KHK7580

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

協和発酵キリン株式会社

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
Ca	カルシウム
PTH	Parathyroid hormone（副甲状腺ホルモン）

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 KHK7580 4
2.6.1.2 構造 4
2.6.1.3 効能・効果及び用法・用量 4

2.6.1 緒言

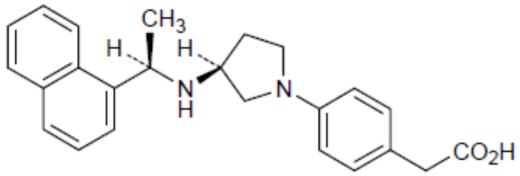
2.6.1.1 KHK7580

KHK7580（一般名：エボカルセト）は、ナフチルアルキルアミン骨格を有する新規カルシミメティクスとして創製された化合物である。KHK7580 は、副甲状腺細胞表面上のカルシウム（Ca）受容体にアロステリックモジュレーターとして作用することで副甲状腺ホルモン（PTH）の分泌を抑制することから、維持透析下の二次性副甲状腺機能亢進症に対する経口治療薬として開発された。また、KHK7580 は既存のカルシミメティクスであるシナカルセト塩酸塩の上部消化管に対する副作用を軽減できる可能性を有する。更に、KHK7580 は主要なチトクローム P450 に対する強い阻害作用を有さないため、薬物相互作用の観点からもシナカルセト塩酸塩に比べ、使いやすい薬剤となりうると考えられる。

2.6.1.2 構造

化学名：{4-[(3*S*)-3-{[(1*R*)-1-(naphthalen-1-yl)ethyl]amino}pyrrolidin-1-yl]phenyl}acetic acid

開発番号：KHK7580



2.6.1.3 効能・効果及び用法・用量

本申請における効能・効果及び用法・用量の案は以下のとおりである。

【効能・効果】

維持透析下の二次性副甲状腺機能亢進症

【用法・用量】

通常、成人にはエボカルセトとして 1 回 1 mg を開始用量とし、1 日 1 回経口投与する。患者の状態に応じて開始用量として 1 日 1 回 2 mg を経口投与することができる。以後は、患者の PTH 及び血清 Ca 濃度の十分な観察のもと、1 日 1 回 1～8 mg の間で適宜用量を調整し、経口投与するが、効果不十分な場合には適宜用量を調整し、1 日 1 回 12 mg まで経口投与することができる。

KHK7580

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

協和発酵キリン株式会社

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine（5-ブロモ-2'-デオキシウリジン）
Ca	カルシウム
Ca^{2+}	イオン化カルシウム
CaR	Calcium receptor（カルシウム受容体）
CHO	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
Cl	クロール
DMSO	Dimethyl sulfoxide（ジメチルスルホキシド）
EC_{50}	50% effective concentration（50%有効濃度）
HEK293 細胞	Human embryonic kidney 293 cell（ヒト胎児由来腎臓 293 細胞）
hERG	Human ether-a-go-go-related gene（ヒト Ether-a-go-go 関連遺伝子）
IC_{50}	50% inhibitory concentration（50%阻害濃度）
IP	無機リン
K	カリウム
MC	Methylcellulose（メチルセルロース）
Na	ナトリウム
NKCC2	Sodium-potassium-chloride cotransporter（Na^+-K^+-$2Cl^-$共輸送体）
PTH	Parathyroid hormone（副甲状腺ホルモン）
SHPT	Secondary hyperparathyroidism（二次性副甲状腺機能亢進症）
TK	Toxicokinetics（トキシコキネティクス）

用語の定義

用語	定義
APA	Action potential amplitude（活動電位振幅）
APD_{30}	30%再分極時活動電位持続時間
APD_{50}	50%再分極時活動電位持続時間
APD_{90}	90%再分極時活動電位持続時間
AUC_{0-24}	投与後 24 時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-72}	投与後 72 時間までの濃度－時間曲線下面積
C_{max}	最高濃度
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hCav1.2	Human voltage-dependent calcium channel 1.2（ヒト電位依存性カルシウムチャネル 1.2）
hKir2.1	Human inwardly rectifying potassium channel 2.1（ヒト内向き整流カリウムチャネル 2.1）
hKir6.2	Human inwardly rectifying potassium channel 6.2（ヒト内向き整流カリウムチャネル 6.2）
hKv1.5	Human voltage-dependent potassium channel 1.5（ヒト電位依存性カリウムチャネル 1.5）
hKv4.3	Human voltage-dependent potassium channel 4.3（ヒト電位依存性カリウムチャネル 4.3）
hKvLQT1	Human voltage-dependent potassium channel 7.1（ヒト電位依存性カリウムチャネル 7.1）
hNav1.5	Human voltage-dependent sodium channel 1.5（ヒト電位依存性ナトリウムチャネル 1.5）
ICH	医薬品規制調和国際会議
M1	KHK7580 代謝物：Taurine conjugate of KHK7580
M2	KHK7580 代謝物：Glycine conjugate of KHK7580
minK	Minimal potassium channel subunit（最小カリウムチャネルサブユニット）
QTc	心拍数で補正した QT 間隔
RMP	Resting membrane potential（静止膜電位）
SUR2A	Sulfonylurea receptor 2A（スルホニル尿素受容体 2A）
t_{max}	最高濃度到達時間
V_{max}	最大速度

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 4
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 6
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 ヒト CaR に対する作用（資料番号：4.2.1.1-1） 7
2.6.2.2.2 ヒト CaR に対する作用様式（資料番号：4.2.1.1-2） 8
2.6.2.2.3 マウスにおける 2 週間反復経口投与による血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（資料番号：4.2.1.1-3） 9
2.6.2.2.4 ラットにおける血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（資料番号：4.2.1.1-4） 11
2.6.2.2.5 部分腎摘ラットにおける 2 週間反復経口投与による血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（資料番号：4.2.1.1-5） 12
2.6.2.2.6 部分腎摘ラットにおける副甲状腺細胞増殖に対する作用（資料番号：参考 4.2.1.1-6） 14
2.6.2.3 副次的薬理試験 16
2.6.2.3.1 受容体結合試験（資料番号：4.2.1.2-1） 16
2.6.2.3.2 ラット尿中電解質に関する試験（資料番号：4.2.1.2-2） 18
2.6.2.3.3 ラットにおける胃排出に対する作用（資料番号：4.2.1.2-3） 18
2.6.2.3.4 ヒト CaR に対する KHK7580 代謝物の作用（資料番号：4.2.1.2-4） 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 21
2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響 21
2.6.2.4.1.1 ラットにおける一般症状及び行動に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-1） 21
2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響 21
2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-2） 21
2.6.2.4.2.2 hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 又は hNav1.5 電流に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-3） 21
2.6.2.4.2.3 hKir2.1 又は hKir6.2/SUR2A 電流に及ぼす影響（資料番号：参考 4.2.1.3-4） 22
2.6.2.4.2.4 乳頭筋の活動電位に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-5） 22
2.6.2.4.2.5 右心房の拍動数に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-6） 22
2.6.2.4.2.6 無麻酔無拘束ラットにおける心拍数及び血圧に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-7） 22
2.6.2.4.2.7 無麻酔無拘束カニクイザルにおける心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-8） 23

2.6.2.4.3 呼吸器系に及ぼす影響 28
2.6.2.4.3.1 無拘束ラットにおける呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-9） 28
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 28
2.6.2.6 考察及び結論 29
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験 29
2.6.2.6.2 副次的薬理試験 30
2.6.2.6.3 安全性薬理試験 31
2.6.2.7 図表 32
2.6.2.8 参考文献 32

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

KHK7580 のヒトカルシウム受容体（CaR）に対する作用を検討した。KHK7580 は、濃度の増加に伴い、ヒト CaR 発現ヒト胎児由来腎臓 293 細胞（HEK293 細胞）の細胞内イオン化カルシウム（Ca^{2+}）濃度を上昇させた。KHK7580 の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇における 50%有効濃度（EC_{50}）値は、6.70×10^{-8}～1.59×10^{-7} mol/L であった。また、KHK7580 は、濃度の増加に伴い、細胞外 Ca^{2+}濃度反応曲線を低濃度側へシフトさせ、アロステリック作動活性を有することが示唆された。

KHK7580 の血漿中又は血清中副甲状腺ホルモン（PTH）及びカルシウム（Ca）に対する作用を検討した。雌雄マウスに KHK7580（0.3、1 及び 3 mg/kg）を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与したとき、KHK7580 は、初回及び最終投与後それぞれにおいて、投与前と比較して、投与量の増加に伴い、血漿中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させた。雄性ラットに KHK7580（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）を単回経口投与したとき、KHK7580 は、0.03 mg/kg 以上の投与群で有意に血清中 PTH 濃度を低下させ、0.1 mg/kg 以上の投与群で有意に血清中 Ca 濃度を低下させた。5/6 腎臓摘出（部分腎摘）術を施した雄性ラットに KHK7580（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与したとき、KHK7580 は、初回及び最終投与後それぞれにおいて、0.1 mg/kg 以上の投与群で血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を有意に低下させた。

KHK7580 の副甲状腺細胞増殖及び副甲状腺過形成に対する作用を検討した。部分腎摘術を施した雄性ラットに KHK7580（0.1 及び 0.3 mg/kg）を 1 日 1 回 4 週間反復経口投与したとき、KHK7580 は、0.1 mg/kg 以上の投与群で副甲状腺細胞増殖亢進を有意に抑制した。また、KHK7580 は、0.1 mg/kg 以上の投与群で副甲状腺の重量増加を有意に減少させたことから、副甲状腺過形成の進展を抑制すると考えられた。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

動物組織又は市販のクローンレセプターを用いて、KHK7580 の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対するトレーサー結合阻害作用を検討した。KHK7580 は、10 μmol/L の濃度において、アドレナリン α2A、アドレナリン α2B、アドレナリン α2C 及びドパミン D3 受容体に対して各々82.03%、46.76%、55.68%及び 41.41%の阻害率を示した。これらの受容体に対して、1 μmol/L の濃度の KHK7580 は、いずれも 40%未満の結合阻害率を示した。

KHK7580 の尿量及び尿中電解質（ナトリウム（Na）、カリウム（K）及びクロール（Cl））排泄に対する影響、尿中 Ca 及び無機リン（IP）排泄量並びに尿 pH に対する影響を検討した。雄性ラットに KHK7580（0.3、1 及び 3 mg/kg）を単回経口投与したとき、KHK7580 は 0.3 mg/kg 以上の投与量で Ca 排泄量を増加させ、IP 排泄量を低下させた。更に、1 mg/kg 以上の投与量で Cl 排泄量を増加させ、3 mg/kg の投与量では尿 pH を低下させた。尿量と Na 及び K 排泄量に対しては、KHK7580 は影響を及ぼさなかった。

KHK7580 の胃排出に対する作用について検討した。雄性ラットに KHK7580（0.3、1 及び 3 mg/kg）又はシナカルセト塩酸塩（10、30 及び 100 mg/kg）を単回経口投与し、その 10 分後

に 0.05 w/v%フェノールレッド呈色液を投与した。胃内のフェノールレッド残存量を測定することで各個体の胃排出率を算出した。正常ラットにおいて、KHK7580 は PTH を有意に低下させた投与量（0.03 mg/kg）の 100 倍の投与量でも胃排出率に影響を与えなかった。一方、シナカルセト塩酸塩は、正常ラットにおいて KHK7580 の 0.03 mg/kg と同程度の PTH 低下作用を示すと推定される投与量（1 mg/kg）の 30 倍の投与量（30 mg/kg）から、胃排出率を有意に低下させた。KHK7580 はシナカルセト塩酸塩に比べ、ラット胃排出能に与える影響が少ないことが示唆された。

KHK7580 代謝物のヒト CaR に対する作用を検討した。ヒトにおける主代謝物である M1 及び M2 は、濃度の増加に伴いヒト CaR 発現 HEK293 細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させた。M1 の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇における EC_{50}値は、7.89×10^{-8}～1.24×10^{-7} mol/L であった。M2 の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇における EC_{50}値は、1.83×10^{-7}～2.08×10^{-7} mol/L であった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

中枢神経系に及ぼす影響を雄性ラットで検討した。最高用量 10 mg/kg まで単回経口投与したが、一般症状及び行動に影響は認められなかった。

心血管系に及ぼす影響を各種 *in vitro* 評価、雄性ラット及び雄性カニクイザルで検討した。ヒト Ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）電流に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）値は 100 µmol/L よりも高値であり、その他心筋イオンチャネル電流（hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3、hNav1.5、hKir2.1 及び hKir6.2/SUR2A）は 10 µmol/L で抑制されなかった。加えて、雄性モルモット乳頭筋及び雄性ラット右心房でも、10 µmol/L で活動電位及び拍動数に影響はなかった。無麻酔無拘束雄性ラットでは、単回経口投与により 3 mg/kg 以上の投与群で心拍数の増加、10 mg/kg 投与群で血圧の一過的な上昇が認められた。また、無麻酔無拘束雄性カニクイザルでも、単回経口投与により 3 mg/kg 以上の投与群で心拍数の増加、10 mg/kg 投与群で血圧の上昇及び QTc の延長が認められた。ラット及びカニクイザルにおける各所見は、*in vitro* 評価結果、血中 KHK7580 及び Ca 濃度推移並びに公知情報から、いずれも薬理作用による二次的な影響に起因すると考えた。

呼吸器系に及ぼす影響を雄性ラットで検討した。最高用量 10 mg/kg まで単回経口投与したが、1 分間の呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に影響は認められなかった。

安全性薬理試験では心血管系に及ぼす影響のみが認められ、本影響は薬理作用による二次的な影響に起因すると考えた。予定臨床最大用量 12 mg 投与時の非結合型 C_{max}をもとに算出した安全域ではカニクイザルにおける心拍数の増加が最も狭く、1 倍未満であった。しかし、本所見は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では認められなかったため、急性的な反応であり、毒性学的意義は低いと判断した。また、血圧の上昇及び QTc の延長については、過度の薬理作用に注意すれば、ヒトにおける安全性は確保できると判断した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

