例に低頻度の発現又はその程度が軽微であったことから，毒性と判断しなかった．したがって，無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と判断した．

2.6.6.3.5　　イヌにおける 7 日間反復静脈内投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-5］

ビーグル犬（雌雄各 2 例／群）にエテルカルセチドを 0.5，2 及び 5 mg/kg の投与量で 1 日 1 回反復静脈内急速投与した．投与 2 日に 5 mg/kg 投与群，投与 3 日に 0.5 及び 2 mg/kg 投与群で振戦，痙攣など顕著な血清 Ca の低下による一般状態変化が認められたため，以降の投与を中止し，この投与期間を第 1 フェーズとした．10～11 日の休薬期間後，0.08，0.2 及び 0.5 mg/kg の投与量で 2 日に 1 回，7 日間（計 4 回）静脈内急速投与し，これを第 2 フェーズとした．投与容量は第 1 フェーズでは 2 mL/kg，第 2 フェーズでは 0.5 mL/kg とし，各

フェーズの対照群には媒体である 20 mmol/L コハク酸緩衝液を投与した．また，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，0.08 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，0.08 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.5-1 及び表 2.6.6.3.5-2 に示す．血漿 PTH は，いずれの投与量においても投与後 4 時間～12 時間に最も低下し，5 mg/kg では投与後 24 時間まで持続的に低値を示した．血清 Ca は，いずれの投与量においても投与後 24 時間まで持続的な低値を示したが，0.5 mg/kg では投与後 48 時間までにほぼ回復した．

表 2.6.6.3.5-1　イヌ 3 日間反復静脈内投与（1 日 1 回投与）における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移

投与量（mg/kg）			0.5	2	5
血漿 PTH 変化率（%）[a, b]	投与 1 日	投与後 4 時間	-100	-85	-76
		投与後 8 時間	-100	-75	-93
		投与後 12 時間	-100	-73	-100
		投与後 24 時間	-40	-73	-91
	投与 2 日	投与後 24 時間	-37	-10	-59
	投与 3 日	投与後 24 時間	-13	-26	98[c]
		投与後 72 時間	-25	-8	25[d]
血清 Ca 変化率（%）[b]	投与 1 日	投与後 4 時間	-14	-17	-19
		投与後 8 時間	-17	-23	-23
		投与後 24 時間	-16	-31	-30
	投与 2 日	投与後 24 時間	-25	-46	-49
	投与 3 日	投与後 24 時間	-27	-51	-38[c]
		投与後 72 時間	-5	-12	-11[d]

各投与群雌雄計 4 例の平均値
a：定量下限（3 pg/mL）未満は 0 として計算，b：対照群に対する変化率
c：投与 3 日以降の投与を中止したため，投与 2 日の投与後 48 時間
d：投与 3 日以降の投与を中止したため，投与 2 日の投与後 96 時間

表 2.6.6.3.5-2 イヌ 7 日間反復静脈内投与（2 日に 1 回投与）における血漿 PTH 及び血清 Ca の推移

投与量（mg/kg）			0.08	0.2	0.5
血漿 PTH 変化率（%）[a, b]	投与 1 日	投与後 8 時間	-80	-77	-91
		投与後 24 時間	-14	136	-32
		投与後 48 時間	-53	0	-49
	投与 3 日	投与後 8 時間	-62	-38	-100
		投与後 24 時間	-46	6	-55
		投与後 48 時間	77	223	127
	投与 5 日	投与後 8 時間	-70	-76	-72
		投与後 24 時間	-42	3	-60
		投与後 48 時間	-2	133	28
	投与 7 日	投与後 8 時間	-88	-92	-100
		投与後 24 時間	16	103	-21
血清 Ca 変化率（%）[b]	投与 1 日	投与後 8 時間	-7	-11	-14
		投与後 24 時間	-4	-9	-17
		投与後 48 時間	-1	-2	-3
	投与 3 日	投与後 8 時間	-8	-12	-19
		投与後 24 時間	-3	-10	-19
		投与後 48 時間	-5	-6	-6
	投与 5 日	投与後 8 時間	-8	-13	-19
		投与後 24 時間	-5	-9	-19
		投与後 48 時間	-3	-7	-8
	投与 7 日	投与後 8 時間	-8	-13	-21
		投与後 24 時間	-6	-11	-22

各投与群雌雄計 4 例の平均値
a：定量下限（3 pg/mL）未満は 0 として計算，b：対照群に対する変化率

第 1 フェーズ，第 2 フェーズともに死亡例は認められなかった．

第 1 フェーズでは，投与 1 日に 5 mg/kg の雄 1 例及び雌 2 例，0.5 mg/kg の雌 1 例で嘔吐が認められた．投与 2 日及び 3 日には，嗜眠，振戦，痙攣，平伏姿勢，呼吸困難，流涎，嘔吐又は摂餌や飲水行動の減少（廃絶）が 2 mg/kg 及び 5 mg/kg で認められた．嗜眠は 5 mg/kg の雌の 1 例で最終投与後 6 日間まで認められたが，その他の変化は最終投与後 3 日までに回復した．0.5 mg/kg 以上では，摂餌の減少を伴う体重減少が認められた．第 2 フェーズでは，0.5 mg/kg の雌 1 例で投与 3 日に嘔吐，投与 7 日に流涎が認められ，0.5 mg/kg で体重減少が認められた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血漿 PTH，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差は認められなかった．第 1 フェーズでは，5 mg/kg で反復投与による蓄積性

が示唆されたが，第 2 フェーズでは，いずれの投与量でも反復投与による影響は認められなかった．

以上，エテルカルセチドの 1 日 1 回の静脈内急速投与では，0.5 mg/kg 以上で顕著な血清 Ca の低下，嘔吐，振戦又は痙攣などの一般状態の変化が認められ，0.5 mg/kg においても忍容性は低いと判断した．一方，2 日に 1 回の静脈内急速投与では，0.5 mg/kg で嘔吐，流涎，体重減少が認められたが，低頻度又はその程度が軽微であったことから，0.5 mg/kg まで忍容と判断した．

2.6.6.3.6　　イヌにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-6］

ビーグル犬（雌雄各 3 例又は 5 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.1，0.3 及び 1.5 mg/kg の投与量で 2 日に 1 回，4 週間（計 14 回）反復静脈内急速投与した．投与容量は 0.5 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）を投与した．4 週間反復投与後に雌雄各 3 例／群を剖検し，4 週間の休薬後に対照群及び 1.5 mg/kg の雌雄各 2 例／群を剖検して回復性を評価した．また，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

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清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.6-1 に示す．1.5 mg/kg では投与後 24 時間まで持続的な血清 Ca の低値が認められ，投与後 48 時間でも完全には回復しなかった．

表 2.6.6.3.6-1　イヌ 4 週間反復静脈内投与（2 日に 1 回投与）における血清 Ca の推移

性別			雄			雌		
投与量（mg/kg）			0.1	0.3	1.5	0.1	0.3	1.5
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日	投与後 8 時間	-6	-2	-20	-4	-8	-21
		投与後 24 時間	-4	-2	-21	-2	-9	-24
		投与後 48 時間	-2	2	-6	-2	-4	-11
	投与 7 日	投与前	-2	2	-9	0	-5	-12
		投与後 24 時間	-3	-1	-30	-2	-9	-33
	投与 15 日	投与前	-2	-1	-13	0	-7	-11
		投与後 24 時間	-3	-3	-31	-3	-12	-31
	投与 27 日	投与前	-1	2	-4	0	-4	-7
		投与後 8 時間	-7	-7	-24	-4	-15	-26
		投与後 24 時間	-3	-4	-24	-4	-14	-32

a：対照群に対する変化率

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった.

一般状態観察では，1.5 mg/kg で嗜眠，流涎，皮膚温低下及び平伏姿勢が認められ，摂餌の減少及び体重増加抑制も認められた.

心電図検査では，1.5 mg/kg で RR 間隔，QT 間隔及び QTcF の延長並びに心拍数の低下が認められた.

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった.

器官重量測定，剖検及び病理組織学的検査では，1.5 mg/kg で胸腺重量の低値及び胸腺のリンパ球枯渇，1.5 mg/kg の雄で胸腺の小型化が認められた．これらの変化はいずれも，血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられた.

上記の変化はいずれも回復性が確認された.

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差及び反復投与による影響は認められなかった.

以上，1.5 mg/kg では顕著な血清 Ca の低下による嗜眠や平伏姿勢などの一般状態変化，摂餌量の減少，体重増加抑制及び QTcF の延長などが認められた．一方，0.3 mg/kg では血清 Ca の低下に伴う変化を含め，毒性学的意義のある変化は認められなかった．したがって，無毒性量は雌雄ともに 0.3 mg/kg と判断した.

2.6.6.3.7　　イヌにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験

[評価資料：4.2.3.2-7]

ビーグル犬（雌雄各 4 例又は 6 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.2，0.5 及び 0.9 mg/kg の投与量で 2 日に 1 回，6 カ月間反復静脈内急速投与した．投与容量は 0.5 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査（血液凝固検査含む），血液化学的検査，尿検査，器官重量測定，剖検及び病理組織学的検査を実施した．6 カ月間反復投与終了後に雌雄各 4 例／群を剖検し，4 週間の休薬後に対照群及び 0.9 mg/kg の雌雄各 2 例／群を剖検し，回復性を評価した．また，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した.

本薬の薬理作用に基づき，0.2 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.7-1 に示す．いずれの投与量においても投与後 24 時間まで持続的な血清 Ca の低値が認められ，投与 169 日の投与後 48 時間における血清 Ca は，0.5 mg/kg 以上で対照群と比較して 10%以上の低値を示した.

表 2.6.6.3.7-1　イヌ 6 カ月間反復静脈内投与（2 日に 1 回投与）における血清 Ca の推移

性別			雄			雌		
投与量（mg/kg）			0.2	0.5	0.9	0.2	0.5	0.9
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日	投与後 4 時間	-5	-11	-12	-9	-9	-17
		投与後 8 時間	-8	-18	-22	-13	-17	-25
		投与後 12 時間	-10	-24	-27	-14	-21	-29
		投与後 24 時間	-9	-14	-21	-9	-16	-25
	投与 169 日	投与後 4 時間	-9	-16	-19	-9	-13	-20
		投与後 8 時間	-12	-20	-26	-16	-19	-28
		投与後 24 時間	-12	-23	-30	-14	-20	-28
		投与後 48 時間	-9	-15	-21	-8	-12	-19

a：対照群に対する変化率

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

一般状態観察では，0.5 mg/kg 以上で嘔吐，流涎，食欲不振，自発運動減少，0.9 mg/kg の雄で振戦が認められた．0.5 mg/kg 以上で摂餌量の減少に伴う体重減少又は体重増加抑制が認められた．

心電図検査では，0.5 mg/kg 以上で QTca の延長が認められ，投与前値と比較して 0.9 mg/kg の雄で 14%，雌で 12%延長した．

血液学的検査では，0.5 mg/kg 以上で網赤血球数の低値が認められた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

上記の変化はいずれも回復性が確認された．

その他，病理組織学的検査では 0.2 mg/kg 以上で腎臓の尿細管上皮に褐色色素の沈着が認められ，0.9 mg/kg では 4 週間の休薬後にも認められた．褐色色素沈着に伴う機能的な影響を示唆する明らかな尿量，血清 Na 及び血清 K などの変動や尿細管の傷害性変化は認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

血液凝固系検査，尿検査，眼科学的検査，器官重量測定及び剖検において影響は認められなかった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差及び反復投与による影響は認められなかった．

以上，0.5 mg/kg 以上で嘔吐，流涎，食欲不振，摂餌量の減少，体重増加抑制及び QTca の延長が認められたが，いずれも薬理作用に基づく血清 Ca の低下に起因した二次的な変化であり，投与の継続が困難となるほどの重篤な変化ではなかった．そのため，無毒性量は雌雄ともに 0.5 mg/kg，と本試験の試験責任者により判断されている．しかし，摂餌量の減少に伴う体重増加抑制，嘔吐や QTca の延長は重要な所見であり，その程度も 0.5 mg/kg 以上では軽微とは言えないことから，二次的な変化であっても毒性と判断すべきと考えた．一方，

0.2 mg/kg では血清 Ca の低下に伴う変化を含め，毒性学的意義のある変化は認められなかった．したがって，申請者は本試験の無毒性量を雌雄ともに 0.2 mg/kg と判断した．

2.6.6.3.8　　イヌにおける 3 カ月間／9 カ月間反復静脈内投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.2-8］

ビーグル犬（雌雄各 6 例又は 10 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.2，0.5 及び 1.2/0.9 mg/kg の投与量で 2 日に 1 回，3 カ月間又は 9 カ月間反復静脈内急速投与した．なお，最高投与量では一般状態の悪化が認められたことから，投与の継続は困難と判断し，雄は投与 25 日以降，雌は投与 27 日以降の投与量を 1.2 mg/kg から 0.9 mg/kg に減量した（1.2/0.9 mg/kg）．投与容量は 0.5 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．一般状態観察，体重測定，摂餌量観察，眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査（血液凝固検査含む），血液化学的検査，尿検査，器官重量測定，剖検及び病理組織学的検査を実施した．3 カ月間反復投与後に雌雄各 3 例／群を剖検し（3 カ月投与群），2 週間の休薬後に対照群及び 1.2/0.9 mg/kg の雌雄各 2 例／群を剖検して回復性を評価した（2 週休薬群）．また，9 カ月間反復投与後に雌雄各 3 例／群を剖検し（9 カ月投与群），4 週間の休薬後に対照群及び 1.2/0.9 mg/kg の雌雄各 2 例／群を剖検して回復性を評価した（4 週休薬群）．更に，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，0.2 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.3.8-1 に示す．投与後 24 時間における血清 Ca は，0.5 mg/kg 以上で対照群と比較して 10%以上の低値を示した．

表 2.6.6.3.8-1　イヌ 9 カ月間反復静脈内投与（2 日に 1 回投与）における血清 Ca の推移

性別			雄			雌		
投与量（mg/kg）			0.2	0.5	1.2/0.9	0.2	0.5	1.2/0.9
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日	投与後 4 時間	-6	-6	-14	-8	-9	-15
		投与後 8 時間	-13	-13	-23	-11	-17	-22
		投与後 24 時間	-8	-10	-27	-6	-12	-25
		投与後 48 時間	-2	-2	-9	0	-2	-9
	投与 45 日	投与後 4 時間	-5	-11	-20	-6	-10	-19
		投与後 8 時間	-11	-16	-25	-12	-17	-24
		投与後 24 時間	-8	-15	-27	-5	-12	-22
		投与後 48 時間	-1	-3	-9	0	-1	-6
	投与 91 日	投与後 4 時間	-7	-12	-18	-5	-11	-21
		投与後 8 時間	-9	-15	-22	-9	-15	-23
	投与 183 日	投与後 4 時間	-12	-14	-20	-9	-13	-22
		投与後 8 時間	-16	-20	-25	-14	-19	-27
		投与後 24 時間	-11	-15	-23	-8	-14	-27
		投与後 48 時間	-1	-3	-4	-1	-5	-9
	投与 273 日	投与後 4 時間	-10	-14	-20	-12	-8	-18
		投与後 8 時間	-11	-18	-24	-9	-12	-21

a：対照群に対する変化率

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

一般状態観察では，1.2/0.9 mg/kg の雄 1 例で嗜眠，平伏姿勢が投与 21 日～25 日に，雄 2 例で自発運動減少が投与 10 日～27 日にそれぞれ認められた．また，1.2/0.9 mg/kg の雌 1 例で嗜眠，平伏姿勢，振戦及び自発運動減少が投与 142 日～149 日に認められた．摂餌の減少を伴った体重減少又は体重増加抑制が 1.2/0.9 mg/kg の雄で投与 8 日～71 日に，雌で投与 8 日～57 日に認められた．

心電図検査では，1.2/0.9 mg/kg で QTcF の延長が認められ，投与 3 カ月及び 9 カ月の検査では，投与前値と比較して 9%延長した．なお，0.2 及び 0.5 mg/kg でも対照群と比較して QTcF の延長が認められたが，投与前値と比較して差はなく，背景値（95%信頼区間 0.21～0.25 s）の範囲内の変化であったことから，投与による影響ではないと判断した．

血液学的検査では，投与 3 カ月の検査で RBC，Hb，Ht 及び網赤血球数の低値が 0.2 mg/kg 以上で認められたが，投与 9 カ月の検査では認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

血液化学的検査では，血清 Ca 及び血清 P の変動に加え，投与 6 カ月の検査で血清 Na の高値が 0.5 mg/kg 以上で認められ，投与 9 カ月の検査で血清 Cl の低値が 0.2 mg/kg 以上，血清 K の高値が 0.5 mg/kg 以上の雄で認められたが，いずれも施設背景値の範囲内又は範囲をわずかに超える程度の軽微な変動であったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

また，0.2 mg/kg 以上で CK 又は LDH の低値が認められたが，その変動はわずかであり，これらのパラメータが低値を示すことに毒性学的意義はないと考えられた．

上記の変化はいずれも回復性が確認された．

その他，病理組織学的検査では 9 カ月投与群の 0.2 mg/kg 以上で腎臓の近位尿細管に褐色色素の沈着が認められ，回復傾向は示唆されるものの 1.2/0.9 mg/kg では 4 週休薬群にも認められた．褐色色素沈着に伴う機能的な影響を示唆する明らかな尿量，血清 Na 及び血清 K などの変動や尿細管の傷害性変化は認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

血液凝固系検査，尿検査，眼科学的検査，器官重量測定及び剖検において影響は認められなかった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差及び反復投与による影響は認められなかった．

以上，1.2/0.9 mg/kg では顕著な血清 Ca の低下による嗜眠や平伏姿勢などの一般状態変化，摂餌の減少，体重増加抑制及び QTcF の延長が認められた．一方，0.5 mg/kg では血清 Ca の低下に伴う変化を含め，毒性学的意義のある変化は認められなかった．したがって，無毒性量は雌雄ともに 0.5 mg/kg と判断した．

2.6.6.4 遺伝毒性試験

エテルカルセチドの遺伝毒性について，*in vitro* 試験として Ames 試験，ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及び CHO-K_1 細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）を用いた HPRT 試験を実施し，*in vivo* 試験としてラットを用いた小核試験及び Muta マウスを用いた遺伝子突然変異試験を実施した．

一部の追加実施した Ames 試験を除き，重要な試験はいずれも GLP に準拠して実施した．

2.6.6.4.1 非ほ乳類動物細胞系での *In vitro* 試験

エテルカルセチドの *in vitro* 遺伝子突然変異誘発性を評価するため，ヒスチジン要求性のネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*：TA98，TA100，TA1535，TA1537）及びトリプトファン要求性の大腸菌（*Escherichia coli*：WP2*uvrA*）を用いた Ames 試験を実施した．エテルカルセチドは *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535 に対して陽性反応を示したため，これらの 2 菌株を用いて treat and plate 法による Ames 試験を実施し，エテルカルセチドが *Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性を満たした可能性について検討した．また，高純度のエテルカルセチドの原薬を用いた Ames 試験を実施し，原薬中に含まれる不純物がこれらの 2 菌株に対する陽性反応の原因であった可能性について検討した．

2.6.6.4.1.1 エテルカルセチドの Ames 試験

［評価資料：4.2.3.3.1-1］

エテルカルセチドの細菌での遺伝子突然変異誘発性について，*Salmonella typhimurium* TA98，TA100，TA1535，TA1537 及び *Escherichia coli* WP2*uvrA* を用いたプレート法により，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．エテルカルセチド（純度：95.3%）は媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，用量は 50～5000 μg/plate とした．

その結果，エテルカルセチドは，TA100 の S9mix 非存在下において復帰変異コロニー数を媒体対照値の 2.5 倍に増加させ，TA1535 の S9mix 存在下及び非存在下において復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の 9.5 倍及び 16.4 倍に増加させた．いずれにおいても，エテルカルセチドの析出や菌の生育阻害は認められなかった．

以上より，エテルカルセチドは Ames 試験において陽性反応を示した．

2.6.6.4.1.2 Treat and plate 法によるエテルカルセチドの Ames 試験

[評価資料：4.2.3.3.1-2]

先に実施した Ames 試験において，エテルカルセチドは *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535 に対する陽性反応を示したため（2.6.6.4.1.1），プレインキュベーション後に被験物質を除去してから菌株を寒天培地に播種することのできる treat and plate 法 [2] を用いて，エテルカルセチドに由来するアミノ酸が寒天培地上で *Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性を満たし，偽陽性を示した可能性について検討した．TA100 及び TA1535 を用い，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，用量は 15～5000 μg/plate とした．

その結果，エテルカルセチドは，TA1535 の S9mix 存在下及び非存在下において復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の 6.9 倍及び 7.6 倍に増加させた．一方，TA100 では，代謝活性化の有無に関わらず，明らかな復帰変異コロニー数の増加は認められなかった．いずれにおいてもエテルカルセチドの析出は認められなかったが，S9mix 非存在下の 5000 μg/plate で菌の生育阻害が認められた．

以上より，エテルカルセチドを除去して菌株を培地に播種しても TA100 及び TA1535 に対する Ames 陽性反応が認められたことから，エテルカルセチドの Ames 試験で認められたこれら菌株に対する陽性反応は *Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性を満たしたことによる偽陽性ではないと考えられた．

2.6.6.4.1.3 高純度の原薬を用いたエテルカルセチドの Ames 試験（1）

[評価資料：4.2.3.3.1-3]

先に実施した Ames 試験において，エテルカルセチド（純度：95.3%）は *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535 に対する陽性反応を示したため（2.6.6.4.1.1），高純度のエテルカルセチドの原薬（純度：98.3%）を用いて，原薬中に含まれる不純物がこれらの 2 菌株に対する陽性反応の原因であった可能性について検討した．TA100 及び TA1535 を用いたプレート法により，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，用量は 50～5000 μg/plate とした．

その結果，エテルカルセチドは，TA100 の S9mix 非存在下において復帰変異コロニー数を媒体対照値の 3.1 倍に増加させ，TA1535 の S9mix 存在下及び非存在下において復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の 11.5 倍及び 13.5 倍に増加させた．いずれにおいても，エテルカルセチドの析出や菌の生育阻害は認められなかった．

以上より，高純度のエテルカルセチドの原薬でもTA100及びTA1535に対するAmes陽性反応が認められたことから，エテルカルセチドのAmes試験で認められたこれら菌株に対する陽性反応は不純物による影響ではないと考えられた．

2.6.6.4.1.4 高純度の原薬を用いたエテルカルセチドのAmes試験（2）

[参考資料：4.2.3.3.1-4]

先に実施したAmes試験において，エテルカルセチド（純度：95.3%）は*Salmonella typhimurium* TA100及びTA1535に対する陽性反応を示したため（2.6.6.4.1.1），高純度のエテルカルセチドの原薬（純度：98.9%）を用いて，原薬中に含まれる不純物がこれらの2菌株に対する陽性反応の原因であった可能性について検討した．TA100及びTA1535を用いたプレート法により，代謝活性化による場合（S9mix存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix非存在下）で評価した．エテルカルセチドは媒体である10 mmol/Lコハク酸緩衝液（組成A，表2.6.6.1-2）に溶解させ，用量は1.5～5000 μg/plateとした．

その結果，エテルカルセチドは，TA100のS9mix非存在下において復帰変異コロニー数を媒体対照値の2.4倍に増加させ，TA1535のS9mix存在下及び非存在下において復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の8.1倍及び9.7倍に増加させた．いずれにおいても，エテルカルセチドの析出や菌の生育阻害は認められなかったが，TA100のS9mix存在下の5000 μg/plateにおいて復帰変異コロニー数の減少が認められた．

以上より，高純度のエテルカルセチドの原薬でもTA100及びTA1535に対するAmes陽性反応が認められたことから，エテルカルセチドのAmes試験で認められたこれらの菌株に対する陽性反応は不純物による影響ではないと考えられた．

2.6.6.4.2 ほ乳類細胞系での*In vitro*試験

エテルカルセチドの*in vitro*染色体異常誘発性を評価するため，ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験を実施した．また，Ames試験において一部の菌株で陽性反応が認められたため（2.6.6.4.1.1），CHO-K_1細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）を用いたHPRT試験を実施し，ほ乳類細胞におけるエテルカルセチドの*in vitro*遺伝子突然変異誘発性を評価した．

2.6.6.4.2.1 ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験

[評価資料：4.2.3.3.1-5]

エテルカルセチドの*in vitro*染色体異常誘発性について，非喫煙健康成人より得られた末梢血リンパ球を用いた短時間処理法（代謝活性化による場合（S9mix存在下）及び代謝活性

化によらない場合（S9mix 非存在下）でエテルカルセチドを 4 時間処理後，新鮮培養液で 16 時間培養）及び連続処理法（S9mix 非存在下でエテルカルセチドを 20 時間連続処理）により，染色体の構造異常及び数的異常を評価した．エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，培養液に添加し，短時間処理法の S9mix 存在下では 156～4000 μg/mL，S9mix 非存在下では 313～5000 μg/mL，連続処理法では 313～5000 μg/mL の濃度に設定した．標本の観察は，短時間処理法の S9mix 存在下では 156，313 及び 625 μg/mL，S9mix 非存在下では 1250，2500 及び 5000 μg/mL，連続処理法では 1250，4000 及び 5000 μg/mL の 3 濃度で実施した．

その結果，短時間処理及び連続処理，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの濃度においても染色体構造異常や数的異常を有する細胞の増加は認められなかった．

以上より，エテルカルセチドはヒト末梢血リンパ球において染色体異常誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.4.2.2 ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT 試験）

［評価資料：4.2.3.3.1-6］

エテルカルセチドのほ乳類細胞での遺伝子突然変異誘発性について，CHO-K_1 細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）を用い，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で HPRT 遺伝子を指標として評価した．エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，濃度は 500～5000 μg/mL とした．

その結果，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの濃度においても遺伝子突然変異頻度の増加は認められなかった．

以上より，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有さないと判断した．

2.6.6.4.3 ほ乳類動物系での *In vivo* 試験

エテルカルセチドの小核誘発性を評価するため，ラットを用いた小核試験を実施した．また，Ames 試験において一部の菌株で陽性反応が認められたため（2.6.6.4.1.1），Muta マウスを用いた遺伝子突然変異試験を実施し，ほ乳類動物におけるエテルカルセチドの *in vivo* 遺伝子突然変異誘発性を評価した．

2.6.6.4.3.1 ラットにおける静脈内持続投与による小核試験

[評価資料：4.2.3.3.2-1]

SD 系ラット（雄 5 例／群）にエテルカルセチドを 1 日 1 回，30 分間の静脈内持続投与により 3 日間反復投与し，エテルカルセチドの小核誘発性を評価した．用量設定試験において 5，7.5，10 及び 12.5 mg/kg の投与量で 30 分間の静脈内持続投与を 3 日間反復した結果，5 mg/kg 以上で立毛及び嗜眠，7.5 mg/kg 以上で体重減少及び死亡，10 mg/kg で振戦，12.5mg/kg で乾燥性眼炎が認められた．7.5 mg/kg 以上で死亡を含む顕著な毒性が認められたことから，本試験におけるエテルカルセチドの投与量は 1.25，2.5 及び 5 mg/kg とした．エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 A，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，対照群には媒体を投与した．静脈内持続投与は頸静脈に留置したカテーテルより行い，投与容量はいずれも 5 mL/kg とした．最終投与後 24 時間に骨髄塗抹標本を作製し，小核を有する幼若赤血球の観察を行った．

その結果，いずれの投与量においても小核を有する幼若赤血球の出現頻度の増加は認められなかった．なお，5 mg/kg で立毛が認められたが，死亡例は認められなかった．

以上より，エテルカルセチドはラットにおいて小核誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.4.3.2 トランスジェニックマウスにおける皮下投与による遺伝子突然変異試験

[評価資料：4.2.3.3.2-2]

lacZ 遺伝子を導入した Muta マウス（CD_2-lacZ80/HazfBR 系）（雄 6 例／群）にエテルカルセチド 1 日 1 回，28 日間反復皮下投与し，*lacZ* 導入遺伝子の表現型を指標として，エテルカルセチドの *in vivo* 遺伝子突然変異誘発性を評価した．反復投与による用量設定試験（4 及び 6 mg/kg/日：28 日間，8 mg/kg/日：7 日間）において 6 mg/kg 以上で死亡例が認められたことから，本試験におけるエテルカルセチドの投与量は 1，2 及び 4 mg/kg とした．エテルカルセチドは媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）に溶解させ，対照群には媒体を投与した．投与容量は 10 mL/kg とした．遺伝子突然変異誘発性の評価臓器は，エテルカルセチドが高曝露され，細胞増殖が遅いが代謝活性のある肝臓及び細胞増殖の速い骨髄とした．最終投与後 3 日に採取した肝臓及び骨髄より DNA を抽出し，バクテリオファージλにパッケージングを行った後，*Escherichia coli C lac*$^-$ *galE*$^-$ Kan^r（*galE*$^-$ Amp^r）へ導入した．総プラーク数あるいは突然変異プラーク数の計測のため，それぞれ 0.3%フェニルガラクトシダーゼ非存在下あるいは存在下でプレートを培養し，出現したプラーク数をもとに遺伝子突然変異頻度を計測した．また，CD2F1 系マウスをサテライト動物（測定ポイント毎に雄 3 例／群）とし，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

その結果，肝臓及び骨髄ともに，いずれの投与量においても遺伝子突然変異頻度の増加は認められなかった．なお，いずれの投与量においても一般状態に変化は認められなかった．血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，反復投与後の Cmax 及び AUC は初回投与時に比べて若干低値を示した．

以上より，エテルカルセチドは生体において遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.5 がん原性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

エテルカルセチドのがん原性を評価するため，トランスジェニックマウスを用いた 26 週間のがん原性試験及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験を実施した．

いずれの試験も GLP に準拠して実施した．各試験の投与量は，用量設定試験の結果及び FDA CDER の Executive Carcinogenicity Assessment Committee（CAC）からの助言を踏まえ，それぞれの動物種における最大耐量に基づき設定した．

2.6.6.5.1 マウスにおける皮下投与による 5 日間及び 4 週間反復投与がん原性用量設定試験

［参考資料：4.2.3.4.1-1］

CByB6F1（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (-/- homozygous c-Ha-ras)）系マウス（雌雄各 5 例／群）を用い，エテルカルセチドを 2，4，6 及び 8 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，5 日間反復皮下投与した．その結果，8 mg/kg の雄で顕著な血清 Ca の低下による自発運動減少，平伏姿勢，体温下降及び努力呼吸などの一般状態変化が認められたことから，8 mg/kg の忍容性は低いと判断した．そのため，4 週間試験では，同系統のマウス（雌雄各 10 例／群）を用い，1.5，3 及び 6 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，反復皮下投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．また，サテライト動物を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，1.5 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.5.1-1 に示す．投与後 6.5 時間付近における血清 Ca は，対照群と比較して 3 mg/kg 以上の雄及び 6 mg/kg の雌で 30%以上の低値を示し，1.5 mg/kg の雄及び 3 mg/kg の雌でも 20%以上の低値を示した．

表 2.6.6.5.1-1 マウス 4 週間反復皮下投与における血清 Ca の推移

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		1.5	3	6	1.5	3	6
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 18 日 投与後 6.5 時間付近	-26	-31	-39	-11	-24	-31
	投与 29 日 剖検時	-3	-4	-3	-4	-4	-7

a：対照群に対する変化率

3 mg/kg 以上の雄及び 6 mg/kg の雌で振戦及び呼吸促迫が認められた．また，雄では 3 mg/kg 以上で運動失調及び自発運動増加，6 mg/kg で自発運動減少及び平伏姿勢が認められ，3 例が死亡した．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

剖検及び病理組織学的検査では，6 mg/kg の雌で投与部位の赤色化，炎症並びに出血の程度又は頻度の増加が認められた．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加した．雄では反復投与後の Cmax 及び AUC は初回投与時に比べて高値を示した．

以上，3 mg/kg 以上の雄及び 6 mg/kg の雌で顕著な血清 Ca の低下による振戦などの一般状態変化が認められ，1.5 mg/kg の雄及び 3 mg/kg の雌でも明らかな血清 Ca の低値が認められた．したがって，雄では 1.5 mg/kg，雌では 3 mg/kg を最大耐量と判断した．

2.6.6.5.2 トランスジェニックマウスにおける皮下投与による 26 週間反復投与がん原性試験

［評価資料：4.2.3.4.1-2］

Tg.rasH2（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (+/- hemizygous c-Ha-ras)）マウス（雌雄各 25 例／群）を用い，エテルカルセチドを雄は 0.375，0.75 及び 1.5 mg/kg，雌は 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，26 週間反復皮下投与した．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，剖検及び病理組織学的検査を実施した．投与容量は 10 mL/kg とし，陰性対照群には生理食塩液，媒体対照群には 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．また，陽性対照群（雌雄各 10 例／群）にはウレタンを 1000 mg/kg の投与量で投与 1，3 及び 5 日に腹腔内投与した．更に，CByB6F1（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (-/- homozygous c-Ha-ras)）系マウスをサテライト動物（媒体対照群では雌雄各 8 例／群，エテルカルセチド投与群では雌雄各 38 例／群）とし，投与 1 日及び投与 177 日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投与に起因した死亡率への影響は認められず，一般状態，体重及び摂餌量においてもエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

剖検及び病理組織学的検査でもエテルカルセチドの投与に起因する肉眼的異常所見，腫瘍性病変及び非腫瘍性病変は認められなかった．

陽性対照群では，肺の腫瘍及び脾臓の血管肉腫の発生頻度の有意な増加が認められ，ウレタンの毒性及び発がんに基づき死亡率も高値であった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加した．雄では反復投与後の AUC は初回投与時に比べて高値を示した．

以上，エテルカルセチドは，最大耐量である雄の 1.5 mg/kg，雌の 3 mg/kg まで Tg.rasH2 マウスにおいてがん原性を示さなかった．

2.6.6.5.3　　ラットにおける皮下投与による4週間反復投与がん原性用量設定試験

[参考資料：4.2.3.4.1-3]

SD系ラット（雌雄各10例／群）を用い，エテルカルセチドを1，3及び4.5 mg/kgの投与量で1日1回，4週間反復皮下投与した．投与容量は1 mL/kgとし，対照群には媒体である10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成B，表2.6.6.1-2）を投与した．また，サテライト動物を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，1 mg/kg以上で投与量に応じた血清Caの低値及び血清Pの高値が認められた．各投与量における血清Caの推移を表2.6.6.5.3-1に示す．投与期間を通じて，投与後12時間における血清Caは，対照群と比較して3 mg/kgで10%以上の低値を示し，4.5 mg/kgで20%以上の低値を示した．

表2.6.6.5.3-1　ラット4週間反復皮下投与における血清Caの推移

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		1	3	4.5	1	3	4.5
血清Ca変化率（%）[a]	投与1日　投与後12時間	-5	-18	-20	-5	-11	-20
	投与28日　投与前	-5	-8	-9	-2	-5	-8
	投与後12時間	-5	-19	-23	-5	-12	-24
	投与29日　剖検時	-2	-7	-11	-1	-4	-7

a：対照群に対する変化率

3 mg/kg以上で流涎，自発運動減少，呼吸促迫及び振戦，4.5 mg/kgで立毛，円背，平伏姿勢，常同行動，運動失調及び削痩が認められ，4.5 mg/kgの雌2例が死亡し，雌1例で切迫剖検を行った．3 mg/kg以上の雄及び4.5 mg/kgの雌で摂餌量の減少を伴う体重増加抑制も認められた．3 mg/kg以上の雄及び4.5 mg/kgの雌では，血清Caの低下の程度が顕著であったことから，これらは血清Caの低下に伴う変化と考えられた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血清Ca及び血清P以外に本薬の影響は認められなかった．

TK測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差及び反復投与による影響は認められなかった．

以上，4.5 mg/kgでは顕著な血清Caの低下による振戦や自発運動減少などの一般状態変化，一般状態の悪化に伴う死亡，摂餌量の減少に伴う体重増加抑制が認められたことから，雌雄ともに最大耐量は3 mg/kgであった．

2.6.6.5.4　　ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与がん原性用量設定試験

[参考資料：4.2.3.4.1-4]

SD 系ラット（雌雄各 10 例／群）を用い，エテルカルセチドを雄は 0.8，1.6 及び 3.2 mg/kg，雌は 0.8，1.6 及び 3.2/4 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，13 週間反復皮下投与した．なお，最高投与量の雌では体重増加抑制が認められなかったため，投与 50 日より投与量を 3.2 mg/kg から 4 mg/kg に増量した（3.2/4）．投与容量は 1 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．また，サテライト動物を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，0.8 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.5.4-1 に示す．投与期間を通じて，投与後 12 時間における血清 Ca は，1.6 mg/kg 以上で対照群と比較して 10%以上の低値を示した．

表 2.6.6.5.4-1　ラット 13 週間反復皮下投与における血清 Ca の推移

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		**0.8**	**1.6**	**3.2**	**0.8**	**1.6**	**3.2/4**
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日　投与後 8 時間	-11	-18	-21	-12	-16	-17
	投与 35 日　投与後 12 時間	-9	-10	-17	-8	-11	-16
	投与 45 日　投与前	-5	-6	-8	-5	-6	-7
	投与後 12 時間	-7	-11	-19	-8	-10	-15
	投与 91 日　投与前	-5	-8	-9	-8	-7	-8
	投与後 12 時間	-8	-10	-18	-8	-10	-16

a：対照群に対する変化率

1.6 mg/kg の雄 1 例が投与 69 日に死亡し，雄 2 例を投与 44 日又は 91 日に切迫剖検した．これらの動物では，同群の他の動物で認められた振戦や自発運動減少などの一般状態変化の他，呼吸困難，傾斜姿勢，横臥位，黒色／赤色物による口鼻周囲汚染又は眼周囲汚染などが認められた．血清 Ca の低下による振戦及び自発運動減少を除き，これらの症状は最高投与量群の動物でも認められていないこと，また死亡又は切迫剖検の直近に測定したこれらの動物の血清 Ca は同群の他の動物と同程度であったことから，死因は明らかではなかった．

生存例では，0.8 mg/kg 以上の雌及び 1.6 mg/kg 以上の雄で流涎が散見され，1.6 mg/kg 以上の雄及び 3.2/4 mg/kg の雌で自発運動減少，振戦，平伏姿勢などが認められた．1.6 mg/kg 以上で体重増加抑制が認められ，3.2 mg/kg の雄では摂餌量の減少を伴っていた．なお，1.6 mg/kg の体重増加抑制の程度は雄で 16%，雌で 13%であり顕著なものではなかった．

血液学的検査では，3.2 mg/kg の雄で血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられる好中球数の高値が散見され，器官重量測定では，3.2 mg/kg の雄及び 3.2/4 mg/kg の雌で胸腺重量の低値も認められた．

血液化学的検査では，いずれの投与量においても，血清 Ca 及び血清 P 以外に本薬の影響は認められなかった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加し，明らかな雌雄差は認められなかった．また，反復投与後の Cmax 及び AUC は初回投与時に比べて高値を示した．

