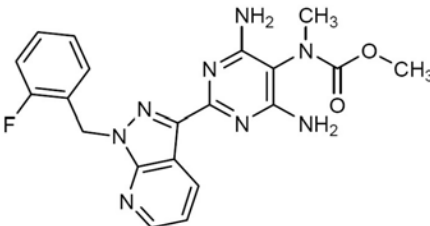


2.6.1 緒言

リオシグアト（以下、「本薬」）は、新規の可溶性グアニル酸シクラーゼの選択的刺激薬である。

本薬の理化学的性状を以下に要約する。

構造式	
化学名	(英名) Methyl N-(4,6-diamino-2-{1-[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl}pyrimidin-5-yl)-N-methylcarbamate (日本名) N-(4,6-ジアミノ-2-{1-[(2-フルオロフェニル)メチル]-1H-ピラゾロ[3,4-b]ピリジン-3-イル}ピリミジン-5-イル)-N-メチルカルバミン酸メチル
分子式	C ₂₀ H ₁₉ N ₈ O ₂
分子量	422.42
CAS 登録番号	625115-55-1
一般名 (JAN)	リオシグアト
社内コード	BAY 63-2521 micronized
鏡像異性／立体化学	なし

本薬の薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的性質を明らかにするため、広範な非臨床試験を実施した。まず、本薬の薬理試験成績には、作用機序を検討する *in vitro* 試験及び種々の肺高血圧症モデルにおける作用を検討する *in vivo* 試験を含めた。本薬の薬物動態特性（吸収、分布、代謝、排泄）を詳細に検討するための非臨床試験を実施した。また、安全性薬理試験では、特に心血管系に対する安全性をはじめとする生命維持に重要な器官系について検討した。毒性試験として、単回及び反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、及び特定の問題に関する試験（機序検討及び幼若期毒性）などを実施した。

また、本薬の主代謝物である M-1 (BAY 60-4552) についても、薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的性質を明らかにするため、非臨床試験を実施した。

安全性試験は、試験法ガイドライン（ICH 及び OECD）及び医薬品 GLP に従って実施した。実施した非臨床試験の詳細と結果を 2.6.2 以降の項に記載する。

本薬の〔効能・効果〕及び〔用法・用量〕を以下に示す。

〔効能・効果〕

手術不適応又は術後に残存・再発した慢性血栓塞栓性肺高血圧症

〔用法・用量〕

用量調節期

通常、成人にはリオシグアトとして 1 回 1.0mg を 1 日 3 回（約 6～8 時間間隔）経口投与から開始し、2 週間継続する。収縮期血圧が 95mmHg 以上で低血圧症状を示さない場合には、2 週間間隔で 1 回用量を 0.5mg ずつ増量するが、最高用量は 1 回 2.5mg 1 日 3 回までとする。収縮期血圧が 95mmHg 未満でも低血圧症状を示さない場合は、現行の用量を維持するが、低血圧症状を伴う場合には、1 回用量を 0.5mg ずつ減量する。

用量維持期

用量調節期に決定した用量を維持する。用量維持期においても、最高用量は 1 回 2.5mg 1 日 3 回までとし、低血圧症状の発現など、忍容性がない場合には、減量する。1 回の服用を忘れた場合には、次の服用時刻に 1 回用量を服用させる。

投与中断時

3 日間以上投与が中断した場合には、再開時に 1 回 1.0mg 1 日 3 回を 2 週間経口投与し、その後は上記に従い用量調節を行う。

略語一覧

略 語	英 語 名 称	日 本 語 名 称
μg	microgram	マイクログラム
ADP	adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
AGP	α ₁ -acidic glycoprotein	α ₁ -酸性糖たん白
ALD	aldolase	アルドラーゼ
ALT	alanine (amino-)transferase	アラニン (アミノ) トランスフェラーゼ
ANF	Atrial natriuretic factor	心房性ナトリウム利尿因子
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ANP	Atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド
APD _x	action potential duration at x% repolarization	x%再分極時の活動電位持続時間
app	apparent	見かけの
ARB	angiotensin-receptor blocker	アンジオテンシン受容体拮抗薬
ASA	acetylsalicylic acid	アセチルサリチル酸
AUC	area under the plasma concentration vs time curve, area under the plasma concentration vs time curve from zero to infinity	血漿中濃度－時間曲線下面積、投与後 0－無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC _{norm}	dose normalized area under the plasma concentration vs time curve	体重当たりの投与量で正規化した血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC _u	area under the plasma concentration of unbound fraction vs time curve	非結合型血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC _(0-x)	area under the plasma concentration vs time curve (from zero to x h)	投与後 0－x 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC _{(0-x)norm}	dose normalized area under the plasma concentration vs time curve (from zero to x h)	体重当たりの投与量で正規化した投与後 0－x 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性たん白
bid	bis in die (twice a day)	1 日 2 回
BMD	bone mineral density	骨密度
BNP	B-type natriuretic peptide	B 型ナトリウム利尿ペプチド
C(24)	drug concentration in plasma at 24 h after administration	投与後 24 時間の血漿中薬物濃度
cAMP	cyclic adenosine-3',5'-monophosphate	環状アデノシン - 3',5' - ーリン酸
CAT、CA-T	Carnitine acetyltransferase	カルニチンアセチルトランスフェラーゼ