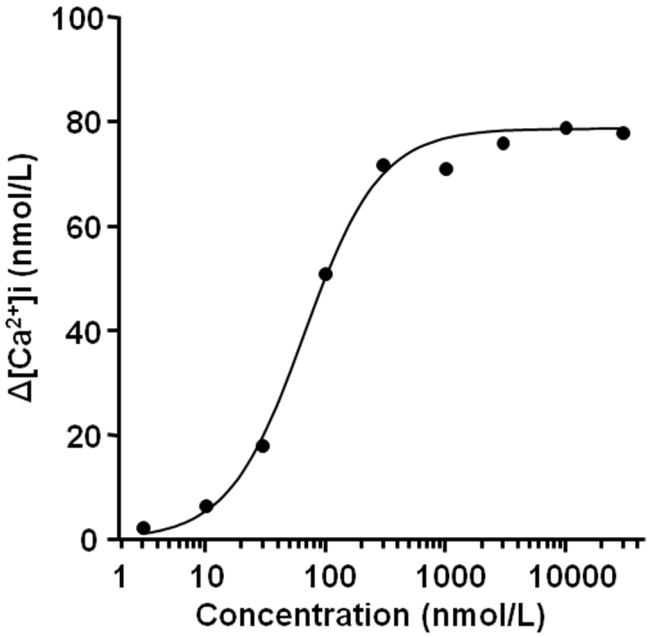
2.6.2.2.1 ヒト CaR に対する作用（資料番号：4.2.1.1-1）

CaR 作動薬がヒト CaR 発現 HEK293 細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させることが報告されている[1)]。そこで、ヒト CaR 発現 HEK293 細胞に蛍光 Ca^{2+}指示薬 Fura 2 を取り込ませ、培養液に 1 mmol/L の Ca^{2+}存在下で、ジメチルスルホキシド（DMSO、最終濃度 1 vol%）で溶解した各濃度の KHK7580（3～30000 nmol/L）を添加し、細胞内 Ca^{2+}濃度を測定した。

KHK7580 は、ヒト CaR 発現 HEK293 細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させた（図 2.6.2.2.1-1）。KHK7580 の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇に対する EC_{50} 値は、3 回の独立した実験において、それぞれ 1.59×10^{-7}、6.70×10^{-8} 及び 7.50×10^{-8} mol/L であった。

以上の結果から、KHK7580 は、濃度の増加に伴いヒト CaR を活性化し、細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させることが示された。

図 2.6.2.2.1-1　ヒト CaR に対する作用



数値：二重測定の平均値
縦軸は、KHK7580 添加後の最高$[Ca^{2+}]i$から基底$[Ca^{2+}]i$を差し引いた値（$\Delta[Ca^{2+}]i$）を示す
代表例として、EC_{50} 値 6.70×10^{-8} mol/L の反応曲線を示す

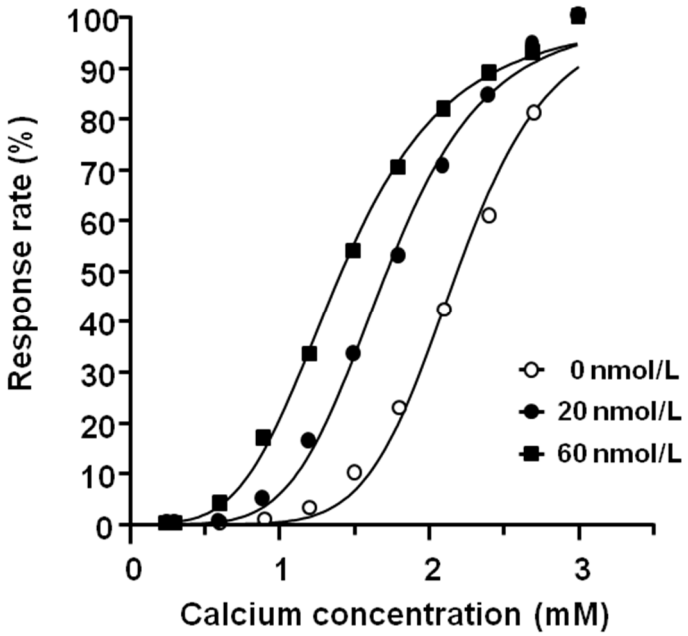
2.6.2.2.2　ヒト CaR に対する作用様式（資料番号：4.2.1.1-2）

ヒト CaR 発現 HEK293 細胞に蛍光 Ca^{2+}指示薬 Fura 2 を取り込ませ、培養液に各濃度の Ca^{2+}溶液（最終濃度：0.25～3 mmol/L）を添加し、細胞内 Ca^{2+}濃度を測定した。同じ操作を、DMSO（最終濃度 1.4 vol%）で溶解した各濃度の KHK7580（0、20 及び 60 nmol/L）を添加して行った。

細胞外 Ca^{2+}濃度の上昇に伴い、ヒト CaR 発現 HEK293 細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度は増加した。KHK7580 は、濃度増加に伴い、細胞外 Ca^{2+}濃度反応曲線を細胞外 Ca^{2+}の低濃度側へシフトさせた（図 2.6.2.2.2-1）。

以上の結果から、KHK7580 は、濃度の増加に伴いヒト CaR 発現細胞における細胞外 Ca^{2+}濃度反応曲線を低濃度側へシフトさせることが示された。この作用様式は、アロステリックに作用する化合物の特徴として知られているため[2)]、KHK7580 はアロステリック作動活性を有することが示唆された。

図2.6.2.2.2-1　ヒト CaR に対する作用様式



数値：二重測定の平均値
縦軸は、各条件における反応率を示す
反応率は、以下の式により算出した
反応率（%）= $\Delta[Ca^{2+}]i/Max\ \Delta[Ca^{2+}]i \times 100$
$\Delta[Ca^{2+}]i$: KHK7580 添加後の最高$[Ca^{2+}]i$ から基底$[Ca^{2+}]i$ を差し引いた値
Max $\Delta[Ca^{2+}]i$: 最大 Ca 濃度（3 mmol/L）における $\Delta[Ca^{2+}]i$

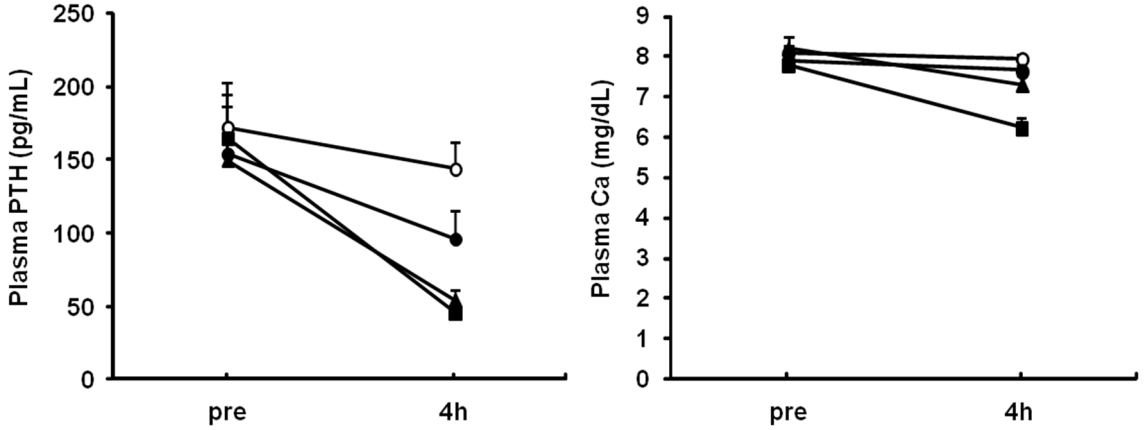
2.6.2.2.3　マウスにおける 2 週間反復経口投与による血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（資料番号：4.2.1.1-3）

雌雄マウス（Jcl:ICR、投与開始時 9 週齢）に KHK7580（0.3、1 及び 3 mg/kg）又は媒体（0.5 w/v%メチルセルロース（MC）溶液）を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した。初回投与前、初回投与後 4 時間、最終投与前、最終投与後 4 時間に採血を実施し、血漿中 PTH 及び Ca 濃度を測定した。

KHK7580 は、初回及び最終投与後それぞれにおいて、投与前と比較して、投与量の増加に伴い、血漿中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させた（図 2.6.2.2.3-1、図 2.6.2.2.3-2、図 2.6.2.2.3-3、図 2.6.2.2.3-4）。

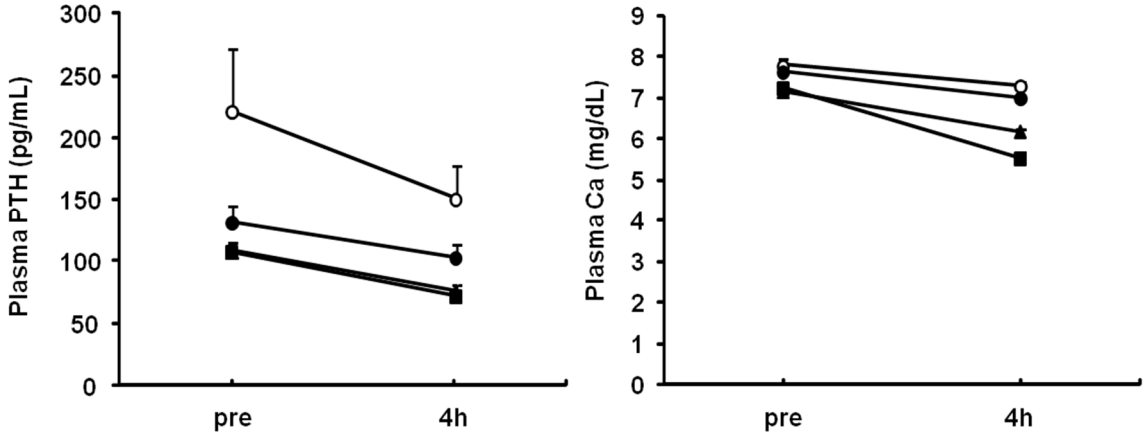
以上の結果から、KHK7580 は、正常マウスにおいて雌雄差関係なく血漿中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させることが示された。

図2.6.2.2.3-1　雄性マウスにおける血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（初回投与）



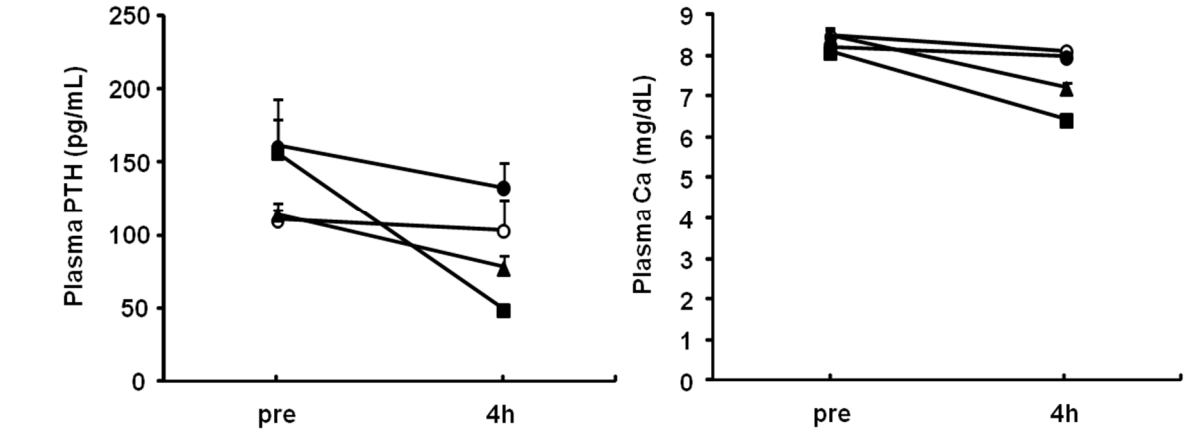
媒体（○）、0.3 mg/kg（●）、1 mg/kg（▲）、3 mg/kg（■）
n=6、平均値+標準誤差

図2.6.2.2.3-2　雄性マウスにおける血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（最終投与）



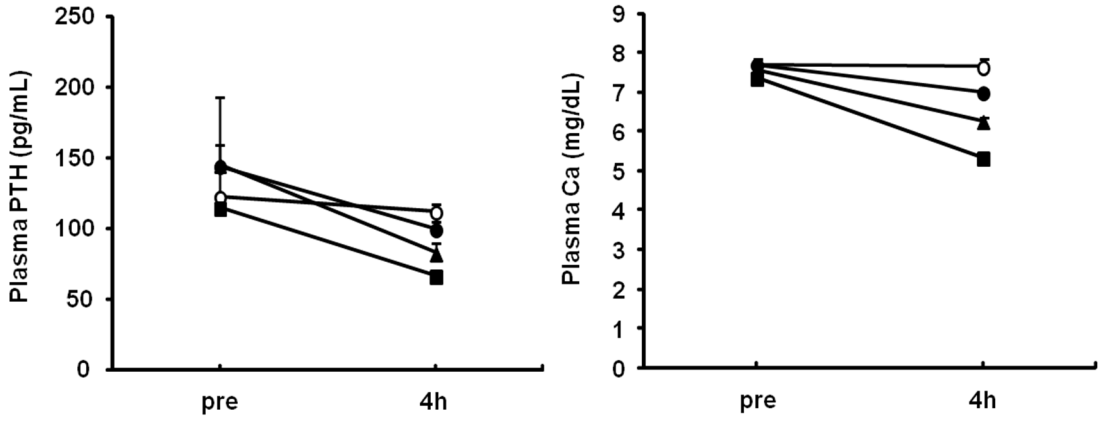
媒体（○）、0.3 mg/kg（●）、1 mg/kg（▲）、3 mg/kg（■）
n=6、平均値+標準誤差

図2.6.2.2.3-3　雌性マウスにおける血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（初回投与）



媒体（○）、0.3 mg/kg（●）、1 mg/kg（▲）、3 mg/kg（■）
n=6、平均値+標準誤差

図2.6.2.2.3-4　雌性マウスにおける血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（最終投与）



媒体（○）、0.3 mg/kg（●）、1 mg/kg（▲）、3 mg/kg（■）
n=6、平均値+標準誤差

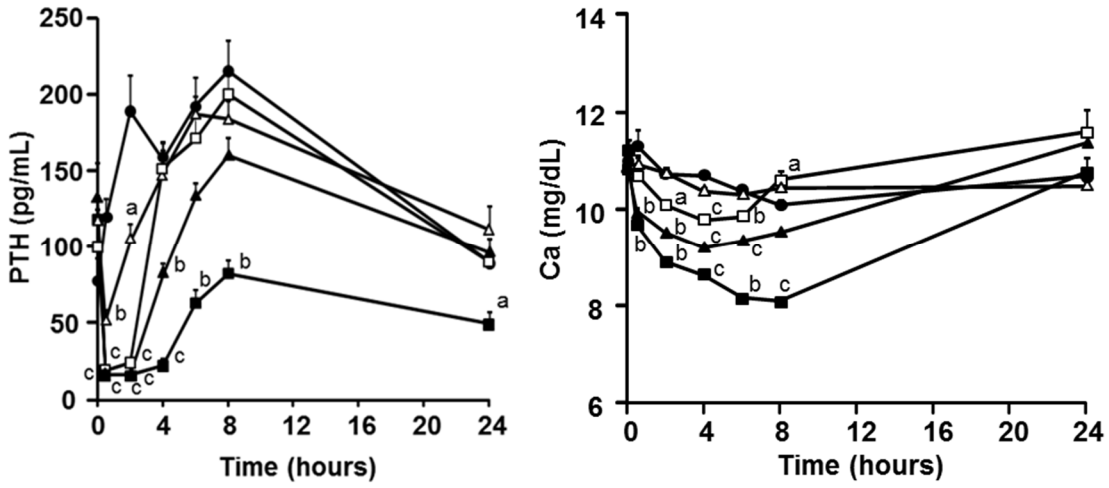
2.6.2.2.4　ラットにおける血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（資料番号：4.2.1.1-4）