以上，1.6 mg/kg の死因とエテルカルセチドの投与との関連が明らかではないこと，また 1.6 mg/kg の体重増加抑制の程度は顕著なものではなく，生存例では血清 Ca の低下による一般状態の変化が認められたのみであったことから，同投与量を最大耐量と判断した．

2.6.6.5.5　　ラットにおける皮下投与による 2 年間反復投与がん原性試験

［評価資料：4.2.3.4.1-5］

SD 系ラット（雌雄各 65 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.2，0.4，0.8 及び 1.6 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，2 年間反復皮下投与した．投与容量は 1 mL/kg とし，陰性対照群には生理食塩液を，媒体対照群には 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，剖検及び病理組織学的検査を実施した．また，サテライト動物（対照群では雌雄各 5 例，エテルカルセチド投与群では雌雄各 9 例／群）を設け，投与 183 日の血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．なお，投与 607 日に 1.6 mg/kg の雌の生存例が 20 例となったため，同群の雌の投与を中止し，投与 623 日及び 624 日に 1.6 及び 0.8 mg/kg の雌の生存例が 15 例となったため，同群の雌の剖検を実施した．また，投与 644 日に媒体対照群の生存例が雌雄各 20 例となったため，残りの全群の剖検を投与 653 日までに実施した．そのため，実際の投与期間は 87～94 週となった．

エテルカルセチドの投与に起因した死亡率（切迫剖検を含む）への影響は認められなかった．

体重については，1.6 mg/kg の雄で体重増加抑制が認められたが，一般状態，触診，摂餌量及び剖検においてエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

病理組織学的検査において，腫瘍性病変として雌で下垂体前葉の腺腫の頻度の増加が認められ，陰性対照群及び媒体対照群の 75%及び 77%に対して，エテルカルセチド投与群では 0.2，0.4，0.8 及び 1.6 mg/kg でそれぞれ 86，86，88 及び 71%であった．しかし，施設背景値の範囲（63～85%）をわずかに超える程度であり，また投与量に応じた発現頻度の増加も認められなかったことから，エテルカルセチドの投与に関連しない変化と判断した．非腫瘍

性病変として，皮下投与部位の線維化が認められた．本変化は陰性対照群でほとんど認められない変化であったが，エテルカルセチド投与群の発現頻度は媒体対照群と同程度であったことから，媒体に起因する変化と判断した．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加した．

以上，エテルカルセチドは雌雄とも最大耐量の 1.6 mg/kg までラットにおいてがん原性を示さなかった．

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

エテルカルセチドの生殖発生毒性試験として，ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験，ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験を実施した．

上記の試験は，いずれも GLP に準拠して実施した．その他，試験の一部を OECD 非加盟かつ MAD 制度非参加国で実施した試験は，いずれも参考資料とした．

2.6.6.6.1 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

［参考資料：4.2.3.5.1-1］

SD 系ラット（雌雄各 25 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.75，1.5 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，反復静脈内急速投与し，受胎能及び初期胚発生に及ぼす影響を検討した．雄は交配前 28 日から交配期間を経て剖検前日まで，雌は交配前 14 日から交配期間を経て妊娠 7 日まで投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．雌は妊娠 15 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胚の観察を行った．雄は雌動物の帝王切開後に剖検した．

本薬の薬理作用に基づき，雌雄ともに 0.75 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値が認められた．各投与量における血清 Ca を表 2.6.6.6.1-1 に示す．交配前期間の投与後 8 時間における血清 Ca は，3 mg/kg の雄及び雌で対照群と比較してそれぞれ 19 及び 15%の低値を示した．

表 2.6.6.6.1-1 ラット交配前期間における親動物の血清 Ca

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		0.75	1.5	3	0.75	1.5	3
血清 Ca 変化率（%）[a]	交配前期間終了時 投与後 8 時間	-6	-13	-19	-6	-9	-15

a：対照群に対する変化率

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

3 mg/kg で振戦，流涎，体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた．剖検，生殖器官（下垂体，精巣，精巣上体及び卵巣）重量，交尾率，受胎率，性周期，交配所要日数，黄体数，着床数，生存胚数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率及び精子検査にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

以上より，親動物に対する一般毒性学的な無毒性量は雌雄ともに 1.5 mg/kg，受胎能及び初期胚発生に対する無毒性量は 3 mg/kg と判断した．

2.6.6.6.2　　ラットにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験

［参考資料：4.2.3.5.2-1］

SD 系妊娠ラット（8 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.5，1.5，3 及び 4.5 mg/kg の投与量で胎児器官形成期（妊娠 6～17 日）に 1 日 1 回，静脈内急速投与し，妊娠動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．妊娠 20 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．

本薬の薬理作用に基づき，母動物において 1.5 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.6.2-1 に示す．妊娠 17 日の投与後 8 時間における母動物の血清 Ca は，3 mg/kg 以上で対照群と比較して 20%以上の低値を示した．

表 2.6.6.6.2-1　ラット胎児器官形成期における母動物の血清 Ca 推移

投与量（mg/kg）		0.5	1.5	3	4.5
血清 Ca 変化率（%）[a]	妊娠 6 日　投与後 8 時間	-3	-12	-15	-19
	妊娠 17 日　投与後 8 時間	-1	-11	-20	-25

a：対照群に対する変化率

母動物に及ぼす影響として，顕著な血清 Ca の低下に伴い，3 mg/kg 以上で振戦，立毛，生殖器周囲の汚染，体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められ，4.5 mg/kg では体重減少及び死亡が認められた．

胚・胎児発生においては，4.5 mg/kg で胎児体重の低値が認められた．黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，性比，胎児の外表にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

以上より，4.5 mg/kg では母動物に体重減少及び死亡が認められ，胎児体重も低値であったことから，胚・胎児発生に関する試験への使用には適さないと考えられた．

2.6.6.6.3　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験

［参考資料：4.2.3.5.2-2］

SD 系妊娠ラット（24 又は 25 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.8，1.6 及び 3.2 mg/kg の投与量で胎児器官形成期（妊娠 6～17 日）に 1 日 1 回，反復静脈内急速投与し，妊娠動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．妊娠 20 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．

本薬の薬理作用に基づき，母動物において 0.8 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.6.3-1 に示す．妊娠 17 日の投与後 8 時間における母動物の血清 Ca は，3.2 mg/kg で対照群と比較して 20%以上の低値を示した．

表 2.6.6.6.3-1　ラット胎児器官形成期における母動物の血清 Ca 推移

投与量（mg/kg）		0.8	1.6	3.2
血清 Ca 変化率（%）[a]	妊娠 6 日　投与後 8 時間	-7	-12	-17
	妊娠 17 日 投与後 8 時間	-7	-11	-20

a：対照群に対する変化率

母動物に及ぼす影響として，3.2 mg/kg で被毛の汚染，体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた．3.2 mg/kg では顕著な血清 Ca の低下が認められたことから，これらの変化は血清 Ca の低下に起因する変化と考えられた．剖検ではエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

胚・胎児発生においては，黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重，性比，胎児の外表，内臓及び骨格にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

以上より，ラットの母動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 1.6 mg/kg，胚・胎児発生に対する無毒性量は 3.2 mg/kg と判断した．

2.6.6.6.4　　ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

［評価資料：4.2.3.5.2-3］

SD 系ラット（雌雄各 25 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.75，1.5 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，静脈内急速投与し，受胎能，妊娠動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した．雄は交配前 28 日から交配期間を経て剖検前日まで計 56～59 日間，雌は交配前 15 日から交配期間を経て妊娠 17 日まで計 33～49 日間投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．妊娠 21 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

一般状態観察では，1.5 mg/kg 以上の雄で振戦及び流涎が認められた．また，3 mg/kg で脱水症状，円背，運動失調，平伏姿勢，ラッセル音，虚脱，自発運動減少，つま先歩行，耳介蒼白，呼吸促迫及び削痩が認められた．交配前の雌では，1.5 mg/kg 以上で振戦，運動失調，平伏姿勢，虚脱が認められ，3 mg/kg で脱水症状，円背，耳介蒼白，自発運動減少，皮膚温低下，つま先歩行，散瞳，正向反射障害及び異常発声が認められた．妊娠期間では更に，

1.5 mg/kg 以上で流涎，3 mg/kg で膣周囲汚染，四肢蒼白及び呼吸促迫が認められた．また，1.5 mg/kg 以上の雄並びに 3 mg/kg の交配前及び妊娠期間の雌で体重増加抑制，3 mg/kg の雄並びに交配前及び妊娠期間の雌で摂餌量の減少が認められた．なお，0.75 mg/kg の雄でも体重増加抑制が認められたが，薬理作用に基づく血清 Ca の低下に伴う変化であり，対照群と比較して 10%未満の軽微な変動であることから，毒性ではないと判断した．

剖検では，エテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

雄の生殖器官（精巣，精巣上体，前立腺及び精嚢）重量，精子濃度及び精子運動率にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．また，交配所要日数，交尾率及び授胎率に影響は認められなかった．

3 mg/kg の雌では，発情間期が 6 日以上持続する例が認められ，性周期が延長したが，交尾率，受胎率，交配所要日数，黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，吸収胚数，胎児体重及び性比にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．また，胎児の外表，内臓及び骨格に影響は認められなかった．

以上，雌雄とも 1.5 mg/kg 以上で振戦などの一般状態変，体重増加抑制，摂餌量の減少又は性周期の延長が認められた．これらは，エテルカルセチドの薬理作用に基づく血清 Ca の低下に起因する変化又はストレスによる二次的な変化と考えられた．一方，雌雄の受胎能及び胚・胎児発生に対する影響は認められなかった．したがって，雌雄親動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 0.75 mg/kg，雌雄ラットの受胎能及び胚・胎児発生に対する無毒性量は 3 mg/kg と判断した．

2.6.6.6.5　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験

［参考資料：4.2.3.5.2-4］

NZW 系妊娠ウサギ（5～6 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.5，1.5，2.25 及び 3 mg/kg の投与量で胎児器官形成期（妊娠 7～20 日）に 1 日 1 回，反復静脈内急速投与し，母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．妊娠 29 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．また，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

本薬の薬理作用に基づき，母動物において 0.5 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.6.5-1 に示す．妊娠 20 日の投与後 8 時間における母動物の血清 Ca は，1.5 mg/kg 以上で対照群と比較して 30%以上の低値を示した．

表 2.6.6.6.5-1　ウサギ胎児器官形成期における母動物の血清 Ca 推移

投与量（mg/kg）			0.5	1.5	2.25	3
血清 Ca 変化率（%）[a]	妊娠 7 日	投与後 8 時間	-15	-22	-22	-27
		投与後 24 時間	-2	-5	-14	-12
	妊娠 20 日	投与後 8 時間	-16	-31	-41	-48
		投与後 24 時間	-1	-11	-6	-30

a：対照群に対する変化率

母動物に及ぼす影響として，1.5 mg/kg 以上で振戦，咀嚼様運動，流涎，糞便数の減少，便の小型化，軟便，体重及び摂餌量の減少，2.25 mg/kg で流産，3 mg/kg で呼吸促迫及び死亡が認められた．1.5 mg/kg 以上では顕著な血清 Ca の低下が認められたことから，これらの変化は血清 Ca の低下に起因する変化と考えられた．剖検では，エテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

胚・胎児発生においては，2.25 mg/kg 以上で胎児体重の低値が認められた．黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重，胎児の外表にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

TK 測定の結果，血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加した．

以上より，2.25 mg/kg 以上では母動物に流産又は死亡が認められ，胎児体重も低値であったことから，胚・胎児発生に関する試験への使用には適さないと考えられた．

2.6.6.6.6　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

[参考資料：4.2.3.5.2-5]

NZW 系妊娠ウサギ（20 又は 22 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.375，0.75 及び 1.5 mg/kg の投与量で胎児器官形成期（妊娠 7～20 日）に 1 日 1 回，反復静脈内急速投与し，妊娠動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．妊娠 29 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．

本薬の薬理作用に基づき，母動物において 0.375 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値が認められた．各投与量における血清 Ca の推移を表 2.6.6.6.6-1 に示す．妊娠 20 日の投与後 8 時間における母動物の血清 Ca は，1.5 mg/kg で対照群と比較して 30%以上の低値を示した．

表 2.6.6.6.6-1　ウサギ胎児器官形成期における母動物の血清 Ca 推移

投与量（mg/kg）			0.375	0.75	1.5
血清 Ca 変化率（%）[a]	妊娠 7 日	投与後 8 時間	-4	-7	-14
		投与後 24 時間	-1	0	-5
	妊娠 20 日	投与後 8 時間	-13	-20	-32
		投与後 24 時間	-3	-3	-13

a：対照群に対する変化率

母動物に及ぼす影響として，1.5 mg/kg で糞便数の減少，便の小型化，体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた．なお，0.375 及び 0.75 mg/kg でも糞便数の減少，便の小型化が認められたが，体重及び摂餌量に顕著な変動は認められなかったことから，毒性変化ではないと判断した．また，0.375 mg/kg 以上で軟便も観察されたが，対照群でも認められる変化であった．剖検では，エテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

胚・胎児発生においては，黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重，性比，胎児の外表，内臓及び骨格にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

以上，ウサギの母動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 0.75 mg/kg，胚・胎児発生に対する無毒性量は 1.5 mg/kg と判断した．

2.6.6.6.7　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

［評価資料：4.2.3.5.2-6］

NZW 系妊娠ウサギ（21 又は 22 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.375，0.75 及び 1.5 mg/kg の投与量で胎児器官形成期（妊娠 7～19 日）に 1 日 1 回，反復静脈内急速投与し，母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．妊娠 29 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．また，妊娠 11 日の血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

母動物に及ぼす影響として，1.5 mg/kg で糞便数の減少，体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた．剖検では，エテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．なお，0.375 mg/kg 以上で軟便又は液状便が観察されたが，対照群でも認められる程度の変化であった．その他，0.375，0.75 及び 1.5 mg/kg のそれぞれ，2 例，1 例及び 1 例を摂餌量の減少に伴う体重減少のため切迫剖検した．これらの例が摂餌量の減少を示した明らかな原因は不明であるが，投与量に応じない変化であり，ウサギにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験（2.6.6.6.5）では，2.25 mg/kg までの投与で死亡例は認められていないことから，エテルカルセチドの投与に起因した変化ではないと判断した．

胚・胎児発生においては，黄体数，着床数，着床前胚死亡率，吸収胚数，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重及び性比に影響は認められなかった．また，胎児の外表，内臓及び骨格にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

TK 測定の結果，血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加した．

以上，母動物では 1.5 mg/kg で糞便数の減少，体重増加抑制や摂餌量の減少などが認められたが，胚・胎児発生に対する影響はいずれの投与量でも認められなかったことから，母動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 0.75 mg/kg，胚・胎児発生に対する無毒性量は 1.5 mg/kg と判断した．

2.6.6.6.8　　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

［評価資料：4.2.3.5.3-1］

SD 系妊娠ラット（23 又は 25 例／群）を用い，エテルカルセチドを 0.75，1.5 及び 3 mg/kg の投与量で妊娠 7 日～授乳 20 日まで 1 日 1 回，反復静脈内急速投与し，出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．母動物を自然分娩させ，分娩しない動物には妊娠 24 日まで投与し妊娠 25 日に剖検を実施した．生後 21 日に出生児を離乳させ，母動物の剖検を実施した．母動物毎に出生児雌雄各 1 例を選択し，成長，行動機能，生殖能を評価した．また，サテライト動物（妊娠ラット，4 例／群）を設け，妊娠 7 日，妊娠 20 日及び妊娠 21 日の血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．更に，妊娠 21 日の胎児中エテルカルセチド濃度を測定した．

母動物に及ぼす影響として，3 mg/kg の 1 例で妊娠 15 日以降に振戦，流涎，脱水症状及び削痩などが認められ，授乳期間中には体重及び摂餌量の減少を示し，授乳 17 日に切迫剖検した．本薬の薬理作用に基づき 3 mg/kg で血清 Ca が顕著に低下する（2.6.6.6.2）ことから，これらの変化は血清 Ca の低下に起因するものと考えられた．切迫剖検した 1 例以外の動物においても，妊娠後期に 3 mg/kg で流涎及び振戦が認められ，授乳期間中に 1.5 mg/kg 以上で振戦，流涎及び腹部被毛の汚れが，3 mg/kg で脱水症状及び円背が認められた．なお，0.75 mg/kg でも振戦が認められたが，1 例に 1 回認められたのみであり，体重や摂餌に影響は認められず，薬理作用に基づく血清 Ca の低下に起因した軽微な影響であることから，毒性ではないと判断した．3 mg/kg で妊娠後期から授乳期間にかけて体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた．1.5 mg/kg 及び 3 mg/kg で妊娠期間がそれぞれ 22.7 日及び 22.8 日となり，対照群の 22.4 日と比較してわずかに延長したが，血清 Ca の低下による子宮平滑筋の収縮の減弱が原因と推察された [3)]．剖検では，エテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

出生児に及ぼす影響として，3 mg/kg で生産児数の低値及び死産児数の高値が認められ，生後 4 日の生存率も低値を示した．授乳期間中の出生児では，1.5 mg/kg 以上で体重増加抑制が認められ，3 mg/kg で軽微な脱水症状も認められた．1.5 mg/kg 以上では，授乳期間中の母動物に本薬の薬理作用に基づく血清 Ca の低下による振戦及び脱水症状などの一般状態変化，体重の低値又は摂餌量の減少が認められていることから，これら出生児の変化は母動物への影響に伴うものと考えられた．3 mg/kg の雄児では離乳後も生後 29 日まで体重の低値が認められたが，その後は回復した．離乳時の剖検，性成熟，行動機能，交尾能，受胎能，最終剖検，精巣，精巣上体，卵巣及び子宮重量にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．また，出産した動物数，着床数，生産児を産んだ動物率，死産児を産んだ動物率，性比，生産児体重にエテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

TK 測定の結果，妊娠 20 日の C5min 及び AUC は妊娠 7 日（初回投与時）に比べて若干高値を示した．妊娠 21 日におけるエテルカルセチドの胎児／母動物血漿中濃度比は 0.75，1.5 及び 3 mg/kg でそれぞれ 2.99，2.86 及び 2.39%であった．

以上，1.5 mg/kg 以上で妊娠期間の延長，授乳期間中の母動物に振戦，授乳期間中の出生児に体重増加抑制が認められたが，いずれの投与量においても出生児の性成熟，行動機能及び生殖機能に影響は認められなかったことから，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，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 と判断した．

2.6.6.7 局所刺激性試験

エテルカルセチドの局所刺激性について，イヌを用いた静脈内及び静脈周囲への皮下投与による局所刺激性試験をGLPに準拠して実施した．

2.6.6.7.1 イヌにおける静脈内及び静脈周囲への単回投与による局所刺激性試験

［評価資料：4.2.3.6-1］

ビーグル犬（雄3例／群）を用い，5 mg/mLの濃度で3 mLを右前肢橈側皮静脈内及び右後肢伏在静脈から 1 cm 離れた皮下に単回投与し，局所刺激性を評価した．媒体には10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 C，表 2.6.6.1-2）を用い，対照として注射用水を同一個体の左前肢橈側皮静脈内及び左後肢伏在静脈から 1 cm 離れた皮下に投与した．一般状態観察，体重測定及び投与部位の観察を行い，投与後約24時間に剖検した．

投与部位の肉眼所見（Draize 変法による刺激性スコア），投与部位の剖検及び病理組織学的検査において影響は認められなかった．

以上，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ても，局所刺激性を示さなかった．

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 光安全性試験

エテルカルセチドはペプチドであり，眼及び皮膚への分布は限られていること，またメラニンに対する親和性が低いと考えられることから，光安全性試験は実施していない．ICH S10「医薬品の光安全性評価ガイドライン」（薬食審査発0521第1号，平成26年5月21日）は，一般的にペプチド及び蛋白質などには適用されない，とされている．

2.6.6.8.2 免疫原性試験

ラット及びイヌの反復投与毒性試験において，反復投与後のエテルカルセチドの血漿中曝露の低下，薬理作用の減弱又は免疫系の賦活化などの明らかな抗薬物抗体の産生を示唆する所見は認められなかったことから，エテルカルセチドの免疫原性試験は実施していない．

2.6.6.8.3 免疫毒性試験

ラット及びイヌの反復投与毒性試験において直接的な免疫系への影響を示唆する変化は認められなかったことから（2.6.6.3），ICH S8「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」（薬食審査発第0418001号，平成18年4月18日）に基づき，免疫毒性試験を実施していない．

ラット及びイヌの反復投与毒性試験では，好中球数の高値，リンパ球数の低値，胸腺及び脾臓重量の低値，副腎重量の高値又は胸腺のリンパ球枯渇など，免疫系への影響が認められた．しかし，これらの変化はエテルカルセチドの直接的な免疫系への影響を示唆する変化ではなく，薬理作用に基づく血清 Ca の低下によるストレスに関連した変化と考えられた．また，いずれの試験においても，感染症の増加，発がん性，アルブミン，グロブリン，フィブリノーゲンなどの急性期蛋白の一貫した変動は認められなかった．

2.6.6.8.4 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 試験において *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535 に対して陽性反応を示した（2.6.6.4.1.1）．L-Cys やグルタチオンなどの SH 基を含有するアミノ酸及びペプチドは，Ames 試験において TA100 で陽性反応を示し [4) ~9)]，この陽性反応には SH 基による活性酸素種の生成が関与することが示唆されている [10) 11)]．TA1535 でも同様に，SH 基を含有するアミノ酸あるいはペプチドが Ames 陽性反応を示す可能性が考えられたため，エテルカルセチドから SH 基（D-Cys 又は L-Cys）を脱離させたペプチドの Ames 試験及び SH 基を有する L-Cys の Ames 試験を TA1535 で実施した．エテルカルセチドやそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの TA1535 に対する代謝安定性についても検討した．また，活性酸素種を生成させる各種酸化剤の Ames 試験を TA100 及び TA1535 で実施した．

2.6.6.8.4.1 *Salmonella typhimurium* TA1535 におけるエテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチド（KP-2326，KP-2140 及び KP-2067）の Ames 試験

[参考資料：4.2.3.7.3-1]

エテルカルセチド，KP-2326（エテルカルセチドの 2 位 D-Ala と 4 位 D-Arg を入れ替えたペプチド），KP-2140（エテルカルセチドの D-Cys 及び L-Cys 脱離体）及び KP-2067（エテルカルセチドの L-Cys 脱離体）の Ames 試験を実施し，エテルカルセチドのアミノ酸配列や分子内の SH 基がエテルカルセチドの Ames 陽性反応に寄与した可能性について検討した．*Salmonella typhimurium* TA1535 を用いたプレート法により，代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．いずれも媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（pH4.5±0.1）に溶解させ，用量は 15～5000 μg/plate とした．

その結果，エテルカルセチド及び KP-2326 は，復帰変異コロニー数を媒体対照値の 3 倍以上に増加させた．一方，SH 基を有さない KP-2140 は，復帰変異コロニー数を増加させなかった．SH 基を有するがジスルフィド結合をもたない KP-2067 は，復帰変異コロニー数を

媒体対照値の 2.2 倍に増加させたが，用量に応じた増加ではなく，エテルカルセチドと比較して弱い反応であった．いずれにおいても，被験物質の析出や菌の生育阻害は認められなかった．

以上より，エテルカルセチドから D-Cys 及び L-Cys を脱離させ，SH 基を除去することにより，エテルカルセチドの Ames 陽性反応は消失した．また，エテルカルセチドから L-Cys を脱離させ，ジスルフィド結合を還元することにより，エテルカルセチドの Ames 陽性反応は減弱した．以上のことから，エテルカルセチド分子内の SH 基及び L-Cys と D-Cys の間で形成されるジスルフィド結合が，エテルカルセチドの Ames 陽性反応に寄与すると考えられた．

2.6.6.8.4.2 *Salmonella typhimurium* TA1535 におけるエテルカルセチドの L-Cys 脱離体（KP-2067）の Ames 試験

[参考資料：4.2.3.7.3-2]

先に実施した Ames 試験においてエテルカルセチドの L-Cys 脱離体である KP-2067 は復帰変異コロニー数を増加させたが，その反応は弱かったことから（2.6.6.8.4.1），その再現性について確認するための試験を実施した．*Salmonella typhimurium* TA1535 を用いたプレート法により，代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．KP-2067 は媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（pH4.5±0.1）に溶解させ，用量は 150～5000 μg/plate とした．

その結果，KP-2067 は復帰変異コロニー数を媒体対照値の 3 倍以上に増加させたが，用量に応じた増加ではなかった．いずれにおいても，KP-2067 の析出や菌の生育阻害は認められなかった．

以上より，KP-2067 は先に実施した Ames 試験（2.6.6.8.4.1）と同様の反応を示し，再現性が確認された．

2.6.6.8.4.3 エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチド（KP-2326，KP-2140 及び KP-2067）の *Salmonella typhimurium* TA1535 に対する代謝安定性試験

[参考資料：4.2.3.7.3-3]

エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチド（KP-2326，KP-2140 及び KP-2067）を *Salmonella typhimurium* TA1535 とともにインキュベーションしたときの代謝安定性について検討した．S9mix 非存在下において，これらのペプチドを TA1535 とともに 37℃で 60 分間インキュベーションした後，LC/MS/MS 法により各ペプチドから生成され

る分解物又は生成物を測定した．ペプチドの濃度は 10 mg/mL（ペプチド量で補正した場合は 7142 μg/mL）とした．

その結果，エテルカルセチドの D-Cys 及び L-Cys 脱離体である KP-2140 は，TA1535 とインキュベーションしても分解物あるいは生成物を生成しなかった．一方，D-Cys を有するエテルカルセチド，KP-2326 及び KP-2067 を TA1535 とともにインキュベーションした結果，それぞれの母骨格の二量体が認められ，いずれも分子内におけるジスルフィド交換反応により生じたと考えられた．なお，エテルカルセチドの L-Cys 脱離体の二量体（ホモダイマー）は，ヒト血漿中において認められなかったことから［5.3.3.2-2］，血中濃度をはるかに超える高濃度の各ペプチドをインキュベーションしたために生じたと推察された．

以上より，エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドと TA1535 とのインキュベーションにより母骨格の二量体が形成されたが，その他に分解物や生成物は認められなかったことから，一連の Ames 試験においてエテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドは TA1535 による代謝を受けず，安定であったと考えられた．

2.6.6.8.4.4 *Salmonella typhimurium* TA1535 における L-Cys の Ames 試験

［参考資料：4.2.3.7.3-4］

エテルカルセチドは，その分子内のジスルフィド結合を還元することにより L-Cys を遊離すると考えられ，L-Cys は SH 基を介して，*Salmonella typhimurium* TA100 で Ames 陽性反応を示すことが報告されている[4]．L-Cys は *Salmonella typhimurium* TA1535 に対しても Ames 陽性反応を示す可能性が考えられたため，L-Cys の Ames 試験を TA1535 で実施した．TA1535 を用いたプレート法により，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．L-Cys は媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（pH4.5±0.1）に溶解させ，用量は 1.5～5000 μg/plate とした．比較対照として，L-Cys が陽性反応を示すことが報告されている *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA102 を用いて Ames 試験を実施した．

その結果，L-Cys は，代謝活性化の有無に関わらず TA1535 において復帰変異コロニー数を増加させなかった．一方，TA100 の S9mix 存在下及び非存在下では復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の 2.8 倍及び 2.2 倍に増加させ，TA102 の S9mix の存在下では復帰変異コロニー数を媒体対照値の 2.3 倍に増加させた．いずれにおいても，L-Cys の析出や菌の生育阻害は認められなかった．

以上より，L-Cys は TA1535 において復帰変異コロニー数を増加させなかったことから，エテルカルセチドから遊離する L-Cys は，エテルカルセチドの TA1535 に対する Ames 陽性反応の原因ではないと考えられた．

2.6.6.8.4.5 *Salmonella typhimurium* TA1535 における酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験

[参考資料：4.2.3.7.3-5]

酸化剤は活性酸素種を生成することにより，Ames 試験において *Salmonella typhimurium* TA100 あるいは TA102 で陽性反応を示すことが報告されている[12]．エテルカルセチドはその分子内の SH 基を介して活性酸素種を生成する可能性があるため，酸化剤の Ames 試験を実施し，活性酸素種の生成に起因して *Salmonella typhimurium* TA1535 に対する Ames 陽性反応が誘発される可能性について検討した．TA1535 を用いたプレインキュベーション法により，種々の酸化剤（グリオキサール，クメンヒドロペルオキシド，*tert*-ブチルヒドロペルオキシド，L-ペニシラミン，フェニルヒドラジン，過酸化水素，1,2,4-ベンゼントリオール，ヒドロキノン，ピロガロール，2,6-ジメチル-1,4-ベンゾキノン及び L-グルタチオン）並びに抗酸化剤である活性酸素分解酵素（SOD）について，代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．これらの酸化剤及び SOD は媒体である水，ジメチルスルホキシドあるいは 100 mmol/L リン酸緩衝液に溶解させ，それぞれの用量は TA100 あるいは TA102 に対して陽性反応を示す用量に基づいて設定した．比較対照として，酸化剤が陽性反応を示すことが報告されている TA100 及び TA102 を用いて Ames 試験を実施した．

その結果，TA1535 において，グリオキサール及びクメンヒドロペルオキシドは復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の 3.3 及び 5.3 倍に増加させた．これらについて再試験を実施した結果，グリオキサールは復帰変異コロニー数を媒体対照値の 5.6 倍に増加させ，再現性が確認されたが，クメンヒドロペルオキシドは復帰変異コロニー数を増加させず，再現性は認められなかった．一方，TA100 又は TA102 では，グリオキサール及びクメンヒドロペルオキシドに加えて，*tert*-ブチルヒドロペルオキシド，L-ペニシラミン及びフェニルヒドラジンが復帰変異コロニー数を増加させた．その他の酸化剤及び抗酸化剤は復帰変異コロニー数を増加させなかった．

以上より，一部の酸化剤は TA1535 で復帰変異コロニー数の増加を示したことから，活性酸素種の生成に起因して TA1535 に対する Ames 陽性反応が誘発される可能性が示唆された．

2.6.6.8.4.6 *Salmonella typhimurium* TA1535 におけるグリオキサールの Ames 陽性反応に対する抗酸化剤の影響

[参考資料：4.2.3.7.3-6]

先に実施した Ames 試験において，酸化剤であるグリオキサールは *Salmonella typhimurium* TA1535 で復帰変異コロニー数を増加させたことから（2.6.6.8.4.5），抗酸化剤で前処理した

TA1535 を用いてグリオキサールの Ames 試験を実施し，グリオキサールの Ames 陽性反応が活性酸素種の生成を介して誘発された可能性について検討した．TA1535 を抗酸化剤（SOD，カタラーゼ，デフェロキサミンメシル酸塩あるいは EDTA）とともに 37℃で 10 分間インキュベーション（前処理）した後，グリオキサールをプレインキュベーション法により，代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価し，前処理していないグリオキサールの結果と比較した．グリオキサールは媒体である水に溶解させ，用量は先に実施した Ames 試験で復帰変異コロニー数の増加が認められた 250 μg/plate とした．比較対照として，グリオキサールによる Ames 陽性反応に活性酸素の生成が関与することが報告されている TA100 を用いて Ames 試験を実施した．

その結果，TA1535 を抗酸化剤で前処理しなかった場合には，先に実施した Ames 試験（2.6.6.8.4.5）と同様，グリオキサールは復帰変異コロニー数を媒体対照値の 9 に対して 28（3.1 倍）に増加させた．一方，TA1535 を SOD，カタラーゼ，デフェロキサミンメシル酸塩及び EDTA の各抗酸化剤で前処理した場合には，グリオキサールによる復帰変異コロニーはそれぞれ 39，21，29 及び 39%減少した．なお，TA100 でも TA1535 と同様の結果を示した．また，いずれの抗酸化剤も単剤では Ames 陽性反応や細胞毒性を示さなかった．

以上より，TA1535 でも，特定の酸化剤の添加条件下において活性酸素種の生成に起因して復帰変異コロニー数の増加が誘発されると考えられた．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が生成されたことに起因する可能性が示唆された．

2.6.6.8.5　　依存性試験

エテルカルセチドは中枢神経系に対して活性を示さないと考えられたことから，ICH M3（R2）ガイダンスに基づき，依存性試験は実施しなかった．

エテルカルセチドは膜透過性が低く，トランスポーターの基質でもないため，血液脳関門を通過しにくいと考えられ，ラットにおける中枢組織への分布も低かった［2.6.4.4.1.1］．ラット又はイヌを用いた安全性薬理試験［2.6.2.4.1］及び反復投与毒性試験（2.6.6.3）では振戦，痙攣や嘔吐などの一般状態の変化が認められたが，いずれも顕著な血清 Ca の低下による二次的変化あるいは消化管に発現する CaSR への直接的な影響と考えられ，中枢神経系への直接的な影響は認められなかった．また，ラットを用いた出生前後試験（2.6.6.6.8）において，出生児の記憶及び学習を含む行動機能に対する影響は認められなかった．

エテルカルセチドは依存性を有する既存の化合物と構造が類似せず，エテルカルセチドより中枢移行性の高い同種同効薬のシナカルセト塩酸塩においても依存性を示唆する変化は認められていない [13]．また，エテルカルセチドは，依存性に関連するオピオイド，ドーパミ

ン，セロトニン，GABA 及びニコチン性アセチルコリン受容体やノルエピネフリントランスポーターを含む 34 種類の分子標的に対する親和性を示さなかった［2.6.2.3.2］．

2.6.6.8.6　　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，分子内の L-Cys と生体内 SH 基含有物質が非酵素的にジスルフィド交換反応することで種々の生体内変換物質となり，主にアルブミンとの複合体である 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）になる［2.6.4.5.3］．SAPC は，ヒト血漿中には多く認められているが［2.7.2.2.3.4］，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．ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験では SAPC の免疫原性を示唆する安全性や薬物動態学的な影響は認められず，臨床試験においても SAPC は免疫原性を示さなかった［2.7.2.4.1］．また，臨床での血漿中エテルカルセチド濃度は血中の還元型アルブミンの血中濃度（約 400 μ mol/L）[14] の 1/300 以下であったことから，SAPC 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．SAPC はエテルカルセチドの主活性部位である D-アミノ酸骨格を保持しているが，その 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］，本薬の薬理作用に基づく毒性変化を増強する可能性も低いと考えられた．

2.6.6.8.7　　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 及び ICH Q3B ガイドライン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　　,*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 週間反復静脈内投与毒性試験を GLP に準拠して実施した．また，エテルカルセチド塩酸塩の原薬に含まれる可能性のある不純物のうち，原料由来の　　*不純物A　　が *in silico* 評価で警告構造を示したため，Ames 試験を GLP に準拠して実施した．その他の GLP 非適用あるいは OECD 非加盟かつ MAD 制度非参加国で実施した試験は，参考資料とした．

*新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.6.8.7.1 不純物を含有する原薬のラットにおける静脈内投与による 4 週間反復投与毒性試験

[評価資料：4.2.3.7.6-1]

SD 系ラット（雌雄各 10 例／群）を用い，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及び分解物 [redacted] 種を添加した原薬の 4 週間反復静脈内投与毒性試験を実施し，これら不純物の安全性評価を行った．本試験で使用した原薬に含まれる不純物及び分解物のうち，規格として ICH Q3A 及び ICH Q3B ガイドラインの安全性確認の閾値を超える不純物及び分解物の含量を表 2.6.6.8.7.1-1 に示す．エテルカルセチドを 0.3，1 及び 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，4 週間反復静脈内急速投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．また，サテライト動物（雌雄各 6 例／群）を設け，投与 1 日及び投与 28 日の血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

表 2.6.6.8.7.1-1 原薬中の不純物含量

名称	添加量（%）	含量（%）（HPLC）
ホモダイマー	[redacted]	[redacted]
脱アミド体	[redacted]	[redacted]
*不純物B	[redacted]	[redacted]
*不純物C	[redacted]	[redacted]a
*不純物D	[redacted]	

a：*不純物C と *不純物D の総量

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

一般状態観察では，3 mg/kg で振戦，自発運動減少，異常発声，歩行異常，流涎，咀嚼行動，円背及び平伏姿勢が認められ，雄では体重増加抑制も認められた．

血液化学的検査では，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清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められた．その他，3 mg/kg で ALT の高値，ALP 及びグロブリンの低値が認められたが，施設背景値の範囲をわずかに超える程度の軽微な変動であり，肝臓に傷害性を示唆する病理組織学的変化が認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

病理組織学的検査では，1 mg/kg 以上の雌及び 3 mg/kg の雄で副甲状腺の主細胞好酸性化が認められ，血清 Ca の低下に伴う適応性変化と考えられた．また，同投与量で腎臓の近位尿細管に褐色色素沈着が認められたが，褐色色素沈着に伴う機能的な影響を示唆する明らかな尿量，血清 Na 及び血清 K などの変動や尿細管の傷害性変化は認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と考えられた．

この他，摂餌量，血液学的検査，尿検査，眼科学的検査，剖検及び器官重量測定では，エテルカルセチドの投与による影響は認められなかった．

TK 測定の結果，雌雄ともに血漿中のエテルカルセチドの曝露量は投与量に応じて増加した．

以上，エテルカルセチド不純物を添加した原薬は，不純物を添加しない原薬と同様の変化を示し，原薬に添加した不純物特有の毒性変化は認められなかった．無毒性量は不純物を添加しない原薬を用いた毒性試験と同じ 1 mg/kg であった．

2.6.6.8.7.2 不純物を含有する液剤のイヌにおける静脈内投与による 4 週間反復投与毒性試験

[参考資料：4.2.3.7.6-2]

ビーグル犬（雌雄各 3 例／群）を用い，ホモダイマーなどを多く含む液剤（ロット番号[redacted]）の 4 週間反復静脈内投与毒性試験を実施し，製剤の保管中に増加する可能性のある不純物の安全性評価を行った．また，比較のため，従来の凍結乾燥品（ロット番号[redacted]）も評価した．液剤及び凍結乾燥品ともに 0.4 及び 1 mg/kg の投与量で 2 日に 1 回，4 週間（計 14 回）静脈内急速投与した．投与容量は 0.5 mL/kg とし，対照群には媒体である 10 mmol/L コハク酸緩衝液（組成 B，表 2.6.6.1-2）を投与した．また，血漿中エテルカルセチド濃度を測定した．

いずれの投与量においても死亡例は認められなかった．

不純物を含有する液剤では，本薬の薬理作用に基づき 0.4 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値が認められ，1 mg/kg で顕著な血清 Ca の低下による振戦，自発運動減少，嗜眠，痙攣及び皮膚温低下，体重及び摂餌の減少，白血球数，好中球数，リンパ球数及び網赤血球数の低値が認められた．