略 語	英 語 名 称	日 本 語 名 称
C _b	concentration in blood	血中濃度
C _{eq} (24)	equivalent concentration of radioactivity at 24 h	投与後 24 時間の放射能当量濃度
C _{eqmax}	maximum equivalent concentration of radioactivity	最高放射能当量濃度
cGMP	cyclic guanosine-3',5'-monophosphate	環状グアノシン - 3',5' - ーリン酸
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C _{max}	maximum drug concentration in plasma	最高血漿中薬物濃度
C _{max, norm}	dose normalized maximum drug concentration in plasma	体重当たりの投与量で補正した最高血漿中薬物濃度
C _{max, u}	maximum concentration of unbound fraction	非結合型の最高血漿中薬物濃度
C _{min}	minimum drug concentration in plasma	最低血漿中薬物濃度
CNP	C-type natriuretic peptide	C 型ナトリウム利尿ペプチド
CNS	central nervous system	中枢神経系
C _p	concentration in plasma	血漿中濃度
CTEPH	chronic thromboembolic pulmonary hypertension	慢性血栓塞栓性肺高血圧症
CTX	C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen	I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DEA/NO	2-(N,N-Diethylamino)-diazeneolate-2-oxide. Diethylammonium salt	2 - (N,N-ジエチルアミノ) - ジアゼノレート - 2 - オキサイド、ジエチルアンモニウム塩
DMSO	dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
EC ₅₀	50% effective concentration	50%有効濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
ECOD	7-ethoxycoumarin-deethylase	7 - エトキシクマリン - デエチラーゼ
EH	epoxide hydrolase	エポキシドヒドロラーゼ
EMA	European Medicines Agency	ヨーロッパ医薬品庁
EROD	7-ethoxyresorufin-deethylase	7 - エトキシレゾルフィン - デエチラーゼ
F, f	female(s)	雌
F0	filial 0	第 0 世代
F1	filial 1	第 1 世代

略 語	英 語 名 称	日 本 語 名 称
F2	filial 2	第 2 世代
FACS	fluorescence activated cell scan	蛍光活性化細胞選別
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価法
f_u	fraction of free (unbound) drug in plasma	血漿中遊離体（非結合型）分率
G	gestation day	妊娠日
GC-A	guanylate cyclase A	グアニル酸シクラーゼ A
GC-B	guanylate cyclase B	グアニル酸シクラーゼ B
GGT	γ -glutamyltransferase	γ - グルタミルトランスフェラーゼ
GLDH	glutamate dehydrogenase	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLU-T	UDP-glucuronyl transeferase	UDP グルクロン酸トランスフェラーゼ
GST	glutathione-S-transferase	グルタチオン - S - トランスフェラーゼ
GTN	glycerol trinitrate	ニトログリセリン
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HRP	Horse radish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
i. c.	intracoronary	冠動脈内
IC ₅₀	concentration required for 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IMDS	integrated model for the differentiation of skin reactions	皮膚反応の識別のための統合モデル
IV, iv, i. v.	intravenous (ly)	静脈内
kg	kilogram	キログラム
K _i	enzyme-inhibitor constant	阻害定数
K _m	Michaelis-menten constant	ミカエリスメンテン定数
L	liter	リットル
LD ₅₀	median lethal dose	半数致死量

略 語	英 語 名 称	日 本 語 名 称
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸デヒドロゲナーゼ
LLNA	Local lymph node assay	局所リンパ節試験
L-NAME	N-nitro-L-arginine methylester	N - ニトロ - L - アルギニンメチルエステル
LV	left ventricle	左室
MCT	Monocrotaline	モノクロタリン
mg	milligram	ミリグラム
MoE	margins of exposure	曝露マージン
MR	metabolic ratio	代謝比
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
n	number	数
n. c.	not calculated	算出せず
n. d.	not determined	測定せず
n. d.	not detectable	検出できず
NEFA	non-esterified fatty acid	非エステル化脂肪酸
NO	nitric oxide	一酸化窒素
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
NP	natriuretic peptide	ナトリウム利尿ペプチド
NRU	neutral red uptake	ニュートラルレッド取込み
NTX	N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen	I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one	1H - [1,2,4] オキサジアゾロ [4,3-a] キノキサリン - 1 - オン
OECD	organization for economic cooperation and development	経済協力開発機構
P	probability	確率
p. c.	post coitum	交尾後