雄性ラット（Jcl:SD、投与開始時 8～9 週齢）に KHK7580（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）又は媒体（0.5 w/v% MC 溶液）を単回経口投与した。投与前、投与後 0.5、2、4、6、8 及び 24 時間に採血を実施し、血清中 PTH 及び Ca 濃度を測定した。

KHK7580 は、媒体投与群と比較して、0.03 mg/kg 以上の投与群で有意に血清中 PTH 濃度を低下させた（図 2.6.2.2.4-1）。1 mg/kg の投与群では、KHK7580 投与後 24 時間においても、有意な血清中 PTH 濃度の低下が認められた。また、KHK7580 は、媒体投与群と比較して、0.1 mg/kg 以上の投与群で有意に血清中 Ca 濃度を低下させた。1 mg/kg の投与群では、KHK7580 投与後 8 時間まで、有意な血清中 Ca 濃度の低下が認められた（図 2.6.2.2.4-1）。

以上の結果から、KHK7580 は、ラットにおいて血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させることが示された。

図 2.6.2.2.4-1　　ラットにおける血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用



媒体（●）、0.03 mg/kg（△）、0 1 mg/kg（□）、0.3 mg/kg（▲）、1 mg/kg（■）
a: p<0.05、b: p<0.01、c: p<0.001（vs. 媒体群、Steel test）
n=10、平均値+標準誤差

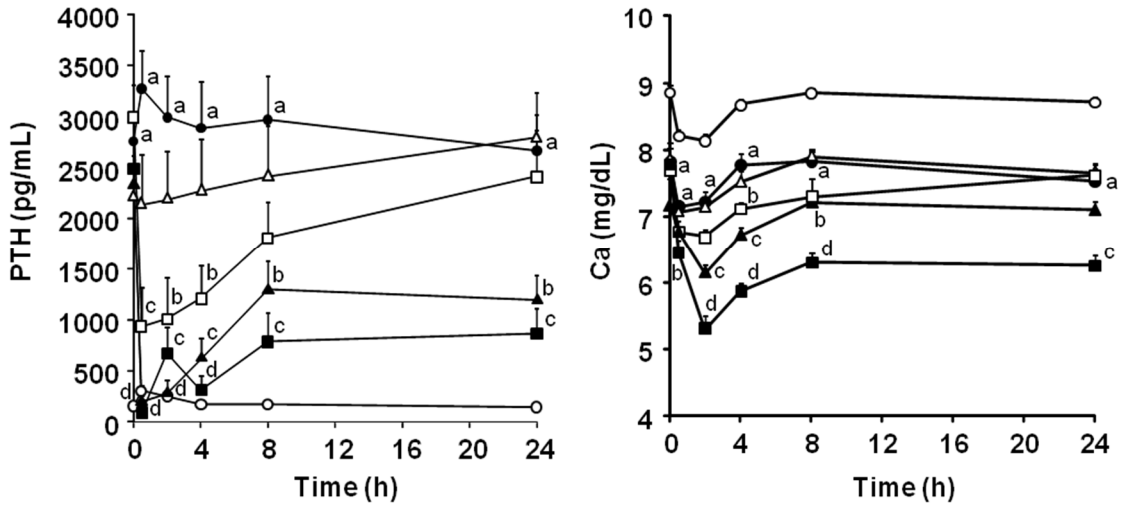
2.6.2.2.5 部分腎摘ラットにおける 2 週間反復経口投与による血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（資料番号：4.2.1.1-5）

5/6 腎臓摘出（部分腎摘）術又は偽手術を雄性ラット（Jcl:SD、手術時 8～9 週齢）に施した。術後約 1 週間から、高リン餌に切り換え飼育した。高リン餌飼育開始から約 2 週間後より、部分腎摘ラットに KHK7580（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）又は媒体（0.5 w/v% MC 溶液）を、偽手術ラットには媒体を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した。初回投与前、初回投与後 0.5、2、4、8 及び 24 時間、7 回目投与後 24 時間、最終投与前、最終投与後 0.5、2、4、8、24、48 及び 72 時間に採血を実施し、血清中 PTH 及び Ca 濃度を測定した。また、血漿を採取し血漿中濃度の測定に供した（2.6.4.8.1）。

部分腎摘+媒体群（媒体投与群）の血清中 PTH 濃度は、偽手術群と比較して持続的に有意な高値を示した。KHK7580 は、初回及び最終投与後それぞれにおいて、媒体投与群と比較して、0.1 mg/kg 以上の投与群で血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を有意に低下させた（図 2.6.2.2.5-1、図 2.6.2.2.5-2、図 2.6.2.2.5-3）。また、最終投与前において、媒体投与群と比較して、0.3 mg/kg 以上の投与群で、有意な血清中 PTH 濃度の低下が認められた。7 回目投与後 24 時間においては、KHK7580 は、媒体投与群と比較して、0.3 mg/kg 以上の投与群で血清中 PTH 濃度を有意に低下させ、0.1 mg/kg 以外の投与群で血清中 Ca 濃度を有意に低下させた。

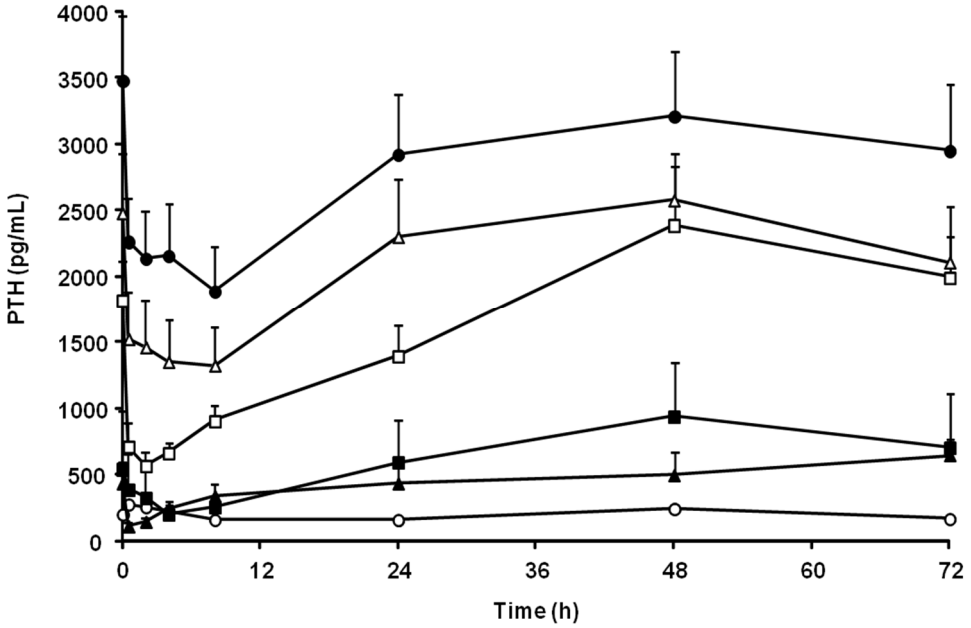
以上の結果から、KHK7580 は、部分腎摘ラットにおいて 2 週間の反復経口投与によって、継続的に血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させることが示された。

図 2.6.2.2.5-1 部分腎摘ラットにおける血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用（初回投与）



偽手術+媒体（○）、部分腎摘+媒体（●）、0.03 mg/kg（△）、0.1 mg/kg（□）、0.3 mg/kg（▲）、1 mg/kg（■）
a: p<0.001（vs. 偽手術群、Student's t-test 又は Aspin-Welch test）
b: p<0.05、c: p<0.01、d: p<0.001（vs.部分腎摘+媒体群、Steel test）
n=12、平均値+標準誤差

図 2.6.2.2.5-2　部分腎摘ラットにおける血清中 PTH 濃度に対する作用（最終投与）



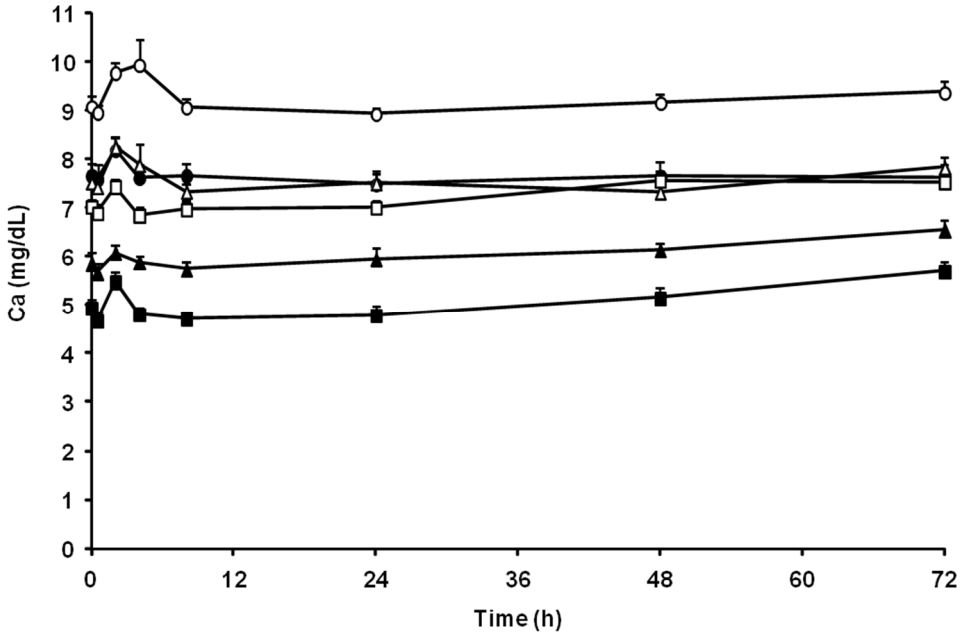
偽手術+媒体（○）、部分腎摘+媒体（●）、0.03 mg/kg（△）、0 1 mg/kg（□）、0.3 mg/kg（▲）、1 mg/kg（■）
n=12、平均値+標準誤差

p value (sham vs 媒体投与群)	0 h	0.5 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
Aspin-Welch test	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

p value (vs 媒体投与群)		0 h	0.5 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
Steel test	0.03 mg/kg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	0.1 mg/kg	NS	<0.01	<0.01	<0.05	NS	NS	NS	NS
	0.3 mg/kg	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.01
	1 mg/kg	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01	<0.01

NS: 有意差なし

図2.6.2.2.5-3　部分腎摘ラットにおける血清中 Ca 濃度に対する作用（最終投与）



偽手術+媒体（○）、部分腎摘+媒体（●）、0.03 mg/kg（△）、0 1 mg/kg（□）、0.3 mg/kg（▲）、1 mg/kg（■）
n=12、平均値+標準誤差

p value (sham vs 媒体投与群)	0 h	0.5 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
Student's *t*-test	<0.001	–	<0.001	–	<0.001	–	–	<0.001
Aspin-Welch test	–	<0.001	–	<0.01	–	<0.001	<0.001	–

p value (vs 媒体投与群)		0 h	0.5 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
Steel test	0.03 mg/kg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	0.1 mg/kg	NS	NS	NS	<0.05	NS	NS	NS	NS
	0.3 mg/kg	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	NS
	1 mg/kg	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01

–: 該当せず
NS: 有意差なし

2.6.2.2.6　部分腎摘ラットにおける副甲状腺細胞増殖に対する作用（資料番号：参考 4.2.1.1-6）

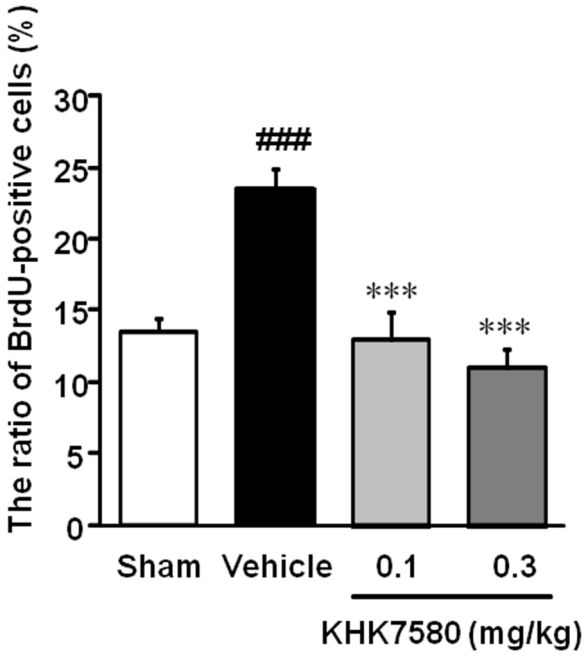
5/6 腎臓摘出（部分腎摘）術又は偽手術を雄性ラット（Crl:CD(SD)、手術時 7～8 週齢）に施した。術後約 1 週間から、高リン餌に切り換え飼育した。高リン餌飼育開始から約 2 週間後より、部分腎摘ラットに KHK7580（0.1 及び 0.3 mg/kg）又は媒体（0.5 w/v% MC 溶液）を、偽手術ラットに媒体を 1 日 1 回 4 週間反復経口投与した。副甲状腺採材 1 週間前から 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）を充填させた浸透圧ポンプを皮下に埋め込むことで、増殖期の細胞を標識した。最終投与後翌々日に副甲状腺を採材した後、組織切片を作製し、免疫染色法を用いて BrdU が取り込まれた細胞を染色した。副甲状腺 1 断面における BrdU 陽性核数を計測し、副甲状腺細胞に占める BrdU 陽性率を算出した。また、採材した副甲状腺の重量を測定し、ラット体重値で補正して副甲状腺重量値を算出した。

部分腎摘+媒体群（媒体投与群）の副甲状腺 BrdU 陽性率は、偽手術+媒体群と比較して有意な高値を示し、部分腎摘ラットにおける副甲状腺細胞増殖亢進が認められた。また、媒体投与群の副甲状腺重量は、偽手術+媒体群と比較して有意な増加を示し、部分腎摘ラットにおける副甲状腺過形成が認められた。KHK7580 は、媒体投与群と比較して、0.1 mg/kg 以上の投与群

で BrdU 陽性率を有意に低下させ、副甲状腺重量増加を有意に抑制した（図 2.6.2.2.6-1、図 2.6.2.2.6-2）。

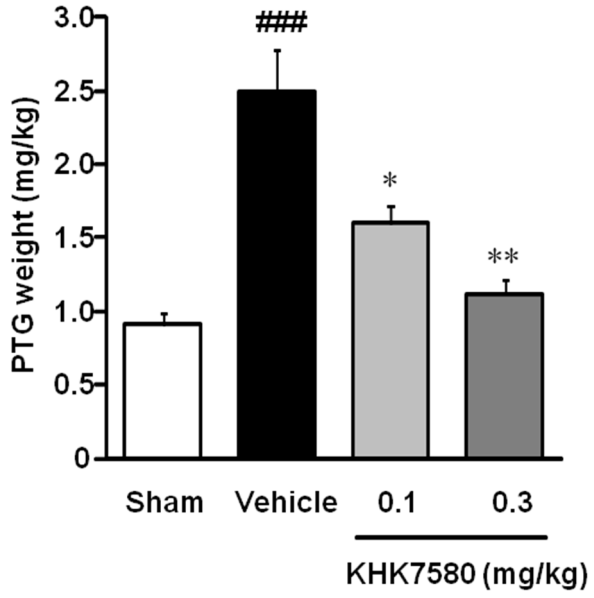
以上の結果から、KHK7580 は、部分腎摘ラットにおいて、副甲状腺細胞増殖亢進を抑制すること及び副甲状腺過形成の進展を抑制することが示された。