心電図検査では，1 mg/kg の雄で心拍数の低下，QT 間隔及び QTcF の延長が認められた．また，1 mg/kg で胸腺重量の低値及び胸腺の小型化が認められ，病理組織学的検査では，胸腺のリンパ球枯渇及び骨髄の細胞減少が認められた．なお，1 mg/kg の雄で，腎臓の近位尿細管の褐色色素沈着及び肝臓の肝細胞空胞化（グリコーゲン貯留）が認められたが，いずれも他の病理組織学的変化や臨床検査値の変動を伴っていないことから毒性学的意義のない変化と判断した．

比較のために用いた凍結乾燥品でもほぼ同様の変化が認められた．なお，凍結乾燥品では，嗜眠，痙攣及び皮膚温低下は認められなかったが，凍結乾燥品を用いて先に実施したイヌの反復投与毒性試験では，これらの変化は認められており，本薬の薬理作用に基づく血清 Ca

の低下に起因する変化と考えられることから，液剤に含まれる不純物特有の毒性変化ではないと判断した．

TK 測定の結果，血漿中のエテルカルセチドの曝露量について両剤で明確な差は認められなかった．

以上，不純物を含有する液剤は，比較のために用いた凍結乾燥品と同様の変化を示し，無毒性量はいずれも 0.4 mg/kg であり，液剤に含まれる不純物特有の毒性変化は認められなかった．

2.6.6.8.7.3 不純物を含有する原薬のほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT 試験）

［参考資料：4.2.3.7.6-3］

V79 細胞（チャイニーズハムスター肺由来）を用い，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で HPRT 遺伝子を指標として評価した．RRT 1.11-1.12 及び RRT 1.19-1.23 に相当する不純物をそれぞれ[redacted]%及び[redacted]%含有したエテルカルセチドを水に溶解させ，濃度は 625～5000 μg/mL とした．

その結果，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの濃度においても遺伝子突然変異頻度の増加は認められなかった．

以上より，上記の不純物を含有した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有さないと判断した．

2.6.6.8.7.4 *不純物A の Ames 試験

［評価資料：4.2.3.7.6-4］

Salmonella typhimurium TA98，TA100，TA1535，TA97a 及び *Escherichia coli* WP2*uvrA* を用い，プレート法で代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）で評価した．*不純物A は媒体である水に溶解させ，用量は 1.58～5000 μg/plate とした．

その結果，*不純物A は，代謝活性化の有無に関わらず全菌株ともにいずれの用量においても復帰変異コロニー数を増加させなかった．*不純物A の析出及び菌の生育阻害は認められなかった．

以上より，*不純物A は細菌において遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.9 考察及び結論

1) 急性毒性

げっ歯類及び非げっ歯類を用いた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及びラット小核試験の用量設定試験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．

ラットにエテルカルセチドを 0.5，2 及び 5 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，静脈内急速投与した結果，5 mg/kg で初回投与後より対照群と比較して 23～28%の顕著な血清 Ca の低値が認められたが，投与 3 日まで一般状態の変化や死亡例は認められなかった．また，ラットにエテルカルセチドを 5，7.5，10 及び 12.5 mg/kg の投与量で 1 日 1 回，30 分間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，投与 2 日以降に痙攣や体重減少も認められた．死亡例の認められた 7.5 mg/kg 以上では血清 Ca が顕著に低下したと推察され，血清 Ca の低下に伴う一般状態の悪化が死因と考えられた．

イヌにエテルカルセチドを 0.5，2 及び 5 mg/kg の投与量で 1 日 1 回静脈内急速投与した結果，2 mg/kg 以上で初回投与後より対照群と比較して 30%以上の顕著な血清 Ca の低値が認められ，5 mg/kg の雄 1 例及び雌 2 例で嘔吐が認められた．投与 2 日及び投与 3 日には 2 mg/kg 以上で血清 Ca の低値はより顕著となり，これに伴い嗜眠，振戦，痙攣，平伏姿勢，呼吸困難，流涎，嘔吐又は摂餌や飲水行動の減少（廃絶）が認められた．一般状態の悪化のため，投与 2 日又は投与 3 日で投与を中止した結果，これらの症状は回復し，死亡例は認められなかった．

以上より，ラット及びイヌにエテルカルセチドを静脈内急速投与あるいは静脈内持続投与した結果，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，イヌの 2 mg/kg 以上で振戦，痙攣及び嘔吐，ラットの 7.5 mg/kg 以上で嗜眠，立毛，痙攣及び死亡などが認められた．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) 反復投与毒性

エテルカルセチドの反復投与毒性試験として，ラットの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験及びイヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験を実施した．いずれの動物種も薬効薬理試験［2.6.2.2.2］において本薬の主薬効である血漿 PTH の低下作用を示したことから，本薬の毒性評価に適した動物種である．

ラット及びイヌでは，エテルカルセチドの薬理作用に基づく血清 Ca の低値及び血清 P の高値が投与量に応じて認められ，高い投与量では顕著な血清 Ca の低下に伴い，自発運動減少，振戦，痙攣，嘔吐，流涎などの一般状態変化，摂餌量の減少を伴う体重増加抑制，QTc

の延長又は副甲状腺の主細胞好酸性化などが認められた．その他，ラット及びイヌで腎臓の尿細管上皮に褐色色素沈着が認められ，ラットでは RBC，Hb，Ht，好中球数及びアルブミンの高値，リンパ球数，グロブリン及び血清 K の低値，脾臓重量の低値，胃粘膜のびらんやクレアチニン，BUN，AST，ALT 及び ALP のわずかな変動なども認められた．

以下に，これらの変化に関する考察を記載した．

血清 Ca 及び血清 P への影響

ラットの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 0.3 mg/kg 以上，イヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 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．

これら試験におけるラット及びイヌの血清 Ca 及び血漿中エテルカルセチド濃度の推移について，それぞれ表 2.6.6.9-1～表 2.6.6.9-2 に示した．ラット及びイヌともに，血漿中エテルカルセチド濃度の増加に応じた血清 Ca の低下が認められ，それぞれ最高投与量とした 3 及び 0.9 mg/kg における血清 Ca は，対照群と比較して 26～30%の低値を示した．血清 Ca の低値は休薬により回復し，反復投与による増強や雌雄差は認められなかった．イヌで経時的に血清 Ca を測定した結果，反復投与後における血漿中エテルカルセチド濃度及び血清 Ca は概ね初回投与時と同様の推移を示した．また，血清 P は血漿中エテルカルセチド濃度に応じて高値を示し，血清 Ca とほぼ逆相関の関係にあった．

エテルカルセチドの薬効薬理試験では，血漿 PTH の低下に伴う血清 Ca の低下［2.6.2.2.2.3，2.6.2.2.2.4，2.6.2.2.2.5］及び血清 P の増加［2.6.2.2.2.4］が確認されている．血清 Ca の低下は，本薬の 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であり，血清 P の増加は，本薬の PTH 分泌抑制作用により腎尿細管からの P 再吸収が促進された結果であると考えられた［2.6.2.6］．

したがって，これら反復投与毒性試験で認められた血清 Ca の低値及び血清 P の高値は，いずれもエテルカルセチドの薬理作用に基づく血漿 PTH の低下に起因した変動と考えられた．

表 2.6.6.9-1 ラット 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験の血清 Ca 及び血漿中エテルカルセチド濃度

性別		雄			雌		
投与量（mg/kg）		0.3	1	3	0.3	1	3
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日　投与後 8 時間	-5	-13	-26	-3	-8	-25
	投与 170 日 投与後 8 時間	-7	-10	-25	-5	-9	-19
	4 週休薬後	-	-	-2	-	-	-2
血漿中エテルカルセチド C5min（ng/mL）	投与 1 日	386	1380	3050	425	1280	4470
	投与 182 日	823	2840	7440	714	2240	6240

a：対照群に対する変化率
-：評価対象なし.

表 2.6.6.9-2 イヌ 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験の血清 Ca 及び血漿中エテルカルセチド濃度

性別			雄			雌		
投与量（mg/kg）			0.2	0.5	0.9	0.2	0.5	0.9
血清 Ca 変化率（%）[a]	投与 1 日	投与後 4 時間	-5	-11	-12	-9	-9	-17
		投与後 8 時間	-8	-18	-22	-13	-17	-25
		投与後 12 時間	-10	-24	-27	-14	-21	-29
		投与後 24 時間	-9	-14	-21	-9	-16	-25
	投与 169 日	投与前	-5	-5	-9	-3	-6	-7
		投与後 4 時間	-9	-16	-19	-9	-13	-20
		投与後 8 時間	-12	-20	-26	-16	-19	-28
		投与後 12 時間	-12	-23	-30	-14	-20	-28
		投与後 24 時間	-9	-15	-21	-8	-12	-19
	4 週休薬後		-	-	-2	-	-	-3
血漿中エテルカルセチド C5min（ng/mL）	投与 1 日		480	1240	2030	458	1180	2300
	投与 181 日		529	1400	1830	430	1060	2100

a：対照群に対する変化率
-：評価対象なし.

振戦及び痙攣

ラットの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 3 mg/kg，イヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 0.9 mg/kg で振戦が認められ，ラットの 3 mg/kg の雄 1 例では痙攣による切迫剖検例も認められた．

いずれの試験においても，病理組織学的検査で中枢及び末梢神経系に異常は認められなかった．血清 Ca の低下は末梢神経の発火の閾値を低下させ，骨格筋の攣縮を引き起こすことが知られており [15]，振戦及び痙攣が認められた投与量では対照群と比較して血清 Ca が 25%以上低値であった．また，安全性薬理試験では，イヌにおいて血清 Ca の低下に伴って振戦が認められており，Ca 補充による症状の消失も確認されている［2.6.2.4.1］．したがって，反復投与毒性試験で認められた振戦及び痙攣は，本薬の薬理作用に基づく血清 Ca の低下に起因した変化と考えられた．

嘔吐

イヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では，0.5 mg/kg 以上で嘔吐が認められた．嘔吐は，投与期間を通して断続的に認められ，その発現頻度は投与量に応じて増加した．嘔吐の発現機序としては，エテルカルセチドは静脈内急速投与される薬剤であることから粘膜への直接刺激によるものではなく，血清 Ca の低下に伴う可能性 [16] 又は種々の消化管機能を制御する CaSR[17] に直接作用して生じている可能性が考えられた．エテルカルセチドは消化管に直接曝露されないことから，嘔吐は，本薬の消化管に存在する CaSR への直接作用よりも，本薬の薬理作用に伴う血清 Ca の低下との関連性が高いと考えられた．

摂餌量及び体重への影響

ラットの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 3 mg/kg，イヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 0.5 mg/kg 以上で摂餌量の減少又は食欲不振が認められ，投与期間終了時には対照群と比較してラットで 14～33%，イヌで 41～50%の体重増加抑制が認められた．

ラットでは，摂餌量の減少及び体重増加抑制が投与期間を通して継続的に認められた．一方，イヌでは，摂餌量の減少，食欲不振やこれに伴う体重増加抑制は主に投与初期に認められたが，反復投与の継続中に摂餌量は回復傾向を示し，投与期間の後半には対照群と概ね同様の体重推移となった．ラット及びイヌで明らかな体重増加抑制が認められた投与量では，対照群と比較して 25%以上の血清 Ca の低値を示し，血清 Ca の低下は生体に対するストレスであること [18]，同種同効薬であるシナカルセト塩酸塩でも血清 Ca の低下に応じた摂餌量の減少に伴う体重増加抑制が認められていること [19] から，ラット及びイヌで認められた体重増加抑制は，本薬の薬理作用に基づく血清 Ca の低下に起因した変化と考えられた．なお，

ラットの 1 mg/kg でも体重増加抑制が認められたが，明らかな摂餌量の減少は伴わない 10%程度の軽微な変動であり，薬理作用に基づく二次的な変化であったことから，毒性と判断しなかった．

QTc の延長

イヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では，投与 2 日及び投与 177 日の心電図検査において 0.5 mg/kg 以上で投与前値と比較して最大 14%の QTc の延長が認められた（表 2.6.6.9-3，表 2.6.6.9-4）．QTc は投与量に応じて延長したが，投与期間の延長による増悪は認められず，4 週間の休薬により回復した．また，病理組織学的検査で心臓に異常は認められなかった．QTc の延長は，イヌにエテルカルセチドを単回静脈内急速投与した安全性薬理試験においても認められており，血清 Ca の低下に伴い QTc が延長し，血清 Ca の回復により QTc の延長も回復したことから［2.6.2.4.2.2］，血清 Ca の低下に伴う二次的変化と考えられた．また，QTc の延長が認められたイヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験の 0.5 mg/kg における C5min は 1.1～1.4 μg/mL（非蛋白結合濃度：0.74～0.94 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）を十分に下回っていることから［2.6.2.4.2.1］，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．

以上のことから，エテルカルセチドの QTc の延長は血清 Ca の低下による二次的変化と判断した．

表 2.6.6.9-3　イヌ 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験の心電図検査における QTca（実測値）

性別	雄（ms）				雌（ms）			
投与量（mg/kg）	**0**	**0.2**	**0.5**	**0.9**	**0**	**0.2**	**0.5**	**0.9**
投与前	230	222	221	210	217	232	212	221
投与 2 日	225	223	233	226	215	229	231	241*
投与 177 日	229	227	243	239	221	240	235	247
4 週休薬後	218	-	-	203	214	-	-	215

*p≤0.05：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定
-：評価対象なし．

表 2.6.6.9-4　イヌ 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験の心電図検査における QTca（変化率 [a]）

性別	雄（%）				雌（%）			
投与量（mg/kg）	**0**	**0.2**	**0.5**	**0.9**	**0**	**0.2**	**0.5**	**0.9**
投与 2 日	-2	0	5	8	-1	-1	9	9
投与 177 日	0	2	10	14	2	3	11	12
4 週休薬後	-5	-	-	-3	-1	-	-	-3

a：投与前値に対する変化率
-：評価対象なし.

副甲状腺に対する影響

ラットの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では，1 mg/kg 以上で副甲状腺の主細胞に活性化を示唆する好酸性化が認められた．副甲状腺の主細胞は PTH を産生し，PTH は血清 Ca を増加させる作用を有するため，本薬の薬理作用に基づく PTH の分泌抑制作用に伴う過度な血清 Ca の低下が長期間持続したことにより，PTH を産生する主細胞が二次的に活性化された可能性が考えられた．本変化は，血清 Ca の低下に伴う適応性の変化と考えられたが，血清 Ca は 6 カ月反復投与後も持続的に低値であったことから，PTH の産生は抑制されていたと考えられた.

尿細管上皮における褐色色素の沈着

ラットの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 0.3 mg/kg 以上，イヌの 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 0.2 mg/kg 以上で腎臓の尿細管上皮において褐色色素の沈着が認められた．エテルカルセチドは分子量 1000 程度の化学合成ペプチドであり，主に腎臓から尿中に排泄されるため［2.6.4.6.1］，糸球体でろ過されたエテルカルセチド及びその生体内変換物質（SAPC を除く）は，生体内の低分子量蛋白と同様に，尿細管で能動的に再吸収されると考えられる．尿中排泄される薬物では，適応性変化として近位尿細管上皮に色素沈着が認められるものが知られており，沈着が長期にわたっても上皮細胞の壊死や腎機能への影響などが認められず，回復性が確認されれば毒性を示唆する変化ではないとされている [20]．本薬を投与したいずれの反復投与毒性試験及びラットの一生涯に相当する 2 年間のがん原性試験においても褐色色素沈着に伴う腎機能への影響を示唆する変化や尿細管の傷害を示唆する変化は認められなかったこと，また反復投与毒性試験において回復性が確認されたことから，尿細管上皮における褐色色素の沈着は毒性学的意義のない変化と判断した.

その他の影響

ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では，血清 Ca の低値や体重増加抑制が顕著に認められた 3 mg/kg で好中球数の高値，リンパ球数，グロブリン及び脾臓重量の低値

並びに胃粘膜のびらんが認められた．これらの変化はいずれも慢性的なストレスに関連して生じることが報告されており[21]，顕著な血清 Ca の低下や体重増加抑制に伴うストレスに関連した変化と考えられた．

また，ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では，3 mg/kg の雄でアルブミンの高値並びに血清 K の低値が認められた．本投与量の雄では血液学的検査で RBC，Hb 及び Ht がわずかに高値を示した．本薬の血清 Ca の低下には，PTH の分泌抑制を介した腎での Ca 再吸収の抑制が寄与しているが，CaSR 又は PTH は腎での尿濃縮に一部寄与する可能性があり[22]，ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 3 カ月間／6 カ月間反復静脈内投与毒性試験では 3 mg/kg で尿量の高値や尿比重の低値が認められた．したがって，血清 K の低値あるいはアルブミンや RBC，Hb 及び Ht の高値は，尿濃縮能の低下あるいはこれに伴う脱水が影響した可能性が考えられた．

反復投与毒性試験と臨床の用法・用量におけるエテルカルセチドの曝露について

ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験，イヌにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験における定常状態の血漿中エテルカルセチドの AUC 並びにヒトの AUC を表 2.6.6.9-5 に示した．ラットと比較してイヌでは低い投与量より毒性発現が認められ，無毒性量は，ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験で 1 mg/kg，イヌにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験で 0.2 mg/kg であった．ラット及びイヌの反復投与毒性試験の無毒性量におけるエテルカルセチドの AUC はそれぞれ 6120～7660 及び 529～614 ng·h/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 AUC（約 11.6 μg·h/mL）との安全域はいずれの動物種でも 1 倍未満であった．PTH は腎での Ca 排泄に関与しており，CaSR 作動薬は PTH 低下作用を介して腎での Ca 排泄を亢進させることから[13]，腎機能の低下・喪失した SHPT 患者と比較して，正常動物では CaSR 作動薬による血清 Ca の低下が生じやすい可能性が考えられた．ラット及びイヌで認められた毒性変化はいずれもエテルカルセチドの薬理作用に基づく血清 Ca の低下による直接的あるいは二次的な影響であり，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．

表 2.6.6.9-5 反復投与毒性試験と臨床の用法・用量における血漿中エテルカルセチド曝露の比較

種	投与量	性	Cmax [e] (ng/mL)	AUC (ng·h/mL)	Cmax 比 (動物／ヒト)	AUC 比 (動物／ヒト)
ヒト [a]	15 mg/person	-	1068	11580	-	-
ラット [b]	0.3 mg/kg	雄	823	2140	0.77	0.18
		雌	714	1828	0.67	0.16
	1 mg/kg [d]	雄	2840	7660	2.66	0.66
		雌	2240	6120	2.10	0.53
	3 mg/kg	雄	7440	19940	6.97	1.72
		雌	6240	17260	5.84	1.49
イヌ [c]	0.2 mg/kg [d]	雄	529	614	0.50	0.05
		雌	430	529	0.40	0.05
	0.5 mg/kg	雄	1400	1590	1.31	0.14
		雌	1060	1390	0.99	0.12
	0.9 mg/kg	雄	1830	2160	1.71	0.19
		雌	2100	2670	1.97	0.23

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 及び AUC に基づく推定値［表 2.7.2.2-4］
b：ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験（1 日 1 回投与）における投与 182 日の C5min 及び AUC［2.6.7.7A］．なお，本試験は 1 日 1 回投与のため，ヒト AUC（2 日間における AUC）との比較のため，AUC は 2 倍した計算値
c：イヌにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験（2 日に 1 回投与）における投与 181 日の C5min 及び AUC［2.6.7.7B］
d：無毒性量
e：ラット及びイヌでは C5min

3）遺伝毒性

エテルカルセチドの遺伝毒性について，*Salmonella typhimurium*（TA98，TA100，TA1535，TA1537）及び *Escherichia coli*（WP2*uvrA*）を用いた Ames 試験で遺伝子突然変異誘発性を評価した結果，*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535 の 2 菌株で陽性反応が認められた．一方，チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K_1 細胞を用いた HPRT 試験及び Muta マウスを用いた遺伝子突然変異試験でほ乳類細胞における遺伝子突然変異誘発性を評価した結果，いずれも陰性であった．また，ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及び *in vivo* ラット小核試験の結果はいずれも陰性であった．

エテルカルセチドの TA100 及び TA1535 に対する Ames 陽性反応は，treat and plate 法によりエテルカルセチドを除去して菌株を培地に播種した場合にも認められたことから，エテルカルセチドに由来するアミノ酸がこれら菌株のヒスチジン要求性を満たしたことによる偽陽性ではないと考えられた．また，不純物含量の少ないエテルカルセチドの原薬を用いた Ames 試験でも，同様の陽性反応が認められたことから，不純物による陽性反応ではないと考えられた．

エテルカルセチドは分子内に SH 基を有しており，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 を用いた Ames 試験で陽性反応を示すことが報告されている [4) ~9)]．TA1535 でも同様に，SH 基を含有するアミノ酸あるいはペプチドが Ames 陽性反応を示す可能性が考えられたため，エテルカルセチドから SH 基（D-Cys 又は L-Cys）を脱離させたペプチドの Ames 試験を TA1535 で実施した．その結果，エテルカルセチドから SH 基を有する L-Cys を脱離させ，ジスルフィド結合を還元することで，エテルカルセチドの Ames 陽性反応は減弱した．また，エテルカルセチドから L-Cys 及び D-Cys を脱離させ，エテルカルセチド分子内の SH 基を完全に欠損させると，Ames 陽性反応が消失した．したがって，エテルカルセチド分子内の SH 基及び L-Cys と D-Cys の間で形成されるジスルフィド結合が，エテルカルセチドの Ames 陽性反応に寄与すると考えられた．

分子内に SH 基を有するペプチドの TA100 に対する Ames 陽性反応には，SH 基を介した過酸化水素やフリーラジカルなどの活性酸素種の生成が関与しており，フリーラジカルスカベンジャーやカタラーゼなどにより活性酸素種の発生を抑制することで，これらペプチドの Ames 陽性反応が抑制されることが報告されている [10) 11)]．TA1535 でも同様に活性酸素種の生成に起因して Ames 陽性反応を示す可能性が考えられたため，活性酸素種を生成する酸化剤の Ames 試験を TA1535 で実施した．その結果，酸化剤であるグリオキサールは TA1535 で Ames 陽性反応を示し，SOD やカタラーゼなどの抗酸化剤により Ames 陽性反応が抑制されたことから，TA1535 でも特定の酸化剤の添加条件下において活性酸素種の生成による Ames 陽性反応が誘発されると考えられた．したがって，エテルカルセチドは，その分子内の SH 基あるいはジスルフィド結合を介して活性酸素種を生成することにより，TA1535 に対する Ames 陽性反応を示した可能性が考えられた．

エテルカルセチドは，*Salmonella typhimurium* に対する遺伝子突然変異誘発性を示したが，ほ乳類細胞を用いた HPRT 試験で遺伝子突然変異誘発性を示さなかった．グリオキサールや過酸化水素などの酸化剤は，*Salmonella typhimurium* を用いた Ames 試験だけでなく，ほ乳類細胞を用いた HPRT 試験でも遺伝子突然変異を誘発することが報告されているが [23) ~25)]，L-Cys，グルタチオン，N-アセチルシステインやシステイニルグリシンなどの SH 基を有するアミノ酸及びペプチドは，いずれも生体内物質であり，ヒトに対する遺伝毒性リスクがなく，発がん性を示す懸念はないと考えられる．したがって，これらのアミノ酸及びペプチドの TA100 に対する Ames 陽性反応は *Salmonella typhimurium* に特有であると考えられた．エテルカルセチドは化学合成ペプチドであり，受動的な細胞膜透過速度が非常に遅い［2.6.4.3.1］ことから，ほ乳類細胞の細胞膜を通過し，核内の DNA へ接近して直接相互作用することは考えにくい．一方で，Ames 試験に用いられる *Salmonella typhimurium* は膜変異を有しており，通常は細胞内に入りにくい大きな分子量をもつ分子も透過しやすいことから，

Salmonella typhimurium において，ほ乳類動物に外挿されない遺伝子突然変異が誘発された可能性が考えられた．

以上より，エテルカルセチドは，Ames 試験において一部の菌株で陽性反応を示し，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．分子内に SH 基を有するアミノ酸及びペプチドは，同様の Ames 陽性反応を示すことが報告されており，これらはヒトでの発がん性の懸念を示すものではないと考えられる．エテルカルセチドは，ほ乳類細胞を用いた HPRT 試験及び Muta マウスを用いた遺伝子突然変異試験で遺伝子突然変異を誘発せず，ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験の結果も陰性であったことから，ヒトにおいて遺伝毒性を示さないと判断した．

4）がん原性

Tg.rasH2 マウスを用いた 26 週間のがん原性試験及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験を 1 日 1 回の皮下投与により実施した．マウス及びラットともに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．

マウス及びラットのがん原性試験の最高投与量における AUC（臨床試験の投与間隔を考慮して AUC を 2 倍した計算値）はそれぞれ 2080～3400 及び 3800～4300 ng･h/mL であり，エテルカルセチドの臨床最大用量（15 mg/person）での定常状態における推定 AUC（約 11.6 μg･h/mL）との安全域はマウス及びラットともに 1 倍未満であった（表 2.6.6.9-6）．また，ラット及びイヌでは 6 カ月間まで反復静脈内投与した試験において増殖性病変は認められず，臨床最大用量での定常状態における推定 AUC との安全域はラットで 1.72 倍，イヌでは 1 倍未満であった（表 2.6.6.9-5）．これらの試験で認められたエテルカルセチドの毒性変化は，いずれも本薬の薬理作用に基づく血清 Ca の低下により生じたと考えられる変化であった．いずれの試験においても十分な血清 Ca の低下が生じる投与量まで評価したことから，本薬の薬理作用に伴うがん原性リスクについては十分に評価されたと考えられた．

エテルカルセチドは化学合成ペプチドであることから，CaSR を介した薬理作用以外に発がん性を示す可能性は低いと考えられる．CaSR は消化管，乳腺，副甲状腺及び下垂体の上皮の分化や増殖に関与することが報告されており，CaSR 作動薬は副甲状腺ホルモン関連蛋白（PTHrP）の分泌に影響を与えることが報告されていることから，消化管，乳腺，副甲状腺及び下垂体での発がん性並びに PTHrP を介した腫瘍の骨転移の可能性について，以下に考察した．

消化管

消化管については，CaSR 遺伝子欠損マウスで消化管上皮の過形成が認められたこと[26]，結腸がん患者に Ca を添加した食事を与えることによりがんの進展が抑制されたこと[27][28]，遺伝子変異により CaSR が機能亢進したヒトにおいて結腸がんの増加は認められなかったこと[29][30]から，CaSR の活性化は消化管での発がんリスクとはならないと考えられた．

乳腺

乳腺については，発がんモデルマウスに Ca を添加した餌を与えることにより増殖性病変が抑制されたこと[31][32]，閉経後の女性に高濃度の Ca を含む食事を与えることにより乳がんの発生率が抑制されたこと[33]，遺伝子変異により CaSR が機能亢進したヒトにおいて乳がんの発生率の増加は認められなかったことから[29][30]，CaSR の活性化は乳腺での発がんリスクとはならないと考えられた．

副甲状腺

副甲状腺については，慢性腎障害モデルである 5/6 腎摘ラットでエテルカルセチドは副甲状腺の過形成を抑制したこと［2.6.2.2.2.6］，CaSR 遺伝子欠損マウス[34]及び遺伝子変異により CaSR の機能低下したヒトにおいて副甲状腺の過形成が認められたこと[35]~[38]，副甲状腺機能亢進症患者において CaSR の発現低下が副甲状腺の増殖性病変を誘発したこと[39]~[41]，遺伝子変異により CaSR が機能亢進したヒトにおいて副甲状腺のがんの発生率の増加は認められなかったこと[29][30]から，CaSR の活性化は副甲状腺での発がんリスクとはならないと考えられた．

下垂体

下垂体については，CaSR の活性化により下垂体細胞からの GH の分泌亢進が生じることが報告されており[42]，下垂体腫瘍が増悪する可能性が懸念される．しかし，エテルカルセチドの下垂体への分布は限られていたこと［2.6.4.4.1.1］，同種同効薬であるシナカルセト塩酸塩は，本薬より高い下垂体への分布を示したが，がん原性試験で投与に起因する下垂体腫瘍の増悪は認められなかったこと[19]，遺伝子変異により CaSR が機能亢進したヒトにおいて下垂体腫瘍の発生率の増加は認められなかったこと[29][30]から，エテルカルセチドが下垂体腫瘍を増悪するリスクは低いと考えられた．

PTHrP を介した腫瘍の骨転移

腫瘍細胞の骨転移と関連することが知られている PTHrP[43) ~45)] は，CaSR 作動薬又は血中 Ca によって分泌に影響を受けることが報告されており，CaSR の活性化が PTHrP の産生を亢進する場合には腫瘍の骨転移を誘発する可能性が考えられる．しかし，同種同効薬であるシナカルセト塩酸塩は担がんマウスの PTHrP の分泌を抑制したこと[46)]，高濃度の Ca を含む餌をマウスに与えると乳汁中の PTHrP が低下したこと[47)]，同種同効薬である NPS-R467 は授乳中のために Ca が不足したマウスの PTHrP を低下させたこと[48) 49)]，低 Ca の餌を与えたマウス[49)] 又は CaSR の遺伝子変異マウス[48) 50)] では PTHrP の発現が増加したことから，CaSR の活性化は PTHrP を低下させると考えられ，エテルカルセチドが PTHrP に関連して骨転移を誘発するリスクは低いと考えられた．

以上，マウス及びラットを用いたがん原性試験を含む毒性試験において，エテルカルセチドの投与に起因した腫瘍性病変は認められず，エテルカルセチドは発がん性を示さなかった．また，本薬の薬理作用や同種同効薬の情報からもエテルカルセチドの発がんリスクは示唆されなかった．

表 2.6.6.9-6　がん原性試験と臨床の用法・用量における血漿中エテルカルセチド曝露の比較

種	投与量	性	AUC (ng·h/mL)	AUC 比 (動物／ヒト)
ヒト[a]	15 mg/person	-	11580	-
マウス[b]	0.375 mg/kg	雄	464	0.04
	0.3 mg/kg	雌	310	0.03
	0.75 mg/kg	雄	1250	0.11
	1 mg/kg	雌	1056	0.09
	1.5 mg/kg[d]	雄	2080	0.18
	3 mg/kg[d]	雌	3400	0.29
ラット[c]	0.2 mg/kg	雄	482	0.04
		雌	428	0.04
	0.4 mg/kg	雄	1074	0.09
		雌	1084	0.09
	0.8 mg/kg	雄	1924	0.17
		雌	1544	0.13
	1.6 mg/kg[d]	雄	4300	0.37
		雌	3800	0.33

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 AUC に基づく推定値［表 2.7.2.2-4］
b：マウスのがん原性試験における投与 177 日の AUC［2.6.7.10.2A］．なお，本試験は 1 日 1 回投与のため，ヒト AUC（2 日間における AUC）との比較のため，AUC は 2 倍した計算値
c：ラットのがん原性試験における投与 183 日の AUC［2.6.7.10.2B］．なお，本試験は 1 日 1 回投与のため，ヒト AUC（2 日間における AUC）との比較のため，AUC は 2 倍した計算値
d：発がん性が認められなかった最高投与量

5）生殖発生毒性

エテルカルセチドの生殖発生毒性試験ではラット又はウサギを用いて，受胎能，胚・胎児発生，出生前及び出生後の発生並びに母体機能への影響を評価した．

ラットを用いて受胎能及び初期胚発生に対する影響を評価した結果，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，最高投与量とした 3 mg/kg の雌で性周期の延長が認められた．性周期の延長は，ストレスによって性ホルモンが変動し卵巣機能に影響することが知られていることから[21]，血清 Ca の低下によるストレスに関連する変化と考えられた．しかし，交尾率，受胎率，交配所要日数などに影響は認められなかったことから，毒性学的意義のない変化と判断した．

ラット及びウサギを用いて胚・胎児発生に対する影響を評価した結果，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，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は認められなかった．また，これらの用量設定試験では，ラットの 4.5 mg/kg，ウサギの 2.25 mg/kg 以上で顕著な血清 Ca の低下が

認められ，母動物の死亡及び流産や胎児体重の低値が認められたが，催奇形性は認められなかった．これらの母動物及び胎児に対する影響は，本薬の薬理作用に基づき，母動物において血清 Ca が過剰に低下したことに起因すると考えられた．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．

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を評価した結果，1.5 mg/kg 以上で妊娠期間の延長及び授乳期間中の出生児に体重増加抑制が認められ，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．妊娠期間の延長については，血清 Ca の低下による子宮平滑筋の収縮の減弱が原因と推察された[3)]．また，生産児数及び出生児生存率の低値，出生児の体重増加抑制については，エテルカルセチドは胎児血漿から母動物の血漿中濃度の 3%程度認められており［2.6.4.4.4］，授乳期ラットへの投与により乳汁中への移行性も確認されている［2.6.4.6.2］が，エテルカルセチドの膜透過性は低いことから［2.6.4.3.1］，乳汁中に移行したエテルカルセチドが経口吸収されて出生児に影響を与える可能性は低いと考えられる．したがって，これら出生児への影響は，母動物の栄養状態の悪化に伴う二次的なものと判断した．

以上，エテルカルセチドの臨床最大用量（15 mg/person）の曝露量と比較してラットで 1.5 倍，ウサギで 3.6 倍まで曝露した結果，血清 Ca の低下による妊娠期間の延長及び母動物への影響に伴う出生児の生存及び発育への影響が認められたが，受胎能，胚・胎児発生，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（表 2.6.6.9-7）．

表 2.6.6.9-7　生殖発生毒性試験と臨床の用法・用量における血漿中エテルカルセチド曝露の比較

種	投与量	AUC (ng·h/mL)	AUC 比 (動物／ヒト)
ヒト[a]	15 mg/person	11580	-
ラット[b]	0.75 mg/kg[e]	4480	0.39
	1.5 mg/kg	8100	0.70
	3 mg/kg[d]	17280	1.49
ウサギ[c]	0.375 mg/kg	8140	0.70
	0.75 mg/kg	18020	1.56
	1.5 mg/kg[d]	41600	3.59

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 AUC に基づく推定値［表 2.7.2.2-4］
b：ラットの出生前後試験における妊娠 20 日の AUC［2.6.7.14A］．なお，本試験は 1 日 1 回投与のため，ヒト AUC（2 日間における AUC）との比較のため，AUC は 2 倍した計算値
c：ウサギの胚・胎児発生試験における妊娠 11 日の AUC［2.6.7.13A］．なお，本試験は 1 日 1 回投与のため，ヒト AUC（2 日間における AUC）との比較のため，AUC は 2 倍した計算値
d：受胎能又は胚・胎児発生に対する無毒性量
e：出生前及び出生後の発生並びに母体機能の影響に対する無毒性量

6）局所刺激性

エテルカルセチドのイヌの局所刺激性試験では最高投与液濃度の 5 mg/mL で投与部位への影響は認められなかった．したがって，エテルカルセチドが臨床で使用される投与液濃度範囲（1.25～5 mg/mL）で局所刺激性を示す可能性は低いと考えられた．

7）代謝物

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，分子内の L-Cys と生体内 SH 基含有物質が非酵素的にジスルフィド交換することで種々の生体内変換物質となり，主にアルブミンとの複合体である SAPC に変換される［2.6.4.5.3］．[^{14}C]エテルカルセチドを静脈内投与した慢性腎臓病患者の血漿中では総血漿中放射能濃度の約 73%が SAPC 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．ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験では SAPC の免疫原性を示唆する毒性変化や薬物動態学的な影響は認められず，臨床試験においても SAPC は免疫原性を示さなかった［2.7.2.4.1］．また，臨床での血漿中エテルカルセチド濃度は血中の還元型アルブミン濃度（約 400 μmol/L）[14] の 1/300 以下であったことから，SAPC 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．SAPC はエテルカルセチドの主活性部位である D-アミノ酸骨格を保持しているが，その 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］，本薬の薬理作用に基づく毒性変化を増強する可能性も低いと考えられた．以上のことから，SAPC に安全性の懸念はないと判断した．

なお，ラット反復投与毒性試験の最高投与量である 3 mg/kg を反復投与したときの血漿中 SAPC の AUC は，エテルカルセチドの初回臨床用量である 5 mg/person あるいは臨床最大用量である 15 mg/person を反復投与したときのヒトの血漿中 SAPC の AUC と比較していずれも 1 倍未満であった（表 2.6.6.9-8）．

表 2.6.6.9-8　ヒトとラットの血中 SAPC 濃度比較

種	用量	SAPC AUC (ng·h/mL)	SAPC 濃度比 (ラット／ヒト)
ラット	3 mg/kg	3739 [a]	-
ヒト	5 mg/person	5125 [b]	0.7
	15 mg/person	15374 [c]	0.2

a：ラットに[^{14}C]エテルカルセチド 2.5 mg/kg を単回静脈内急速投与したときの[^{14}C]エテルカルセチドの AUC（7419 ng·h/mL）及びエテルカルセチドに対する SAPC 比（0.42）から，ラットにおける 3 mg/kg 投与時の SAPC の AUC を比例計算により算出

b：非日本人 SHPT 患者に[^{14}C]エテルカルセチド 10 mg/person を単回静脈内急速投与したときの[^{14}C]エテルカルセチドの AUC（14040 ng·h/mL）及びエテルカルセチドに対する SAPC 比（0.73）から，ヒトにおける 5 mg/person 投与時の SAPC の AUC を比例計算により算出

c：非日本人 SHPT 患者に[^{14}C]エテルカルセチド 10 mg/person を単回静脈内急速投与したときの[^{14}C]エテルカルセチドの AUC（14040 ng·h/mL）及びエテルカルセチドに対する SAPC 比（0.73）から，ヒトにおける 15 mg/person 投与時の SAPC の AUC を比例計算により算出

8）不純物

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 及び ICH Q3B ガイドライン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　　，*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．

また，これら不純物の遺伝毒性については，①いずれの不純物も[redacted]こと，②ICH M7 ガイダンスに従い，ルールベースの(Q)SAR ツールである Derek Nexus（バージョン 3.0.1，Lhasa 社）及び統計ベースの(Q)SAR ツールである CASE Ultra T（バージョン 1.4.7.0，Multicase 社）を用いて *in silico* による変異原性予測を行った結果，[redacted]こと，③いずれの不純物も[redacted]こと，の 3 点より，遺伝毒性の懸念はないと判断し，これら不純物の遺伝毒性試験を実施しなかった．本件については，機構相談［1.13.2.1.2］においても了承を得ている．

また，エテルカルセチド塩酸塩の原料由来の不純物である　　*不純物A　　は，ICH Q3A 及び ICH Q3B ガイドラインの安全性確認の必要な閾値を超えないが，*in silico* による変異原性予測において警告構造を示したため，Ames 試験を実施した．その結果，陰性であったことから，遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断した．

表 2.6.6.9-9　不純物の曝露比較

不純物			ホモダイマー	脱アミド体	*不純物B	*不純物C と *不純物D の総量 [a]
申請規格（%）		原薬	[redacted]			
		製剤				
臨床最大用量：0.3 mg/kg（15 mg／50 kg）		規格上限における不純物曝露量（mg/kg）［A］				
ラット 6 カ月間反復投与毒性試験 無毒性量：1 mg/kg Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）				
		不純物曝露量（mg/kg）［B］				
		臨床最大用量に対する倍数［B÷A］	0.11	0.29	-	1.3
イヌ 6 カ月間反復投与毒性試験 無毒性量：0.2 mg/kg Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）	[redacted]			
		不純物曝露量（mg/kg）［B］				
		臨床最大用量に対する倍数［B÷A］	0.02	0.06	-	0.26
イヌ 3 カ月間／9 カ月間反復投与毒性試験 無毒性量：0.5 mg/kg	Lot No.：[redacted]（1-27 週に投与）	不純物含量（%）	[redacted]			
		不純物曝露量（mg/kg）［B］				
		臨床最大用量に対する倍数［B÷A］	0.54	0.21	-	-
	Lot No.：[redacted]（28-39 週に投与）	不純物含量（%）	[redacted]			
		不純物曝露量（mg/kg）［B］				
		臨床最大用量に対する倍数［B÷A］	0.09	0.19	-	1.02
不純物を含有する原薬のラット 4 週間反復投与毒性試験 無毒性量：1 mg/kg Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）	[redacted]			
		不純物曝露量（mg/kg）［B］				
		臨床最大用量に対する倍数［B÷A］	3.4	3.4	2.63	6
不純物を含有する液剤のイヌ 4 週間反復投与毒性試験 無毒性量：0.4 mg/kg Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）	[redacted]			
		不純物曝露量（mg/kg）［B］				
		臨床最大用量に対する倍数［B÷A］	1.3	1.15	0.973	-
In vitro Ames 試験 Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）	[redacted]			
In vitro 染色体異常試験 Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）				
In vitro ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT 試験） Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）				
In vivo ラット小核試験 Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）				
In vivo Muta マウスを用いた遺伝子突然変異試験 Lot No.：[redacted]		不純物含量（%）				
In silico による構造アラート評価						
Derek			陰性	陰性	陰性	陰性
Case Ultra T			陰性	アラートあり [b]	アラートあり [b]	未実施

-：0.1%以下，又は未検出
a：本測定条件では，*不純物C と *不純物D のピークが重なり分離できないため，総量として管理する．
b：[redacted]

*新薬承認情報提供時に置換えた

9）結論

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 PTH の分泌抑制作用に基づく，投与量に応じた血清 Ca の低下が認められ，いずれの毒性も血清 Ca の低下による直接的あるいは二次的な影響であった．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．これらの毒性はいずれも可逆的であり，長期投与により増悪せず，毒性プロファイルに明らかな雌雄差や動物種間の違いも認められなかった．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（15 mg/person）における曝露量を下回ったが，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，臨床で使用される投与液濃度範囲（1.25～5 mg/mL）では，安全に使用することが可能と考える．更に，種々の遺伝毒性試験及びがん原性試験の結果並びに同種同効薬の情報を含む薬理作用に基づく考察から，ヒトにおいて遺伝毒性や発がん性の懸念はないと判断した．

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．

以上の非臨床成績から，エテルカルセチド塩酸塩は，臨床において血清 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．

2.6.6.10 図表

図表は本文中に記載した．

2.6.6.11 参考文献

1) Holzgrefe H, Ferber G, Champeroux P, Gill M, Honda M, Greiter-Wilke A, et al. Preclinical QT safety assessment: Cross-species comparisons and human translation from an industry consortium. J Pharmacol Toxicol Methods. 2014;69:61-101.