略 語	英 語 名 称	日 本 語 名 称
PAH	pulmonary arterial hypertension	肺動脈性肺高血圧症
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1	プラスミノゲン活性化阻害薬 - 1
P _{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PDE	phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖たん白
PIF	Photo-Irritation-Factor	光毒性判定基準
PKG	cGMP-dependent protein kinase	cGMP 依存性プロテインキナーゼ
ppm	parts per million	百万分率
pQCT	peripheral quantitative computer tomography	末梢骨用定量コンピュータ断層撮影
PRA	plasma renin activity	血漿レニン活性
PTH	parathyroid hormone	副甲状腺ホルモン
QT	QT interval in ECG	心電図の QT 間隔
QTc	corrected QT interval in ECG	心電図の補正 QT 間隔
QTcB	corrected QT interval in ECG according to Bazett	Bazett 式を用いた心電図の補正 QT 間隔
QTcF	corrected QT interval in ECG according to Fridericia	Fridericia 式を用いた心電図の補正 QT 間隔
QTcV	corrected QT interval in ECG according to van de Water	van de Water 式を用いた心電図の補正 QT 間隔
R _{A1}	accumulation ratio $R_{A1} = C_{\max, \text{steady state}} / C_{\max, \text{Day 1}}$	反復投与後の $C_{\max}$ と初回投与後の $C_{\max}$ から算出した蓄積比
R _{A2}	accumulation ratio $R_{A2} = C_{\min, \text{steady state}} / C_{\min, \text{Day 1}}$	反復投与後の $C_{\min}$ と初回投与後の $C_{\min}$ から算出した蓄積比
R _{A3}	accumulation ratio $R_{A3} = AUC_{(0-24), \text{steady state}} / AUC_{(0-24), \text{Day 1}}$	反復投与後の $AUC_{(0-24)}$ と初回投与後の $AUC_{(0-24)}$ から算出した蓄積比
RV	right ventricle	右室
RVSP	right ventricular systolic pressure	右室収縮期圧
S	septum	中隔
sGC	soluble guanylate cyclase	可溶性グアニル酸シクラーゼ
SHR	spontaneously hypertensive rats	自然発症高血圧ラット
SIN-1	3-Morpholinostyrene	3 - モルホリノシドノンイミン
SNP	sodium nitroprusside	ニトロプルシドナトリウム
t _{1/2}	half-life	半減期

略 語	英 語 名 称	日 本 語 名 称
$t_{1/2app}$	apparent half-life	見かけの半減期
T3	triiodothyronine	トリヨードサイロニン
TIMP-1	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1	組織マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬 - 1
t_{max}	time to reach maximum drug concentration in plasma	最高血漿中濃度到達時間
TRAP-6	thrombin-receptor activating peptide-6	トロンビン受容体活性化ペプチド-6
UDP-GT	uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase	ウリジン - ニリン酸 - グルクロン酸転移酵素
UGT	uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase	ウリジン - ニリン酸 - グルクロン酸転移酵素
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein	血管拡張薬刺激性リンたん白質
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.6.2 薬理試験の概要文の目次

2.6.2	薬理試験の概要文の目次.....	1
2.6.2.1	まとめ.....	4
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	7
2.6.2.2.1	<i>In vitro</i> 試験.....	10
2.6.2.2.1.1	可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激.....	10
2.6.2.2.1.1.1	精製 sGC.....	10
2.6.2.2.1.1.2	sGC 過剰発現 CHO レポーター細胞株.....	11
2.6.2.2.1.1.3	血管内皮細胞.....	12
2.6.2.2.1.2	摘出血管及び組織.....	12
2.6.2.2.1.3	硝酸薬耐性血管.....	13
2.6.2.2.1.4	ランゲンドルフ灌流心臓.....	13
2.6.2.2.1.5	ヒト平滑筋細胞.....	13
2.6.2.2.2	<i>In vivo</i> 試験.....	14
2.6.2.2.2.1	血行動態に対する作用.....	14
2.6.2.2.2.1.1	ラット.....	14
2.6.2.2.2.1.2	自然発症高血圧ラット.....	14
2.6.2.2.2.1.3	イヌ.....	15
2.6.2.2.2.2	肺高血圧症モデル動物における作用.....	15
2.6.2.2.2.2.1	低酸素誘発肺高血圧症マウスモデル.....	15
2.6.2.2.2.2.2	モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットモデル.....	17
2.6.2.2.2.2.3	SU5416 及び低酸素誘発肺高血圧症ラットモデル.....	18
2.6.2.2.3	代謝物 M-1 の効力薬理試験.....	19
2.6.2.2.3.1	<i>In vitro</i> 試験.....	20
2.6.2.2.3.1.1	可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激.....	20
2.6.2.2.3.1.2	摘出血管.....	20
2.6.2.2.3.1.3	硝酸薬耐性血管.....	20
2.6.2.2.3.1.4	ランゲンドルフ灌流心臓.....	20
2.6.2.2.3.1.5	ヒト平滑筋細胞.....	21
2.6.2.2.3.1.6	摘出血管：リオシグアトとの比較.....	21
2.6.2.2.3.2	<i>In vivo</i> 試験.....	21
2.6.2.2.3.2.1	血行動態に対する作用.....	21
2.6.2.2.3.2.2	ラット.....	21
2.6.2.2.3.2.3	自然発症高血圧ラット.....	22