図2.6.2.2.6-1　部分腎摘ラットの副甲状腺細胞増殖に対する作用



###: p<0.001（vs. Sham 群、Student's t-test）
***: p<0.001（vs. Vehicle 群、Dunnett's test）
n=10～11、平均値+標準誤差

図 2.6.2.2.6-2　部分腎摘ラットにおける副甲状腺重量に対する作用



PTG: Parathyroid gland
###: p<0.001（vs. Sham 群、Aspin-Welch test）
*: p<0.05、**: p<0.01（vs. Vehicle 群、Steel test）
n=10～11、平均値+標準誤差

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 受容体結合試験（資料番号：4.2.1.2-1）

動物組織又は市販のクローンレセプターを用いて、KHK7580 の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対するトレーサー結合阻害作用を検討した。KHK7580 は、DMSO（最終濃度 1 vol%）に溶解し最終濃度が 10 μmol/L となるように添加した。10 μmol/L の濃度で 40%を超える結合阻害を示した受容体に対しては、1 μmol/L の濃度での検討も実施した。

KHK7580 は、10 μmol/L の濃度においてアドレナリン α2A、アドレナリン α2B、アドレナリン α2C 及びドパミン D3 受容体に対して各々82.03%、46.76%、55.68%及び 41.41%の阻害率を示した（表 2.6.2.3.1-1）。これらの受容体に対して、1 μmol/L の濃度では、KHK7580 の結合阻害率はいずれも 40%未満であった。その他の受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する KHK7580 の阻害率はいずれも 10 μmol/L の濃度において 40%未満であった（表 2.6.2.3.1-2）。

表2.6.2.3.1-1 各種受容体に対する KHK7580 の結合阻害作用

試験項目	動物種	阻害率 (%)	
		KHK7580	
		1 μmol/L	10 μmol/L
受容体			
アドレナリン α2A	ヒト	33.27	82.03
アドレナリン α2B	ヒト	12.98	46.76
アドレナリン α2C	ヒト	11.83	55.68
ドパミン D3	ヒト	20.11	41.41

数値：二重測定の平均値
阻害率： 100－結合率 により算出
結合率：［(B−N)/(B_0−N)］×100 (%) により算出

B：KHK7580 存在下の結合放射能活性値
B_0：KHK7580 非存在下の総結合放射能活性値
N：非特異結合放射能活性値

表 2.6.2.3.1-2 各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する KHK7580 の結合阻害作用（10 μmol/L）

試験項目	動物種	阻害率 (%)
		KHK7580
受容体		
アデノシン A1	ヒト	3.08
アデノシン A2a	ヒト	0.00
アドレナリン α1D	ラット	0.23
アドレナリン α1A	ヒト	15.65
アドレナリン α1B	ヒト	7.62
アドレナリン β1	ヒト	2.49
アドレナリン β2	ヒト	5.75
ブラジキニン B2	ヒト	1.41
カンナビノイド CB1	ヒト	4.25
カンナビノイド CB2	ヒト	0.07
ドパミン D1	ヒト	0.03
ドパミン D2 short	ヒト	0.00
GABA A (Agonist site)	ラット	2.13
GABA A (BZ central)	ラット	0.43
GABA A (Chloride channel)	ラット	0.00
GABA B	ラット	0.00
グルタミン酸 (Non-selective)	ラット	0.09
グリシン (ストリキニーネ感受性)	ラット	0.00
ヒスタミン H1	ヒト	0.00
ヒスタミン H2	ヒト	2.33
ムスカリン M1	ヒト	1.43
ムスカリン M2	ヒト	1.82
ムスカリン M3	ヒト	3.86
ニューロキニン NK1	ヒト	5.40
ニューロキニン NK2	ヒト	1.21
ニューロキニン NK3	ヒト	2.13
ニコチン	ヒト	3.28
オピオイド δ	ヒト	36.38
オピオイド κ	ヒト	0.98
オピオイド μ	ヒト	0.00
セロトニン 5HT1A	ヒト	12.70
セロトニン 5HT2A	ヒト	0.15
セロトニン 5HT3	ヒト	0.00
セロトニン 5HT5A	ヒト	30.78
シグマ (Non-selective)	モルモット	17.31
イオンチャネル		
Ca チャネル (L 型、ベンゾジアゼピン)	ラット	21.07
Ca チャネル (L 型、ジヒドロピリジン)	ラット	3.42
Ca チャネル (L 型、フェニルアルキルアミン)	ラット	6.26
Na チャネル (Site 2)	ラット	17.93

数値：二重測定の平均値
阻害率： 100 − 結合率 により算出
結合率：［(B−N)/(B_0−N)］×100 (%) により算出

B：KHK7580 存在下の結合放射能活性値
B_0：KHK7580 非存在下の総結合放射能活性値
N：非特異結合放射能活性値

表 2.6.2.3.1-2 各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する KHK7580 の結合阻害作用（10 μmol/L）（続き）

試験項目	動物種	阻害率 (%)
		KHK7580
トランスポーター		
ドパミントランスポーター	ヒト	17.88
ノルエピネフリントランスポーター	ヒト	6.40
セロトニントランスポーター	ヒト	19.38

数値：二重測定の平均値
阻害率： 100－結合率 により算出
結合率：［(B−N)/(B_0−N)］×100 (%) により算出

B：KHK7580 存在下の結合放射能活性値
B_0：KHK7580 非存在下の総結合放射能活性値
N：非特異結合放射能活性値

2.6.2.3.2 ラット尿中電解質に関する試験（資料番号：4.2.1.2-2）

雄性ラット（Crl:CD(SD)、投与時 7 週齢）を用い、KHK7580 の尿量及び尿中電解質（Na、K 及び Cl）排泄に対する影響を評価した。更に、尿中 Ca 及び IP 排泄量並びに尿 pH に対する影響も評価した。ラットに KHK7580（0.3、1 及び 3 mg/kg）又は媒体（0.5 w/v% MC 溶液）を絶食絶水下にて単回経口投与した。媒体及び KHK7580 投与後、速やかに生理食塩液 20 mL/kg を強制経口投与し、尿量を 1 時間ごとに投与後 6 時間まで累積的に測定し、体重 100 g 当たりの尿量を算出した。6 時間蓄尿を用い、尿 pH 及び電解質濃度並びに Ca 及び IP 濃度を測定した。各排泄量については、6 時間の総排泄量を体重 100 g あたりの量として算出した。

KHK7580 は 0.3 mg/kg 以上の投与群で Ca 排泄量を増加させ、IP 排泄量を減少させた。更に、1 mg/kg 以上の投与群で Cl 排泄量を増加させ、3 mg/kg の投与群では尿 pH を低下させた。尿量と Na 及び K 排泄量に対しては、KHK7580 は影響を及ぼさなかった（表 2.6.2.3.2-1）。

表 2.6.2.3.2-1 生理食塩液負荷ラットにおける尿量及び尿中電解質排泄への影響の試験成績

投与量 (mg/kg)	0 (媒体)	0.3	1	3
動物数	8	8	8	8
尿量 (mL/100 g 体重)[a]	1.7	1.7	1.6	1.9
Ca 排泄量 (mg/100 g 体重)[a]	0.142	0.782**	1.159**	1.023**
IP 排泄量 (mg/100 g 体重)[a]	0.73	0.33*	0.10**	0.05**
pH[a]	7.6	7.6	7.0	6.6**
Na 排泄量 (μmol/100 g 体重)[a]	220	184	228	233
K 排泄量 (μmol/100 g 体重)[a]	234	281	291	295
Cl 排泄量 (μmol/100 g 体重)[a]	276	334	412**	440**

数値：平均値（n=8）
a：6 時間蓄尿
*: p<0.05、 **: p<0.01 (vs 媒体群、Dunnett's test)

2.6.2.3.3 ラットにおける胃排出に対する作用（資料番号：4.2.1.2-3）

雄性ラット（Crlj:WI(Wistar)、投与時 6 週齢）に KHK7580（0.3、1 及び 3 mg/kg）又はシナカルセト塩酸塩（10、30 及び 100 mg/kg）若しくは媒体（0.5 w/v% MC 溶液）を単回経口投与したときの胃排出に対する作用を検討した。試験前日の夕方より絶食及び試験当日の午前中から絶水処置を施したラットに KHK7580 又はシナカルセト塩酸塩を経口投与し、その 10 分後に 0.05 w/v%フェノールレッド呈色液を投与した。フェノールレッド呈色液投与後 30 分又は 60

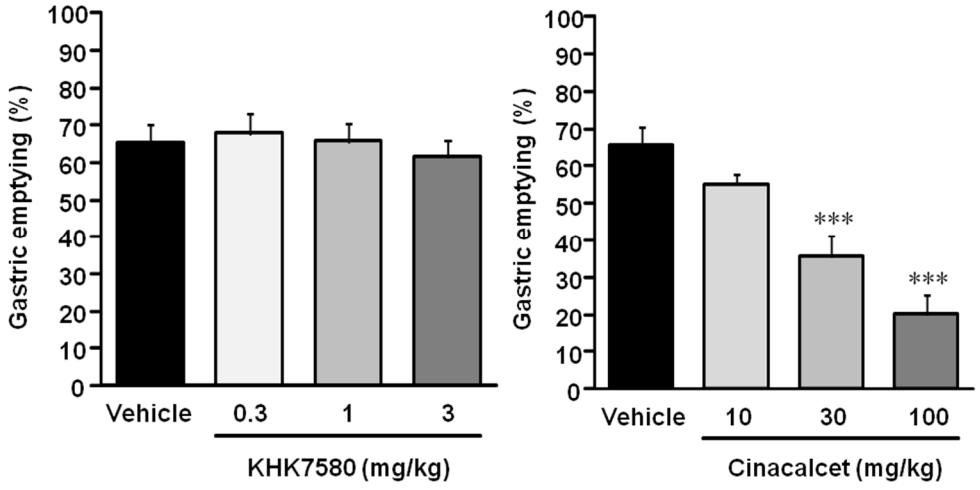
分に頸椎脱臼によりラットを安楽殺した後に開腹し、胃内のフェノールレッド残存量を測定することで各個体の胃排出率を算出した。

KHK7580 は、いずれの投与量においても、フェノールレッド呈色液投与後 30 分及び 60 分の胃排出率に影響を与えなかった。一方、シナカルセト塩酸塩はフェノールレッド呈色液投与後 30 分及び 60 分のいずれの時間においても、30 mg/kg の投与量から胃排出率を有意に低下させた（図 2.6.2.3.3-1）。正常ラットにおいて PTH を有意に低下させた KHK7580 投与量は 0.03 mg/kg であり（2.6.2.2.4）、その 100 倍の投与量においても胃排出率に影響を与えなかった。正常ラットにおいて KHK7580 の 0.03 mg/kg と同程度の PTH 低下作用を示すシナカルセト塩酸塩の投与量は 1 mg/kg と推定されるが[3]、その 30 倍の投与量から胃排出率の有意な減少が認められた。

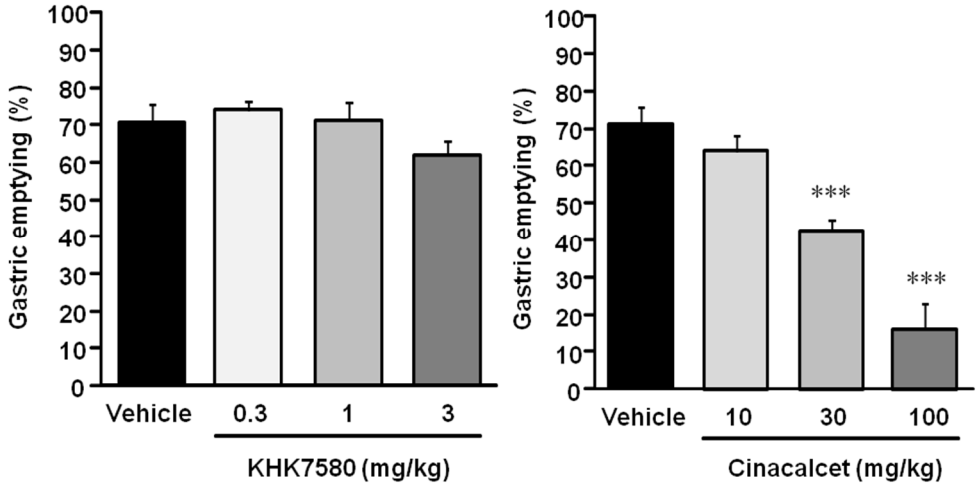
以上の結果から、KHK7580 はシナカルセト塩酸塩に比べ、ラット胃排出能に与える影響が少ないことが示唆された。

図 2.6.2.3.3-1　KHK7580 及びシナカルセト塩酸塩のラット胃排出に対する作用

(A) 呈色液投与後 30 分



(B) 呈色液投与後 60 分



***: p<0.001（vs. Vehicle 群、Dunnett's test）
n=7～8、平均値+標準誤差

2.6.2.3.4 ヒト CaR に対する KHK7580 代謝物の作用（資料番号：4.2.1.2-4）

ヒト CaR 発現 HEK293 細胞に蛍光 Ca^{2+}指示薬 Fura 2 を取り込ませ、培養液に 1 mmol/L の Ca^{2+}存在下で、DMSO（最終濃度 1 vol%）で溶解した各濃度の M1 又は M2（3～30000 nmol/L）を添加し、細胞内 Ca^{2+}濃度を測定した。

M1 及び M2 は、ヒト CaR 発現 HEK293 細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させることが示された。M1 の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇に対する EC_{50} 値は、3 回の独立した実験において、それぞれ 9.96×10^{-8}、1.24×10^{-7} 及び 7.89×10^{-8} mol/L であった。M2 の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇に対する EC_{50} 値は、3 回の独立した実験において、それぞれ 2.08×10^{-7}、1.97×10^{-7} 及び 1.83×10^{-7} mol/L であった。

以上の結果から、KHK7580 代謝物 M1 及び M2 は、濃度の増加に伴いヒト CaR を活性化し、細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させることが示された。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ICH S7A 及び S7B に則り、KHK7580 の中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。なお、参考資料とした試験を除くすべての試験を GLP に準拠して実施した。

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1 ラットにおける一般症状及び行動に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-1）