2) Thompson C, Morley P, Kirkland D, Proudlock R. Modified bacterial mutation test procedures for evaluation of peptides and amino acid-containing material. Mutagenesis. 2005;20:345-50.

3) Al-Eknah MM, Homeida AM, Dafalla EA, Galil AK, al-Tahir AY. Uterine Activity after Induction of Hypocalcaemia in the Ovariectomized Camel (Camelus Dromedarius). Vet Res Commun. 1997;21:45-50.

4) Glatt H, Protic-Sablji CM, Oesch F. Mutagenicity of glutathione and cysteine in the Ames test. Science. 1983;220:961-3.

5) Glatt H. Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. Mutagenesis. 1989;4:221-7.

6) Glatt H, Oesch F. Mutagenicity of Cysteine and Penicillamine and Its Enantiomeric Selectivity. Biochem Pharmacol. 1985;34:3725-8.

7) 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.

8) Ross D, Moldeus P, Sies H, Smith MT. Mechanism and relevance of glutathione mutagenicity. Mutat Res. 1986;175:127-31.

9) Yamaguchi T, Yamashita Y. Activating Effect of Several Enzyme-Proteins on the Mutagenicity of Amino-thiol Compounds. Agric Biol Chem. 1981;45:2157-60.

10) 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.

11) 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.

12) Ueno H, Nakamuro K, Sayato Y, Okada S. Characteristics of mutagenesis by glyoxal in Salmonella typhimurium: contribution of singlet oxygen. Mutat Res. 1991;251:99-107.

13) 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.

14) Soejima A, Matsuzawa N, Hayashi T, Kimura R, Ootsuka T, Fukuoka K, et al. Alteration of Redox State of Human Serum Albumin before and after Hemodialysis. Blood Purif.

2004;22:525-9.

15) Armstrong CM, Cota G. Calcium block of Na+ channels and its effect on closing rate. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:4154-7.

16) Silverstein D, Campbell J. Chapter 5 Fluid Therapy. Carcium. Hypocalcemia. In: Tobias KM, Jhonston SA, editors. Veterinary surgery: small animal. St. Louis: Elsevier Saunders; 2012;58-9.

17) Hebert SC, Cheng S, Geibel J. Functions and roles of the extracellular Ca^{2+}-sensing receptor in the gastrointestinal tract. Cell Calcium. 2004;35:239-47.

18) 稲葉雅章, 西沢良記. カルシウム・リン代謝異常症：診断と治療の進歩 II. 低カルシウム血症 2. 特発性副甲状腺機能低下症. 日本内科学会雑誌. 2007;96:696-701.

19) レグパラ錠 25mg, 同錠 75mg 申請資料概要 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 毒性試験.

20) 毒性病理組織学 8 章 腎臓. 日本毒性病理学会; 2000:247-66.

21) Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting Stress Responses during Routine Toxicity Studies:A Review of the Biology, Impact, and Assessment. Toxicol Pathol. 2013;41:560-614.

22) 谷口正智, Calcimimetics の副作用とさまざまな臓器への効果. Clinical Calcium. 2008:18:45-50.

23) Tsutsui T, Hayashi N, Maizumi H, Huff J, Barrett JC. Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. Mutat Res. 1997;373:113-23.

24) Wangenheim J, Bolcsfoldi G. Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. Mutagenesis. 1988;3:193-205.

25) Ziegler-Skylakakis K, Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res. 1987;192:65-7.

26) Rey O, Chang W, Bikle D, Rozengurt N, Young SH, Rozengurt E. Negative Cross-talk between Calcium-sensing Receptor and beta-Catenin Signaling Systems in Colonic Epithelium. J Biol Chem. 2012;287:1158-67.

27) Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of Colon Cancer by Calcium, Vitamin D and Folate: Molecular Mechanisms. Nat Rev Cancer. 2003;3:601-14.

28) Sellers TA, Bazyk AE, Bostick RM, Kushi LH, Olson JE, Anderson KE, et al. Diet and risk of colon cancer in a large prospective study of older women: an analysis stratified on family history (Iowa, United States). Cancer Causes Control. 1998;9:357-67.

29) Hannan FM, Thakker RV. Calcium-sensing receptor (CaSR) mutations and disorders of calcium, electrolyte and water metabolism. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013;27:359-71.

30) Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE. Mutations of the Calcium-Sensing Receptor (CASR) in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia, Neonatal Severe Hyperparathyroidism, and Autosomal Dominant Hypocalcemia. Hum Mutat. 2000;16:281-96.

31) Jacobson EA, James KA, Newmark HL, Carroll KK. Effects of Dietary Fat, Calcium, and Vitamin D on Growth and Mammary Tumorigenesis Induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in Female Sprague-Dawley Rats. Cancer Res. 1989;49:6300-3.

32) Xue L, Lipkin M, Newmark H, Wang J. Influence of Dietary Calcium and Vitamin D on Diet-Induced Epithelial Cell Hyperproliferation in Mice. J Natl Cancer Inst. 1999;91:176-81.

33) McCullough ML, Rodriguez C, Diver WR, Feigelson HS, Stevens VL, Thun MJ, et al. Dairy, Calcium, and Vitamin D Intake and Postmenopausal Breast Cancer Risk in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:2898-904.

34) Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB, et al. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Nat Genet. 1995;11:389-94.

35) Doria AS, Huang C, Makitie O, Thorner P, Kooh SW, Sochett E, et al. Neonatal, severe primary hyperparathyroidism: a 7 year clinical and radiological follow-up of one patient. Pediatr Radiol. 2002;32:684-9.

36) Marx SJ, Attie MF, Spiegel AM, Levine MA, Lasker RD, Fox M. An Association between Neonatal Severe Primary Hyperparathyroidism and Familial Hypocalciuric Hypercalcemia in Three Kindreds. N Engl J Med. 1982;306:257-64.

37) Marx SJ, Fraser D, Rapoport A. Familial Hypocalciuric Hypercalcemia. Mild Expression of the Gene in Heterozygotes and Severe Expression in Homozygotes. Am J Med. 1985;78:15-22.

38) Marx SJ, Lasker RD, Brown EM, Fitzpatrick LA, Sweezey NB, Goldbloom RB, et al. Secretory Dysfunction in Parathyroid Cells from a Neonate with Severe Primary Hyperparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 1986;62:445-9.

39) Haven CJ, van Puijenbroek M, Karperien M, Fleuren GJ, Morreau H. Differential expression of the calcium sensing receptor and combined loss of chromosomes 1q and 11q in parathyroid carcinoma. J Pathol. 2004;202:86-94.

40) Kifor O, Moore FD, Jr., Wang P, Goldstein M, Vassilev P, Kifor I, et al. Reduced Immunostaining for the Extracellular Ca^{2+}-Sensing Receptor in Primary and Uremic Secondary Hyperparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:1598-606.

41) Martín-Salvago M, Villar-Rodríguez JL, Palma-Álvarez A, Beato-Moreno A, Galera Davidson H. Decreased Expression of Calcium Receptor in Parathyroid Tissue in Patients with Hyperparathyroidism Secondary to Chronic Renal Failure. Endocr Pathol. 2003;14:61-70.

42) Romoli R, Lania A, Mantovani G, Corbetta S, Persani L, Spada A. Expression of Calcium-Sensing Receptor and Characterization of Intracellular Signaling in Human Pituitary Adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:2848-53.

43) Akhtari M, Mansuri J, Newman KA, Guise TM, Seth P. Biology of breast cancer bone metastasis. Cancer Biol Ther. 2008;7:3-9.

44) Bundred NJ, Ratcliffe WA, Walker RA, Coley S, Morrison JM, Ratcliffe JG. Parathyroid hormone related protein and hypercalcaemia in breast cancer. BMJ. 1991;303:1506-9.

45) Bundred NJ, Walker RA, Ratcliffe WA, Warwick J, Morrison JM, Ratcliffe JG. Parathyroid Hormone Related Protein and Skeletal Morbidity in Breast Cancer. Eur J Cancer. 1992;28:690-2.

46) Colloton M, Shatzen E, Wiemann B, Starnes C, Scully S, Henley C, et al. Cinacalcet attenuates hypercalcemia observed in mice bearing either Rice H-500 Leydig cell or C26-DCT colon tumors. Eur J Pharmacol. 2013;712:8-15.

47) Cao G, Gu Z, Ren Y, Shu L, Tao C, Karaplis A, et al. Parathyroid Hormone Contributes to Regulating Milk Calcium Content and Modulates Neonatal Bone Formation Cooperatively with Calcium. Endocrinology. 2009;150:561-9.

48) Ardeshirpour L, Dann P, Pollak M, Wysolmerski J, VanHouten J. The calcium-sensing receptor regulates PTHrP production and calcium transport in the lactating mammary gland. Bone. 2006;38:787-93.

49) VanHouten J, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho K, Neville M, et al. The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. J Clin Invest. 2004;113:598-608.

50) Mamillapalli R, VanHouten J, Dann P, Bikle D, Chang W, Brown E, et al. Mammary-Specific Ablation of the Calcium Sensing Receptor During Lactation Alters Maternal Calcium Metabolism, Milk Calcium Transport, and Neonatal Calcium Accrual. Endocrinology. 2013;154:3031-42.

2.6.7 毒性試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.7 毒性試験の概要表 3
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 8
2.6.7.5 単回投与毒性試験 10
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 29
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 39
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 49
2.6.7.10 がん原性試験 52
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 69
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 73
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 78
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験 81
2.6.7.15 新生児を用いた試験 86
2.6.7.16 局所刺激性試験 87
2.6.7.17 その他の毒性試験 88

2.6.7 毒性試験の概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：エテルカルセチド又はエテルカルセチド塩酸塩

試験の種類		動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量 (mg/kg)	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
反復投与毒性試験 [1]		ラット／SD	静脈内急速	7 日間	0，0.5，2，5	非適用*	[redacted]	2082-NC-100	4.2.3.2-1
		ラット／SD	静脈内急速	4 週間	0，0.3，1，3	適用*# [5]	[redacted]	4169-NC-107	4.2.3.2-2
		ラット／SD	静脈内急速	3 カ月間／6 カ月間 [2]	0，0.3，1，3	適用* [5]	[redacted]	4169-NC-133	4.2.3.2-3
		ラット／SD	静脈内急速	6 カ月間	0，0.3，1，3	適用	[redacted]	119037	4.2.3.2-4
		イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	2 日間／3 日間 [3] 7 日間	5 0，0.5，2 0，0.08，0.2，0.5（2 日に 1 回）	非適用*	[redacted]	4169-NC-101	4.2.3.2-5
		イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	4 週間	0，0.1，0.3，1.5（2 日に 1 回）	適用* [5]	[redacted]	4169-NC-106	4.2.3.2-6
		イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	6 カ月間	0，0.2，0.5，0.9（2 日に 1 回）	適用	[redacted]	119036	4.2.3.2-7
		イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	3 カ月間／9 カ月間 [2]	0，0.2，0.5，1.2/0.9 [4]（2 日に 1 回）	適用* [5]	[redacted]	4169-NC-132	4.2.3.2-8
遺伝毒性試験	Ames 試験	*S. typhimurium, E. coli*	*In vitro*	−	50-5000 μg/plate (+S9/-S9)	適用	[redacted]	4169-NC-104	4.2.3.3.1-1
		S. typhimurium	*In vitro*	−	15-5000 μg/plate (+S9/-S9)	適用	[redacted]	4169-NC-113	4.2.3.3.1-2
		S. typhimurium	*In vitro*	−	50-5000 μg/plate (+S9/-S9)	適用	[redacted]	4169-NC-123	4.2.3.3.1-3
		S. typhimurium	*In vitro*	−	1.5-5000 μg/plate (+S9/-S9)	非適用*	[redacted]	4169-NC-126	4.2.3.3.1-4
	染色体異常試験	ヒト末梢血リンパ球	*In vitro*	−	156-625 μg/mL (+S9) 1250-5000 μg/mL (-S9)	適用	[redacted]	4169-NC-105	4.2.3.3.1-5
	遺伝子突然変異試験	CHO-K_1 細胞	*In vitro*	−	500-5000 μg/mL	適用	[redacted]	4169-NC-112	4.2.3.3.1-6
	小核試験	ラット／SD	静脈内持続（30 分間）	3 日間	0，1.25，2.5，5	適用	[redacted]	4169-NC-122	4.2.3.3.2-1
	遺伝子突然変異試験	Muta マウス	皮下	28 日間	0，1，2，4	適用	[redacted]	116904	4.2.3.3.2-2

*：参考資料，#：PTH の測定は GLP 非適用，1）無毒性量が求められた場合は該当する投与量に下線，2）3 カ月間投与終了時にも剖検を含む検査を実施，
3）5 mg/kg では投与 2 日，その他の投与量では投与 3 日まで投与を実施，4）雄は投与 25 日，雌は投与 27 日より投与量を 1.2 mg/kg から 0.9 mg/kg に変更，
5）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

2.6.7.1　　毒性試験：一覧表（続き）

試験の種類		動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP適用	実施施設	試験番号	CTDにおける記載箇所
がん原性試験	用量設定試験	マウス／CByB6F1	皮下	5日間 4週間	0，2，4，6，8 0，1.5，3，6	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-155	4.2.3.4.1-1
	がん原性試験	マウス／Tg.rasH2	皮下	26週間	雄：0（生理食塩液），0（媒体），0.375，0.75，1.5 雌：0（生理食塩液），0（媒体），0.3，1，3	適用	[redacted]	116846	4.2.3.4.1-2
	用量設定試験	ラット／SD	皮下	4週間	0，1，3，4.5	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-147	4.2.3.4.1-3
		ラット／SD	皮下	13週間	0，0.8，1.6，3.2/4 1)	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-148	4.2.3.4.1-4
	がん原性試験	ラット／SD	皮下	2年間（最長93週間）	0（生理食塩液），0（媒体），0.2，0.4，0.8，1.6	適用	[redacted]	116848	4.2.3.4.1-5
生殖発生毒性試験	受胎能試験	ラット／SD	静脈内急速	雄：交配前28日～剖検前日（58～59日間） 雌：交配前14日～妊娠7日	0，0.75，1.5，3	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-152	4.2.3.5.1-1
	胚・胎児用量設定試験	ラット／SD	静脈内急速	妊娠6～17日	0，0.5，1.5，3，4.5	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-140	4.2.3.5.2-1
	胚・胎児試験	ラット／SD	静脈内急速	妊娠6～17日	0，0.8，1.6，3.2	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-150	4.2.3.5.2-2
	受胎能，胚・胎児試験	ラット／SD	静脈内急速	雄：交配前28日～剖検前日（56～59日間） 雌：交配前15日～妊娠17日	0，0.75，1.5，3	適用	[redacted]	119088	4.2.3.5.2-3
	胚・胎児用量設定試験	ウサギ／NZW	静脈内急速	妊娠7～20日	0，0.5，1.5，2.25，3	適用* 2) 3)	[redacted]	4169-NC-141	4.2.3.5.2-4
	胚・胎児試験	ウサギ／NZW	静脈内急速	妊娠7～20日	0，0.375，0.75，1.5	適用* 2)	[redacted]	4169-NC-149	4.2.3.5.2-5
		ウサギ／NZW	静脈内急速	妊娠7～19日	0，0.375，0.75，1.5	適用	[redacted]	119089	4.2.3.5.2-6
	出生前後試験	ラット／SD	静脈内急速	妊娠7日～授乳20日	0，0.75，1.5，3	適用	[redacted]	116847	4.2.3.5.3-1

*：参考資料
1）投与50日より雌の投与量を3.2 mg/kgから4 mg/kgに増量，2）投与液の濃度分析を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，
3）トキシコキネティクス測定はGLP非適用

2.6.7.1　　毒性試験：一覧表（続き）

試験の種類		動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量 (mg/kg)	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
局所刺激性試験		イヌ／ビーグル犬	静脈内，静脈周囲	単回	0，5 mg/mL の濃度で 3 mL	適用	[redacted]	117458	4.2.3.6-1
その他の毒性試験									
遺伝毒性機序検討	Ames 試験	*S. typhimurium*	*In vitro*	—	15-5000 μ g/plate (-S9)	非適用*	[redacted]	117144	4.2.3.7.3-1
		S. typhimurium	*In vitro*	—	150-5000 μ g/plate (-S9)	非適用*	[redacted]	117418	4.2.3.7.3-2
	細菌における代謝安定性検討試験	*S. typhimurium*	*In vitro*	—	7142 μ g/mL (-S9)	非適用*	[redacted]	117145	4.2.3.7.3-3
	Ames 試験	*S. typhimurium*	*In vitro*	—	1.5-5000 μ g/plate (+S9/-S9)	非適用*	[redacted]	117326	4.2.3.7.3-4
		S. typhimurium	*In vitro*	—	— (-S9)	非適用*	[redacted]	118039	4.2.3.7.3-5
		S. typhimurium	*In vitro*	—	250 μ g/plate (-S9)	非適用*	[redacted]	119371	4.2.3.7.3-6
不純物の毒性試験	不純物を含む原薬の毒性試験	ラット／SD	静脈内急速	4 週間	0，0.3，1，3	適用	[redacted]	119181	4.2.3.7.6-1
	不純物を含む液剤の毒性試験	イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	4 週間	0，0.4，1（2 日に 1 回）	適用*[1)]	[redacted]	4169-NC-146	4.2.3.7.6-2
	不純物を含む原薬の遺伝子突然変異試験	V79 細胞	*In vitro*	—	625-5000 μ g/mL	非適用*	[redacted]	G[redacted]063	4.2.3.7.6-3
	硫酸水素イソプロピルの Ames 試験	*S. typhimurium*	*In vitro*	—	1.58-5000 μ g/plate (+S9/-S9)	適用	[redacted]	118280	4.2.3.7.6-4

*：参考資料

1）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

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表　被験物質：エテルカルセチド又はエテルカルセチド塩酸塩

試験の種類	試験系／系統	投与方法	投与量（mg/kg）	GLP 適用	CTD における記載箇所
反復投与毒性試験（7 日間）	ラット／SD	静脈内急速	0.5，2，5	非適用	4.2.3.2-1
反復投与毒性試験（4 週間）	ラット／SD	静脈内急速	0.3，1，3	適用	4.2.3.2-2
反復投与毒性試験（3 カ月間／6 カ月間）	ラット／SD	静脈内急速	0.3，1，3	適用	4.2.3.2-3
反復投与毒性試験（6 カ月間）	ラット／SD	静脈内急速	0.3，1，3	適用	4.2.3.2-4
反復投与毒性試験（2 日間／3 日間）（7 日間）	イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	0.5，2，5 0.08，0.2，0.5（2 日に 1 回）	非適用	4.2.3.2-5
反復投与毒性試験（4 週間）	イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	0.1，0.3，1.5（2 日に 1 回）	適用	4.2.3.2-6
反復投与毒性試験（6 カ月間）	イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	0.2，0.5，0.9（2 日に 1 回）	適用	4.2.3.2-7
反復投与毒性試験（3 カ月間／9 カ月間）	イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	0.2，0.5，1.2/0.9[1)]（2 日に 1 回）	適用	4.2.3.2-8
遺伝毒性試験（遺伝子突然変異試験）	マウス／CD2F1	皮下	1，2，4	適用	4.2.3.3.2-2
がん原性試験（用量設定試験，4 週間）	マウス／CByB6F1	皮下	1.5，3，6	適用	4.2.3.4.1-1
がん原性試験（26 週間）	マウス／CByB6F1	皮下	雄：0.375，0.75，1.5 雌：0.3，1，3	適用	4.2.3.4.1-2
がん原性試験（用量設定試験，4 週間）	ラット／SD	皮下	1，3，4.5	適用	4.2.3.4.1-3
がん原性試験（用量設定試験，13 週間）	ラット／SD	皮下	0.8，1.6，3.2/4[2)]	適用	4.2.3.4.1-4
がん原性試験（2 年間）	ラット／SD	皮下	0.2，0.4，0.8，1.6	適用	4.2.3.4.1-5
生殖発生毒性試験（胚・胎児用量設定試験）	ウサギ／NZW	静脈内急速	0.5，1.5，2.25，3	非適用	4.2.3.5.2-4
生殖発生毒性試験（胚・胎児試験）	ウサギ／NZW	静脈内急速	0.375，0.75，1.5	適用	4.2.3.5.2-6
生殖発生毒性試験（出生前後試験）	ラット／SD	静脈内急速	0.75，1.5，3	適用	4.2.3.5.3-1
不純物の毒性試験（ラット，4 週間）	ラット／SD	静脈内急速	0.3，1，3	適用	4.2.3.7.6-1
不純物の毒性試験（イヌ，4 週間）	イヌ／ビーグル犬	静脈内急速	0.4，1（2 日に 1 回）	適用	4.2.3.7.6-2

1）雄は投与 25 日，雌は投与 27 日より投与量を 1.2 mg/kg から 0.9 mg/kg に変更
2）投与 50 日より雌の投与量を 3.2 mg/kg から 4 mg/kg に増量

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

重要な試験における動物の無毒性量又は最高投与量並びにヒト最大用量の
最高血漿中濃度（Cmax）及び全身曝露量（AUC）

試験の種類	動物種	投与量	Cmax* (ng/mL)		AUC# (ng•h/mL)	
			雄	雌	雄	雌
反復投与毒性試験（6カ月間）[a]	ラット	1 mg/kg[i]	2840	2240	7660	6120
		3 mg/kg[j]	7440	6240	19940	17260
反復投与毒性試験（6カ月間）[b]	イヌ	0.2 mg/kg[i]	529	430	614	529
		0.9 mg/kg[j]	1830	2100	2160	2670
がん原性試験（26週間）[c]	マウス	雄：1.5 mg/kg[j] 雌：3 mg/kg[j]	466	1070	2080	3400
がん原性試験（2年間）[d]	ラット	1.6 mg/kg[j]	1120	884	4300	3800
生殖発生毒性試験（受胎能，胚・胎児試験）[e]	ラット	3 mg/kg[j,k]	7440	6840	19940	17280
生殖発生毒性試験（胚・胎児試験）[f]	ウサギ	1.5 mg/kg[j,k]		4430		41600
生殖発生毒性試験（出生前後試験）[g]	ラット	0.75 mg/kg[k]		1590		4480
		3 mg/kg[j]		6840		17280
国内第Ⅰ／Ⅱ相試験[h]	ヒト	15 mg/person	1068		11580	

*：動物はC5min値，ヒトはCmax値

#：ヒトのAUCは，エテルカルセチドを投与27日目に投与した後の2日間の値（2日に1回投与）に基づいていることから，ヒトとの曝露量を比較するために，イヌ以外の動物を用いた試験（1日1回投与）ではAUCを2倍した．

a：投与182日の値（2.6.7.7A），b：投与181日の値（2.6.7.7B），c：投与177日の値（2.6.7.10.2A），d：投与183日の値（2.6.7.10.2B）

e：本試験ではトキシコキネティクス測定を実施していないため，雄は6カ月間反復投与毒性試験の値（2.6.7.7A），雌はラットの出生前後試験における妊娠20日の値（2.6.7.14A）を代用，f：妊娠11日の値（2.6.7.13A），g：ラットの出生前後試験における妊娠20日の値（2.6.7.14A）

h：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日の値に基づく推定値［表2.7.2.2-4］

i：無毒性量，j：最高投与量，k：受胎能，胚・胎児発生又は出生前及び出生後の発生並びに母体機能の影響に対する無毒性量

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧　被験物質：エテルカルセチド又はエテルカルセチド塩酸塩

バッチ番号	純度（%）	規格設定された不純物				試験番号	試験の種類
		ホモダイマー	脱アミド体	*不純物B	*不純物C 及び *不純物D の総量[c]		
申請規格	原薬	[redacted]					
	製剤						
[redacted]						2082-NC-100	ラット7日間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-107	ラット4週間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-133	ラット3カ月間／6カ月間反復静脈内投与毒性試験
						119037	ラット6カ月間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-101	イヌ7日間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-106	イヌ4週間反復静脈内投与毒性試験
						119036	イヌ6カ月間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-132	イヌ3カ月間／9カ月間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-104	Ames試験
						4169-NC-113	Treat and plate法によるAmes試験
						4169-NC-123	高純度の原薬を用いたAmes試験（1）
						4169-NC-126	高純度の原薬を用いたAmes試験（2）
						4169-NC-105	*In vitro* ヒト末梢血リンパ球染色体異常試験
						4169-NC-112	*In vitro* ほ乳類細胞遺伝子突然変異試験（HPRT試験）
						4169-NC-122	*In vivo* ラット小核試験
						116904	*In vivo* トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験
						4169-NC-155	マウス4週間がん原性用量設定試験
						116846	トランスジェニックマウス26週間がん原性試験
						4169-NC-147	ラット4週間がん原性用量設定試験
						4169-NC-148	ラット13週間がん原性用量設定試験
						116848	ラット2年間がん原性試験

a：HPLC旧分析法，b：HPLC新分析法
c：本測定条件では，*不純物C と*不純物D のピークが重なり分離できないため，総量として管理する．

*新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.4　　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

バッチ番号	純度（%）	規格設定された不純物				試験番号	試験の種類
		ホモダイマー	脱アミド体	*不純物B	*不純物C 及び *不純物D の総量[c]		
申請規格	原薬	[redacted]					
	製剤						
[redacted]						4169-NC-152	ラット受胎能試験
						4169-NC-140	ラット胚・胎児用量設定試験
						4169-NC-150	ラット胚・胎児試験
						119088	ラット受胎能，胚・胎児試験
						4169-NC-141	ウサギ胚・胎児用量設定試験
						4169-NC-149	ウサギ胚・胎児試験
						119089	ウサギ胚・胎児試験
						116847	ラット出生前後試験
						117458	イヌ局所刺激性試験
						117144	エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの Ames 試験
						117145	エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの細菌に対する代謝安定性試験
						119181	不純物を含有する原薬のラット 4 週間反復静脈内投与毒性試験
						4169-NC-146	不純物を含有する液剤のイヌ 4 週間反復静脈内投与毒性試験
						G[redacted]063	不純物を含有する原薬の *in vitro* ほ乳類細胞遺伝子突然変異試験（HPRT 試験）

a：HPLC 旧分析法，b：HPLC 新分析法
c：本測定条件では，*不純物C と *不純物D のピークが重なり分離できないため，総量として管理する．
d：不純物を添加した原薬，e：液剤

*新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.5 単回投与毒性試験

該当する試験なし.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：エテルカルセチド又はエテルカルセチド塩酸塩

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg）	性別及び一群の動物数	無毒性量（mg/kg）	特記すべき所見	試験番号
ラット／SD	静脈内急速（生理食塩液，pH4.5±0.1／溶液）	7日間	0，0.5，2，5	雌雄各4例	評価せず	一般状態：投与7日に5 mg/kgの雌1例が死亡．5 mg/kgで投与4日以降，自発運動減少，振戦，痙攣，運動協調性の欠如及び浅速呼吸，投与5日以降に歩行失調，腹臥位，投与期間終了時に脱水症状を示唆する皮膚の張りの低下 体重及び摂餌量：5 mg/kgで体重及び摂餌量の減少 血液学的検査：5 mg/kgでRBC及び血小板数の高値，白血球及びリンパ球数の低値 血液化学的検査：0.5 mg/kg以上で投与量に応じた血漿PTH，血清Caの低値及び血清Pの高値	2082-NC-100

PTH（pg/mL）：雌雄各1～4例／群の平均値

投与量（mg/kg）	0		0.5		2		5	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
投与1日投与前	383	138	226	243	247	173	525	156
投与後6時間	404	506	208	141	32.5	22.3	23.8	32.0
投与7日投与前	209	118	275	196	296	302	86.5	82.7
投与後6時間	282	155	154	51.0	59.5	37.3	17.8	19.7
投与8日剖検時	399	354	296	418	476	469	315	182

Ca（mmol/L）

雄：3～4例／群の平均値

投与量（mg/kg）	0	0.5	2	5
投与1日投与後6時間	2.67	2.39	2.13	1.92
投与7日投与後6時間	2.71	2.35	1.94	1.61
投与8日剖検時	2.49	2.42	2.39	2.03

雌：3～4例／群の平均値

投与量（mg/kg）	0	0.5	2	5
投与1日投与後6時間	2.78	2.52	2.29	2.13
投与7日投与後6時間	2.78	2.55	2.34	1.78
投与8日剖検時	2.57	2.55	2.55	2.11

器官重量：5 mg/kgで副腎重量の高値，脾臓及び胸腺重量の低値
剖検：5 mg/kgで胸腺の小型化及び胃粘膜の暗色化
病理組織学的検査：5 mg/kgで胸腺のリンパ組織萎縮／リンパ球枯渇，胃粘膜の炎症細胞浸潤を伴うびらん

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
ラット／SD</td><td>静脈内急速（生理食塩液，pH4.5±0.1／溶液）</td><td>7 日間</td><td>0，0.5，2，5</td><td>サテライト群：雌雄各 3 例</td><td>評価せず</td><td>トキシコキネティクス：雌雄合計 6 例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0.5</th><th>2</th><th>5</th></tr>
<tr><td rowspan="3">投与 1 日</td><td>C5min（ng/mL）</td><td>816</td><td>2094</td><td>7860</td></tr>
<tr><td>C3h（ng/mL）</td><td>36</td><td>133</td><td>473</td></tr>
<tr><td>C6h（ng/mL）</td><td>11</td><td>20</td><td>82</td></tr>
<tr><td rowspan="3">投与 7 日</td><td>C5min（ng/mL）</td><td>833</td><td>2634</td><td>10969</td></tr>
<tr><td>C3h（ng/mL）</td><td>44</td><td>192</td><td>710</td></tr>
<tr><td>C6h（ng/mL）</td><td>11</td><td>53</td><td>165</td></tr>
</table></td><td>2082-NC-100</td></tr>
<tr><td>ラット／SD</td><td>静脈内急速（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），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>4 週間</td><td>0，0.3，1，3</td><td>雌雄各 10 例又は 15 例
4 週投与群：雌雄各 10 例
4 週投与+4 週休薬群：対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例</td><td>雌雄
1</td><td>一般状態：3 mg/kg で振戦及び平伏姿勢
体重及び摂餌量：変化なし．
眼科学的検査：特記すべき所見なし．
尿検査：3 mg/kg で尿量の高値及び尿比重の低値
血液学的検査：特記すべき所見なし．
血液化学的検査：0.3 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値
Ca（mmol/L）
雄：8 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.3</th><th>1</th><th>3</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 8 時間</td><td>2.701</td><td>2.618</td><td>2.429**</td><td>2.035**</td></tr>
<tr><td>投与 28 日 投与後 8 時間</td><td>2.696</td><td>2.525**</td><td>2.385**</td><td>2.110**</td></tr>
<tr><td>投与 29 日 剖検時</td><td>2.598</td><td>2.559</td><td>2.532</td><td>2.423**</td></tr>
</table>
雌：8 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.3</th><th>1</th><th>3</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 8 時間</td><td>2.810</td><td>2.685*</td><td>2.420**</td><td>2.154**</td></tr>
<tr><td>投与 28 日 投与後 8 時間</td><td>2.813</td><td>2.736</td><td>2.558**</td><td>2.275**</td></tr>
<tr><td>投与 29 日 剖検時</td><td>2.710</td><td>2.651</td><td>2.620</td><td>2.580*</td></tr>
</table>
* p<0.05, ** p<0.01：対照群に対する Dunnett 検定
器官重量：3 mg/kg の雌で脾臓及び胸腺重量の低値
剖検：特記すべき所見なし．
病理組織学的検査：3 mg/kg の雌で胸腺のリンパ球枯渇
回復性：上記の変化はいずれも回復性が確認された．</td><td>4169-NC-107</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
ラット／SD</td><td>静脈内急速（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），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>4 週間</td><td>0，0.3，1，3</td><td>サテライト群：雌雄各 6 例（投与 1 及び 28 日にそれぞれ雌雄各 3 例／群を使用）</td><td></td><td>PTH（pg/mL）：雌雄各 2～3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.3</th><th colspan="2">1</th><th colspan="2">3</th></tr>
<tr><th>性別</th><th>雄</th><th>雌</th><th>雄</th><th>雌</th><th>雄</th><th>雌</th></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与前</td><td>91.7</td><td>122</td><td>84.7</td><td>132</td><td>124</td><td>99.3</td></tr>
<tr><td>投与後 5 分</td><td>37.0</td><td>40.7</td><td>28.3</td><td>97.7</td><td>19.7</td><td>16.0</td></tr>
<tr><td>投与後 2 時間</td><td>21.7</td><td>0</td><td>6.00</td><td>10.7</td><td>8.33</td><td>6.67</td></tr>
<tr><td>投与後 5 時間</td><td>57.3</td><td>28.7</td><td>65.3</td><td>11.3</td><td>7.00</td><td>10.7</td></tr>
<tr><td>投与後 8 時間</td><td>111</td><td>51.0</td><td>60.3</td><td>43.3</td><td>26.0</td><td>10.0</td></tr>
<tr><td>投与 28 日</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与前</td><td>167</td><td>51.3</td><td>110</td><td>56.0</td><td>205</td><td>149</td></tr>
<tr><td>投与後 5 分</td><td>36.0</td><td>26.3</td><td>22.3</td><td>20.0</td><td>32.7</td><td>31.0</td></tr>
<tr><td>投与後 2 時間</td><td>4.00</td><td>11.7</td><td>6.33</td><td>19.0</td><td>11.7</td><td>9.33</td></tr>
<tr><td>投与後 5 時間</td><td>199</td><td>102</td><td>52.0</td><td>7.33</td><td>8.33</td><td>3.00</td></tr>
<tr><td>投与後 8 時間</td><td>136</td><td>98.3</td><td>95.3</td><td>46.0</td><td>14.0</td><td>3.33</td></tr>
</table>
対照群は測定せず．定量下限（3 pg/mL）未満は 0 として計算