2.6.2.2.3.2.4	イヌ	22
2.6.2.2.3.2.5	イヌ：リオシグアトとの比較	23
2.6.2.3	副次的薬理試験	24
2.6.2.3.1	<i>In vitro</i> 試験	24
2.6.2.3.1.1	特異性	24
2.6.2.3.1.2	摘出心房	24
2.6.2.3.1.3	血小板凝集	25
2.6.2.3.2	<i>In vivo</i> 試験	26
2.6.2.3.2.1	有害作用スクリーニング	26
2.6.2.3.2.2	勃起反応	27
2.6.2.3.2.3	抗アテローム性動脈硬化作用	27
2.6.2.3.2.4	高血圧症モデルにおける作用	27
2.6.2.3.2.4.1	糖尿病惹起 eNOS 欠損マウス	28
2.6.2.3.2.4.2	低 NO／高レニンラット	28
2.6.2.3.2.4.3	Dahl 食塩感受性ラット	30
2.6.2.3.2.4.4	低レニンラット	32
2.6.2.3.2.5	代謝物 M-1 の副次的薬理試験	34
2.6.2.3.2.5.1	特異性	34
2.6.2.3.2.5.2	血小板凝集	34
2.6.2.3.2.5.3	有害作用スクリーニング	35
2.6.2.4	安全性薬理試験	36
2.6.2.4.1	中枢神経系に及ぼす影響	36
2.6.2.4.2	心血管系に及ぼす影響	37
2.6.2.4.2.1	<i>In vitro</i> 試験	37
2.6.2.4.2.2	<i>In vivo</i> 試験	37
2.6.2.4.2.2.1	麻酔イヌ	37
2.6.2.4.2.2.2	テレメーターを装着した覚醒イヌ	38
2.6.2.4.2.2.3	テレメーターを装着した覚醒ラット	39
2.6.2.4.3	呼吸器系に及ぼす影響	40
2.6.2.4.4	その他の器官・機能に及ぼす影響	40
2.6.2.4.4.1	胃腸管系	40
2.6.2.4.4.2	腎機能及び代謝	40
2.6.2.4.4.3	血液系	41
2.6.2.4.4.3.1	血液学的検査	41
2.6.2.4.4.3.2	出血時間	41
2.6.2.4.5	代謝物 M-1 の安全性薬理試験	42

2.6.2.4.5.1	中枢神経系に及ぼす影響	42
2.6.2.4.5.2	心血管系に及ぼす影響	42
2.6.2.4.5.2.1	<i>In vitro</i> 試験	42
2.6.2.4.5.2.2	<i>In vivo</i> 試験	42
2.6.2.4.5.3	呼吸器系に及ぼす影響	43
2.6.2.4.5.4	その他の器官・機能に及ぼす影響	43
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用	45
2.6.2.5.1	血行動態に対する影響	45
2.6.2.5.1.1	PDE-5 阻害薬との併用	45
2.6.2.5.1.1.1	ラットにおけるバルデナフィルとの併用	45
2.6.2.5.1.1.2	自然発症高血圧ラットにおけるバルデナフィルとの併用	45
2.6.2.5.1.1.3	イヌにおけるシルデナフィルとの併用	46
2.6.2.5.1.1.4	U46619 誘発肺動脈高血圧症ウサギモデルにおけるシルデナフィルとの併用	46
2.6.2.5.1.2	イヌにおける硝酸薬との併用	47
2.6.2.5.2	ラットにおけるリバーロキサバン、iloprost、クロピドグレル及びアスピリンとの併用による止血に対する影響	48
2.6.2.5.3	代謝物 M-1 の薬力学的薬物相互作用	49
2.6.2.5.3.1	血行動態に対する影響	49
2.6.2.5.3.1.1	ラットにおけるバルデナフィルとの併用	49
2.6.2.5.3.1.2	イヌにおけるニトログリセリンとの併用	49
2.6.2.5.3.2	勃起反応に対する影響	49
2.6.2.5.3.2.1	海綿体神経破壊 ED ラットモデルにおけるバルデナフィルとの併用	50
2.6.2.5.3.2.2	L-NAME 処置 ED ラットモデルにおけるバルデナフィルとの併用	50
2.6.2.5.3.2.3	SNP 処置ウサギモデルにおけるバルデナフィルとの併用	50
2.6.2.6	考察及び結論	51
2.6.2.7	引用文献一覧	55

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase : sGC) は、内皮細胞由来の一酸化窒素 (NO) に対する受容体であり、心肺系における重要な酵素である。この NO-sGC 経路の活性化により、血管緊張、細胞増殖、線維化、及び炎症のような細胞機能の調節に重要な役割を果たすシグナル伝達分子である環状グアノシン 3',5'-リン酸 (cGMP) 産生が促進される。肺高血圧症の病態生理には、NO 産生の減少及び利用率の低下、並びに組織中の cGMP 濃度の低下を伴う内皮細胞機能障害がある^{1), 2), 3)}。したがって、sGC を薬理的に直接刺激することにより、種々の肺高血圧症に対する改善が期待され、新しい治療法となる可能性が考えられる。実際、ウサギ摘出肺における虚血・再灌流誘発肺血管障害モデル、急性肺塞栓症イヌモデル、急性肺高血圧症ヒツジモデル、モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットモデル、及び慢性低酸素誘発肺高血圧症マウスモデルのような急性及び慢性肺高血圧症の動物モデルに対して、種々の sGC 刺激薬により有効性が確認されている^{1), 2), 3), 4), 5)}。

以上のように、sGC 刺激薬は、種々の急性及び慢性肺血管障害により機能低下した NO-sGC-cGMP 経路を回復させることで cGMP 濃度を増加させ、治療効果を示す可能性が考えられる。また、これらの sGC 刺激薬は NO 産生が重度に低下又は欠如した場合にも効果を発揮すると考えられる。これに対して、ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase : PDE) -5 阻害薬は cGMP の加水分解を低下させることによって細胞内 cGMP 濃度を増加させるが、それには NO-cGMP 経路が十分に活性化されている必要がある。加えて、PDE-5 が阻害されると、そのほかの PDE が代償性に活性化される可能性が考えられる。