雄性ラット（Crl:CD(SD)、6 週齢）を 4 群に振り分け（6 例／群）、媒体（0.5 w/v% MC 溶液）並びに KHK7580 の 1、3 及び 10 mg/kg を単回経口投与し、投与前並びに投与後 1、2、4、8、24、48 及び 72 時間における一般症状と行動に及ぼす影響を検討した。なお、一般症状及び行動は、Irwin 変法（多次元観察法）で評価した。更に、各群にサテライト群を設け、全身曝露（3 例／群、媒体群除く）及び血清中 Ca 濃度（3 例／群）を評価した。

試験期間中、一般症状及び行動に KHK7580 投与による影響は認められなかった。トキシコキネティクス（TK）解析の結果を表 2.6.2.4.1.1-1に示す。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ は KHK7580 の投与量の増加に伴った上昇及び増加が認められ、t_{max} は 1～4 時間であった。血清中 Ca 濃度推移は KHK7580 の投与量の増加に伴った低下が認められ、10 mg/kg 投与群の最低値は投与後 8 時間の 7.0 mg/dL であった。

以上の結果から、KHK7580 は 10 mg/kg までの単回経口投与では、雄性ラットの一般症状及び行動に影響を及ぼさないと判断した。

表2.6.2.4.1.1-1 KHK7580 を単回経口投与した雄性ラットにおける TK パラメータ

投与量 (mg/kg)	1	3	10
C_{max} (μg/mL)[a]	1.452	2.474	11.57
t_{max} (h)[a]	1.7	1.3	3.3
$AUC_{0\text{-}24}$ (μg·h/mL)[a]	13.88	24.70	132.5

a：3 例の平均値

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-2）

hERG 導入 HEK293 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して hERG 電流を測定し、KHK7580 の 3、10、30 及び 100 μmol/L が hERG 電流に及ぼす影響を検討した（4 例／群）。溶媒には 0.1 vol% DMSO を用いた（4 例／群）。

KHK7580 の 3、10、30 及び 100 μmol/L による hERG 電流の抑制率は、それぞれ 2.8%、3.4%、9.4%及び 23.2%であった。なお、溶媒における hERG 電流の抑制率は、3.6%であった。

以上の結果から、hERG 電流に対する KHK7580 の IC_{50} 値は 100 μmol/L よりも高値と判断した。

2.6.2.4.2.2 hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 又は hNav1.5 電流に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-3）

hCav1.2 導入チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又は hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 若しくは hNav1.5 導入 HEK293 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して各イオン

電流を測定し、KHK7580 の 10 μmol/L が各イオン電流に及ぼす影響を検討した（4～5 例／群）。溶媒には 0.3 vol% DMSO を用いた（3～4 例／群）。

KHK7580 の 10 μmol/L による hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 及び hNav1.5 電流の抑制率は、それぞれ 2.9%、−0.4%、6.4%、5.3%及び−0.5%であった。なお、溶媒における各イオン 電流の抑制率は、それぞれ 2.3%、0.7%、0.3%、1.0%及び 1.1%であった。

以上の結果から、KHK7580 の 10 μmol/L では hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 及び hNav1.5 電流を抑制しないと判断した。

2.6.2.4.2.3 hKir2.1 又は hKir6.2/SUR2A 電流に及ぼす影響（資料番号：参考 4.2.1.3-4）

hKir2.1 又は hKir6.2/SUR2A 導入 HEK293 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して各イオン電流を測定し、KHK7580 の 10 μmol/L（最終 DMSO 濃度 0.3 vol%）が各イオン電流に及ぼす影響を検討した（5 例／群）。

KHK7580 の 10 μmol/L による hKir2.1 及び hKir6.2/SUR2A 電流の抑制率は、それぞれ−0.1%及び 15.7%であった。

以上の結果から、KHK7580 の 10 μmol/L では hKir2.1 及び hKir6.2/SUR2A 電流を抑制しないと判断した。

2.6.2.4.2.4 乳頭筋の活動電位に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-5）

雄性モルモット（Slc:Hartley）の心臓から摘出した右心室乳頭筋の活動電位を微小電極法で測定し、KHK7580 の 10 μmol/L が乳頭筋の活動電位に及ぼす影響を検討した（5 例／群）。溶媒には 0.1 vol% DMSO を用いた（5 例／群）。

KHK7580 の 10 μmol/L による各活動電位パラメータの変化は認められなかった（RMP：KHK7580 100.0%、vehicle 101.1%；APA：KHK7580 100.9%、vehicle 100.1%；APD_{30}：KHK7580 100.4%、vehicle 99.0%；APD_{50}：KHK7580 99.5%、vehicle 99.6%；APD_{90}：KHK7580 99.1%、vehicle 99.4%；V_{max}：KHK7580 99.0%、vehicle 101.3%）。

以上の結果から、KHK7580 の 10 μmol/L ではモルモット摘出乳頭筋の活動電位に影響を及ぼさないと判断した。

2.6.2.4.2.5 右心房の拍動数に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-6）

雄性ラット（Crl:CD(SD)）の心臓から摘出した右心房をマグヌス槽内に懸垂して約 0.5 g の負荷を加えて拍動数を測定し、KHK7580 の 10 μmol/L が右心房の拍動数に及ぼす影響を検討した（5 例／群）。溶媒には 0.1 vol% DMSO を用いた（5 例／群）。

KHK7580 の 10 μmol/L による拍動数の変化は認められなかった（KHK7580 98.7%、vehicle 98.4%）。

以上の結果から、KHK7580 の 10 μmol/L ではラット右心房の拍動数に影響を及ぼさないと判断した。

2.6.2.4.2.6 無麻酔無拘束ラットにおける心拍数及び血圧に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-7）

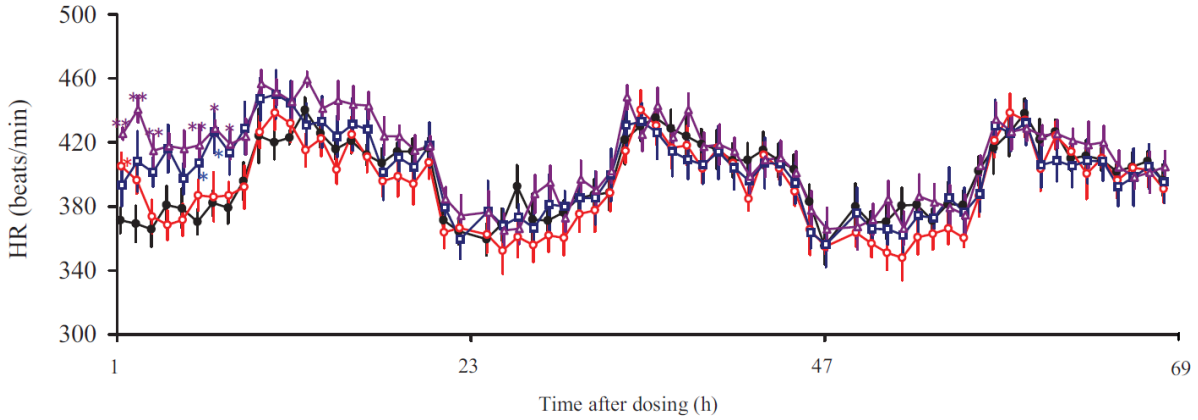
テレメトリー送信器を埋め込んだ雄性ラット（Crl:CD(SD)、12 週齢）を 4 群に振り分け（6 例／群）、媒体（0.5 w/v% MC 溶液）並びに KHK7580 の 1、3 及び 10 mg/kg を単回経口投与し、無麻酔無拘束下における心拍数及び血圧に及ぼす影響を検討した。なお、心拍数及び血圧（収

縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧）は、テレメトリーシステムを用いて投与後 1 から 69 時間まで評価した。

心拍数の推移を図 2.6.2.4.2.6-1に示す。心拍数の増加が 3 及び 10 mg/kg 投与群の投与後 1 から 8 時間まで認められた。また、拡張期血圧及び平均血圧の一過的な上昇が 10 mg/kg 投与群の投与後 1 時間に認められた。一方、収縮期血圧には KHK7580 投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ラットへの KHK7580 の単回投与では、3 mg/kg 以上で心拍数の増加、10 mg/kg で拡張期血圧及び平均血圧の一過的な上昇を示すと判断した。

図2.6.2.4.2.6-1　KHK7580 を単回経口投与した無麻酔無拘束ラットにおける心拍数



媒体（●）、1 mg/kg（○）、3 mg/kg（□）、10 mg/kg（△）
*: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test)
n=6、平均値±標準誤差
HR：心拍数

2.6.2.4.2.7　無麻酔無拘束カニクイザルにおける心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-8）

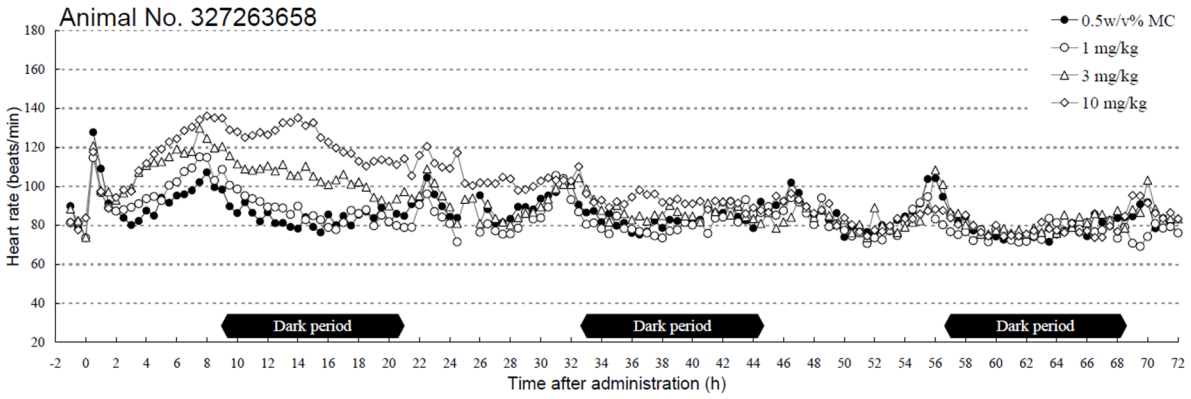
ラテン方格法によるクロスオーバーデザインに従い、テレメトリー送信器を埋め込んだ雄性カニクイザル（4～8 歳齢）4 例に媒体（0.5 w/v% MC 溶液）並びに KHK7580 の 1、3 及び 10 mg/kg を 7 日間間隔で単回経口投与し、無麻酔無拘束下における心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響を検討した。なお、心拍数、血圧（収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧）及び心電図（PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔及び QTc）は、テレメトリーシステムを用いて投与前から投与後 72 時間まで評価した（ただし、PR 間隔及び QRS 幅は投与後 24 時間まで評価した）。更に、当該動物に再び同様に媒体及び KHK7580 を単回経口投与し、全身曝露及び血清中 Ca 濃度を評価した。

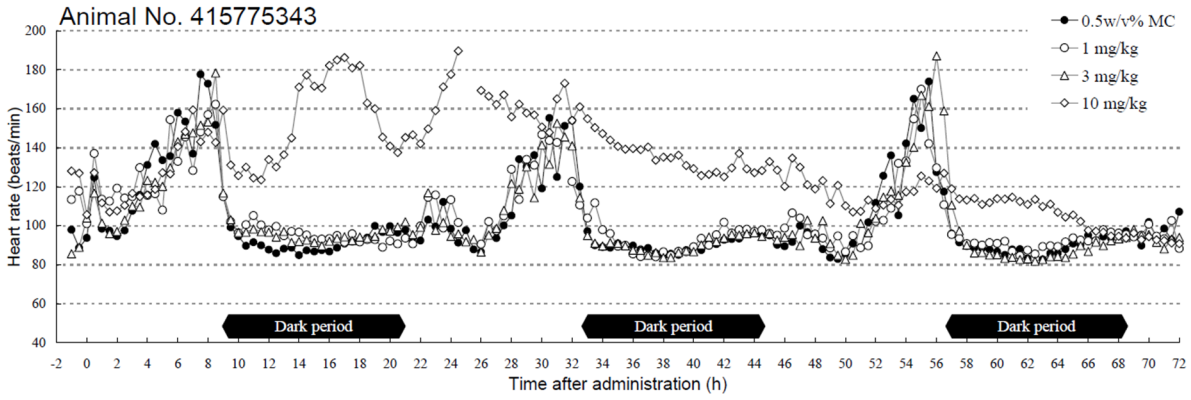
個体間で反応のバラつきが大きかったため、個体別に解析を実施した。心拍数、平均血圧及び QTc における個体別の結果を図 2.6.2.4.2.7-1、図 2.6.2.4.2.7-2及び表 2.6.2.4.2.7-1に示す。動物番号 327263658 では、心拍数の増加が 3 mg/kg 投与後 2～20 時間及び 10 mg/kg 投与後 2～31 時間に認められ、加えて平均血圧の上昇及び QTc の延長がそれぞれ 10 mg/kg 投与後 9～21 時間及び 8～48 時間に認められた。なお、10 mg/kg 投与した当該動物は、暗期（投与後 9～21 時間）に眠っておらず、投与後 24 時間に餌の残存が認められた。動物番号 415775343 では、心拍数の増加、平均血圧の上昇及び QTc の延長がそれぞれ 10 mg/kg 投与後 10～70 時間、10～66 時間及び 2～72 時間に認められた。なお、10 mg/kg 投与した当該動物は、暗期（投与後 9～21 時間）に眠っておらず、投与後 24 時間に筋攣縮及び起立不能が認められた。動物番号

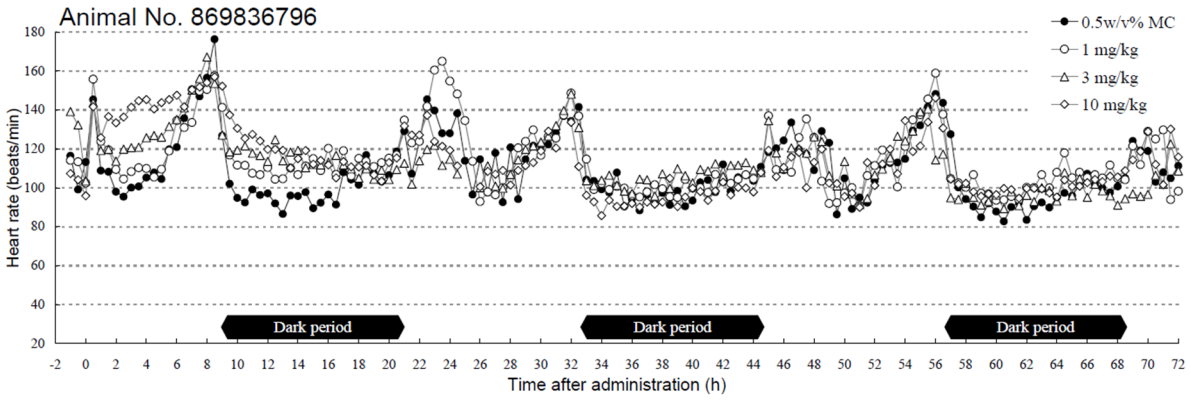
869836796 では、心拍数の増加、平均血圧の上昇及び QTc の延長が 10 mg/kg 投与後 1～6 時間、1～6 時間及び 8 時間に認められた。動物番号 925868518 では、心拍数、平均血圧及び心電図に KHK7580 投与による影響は認められなかった。いずれの個体においても、収縮期血圧及び拡張期血圧は平均血圧と同様な変化が認められ、PR 間隔、QRS 幅及び QT 間隔に KHK7580 投与による影響は認められなかった。