トキシコキネティクス：雌雄各 3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.3</th><th colspan="2">1</th><th colspan="2">3</th></tr>
<tr><th>性別</th><th>雄</th><th>雌</th><th>雄</th><th>雌</th><th>雄</th><th>雌</th></tr>
<tr><td>C5min（ng/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>368</td><td>480</td><td>1010</td><td>1550</td><td>3400</td><td>3270</td></tr>
<tr><td>投与 28 日</td><td>462</td><td>529</td><td>1070</td><td>1690</td><td>4900</td><td>6260</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>476</td><td>617</td><td>1410</td><td>2010</td><td>4510</td><td>4720</td></tr>
<tr><td>投与 28 日</td><td>582</td><td>646</td><td>1570</td><td>2140</td><td>6170</td><td>7810</td></tr>
</table></td><td>4169-NC-107</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>ラット／SD</td><td>静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>3 カ月間／6 カ月間</td><td>0，0.3，1，3</td><td>雌雄各 20 例又は 30 例
3 カ月投与群：雌雄各 10 例
3 カ月投与+2 週休薬群：対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例
6 カ月投与群：雌雄各 10 例
6 カ月投与+4 週休薬群：対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例</td><td>雌雄
1</td><td>一般状態：3 mg/kg で振戦
体重及び摂餌量：3 mg/kg の雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少
眼科学的検査：特記すべき所見なし．
血液学的検査：3 カ月投与群の 3 mg/kg で好中球の高値，リンパ球の低値
血液化学的検査：0.3 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値
Ca（mmol/L）
雄：8 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th></th><th>0</th><th>0.3</th><th>1</th><th>3</th></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.778</td><td>2.556**</td><td>2.446**</td><td>2.138**</td></tr>
<tr><td>投与 45 日</td><td>投与前</td><td>2.979</td><td>2.836*</td><td>2.789**</td><td>2.734**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.844</td><td>2.674**</td><td>2.589**</td><td>2.281**</td></tr>
<tr><td>投与 91 日</td><td>投与前</td><td>2.838</td><td>2.724**</td><td>2.785</td><td>2.644**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.810</td><td>2.649**</td><td>2.561**</td><td>2.198**</td></tr>
<tr><td>投与 182 日</td><td>投与前</td><td>2.786</td><td>2.653*</td><td>2.696</td><td>2.570**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.750</td><td>2.600**</td><td>2.483**</td><td>2.016**</td></tr>
</table>
雌：8 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th></th><th>0</th><th>0.3</th><th>1</th><th>3</th></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.688</td><td>2.540*</td><td>2.354**</td><td>2.131**</td></tr>
<tr><td>投与 45 日</td><td>投与前</td><td>2.884</td><td>2.886</td><td>2.816</td><td>2.726**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.898</td><td>2.796</td><td>2.680**</td><td>2.309**</td></tr>
<tr><td>投与 91 日</td><td>投与前</td><td>2.838</td><td>2.876</td><td>2.893</td><td>2.703*</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.875</td><td>2.806</td><td>2.718**</td><td>2.315**</td></tr>
<tr><td>投与 182 日</td><td>投与前</td><td>2.954</td><td>2.863</td><td>2.954</td><td>2.729**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.923</td><td>2.815</td><td>2.659**</td><td>2.228**</td></tr>
</table>
* p<0.05, ** p<0.01：対照群に対する Dunnett 検定
尿検査：3 カ月投与群の 3 mg/kg の雌雄及び 6 カ月投与群の 3 mg/kg の雌で尿比重の低値，尿量の高値，尿色調変化（淡黄色又は無色尿）の頻度増加
器官重量：3 カ月投与群の 3 mg/kg の雄で胸腺重量の低値，6 カ月投与群の 1 mg/kg 以上の雄で脾臓重量の低値
剖検：3 カ月投与群の 3 mg/kg の雌及び 6 カ月投与群の雌雄で胃粘膜の暗赤色化
病理組織学的検査：3 カ月投与群の 1 mg/kg 以上で胸腺のリンパ球壊死／萎縮，3 mg/kg で胃粘膜のびらん，3 mg/kg の雄で赤脾髄の縮小，3 mg/kg の雌で卵胞嚢胞の頻度及び程度の増加．6 カ月投与群でも同様の変化あり．
回復性：上記の変化はいずれも回復性が確認された．</td><td>4169-NC-133</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
ラット／SD</td><td>静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>3 カ月間／6 カ月間</td><td>0，0.3，1，3</td><td>サテライト群：雌雄各 9 例（投与 1，91 及び 182 日にそれぞれ雌雄各 3 例／群を使用）</td><td></td><td>一般状態：サテライト群の 3 mg/kg の雄 1 例で振戦，痙攣，呼吸困難及び平伏姿勢を発現後に死亡
トキシコキネティクス：雌雄各 2～3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.3</th><th colspan="2">1</th><th colspan="2">3</th></tr>
<tr><th>性別</th><th>雄</th><th>雌</th><th>雄</th><th>雌</th><th>雄</th><th>雌</th></tr>
<tr><td>C5min（ng/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>354</td><td>468</td><td>1200</td><td>1660</td><td>3560</td><td>5490</td></tr>
<tr><td>投与 91 日</td><td>753</td><td>810</td><td>3040</td><td>2910</td><td>8600</td><td>8250</td></tr>
<tr><td>投与 182 日</td><td>925</td><td>739</td><td>3200</td><td>2670</td><td>9040</td><td>7140</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>433</td><td>598</td><td>1460</td><td>2100</td><td>4510</td><td>6830</td></tr>
<tr><td>投与 91 日</td><td>933</td><td>999</td><td>3670</td><td>3520</td><td>10700</td><td>10200</td></tr>
<tr><td>投与 182 日</td><td>1150</td><td>915</td><td>3950</td><td>3360</td><td>11200</td><td>8710</td></tr>
</table></td><td>4169-NC-133</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>イヌ／ビーグル犬</td><td>静脈内急速（20 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1／溶液）</td><td>1日1回 2又は3日間（第1フェーズ）</td><td>0，0.5，2，5</td><td>雌雄各2例</td><td>評価せず</td><td>
一般状態：投与1日に5 mg/kgの雄1例，雌2例及び0.5 mg/kgの雌1例で嘔吐，投与2日及び3日に2 mg/kg以上で嗜眠，振戦，痙攣，平伏姿勢，呼吸困難，流涎，嘔吐又は摂餌や飲水行動の減少（廃絶），5 mg/kgの雌の1例で嗜眠が最終投与後6日間まで持続，その他の変化は最終投与後3日までに回復
体重及び摂餌量：0.5 mg/kg以上で体重及び摂餌の減少
血液化学的検査：0.5 mg/kg以上で投与量に応じた血漿PTHの低値，血清Caの低値及び血清Pの高値
PTH（pg/mL）：雌雄合計4例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.5</th><th>2</th><th>5</th></tr>
<tr><td colspan="2">投与開始前</td><td>101</td><td>48</td><td>66</td><td>63</td></tr>
<tr><td rowspan="4">投与1日</td><td>投与後4時間</td><td>91</td><td>0</td><td>14</td><td>22</td></tr>
<tr><td>投与後8時間</td><td>28</td><td>0</td><td>7</td><td>2</td></tr>
<tr><td>投与後12時間</td><td>26</td><td>0</td><td>7</td><td>0</td></tr>
<tr><td>投与後24時間</td><td>103</td><td>62</td><td>28</td><td>9</td></tr>
<tr><td>投与2日</td><td>投与後24時間</td><td>73</td><td>46</td><td>66</td><td>30</td></tr>
<tr><td rowspan="2">投与3日</td><td>投与後24時間</td><td>114</td><td>99</td><td>84</td><td>226[a]</td></tr>
<tr><td>投与後72時間</td><td>87</td><td>65</td><td>80</td><td>109[b]</td></tr>
</table>
定量下限（3 pg/mL）未満は0として計算
Ca（mmol/L）：雌雄合計4例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.5</th><th>2</th><th>5</th></tr>
<tr><td colspan="2">投与開始前</td><td>2.61</td><td>2.56</td><td>2.55</td><td>2.61</td></tr>
<tr><td rowspan="3">投与1日</td><td>投与後4時間</td><td>2.63</td><td>2.25</td><td>2.18</td><td>2.12</td></tr>
<tr><td>投与後8時間</td><td>2.61</td><td>2.16</td><td>2.02</td><td>2.00</td></tr>
<tr><td>投与後24時間</td><td>2.52</td><td>2.11</td><td>1.74</td><td>1.76</td></tr>
<tr><td>投与2日</td><td>投与後24時間</td><td>2.61</td><td>1.96</td><td>1.41</td><td>1.34</td></tr>
<tr><td rowspan="2">投与3日</td><td>投与後24時間</td><td>2.59</td><td>1.88</td><td>1.26</td><td>1.61[a]</td></tr>
<tr><td>投与後72時間</td><td>2.66</td><td>2.53</td><td>2.34</td><td>2.38[b]</td></tr>
</table>
a：投与3日以降の投与を中止したため，投与2日の投与後48時間
b：投与3日以降の投与を中止したため，投与2日の投与後96時間
トキシコキネティクス：雌雄合計4例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0.5</th><th>2</th><th>5</th></tr>
<tr><td>Cmax（ng/mL）</td><td>投与1日</td><td>1190</td><td>4260</td><td>11900</td></tr>
<tr><td rowspan="2">C24h（ng/mL）</td><td>投与1日</td><td>6.0</td><td>27.7</td><td>59.9</td></tr>
<tr><td>投与2日</td><td>9.1</td><td>26.4</td><td>105.4</td></tr>
<tr><td>AUC24h（ng·h/mL）</td><td>投与1日</td><td>1470</td><td>6120</td><td>15600</td></tr>
</table>
</td><td>4169-NC-101</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
イヌ／ビーグル犬</td><td>静脈内急速（20 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1／溶液）</td><td>2 日に 1 回 7 日間（計 4 回）（第 2 フェーズ）</td><td>0，0.08，0.2，0.5</td><td>雌雄各 2 例</td><td>評価せず</td><td>一般状態：0.5 mg/kg 雌の 1 例で投与 3 日に嘔吐，投与 7 日に流涎
体重及び摂餌量：0.5 mg/kg で体重減少．摂餌に変化なし．
血液化学的検査：0.08 mg/kg 以上で投与量に応じた血漿 PTH，血清 Ca の低値及び血清 P の高値
PTH（pg/mL）：雌雄合計 3～4 例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.08</th><th>0.2</th><th>0.5</th></tr>
<tr><td colspan="2">投与開始前</td><td>64</td><td>55</td><td>64</td><td>40</td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>64</td><td>13</td><td>15</td><td>6</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>44</td><td>38</td><td>104</td><td>30</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>85</td><td>40</td><td>85</td><td>43</td></tr>
<tr><td>投与 3 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>61</td><td>23</td><td>38</td><td>0</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>67</td><td>36</td><td>71</td><td>30</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>26</td><td>46</td><td>84</td><td>59</td></tr>
<tr><td>投与 5 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>79</td><td>24</td><td>19</td><td>22</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>60</td><td>35</td><td>62</td><td>24</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>43</td><td>42</td><td>100</td><td>55</td></tr>
<tr><td>投与 7 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>157</td><td>19</td><td>12</td><td>0</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>38</td><td>44</td><td>77</td><td>30</td></tr>
</table>
定量下限（3 pg/mL）未満は 0 として計算
Ca（mmol/L）：雌雄合計 4 例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.08</th><th>0.2</th><th>0.5</th></tr>
<tr><td colspan="2">投与開始前</td><td>2.61</td><td>2.50</td><td>2.48</td><td>2.52</td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.61</td><td>2.43</td><td>2.33</td><td>2.25</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.59</td><td>2.49</td><td>2.36</td><td>2.14</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>2.58</td><td>2.55</td><td>2.52</td><td>2.49</td></tr>
<tr><td>投与 3 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.65</td><td>2.44</td><td>2.33</td><td>2.14</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.49</td><td>2.41</td><td>2.24</td><td>2.01</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>2.53</td><td>2.41</td><td>2.37</td><td>2.37</td></tr>
<tr><td>投与 5 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.53</td><td>2.34</td><td>2.19</td><td>2.05</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.52</td><td>2.39</td><td>2.29</td><td>2.03</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>2.55</td><td>2.47</td><td>2.38</td><td>2.34</td></tr>
<tr><td>投与 7 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.56</td><td>2.36</td><td>2.23</td><td>2.01</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.52</td><td>2.38</td><td>2.24</td><td>1.97</td></tr>
</table></td><td>4169-NC-101</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
イヌ／ビーグル犬</td><td>静脈内急速（20 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1／溶液）</td><td>2 日に 1 回
7 日間
（計 4 回）
（第 2 フェーズ）</td><td>0，0.08，0.2，0.5</td><td>雌雄各 2 例</td><td>評価せず</td><td>トキシコキネティクス：雌雄合計 4 例／群の平均値
<table>
<tr><th colspan="2">投与量（mg/kg）</th><th>0.08</th><th>0.2</th><th>0.5</th></tr>
<tr><td>Cmax（ng /mL）</td><td>投与 1 日</td><td>239</td><td>563</td><td>1590</td></tr>
<tr><td></td><td>投与 7 日</td><td>218</td><td>515</td><td>1590</td></tr>
<tr><td>AUC24h（ng·h/mL）</td><td>投与 1 日</td><td>347</td><td>748</td><td>1920</td></tr>
<tr><td></td><td>投与 7 日</td><td>313</td><td>785</td><td>2080</td></tr>
</table></td><td>4169-NC-101</td></tr>
<tr><td>イヌ／ビーグル犬</td><td>静脈内急速（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），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>2 日に 1 回
4 週間
（計 14 回）</td><td>0，0.1，0.3，1.5</td><td>雌雄各 3 例又は 5 例
4 週投与群：雌雄各 3 例
4 週投与+4 週休薬群：対照群及び 1.5 mg/kg の雌雄各 2 例</td><td>雌雄
0.3</td>
<td>一般状態：1.5 mg/kg で嗜眠，流涎，皮膚温低下及び平伏姿勢
体重及び摂餌量：1.5 mg/kg で体重増加抑制及び摂餌の減少
眼科的検査：特記すべき所見なし．
心電図検査：1.5 mg/kg で RR 間隔，QT 間隔及び QTcF の延長並びに心拍数低下
雄（投与 27 日）：3～5 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.1</th><th>0.3</th><th>1.5</th></tr>
<tr><td>RR（s）</td><td>0.450</td><td>0.417</td><td>0.513</td><td>0.552</td></tr>
<tr><td>QT（s）</td><td>0.168</td><td>0.173</td><td>0.180</td><td>0.198*</td></tr>
<tr><td>QTcF（s）</td><td>0.222</td><td>0.230</td><td>0.223</td><td>0.244*</td></tr>
<tr><td>心拍数（bpm）</td><td>134.0</td><td>144.0</td><td>118.3</td><td>115.0</td></tr>
</table>
雌（投与 27 日）：3～5 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.1</th><th>0.3</th><th>1.5</th></tr>
<tr><td>RR（s）</td><td>0.452</td><td>0.497</td><td>0.500</td><td>0.568</td></tr>
<tr><td>QT（s）</td><td>0.172</td><td>0.180</td><td>0.180</td><td>0.200**</td></tr>
<tr><td>QTcF（s）</td><td>0.226</td><td>0.230</td><td>0.230</td><td>0.248*</td></tr>
<tr><td>心拍数（bpm）</td><td>135.2</td><td>121.3</td><td>120.3</td><td>111.4</td></tr>
</table>
* p<0.05，** p<0.01：対照群に対する Dunnett 検定
尿検査：特記すべき所見なし．
血液学的検査：特記すべき所見なし．</td><td>4169-NC-106</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
イヌ／ビーグル犬</td><td>静脈内急速（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），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>2 日に 1 回
4 週間
（計 14 回）</td><td>0，0.1，0.3，1.5</td><td>雌雄各 3 例又は 5 例
4 週投与群：雌雄各 3 例
4 週投与+4 週休薬群：対照群及び 1.5 mg/kg の雌雄各 2 例</td><td>雌雄
0.3</td><td>血液化学的検査：0.3 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値
Ca（mmol/L）
雄：3～5 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th></th><th>0</th><th>0.1</th><th>0.3</th><th>1.5</th></tr>
<tr><td>投与開始前</td><td></td><td>2.748</td><td>2.697</td><td>2.773</td><td>2.776</td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.670</td><td>2.507</td><td>2.617</td><td>2.136*</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.682</td><td>2.580</td><td>2.627</td><td>2.128**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>2.678</td><td>2.637</td><td>2.733</td><td>2.504*</td></tr>
<tr><td>投与 7 日</td><td>投与前</td><td>2.648</td><td>2.603</td><td>2.690</td><td>2.412*</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.712</td><td>2.630</td><td>2.680</td><td>1.894**</td></tr>
<tr><td>投与 15 日</td><td>投与前</td><td>2.614</td><td>2.550</td><td>2.587</td><td>2.282**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.622</td><td>2.533</td><td>2.543</td><td>1.814**</td></tr>
<tr><td>投与 27 日</td><td>投与前</td><td>2.612</td><td>2.580</td><td>2.667</td><td>2.502</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.652</td><td>2.470</td><td>2.477</td><td>2.028**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.628</td><td>2.553</td><td>2.527</td><td>2.006**</td></tr>
</table>
雌：3～5 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th></th><th>0</th><th>0.1</th><th>0.3</th><th>1.5</th></tr>
<tr><td>投与開始前</td><td></td><td>2.786</td><td>2.793</td><td>2.683</td><td>2.740</td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>投与後 8 時間</td><td>2.740</td><td>2.627</td><td>2.510</td><td>2.160**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.796</td><td>2.750</td><td>2.557</td><td>2.130**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 48 時間</td><td>2.832</td><td>2.783</td><td>2.717</td><td>2.534**</td></tr>
<tr><td>投与 7 日</td><td>投与前</td><td>2.750</td><td>2.740</td><td>2.617</td><td>2.418**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.776</td><td>2.723</td><td>2.533</td><td>1.860**</td></tr>
<tr><td>投与 15 日</td><td>投与前</td><td>2.642</td><td>2.653</td><td>2.467*</td><td>2.350**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.686</td><td>2.610</td><td>2.357**</td><td>1.850**</td></tr>
<tr><td>投与 27 日</td><td>投与前</td><td>2.632</td><td>2.620</td><td>2.530</td><td>2.452**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 8 時間</td><td>2.660</td><td>2.550</td><td>2.257**</td><td>1.956**</td></tr>
<tr><td></td><td>投与後 24 時間</td><td>2.700</td><td>2.590</td><td>2.333**</td><td>1.832**</td></tr>
</table>
* p<0.05, ** p<0.01：対照群に対する Dunnett 検定</td><td>4169-NC-106</td></tr>
</table>

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
イヌ／ビーグル犬</td><td>静脈内急速（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），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>2 日に 1 回
4 週間
（計 14 回）</td><td>0，0.1，
0.3，1.5</td><td>雌雄各 3 例又は 5 例
4 週投与群：雌雄各 3 例
4 週投与+4 週休薬群：対照群及び 1.5 mg/kg の雌雄各 2 例</td><td>雌雄
0.3</td><td>器官重量：1.5 mg/kg で胸腺重量の低値
剖検：1.5 mg/kg の雄で胸腺の小型化
病理組織学的検査：1.5 mg/kg で胸腺のリンパ球枯渇
回復性：上記の変化はいずれも回復性が確認された．
トキシコキネティクス：雌雄各 3～5 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.1</th><th colspan="2">0.3</th><th colspan="2">1.5</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>C5min（ng /mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>209</td><td>183</td><td>516</td><td>543</td><td>3210</td><td>3050</td></tr>
<tr><td>投与 27 日</td><td>222</td><td>219</td><td>491</td><td>686</td><td>3080</td><td>3500</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>259</td><td>243</td><td>699</td><td>721</td><td>4250</td><td>3820</td></tr>
<tr><td>投与 27 日</td><td>292</td><td>288</td><td>810</td><td>894</td><td>4540</td><td>5020</td></tr>
</table></td><td>4169-NC-106</td></tr>
</table>

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける3カ月間／9カ月間反復静脈内投与毒性試験　　**被験物質：エテルカルセチド塩酸塩**

報告書の題名：A Combination 13- and 39-Week Intravenous Toxicity, Toxicokinetic and Pharmacodynamic Study of KAI-4169 in Beagle Dogs, with Respective 2- and 4-Week Recovery Periods

動物種／系統：ビーグル犬　　投与期間：3カ月間／9カ月間　　試験番号：4169-NC-132

試験開始月齢：6～7カ月齢　　休薬期間：2週間／4週間　　CTDにおける記載箇所：4.2.3.2-8

初回投与年月日：[redacted]年12月28日　　投与方法：静脈内急速（2日に1回）　　GLP適用：適用[1)]

溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液

特記事項：・一般状態の悪化のため，雄は投与25日以降，雌は投与27日以降の投与量を1.2 mg/kgから0.9 mg/kgに減量し，更に雄では投与25日（4例），31日（2例），33日（1例），39日（2例）及び47日（2例）の投与を実施しなかった．

・3カ月間反復投与後に雌雄各3例／群の剖検（3カ月投与群），2週間の休薬後に対照群及び1.2/0.9 mg/kgの雌雄各2例／群の剖検（2週休薬群），9カ月間反復投与後に雌雄各3例／群の剖検（9カ月投与群），4週間の休薬後に対照群及び1.2/0.9 mg/kgの雌雄各2例／群の剖検（4週休薬群）を実施

・血漿中エテルカルセチド濃度を投与1日（初回投与），91日，183日及び273日に測定（採血ポイント：投与前（投与1日を除く），投与後5，30分，2，4，8，12及び24時間）

無毒性量：雌雄0.5 mg/kg

1）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

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
トキシコキネティクス								
C5min（ng/mL）								
投与1日	NE	NE	366	484	1040	1270	2790	3550
投与91日	NE	NE	345	255	751	544	1680	1440
投与183日	NE	NE	496	402	1330	1100	2850	2480
投与273日	NE	NE	720	718	2230	1990	4000	3800
AUClast（ng·h/mL）								
投与1日	NE	NE	595	729	1480	1920	4020	4820
投与91日	NE	NE	469	402	977	895	2340	2400
投与183日	NE	NE	722	731	1880	1910	4100	3600
投与273日	NE	NE	908	951	2550	2320	4720	4330

定量下限：1 ng/mL，NE：評価せず．

a：3カ月投与群＋2週休薬群／9カ月投与群＋4週休薬群

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける 3 カ月間／9 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
特記すべき所見								
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態[b]								
嗜眠	0	0	0	0	0	0	5/1	1/1
平伏姿勢	0	0	0	0	0	0	3/1	3/1
自発運動減少	0	0	0	0	0	0	15/2	3/1
振戦	0	0	0	0	0	0	0	3/1
体重（%[c]）								
投与 8 日	7.478 kg	6.238 kg	-3	-4	0	-3	-16**	-11**
投与 22 日	7.612 kg	6.310 kg	-3	-2	-1	-3	-25**	-15**
投与 57 日	8.046 kg	6.546 kg	-2	-4	0	-4	-18*	-12*
投与 71 日	8.126 kg	6.552 kg	-2	-1	0	-1	-15*	-9
投与 91 日	7.986 kg	6.640 kg	0	-1	+2	-1	-9	-8
投与 183 日	8.692 kg	6.860 kg	-5	+1	+13	0	+2	-5
投与 273 日[d]	8.813 kg	7.140 kg	-11	-1	+10	-4	-7	-10
体重増加量（%[c]）								
投与 1～91 日	0.656 kg	0.446 kg	+13	+2	+15	-51	-66	-100
投与 92～273 日[d]	0.673 kg	0.300 kg	-149	+11	+19	+16	-27	+104
投与 1～273 日[d]	1.380 kg	0.900 kg	-59	-18	+53	-55	-29	-50
摂餌の減少[b]								
投与 1～91 日	6/2	40/4	2/1	12/4	21/1	61/4	301/10	271/10
投与 92～273 日	3/1	87/2	1/1	37/2	18/1	77/2	102/4	192/4
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

* $p<0.05$, ** $p<0.01$：対照群に対する Dunnett 検定，-：特記すべき所見なし．

a：3 カ月投与群＋2 週休薬群／9 カ月投与群＋4 週休薬群，b：延べ発現日数／発現した動物数

c：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．なお，統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．

d：投与 273 日の体重は回復群の動物を除く雌雄各 3 例／群で評価した．そのため，投与 92～273 日及び投与 1～273 日の体重増加量も雌雄各 3 例／群で評価した．

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける3カ月間／9カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
心電図検査								
QTcF（s）								
投与開始前	0.24	0.23	0.24	0.23	0.24	0.23	0.23	0.22
投与3カ月	0.22	0.24	0.24*	0.23	0.24**	0.23	0.25***	0.24
投与9カ月	0.23	0.22	0.22	0.23	0.25*	0.24	0.25*	0.24
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査								
RBC（$10^6/\mu L$）								
投与45日	7.023	7.604	6.765	7.228	6.312**	7.093	5.877**	6.682**
投与92日	6.461	6.963	6.462	6.543	6.410	6.435	5.945**	6.639
投与183日	7.088	7.494	6.893	6.863	6.810	6.900	6.980	6.542
投与274日	6.492	7.060	6.310	6.097	6.607	6.427	6.778	6.476
Hb（g/dL）								
投与45日	15.93	16.91	14.85*	16.43	14.30**	16.00	12.70**	15.00**
投与92日	14.47	15.59	13.97	14.50	14.23	14.28	13.04**	14.75
投与183日	16.22	16.46	15.03	15.83	15.67	16.00	15.58	14.82
投与274日	14.58	15.38	13.30	13.87	15.03	14.67	15.04	14.68
Ht（%）								
投与45日	45.07	47.72	41.62*	46.37	40.57**	45.18	36.32**	42.10**
投与92日	42.05	44.20	40.17	42.20	41.52	41.57	37.94**	43.04
投与183日	49.04	48.90	44.53	47.60	47.50	48.00	46.58	44.68
投与274日	42.64	44.16	38.90	39.80	44.07	42.43	43.26	42.16

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$：対照群に対するDunnett検定
-：特記すべき所見なし.
a：3カ月投与群＋2週休薬群／9カ月投与群＋4週休薬群

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける3カ月間／9カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
血液学的検査（続き）								
網赤血球数（10^9/L）								
投与45日	64.36	68.31	63.47	49.90	45.07	40.42*	36.19**	35.47**
投与92日	46.45	38.09	37.08	33.45	31.30*	34.58	43.25	31.23
投与183日	111.68	77.34	61.83	45.57	54.20*	53.60	38.90**	37.54
投与274日	21.52	14.74	20.90	24.73	31.17	12.60	21.76	17.00
血液化学的検査								
Ca（mmol/L）								
投与開始前	2.748	2.768	2.725	2.770	2.727	2.768	2.736	2.758
投与1日　投与後4時間	2.794	2.722	2.613**	2.503**	2.620**	2.467**	2.397**	2.301**
8時間	2.791	2.772	2.420**	2.455**	2.433**	2.307**	2.163**	2.160**
24時間	2.741	2.682	2.520**	2.527**	2.470**	2.360**	1.996**	2.002**
48時間	2.702	2.731	2.637	2.725	2.655	2.675	2.462**	2.486**
投与24日（投与量変更前）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.669	1.932
投与45日　投与前	2.734	2.709	2.657	2.652	2.597*	2.563*	2.427**	2.443**
投与後4時間	2.740	2.772	2.602	2.607	2.435**	2.485**	2.199**	2.256**
8時間	2.816	2.798	2.512**	2.463**	2.378**	2.317**	2.124**	2.120**
24時間	2.721	2.652	2.498*	2.523	2.317**	2.335**	1.985**	2.078**
48時間	2.637	2.646	2.613	2.650	2.563	2.607	2.396**	2.477**
投与91日　投与前	2.578	2.576	2.515	2.582	2.445**	2.563	2.359**	2.408**
投与後4時間	2.631	2.654	2.440**	2.528	2.317**	2.352**	2.161**	2.104**
8時間	2.626	2.618	2.395**	2.383**	2.232**	2.217**	2.038**	2.014**
投与92日（剖検時）	2.679	2.648	2.448**	2.468*	2.250**	2.253**	2.002**	1.949**
3カ月投与＋2週休薬後	2.680	2.695	NA	NA	NA	NA	2.635	2.750

* $p<0.05$, ** $p<0.01$：対照群に対するDunnett検定
NA：評価対象なし.
a：3カ月投与群＋2週休薬群／9カ月投与群＋4週休薬群

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける 3 カ月間／9 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数 [a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
血液化学的検査（続き）								
Ca（mmol/L）								
投与 183 日　投与前	2.662	2.716	2.547	2.637	2.497*	2.593	2.436**	2.346**
投与後 4 時間	2.604	2.642	2.290**	2.403**	2.247**	2.297**	2.076**	2.072**
8 時間	2.634	2.696	2.207**	2.323**	2.110**	2.180**	1.966**	1.958**
24 時間	2.540	2.596	2.263*	2.390*	2.153**	2.223**	1.954**	1.896**
48 時間	2.522	2.604	2.493	2.583	2.457	2.477	2.428	2.372**
投与 273 日　投与前	2.562	2.678	2.453	2.563	2.447	2.660	2.396*	2.474**
投与後 4 時間	2.648	2.702	2.383**	2.387**	2.270**	2.473**	2.124**	2.206**
8 時間	2.662	2.648	2.357**	2.407**	2.183**	2.340**	2.030**	2.092**
投与 274 日（剖検時）	2.634	2.666	2.383**	2.467*	2.180**	2.443**	2.014**	2.000**
9 カ月投与＋4 週休薬後	2.665	2.640	NA	NA	NA	NA	2.795	2.760
P（mmol/L）								
投与開始前	1.98	1.96	2.00	1.85	1.85	2.03	1.94	1.90
投与 1 日　投与後 4 時間	2.01	1.98	2.17	1.85	2.08	2.03	2.34*	1.96
8 時間	2.40	2.10	2.50	2.05	2.62	2.25	2.51	2.16
24 時間	1.99	1.78	1.98	1.75	2.02	2.05*	2.29**	2.20**
48 時間	1.92	1.78	1.95	1.75	1.83	1.90	2.08*	1.94
投与 24 日（投与量変更前）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.48	2.26
投与 45 日　投与前	1.79	1.56	1.82	1.73	1.87	1.92**	2.06**	1.86*
投与後 4 時間	1.77	1.79	1.87	2.02	1.90	2.12*	2.26**	2.23**
8 時間	2.34	2.29	2.65	2.68*	2.70*	2.77**	2.66*	2.66**
24 時間	1.70	1.54	1.83	1.58	2.00**	1.95**	2.35**	2.01**
48 時間	1.58	1.50	1.73	1.58	1.83*	1.77*	2.12**	1.87**

* $p<0.05$, ** $p<0.01$：対照群に対する Dunnett 検定
NA：評価対象なし.
a：3 カ月投与群＋2 週休薬群／9 カ月投与群＋4 週休薬群

2.6.7.6　　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける 3 カ月間／9 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
血液化学的検査（続き）								
P（mmol/L）								
投与 91 日　投与前	1.60	1.52	1.65	1.47	1.87*	1.83	2.13**	1.85*
投与後 4 時間	1.53	1.45	1.62	1.65	1.83*	1.85*	2.36**	2.10**
8 時間	1.86	1.69	2.17	2.27*	2.42**	2.40**	2.81**	2.30**
投与 92 日（剖検時）	1.56	1.44	1.62	1.42	2.00**	1.78*	2.19**	1.99**
3 カ月投与＋2 週休薬後	1.60	1.55	NA	NA	NA	NA	1.60	1.50
投与 183 日　投与前	1.50	1.32	1.47	1.43	1.73	1.47	1.90**	1.68*
投与後 4 時間	1.38	1.26	1.50	1.53	1.80	1.47	1.86*	1.84*
8 時間	1.74	1.90	1.93	2.40*	2.33*	2.40*	2.48**	2.44**
24 時間	1.48	1.28	1.40	1.40	1.80*	1.70*	2.00**	1.74**
48 時間	1.40	1.24	1.37	1.37	1.70	1.50	1.80**	1.60*
投与 273 日　投与前	1.32	1.20	1.30	1.27	1.53	1.30	1.66**	1.62**
投与後 4 時間	1.16	1.16	1.13	1.13	1.47	1.33	1.66**	1.78**
8 時間	1.44	1.50	1.33	1.53	1.73	1.97**	1.96*	2.04**
投与 274 日（剖検時）	1.20	1.00	1.27	1.07	1.67**	1.27*	1.80**	1.64**
9 カ月投与＋4 週休薬後	1.25	1.00	NA	NA	NA	NA	1.35	1.15

* $p<0.05$, ** $p<0.01$：対照群に対する Dunnett 検定
NA：評価対象なし.
a：3 カ月投与群＋2 週休薬群／9 カ月投与群＋4 週休薬群

2.6.7.6　　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける 3 カ月間／9 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
血液化学的検査（続き）								
CK（U/L）								
投与開始前	314.0	332.2	288.5	228.5	267.2	242.2	331.2	263.8
投与 45 日	199.6	177.1	203.3	180.5	165.3	145.7	132.9**	127.0*
投与 92 日	172.3	151.2	159.2	143.0	144.3	164.5	255.3*	177.4
投与 183 日	215.2	111.0	159.7	121.7	114.7	103.3	131.8	93.4
投与 274 日	165.2	165.6	118.0	180.3	107.7	122.0	138.4	118.0
LDH（U/L）								
投与開始前	98.34	83.74	90.03	82.60	83.77	79.20	94.92	85.28
投与 45 日	79.70	65.81	64.18	62.75	60.82	58.88	45.34**	42.65**
投与 92 日	67.84	76.89	56.53	68.42	56.58	77.77	69.47	63.54
投与 183 日	157.92	76.50	71.83	63.93	84.43	72.87	70.50*	56.54
投与 274 日	96.60	119.56	67.33	103.10	78.63	90.33	80.60	80.26*
Na（mmol/L）								
投与開始前	144.76	145.86	143.38	146.82	145.33	147.02	142.41	146.38
投与 45 日	147.56	146.35	148.20	145.53	147.88	145.53	148.79	147.85
投与 92 日	148.44	147.18	149.42	146.88	150.83**	147.52	149.81	148.15
投与 183 日	147.20	146.16	147.80	146.63	149.17	148.67**	149.32*	149.32**
投与 274 日	148.16	148.78	146.70	148.80	148.07	149.20	147.94	149.14
K（mmol/L）								
投与開始前	4.882	4.931	4.952	4.843	4.872	4.960	4.902	4.850
投与 45 日	4.609	4.574	4.592	4.525	4.555	4.393	4.538	4.332
投与 92 日	4.616	4.431	4.528	4.235	4.475	4.215	4.597	4.222*
投与 183 日	4.714	4.600	4.743	4.393	4.343	4.400	4.502	4.338
投与 274 日	4.198	4.324	4.497	4.143	4.923**	4.210	4.902**	4.346

* $p<0.05$, ** $p<0.01$：対照群に対する Dunnett 検定

a：3 カ月投与群＋2 週休薬群／9 カ月投与群＋4 週休薬群

2.6.7.6　　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

イヌにおける3カ月間／9カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：4169-NC-132（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		1.2/0.9	
動物数[a]	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2	M:3/3	F:3/3	M:3/3	F:3/3	M:3+2/3+2	F:3+2/3+2
血液化学的検査（続き）								
Cl（mmol/L）								
投与開始前	112.27	109.99	110.78	111.02	110.10	111.50	112.76	111.21
投与45日	113.29	111.97	113.52	110.55	112.17	110.33	112.50	111.04
投与92日	113.60	112.56	113.03	111.45	111.95	110.72*	110.49**	109.95**
投与183日	113.86	111.94	114.20	112.10	112.90	113.47	113.48	112.82
投与274日	115.98	114.22	113.27*	112.93	113.47*	111.70*	113.36*	111.70*
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査[b]								
9カ月投与群								
腎臓								
近位尿細管　褐色色素沈着								
ごく軽度	3/3	1/3	0/3	2/3	0/3	2/3	0/3	0/3
軽度	0/3	0/3	3/3	1/3	2/3	1/3	3/3	2/3
中等度	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3
9カ月投与＋4週休薬群								
腎臓								
近位尿細管　褐色色素沈着								
ごく軽度	1/2	1/2	NA	NA	NA	NA	0/2	0/2
軽度	0/2	0/2	NA	NA	NA	NA	2/2	2/2

* $p<0.05$, ** $p<0.01$：対照群に対するDunnett検定
NA：評価対象なし，-：特記すべき所見なし．
a：3カ月投与群＋2週休薬群／9カ月投与群＋4週休薬群
b：所見の認められた動物数／評価動物数

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A　ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：AMG 416: A 6-Month Intravenous Toxicity Study in the Sprague Dawley Rat with a 28-Day Recovery Period
動物種／系統：ラット／SD　投与期間：6 カ月間　試験番号：119037
試験開始週齢：7.5 週齢　休薬期間：4 週間　CTD における記載箇所：4.2.3.2-4
初回投与年月日：[redacted]年 1 月 14 日　投与方法：静脈内急速　GLP 適用：適用
溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液
特記事項：・6 カ月間反復投与後に雌雄各 15 例／群の剖検，4 週間の休薬後に対照群及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例／群の剖検を実施
・サテライト動物（雌雄各 6 例／群）を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を投与 1 日（初回投与）及び投与 182 日に測定（採血ポイント：投与前，投与後 5 分，2，5，8 及び 24 時間）
無毒性量：雌雄 1 mg/kg

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.3		1		3	
動物数　サテライト動物[a]	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
トキシコキネティクス								
C5min（ng/mL）								
投与 1 日	NE	NE	386	425	1380	1280	3050	4470
投与 182 日	NE	NE	823	714	2840	2240	7440	6240
AUClast（ng·h/mL）								
投与 1 日	NE	NE	492	528	1780	1730	4260	5800
投与 182 日	NE	NE	1070	914	3830[b]	3060	9970	8630

定量下限：1 ng/mL
NE：評価せず.
a：雌雄各 3 例／群から投与前，投与後 2 及び 8 時間の採血を行い，残りの雌雄各 3 例／群から投与後 5 分，5 及び 24 時間の採血を実施．ただし，対照群の雄では 2 例が投与 182 日までに死亡したため，投与 182 日は 3 例から投与前，投与後 2 及び 8 時間の採血を行い，4 例から投与後 5 分，5 及び 24 時間の採血を実施
b：投与後 8 時間は 2 例の測定値から算出

2.6.7.7A　　ラットにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119037（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.3		1		3	
動物数　毒性群（6 カ月投与群＋4 週休薬群）	M:15+5	F:15+5	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15+5	F:15+5
特記すべき所見								
死亡又は切迫剖検例数	0	0	1[a]	0	0	1[b]	1	0
一般状態[c]								
振戦	0/0	0/0	0/0	0/0	5/4	5/5	1735/20	2223/20
自発運動減少	1/1	0/0	0/0	0/0	5/3	5/4	2046/20	1952/20
平伏姿勢	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	21/13	26/15
非協調運動	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	33/17	30/13
歩行異常	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	150/20	234/20
異常発声	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	190/18	117/16
流涎	1/1	0/0	0/0	0/0	16/2	17/2	257/20	275/20
体重（%[d]）								
投与 182 日	634.1 g	319.9 g	0	+3	-8*	+3	-22*	-6*
体重増加量（%[d]）								
投与-1～182 日	402.2 g	132.2 g	0	+9	-11	+9	-33*	-14*
摂餌量（%[d]）								
投与 26 週	30.7 g/day	20.8 g/day	-8	-18	-13	-17	-27	-19
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-

* $p \leq 0.05$：対照群に対する Dunnett 検定
-：特記すべき所見なし.
a：投与 103 日に死亡が認められたが，一般状態，体重及び摂餌量への影響や剖検及び病理組織学的検査で異常は認められず，より高い投与量でも同様の死亡例は認められなかったことから，エテルカルセチドの投与に関連しない事象と判断した.
b：自然発生性のリンパ腫による一般状態の悪化のため，投与 70 日に切迫剖検を実施
c：延べ発現日数／発現した動物数
d：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を％で示す．なお，統計学的有意差は実測値に基づく（％ではない）.