リオシグアト (BAY 63-2521) は、sGC 刺激薬という新しいクラスの最初の薬剤であり、慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (chronic thromboembolic pulmonary hypertension : CTEPH) 及び肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension : PAH) の新しい治療薬となる可能性がある。リオシグアトの薬理学的特性について、*in vitro* 試験や様々な動物モデルを用いた血行動態試験、心血管系疾患の動物モデルを用いた長期試験、及び適応対象である肺高血圧症の動物モデルを用いた試験などの *in vivo* 試験により検討した。

精製した組換え体 sGC、sGC を過剰発現した細胞株、及び血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験で示されているように、リオシグアトは 2 つの作用機序を有すると考えられる。すなわち、リオシグアトは、低濃度の NO に対する sGC の感受性を増強させることにより、また、直接 sGC を刺激することにより、NO が低下又は欠如した状態でも NO 非依存的に cGMP 濃度を増加させると考えられる。

リオシグアトは、*in vitro* において、動脈、冠動脈、静脈及び海綿体に対する強力な収縮阻害作用を示した。更に、リオシグアトは硝酸薬耐性ウサギから摘出した動脈に対しても収縮阻害作用を示した。また、リオシグアトは、ランゲンドルフ灌流心臓において、左室圧や心拍数に影響することなく、冠動脈灌流圧を強力に低下させた。

麻酔下の正常血圧ラット及び覚醒下の自然発症高血圧ラット、並びに麻酔下及び覚醒下のイヌを用いた *in vivo* 試験において、リオシグアトは用量依存的に血圧を低下させた。リオシグアトは反復投与してもタキフィラキシーを起こさなかった。

麻酔下のイヌにおいて、リオシグアトは、用量依存的に平均動脈圧を低下させ、また冠動脈血流量及び冠静脈洞の血中酸素飽和度を増加させた。心拍数に対しては中等度に増加させた。

低酸素により誘発した肺高血圧症マウスモデル及びモノクロタリンにより誘発した肺高血圧症ラットモデルにおいて、リオシグアトを反復投与すると、肺高血圧症の改善効果が認められた。

低酸素及び SU5416（血管新生阻害薬）により誘発した肺高血圧症ラットモデルにおいて、リオシグアトは肺血管リモデリングを抑制し、また右室機能を改善した。

副次的薬理試験として、種々の受容体及び酵素、並びに PDE 及び受容体グアニル酸シクラーゼに対するリオシグアトの影響を検討した結果、リオシグアトの sGC との相互作用は極めて特異性が高いと考えられた。

覚醒下の雄性ウサギにおいて、NO 供与体ニトロプルシドナトリウム（SNP）の存在下でリオシグアトを投与すると、用量依存的な陰茎勃起反応が惹起された。アテローム性動脈硬化症動物モデルとして用いたアポリポたん白 E（ApoE）欠損マウスにおいて、リオシグアトを反復投与すると、大動脈起始部の横断面プラーク面積は縮小した。

内皮型 NO 合成酵素（endothelial nitric oxide synthase : eNOS）欠損マウスを用いて糖尿病モデルを作製後、糖尿病性腎症を発症させたマウスにおいて、リオシグアトは血圧を低下させた。アンジオテンシン受容体拮抗薬であるテルミサルタンとの併用ではアルブミン尿も低減させた。

低 NO かつ高レニン性の高血圧ラットモデルにおいて、リオシグアトを反復投与すると、血圧は低下し、また死亡率も低下した。

食塩負荷高血圧ラットモデルにおいて、リオシグアトは生存率を改善し、また全身性の高血圧及び収縮機能障害、並びに心筋及び腎皮質における線維性の組織リモデリングを軽減した。

慢性腎不全ラットモデルにおいて、リオシグアトは生存率を改善し、血圧上昇を抑制した。また、心臓及び腎障害に対する強力な保護作用を示した。

有害作用スクリーニング試験において、リオシグアトは、正常ラットの血圧を顕著に低下させ、水負荷ラットの尿量及び尿中ナトリウム排泄量を減少させた。また、絶食マウスの胃腸管運動を低下させ、絶食ラットに対しては胃刺激作用を示した。

リオシグアトの代謝物である M-1（BAY 60-4552）について、薬理学的特性を検討した。種々の摘出血管における *in vitro* での M-1 の収縮阻害作用は、リオシグアトに比べて約 1/10 であった。リオシグアト又は M-1 を麻酔下のイヌに静脈内投与したときの血行動態作用を検討した結果、M-1 の作用はリオシグアトに比べて約 1/3 であった。M-1 は、概して、*in vitro* 及び *in vivo* において、リオシグアトと質的に同様な薬理学的プロファイルを示した。

安全性薬理試験では、リオシグアト及び M-1 の生命維持に重要な器官系（中枢神経系、心電図を含む心血管系、呼吸器系）及びその他の器官・機能〔胃腸管系、腎機能、代謝（糖及び脂質）、血液及び血液凝固系〕に及ぼす影響を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。