以上、心拍数の増加が 3 mg/kg 投与の 1 例、10 mg/kg 投与の 3 例で認められ、血圧の上昇及び QTc の延長が 10 mg/kg 投与の 3 例で認められた。

図2.6.2.4.2.7-1 KHK7580 を単回経口投与した無麻酔無拘束カニクイザルにおける個体別の心拍数







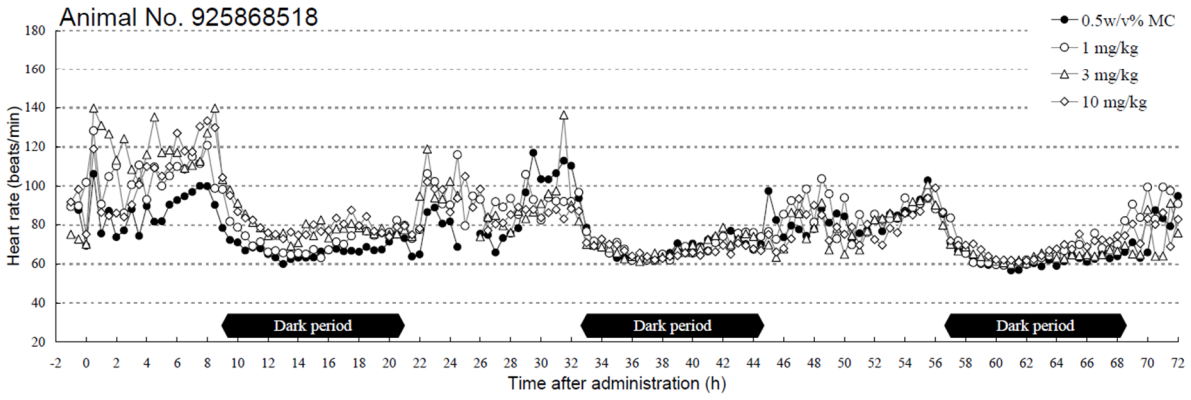
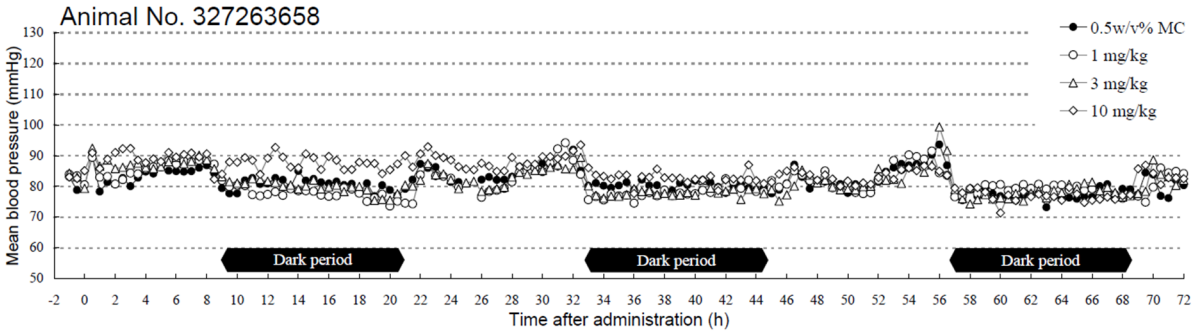
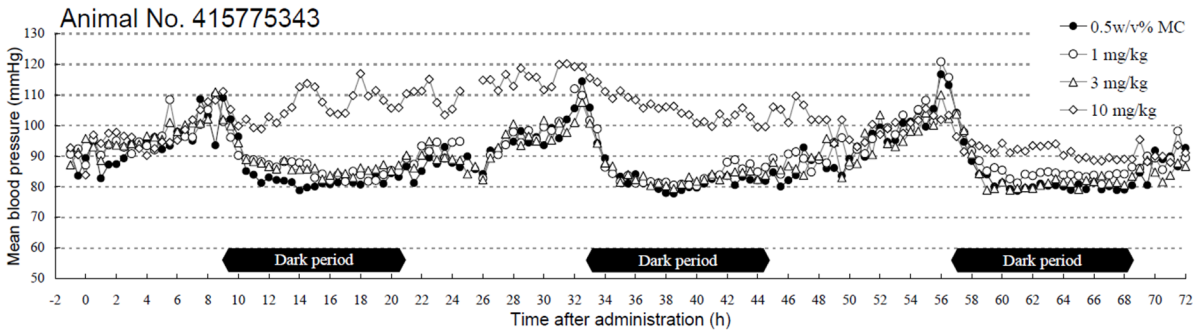
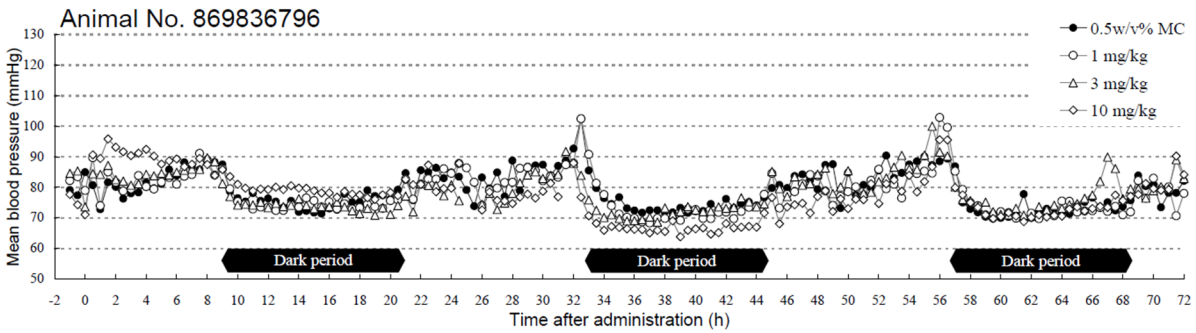


図2.6.2.4.2.7-2　KHK7580 を単回経口投与した無麻酔無拘束カニクイザルにおける個体別の平均血圧







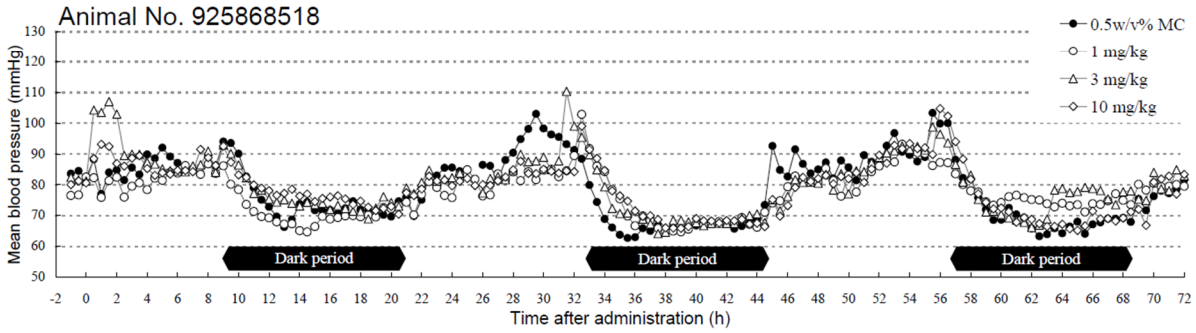


表2.6.2.4.2.7-1 KHK7580 を単回経口投与した無麻酔無拘束カニクイザルにおける個体別の QTc 値

動物番号	投与量 (mg/kg)	QTc[a]							
		投与前	KHK7580 投与後 (h)						
			1	2	4	8	24	48	72
327263658	0	365	365	346	376	353	379	365	362
	1	374	384	390	389	382	396	370	366
	3	360	370	387	391	390	405	385	364
	10	364	364	382	387	**427**	**446**	**455**	395
415775343	0	378	372	366	357	345	375	371	352
	1	375	352	362	388	367	376	379	388
	3	412	403	423	401	358	417	402	389
	10	366	382	**408**	**412**	**412**	MV	**439**	**469**
869836796	0	367	362	370	383	354	364	357	362
	1	363	368	372	369	375	364	363	377
	3	355	380	378	377	386	386	376	370
	10	354	360	374	385	**394**	376	358	356
925868518	0	362	370	370	346	335	373	358	368
	1	362	342	334	367	336	349	344	351
	3	352	342	331	328	358	374	367	345
	10	362	349	347	387	355	334	356	362

MV：Missing value
a：QTc 延長と判断した値を太文字で記し、下線を付けた。

TK 解析の結果を表 2.6.2.4.2.7-2に示す。C_{max}、AUC_{0-24} 及び AUC_{0-72} は KHK7580 の投与量の増加に伴い、上昇及び増加した。t_{max} は 1 及び 3 mg/kg を投与した個体では 1～2 時間であったが、10 mg/kg を投与した個体では 2～8 時間であった。

表2.6.2.4.2.7-2 KHK7580 を単回経口投与した無麻酔無拘束カニクイザルにおける TK パラメータ

投与量 (mg/kg)	動物番号	t_{max} (h)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·h/mL)	AUC_{0-72} (μg·h/mL)
1	327263658	2	0.1114	0.7511	0.7925
	415775343	2	0.1505	1.334	1.430
	869836796	2	0.1673	1.434	1.496
	925868518	1	0.2132	0.9920	1.027
	平均	1.8	0.1606	1.128	1.186
3	327263658	2	1.474	12.18	12.32
	415775343	1	0.6656	2.836	3.077
	869836796	2	1.242	4.485	4.731
	925868518	1	1.958	7.783	7.921
	平均	1.5	1.335	6.821	7.012
10	327263658	8	6.061	88.00	89.76
	415775343	2	2.108	21.96	25.64
	869836796	8	3.590	45.13	46.74
	925868518	2	10.76	136.9	139.7
	平均	5.0	5.630	73.00	75.46

血清中 Ca 濃度の結果を表 2.6.2.4.2.7-3に示す。血清中 Ca 濃度推移は KHK7580 の投与量の増加に伴った低下が認められた。10 mg/kg 投与時の平均最低値は投与後 8 時間の 6.6 mg/dL であり、投与後 72 時間でも完全な回復は認められなかった。

表2.6.2.4.2.7-3 KHK7580 を単回経口投与した無麻酔無拘束カニクイザルにおける血清中 Ca 濃度

投与量 (mg/kg)	動物番号	血清中 Ca 濃度 (mg/dL)							
		投与前	KHK7580 投与後 (h)						
			1	2	4	8	24	48	72
0	327263658	9.2	9.3	9.1	9.2	9.1	9.3	9.7	9.5
	415775343	10.1	10.3	10.0	10.2	10.1	11.0	10.4	10.2
	869836796	9.8	10.0	10.4	9.7	9.3	9.7	10.1	9.9
	925868518	9.5	9.1	9.1	9.6	9.0	9.1	9.3	9.7
	平均	9.7	9.7	9.7	9.7	9.4	9.8	9.9	9.8
1	327263658	9.6	9.5	8.9	8.1	8.1	8.4	9.3	9.1
	415775343	10.5	10.3	9.8	8.7	8.7	9.0	9.6	10.0
	869836796	9.3	9.5	8.8	8.4	8.4	10.1	9.7	9.3
	925868518	10.4	10.0	9.1	8.4	8.2	9.7	9.8	9.5
	平均	10.0	9.8	9.2	8.4	8.4	9.3	9.6	9.5
3	327263658	9.1	9.6	8.6	7.4	5.9	7.5	7.9	8.5
	415775343	9.3	8.8	7.9	7.5	7.6	8.1	8.8	9.3
	869836796	10.0	9.1	8.6	7.9	7.4	8.0	8.7	9.2
	925868518	10.6	9.7	9.3	8.3	7.9	8.5	9.1	9.6
	平均	9.8	9.3	8.6	7.8	7.2	8.0	8.6	9.2
10	327263658	9.5	9.4	8.0	6.8	5.7	5.5	6.8	7.8
	415775343	10.5	9.6	8.7	7.3	6.7	6.3	6.7	7.1
	869836796	10.3	10.3	9.3	8.4	7.2	11.9	11.6	10.4
	925868518	9.6	9.1	8.5	6.9	6.6	7.4	7.8	7.9
	平均	10.0	9.6	8.6	7.4	6.6	7.8	8.2	8.3

以上の結果から、無麻酔無拘束カニクイザルへの KHK7580 の単回経口投与では、3 mg/kg 以上で心拍数の増加、10 mg/kg で血圧の上昇及び QTc の延長を示すと判断した。

2.6.2.4.3 呼吸器系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 無拘束ラットにおける呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に及ぼす影響（資料番号：4.2.1.3-9）

雄性ラット（Crl:CD(SD)、6 週齢）を 4 群に振り分け（8 例／群）、媒体（0.5 w/v% MC 溶液）並びに KHK7580 の 1、3 及び 10 mg/kg を単回経口投与し、1 分間の呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に及ぼす影響を検討した。なお、各呼吸機能は、無拘束下で全身プレチスモグラフィーシステムを用いて、投与前並びに投与後 1、2、4、8 及び 24 時間に測定した。

試験期間中、1 分間の呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に KHK7580 投与による影響は認められなかった。1 回換気量の高値が 10 mg/kg 投与群の投与後 4 時間に、分時換気量の高値が 1 及び 10 mg/kg 投与群の投与後 4 時間に認められたものの、試験施設内の背景値範囲内であること及び投与前の値と同程度であったことから、KHK7580 投与による影響ではないと判断した。

以上の結果から、KHK7580 は 10 mg/kg までの単回経口投与では呼吸器系に影響を及ぼさないと判断した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

副甲状腺における Ca 感知機構である CaR は、7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体であり、副甲状腺細胞では $G_{q/11}$ 活性化を介して phospholipase C が活性化し、inositol 1,4,5-trisphosphate が増加し、細胞内小胞体から Ca^{2+}放出が促進される[4,5]。これに引き続き、電位非依存性 Ca チャネルが開口し、細胞外 Ca^{2+}は細胞内に流入する[1]。CaR 活性化を介した細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇は、副甲状腺細胞からの PTH 分泌抑制に関与している[6]。