2.6.7.7A　　ラットにおける6カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119037（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.3		1		3	
動物数　毒性群（6カ月投与群＋4週休薬群）	M:15+5	F:15+5	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15+5	F:15+5
血液学的検査（6カ月投与群）								
RBC（$10^6/\mu L$）	9.923	8.638	9.935	8.504	9.874	8.438	10.724*	8.893
Hb（g/dL）	16.39	15.31	16.26	15.22	16.52	15.30	17.63*	15.76
Ht（%）	51.59	46.56	51.89	46.81	52.35	46.33	55.61*	48.04
好中球数（$10^3/\mu L$）	1.434	0.656	1.765	0.774	1.472	0.881	2.331*	0.936
リンパ球数（$10^3/\mu L$）	5.476	3.742	6.954	3.647	5.472	4.510	4.241	3.495
血液化学的検査（経日推移）								
Ca（mg/dL）								
投与1日　投与後8時間	10.78	10.58	10.21*	10.24	9.34*	9.70*	7.95*	7.93*
投与170日　投与後8時間	11.45	11.38	10.70	10.78	10.31*	10.41*	8.61*	9.23*
投与183日	10.87	11.27	10.93	11.13	10.58	10.73*	9.69*	10.55*
4週休薬後	10.54	10.84	NA	NA	NA	NA	10.30	10.62
P（mg/dL）								
投与1日　投与後8時間	10.30	8.95	10.51	9.25	12.24*	10.80*	14.39*	12.28*
投与170日　投与後8時間	6.96	5.58	9.18*	6.94*	8.90*	7.64*	9.79*	9.18*
投与183日	6.07	5.25	7.35*	5.45	6.37	4.50*	8.25*	6.80*
4週休薬後	6.68	5.24	NA	NA	NA	NA	7.04	4.32*
血液化学的検査（6カ月投与群）								
AST（U/L）	139.7	145.7	145.2	124.7	163.6	134.5	195.7 (173.8) [a]	135.5
ALT（U/L）	45.6	54.5	47.6	41.5	63.7*	59.3	70.8* (53.1) [a]	46.2
ALP（U/L）	77.7	32.9	91.5	35.6	82.7	38.7	98.5	48.3*
BUN（mg/dL）	12.4	14.1	12.2	15.6	15.1*	17.1*	15.5*	16.9*
クレアチニン（mg/dL）	0.49	0.53	0.50	0.61*	0.55	0.61*	0.56*	0.62*

* $p \leq 0.05$：対照群に対するDunnett検定又はDunn検定
NA：評価対象なし.
a：雄1例に自然発生性の肝嚢胞状変性に伴う高値（AST:480，ALT:301）が認められたため，同例を除外した場合の平均値を括弧内に示した.

2.6.7.7A　　ラットにおける6カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119037（続き）

投与量（mg/kg）		0（対照）		0.3		1		3	
動物数　毒性群（6カ月投与群＋4週休薬群）		M:15+5	F:15+5	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15+5	F:15+5
血液化学的検査（6カ月投与群）（続き）									
アルブミン（g/dL）		4.55	5.71	4.61	5.70	4.65	5.58	4.81*	5.55
グロブリン（g/dL）		2.83	2.41	2.76	2.23	2.90	2.21*	2.62*	2.51
A/G		1.61	2.41	1.68	2.56	1.60	2.55	1.84*	2.23
K（mmol/L）		5.77	5.17	5.94	5.33	5.56	4.86	5.17*	5.05
Cl（mmol/L）		102.9	102.6	102.0	103.3	100.7*	101.4	99.6*	98.6*
血液化学的検査（4週休薬群）									
BUN（mg/dL）		12.6	14.4	NA	NA	NA	NA	15.6*	16.0
器官重量（6カ月投与群）	評価動物数	15	15	14	15	15	14	14	15
脾臓									
実重量（%[a]）		0.9293 g	0.5838 g	-2	-1	-13*	+2	-34*	-16*
相対重量（%体重[a]）		0.1558%	0.2029%	-4	-8	-7	-6	-15*	-14*
剖検[b]（6カ月投与群）	評価動物数	15	15	14	15	15	14	14	15
胃									
胃粘膜の黒色巣		0	1	0	1	1	2	4	2
胃粘膜の陥凹		1	1	0	0	3	2	2	0

* $p \leq 0.05$：対照群に対するDunnett検定又はDunn検定
NA：評価対象なし．
a：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．なお，統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．
b：所見の認められた動物数

2.6.7.7A　　ラットにおける6カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119037（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.3		1		3	
動物数　毒性群（6カ月投与群＋4週休薬群）	M:15+5	F:15+5	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15+5	F:15+5
病理組織学的検査[a]（6カ月投与群）								
上皮小体[b]								
主細胞の好酸性化								
ごく軽度	0/15	0/15	0/14	0/12	10/14	9/14	9/13	10/13
胃								
胃粘膜のびらん								
ごく軽度	0/15	0/15	0/14	0/15	0/15	0/14	2/14	2/15
軽度	0/15	0/15	0/14	0/15	0/15	0/14	1/14	0/15
腎臓								
尿細管上皮の褐色色素沈着								
ごく軽度	0/15	0/15	4/14	6/15	7/15	7/14	6/14	5/15
軽度	0/15	0/15	0/14	0/15	0/15	0/14	1/14	1/15
投与部位								
血管及び血管周囲の炎症								
ごく軽度	1/15	1/15	2/14	0/15	4/15	2/14	3/14	4/15
軽度	0/15	0/15	0/14	0/15	0/15	1/14	0/14	0/15
病理組織学的検査[a]（4週休薬群）								
上皮小体[b]								
主細胞の好酸性化								
ごく軽度	0/5	0/3	NA	NA	NA	NA	2/5	2/5
腎臓								
尿細管上皮の褐色色素沈着								
ごく軽度	0/5	0/5	NA	NA	NA	NA	2/5	0/5

NA：評価対象なし.
a：所見の認められた動物数／評価動物数
b：標本上に上皮小体が認められなかった動物では評価を実施しなかった.

2.6.7.7B　　イヌにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：AMG 416: Six Month Intravenous Toxicology Study in a Beagle Dog with 28 Day Recovery

動物種／系統：イヌ／ビーグル犬　　投与期間：6 カ月間　　試験番号：119036

試験開始月齢：6 カ月齢　　休薬期間：4 週間　　CTD における記載箇所：4.2.3.2-7

初回投与年月日：[redacted] 年 1 月 21 日　　投与方法：静脈内急速（2 日に 1 回）　　GLP 適用：適用

溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有，pH4.5±0.1）／溶液

特記事項：・6 カ月間反復投与後に雌雄各 4 例／群の剖検，4 週間の休薬後に対照群及び 0.9 mg/kg の雌雄各 2 例／群の剖検を実施
・血漿中エテルカルセチド濃度を投与 1 日（初回投与）及び投与 181 日に測定（採血ポイント：投与前，投与後 5，30 分，2，4，8，12 及び 24 時間）

無毒性量：雌雄 0.2 mg/kg

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		0.9	
動物数（6 カ月投与群＋4 週休薬群）	M:4+2	F:4+2	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4+2	F:4+2
トキシコキネティクス								
C5min（ng/mL）								
投与 1 日	NE	NE	480[a]	458	1240	1180	2030	2300[b]
投与 181 日	NE	NE	529	430	1400	1060	1830	2100
AUClast（ng·h/mL）								
投与 1 日	NE	NE	524[a]	570	1400	1470	2410	2660[b]
投与 181 日	NE	NE	614	529	1590	1390	2160	2670

定量下限：1 ng/mL

NE：評価せず.

a：試料調製時のミスにより 1 例のデータを除外したため，3 例の平均値

b：試料調製時のミスにより 1 例のデータを除外したため，5 例の平均値

2.6.7.7B　　イヌにおける6カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119036（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		0.9	
動物数（6カ月投与群＋4週休薬群）	M:4+2	F:4+2	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4+2	F:4+2
特記すべき所見								
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態[a]（投与1～181日）								
嘔吐	1/1	0/0	1/1	0/0	37/4	18/2	198/5	83/5
流涎	1/1	4/1	7/3	3/2	27/4	48/4	146/6	343/6
食欲不振	5/2	59/4	3/2	39/4	21/3	48/4	68/5	229/6
自発運動減少	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	8/3
振戦	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
体重（%[b]）								
投与175日	11.13 kg	9.03 kg	-1	-9	-8	-12	-9	-11*
体重増加量（%[b]）								
投与-1～175日	2.43 kg	1.65 kg	-20	-27	-41	-50	-49	-45
摂餌量[c]（%[b]）								
投与7日	279.83 g/day	211.50 g/day	-9	+4	-26	-12	-41*	-42*
投与12日	265.17 g/day	208.83 g/day	-4	+2	-53*	-7	-56*	+29
投与28日	272.00 g/day	238.17 g/day	+6	+15	-13	+21	-23	+20
投与91日	300.00 g/day	275.00 g/day	0	-2	+5	+15	+11	+14
投与181日	260.83 g/day	254.50 g/day	+17	-13	-12	-4	+10	-36

* $p \leq 0.05$：対照群に対するDunnett検定又はDunn検定

a：延べ発現数／発現した動物数

b：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．なお，統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．

c：0.5 mg/kg以上では摂餌量の減少に伴う体重減少又は体重増加抑制が認められたため，通常の固形飼料に加えてスープや缶詰などの補助食を投与2週より与えた．大部分の動物では，投与期間中に食欲が回復し，投与14週までに補助食の追加が不要となった．また，0.2 mg/kgの雌雄各1例でも投与期間の後半に補助食を与えた．

2.6.7.7B　　イヌにおける 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119036（続き）

投与量（mg/kg）		0（対照）		0.2		0.5		0.9	
動物数（6 カ月投与群＋4 週休薬群）		M:4+2	F:4+2	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4+2	F:4+2
眼科学的検査		-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査									
QTca（ms）									
投与開始前		230.39	217.25	221.66	231.73	220.73	212.32	209.92	220.91
投与 2 日		225.19	214.52	223.35	229.37	233.46	231.26	226.04	241.03*
投与 177 日		229.39	221.25	226.65	240.44	243.48	234.53	238.85	247.28
尿検査		-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査									
網赤血球数（10^9/L）									
投与開始前		75.25	58.50	51.43	67.05	58.95	66.83	59.52	54.92
投与 181 日		58.45	77.38	62.43	59.35	43.35	40.18	36.97	31.18*
血液化学的検査									
Ca（mg/dL）									
投与 1 日	投与前	10.40	10.48	10.23	10.08	10.23	10.33	10.50	10.07*
	投与後 4 時間	10.67	10.72	10.13*	9.80*	9.48*	9.80*	9.40*	8.85*
	8 時間	10.38	10.28	9.50*	8.90*	8.55*	8.55*	8.12*	7.68*
	12 時間	10.40	10.40	9.40*	8.98*	7.95*	8.18*	7.62*	7.38*
	24 時間	11.23	10.87	10.23*	9.93*	9.68*	9.08*	8.85*	8.15*
投与 169 日	投与前	10.75	10.67	10.25	10.30	10.18	10.00*	9.80*	9.87*
	投与後 4 時間	10.70	10.73	9.75*	9.73*	8.98*	9.35*	8.62*	8.57*
	8 時間	10.53	11.00	9.23*	9.20*	8.40*	8.93*	7.75*	7.97*
	12 時間	10.47	10.62	9.20*	9.13*	8.08*	8.48*	7.35*	7.60*
	24 時間	10.98	10.53	9.95*	9.65*	9.30*	9.28*	8.65*	8.48*
投与 181 日	投与前	10.23	10.43	9.95	10.03	9.60*	9.68*	9.22*	9.22*
4 週休薬後		9.95	9.80	NA	NA	NA	NA	9.75	9.55

* $p \leq 0.05$：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定，NA：評価対象なし，-：特記すべき所見なし．

2.6.7.7B　　イヌにおける6カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119036（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		0.9	
動物数（6カ月投与群＋4週休薬群）	M:4+2	F:4+2	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4+2	F:4+2
血液化学的検査（続き）								
P（mg/dL）								
投与1日　投与前	6.52	5.62	6.43	4.50*	6.55	5.33	6.82	4.80*
投与後4時間	7.18	7.20	8.03	7.15	7.75	7.30	7.85	7.75
8時間	6.93	6.50	8.00*	6.23	7.58	6.65	7.25	6.92
12時間	6.23	5.90	6.43	5.88	7.03*	6.78*	6.92	6.73*
24時間	6.47	7.37	6.93	6.68	6.40	6.98	6.65	6.37*
投与169日　投与前	4.65	4.98	4.65	4.23	5.33*	5.33	5.92*	5.42
投与後4時間	5.95	6.42	6.93	5.55	7.63*	6.73	8.12*	7.72*
8時間	6.53	6.73	7.43	6.88	7.35	7.43	8.17*	8.22*
12時間	6.12	6.50	6.48	5.93	7.00	6.85	7.92*	7.48*
24時間	5.43	5.82	6.00	5.28	6.25*	6.23	7.02*	6.67*
投与181日　投与前	4.90	4.47	4.73	3.98	4.93	4.68	5.60	4.83
4週休薬後	5.10	4.35	NA	NA	NA	NA	5.15	4.75
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査[a]								
6カ月投与群								
腎臓								
尿細管上皮の褐色色素沈着								
ごく軽度	0/4	1/4	2/4	3/4	1/4	4/4	1/4	3/4
軽度	0/4	0/4	1/4	0/4	3/4	0/4	3/4	0/4

* $p \leq 0.05$：対照群に対するDunnett検定又はDunn検定
NA：評価対象なし.
-：特記すべき所見なし.
a：所見の認められた動物数／評価動物数

2.6.7.7B　　イヌにおける6カ月間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：119036（続き）

投与量（mg/kg）	0（対照）		0.2		0.5		0.9	
動物数（6カ月投与群＋4週休薬群）	M:4+2	F:4+2	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4+2	F:4+2
病理組織学的検査[a]（続き）								
4週休薬群								
腎臓								
尿細管上皮の褐色色素沈着								
ごく軽度	0/2	0/2	NA	NA	NA	NA	0/2	1/2
軽度	0/2	0/2	NA	NA	NA	NA	2/2	0/2

NA：評価対象なし.
a：所見の認められた動物数／評価動物数

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8A エテルカルセチドの Ames 試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩
報告書の題名：Bacterial Reverse Mutation Assay
試験番号：4169-NC-104
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-1
菌株：*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び *Escherichia coli* WP2 *uvr*A
GLP 適用：適用
独立した試験数：3
プレート数：用量設定試験（1 回目及び 2 回目）：2，確認試験：3
処理年月：[redacted]年 12 月～[redacted]年 1 月
代謝活性化系：ラット肝 S9mix
分析細胞数／培養：該当せず
溶媒：被験物質：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），pH4.5±0.1
処理：プレート法，S9mix 非存在下及び存在下，37℃で 48～72 時間のインキュベーション
細胞毒性：なし
遺伝毒性：TA100 の S9mix 非存在下，TA1535 の S9mix 非存在下及び存在下において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
代謝活性化なし	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	37 ± 5	95 ± 7	12 ± 7	7 ± 2	59 ± 2
	無処置対照	-	29 ± 3	121 ± 5	14 ± 6	7 ± 2	49 ± 5
	エテルカルセチド塩酸塩	50	32 ± 3	118 ± 12	14 ± 4	7 ± 2	57 ± 5
		150	42 ± 9	130 ± 22	21 ± 4	4 ± 1	61 ± 9
		500	23 ± 8	141 ± 20	31 ± 10	6 ± 3	62 ± 6
		1500	25 ± 8	189 ± 11	85 ± 20	5 ± 1	47 ± 4
		5000	27 ± 10	233 ± 27	197 ± 25	7 ± 3	47 ± 6
	2-ニトロフルオレン	1.0	175 ± 21	-	-	-	-
	アジ化ナトリウム	1.0	-	481 ± 22	386 ± 47	-	-
	9-アミノアクリジン	75	-	-	-	286 ± 38	-
	メタンスルホン酸メチル	1000	-	-	-	-	431 ± 15

2.6.7.8A　エテルカルセチドの Ames 試験　試験番号：4169-NC-104（続き）

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
代謝活性化あり	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	49 ± 6	125 ± 13	15 ± 4	6 ± 2	58 ± 7
	無処置対照	-	37 ± 9	116 ± 11	14 ± 4	7 ± 3	57 ± 8
	エテルカルセチド塩酸塩	50	38 ± 6	119 ± 13	21 ± 7	7 ± 1	70 ± 5
		150	36 ± 5	132 ± 18	22 ± 6	7 ± 2	64 ± 8
		500	17 ± 2	130 ± 9	37 ± 9	8 ± 5	48 ± 5
		1500	28 ± 4	136 ± 15	82 ± 11	8 ± 3	59 ± 5
		5000	35 ± 4	153 ± 12	142 ± 6	8 ± 2	51 ± 5
	2-アミノアントラセン	1.0	485 ± 72	-	52 ± 6	29 ± 7	-
		2.0	-	981 ± 44	-	-	-
		10	-	-	-	-	189 ± 43

2.6.7.8B　　Treat and plate 法によるエテルカルセチドの Ames 試験　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：Bacterial Reverse Mutation Assay With KAI-4169 (Treat and Plate Method)　　試験番号：4169-NC-113

試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-2

菌株：*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535　　GLP 適用：適用

独立した試験数：1　　プレート数：3　　処理年月：[redacted]年 3 月

代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：該当せず

溶媒：被験物質：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），pH4.5±0.1

処理：Treat and Plate 法，S9mix 非存在下及び存在下，37℃で 48～72 時間のインキュベーション

細胞毒性：あり（両菌株ともに S9mix 非存在下の 5000 μg/plate）

遺伝毒性：TA1535 の S9mix 非存在下及び存在下において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）	
			TA100	TA1535
代謝活性化なし	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	98 ± 5	9 ± 2
	無処置対照	-	88 ± 6	9 ± 1
	エテルカルセチド塩酸塩	15	99 ± 31	9 ± 3
		50	122 ± 61	14 ± 1
		150	128 ± 12	21 ± 3
		500	85 ± 6	39 ± 16
		1500	151 ± 21	62 ± 0
		5000	133 ± 15	68 ± 11
	アジ化ナトリウム	48 μg/mL	749 ± 23	298 ± 29

2.6.7.8B　Treat and plate 法によるエテルカルセチドの Ames 試験　試験番号：4169-NC-113（続き）

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）	
			TA100	TA1535
代謝活性化あり	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	88 ± 25	7 ± 3
	無処置対照	-	83 ± 11	6 ± 2
	エテルカルセチド塩酸塩	15	65 ± 4	7 ± 2
		50	78 ± 8	10 ± 1
		150	73 ± 10	12 ± 2
		500	88 ± 9	20 ± 5
		1500	123 ± 21	29 ± 6
		5000	132 ± 7	48 ± 9
	2-アミノアントラセン	15 μg/mL	404 ± 17	-
		50 μg/mL	-	31 ± 2

2.6.7.8C　　高純度の原薬を用いたエテルカルセチドの Ames 試験（1）　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：A Bacterial Reverse Mutation Assay of KAI-4169
Lot#F4169KP0901A Performed with Tester Stains TA100 and TA1535

試験番号：4169-NC-123
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-3
菌株：*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535
GLP 適用：適用
独立した試験数：2　　プレート数：用量設定試験：2，確認試験：3　　処理年月：[redacted] 年 6 月
代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：該当せず
溶媒：被験物質：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），pH4.5±0.1
処理：プレート法，S9mix 非存在下及び存在下，37℃で 48～72 時間のインキュベーション
細胞毒性：なし
遺伝毒性：TA100 の S9mix 非存在下，TA1535 の S9mix 非存在下及び存在下において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）	
			TA100	TA1535
代謝活性化なし	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	113 ± 6	21 ± 2
	エテルカルセチド塩酸塩	50	123 ± 20	27 ± 14
		150	133 ± 9	40 ± 14
		500	185 ± 35	77 ± 10
		1500	248 ± 21	117 ± 7
		5000	352 ± 38	283 ± 2
	アジ化ナトリウム	1.0	1073 ± 144	968 ± 133
代謝活性化あり	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	123 ± 12	13 ± 3
	エテルカルセチド塩酸塩	50	150 ± 4	21 ± 5
		150	147 ± 22	29 ± 4
		500	152 ± 6	60 ± 4
		1500	121 ± 6	90 ± 11
		5000	100 ± 2	150 ± 43
	2-アミノアントラセン	1.0	-	404 ± 266
		2.0	1425 ± 246	-

2.6.7.8D　　高純度の原薬を用いたエテルカルセチドの Ames 試験（2）　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：A Bacterial Reverse Mutation Assay of KAI-4169
Lot 2501978 Performed with Tester Stains TA100 and TA1535

試験番号：4169-NC-126
CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-4
GLP 適用：非適用
処理年月：[redacted]年 7 月

試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
菌株：*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1535
独立した試験数：1　　プレート数：2
代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：該当せず
溶媒：被験物質：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），pH4.5±0.1
処理：プレート法，S9mix 非存在下及び存在下，37℃で 48～72 時間のインキュベーション
細胞毒性：あり（TA100 の S9mix 存在下の 5000 μg/plate）
遺伝毒性：TA100 の S9mix 非存在下，TA1535 の S9mix 非存在下及び存在下において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）	
			TA100	TA1535
代謝活性化なし	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	95 ± 14	21 ± 1
	エテルカルセチド塩酸塩	1.5	87 ± 4	19 ± 2
		5.0	92 ± 4	18 ± 4
		15	108 ± 4	20 ± 1
		50	105 ± 6	24 ± 5
		150	101 ± 15	24 ± 5
		500	113 ± 8	39 ± 21
		1500	162 ± 15	92 ± 16
		5000	226 ± 36	204 ± 6
	アジ化ナトリウム	1.0	885 ± 33	681 ± 20

2.6.7.8D　高純度の原薬を用いたエテルカルセチドの Ames 試験（2）　試験番号：4169-NC-126（続き）

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）	
			TA100	TA1535
代謝活性化あり	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	108 ± 4	11 ± 6
	エテルカルセチド塩酸塩	1.5	114 ± 1	11 ± 2
		5.0	92 ± 8	15 ± 0
		15	112 ± 7	9 ± 5
		50	116 ± 7	11 ± 2
		150	99 ± 12	10 ± 7
		500	114 ± 16	33 ± 6
		1500	79 ± 20	38 ± 14
		5000	50 ± 6	89 ± 13
	2-アミノアントラセン	1.0	-	75 ± 42
		2.0	805 ± 11	-

2.6.7.8E　　ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test　　試験番号：4169-NC-105

試験の種類：染色体異常試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-5

細胞：ヒト末梢血リンパ球　　GLP 適用：適用

独立した試験数：1　　プレート数：2　　処理年月：[redacted]年 12 月～[redacted]年 1 月

代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：分裂指数については 500 個，染色体異常については 100 個

溶媒：被験物質：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），pH4.5±0.1

処理：短時間処理（S9mix 非存在下及び存在下，被験物質で 37℃，4 時間処理後，新鮮培養液で 37℃，16 時間培養）及び連続処理（S9mix 非存在下，被験物質で 20 時間連続処理）

細胞毒性：あり（短時間処理 S9mix 非存在下及び連続処理の 5000 μg/mL，短時間処理 S9mix 存在下の 625 μg/mL 以上）

遺伝毒性：染色体異常誘発性なし

代謝活性化	処理方法	被験物質	処理濃度（μg/mL）	相対分裂指数（%）	構造異常発現頻度（%）	数的異常発現頻度（%）
代謝活性化なし	短時間処理	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	100.0	0.0	0.0
		エテルカルセチド塩酸塩	1250	88.6	0.0	0.0
			2500	88.6	0.0	0.0
			5000	78.9	0.5	0.0
		マイトマイシン C	0.6	54.4	22.0**	0.0
代謝活性化なし	連続処理	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	100.0	0.0	0.0
		エテルカルセチド塩酸塩	1250	73.1	0.0	0.0
			4000	56.0	0.0	0.0
			5000	51.5	0.5	0.0
		マイトマイシン C	0.3	40.3	32.0**	0.0

**p≤0.01：対照群に対する Fisher の直接確率検定

2.6.7.8E　ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験　試験番号：4169-NC-105（続き）

代謝活性化	処理方法	被験物質	処理濃度（μg/mL）	相対分裂指数（%）	構造異常発現頻度（%）	数的異常発現頻度（%）
代謝活性化あり	短時間処理	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	100.0	0.0	0.0
		エデルカルセチド塩酸塩	156	97.8	0.0	0.0
			313	90.3	0.0	0.0
			625[a]	75.3	0.0	0.0
		シクロホスファミド	15	25.8	14.0**	0.0

**p≤0.01：対照群に対する Fisher の直接確率検定
a：沈殿あり

2.6.7.8F　　ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT 試験）　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：*In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (CHO/HGPRT Assay)　　試験番号：4169-NC-112

試験の種類：ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-6

細胞：チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-K_1 細胞）　　GLP 適用：適用

独立した試験数：1　　プレート数：2　　処理年月：[redacted]年 2 月～3 月

代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：2 x 10^5 個

溶媒：被験物質：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），pH4.5±0.1

処理：S9mix 非存在下及び存在下，被験物質で 37℃，5 時間処理

細胞毒性：なし

遺伝毒性：遺伝子突然変異誘発性なし

代謝活性化	被験物質	処理濃度（μg/mL）	細胞毒性（媒体対照に対するコロニー形成率%）	突然変異頻度（x 10^{-6}）
代謝活性化なし	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	100	3.0
	エテルカルセチド塩酸塩	500	59	5.5
		1000	71	10.7
		2000	84	4.5
		4000	68	11.4
		5000	88	6.0
	エチルメタンスルホン酸	241.2	47	88.4
代謝活性化あり	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	100	10.4
	エテルカルセチド塩酸塩	500	96	0.8
		1000	82	17.5
		2000	81	0
		4000	90	9.2
		5000	83	6.7
	ベンゾ[a]ピレン	4	91	342.1

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9A ラットにおける小核試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩
報告書の題名：Rat Bone Marrow Erythrocyte Micronucleus Test Following Intravenous Infusion of KAI-4169 HCl
試験番号：4169-NC-122
試験の種類：小核試験
CTD における記載箇所：4.2.3.3.2-1
動物種／系統／性別：ラット／SD／雄
GLP 適用：適用
投与開始週齢：6～8 週齢
投与年月：[redacted]年 5 月～6 月
投与方法：静脈内持続（30 分間）
溶媒／投与形態：被験物質：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），pH4.5±0.1／溶液
処理計画：被験物質：3 日間反復投与，陽性対照：単回投与
計測時間：最終投与の 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製
評価した細胞：多染性赤血球（PCE）
分析細胞数／動物：PCE の割合については 1000 個の赤血球，小核を有する PCE（MPCE）の個数については 2000 個の PCE
毒性／細胞毒性：用量設定試験において，7.5 mg/kg 以上で死亡例が認められた．5 mg/kg 以上で立毛及び嗜眠，7.5 mg/kg 以上で体重減少，10 mg/kg で振戦，12.5mg/kg で乾燥性眼炎が認められた．これらの結果より，小核試験の最高投与量を 5 mg/kg に設定した．小核試験においては，5 mg/kg で立毛が認められた．
遺伝毒性：小核誘発性なし
曝露証明：曝露は確認しなかったが，投与液は適切な濃度であることを確認した

被験物質	投与量（mg/kg）	動物数	全赤血球における PCE の割合 (平均±SD)	1000 個の PCE における MPCE の個数 (平均±SD)
10 mmol/L コハク酸緩衝液	0	5	0.465 ± 0.03	0.7 ± 0.27
エテルカルセチド塩酸塩	1.25	5	0.474 ± 0.03	0.5 ± 0.50
	2.5	5	0.486 ± 0.03	0.4 ± 0.42
	5	5	0.465 ± 0.04	0.4 ± 0.22
シクロホスファミド	40	5	0.339 ± 0.03	21.7 ± 3.99

2.6.7.9B　　トランスジェニックマウスにおける遺伝子突然変異試験　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：AMG 416: 28-Day Subcutaneous Mutagenicity Study in the Male Muta™ Mouse　　試験番号：116904

試験の種類：トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.3.2-2

動物種／系統／性別：マウス/Muta Mouse (CD2-lacZ80/HazfBR)／雄　　GLP 適用：適用

投与開始週齢：8 ~10 週齢　　投与年月：[redacted]年 10 月～12 月

投与方法：皮下

溶媒／投与形態：被験物質：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液

処理計画：28 日間反復投与

計測時間：最終投与の 3 日後

評価した細胞：肝臓及び骨髄

分析細胞数／動物：1 組織あたり 200000 pfu（plaque forming unit）

毒性／細胞毒性：用量設定試験において，6 mg/kg 以上で死亡例が認められた．4 mg/kg では，自発運動減少，振戦及び円背が認められたが，死亡例は認められなかった．これらの結果より，本試験の最高投与量を 4 mg/kg に設定した．本試験においては，すべての投与群で毒性所見は認められなかった．

遺伝毒性：遺伝子突然変異誘発性なし

曝露証明：サテライト動物（CD2F1系マウス，雄）を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を投与1日（初回投与）及び投与28日（最終投与）に測定（採血ポイント：投与前，投与後15分，1，2，4，8及び24時間）した．投与28日の1，2及び4 mg/kgのCmax及びAUC24hはそれぞれ373，556，1550 ng/mL及び472，800，1980 ng･h/mLであった．

2.6.7.9B　トランスジェニックマウスにおける遺伝子突然変異試験　　試験番号：116904（続き）

被験物質	投与量（mg/kg）	動物数	組織	突然変異頻度（x10^{-6}）（平均± SD）
10 mmol/L コハク酸緩衝液	0	6	肝臓	43.7 ± 16.5
未処理	0	6	肝臓	68.1 ± 28.7
エテルカルセチド塩酸塩	1	6	肝臓	44.4 ± 26.6
	2	6	肝臓	53.0 ± 19.7
	4	6	肝臓	45.8 ± 18.6
エチルニトロソウレア[b]	-	-	肝臓	832.7 ± 125.0
10 mmol/L コハク酸緩衝液	0	6	骨髄	45.7 ± 13.4
未処理	0	6	骨髄	48.3 ± 7.7
エテルカルセチド塩酸塩*	1	5[a]	骨髄	38.6 ± 23.2
	2	5[a]	骨髄	56.2 ± 19.7
	4	6	骨髄	60.6 ± 20.4
エチルニトロソウレア[b]	-	-	骨髄	2601.3 ± 3278.7

*：骨髄での用量反応検定において有意差が認められた（$p<0.05$）が，ANOVA 及び媒体対照群に対する Dunnett 検定においては，統計学的有意差は認められなかった．用量反応検定で認められた有意差は，1 mg/kg 投与群の 1 例の復帰突然変異頻度が媒体対照群及び背景データと比較して著しく低値であったことが原因と考えられた．一方で，エテルカルセチド塩酸塩を投与した他のすべての動物の突然変異頻度は，背景データの範囲内であり，媒体対照群の突然変異頻度と同程度であった．以上より，用量反応検定における有意差は偶発的な変化と判断した．

a：DNA パッケージングが不十分であったため，1 例の突然変異頻度のデータが採取できず，評価例数が 5 例となった．

b：別試験にて採取した DNA を使用して評価した．

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10.1 がん原性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr>
<td>マウス／CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic(-/-homozygous c-Ha-ras)</td>
<td>皮下（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%，ベンジルアルコール 0.9％含有），pH4.5±0.1／溶液）</td>
<td>5 日間／28 日間

サテライト群：単回又は 25 日間</td>
<td>5 日投与群：0，2，4，6，8

28 日投与群及びサテライト群：0，1.5，3，6</td>
<td>5 日投与群：雌雄各 5 例

28 日投与群：雌雄各 10 例

サテライト群：対照群：雌雄各 8 例
エテルカルセチド投与群：雌雄各 38 例
（採血ポイント毎に雌雄各 3 例／群を使用）</td>
<td>評価せず</td>
<td>5 日投与群：
一般状態：8 mg/kg の雄で自発運動減少，平伏姿勢，体温下降，努力呼吸，粗毛
血液化学的検査：2 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値

28 日投与群：
一般状態：3 mg/kg 以上の雄：運動失調，自発運動増加，振戦，浅速呼吸，6 mg/kg の雄で自発運動減少，平伏姿勢，3 例死亡，6 mg/kg の雌で振戦，浅速呼吸
血液化学的検査：1.5 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値
Ca（mg/dL）
雄：5～10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>1.5</th><th>3</th><th>6</th></tr>
<tr><td>投与 18 日 投与後 6.5 時間付近</td><td>10.46</td><td>7.79*</td><td>7.17*</td><td>6.33*</td></tr>
<tr><td>投与 29 日 剖検時</td><td>10.50</td><td>10.20</td><td>10.03*</td><td>10.21</td></tr>
</table>
雌：5～10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>1.5</th><th>3</th><th>6</th></tr>
<tr><td>投与 18 日 投与後 6.5 時間付近</td><td>9.88</td><td>8.80</td><td>7.53*</td><td>6.77*</td></tr>
<tr><td>投与 29 日 剖検時</td><td>10.26</td><td>9.82*</td><td>9.84*</td><td>9.56*</td></tr>
</table>
*p<0.05：対照群に対する Dunnett 検定
剖検及び病理組織学的検査：6 mg/kg の雌で投与部位の赤色化，炎症，出血の程度又は頻度増加
トキシコキネティクス：雌雄各 2～3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">1.5</th><th colspan="2">3</th><th colspan="2">6</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>Cmax（ng /mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>855</td><td>488</td><td>1340</td><td>962</td><td>2610</td><td>2130</td></tr>
<tr><td>投与 25 日</td><td>782</td><td>395</td><td>1590</td><td>990</td><td>4090</td><td>1930</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>619</td><td>610</td><td>1110</td><td>1010</td><td>2270</td><td>2340</td></tr>
<tr><td>投与 25 日</td><td>820</td><td>545</td><td>1360</td><td>1250</td><td>4620</td><td>2500</td></tr>
</table>
</td>
<td>4169-NC-155</td>
</tr>
</table>

2.6.7.10.1　がん原性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種
／系統</th><th>投与方法
（溶媒／投与形態）</th><th>投与
期間</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>性別及び
一群の動物数</th><th>無毒性量
（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験
番号</th></tr>
<tr><td>ラット
／SD</td><td>皮下
（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%，ベンジルアルコール 0.9 % 含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>4 週間</td><td>0，1，3，4.5

サテライト群：
1，3，4.5</td><td>雌雄各 10 例

サテライト群：
雌雄各 7 例
（採血ポイント毎に雌雄各 3 例／群を使用）</td><td>評価せず</td><td>一般状態：3 mg/kg 以上で流涎，自発運動減少，呼吸促迫及び振戦，4.5 mg/kg で立毛，円背，平伏姿勢，常同行動，運動失調及び削痩，4.5 mg/kg の雌で 1 例切迫剖検，2 例死亡
体重及び摂餌量：3 mg/kg 以上の雄及び 4.5 mg/kg の雌で体重増加抑制及び摂餌量の減少，
血液化学的検査：1 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値，血清 P の高値
Ca（mg/dL）
雄：9～10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>1</th><th>3</th><th>4.5</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 12 時間</td><td>10.49</td><td>9.96**</td><td>8.57**</td><td>8.38**</td></tr>
<tr><td>投与 28 日 投与前</td><td>10.61</td><td>10.10**</td><td>9.77**</td><td>9.68**</td></tr>
<tr><td>投与 28 日 投与後 12 時間</td><td>9.96</td><td>9.43**</td><td>8.08**</td><td>7.68**</td></tr>
<tr><td>投与 29 日 剖検時</td><td>11.69</td><td>11.42</td><td>10.93**</td><td>10.43**</td></tr>
</table>
雌：7～10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>1.5</th><th>3</th><th>4.5</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 12 時間</td><td>10.40</td><td>9.85</td><td>9.26**</td><td>8.37**</td></tr>
<tr><td>投与 28 日 投与前</td><td>10.52</td><td>10.31</td><td>10.01**</td><td>9.69**</td></tr>
<tr><td>投与 28 日 投与後 12 時間</td><td>10.16</td><td>9.63*</td><td>8.90**</td><td>7.73**</td></tr>
<tr><td>投与 29 日 剖検時</td><td>11.50</td><td>11.34</td><td>11.01*</td><td>10.74**</td></tr>
</table>
*p<0.05，**p<0.01：対照群に対する Dunnett 検定又は Welch 検定

トキシコキネティクス：雌雄各 3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">1</th><th colspan="2">3</th><th colspan="2">4.5</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>Cmax（ng /mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>　投与 1 日</td><td>490</td><td>551</td><td>1860</td><td>2080</td><td>2540</td><td>2460</td></tr>
<tr><td>　投与 28 日</td><td>375</td><td>489</td><td>2520</td><td>2000</td><td>2220</td><td>2970</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>　投与 1 日</td><td>902</td><td>945</td><td>3050</td><td>3500</td><td>4480</td><td>4350</td></tr>
<tr><td>　投与 28 日</td><td>800</td><td>790</td><td>4040</td><td>3110</td><td>3750</td><td>4510</td></tr>
</table></td><td>4169
-NC-
147</td></tr>
</table>

2.6.7.10.1 がん原性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>ラット／SD</td><td>皮下（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5± 0.1／溶液）</td><td>13 週間</td><td>0，0.8，1.6，3.2/4 [a]</td><td>雌雄各 10 例</td><td>評価せず</td><td>一般状態：0.8 mg/kg 以上の雌及び 1.6 mg/kg 以上の雄で流涎，1.6 mg/kg の雄で 2 例切迫剖検，1 例死亡，1.6 mg/kg 以上の雄及び 3.2/4 [a] mg/kg の雌で自発運動減少，振戦，平伏姿勢
体重及び摂餌量：1.6 mg/kg 以上で体重増加抑制，3.2 mg/kg の雄で摂餌量の減少
体重増加量（%）：雌雄 7～10 例／群の平均値を対照群に対する変化率で示した
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.8</th><th colspan="2">1.6</th><th>3.2</th><th>3.2/4 [a]</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>投与-1 日～投与 91 日</td><td>9</td><td>-6</td><td>-16</td><td>-13</td><td>-41</td><td>-20</td></tr>
</table>
血液学的検査：3.2 mg/kg の雄で好中球数の高値
血液化学的検査：0.8 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値及び血清 P の高値
Ca（mg/dL）
雄：7～10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.8</th><th>1.6</th><th>3.2</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 8 時間</td><td>10.83</td><td>9.59**</td><td>8.93**</td><td>8.55**</td></tr>
<tr><td>投与 35 日　投与後 12 時間</td><td>10.51</td><td>9.60**</td><td>9.41**</td><td>8.76**</td></tr>
<tr><td>投与 45 日　投与前</td><td>10.41</td><td>9.86**</td><td>9.82 **</td><td>9.57**</td></tr>
<tr><td>投与後 12 時間</td><td>10.11</td><td>9.38**</td><td>9.03**</td><td>8.17**</td></tr>
<tr><td>投与 91 日　投与前</td><td>10.53</td><td>9.98**</td><td>9.69**</td><td>9.61**</td></tr>
<tr><td>投与後 12 時間</td><td>10.30</td><td>9.48**</td><td>9.23**</td><td>8.46**</td></tr>
<tr><td>投与 92 日　解剖時</td><td>10.78</td><td>10.47</td><td>10.51</td><td>10.13**</td></tr>
</table>
雌：10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.8</th><th>1.6</th><th>3.2/4 [a]</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 8 時間</td><td>11.06</td><td>9.74**</td><td>9.27**</td><td>9.18**</td></tr>
<tr><td>投与 35 日　投与後 12 時間</td><td>10.76</td><td>9.88**</td><td>9.55**</td><td>9.06**</td></tr>
<tr><td>投与 45 日　投与前</td><td>10.82</td><td>10.25**</td><td>10.17**</td><td>10.01**</td></tr>
<tr><td>投与後 12 時間</td><td>10.38</td><td>9.54**</td><td>9.32**</td><td>8.85**</td></tr>
<tr><td>投与 91 日　投与前</td><td>10.98</td><td>10.15**</td><td>10.23**</td><td>10.07**</td></tr>
<tr><td>投与後 12 時間</td><td>10.66</td><td>9.78**</td><td>9.59**</td><td>9.00**</td></tr>
<tr><td>投与 92 日　解剖時</td><td>11.77</td><td>10.77**</td><td>11.03**</td><td>10.59**</td></tr>
</table>
**p<0.01：対照群に対する Dunnett 検定又は Welch 検定
器官重量：3.2 mg/kg の雄及び 3.2/4[a] mg/kg の雌で胸腺重量の低値</td><td>4169-NC-148</td></tr>
</table>

a：最高投与量群の雌では体重増加抑制が認められなかったため，投与 50 日より雌の投与量を 3.2 mg/kg から 4 mg/kg に増量した.