リオシグアトの安全性薬理試験で認められた、ラット及びイヌにおける顕著な心血管系への作用（血管拡張作用とそれに伴う反射性の調節作用）は、リオシグアトの薬理学的作用機序から予測される作用であった。また胃腸管運動能の低下、尿量の減少、及び血糖値の上昇についても、リオシグアトの平滑筋弛緩作用又は血管拡張作用に起因したもの、あるいはそれに続発したものと考えられた。

ヒトにおける QT 間隔延長のリスク評価のために実施した、*in vitro* (hERG カリウム電流及びウサギ心筋活動電位) 及び *in vivo* 試験 (イヌの心電図記録を用いた QT 及び QTc 間隔) において、リオシグアトによる心室再分極遅延を示唆する影響はみられなかった。

中枢神経系に対しては、リオシグアトによる侵害受容反応に軽度な影響がみられたものの、そのほかに特に問題となる影響はみられなかった。また、呼吸及び肺機能、脂質代謝、血球数 (白血球数及び血小板数) 並びに血液凝固系に対して、明らかな影響はみられなかった。

In vitro 試験において、リオシグアトは臨床での曝露量に比し高濃度でヒト血小板に対する弱い凝集阻害作用を示した。

代謝物 M-1 を用いた安全性薬理試験において、M-1 をリオシグアトの約 3 倍の用量で投与すると、リオシグアトで認められた作用と同様な作用が認められた。

以上、*in vitro* 及び *in vivo* 試験において、リオシグアトは sGC に対する刺激作用を有することが明らかとなった。また、*in vitro* 試験において、リオシグアト単独で cGMP 濃度を増加させたこと、及び NO との併用により相乗的に cGMP 濃度を増加させたことから、リオシグアトは sGC を直接的に刺激するのみならず、内因性リガンドである NO に対する sGC の感受性も高めると考えられた。更に、種々の肺高血圧症の動物モデルに対し肺高血圧症の改善効果を示すことが確認された。リオシグアトはその作用機序により、心血管系に顕著な作用を示し、安全性薬理試験で認められたそのほかの作用は、平滑筋弛緩作用又は血管拡張作用に起因したものと考えられる。したがって、非臨床薬理試験で認められたリオシグアトの特異性、有効性及び安全性に関する薬理学的プロファイルから、リオシグアトは、肺高血圧症の患者に有効かつ安全な経口治療薬になることが期待される。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

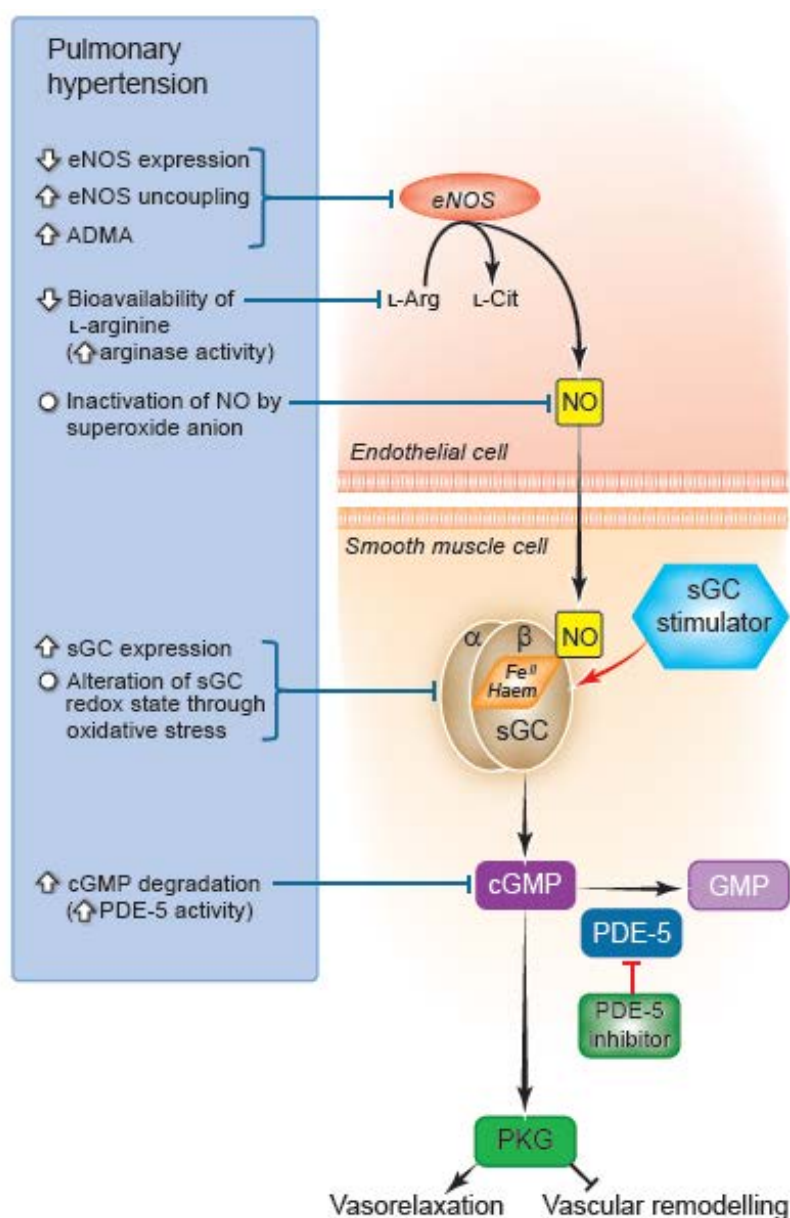
sGC は内皮細胞由来のシグナル伝達分子である NO の主要な受容体であるため、多くの器官系の細胞機能調節における重要な役割を果たしている。このヘテロ二量体のヘム含有たん白質である sGC は、二次情報伝達物質である cGMP の産生を促す。次に、その cGMP は、cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGMP-dependent protein kinase : PKG) などの特定の downstream エフェクターを活性化し、血管弛緩、並びに平滑筋細胞の増殖及び遊走を阻害する^{1), 2), 3)}。