KHK7580 の CaR に対する作用を明らかにするため、ヒト CaR 発現細胞に対する作用について検討した。KHK7580 は、ヒト CaR 発現細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させた。また、KHK7580 は、濃度の増加に伴い、細胞外 Ca^{2+}濃度反応曲線を低濃度側へシフトさせた。CaR を活性化するリガンドは、Type I 及び Type II に大別される[7]。例えば、内因性リガンドである Ca^{2+}は、アゴニストとして CaR の細胞外領域に結合して作用する Type I である[8]。一方、ポジティブアロステリックモジュレーターは、アゴニストとは異なる部位に結合し作用する Type II である。フェニルアルキルアミンやナフチルアルキルアミン構造を有する化合物（NPS R-568、calindol 等）は、CaR の膜貫通領域に結合し、アロステリックに作用して CaR 活性を調節していることが知られている[9-12]。KHK7580 は、ナフチルアルキルアミン構造を有しているため、NPS R-568 及び calindol と同様に、7 回膜貫通領域に結合していると推察される。ポジティブアロステリックモジュレーターは、細胞外 Ca^{2+}濃度に対する CaR の感受性を高めるため、細胞外 Ca^{2+}濃度の低値側に EC_{50} 値をシフトさせる[1-3]。KHK7580 は、濃度の増加に伴い、細胞外 Ca^{2+}濃度反応曲線を低濃度側へシフトさせたことから、アロステリックに作用すると考えられた。以上のことから、KHK7580 は、CaR の膜貫通領域に結合し、アロステリックに作用することにより、CaR を活性化すると考えられた。

KHK7580 の *in vivo* 薬理作用を明らかにするため、マウス、ラット、部分腎摘ラットにおける血漿中若しくは血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用を検討した。KHK7580 は、正常ラットへの単回投与、正常マウス及び部分腎摘ラットへの反復投与により、血漿中若しくは血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させた。更に、二次性副甲状腺機能亢進症（SHPT）において認められる副甲状腺細胞増殖及び副甲状腺過形成に対する作用について部分腎摘ラットを用いて検討したところ、KHK7580 は、部分腎摘ラットにおける副甲状腺細胞増殖亢進及び副甲状腺過形成の進展を抑制した。既存の SHPT 治療薬であるシナカルセト塩酸塩は、正常ラットや部分腎摘ラットにおいて、血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を有意に低下させることが報告されている[3,13]。また、NPS R-568 及びシナカルセト塩酸塩は、副甲状腺細胞過形成の進展を抑制することが報告されている[14,15]。シナカルセト塩酸塩は、副甲状腺細胞からの PTH 分泌を抑制すること及び副甲状腺細胞増殖を抑制することにより、血清中 PTH 濃度を低下させると考えられる。シナカルセト塩酸塩の血清中 Ca 濃度低下は、主として血清中 PTH 濃度低下に伴う二次的反応と考えられており、その主要経路として、骨からの Ca 動員の低下及び腎からの Ca 排泄の増加が考えられる。KHK7580 は、シナカルセト塩酸塩との構造学的類似性（ナフチルアルキルアミン構造）及び薬理学的作用の類似性（CaR に対する作用様式、PTH 及び Ca 濃度低下作用など）から、シナカルセト塩酸塩と同様の機序により、血清中 PTH 濃度及び Ca 濃度を低下させていると考えられた。

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

KHK7580 の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対するトレーサー結合阻害作用を検討した。KHK7580 は、10 μmol/L にて、アドレナリン α2A、アドレナリン α2B、アドレナリン α2C 及びドパミン D3 受容体に対して各々82.03%、46.76%、55.68%及び 41.41%の結合阻害率を示したが、1 μmol/L ではいずれも 40%未満であった。予定臨床最大用量 12 mg 投与時の推定非結合型 C_{max}（15.2 ng/mL）（5.3.3.5-1）と上記受容体に対して 40%以上の阻害作用を示す 10 μmol/L（3.74 μg/mL）の比は 240 倍以上であった。したがって、上記受容体に作用を示す濃度はヒトで想定される血中濃度と比較して極めて高い濃度と考えられた。

KHK7580 の尿量及び尿中電解質（Na、K、Cl）排泄に対する影響、尿中 Ca 及び IP 排泄量、並びに尿 pH に対する影響を検討した。KHK7580 は、正常ラットにおいて、尿中 Ca 及び Cl 排泄量を増加させ、IP 排泄量を低下させた。また、KHK7580 は尿 pH を低下させた。尿量と尿中 Na 及び K 排泄量に対しては、KHK7580 は影響を及ぼさなかった。腎臓の尿細管領域（特にヘンレループの太い上行脚）では CaR の発現が多く、Ca や電解質の再吸収に関与している[16,17]。腎尿細管における CaR 活性化により、Ca 再吸収の抑制や Cl 再吸収に関与する Na^+-K^+-$2Cl^-$共輸送体（NKCC2）の不活性化が認められることから、KHK7580 による尿中 Ca 及び Cl 排泄量の増加は CaR 活性化に伴う変化と考えられた。Ca 再吸収抑制作用は、ラットにおける血清中 Ca 濃度低下作用に一部寄与している可能性が示唆される。また、PTH は腎尿細管に作用することにより IP 再吸収を抑制することから[18]、KHK7580 の血清中 PTH 濃度低下作用により、腎尿細管での IP 再吸収が促進され、IP 排泄量が減少したと考えられた。更に、集合管における CaR 活性化により H^+-ATPase 活性化を介した尿酸性化が報告されていることから[19]、KHK7580 による尿 pH 低下は CaR 活性化に伴う作用と考えられた。

シナカルセト塩酸塩の有害事象として、悪心・嘔吐、胃不快感、食欲不振、腹部膨満等の上部消化管障害が発現する。透析患者において、シナカルセト塩酸塩使用時に上部消化管障害が発現した症例では、胃排出能の遅延が強く認められており[20]、ラットにおいて、シナカルセト塩酸塩が胃排出能を抑制することが報告されている[21]。KHK7580 の胃排出能に及ぼす影響を明らかにするため、ラットにおける胃排出に対する作用を検討し、シナカルセト塩酸塩と比較した。KHK7580 は、正常ラットにおいて PTH を有意に低下させた投与量（0.03 mg/kg）の 100 倍の投与量においてもラット胃排出率に影響を与えなかった。正常ラットにおいて、KHK7580 の 0.03 mg/kg と同程度の PTH 低下作用を示すシナカルセト塩酸塩の投与量は 1 mg/kg と推定されるが[3]、その 30 倍の投与量から胃排出率の有意な低下が認められた。上部消化管には CaR が発現しているものの[22,23]、上部消化管障害は様々な要因によって生じることから、シナカルセト塩酸塩の胃排出抑制機序は不明である。しかし、シナカルセト塩酸塩がラットにおいて胃排出能を低下させたのに対し KHK7580 は影響を及ぼさなかったことから、KHK7580 は、シナカルセト塩酸塩に比べ、胃排出能に与える影響が少ないと考えられた。

KHK7580 代謝物の CaR に対する作用を明らかにするため、ヒト CaR 発現細胞に対する作用について検討した。M1 及び M2 は、ヒト CaR 発現細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させた。それぞれの EC_{50}値が KHK7580 と同程度であったことから、M1 及び M2 は、KHK7580 と同程度の CaR 作動活性を有していることが示唆された。

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響を検討した。以下に、各試験の概要及び認められた所見の考察を記載する。なお、安全域は、*in vitro* 試験では処理濃度、*in vivo* 試験では非結合型 C_{max} を用いて予定臨床最大用量 12 mg 投与時の推定非結合型 C_{max}（15.2 ng/mL）（5.3.3.5-1）に対する比として算出した。

中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響を雄性ラットで検討した結果、最高用量 10 mg/kg の単回経口投与でも影響は認められず、安全域は 32 倍以上であった。

心血管系に及ぼす影響として、hERG 電流を含む心筋イオンチャネル電流、雄性モルモット乳頭筋の活動電位、雄性ラット右心房の拍動数、無麻酔無拘束雄性ラットの心拍数及び血圧並びに無麻酔無拘束雄性カニクイザルの心拍数、血圧及び心電図を検討した。hERG 電流に対する IC_{50} 値は 100 µmol/L よりも高値であり、その他心筋イオンチャネル電流（hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3、hNav1.5、hKir2.1 及び hKir6.2/SUR2A）は 10 µmol/L で抑制されなかった。加えて、雄性モルモット乳頭筋及び雄性ラット右心房でも、10 µmol/L で活動電位及び拍動数に影響はなかった。したがって、*in vitro* 評価では、いずれも 10 µmol/L で心血管系に及ぼす影響は認められず、安全域は 250 倍以上であった。無麻酔無拘束雄性ラットでは、3 mg/kg 以上の投与群で心拍数の増加、10 mg/kg 投与群で血圧の一過的な上昇が認められ、安全域はそれぞれ 4.0 倍以上、6.8 倍以上であった。無麻酔無拘束雄性カニクイザルでも、3 mg/kg 以上の投与群で心拍数の増加、10 mg/kg 投与群で血圧の上昇及び QTc の延長が認められ、安全域はそれぞれ 0.40 倍以上、3.3 倍以上であった。

安全性薬理試験では、心血管系に及ぼす影響として心拍数の増加、血圧の上昇及び QTc の延長が認められた。これら所見は、他の CaR 作動薬でも認められているため[24-26)]、薬理作用に起因する可能性が高い。

心拍数の増加については、特にラット及びカニクイザルの 2 種で認められ、カニクイザルでの安全域は 1 倍未満であった。心拍数の増加を示したラット及びカニクイザルにおける非結合型 C_{max} はそれぞれ 103.9～118.8 及び 50.73～65.42 ng/mL であったが、それよりも 31 倍以上高い濃度（10 µmol/L：3744.8 ng/mL）でも雄性ラット右心房における拍動数（*in vitro* 評価）に影響しなかった。したがって、心拍数の増加は心臓への直接作用よりも薬理作用に基づく二次的な影響に起因すると考えた。

血圧の上昇については、血漿中 KHK7580 濃度推移に合致せず、心拍数の増加と同様、血管への直接作用よりも薬理作用に基づく二次的な影響に起因すると考えた。特に、暗期に血圧が上昇した 2 例のカニクイザルはいずれも眠っていなかったため、暗期の血圧上昇に対する不眠の影響を推察した。

QTc の延長については、1）各種心筋イオンチャネル電流及び雄性モルモット乳頭筋の活動電位に影響しないこと、2）カニクイザルにおける QTc 及び血清中 Ca 濃度の推移、3）血中 Ca 濃度低下によって QTc が延長するとの公知情報[27-30)]を踏まえ、薬理作用に基づく二次的な影響、すなわち低 Ca 血症に起因すると結論付けた。

以上より、安全性薬理試験では心血管系に及ぼす影響のみが認められ、本影響は薬理作用に基づく二次的な影響に起因すると考えた。特に、カニクイザルにおける心拍数の増加については、安全域は 1 倍未満であった。しかし、本所見は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では認められなかったため、急性的な反応であり、毒性学的意義は低いと判断した。また、血圧の上昇及び QTc の延長については、過度の薬理作用に注意すれば、ヒトにおける安全性は確保できると判断した。

2.6.2.7 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1. Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BCP, Van Wagenen BC, DelMar EG, et al. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:4040-5.
2. Parmentier ML, Prezeau L, Bockaert J, Pin JP. A model for the functioning of family 3 GPCRs. Trends Pharmacol Sci. 2002;23:268-74.
3. Nemeth EF, Heaton WH, Miller M, Fox J, Balandrin MF, Van Wagenen BC, et al. Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl. J Pharmacol Exp Ther. 2004;308:627-35.
4. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+}-sensing receptor from bovine parathyroid. Nature. 1993;366:575-80.
5. Kifor O, Kifor I, Brown EM. Signal transduction in the parathyroid. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2002;11:397-402.
6. Almaden Y, Canalejo A, Ballesteros E, Anon G, Canadillas S, Rodriguez M. Regulation of arachidonic acid production by intracellular calcium in parathyroid cells: effect of extracellular phosphate. J Am Soc Nephrol. 2002;13:693-8.
7. Nemeth EF. Allosteric modulators of the extracellular calcium receptor. Drug Discov Today Technol. 2013;10:e277-84.
8. Hammerland LG, Krapcho KJ, Garrett JE, Alasti N, Hung BCP, Simin RT, et al. Domains determining ligand specificity for Ca^{2+} receptors. Mol Pharmacol. 1999;55:642-8.
9. Hauache OM, Hu J, Ray K, Xie R, Jacobson KA, Spiegel AM. Effects of a calcimimetic compound and naturally activating mutations on the human Ca^{2+} receptor and on Ca^{2+} receptor/metabotropic glutamate chimeric receptors. Endocrinology. 2000;141:4156-63.
10. Hu J, Reyes-Cruz G, Chen W, Jacobson KA, Spiegel AM. Identification of acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca^{2+} receptor critical for response to Ca^{2+} and a positive allosteric modulator. J Biol Chem. 2002;277:46622-31.
11. Ray K, Northup J. Evidence for distinct cation and calcimimetic compound (NPS 568) recognition domains in the transmembrane regions of the human Ca^{2+} receptor. J Biol Chem. 2002;277:18908-13.
12. Ray K, Tisdale J, Dodd RH, Dauban P, Ruat M, Northup JK. Calindol, a positive allosteric modulator of the human Ca^{2+} receptor, activates an extracellular ligand-binding domain-deleted rhodopsin-like seven-transmembrane structure in the absence of Ca^{2+}. J Biol Chem. 2005;280:37013-20.
13. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzen E, Towler DA, Lacey D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 but not cinacalcet HCl (Sensipar®/Mimpara®) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. Nephrol Dial Transplant. 2005;20:1370-7.