2.6.7.10.1　がん原性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>（続き）
ラット／SD</td><td>皮下（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5± 0.1／溶液）</td><td>13 週間</td><td>サテライト群：0.8，1.6，3.2/4 [a]</td><td>サテライト群：雌雄各 8 例（採血ポイント毎に雌雄各 3 例／群を使用）</td><td>評価せず</td><td>トキシコキネティクス：雌雄各 2～3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.8</th><th colspan="2">1.6</th><th>3.2</th><th>3.2/4 [a]</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>Cmax（ng /mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>288</td><td>320</td><td>759</td><td>521</td><td>1460</td><td>1190</td></tr>
<tr><td>投与 91 日</td><td>377</td><td>452</td><td>1410</td><td>1110</td><td>2440</td><td>2660</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>628</td><td>584</td><td>1480</td><td>1130</td><td>2730</td><td>2480</td></tr>
<tr><td>投与 91 日</td><td>1050</td><td>1250</td><td>2940</td><td>2240</td><td>4820</td><td>5970</td></tr>
</table></td><td>4169-NC-148</td></tr>
</table>

a：最高投与量群の雌では体重増加抑制が認められなかったため，投与 50 日より投与量を 3.2 mg/kg から 4 mg/kg に増量した．

2.6.7.10.2　がん原性試験：重要な試験

2.6.7.10.2A　トランスジェニックマウスにおける 26 週間反復皮下投与がん原性試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩
報告書の題名：AMG 416: 26-Week Repeated Dose Subcutaneous Carcinogenicity Study in Tg.rasH2 Mice
試験番号：116846
動物種／系統：マウス／CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (+/- hemizygous c-Ha-ras)
試験開始週齢：7 週齢　　投与期間：26 週間
CTD における記載箇所：4.2.3.4.1-2
初回投与年月日：雄：[redacted]年 7 月 8 日
雌：[redacted]年 7 月 10 日
GLP 適用：適用
投与方法：皮下（エテルカルセチド投与及び陰性対照群），腹腔内（陽性対照（ウレタン）投与群）
溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液
対照群の処置：陰性対照群は媒体又は生理食塩液（生食）を 26 週間反復皮下投与，陽性対照群は投与 1，3 及び 5 日にウレタンを腹腔内投与
投与量の設定根拠：4 週間反復皮下投与による用量設定試験の結果及び FDA CDER の Executive Carcinogenicity Assessment Committee（CAC）からの助言を踏まえ，最大耐量に基づき設定した．
特記事項：・投与部位を 7 カ所決め，毎日部位を変えて皮下投与
・サテライト動物には CByB6F1（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (-/- homozygous c-Ha-ras)）系マウスを用い，血漿中エテルカルセチド濃度を投与 1 日（初回投与）及び投与 177 日に測定（採血ポイント：投与後 15 分，1，2，4，8 及び 24 時間，ただし対照群は投与後 2 時間のみ）
がん原性：なし．

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		1000（ウレタン）		0.375	0.3	0.75	1	1.5	3
動物数　サテライト動物[a]	M:0	F:0	M:8	F:8	M:0	F:0	M:38	F:38	M:38	F:38	M:38	F:38
トキシコキネティクス												
投与 1 日　Cmax（ng/mL）	NA	NA	NE	NE	NA	NA	218	154	475	411	453	2020
AUClast（ng･h/mL）	NA	NA	NE	NE	NA	NA	194	176	429[c]	444	581[e]	1820
投与 177 日 Cmax（ng/mL）	NA	NA	NE	NE	NA	NA	142	126	334	381	466	1070
AUClast（ng･h/mL）	NA	NA	NE	NE	NA	NA	232	155[b]	625	528[d]	1040	1700

定量下限：1 ng/mL
NA：評価対象なし，NE：評価せず．
a：各採血ポイントには雌雄各 3 例／群を使用
b：投与後 24 時間は 2 例の測定値から算出，c：投与後 2 時間は 2 例の測定値から算出，d：投与後 24 時間は 2 例の測定値から算出
e：投与後 8 時間は 2 例の測定値から算出

2.6.7.10.2A　トランスジェニックマウスにおける26週間反復皮下投与がん原性試験　試験番号：116846（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		1000（ウレタン）		0.375	0.3	0.75	1	1.5	3
動物数	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25
死亡又は切迫剖検例数	2	2	1	0	4	2	1	0	1	0	2	1
計画剖検例数	23	23	24	25	6	8	24	25	24	25	23	24
生存率（%）	92	92	96	100	60	80	96	100	96	100	92	96
体重[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理評価動物数	25	25	25	25	10	10	25	25	25	25	25	25
エテルカルセチドに関連する腫瘍性病変	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
その他の腫瘍性病変[b]												
多中心性腫瘍												
血管肉腫：悪性，偶発性	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管肉腫：悪性，致死性	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
リンパ腫：悪性，偶発性	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
リンパ腫：悪性，致死性	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ハーダー氏腺												
腺腫：単発，良性，原発，偶発性	0	0	0	1	NE	NE	1	1	0	0	2	0
腺腫：多発，良性，原発，偶発性	0	0	0	0	NE	NE	0	0	0	1	0	0
腺癌：悪性，原発，偶発性	0	0	1	0	NE	NE	1	1	0	2	0	0
肝臓												
腺腫：良性，原発，偶発性	1	2	0	1	NE	NE	0	0	0	0	0	0

-：特記すべき所見なし．NE：評価せず．
a：陽性対照群では，ウレタン投与に伴う一般状態及び体重の変化が認められた．
b：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2A　トランスジェニックマウスにおける26週間反復皮下投与がん原性試験　試験番号：116846（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		1000（ウレタン）		0.375	0.3	0.75	1	1.5	3
動物数	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25
病理評価動物数	25	25	25	25	10	10	25	25	25	25	25	25
その他の腫瘍性病変[a]（続き）												
肺（気管支含む）												
細気管支肺胞上皮腺癌：悪性，原発，偶発性	1	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0
細気管支肺胞上皮腺腫：単発，良性，原発，偶発性	2	0	1	1	0	0	1	2	3	1	1	4
細気管支肺胞上皮腺腫：多発，良性，原発，偶発性	0	0	0	0	6	8	0	1	0	0	1	0
細気管支肺胞上皮腺腫：多発，良性，原発，致死性	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0
血管肉腫：悪性，原発，偶発性	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
唾液腺												
リンパ管腫：良性，原発，偶発性	1	0	0	0	NE	NE	0	0	0	0	1	0
皮膚												
乳頭腫：会陰，良性，原発，偶発性	0	0	0	0	NE	NE	0	0	0	0	1	0
皮膚（投与部位）												
乳頭腫：投与部位，良性，原発，偶発性	0	0	0	0	NE	NE	0	0	1	0	0	0
脾臓												
血管肉腫：悪性，原発，偶発性	1	1	2	1	6	7	2	4	1	2	2	0
血管肉腫：悪性，原発，致死性	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0

NE：評価せず.
a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2A　トランスジェニックマウスにおける26週間反復皮下投与がん原性試験　試験番号：116846（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		1000（ウレタン）		0.375	0.3	0.75	1	1.5	3
動物数	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25
病理評価動物数	25	25	25	25	10	10	25	25	25	25	25	25
その他の腫瘍性病変[a]（続き）												
胃												
扁平上皮癌：前胃，悪性，原発，偶発性	0	0	0	0	NE	NE	1	0	0	0	0	0
胸腺												
胸腺腫：良性，原発，偶発性	0	0	0	1	NE	NE	0	0	0	0	0	1
筋肉												
血管肉腫：悪性，原発，偶発性	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1	NE	NE	NE
前肢												
血管肉腫：悪性，原発，偶発性	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1	NE	NE	NE	NE
子宮												
血管肉腫：悪性，原発，偶発性	NA	0	NA	0	NA	NE	NA	0	NA	2	NA	0
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査－非腫瘍性病変	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし.
NA：評価対象なし.
NE：評価せず.
a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける2年間反復皮下投与がん原性試験　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：AMG 416: 24 Month Subcutaneous Carcinogenicity Study in the Sprague Dawley Rat
動物種／系統：ラット／SD　　投与期間：87～94 週間　　試験番号：116848
試験開始週齢：6 週齢　　CTD における記載箇所：4.2.3.4.1-5
初回投与年月日：[redacted]年 5 月 17 日　　GLP 適用：適用
投与方法：皮下
溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液
対照群の処置：対照群には媒体又は生理食塩液（生食）を皮下投与
投与量の設定根拠：13 週間反復皮下投与による用量設定試験の結果及び FDA CDER の Executive Carcinogenicity Assessment Committee（CAC）からの助言を踏まえ，最大耐量に基づき設定した．
特記事項：・投与部位を 4 カ所決め，毎日部位を変えて皮下投与
・投与 607 日に 1.6 mg/kg の雌の生存例が 20 例となったため，同群の雌の投与を中止し，投与 623 日及び 624 日にそれぞれ 1.6 及び 0.8 mg/kg の雌の生存例が 15 例となったため，同群の雌の剖検を実施した．また，投与 644 日に媒体対照群の生存例が雌雄各 20 例となったため，残りの全群の剖検を投与 653 日までに実施した．
・サテライト動物（雌雄各 5～9 例／群）を設け，血漿中エテルカルセチド濃度を投与 183 日に測定（採血ポイント：投与前，投与後 30 分，1，2，5，及び 8 時間，ただし対照群は投与後 30 分のみ）
がん原性：なし．

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数　サテライト動物[a]	M:5	F:5	M:5	F:5	M:9	F:9	M:9	F:9	M:9	F:9	M:9	F:9
トキシコキネティクス（投与 183 日）												
Cmax（ng/mL）	NE	NE	NE	NE	126	110	282	241[b]	505	392	1120	884
AUClast（ng･h/mL）	NE	NE	NE	NE	241	214	537	542[b]	962	772	2150	1900

定量下限：1 ng/mL
NE：評価せず．
a：各採血ポイントには雌雄各 3 例／群を使用
b：投与後 30 分，2 及び 8 時間は 2 例の測定値から算出

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
死亡又は切迫剖検	40	41	45	45	40	44	49	47	42	50	46	50
計画剖検	25	24	20	20	25	21	16	18	23	15	19	15
生存率（%）	38.5	36.9	30.8	30.8	38.5	32.3	24.6	27.7	35.4	23.1	29.2	23.1
体重[a]（g，%）												
投与 182 日	683.6	341.7	693.9	353.9	0	-1	-2	-1	-2	+3	-6*	0
投与 364 日	793.6	407.0	789.9	420.7	0	0	0	+1	-2	+4	-10**	-4
投与 532 日	840.0	469.6	807.3	479.1	+5	-2	+3	0	0	+2	-8*	-5
投与 644 日	836.4	481.2	824.2	518.7	-4	-5	-2	-4	-6	NA[c]	-12*	NA[c]
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
エテルカルセチドに関連する腫瘍性病変	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[b]												
副腎												
皮質腺腫：良性，原発	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
褐色細胞腫：良性，原発	9	3	6	3	5	0	12	2	4	0	2	0
褐色細胞腫：悪性，原発	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	2	0
骨												
骨肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
骨髄（大腿骨）												
血管腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

* $p<0.05$，** $p<0.01$：対照群に対する検定
-：特記すべき所見なし．
NA：評価対象なし．
a：対照群は平均値を示す．投与群は媒体対照群との差を%で示す．なお，統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．
b：所見の認められた動物数
c：0.8 及び 1.6 mg/kg の雌は，投与 623 日又は 624 日に生存例が 15 例となり，その時点で全例の剖検を実施したため，投与 644 日の体重は評価対象なし．

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
脳												
星状膠細胞腫：悪性，原発	1	1	2	0	1	2	1	0	3	0	1	1
腺癌：下垂体前葉，悪性，転移	0	2	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0
顆粒細胞腫：良性，原発	1	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0
稀突起膠細胞腫：悪性，原発	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
細網症：悪性，原発	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
腹腔												
線維肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
中皮腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
陰核腺												
扁平上皮癌：悪性，原発	NA	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
精巣上体												
中皮腫：良性，原発	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
眼												
扁平上皮癌：悪性，原発	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
心臓												
房洞中皮腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
心内膜シュワン細胞腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
投与部位（肩甲部）												
線維腫：良性，原発	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
乳頭腫：線維性，良性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

NA：評価対象なし.
a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
腎臓												
尿細管腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
脂肪腫：良性，原発	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脂肪肉腫：悪性，原発	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大腸，結腸												
平滑筋腫：良性，原発	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
大腸，直腸												
平滑筋腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
肝臓												
肝細胞腺腫：良性，原発	1	0	4	0	2	0	2	0	2	0	1	0
肝細胞癌：悪性，原発	1	0	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0
肺												
腺癌：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
細気管支肺胞上皮腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
褐色細胞腫：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
腸間膜リンパ節												
血管肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
乳腺												
腺癌：悪性，原発	1	28	0	22	0	18	1	17	1	21	0	21
脂肪腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
線維腺腫：良性，原発	3	19	0	28	1	10	1	13	0	19	0	20

a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
多中心性腫瘍												
顆粒球性白血病：悪性，多中心性	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
リンパ腫：悪性，多中心性	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	2
組織球性肉腫：悪性，多中心性	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
卵巣												
生殖索間葉腫瘍：良性，原発	NA	0	NA	0	NA	2	NA	1	NA	1	NA	1
生殖索間葉腫瘍：悪性，原発	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0
膵臓												
腺房細胞腺腫：良性，原発	2	0	0	0	2	0	1	1	2	0	0	0
島細胞腺腫：良性，原発	4	0	6	2	4	0	2	0	10	0	2	0
島細胞癌：悪性，原発	5	1	4	2	1	1	0	0	0	0	1	0
上皮小体												
腺腫：良性，原発	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0
下垂体												
下垂体前葉腺腫：良性，原発*	37	49	35	49	35	56	39	56	40	57	29	46
下垂体前葉腺癌：悪性，原発	0	2	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0
頭蓋咽頭腫：悪性，原発	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
シュワン細胞腫：悪性，原発	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
包皮腺												
扁平上皮癌：悪性，原発	2	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
前立腺												
腺癌：悪性，原発	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
腺腫：良性，原発	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA

*：雌においてPeto検定で有意差が認められた.
NA：評価対象なし.
a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
顎下腺												
シュワン細胞腫：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
耳下腺												
腺腫：良性，原発	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
シュワン細胞腫：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
舌下腺												
シュワン細胞腫：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
骨格筋，肋間												
血管肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
皮膚												
基底細胞腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
皮脂腺腫：良性，原発	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
基底細胞癌：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
皮脂腺癌：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
線維肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
角化棘細胞腫：良性，原発	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0	1	1
線維性乳頭腫：良性，原発	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
扁平上皮乳頭腫：良性，原発	1	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
毛基質腫：良性，原発	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける2年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
皮膚，皮下												
線維腫：良性，原発	2	0	0	0	1	0	2	0	3	0	0	0
線維肉腫：悪性，原発	2	0	2	1	1	0	1	0	2	0	1	0
血管周皮腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
脂肪腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
脂肪肉腫：悪性，原発	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
骨肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
シュワン細胞腫：悪性，原発	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	0
小腸，回腸												
腺癌：悪性，原発	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
脊髄（頸部）												
細網症：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
脊髄（腰部）												
細網症：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
脊髄（胸部）												
細網症：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
脾臓												
線維肉腫：悪性，転移	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管肉腫：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
腺胃												
腺癌：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
前胃												
扁平上皮癌：悪性，原発	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
精巣												
間細胞腺腫：良性，原発	1	NA	1	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
胸腺												
胸腺腫：良性，原発	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
甲状腺												
C 細胞腺腫：良性，原発	12	3	2	7	3	4	2	4	2	4	2	1
濾胞細胞腺腫：良性，原発	1	1	1	0	1	0	1	3	4	0	0	0
C 細胞癌：悪性，原発	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
濾胞上皮細胞癌：悪性，原発	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
舌												
扁平上皮癌：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
膀胱												
腺癌：悪性，転移	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
子宮（頸部を含む）												
腺癌：悪性，原発	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0
顆粒細胞腫：良性，原発	NA	3	NA	0	NA	0	NA	2	NA	1	NA	1
平滑筋腫：良性，原発	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
腺様ポリープ：良性，原発	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0
間質ポリープ：良性，原発	NA	5	NA	3	NA	3	NA	5	NA	4	NA	2
間質肉腫：悪性，原発	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	1

NA：評価対象なし.
a：所見の認められた動物数

2.6.7.10.2B　　ラットにおける２年間反復皮下投与がん原性試験　　試験番号：116848（続き）

投与量（mg/kg）	0（生食対照）		0（媒体対照）		0.2		0.4		0.8		1.6	
動物数	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65	M:65	F:65
病理評価動物数	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
その他の腫瘍性病変（自然発生性）[a]（続き）												
膣												
扁平上皮癌：悪性，原発	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0
顆粒細胞腫：良性，原発	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA	1
間質肉腫：悪性，転移	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
外耳道腺												
腺腫：外耳道腺，良性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
皮脂腺癌：悪性，原発	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
腺癌：外耳道腺，悪性，原発	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査－非腫瘍性病変[a]												
投与部位（肩甲部）：線維化	2	1	43	35	36	29	40	28	56	25	52	28

-：特記すべき所見なし．
NA：評価対象なし．
a：所見の認められた動物数

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

2.6.7.11A　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg）	一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
ラット／SD	静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）	雄：交配前 28 日～剖検前日 雌：交配前 14 日～妊娠 7 日	0，0.75，1.5，3	雌雄各 25 例／群	0.75 mg/kg 以上：投与量に応じた血清 Ca の低値 3 mg/kg　：振戦，流涎，体重増加抑制，摂餌量の減少 Ca（mg/dL）：雌雄各 8 例／群の平均値 投与量（mg/kg）　0　0.75　1.5　3 交配前期間終了時　投与後 8 時間　雄　10.8　10.1**　9.4**　8.7** 雌　11.0　10.3**　10.0**　9.3** **p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定 剖検，生殖器官（下垂体，精巣，精巣上体及び卵巣）重量，交尾率，受胎率，性周期，交配所要日数，黄体数，着床数，生存胚数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率及び精子検査に影響なし． 受胎能及び初期胚発生に対する無毒性量：3 mg/kg	4169-NC-152

2.6.7.11B　ラットにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg）	一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
ラット／SD	静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）	妊娠 6～17 日	0，0.5，1.5，3，4.5	妊娠雌 8 例／群	母動物： 1.5 mg/kg 以上：投与量に応じた血清 Ca の低値 3 mg/kg 以上：振戦，立毛，生殖器周囲の汚染，体重増加抑制及び摂餌量の減少 4.5 mg/kg：体重減少，1 例死亡（妊娠 17 日） Ca（mg/dL）：7～8 例／群の平均値 投与量（mg/kg）　0　0.5　1.5　3　4.5 妊娠 6 日　投与後 8 時間　11.0　10.7　9.7**　9.4**　8.9** 妊娠 17 日　投与後 8 時間　10.6　10.5　9.4**　8.5**　8.0** **p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定 胚・胎児： 4.5 mg/kg：胎児体重の低値 黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，性比，胎児の外表に影響なし．	4169-NC-140

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

2.6.7.11C　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

<table>
<tr><th>動物種
／系統</th><th>投与方法
（溶媒／投与形態）</th><th>投与
期間</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>一群の
動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験
番号</th></tr>
<tr><td>ラット
／SD</td><td>静脈内急速
（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>妊娠 6～17 日</td><td>0，0.8，1.6，3.2</td><td>妊娠雌
24～25 例／群</td><td>母動物：
0.8 mg/kg 以上：投与量に応じた血清 Ca の減少
3.2 mg/kg　：被毛の汚れ，体重増加抑制，摂餌量の減少
Ca（mg/dL）：8 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.8</th><th>1.6</th><th>3.2</th></tr>
<tr><td>妊娠 6 日　投与後 8 時間</td><td>10.6</td><td>9.9**</td><td>9.3**</td><td>8.8**</td></tr>
<tr><td>妊娠 17 日　投与後 8 時間</td><td>11.1</td><td>10.3*</td><td>9.9**</td><td>8.9**</td></tr>
</table>
*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定

胚・胎児：
黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重，性比，胎児の外表，内臓及び骨格に影響なし．

母動物に対する無毒性量：1.6 mg/kg
胚・胎児に対する無毒性量：3.2 mg/kg</td><td>4169-NC-150</td></tr>
</table>

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

2.6.7.11D　ウサギにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>一群の動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>ウサギ／NZW</td><td>静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>妊娠 7～20 日</td><td>0，0.5，1.5，2.25，3</td><td>妊娠雌 5～6 例／群</td><td>母動物：
0.5 mg/kg 以上：投与量に応じた血清 Ca の低値
1.5 mg/kg 以上：振戦，咀嚼様運動，流涎，糞便数の減少，便の小型化，軟便，体重及び摂餌量の減少
2.25 mg/kg：1 例流産（妊娠 21 日）
3 mg/kg：呼吸促迫，2 例死亡（妊娠 9 日）
Ca（mg/dL）：4～6 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.5</th><th>1.5</th><th>2.25</th><th>3</th></tr>
<tr><td>妊娠 7 日　投与後 8 時間</td><td>14.8</td><td>12.6**</td><td>11.6**</td><td>11.5**</td><td>10.8**</td></tr>
<tr><td>投与後 24 時間</td><td>15.4</td><td>15.1</td><td>14.6</td><td>13.2**</td><td>13.5**</td></tr>
<tr><td>妊娠 20 日　投与後 8 時間</td><td>14.3</td><td>12.0*</td><td>9.8**</td><td>8.4**</td><td>7.5**</td></tr>
<tr><td>投与後 24 時間</td><td>13.8</td><td>13.7</td><td>12.3</td><td>13.0</td><td>9.7**</td></tr>
</table>
*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定

トキシコキネティクス：4～6 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0.5</th><th>1.5</th><th>2.25</th><th>3</th></tr>
<tr><td>妊娠 7 日　C5min（ng/mL）</td><td>1750</td><td>4250</td><td>6490</td><td>9060</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td>7900</td><td>19700</td><td>28500</td><td>41500</td></tr>
<tr><td>妊娠 20 日　C5min（ng/mL）</td><td>1680</td><td>5010</td><td>7670</td><td>9250</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td>7490</td><td>23100</td><td>34100</td><td>45000</td></tr>
</table>
胚・胎児：
2.25 mg/kg 以上：胎児体重の低値
黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重，胎児の外表に影響なし．</td><td>4169-NC-141</td></tr>
</table>

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

2.6.7.11E　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>一群の動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>ウサギ／NZW</td><td>静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>妊娠 7～20 日</td><td>0，0.375，0.75，1.5</td><td>妊娠雌 20 又は 22 例／群</td><td>母動物：
0.375 mg/kg 以上：投与量に応じた血清 Ca の減少
1.5 mg/kg　：糞便数の減少，便の小型化，体重増加抑制，摂餌量の減少
Ca（mg/dL）：7～8 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.375</th><th>0.75</th><th>1.5</th></tr>
<tr><td>妊娠 7 日　投与後 8 時間</td><td>15.0</td><td>14.4</td><td>13.9</td><td>12.9**</td></tr>
<tr><td>投与後 24 時間</td><td>15.0</td><td>14.9</td><td>15.0</td><td>14.2</td></tr>
<tr><td>妊娠 20 日　投与後 8 時間</td><td>14.2</td><td>12.3**</td><td>11.3**</td><td>9.7**</td></tr>
<tr><td>投与後 24 時間</td><td>14.4</td><td>14.0</td><td>13.9</td><td>12.6*</td></tr>
</table>
*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定

胚・胎児：
黄体数，着床数，着床前胚死亡率，着床後胚死亡率，生存胎児数，死亡胎児数，胎児体重，性比，胎児の外表，内臓及び骨格に影響なし．

母体に対する無毒性量：0.75 mg/kg
胚・胎児に対する無毒性量：1.5 mg/kg</td><td>4169-NC-149</td></tr>
</table>

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

2.6.7.12A　ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

報告書の題名：AMG 416: Fertility and Embryo-Fetal Development Study in the Sprague Dawley Rat

試験計画：ICH4.1.1 及び 4.1.3 に準拠　投与期間：雄：交配前 28 日～剖検前日，雌：交配前 15 日～妊娠 17 日　試験番号：119088

動物種／系統：ラット／SD　交尾成立日：妊娠 0 日　CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-3

試験開始週齢：雄：約 11 週齢，雌：約 12 週齢　帝王切開日：妊娠 21 日　GLP 適用：適用

初回投与年月日：[redacted]年 3 月 4 日　投与方法：静脈内急速

溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH 4.5 ± 0.1／溶液

特記事項：なし.

無毒性量：F_0 雄：0.75 mg/kg，F_0 雌：0.75 mg/kg，F_1 胎児：3 mg/kg

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
雄：評価例数	25	25	25	25
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0
一般状態 [a]				
振戦	0/0	0/0	2/2	298/25
脱水	0/0	0/0	0/0	170/23
円背	0/0	0/0	0/0	99/14
運動失調	0/0	0/0	0/0	24/14
平伏姿勢	0/0	0/0	0/0	39/13
ラッセル音	0/0	0/0	0/0	15/13
虚脱	0/0	0/0	0/0	23/8
流涎	1/1	1/1	6/3	8/7
自発運動減少	0/0	0/0	0/0	10/6
つま先歩行	0/0	0/0	0/0	39/5
耳介蒼白	0/0	0/0	0/0	5/4
呼吸促迫	0/0	0/0	0/0	2/2
削痩	0/0	0/0	0/0	1/1
剖検	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし.

a：延べ発現数／発現した動物数

2.6.7.12A　　ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験　　試験番号：119088（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
雄（続き）：評価例数	25	25	25	25
体重（%[a]）				
投与 28 日	464.2 g	-2	-3	-12**
投与 57 日	533.6 g	-3	-5*	-15**
体重増加量（%[a]）				
投与 1～28 日	101.0 g	-8	-13*	-55**
投与 1～57 日	170.4 g	-9	-13*	-46**
摂餌量（%[a]）				
投与 1～28 日	22.9 g/day	0	-3	-19**
投与 1～57 日	23.4 g/day	0	-3	-16**
平均交配所要日数	3.0	2.7	2.6	2.4
交尾率（%）	100	96	100	100
授胎率（%）	92	100	92	92
生殖器官（精巣，精巣上体，前立腺及び精嚢）重量	-	-	-	-
精子運動率	-	-	-	-
精子濃度	-	-	-	-
雌／母動物：評価例数	25	25	25	25
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0
交配前　一般状態[b]				
脱水	0/0	0/0	0/0	113/20
振戦	0/0	0/0	2/1	63/18
運動失調	0/0	0/0	1/1	20/9
平伏姿勢	0/0	0/0	1/1	17/9
虚脱	0/0	0/0	1/1	16/8
円背	0/0	0/0	0/0	29/7
耳介蒼白	0/0	0/0	0/0	12/6

*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定
-：特記すべき所見なし．
a：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．
b：延べ発現数／発現した動物数

2.6.7.12A　　ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験　　試験番号：119088（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
雌／母動物（続き）：評価例数	25	25	25	25
交配前　一般状態（続き）[a]				
自発運動減少	0/0	0/0	0/0	9/5
皮膚温低下	0/0	0/0	0/0	4/4
つま先歩行	0/0	0/0	0/0	8/3
散瞳	0/0	0/0	0/0	2/2
異常発声	0/0	0/0	0/0	2/1
正向反射障害	0/0	0/0	0/0	1/1
妊娠期間　一般状態[a]				
振戦	0/0	0/0	2/1	77/17
運動失調	0/0	0/0	1/1	23/11
平伏姿勢	0/0	0/0	1/1	21/8
虚脱	0/0	0/0	1/1	19/8
円背	0/0	0/0	0/0	31/8
耳介蒼白	0/0	0/0	0/0	27/8
自発運動減少	0/0	0/0	0/0	9/3
つま先歩行	0/0	0/0	0/0	6/3
異常発声	0/0	0/0	0/0	3/1
流涎	0/0	0/0	26/6	57/15
膣周囲汚染	0/0	0/0	0/0	4/2
四肢蒼白	0/0	0/0	0/0	2/1
呼吸促迫	0/0	0/0	0/0	1/1
剖検	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし.
a：延べ発現数／発現した動物数

2.6.7.12A　　ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験　　試験番号：119088（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
雌／母動物（続き）：評価例数（妊娠動物数）[a]	25（23）	25（25）	25（23）	25（23）
交配前　体重（%[b]）				
投与 8 日	265.8 g	+2	+1	-4*
投与 11 日	271.0 g	+2	+1	-4*
交配前　体重増加量（%[b]）				
投与 4～8 日	6.4 g	+16	-8	-163**
投与 1～15 日	14.0 g	+2	+30	-36
妊娠期間　体重（%[b]）				
妊娠 7 日	309.3 g	+3	-1	-6**
妊娠 18 日	391.6 g	+3	-1	-5*
妊娠 21 日	447.7 g	+3	-1	-4
妊娠期間　体重増加量（%[b]）				
妊娠 0～7 日	30.1 g	-2	-7	-35**
妊娠 7～10 日	12.9 g	+9	-7	+5
妊娠 10～12 日	10.6 g	+7	+6	+14
妊娠 12～15 日	15.8 g	-2	0	+9
妊娠 15～18 日	43.0 g	+2	-3	-12
妊娠 0～21 日	168.6 g	+3	0	-7
子宮重量補正[c]後の母動物の体重増加量（%[b]）	59.4 g	+9	+2	-10
交配前　摂餌量（%[b]）				
投与 1～15 日	16.2 g/day	+3	+1	-22**
妊娠期間　摂餌量（%[b]）				
妊娠 0～7 日	19.3 g/day	4	-4	-13**
平均発情期回数／14 日	3.2	3.4	3.2	2.7
発情間期が 6 日以上持続した例数	0	0	1	5**

*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定
a：交配前の評価は全例，妊娠期間の評価は妊娠動物を対象とした．
b：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．
c：妊娠 21 日の母体体重から胎児を含む子宮重量を減じて補正

2.6.7.12A　　ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験　　試験番号：119088（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
雌／母動物（続き）：評価例数	25	25	25	25
平均交配所要日数	3.0	2.8	2.6	2.4
交尾率（%）	100	100	100	100
受胎率（%）	92	100	92	92
妊娠例数	23	25	23	23
流産又は全胚吸収例数	0	0	0	0
平均黄体数[a]	16.1	16.6	16.3	15.3
平均着床数[a]	15.7	15.5	15.4	14.5
平均着床前胚死亡率（%）[a]	2.1	7.3	4.8	5.4
胎児：				
評価母動物数	23	25	23	23
平均生存胎児数／腹	14.7	14.5	14.3	13.3
平均吸収胚数／腹	1.0	1.0	1.1	1.2
死亡胎児数	0	0	0	0
平均着床後胚死亡率（%）	6.2	6.0	7.4	8.8
平均胎児体重（%[b]）				
雄	5.63 g	+2	+2	+4
雌	5.32 g	+4	+2	+5
胎児の性比（%　雄）	48.0	47.3	54.2	51.7
胎児の異常				
外表異常（%）	-	-	-	-
内臓異常（%）	-	-	-	-
骨格異常（%）	-	-	-	-
骨化進行度	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし.
a：妊娠動物を評価対象とした.
b：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す.

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

2.6.7.13A　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

報告書の題名：AMG 416: Embryo-Fetal Development Study in the New Zealand White Rabbit

試験計画：ICH 4.1.3 準拠　投与期間：妊娠 7～19 日　試験番号：119089

動物種／系統：ウサギ／NZW　交尾成立日：妊娠 0 日　CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-6

試験開始月齢：6～7 カ月齢　帝王切開日：妊娠 29 日　GLP 適用：適用

初回投与年月日：[redacted]年 2 月 24 日　投与方法：静脈内急速

溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH 4.5 ± 0.1／溶液

特記事項：妊娠 11 日に母動物の血漿中エテルカルセチド濃度を測定（採血ポイント：投与後 5 分，8 時間，24 時間）

無毒性量：F_0 雌：0.75 mg/kg，F_1 胎児：1.5 mg/kg

投与量（mg/kg）	0	0.375	0.75	1.5
雌／母動物：				
トキシコキネティクス　妊娠 11 日				
動物数[a]	9	9	9	9
C5min（ng/mL）	NE	879	2000	4430
AUClast（ng·h/mL）	NE	4070	9010	20800

定量下限：2 ng/mL

NE：評価せず.

a：各採血ポイントに動物を 3 例使用

2.6.7.13A　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験　　試験番号：119089（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.375	0.75	1.5
雌／母動物（続き）：動物数	22	22	22	22
交配例数	22	22	22	22
妊娠例数	21	22	21	22
死亡又は切迫剖検例数	0	2[d]	1[d]	1[d]
流産又は全胚吸収例数	0	0	0	0
一般状態[a]				
糞便数の減少	15/4	18/8	20/5	38/10
剖検	-	-	-	-
母動物　体重[b]	-	-	-	-
母動物　体重増加量（%[c]）：評価例数[b]	21	22	21	22
妊娠 7～20 日	0.16 kg	-13	+25	0
妊娠 20～29 日	0.19 kg	0	-5	-16
妊娠 7～29 日	0.35 kg	0	+9	-11
母動物　摂餌量（%[c]）：評価例数[b]	21	22	21	22
妊娠 7～20 日	123.1 g/day	-7	-2	-14**
妊娠 20～29 日	117.9 g/day	-3	+1	+1
妊娠 7～29 日	121.0 g/day	-4	-1	-8

**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定
-：特記すべき所見なし.
a：延べ発現数／発現した動物数
b：妊娠動物のみを評価対象とした.
c：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を％で示す．統計学的有意差は実測値に基づく（％ではない）.
d：エテルカルセチドの投与に起因しないと考えられる摂餌量の減少に伴う体重減少のため切迫剖検した．いずれの動物も妊娠していた.

2.6.7.13A　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験　　試験番号：119089（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.375	0.75	1.5
雌／母動物（続き）：評価例数	21	20	20	21
平均黄体数	10.1	10.0	9.9	9.8
平均着床数	8.8	9.5	9.5	9.1
平均着床前胚死亡率（%）	11.0	4.1	4.0	6.8
胎児：				
評価母動物数	21	20	20	21
平均生存胎児数／腹	8.5	9.2	9.3	8.8
平均吸収胚数／腹	0.3	0.3	0.2	0.3
死亡胎児数	0	0	0	0
平均着床後胚死亡率（%）	3.1	2.8	2.1	3.6
平均胎児体重（%[a]）				
雄	43.63 g	-3	-2	-6
雌	42.11 g	-4	-2	-3
胎児の性比（% 雄）	42.9	48.8	47.1	43.1
胎児の異常				
外表異常（%）	-	-	-	-
内臓異常（%）	-	-	-	-
骨格異常（%）	-	-	-	-
骨化進行度	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし.
a：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す.

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

2.6.7.14A　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

報告書の題名：AMG 416: Pre- and Postnatal Development Study in the Sprague-Dawley Rat

試験計画：ICH 4.1.2 準拠　投与期間：妊娠 7 日～授乳 20 日　試験番号：116847

動物種／系統：ラット／SD　交尾成立日：妊娠 0 日　CTD における記載箇所：4.2.3.5.3-1

試験開始週齢：約 9 週齢　GLP 適用：適用

初回投与年月日：[redacted]年 7 月 8 日　投与方法：静脈内急速

溶媒／投与形態：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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH 4.5 ± 0.1.／溶液

同腹児の調整／非調整：非調整

特記事項：・サテライト動物（妊娠ラット）を設け，妊娠 7 日，20 日（採血ポイント：投与後 5 分，2，5，8，24 時間）及び 21 日（採血ポイント：投与後 1 時間）の血漿中エテルカルセチド濃度を測定.

・妊娠 21 日にサテライト動物を帝王切開し，母動物 1 例毎の胎児血漿をプールしてエテルカルセチド濃度を測定（採血ポイント：母動物の投与後 2 時間以内）

無毒性量：F_0 母動物：0.75 mg/kg，F_1：生存及び発育に対して 0.75 mg/kg，性成熟，行動機能及び生殖機能に対して 3 mg/kg

投与量（mg/kg）		0	0.75	1.5	3
サテライト動物：動物数		3	4	3	3
C5min（ng/mL）	妊娠 7 日	NA	984	2190	4280
	妊娠 20 日	NA	1590	2970	6840
AUClast（ng·h/mL）	妊娠 7 日	NA	1330	2710	5560
	妊娠 20 日	NA	2240	4050	8640
母動物の血漿中濃度（ng/mL）	妊娠 21 日投与後 1 時間	LLOQ	234	487	928
胎児の血漿中濃度（ng/mL）	妊娠 21 日投与後 2 時間以内	LLOQ	6.76	13.5	22.3
胎児／母動物　血漿中濃度比（%）		NA	2.99	2.86	2.39

LLOQ：定量下限（1 ng/mL）未満

NA：評価対象なし.