肺高血圧症の血管における病態は、NO 及びプロスタサイクリンの産生低下、並びにエンドセリン-1、トロンボキサン A₂、及びセロトニンの増加といった、様々なシグナル伝達経路の調節異常を伴う肺血管内皮細胞の機能障害又は損傷に起因するとされている。特に、肺高血圧症は、アルギナーゼ活性亢進による L-アルギニンの利用率の低下、eNOS のダウンレギュレーション又はアンカップリング (スーパーオキシドなどの活性酸素種を産生する状態)、スーパーオキシドアニオンによる NO の不活性化、内因性 eNOS 阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン (asymmetrical dimethylarginine : ADMA) の血漿中濃度増加などによって内因性 NO が低下した状態、又は酸化ストレスにより sGC の酸化還元状態に変化が生じ、NO 感受性型 sGC が低下した状態であると考えられている (図 2.6.2.2-1 及び図 2.6.2.2-2)^{3), 6)}。NO-sGC-cGMP 経路が障害されると、内皮機能障害、血管収縮及び肺循環系の血管リモデリングを含む、急性及び慢性の血管障害が惹起される。

種々の病因の肺高血圧症患者の治療に低濃度の NO 吸入が用いられている。吸入された NO は、sGC を刺激し、肺血管平滑筋細胞の cGMP 濃度上昇を介して、換気が良好な肺領域において選択的な血管拡張作用を示すが、NO の半減期は短いため、NO の吸入を中止すると、この作用は速やかに消失する^{1), 2), 4), 5)}。また、cGMP を分解する PDE-5 を阻害する薬剤も用いられている。しかし、肺高血圧症では、NO 産生が低下していることから、cGMP 自体が極度に低下している可能性があり、PDE-5 阻害薬によりこうした低濃度の cGMP が維持されても肺高血圧症の治療効果への寄与は限定的と推測される。また、PDE-5 が阻害されると、そのほかの PDE が代償性に働くことが知られている³⁾。加えて、肺小動脈では PDE-5 の発現もアップレギュレーションされていることから、PDE-5 阻害作用による治療効果には限界がある³⁾。

このような NO の産生が重度に低下又は欠如した状態にある肺高血圧症に対して、NO に依存することなく sGC を直接刺激し得る薬剤は、肺高血圧症の新しい治療法となる可能性がある。また、肺高血圧症患者の肺小動脈では健康なヒトに比し、sGC の発現がアップレギュレーションされていることから、sGC 刺激作用が肺高血圧症に対し効率的に効果を発揮することが期待される。

リオシグアトは、sGC 刺激薬という新しいクラスの最初の薬剤であり、CTEPH 及び PAH の新しい治療薬となる可能性がある。リオシグアトの薬理学的特性について、*in vitro* 試験や様々な動物モデルを用いた血行動態試験、心血管系疾患の動物モデルを用いた長期試験、及び適応対象である肺高血圧症の動物モデルを用いた試験などの *in vivo* 試験により検討した。



ADMA: asymmetrical dimethylarginine, cGMP: cyclic guanosine monophosphate, eNOS: endothelial nitric oxide synthase, Fe^{II}: ferrous iron, GMP: guanosine monophosphate, L-Arg: L-arginine, L-Cit: L-citrulline, NO: nitric oxide, PDE-5: phosphodiesterase-5, PKG: cGMP-dependent protein kinase (protein kinase G), sGC: soluble guanylate cyclase