14. Wada M, Furuya Y, Sakiyama J, Kobayashi N, Miyama S, Ishi H, et al. The calcimimetic compound NPS R-568 suppresses parathyroid cell proliferation in rats with renal insufficiency. J Clin Invest. 1997;100:2977-83.
15. Colloton M, Shatzen E, Miller G, Stehman-Breen C, Wada M, Lacey D, et al. Cinacalcet HCl attenuates parathyroid hyperplasia in a rat model of secondary hyperparathyroidism. Kidney Int. 2005;67:467-76.
16. Graca JAZ, Schepelmann M, Brennan SC, Reens J, Chang W, Yan P, et al. Comparative expression of the extracellular calcium-sensing receptor in the mouse, rat, and human kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2016;310:F518-33.
17. Riccardi D, Valenti G. Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. Nat Rev Nephrol. 2016;12:414-25.
18. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. J Clin Invest. 2008;118:3820-8.
19. Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, Verkaart S, van der Kemp AW, Nowik M, et al. The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. J Am Soc Nephrol. 2009;20:1705-13.
20. 福本和生, 野口智永, 酉家佐吉子, 島津栄一, 三宅晋. シナカルセト塩酸塩の上部消化管合併症の機序. 透析会誌. 2010;43:309-15.
21. 春山和佳, 川田剛央, 紹慶洋治, 加藤恵理, 荒木美保, 増田奈美, ら. シナカルセト塩酸塩の嘔吐誘発作用に対するドンペリドンの予防効果―マーモセットおよびラットを用いた基礎検討―. 腎と透析. 2011;70:301-6.
22. Chattopadhyay N, Cheng I, Rogers K, Riccardi D, Hall A, Diaz R, et al. Identification and localization of extracellular Ca^{2+}-sensing receptor in rat intestine. Am J Physiol. 1998;274:G122-30.
23. Rutten MJ, Bacon KD, Marlink KL, Stoney M, Meichsner CL, Lee FP, et al. Identification of a functional Ca^{2+}-sensing receptor in normal human gastric mucous epithelial cells. Am J Physiol. 1999;277:G662-70.
24. Odenwald T, Nakagawa K, Hadtstein C, Roesch F, Gohlke P, Ritz E, et al. Acute blood pressure effects and chronic hypotensive action of calcimimetics in uremic rats. J Am Soc Nephrol. 2006;17:655-62.
25. Fryer RM, Segreti JA, Widomski DL, Franklin PH, Banfor PN, Koch KA, et al. Systemic activation of the calcium sensing receptor produces acute effects on vascular tone and circulatory function in uremic and normal rats: focus on central versus peripheral control of vascular tone and blood pressure by cinacalcet. J Pharmacol Exp Ther. 2007;323:217-26.
26. Fielden MR, Dean C Jr, Black K, Sawant SG, Subramanian R, Tomlinson JE, et al. Nonclinical safety profile of etelcalcetide, a novel peptide calcimimetic for the treatment of secondary hyperparathyroidism. Int J Toxicol. 2016;35:294-308.
27. Davis TM, Singh B, Choo KE, Ibrahim J, Spencer JL, St John A. Dynamic assessment of the electrocardiographic QT interval during citrate infusion in healthy volunteers. Br Heart J. 1995;73:523-6.

28. Fukuda T, Toyoshima S, Nakashima Y, Koshitani O, Kawaguchi Y, Momii A. Tolerable infusion rate of citrate based on clinical signs and the electrocardiogram in conscious dogs. Clin Nutr. 2006;25:984-93.
29. Zhang Y, Post WS, Dalal D, Bansal S, Blasco-Colmenares E, Jan De Beur S, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D, calcium, phosphorus, and electrocardiographic QT interval duration: findings from NHANES III and ARIC. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96:1873-82.
30. Newman DB, Fidahussein SS, Kashiwagi DT, Kennel KA, Kashani KB, Wang Z, et al. Reversible cardiac dysfunction associated with hypocalcemia: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. Heart Fail Rev. 2014;19:199-205.

KHK7580

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

協和発酵キリン株式会社

目次

目次 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 12

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質: KHK7580					
試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
効力を裏付ける試験					
ヒト CaR に対する作用	ヒト CaR 発現 HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted]	[redacted]061[redacted]	4.2.1.1-1
ヒト CaR に対する作用様式	ヒト CaR 発現 HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted]	[redacted]102[redacted]	4.2.1.1-2
マウスにおける 2 週間反復経口投与による血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用	マウス/Jcl: ICR	経口	協和発酵キリン株式会社	d-[redacted]-0838	4.2.1.1-3
ラットにおける血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用	ラット/Jcl:SD	経口	協和発酵キリン株式会社	d-[redacted]-926	4.2.1.1-4
部分腎摘ラットにおける 2 週間反復経口投与による血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用	ラット/Jcl:SD（部分腎摘）	経口	協和発酵キリン株式会社	d-[redacted]-0633	4.2.1.1-5
部分腎摘ラットにおける副甲状腺細胞増殖に対する作用	ラット/Crl:CD(SD)（部分腎摘）	経口	協和発酵キリン株式会社	r-[redacted]-0196	参考 4.2.1.1-6
副次的薬理試験					
受容体結合試験	動物組織、市販クローンレセプター	*In vitro*	[redacted]	[redacted]137[redacted]	4.2.1.2-1
ラット尿中電解質に関する試験	ラット/Crl:CD(SD)	経口	[redacted]	[redacted]170	4.2.1.2-2
ラットにおける胃排出に対する作用	ラット/Crlj:WI(Wistar)	経口	協和発酵キリン株式会社	d-[redacted]-0068	4.2.1.2-3
ヒト CaR に対する KHK7580 代謝物の作用	ヒト CaR 発現 HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted]	[redacted]361[redacted]	4.2.1.2-4

CaR: Calcium receptor（カルシウム受容体）
[redacted]（現[redacted]）

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質: KHK7580					
試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
安全性薬理試験					
中枢神経系に及ぼす影響 ラットにおける一般症状及び行動に及ぼす影響	ラット/Crl:CD(SD)	経口	[redacted]	[redacted]275	4.2.1.3-1
心血管系に及ぼす影響 hERG 電流に及ぼす影響	hERG 導入 HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted]	[redacted]037	4.2.1.3-2
心血管系に及ぼす影響 hCav1.2、hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 又は hNav1.5 電流に及ぼす影響	hCav1.2 導入 CHO 細胞又は hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 若しくは hNav1.5 導入 HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted]	[redacted]923[redacted]	4.2.1.3-3
心血管系に及ぼす影響 hKir2.1 又は hKir6.2/SUR2A 電流に及ぼす影響	hKir2.1 又は hKir6.2/SUR2A 導入 HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted]	[redacted]924[redacted]	参考 4.2.1.3-4
心血管系に及ぼす影響 乳頭筋の活動電位に及ぼす影響	モルモット摘出乳頭筋	*In vitro*	[redacted]	[redacted]271	4.2.1.3-5
心血管系に及ぼす影響 右心房の拍動数に及ぼす影響	ラット摘出右心房	*In vitro*	[redacted]	[redacted]713	4.2.1.3-6
心血管系に及ぼす影響 無麻酔無拘束ラットにおける心拍数及び血圧に及ぼす影響	ラット/Crl:CD(SD)	経口	[redacted]	[redacted]362[redacted]	4.2.1.3-7
心血管系に及ぼす影響 無麻酔無拘束カニクイザルにおける心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響	カニクイザル	経口	[redacted]	[redacted]167	4.2.1.3-8
呼吸器系に及ぼす影響 無拘束ラットにおける呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に及ぼす影響	ラット/Crl:CD(SD)	経口	[redacted]	[redacted]012	4.2.1.3-9

[redacted]（現[redacted]）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量[a]	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ヒト CaR に対する作用	ヒト CaR 発現 HEK293 細胞	*In vitro*	3~30000	NA	KHK7580 は、濃度の増加に伴い、細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させた（EC_{50} 値: 6.70×10^{-8}～1.59×10^{-7} mol/L）。	非適	[redacted]061[redacted]
ヒト CaR に対する作用様式	ヒト CaR 発現 HEK293 細胞	*In vitro*	0, 20, 60	NA	KHK7580 は、濃度の増加に伴い細胞外 Ca^{2+}濃度反応曲線を低濃度側へシフトさせ、アロステリック作動活性を有することが示唆された。	非適	[redacted]102[redacted]
マウスにおける 2 週間反復投与による血漿中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用	マウス/Jcl: ICR	経口、14 日間反復	0, 0.3, 1, 3	雄 6 例 雌 6 例	KHK7580 は、正常マウスにおいて、投与量の増加に伴い、血漿中 PTH 濃度及び血漿中 Ca 濃度を低下させた。	非適	d-[redacted]-0838
ラットにおける血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用	ラット/Jcl:SD	経口	0, 0.03, 0.1, 0.3, 1	雄 10 例	KHK7580 は、正常ラットにおいて、0.03 mg/kg 以上の投与群で有意に血清中 PTH 濃度を低下させ、0.1 mg/kg 以上の投与群で血清中 Ca 濃度を有意に低下させた。	非適	d-[redacted]-926
部分腎摘ラットにおける 2 週間反復投与による血清中 PTH 及び Ca 濃度に対する作用	ラット/Jcl:SD（部分腎摘）	経口、14 日間反復	0, 0.03, 0.1, 0.3, 1	雄 12 例	KHK7580 は、部分腎摘ラットにおいて、0.1 mg/kg 以上の投与群で有意に血清中 PTH 及び Ca 濃度を低下させた。	非適	d-[redacted]-0633
部分腎摘ラットにおける副甲状腺細胞増殖に対する作用	ラット /Crl:CD(SD)（部分腎摘）	経口、28 日間反復	0, 0.1, 0.3	雄 12 例	KHK7580 は、部分腎摘ラットにおいて、0.1 mg/kg 以上の投与群で副甲状腺細胞増殖亢進及び副甲状腺過形成の進展を抑制した。	非適	r-[redacted]-0196

NA: 適応外
a: *in vivo* 試験が mg/kg、*in vitro* 試験が nmol/L。また、*in vivo* 試験は特にことわりがない限り単回投与。
CaR: Calcium receptor（カルシウム受容体）

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量[a]	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
受容体結合試験	動物組織市販クローンレセプター	*In vitro*	1, 10	NA	KHK7580 は、10 μmol/L の濃度において、アドレナリンα2A、アドレナリンα2B、アドレナリンα2C 及びドパミン D3 受容体に対して各々 82.03%、46.76%、55.68%及び 41.41%の阻害率を示した。これらの受容体に対して、1 μmol/L の濃度では、KHK7580 の結合阻害率はいずれも 40%未満であった。	非適	[redacted]137[redacted]
ラット尿中電解質に関する試験	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 0.3, 1, 3	雄 8 例	KHK7580 は、0.3 mg/kg 以上の投与群で Ca 排泄量を増加させ、IP 排泄量を減少させた。更に、1 mg/kg 以上の投与群で Cl 排泄量を増加させ、3 mg/kg の投与群では尿 pH を低下させた。Na 及び K 排泄量に対しては、KHK7580 は影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]170
ラットにおける胃排出に対する作用	ラット/Crlj:WI (Wistar)	経口	KHK7580: 0, 0.3, 1, 3 シナカルセト塩酸塩: 0, 10, 30, 100	雄 7~8 例	シナカルセト塩酸塩は、30 mg/kg の投与量から胃排出率を有意に低下させた。 KHK7580 は、正常ラットにおいて PTH を有意に低下させた投与量（0.03 mg/kg）の 100 倍の投与量においても胃排出率に影響を与えなかった。	非適	d-[redacted]-0068

NA: 適応外

a: *in vivo* 試験が mg/kg、*in vitro* 試験が μmol/L。また、*in vivo* 試験は単回投与。

2.6.3.3 副次的薬理試験（続き）

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量 (nmol/L)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ヒト CaR に対する KHK7580 代謝物の作用	ヒトCaR発現HEK293細胞	*In vitro*	M1: 3~30000 M2: 3~30000	NA	M1 及び M2 は、濃度の増加に伴い、細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させた。EC_{50} 値はそれぞれ、7.89×10^{-8}～1.24×10^{-7} mol/L 及び 1.83×10^{-7}～2.08×10^{-7} mol/L であった。	非適	[redacted]361[redacted]

NA: 適応外
CaR: Calcium receptor（カルシウム受容体）

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量 [a]	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
中枢神経系	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 1, 3, 10	雄 6 例	Irwin 変法で一般症状と行動に及ぼす影響を単回投与後 72 時間まで検討した結果、KHK7580 投与による影響は認められなかった。	適	[redacted]275
心血管系	hERG 導入 HEK293 細胞	*In vitro*	3, 10, 30, 100	NA	ホールセルパッチクランプ法で hERG 電流に及ぼす影響を検討した結果、IC_{50}値は 100 μmol/L よりも高値と判断した（阻害率: 23.2% @ 100 μmol/L）。	適	[redacted]037
心血管系	hCav1.2 導入 CHO 細胞又は hKv1.5、hKvLQT1/minK、hKv4.3 若しくは hNav1.5 導入 HEK293 細胞	*In vitro*	10	NA	ホールセルパッチクランプ法で複数のイオン電流に及ぼす影響を検討した結果、いずれのイオン電流も10 μmol/Lでは抑制しないと判断した（阻害率: 2.9%/hCav1.2電流、−0.4%/hKv1.5電流、6.4%/hKvLQT1/minK 電流、5.3%/hKv4.3 電流、−0.5%/hNav1.5 電流）。	適	[redacted]923[redacted]

NA: 適応外
a: *in vivo* 試験が mg/kg、*in vitro* 試験が μmol/L。また、*in vivo* 試験は単回投与。

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量 (μmol/L)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
心血管系	hKir2.1 又は hKir6.2/SUR2A 導入 HEK293 細胞	*In vitro*	10	NA	ホールセルパッチクランプ法で複数のイオン電流に及ぼす影響を検討した結果、いずれのイオン電流も10 μmol/Lでは抑制しないと判断した（阻害率: −0.1%/hKir2.1電流、15.7%/hKir6.2/SUR2A電流）。	非適	[redacted]924[redacted]
心血管系	モルモット摘出乳頭筋	*In vitro*	10	雄	微小電極法で乳頭筋の活動電位に及ぼす影響を検討した結果、10 μmol/Lで影響を及ぼさないと判断した （RMP: 100.0%、APA: 100.9%、APD_{30}: 100.4%、APD_{50}: 99.5%、APD_{90}: 99.1%、V_{max}: 99.0%）。	適	[redacted]271
心血管系	ラット摘出右心房	*In vitro*	10	雄	右心房をマグヌス槽内に懸垂して約0.5 gの負荷を加えて拍動数に及ぼす影響を検討した結果、10 μmol/Lで影響を及ぼさないと判断した（拍動数: 98.7%）。	適	[redacted]713

NA: 適応外

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/ 系統	投与方法	投与量[a] (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
心血管系	ラット/Crl:CD(SD) （テレメトリー）	経口	0, 1, 3, 10	雄 6 例	無麻酔無拘束下で心拍数及び血圧に及ぼす影響を単回投与後 69 時間まで検討した結果、3 及び 10 mg/kg の投与後 1～8 時間において心拍数の増加、10 mg/kg の投与後 1 時間において拡張期血圧及び平均血圧の一過的な上昇が認められた。なお、収縮期血圧については KHK7580 投与による影響は認められなかった。	適	[redacted]362[redacted]
心血管系	カニクイザル （テレメトリー）	経口	0, 1, 3, 10	雄 4 例 （ラテン方格法によるクロスオーバーデザイン）	無麻酔無拘束下で、心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響を単回投与後 72 時間まで検討した。個体間で反応のバラつきが大きく、個別に解析を実施した。その結果、心拍数の増加が 3 mg/kg の 1 例及び 10 mg/kg の 3 例で認められた。加えて、血圧の上昇及び QTc の延長が 10 mg/kg の 3 例で認められた。QTc 以外の心電図パラメータに KHK7580 投与による影響は認められなかった。	適	[redacted]167

a: 単回投与

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質: KHK7580							
評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量[a] (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
呼吸器系	ラット /Crl:CD(SD)	経口	0, 1, 3, 10	雄 8 例	無拘束下で全身プレチスモグラフィーシステムを用いて呼吸数、一回換気量及び分時換気量に及ぼす影響を単回投与後 24 時間まで検討した結果、KHK7580 投与による影響は認められなかった。	適	[redacted]012

a: 単回投与

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。