2.6.7.14A　　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験　　試験番号：116847（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
雌／母動物（続き）：動物数	25	25	25	25
妊娠例数	25	25	23	25
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	1
妊娠期間　一般状態[a]				
流涎	0/0	0/0	1/1	45/17
振戦	0/0	0/0	0/0	11/5
授乳期間　一般状態[a]				
流涎	0/0	1/1	35/8	229/25
振戦	0/0	1/1	5/5	194/25
脱水	0/0	0/0	0/0	9/5
円背	0/0	0/0	0/0	5/4
腹部被毛の汚れ	0/0	2/1	7/2	14/5
削痩	0/0	0/0	0/0	2/2
剖検	-	-	-	-
妊娠期間　体重[b]（%[c]）　妊娠 20 日	367.0 g	+1	+2	-4*
妊娠期間　体重増加量[b]（%[c]）妊娠 7～20 日	103.8 g	+5	+6	-15**
授乳期間　体重（%[c]）　授乳 7 日	303.0 g	+1	0	-4*
授乳期間　体重増加量	-	-	-	-
妊娠期間　摂餌量[b]（%[c]）妊娠 7～20 日	20.0 g/day	0	+2	-8**
授乳期間　摂餌量（%[c]）　授乳 1～14 日	47.4 g/day	+1	0	-9**
異常分娩	0	0	0	0
平均妊娠期間（日）	22.4	22.4	22.7	22.8*

*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定
-：特記すべき所見なし．
a：延べ発現数／発現した動物数
b：妊娠動物のみを評価対象とした．
c：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を％で示す．統計学的有意差は実測値に基づく（％ではない）．

2.6.7.14A　　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験　　試験番号：116847（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
F_1 胎児（離乳前）：				
評価母動物数	25	25	23	25[c]
平均出生児数／腹	14.0	14.5	14.6	13.5
平均生産児数／腹	13.9	14.5	14.5	13.2
生産児数（%）	348（99.7）	362（99.7）	334（99.4）	329（97.3）**
平均死産児数／腹	0.0	0.0	0.1	0.2
生後 4 日生存率（%）	98.6	99.4	98.8	95.1**
生後 4 日～離乳時（生後 21 日）までの生存率（%）	99.4	100.0	98.5	99.3
出生児体重／腹（%[a]）				
生後 1 日	6.4 g	-2	-3	-8**
生後 4 日	9.1 g	-4	-7*	-13**
生後 7 日	13.1 g	-5	-8*	-15**
生後 14 日	24.9 g	-3	-6*	-13**
生後 18 日	31.0 g	-3	-6	-9*
生後 21 日	37.8 g	-3	-6	-9
出生児性比　生後 1 日（%　雄）	50.0	49.3	46.9	45.5
出生児一般状態[b]　脱水	28/4	13/1	64/3	147/11
出生児剖検	-	-	-	-

*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定，Dunn 検定又は Fisher の直接確率検定
-：特記すべき所見なし．
a：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．
b：延べ発現数／発現した動物数
c：薬理作用に基づく血清 Ca の低下に伴う一般状態の悪化のため，生後 17 日に母動物 1 例を切迫剖検した．そのため，同母動物の産児を同日にすべて安楽死し，以降の評価は実施しなかった．

2.6.7.14A　　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験　　試験番号：116847（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
F_1 雄（離乳後）：評価児数	25	25	25	25
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-
雄性生殖器官重量	-	-	-	-
体重（%[a]）				
生後 22 日	43.6 g	-4	-8*	-9*
生後 29 日	84.0 g	0	-5	-7*
体重増加量	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-
陰茎包皮の剥離（平均発現日，生後）	45.2	45.0	45.9	46.1
行動機能検査				
受動回避反応	-	-	-	-
自発運動	-	-	-	-
学習能力（水迷路試験）	-	-	-	-
交配成立雄例数	24	25	24[b]	25
妊娠成立雄例数	23	25	24[b]	23

*$p \leq 0.05$：対照群に対する Dunnett 検定又は Dunn 検定
-：特記すべき所見なし．
a：対照群は平均値を示す．投与群は対照群との差を%で示す．統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）．
b：生後 24 日に 1.5 mg/kg の F_1 雌に割り当てられた 1 例が雄であることが判明したため，同用量の雄 1 例では交配対象動物がいなかった．同例を評価対象から除外したため，実際の評価例数は 24 例となった．

2.6.7.14A　　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験　　試験番号：116847（続き）

投与量（mg/kg）	0	0.75	1.5	3
F_1 雌（離乳後）：評価児数	25	25	24[a]	25
死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-
雌性生殖器官重量	-	-	-	-
交配前　体重	-	-	-	-
交配前　体重増加量	-	-	-	-
妊娠期間　体重	-	-	-	-
妊娠期間　体重増加量	-	-	-	-
交配前　摂餌量	-	-	-	-
妊娠期間　摂餌量	-	-	-	-
膣開口（平均発現日，生後）	33.1	33.4	32.9	33.1
行動機能検査				
受動回避反応	-	-	-	-
自発運動	-	-	-	-
学習能力（水迷路試験）	-	-	-	-
平均交配所要日数	4.1	2.0*	2.9	2.4
交尾確認例数	24	25	24	25
妊娠例数	23	25	24	23
平均黄体数	15.6	16.5	16.4	16.4
平均着床数	15.5	15.9	15.3	15.7
平均着床前胚死亡率（%）	1.1	3.2	6.7**	4.2
平均生存胚数／腹	14.8	15.0	14.6	14.8
平均死亡胚数／腹	0.6	1.0	0.7	0.9
平均着床後胚死亡率（%）	4.0	6.1	4.3	5.6

*p≤0.05，**p≤0.01：対照群に対する Dunnett 検定，Dunn 検定又は Fisher の直接確率検定
-：特記すべき所見なし．
a：生後 24 日に 1 例が雄であることが判明したため，同例を評価対象から除外した．

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当する試験なし.

2.6.7.16 局所刺激性試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

動物種／系統	投与方法	投与液濃度（投与容量）	性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
イヌ／ビーグル犬	静脈内（橈側皮静脈），伏在静脈周囲皮下 媒体：10 mmol/L コハク酸緩衝液（塩化ナトリウム 0.85%含有），pH 3.3 ± 0.5	0（注射用水），5 mg/mL（3 mL/例）	雄 3 例／群	投与部位の肉眼及び病理組織学的検査の結果，影響なし.	117458（GLP）

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　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

2.6.7.17.1A　エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの Ames 試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩，KP-2326，KP-2140 及び KP-2067

報告書の題名：Mutagenicity of KP-2326, KP-2140,KP-2067 and AMG 416 in TA1535 in the Absence of S9 Activation　試験番号：117144
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験　CTD における記載箇所：4.2.3.7.3-1
菌株：*Salmonella typhimurium* TA1535　GLP 適用：非適用
独立した試験数：1　プレート数：3　処理年月：[redacted]年 10 月
代謝活性化系：なし　分析細胞数／該当せず
溶媒：被験物質：10 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1
処理：プレート法，37℃で 48～72 時間のインキュベーション
特記事項：・KP-2326：エテルカルセチドの 2 位 D-Ala と 4 位 D-Arg を入れ替えたペプチド
・KP-2140：エテルカルセチドの D-Cys 及び L-Cys 脱離体
・KP-2067：エテルカルセチドの L-Cys 脱離体（D-アミノ酸ペプチド体）
細胞毒性：なし
遺伝毒性：・KP-2140 及び KP-2067：遺伝子突然変異誘発性なし（KP-2067 では媒体対照値の 2.2 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められたが，用量に応じた増加ではなかった）
・KP-2326 及びエテルカルセチド塩酸塩：復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）
		TA1535
10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	12 ± 2
KP-2326	15	10 ± 2
	50	15 ± 3
	151	14 ± 3
	504	15 ± 3
	1512	19 ± 2
	5041	36 ± 5
アジ化ナトリウム	1.0	1125 ± 110

2.6.7.17.1A　エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの Ames 試験　試験番号：117144（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）*
		TA1535
10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	12 ± 6
KP-2140	15	10 ± 5
	49	9 ± 1
	146	6 ± 2
	488	12 ± 3
	1463	9 ± 6
	4876	11 ± 2
アジ化ナトリウム	1.0	1379 ± 60
10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	11 ± 3
KP-2067	15	13 ± 1
	49	9 ± 2
	148	10 ± 2
	493	20 ± 5
	1480	24 ± 9
	4933	18 ± 5
アジ化ナトリウム	1.0	1045 ± 146
10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	9 ± 2
エテルカルセチド塩酸塩	15	13 ± 6
	50	12 ± 3
	150	15 ± 3
	500	21 ± 6
	1500	27 ± 7
	5000	48 ± 7
アジ化ナトリウム	1.0	860 ± 171

2.6.7.17.1B　エテルカルセチドの L-Cys 脱離体（KP-2067）の Ames 試験

被験物質：KP-2067
試験番号：117418
CTD における記載箇所：4.2.3.7.3-2
GLP 適用：非適用
処理年月：[redacted]年 1 月

報告書の題名：Mutagenicity of KP-2067 in TA1535 in the Absence of S9 Activation
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
菌株：*Salmonella typhimurium* TA1535
独立した試験数：1　　プレート数：3
代謝活性化系：なし　　分析細胞数／培養：該当せず
溶媒：被験物質：10 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1
処理：プレート法，37℃で 48～72 時間のインキュベーション
細胞毒性：なし
遺伝毒性：遺伝子突然変異誘発性なし（媒体対照値の 3 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められたが，用量に応じた増加ではなかった）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）
		TA1535
10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	7 ± 2
KP-2067	150	9 ± 5
	500	17 ± 2
	1000	22 ± 2
	1500	21 ± 6
	2000	17 ± 2
	2500	22 ± 6
	3000	19 ± 3
	3500	22 ± 8
	4000	14 ± 2
	4500	15 ± 3
	5000	14 ± 8
アジ化ナトリウム	1.0	915 ± 83

2.6.7.17.1C　エテルカルセチド及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの細菌に対する代謝安定性試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩，KP-2326，KP-2140 及び KP-2067

菌株	被験物質	溶媒	試験目的	試験方法	特記すべき所見	試験番号
Salmonella typhimurium TA1535	エテルカルセチド塩酸塩，KP-2326，KP-2140 及び KP-2067	10 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1	エテルカルセチド塩酸塩及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドの *Salmonella typhimurium* TA1535 に対する代謝安定性について検討	エテルカルセチド塩酸塩及びそのアミノ酸配列の一部を改変したペプチドを TA1535 とともに 37℃で 60 分間インキュベーション後に LC/MS/MS 法により各ペプチドから生成された分解物又は生成物を測定 ペプチドの濃度：10 mg/mL（ペプチド量で補正した場合は 7142 μg/mL） 代謝活性化系：なし	分解物又は生成物の生成（%） 被験物質 / 未変化体 / 二量体[a] エテルカルセチド塩酸塩 / 79 / 21 KP-2326 / 61 / 39 KP-2067 / 96 / 4 KP-2140 / 100 / 0 a：分子内におけるジスルフィド交換反応により生じた母骨格の二量体	117145

2.6.7.17.1D　　AMG2508#5（L-Cys）の Ames 試験

被験物質：AMG2508#5（L-Cys）
試験番号：117326
CTD における記載箇所：4.2.3.7.3-4
GLP 適用：非適用
処理年月：[redacted]年 12 月

報告書の題名：Bacterial Reverse Mutation Assay:AMG2508#5
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
菌株：*Salmonella typhimurium* TA1535，TA100 及び TA102
独立した試験数：1　　プレート数：3
代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：該当せず
溶媒：被験物質：10 mmol/L コハク酸緩衝液，pH4.5±0.1
処理：プレート法，S9mix 非存在下及び存在下，37℃で 48～72 時間のインキュベーション
細胞毒性：なし
遺伝毒性：・TA1535：遺伝子突然変異誘発性なし
・TA100 及び TA102：TA100 の S9mix 非存在下及び存在下，TA102 の S9mix 存在下において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
			TA1535	TA100	TA102
代謝活性化なし	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	13 ± 2	88 ± 11	355 ± 19
	AMG2508#5（L-Cys）	1.5	10 ± 5	82 ± 9	347 ± 22
		5.0	10 ± 2	88 ± 12	322 ± 6
		15	9 ± 4	71 ± 13	317 ± 13
		50	8 ± 3	76 ± 3	296 ± 5
		150	9 ± 3	73 ± 3	340 ± 31
		500	3 ± 2	75 ± 9	297 ± 22
		1500	7 ± 3	87 ± 7	295 ± 6
		5000	6 ± 4	197 ± 21	405 ± 22
	アジ化ナトリウム	1.0	1181 ± 240	743 ± 57	-
	マイトマイシン C	1.0	-	-	1640 ± 243

2.6.7.17.1D　AMG2508#5（L-Cys）の Ames 試験　試験番号：117326（続き）

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
			TA1535	TA100	TA102
代謝活性化あり	10 mmol/L コハク酸緩衝液	-	8 ± 1	92 ± 1	411 ± 39
	AMG2508#5（L-Cys）	1.5	11 ± 1	78 ± 6	373 ± 19
		5.0	9 ± 6	85 ± 11	369 ± 12
		15	4 ± 2	81 ± 12	371 ± 14
		50	7 ± 3	77 ± 5	380 ± 13
		150	5 ± 1	87 ± 6	364 ± 9
		500	7 ± 3	83 ± 14	334 ± 34
		1500	8 ± 3	100 ± 10	321 ± 6
		5000	6 ± 5	261 ± 30	946 ± 15
	2-アミノアントラセン	1.0	66 ± 10	719 ± 28	-
	ステリグマトシスチン	10	-	-	1939 ± 14

2.6.7.17.1E　　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　　被験物質：酸化剤及び抗酸化剤

報告書の題名：Investigation of Mutagenic Effects of Oxidants and Antioxidants in Three *Salmonella typhimurium* Strains　　試験番号：118039

試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.7.3-5

菌株：*Salmonella typhimurium* TA1535，TA100 及び TA102　　GLP 適用：非適用

独立した試験数：1 又は 2　　プレート数：3　　処理年月：[redacted]年 8 月～[redacted]年 2 月

代謝活性化系：なし　　分析細胞数／培養：該当せず

溶媒：被験物質：水（pH7.0），ジメチルスルホキシド（DMSO）又は 100 mmol/L リン酸緩衝液（pH7.4）

処理：プレインキュベーション法，37℃で 20～30 分間のプレインキュベーション後に 37℃で 48～72 時間のインキュベーション

特記事項：被験物質として以下の酸化剤及び抗酸化剤を使用

酸化剤：過酸化水素，グリオキサール，L-グルタチオン，*tert*-ブチルヒドロペルオキシド，1,2,4-ベンゼントリオール，クメンヒドロペルオキシド，ヒドロキノン，ピロガロール，2,6-ジメチル-1,4-ベンゾキノン，L-ペニシラミン及びフェニルヒドラジン

抗酸化剤：活性酸素分解酵素（SOD）

細胞毒性：
- 過酸化水素：あり（TA100 及び TA1535 の 100～200 μg/plate）
- グリオキサール：あり（TA100，TA1535 及び TA102 の 1500～5000 μg/plate）
- 1,2,4-ベンゼントリオール：あり（TA100 の 85～115 μg/plate 及び TA1535 の 55～115 μg/plate）
- クメンヒドロペルオキシド：あり（TA100 の 130～290 μg/plate 及び TA1535 の 210～290 μg/plate）
- 2,6-ジメチル-1-4-ベンゾキノン：あり（TA100，TA1535 及び TA102 の 15～5000 μg/plate）
- フェニルヒドラジン：あり（TA1535，TA100 及び TA102 の 1500～5000 μg/plate）
- L-グルタチオン，*tert*-ブチルヒドロペルオキシド，ヒドロキノン，ピロガロール，L-ペニシラミン，SOD：なし

遺伝毒性：
- 過酸化水素，L-グルタチオン，1,2,4-ベンゼントリオール，ヒドロキノン，ピロガロール，SOD：遺伝子突然変異誘発性なし
- グリオキサール，クメンヒドロペルオキシド：TA1535*，TA100，TA102 において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した
  *：TA1535 について再試験を実施した結果，グリオキサールは復帰変異コロニー数を増加させたが，クメンヒドロペルオキシドは復帰変異コロニー数を増加させなかった
- *tert*-ブチルヒドロペルオキシド，フェニルヒドラジン：TA100，TA102 において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した
- L-ペミシラミン：TA100 において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した
- 2,6-ジメチル-1-4-ベンゾキノン：細胞毒性が強く，2 用量しか評価できなかったが，復帰変異コロニー数の増加は認められなかった

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（水）	-	13 ± 5	85 ± 8	353 ± 35
過酸化水素	25	15 ± 4	116 ± 10	400 ± 18
	50	15 ± 8	163 ± 8	437 ± 9
	75	9 ± 2	146 ± 14	481 ± 22
	100	7 ± 3	56 ± 10	468 ± 26
	125	1 ± 1	25 ± 10	476 ± 26
	150	1 ± 1	3 ± 1	510 ± 9
	175	2 ± 3	21 ± 14	486 ± 46
	200	0 ± 0	3 ± 1	503 ± 24
アジ化ナトリウム	1.0	335 ± 25	418 ± 73	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1371 ± 36

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（水）	-	11 ± 1	89 ± 15	350 ± 38
	1.5	12 ± 5	98 ± 6	398 ± 5
	5.0	15 ± 5	81 ± 2	358 ± 41
	15	9 ± 2	110 ± 13	387 ± 43
	50	15 ± 5	199 ± 13	428 ± 6
グリオキサール	150	36 ± 3	801 ± 46	683 ± 32
	500	28 ± 6	1064 ± 129	875 ± 79
	1500	10 ± 17	375 ± 44	409 ± 29
	5000	4 ± 3	4 ± 3	143 ± 109
アジ化ナトリウム	1.0	439 ± 17	505 ± 45	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1171 ± 33
溶媒（水）	-	8 ± 5	-	-
	50	17 ± 1	-	-
	100	18 ± 4	-	-
	150	27 ± 7	-	-
グリオキサール	200	32 ± 8	-	-
（再試験）	250	34 ± 5	-	-
	500	45 ± 6	-	-
	750	2 ± 1	-	-
	1000	3 ± 4	-	-
アジ化ナトリウム	1.0	343 ± 32	-	-

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（水）	-	19 ± 8	90 ± 7	315 ± 15
L-グルタチオン	1.5	11 ± 1	98 ± 17	280 ± 3
	5.0	12 ± 4	102 ± 10	296 ± 15
	15	13 ± 2	92 ± 11	295 ± 15
	50	16 ± 3	89 ± 11	304 ± 7
	150	18 ± 3	84 ± 2	286 ± 22
	500	16 ± 1	89 ± 15	291 ± 7
	1500	17 ± 6	98 ± 16	260 ± 8
	5000	19 ± 3	88 ± 6	237 ± 13
アジ化ナトリウム	1.0	416 ± 26	398 ± 42	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1273 ± 6
溶媒（水）	-	17 ± 7	82 ± 10	355 ± 27
tert-ブチルヒドロペルオキシド	10	20 ± 2	182 ± 21	559 ± 31
	25	18 ± 2	177 ± 16	618 ± 21
	40	18 ± 5	212 ± 24	694 ± 20
	55	15 ± 2	191 ± 13	713 ± 42
	70	17 ± 7	194 ± 18	773 ± 16
	85	19 ± 8	196 ± 13	841 ± 16
	100	24 ± 7	185 ± 6	864 ± 6
	115	14 ± 7	186 ± 11	853 ± 48
アジ化ナトリウム	1.0	399 ± 9	455 ± 29	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1294 ± 115

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（DMSO）	-	10 ± 3	81 ± 3	327 ± 30
1,2,4-ベンゼントリオール	10	8 ± 2	68 ± 13	354 ± 19
	25	21 ± 5	93 ± 12	400 ± 25
	40	23 ± 9	89 ± 5	363 ± 24
	55	8 ± 2	85 ± 4	366 ± 41
	70	10 ± 1	93 ± 0	319 ± 11
	85	14 ± 2	62 ± 17	364 ± 14
	100	10 ± 8	46 ± 11	337 ± 23
	115	19 ± 4	28 ± 16	397 ± 20
アジ化ナトリウム	1.0	401 ± 40	466 ± 47	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1589 ± 98

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（DMSO）	-	8 ± 2	80 ± 3	338 ± 23
	10	39 ± 2	173 ± 3	443 ± 18
	50	42 ± 9	181 ± 9	582 ± 26
	90	33 ± 5	89 ± 9	744 ± 44
クメンヒドロペルオキシド	130	24 ± 2	26 ± 15	787 ± 28
	170	8 ± 5	5 ± 1	892 ± 48
	210	2 ± 2	1 ± 1	1011 ± 41
	250	0 ± 0	0 ± 1	1072 ± 75
	290	0 ± 0	0 ± 0	1034 ± 63
アジ化ナトリウム	1.0	474 ± 49	502 ± 24	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1473 ± 107
溶媒（DMSO）	-	8 ± 3	-	-
	1	7 ± 2	-	-
	2	10 ± 2	-	-
	5	9 ± 2	-	-
クメンヒドロペルオキシド（再試験）	10	17 ± 8	-	-
	20	12 ± 2	-	-
	50	19 ± 5	-	-
	100	18 ± 1	-	-
	150	8 ± 4	-	-
アジ化ナトリウム	1.0	293 ± 27	-	-

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（DMSO）	-	7 ± 5	83 ± 4	347 ± 48
ヒドロキノン	5.0	8 ± 6	76 ± 2	311 ± 10
	10	10 ± 4	79 ± 8	315 ± 32
	15	8 ± 4	72 ± 10	276 ± 29
	20	13 ± 5	72 ± 7	300 ± 26
	25	10 ± 1	78 ± 3	303 ± 29
	30	9 ± 3	81 ± 11	330 ± 37
	35	10 ± 1	81 ± 6	297 ± 25
	40	12 ± 5	66 ± 6	292 ± 19
アジ化ナトリウム	1.0	402 ± 6	480 ± 37	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1553 ± 64
溶媒（DMSO）	-	5 ± 1	86 ± 16	369 ± 12
ピロガロール	5.0	9 ± 2	100 ± 11	401 ± 7
	10	7 ± 2	90 ± 3	418 ± 10
	15	9 ± 3	102 ± 9	453 ± 23
	20	10 ± 4	94 ± 7	454 ± 34
	25	8 ± 2	111 ± 9	490 ± 9
	30	8 ± 2	110 ± 8	472 ± 33
	35	7 ± 3	113 ± 10	464 ± 35
	40	9 ± 2	117 ± 16	504 ± 37
アジ化ナトリウム	1.0	415 ± 53	503 ± 23	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1212 ± 142

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（DMSO）	-	9 ± 2	80 ± 3	313 ± 13
	1.5	10 ± 2	82 ± 10	293 ± 25
	5.0	9 ± 3	91 ± 11	319 ± 23
	15	7 ± 3	5 ± 1	172 ± 9
2,6-ジメチル-1,4-ベンゾキノン	50	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1
	150	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	500	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	1500	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	5000	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
アジ化ナトリウム	1.0	364 ± 76	510 ± 22	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1369 ± 135
溶媒（水）	-	10 ± 2	88 ± 16	377 ± 29
	1.5	11 ± 3	100 ± 13	377 ± 8
	5.0	9 ± 2	99 ± 15	322 ± 18
	15	18 ± 10	92 ± 8	309 ± 31
L-ペニシラミン	50	8 ± 1	80 ± 8	364 ± 32
	150	11 ± 5	82 ± 7	341 ± 23
	500	10 ± 3	87 ± 10	378 ± 40
	1500	10 ± 4	185 ± 13	472 ± 27
	5000	14 ± 4	421 ± 17	658 ± 49
アジ化ナトリウム	1.0	501 ± 126	543 ± 51	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1307 ± 243

2.6.7.17.1E　酸化剤及び抗酸化剤の Ames 試験　試験番号：118039（続き）

被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）		
		TA1535	TA100	TA102
溶媒（水）	-	9 ± 4	81 ± 13	393 ± 44
フェニルヒドラジン	1.5	12 ± 3	94 ± 3	420 ± 61
	5.0	12 ± 3	103 ± 15	423 ± 23
	15	9 ± 4	96 ± 9	500 ± 44
	50	9 ± 8	127 ± 9	613 ± 13
	150	12 ± 3	173 ± 31	932 ± 84
	500	8 ± 2	181 ± 29	1121 ± 21
	1500	0 ± 0	0 ± 0	253 ± 74
	5000	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
アジ化ナトリウム	1.0	438 ± 35	512 ± 79	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1656 ± 21
溶媒（100 mmol/L リン酸緩衝液）	-	12 ± 2	82 ± 8	357 ± 29
SOD	(U/plate)			
	25	9 ± 2	72 ± 19	371 ± 33
	100	9 ± 2	82 ± 5	384 ± 15
	200	7 ± 3	83 ± 11	373 ± 6
	400	8 ± 2	73 ± 4	354 ± 48
	800	9 ± 3	76 ± 10	327 ± 32
	1600	7 ± 4	78 ± 2	376 ± 11
	3200	14 ± 5	81 ± 8	358 ± 32
	6400	10 ± 4	83 ± 9	361 ± 37
アジ化ナトリウム	1.0	629 ± 62	688 ± 59	-
マイトマイシン C	1.0	-	-	1339 ± 201

2.6.7.17.1F　　グリオキサールの Ames 陽性反応に対する抗酸化剤の影響

被験物質：グリオキサール
試験番号：119371
CTD における記載箇所：4.2.3.7.3-6
GLP 適用：非適用
処理年月：[redacted]年 4 月

報告書の題名：Investigation of the Reversibility of Glyoxal-induced Mutagenicity by Antioxidants
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
菌株：*Salmonella typhimurium* TA1535 及び TA100
独立した試験数：1　　プレート数：3
代謝活性化系：なし　　分析細胞数／培養：該当せず
溶媒：グリオキサール：水，抗酸化剤：リン酸緩衝液又は水
抗酸化剤：SOD，カタラーゼ，デフェロキサミンメシル酸塩，EDTA
処理：プレインキュベーション法，抗酸化剤を加えて 37℃で 10 分間インキュベーション（前処理），グリオキサールを加えて 37℃で 20 分間のプレインキュベーション後に 37℃で 48～72 時間のインキュベーション
細胞毒性：なし
遺伝毒性：

・グリオキサール（単独）：TA1535，TA100 において復帰変異コロニー数が増加し，陽性反応を示した
・SOD（前処理）＋グリオキサール：グリオキサールの復帰変異コロニー数を TA1535 において 39%，TA100 において 66%減少させた
・カタラーゼ（前処理）＋グリオキサール：グリオキサールの復帰変異コロニー数を TA1535 において 21%，TA100 において 60%減少させた
・デフェロキサミンメシル酸塩（前処理）＋グリオキサール：グリオキサールの復帰変異コロニー数を TA1535 において 29%，TA100 において 62%減少させた
・EDTA（前処理）＋グリオキサール：グリオキサールの復帰変異コロニー数を TA1535 において 39%，TA100 において 63%減少させた

2.6.7.17.1F　グリオキサールのAmes陽性反応に対する抗酸化剤の影響　試験番号：119371（続き）

被験物質（用量レベル（μg/plate））	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）	
	TA100	TA1535
水	84 ± 10	9 ± 3
リン酸緩衝液	85 ± 5	11 ± 3
リン酸緩衝液+グリオキサール（250）	1534 ± 94	28 ± 2
アジ化ナトリウム（1.0）	765 ± 40	764 ± 40
水	92 ± 12	12 ± 8
リン酸緩衝液	84 ± 7	11 ± 2
SOD（6400 U/plate）+リン酸緩衝液	95 ± 9	11 ± 3
SOD（6400 U/plate）+リン酸緩衝液+グリオキサール（250）	522 ± 7	17 ± 2
アジ化ナトリウム（1.0）	763 ± 41	714 ± 47
水	93 ± 11	13 ± 8
リン酸緩衝液	87 ± 7	11 ± 3
カタラーゼ（24）+リン酸緩衝液	99 ± 19	13 ± 3
カタラーゼ（24）+リン酸緩衝液+グリオキサール（250）	607 ± 34	22 ± 5
アジ化ナトリウム（1.0）	759 ± 29	711 ± 40
水	92 ± 11	13 ± 7
リン酸緩衝液	84 ± 7	10 ± 2
デフェロキサミンメシル酸塩（0.210）+リン酸緩衝液	89 ± 12	15 ± 4
デフェロキサミンメシル酸塩（0.210）+リン酸緩衝液+グリオキサール（250）	576 ± 8	20 ± 2
アジ化ナトリウム（1.0）	763 ± 36	717 ± 48
水	83 ± 10	10 ± 1
リン酸緩衝液	83 ± 8	10 ± 1
EDTA（4.09）+リン酸緩衝液	107 ± 15	19 ± 8
EDTA（4.09）+リン酸緩衝液+グリオキサール（250）	567 ± 14	17 ± 6
アジ化ナトリウム（1.0）	760 ± 41	714 ± 50

2.6.7.17.2 不純物の毒性試験

2.6.7.17.2A 不純物を含有する原薬のラット4週間反復静脈内投与毒性試験

被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>ラット／SD</td><td>静脈内急速（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%，ベンジルアルコール 0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td><td>4 週間</td><td>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及び分解物 [redacted] 種を添加した原薬：
0，0.3，1，3</td><td>雌雄各 10 例
サテライト群：雌雄各 6 例（雌雄各 3 例／群から投与前，投与後 2 及び 8 時間の採血を行い，残りの雌雄各 3 例／群から投与後 5 分，5 及び 24 時間の採血を実施）</td><td>一般状態：3 mg/kg で振戦，自発運動減少，異常発声，歩行異常，流涎，咀嚼行動，円背及び平伏姿勢
体重及び摂餌量：3 mg/kg の雄で体重増加抑制，摂餌量に変化なし．
眼科的検査：特記すべき所見なし．
血液化学的検査：0.3 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値，血清 P の高値，3 mg/kg で ALT の高値，3 mg/kg の雄で ALP の低値，3 mg/kg の雌でグロブリンの低値
Ca（mg/dL）
雄：10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.3</th><th>1</th><th>3</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 8 時間</td><td>10.9</td><td>10.4**</td><td>9.1***</td><td>8.4***</td></tr>
<tr><td>投与 28 日　投与後 8 時間</td><td>11.5</td><td>10.7**</td><td>10.3***</td><td>9.4***</td></tr>
<tr><td>投与 29 日　剖検時</td><td>10.7</td><td>10.4</td><td>10.2*</td><td>9.9***</td></tr>
</table>
雌：10 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>0</th><th>0.3</th><th>1</th><th>3</th></tr>
<tr><td>投与 1 日　投与後 8 時間</td><td>11.0</td><td>10.4*</td><td>9.8***</td><td>9.0***</td></tr>
<tr><td>投与 28 日　投与後 8 時間</td><td>11.2</td><td>10.9</td><td>10.6**</td><td>9.7***</td></tr>
<tr><td>投与 29 日　剖検時</td><td>10.5</td><td>10.4</td><td>10.4</td><td>9.9*</td></tr>
</table>
*p≤0.05，**p≤0.01，**p≤0.001：対照群に対する Dunnett 検定
病理組織学的検査：1 mg/kg 以上の雌及び 3 mg/kg の雄で副甲状腺の主細胞好酸性化，腎臓の近位尿細管上皮の褐色色素沈着
トキシコキネティクス：雌雄各 3 例／群の平均値
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th colspan="2">0.3</th><th colspan="2">1</th><th colspan="2">3</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>C5min（ng/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>264</td><td>359</td><td>754</td><td>950</td><td>2920</td><td>3230</td></tr>
<tr><td>投与 28 日</td><td>245</td><td>212</td><td>866</td><td>845</td><td>3990</td><td>3330</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与 1 日</td><td>340</td><td>438</td><td>981</td><td>1240</td><td>3680</td><td>4030</td></tr>
<tr><td>投与 28 日</td><td>333</td><td>297</td><td>1180</td><td>1120</td><td>5230</td><td>4480</td></tr>
</table></td><td>119181
（GLP）</td></tr>
</table>

2.6.7.17.2B　不純物を含有する液剤のイヌ4週間反復静脈内投与毒性試験　　被験物質：エデルカルセチド塩酸塩

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr>
<td>イヌ／ビーグル犬</td>
<td>静脈内急速（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%，ベンジルアルコール0.9%含有），pH4.5±0.1／溶液）</td>
<td>2日に1回4週間（計14回）</td>
<td>0，0.4，1：不純物（ホモダイマーなど）を多く含む液剤（ロット番号：[redacted]）

0，0.4，1：従来の凍結乾燥品（ロット番号：[redacted]）</td>
<td>雌雄各3例</td>
<td>不純物を多く含む液剤：0.4

従来の凍結乾燥品：0.4</td>
<td>不純物を多く含む液剤：
一般状態：1 mg/kg で振戦，自発運動減少，嗜眠，痙攣及び皮膚温低下
体重及び摂餌量：1 mg/kg で体重及び摂餌の減少
血液学的検査：1 mg/kg で白血球数，好中球数，リンパ球数及び網赤血球数の低値
血液化学的検査：0.4 mg/kg 以上で投与量に応じた血清 Ca の低値，血清 P の高値
心電図検査：1 mg/kg の雄で心拍数の低下，QT 間隔及び QTcF の延長
器官重量：1 mg/kg で胸腺重量の低値
病理組織学的検査：1 mg/kg で胸腺のリンパ球枯渇，骨髄の細胞減少，腎臓の近位尿細管の褐色色素沈着及び肝臓の肝細胞空胞化（グリコーゲン貯留）

従来の凍結乾燥品：上記液剤と同様の変化が認められた．

トキシコキネティクス：雌雄各3例／群の平均値
<table>
<tr><th rowspan="2">投与量（mg/kg）</th><th colspan="4">不純物を多く含む液剤</th><th colspan="4">従来の凍結乾燥品</th></tr>
<tr><th colspan="2">0.4</th><th colspan="2">1</th><th colspan="2">0.4</th><th colspan="2">1</th></tr>
<tr><td>性別</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td><td>雄</td><td>雌</td></tr>
<tr><td>C5min（ng/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与1日</td><td>1010</td><td>1030</td><td>2410</td><td>2510</td><td>939</td><td>1170</td><td>2790</td><td>2540</td></tr>
<tr><td>投与27日</td><td>1280</td><td>1030</td><td>3320</td><td>3090</td><td>1160</td><td>1190</td><td>3060</td><td>3250</td></tr>
<tr><td>AUClast（ng·h/mL）</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>投与1日</td><td>1900</td><td>1940</td><td>4460</td><td>4760</td><td>1740</td><td>2090</td><td>5280</td><td>5020</td></tr>
<tr><td>投与27日</td><td>2210</td><td>1910</td><td>5850</td><td>5520</td><td>2070</td><td>2100</td><td>5360</td><td>5570</td></tr>
</table>
</td>
<td>4169-NC-146（GLP）[1]</td>
</tr>
</table>

1）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

2.6.7.17.2C　　不純物を含有する原薬のほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT 試験）　　被験物質：エテルカルセチド塩酸塩

報告書の題名：Gene Mutation Test of ONO -5163HCL in V79 Cells　　試験番号：G[redacted]063
試験の種類：ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.7.6-3
細胞：チャイニーズハムスターV79 細胞　　GLP 適用：非適用（信頼性基準）
独立した試験数：2　　プレート数：2　　処理年月：[redacted]年 1 月～4 月
代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：10^5 個
溶媒：被験物質：注射用水
処理：S9mix 非存在下及び存在下，被験物質で 37℃，4 時間処理
特記事項：RRT 1.11-1.12 及び RRT 1.19-1.23 に相当する不純物をそれぞれ[redacted]%及び[redacted]%含有した原薬を被験物質として使用
細胞毒性：なし
遺伝毒性：遺伝子突然変異誘発性なし

代謝活性化	被験物質	処理濃度（μg/mL）	本試験		確認試験	
			細胞毒性（媒体対照に対する細胞生存率%）	突然変異頻度（x 10^{-5}）	細胞毒性（媒体対照に対する細胞生存率%）	突然変異頻度（x 10^{-5}）
代謝活性化なし	無処理	-	100.8	0.66	97.3	0.08
	注射用水	-	100.0	0.56	100.0	0.60
	エテルカルセチド塩酸塩	625	98.6	0.41	95.1	0.62
		1250	99.0	0.51	96.5	0.32
		2500	99.0	0.20	104.3	0.47
		5000	100.5	0.53	105.7	0.06
	エチルメタンスルホン酸	250	97.5	15.38	-	-
		1000	96.1	76.62	100.6	88.16
代謝活性化あり	無処理	-	98.5	0.73	98.6	0.36
	注射用水	-	100.0	0.68	100.0	0.37
	エテルカルセチド塩酸塩	625	103.4	0.53	101.2	0.26
		1250	104.2	0.57	102.2	0.33
		2500	101.9	0.65	100.5	0.23
		5000	101.2	0.39	101.0	0.15
	N-ニトロソジメチルアミン	500	100.2	10.69	-	-
		2000	100.3	34.94	99.2	47.26

2.6.7.17.2D　　*不純物A　の Ames 試験　　被験物質：　*不純物A

報告書の題名：　*不純物A　: Bacterial Reverse Mutation Test in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*　試験番号：118280

試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験　　CTD における記載箇所：4.2.3.7.6-4

菌株：*Salmonella typhimurium* TA1535, TA97a, TA98, TA100 及び *Escherichia coli* WP2 *uvr*A　　GLP 適用：適用

独立した試験数：1　　プレート数：3　　処理年月：[redacted]年 8 月

代謝活性化系：ラット肝 S9mix　　分析細胞数／培養：該当せず

溶媒：被験物質：水

処理：プレート法，S9mix 非存在下及び存在下，37℃で 66 時間のインキュベーション

細胞毒性：なし

遺伝毒性：遺伝子突然変異誘発性なし

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）				
			TA1535	TA97a	TA98	TA100	WP2*uvr*A
代謝活性化なし	水	-	16 ± 3	164 ± 4	24 ± 6	134 ± 6	48 ± 7
	*不純物A	50	19 ± 10	145 ± 10	34 ± 2	127 ± 11	49 ± 6
		158	16 ± 10	141 ± 11	37 ± 5	132 ± 17	47 ± 3
		500	17 ± 3	151 ± 9	39 ± 4	132 ± 6	44 ± 5
		1581	17 ± 6	165 ± 13	32 ± 7	121 ± 10	42 ± 6
		5000	22 ± 2	148 ± 10	28 ± 5	117 ± 10	47 ± 4
	アジ化ナトリウム	0.5	307 ± 13	-	-	579 ± 31	-
	9-アミノアクリジン	50	-	1028 ± 72	-	-	-
	2-ニトロフルオレン	1	-	-	181 ± 10	-	-
	4-ニトロキノリン N-オキサイド	0.5	-	-	-	-	152 ± 31

*新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17.2D　　*不純物A　　の Ames 試験　　試験番号：118280（続き）

代謝活性化	被験物質	用量レベル（μg/plate）	復帰変異コロニー数/plate（平均±SD）				
			TA1535	TA97a	TA98	TA100	WP2*uvr*A
代謝活性化あり	水	-	25 ± 3	310 ± 51	45 ± 1	145 ± 7	49 ± 7
	*不純物A	50	17 ± 3	227 ± 9	42 ± 4	142 ± 9	46 ± 7
		158	20 ± 1	265 ± 8	36 ± 4	139 ± 18	51 ± 1
		500	22 ± 6	217 ± 8	48 ± 4	158 ± 9	40 ± 7
		1581	23 ± 5	324 ± 16	42 ± 10	134 ± 16	49 ± 7
		5000	28 ± 7	235 ± 14	40 ± 7	138 ± 11	54 ± 5
	2-アミノアントラセン	1	-	2048 ± 340	-	-	-
		5	270 ± 20	-	-	-	-
		20	-	-	-	-	117 ± 1
	ベンゾ［a］ピレン	5	-	-	528 ± 38	1009 ± 85	-

*新薬承認情報提供時に置換えた