図 2.6.2.2- 1 肺高血圧症の NO-sGC-cGMP シグナル伝達経路における薬理学的標的

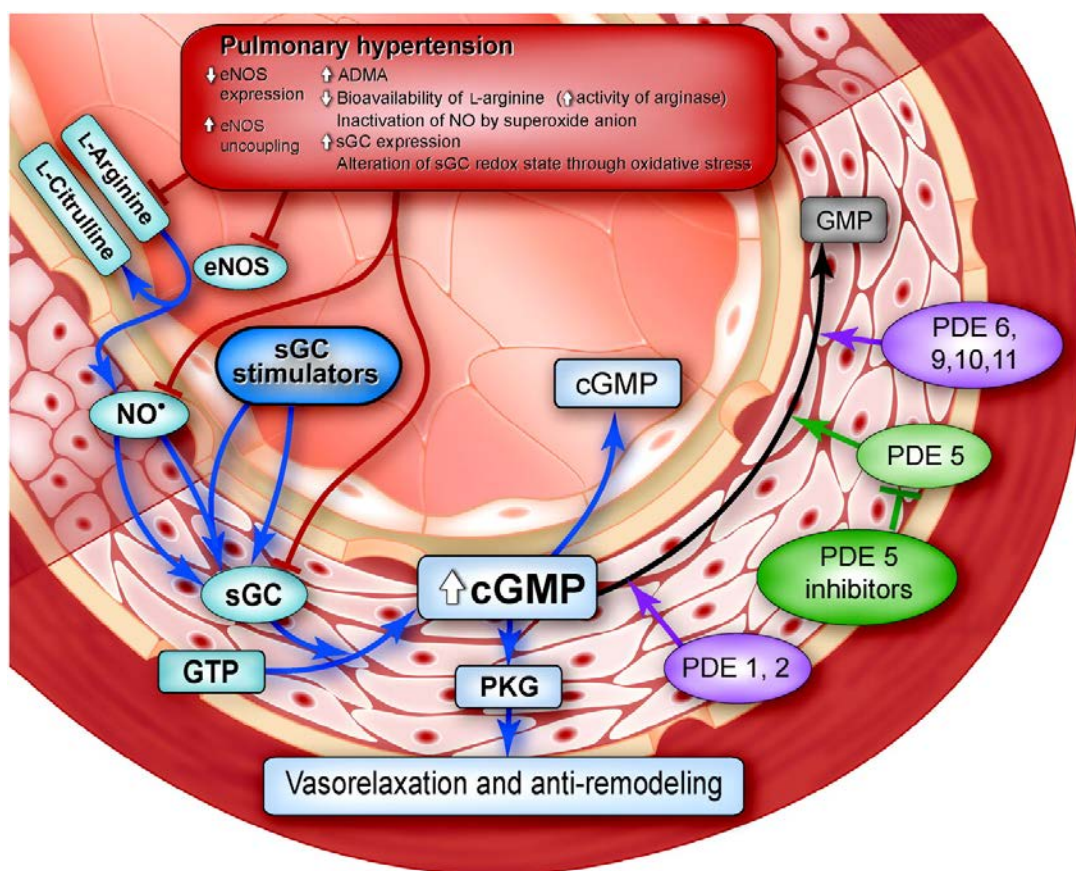


図 2. 6. 2. 2- 2 肺高血圧症の NO-sGC-cGMP シグナル伝達経路における薬理的標的 (血管模式図)

PDE-5 阻害薬は cGMP の加水分解を低減することで細胞内 cGMP 濃度を増加させるため、この阻害薬の作用は上流の NO-cGMP シグナル伝達が多量であることに依存する。対照的に、sGC 刺激薬は、cGMP の分解を抑制するのではなく、cGMP の産生を増加させるため、その下流での効果は低 NO によって制限されない^{3), 6)}。

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激

リオシグアトの可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 刺激作用について、精製 sGC 及び sGC を過剰発現したチャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary : CHO) レポーター細胞株を用いて検討した。

2.6.2.2.1.1.1 精製 sGC

参照項目 : 4.2.1.1.1 Eur Respir J 2008-32-881
4.2.1.1.2 PH-36760

リオシグアト単独又は一酸化窒素 (NO) との併用における sGC 刺激作用について、精製組換え体 sGC を用いて検討した。また、リオシグアトの sGC 刺激作用が sGC のヘム基に依存するか検討するために、sGC 阻害薬 ODQ の存在下でリオシグアトの sGC 刺激作用について同様に調べた。ODQ は sGC のヘム基を酸化することにより sGC の不活性化を起こす。更に、ヘム基を持たない sGC を用いた場合のリオシグアトの sGC 刺激作用や NO 存在下/非存在下におけるリオシグアトの sGC のヘム基に及ぼす影響を検討した。

高度に精製した組換え体 sGC 及び^[32P]標識 GTP にリオシグアト (0.01~100 μ M) を添加し、NO 供与体ジエチルアミン/NO 複合体 (DEA/NO) (0.001~0.1 μ M) の存在下/非存在下でインキュベートした後、生成される^[32P]標識 cGMP を測定した。sGC に対する比活性をリオシグアト添加前/添加後の^[32P]標識 cGMP の割合で示し、sGC 刺激作用の指標とした。また、リオシグアトと ODQ (100 μ M) の両薬剤を sGC 及び^[32P]標識 GTP に添加し、同様に sGC に対する比活性を算出した。

リオシグアト単独及び DEA/NO との併用、並びに ODQ 存在下における sGC 刺激作用を図 2.6.2.2- 3 に示す (4.2.1.1.1 Eur Respir J 2008-32-881 及び 4.2.1.1.2 PH-36760 参照)。DEA/NO 非存在下において、リオシグアトは 0.1~100 μ M で濃度依存的な sGC 刺激作用を示し、その作用はベースライン値 (薬剤添加前の sGC 活性値) に比し 2~73 倍であった。リオシグアトと DEA/NO の併用により、検討した濃度範囲で sGC 活性は相乗的に増強し、各薬剤の最高濃度 (リオシグアト : 100 μ M 及び DEA/NO : 0.1 μ M) において、sGC 活性値はベースライン値の 112 倍を示した。

リオシグアトによる sGC 刺激作用は ODQ によりほぼ完全に阻害された。更に、0.5% Tween-20 によりヘム基を除去した sGC に対して、リオシグアトは刺激作用を示さなかった (4.2.1.1.2 PH-36760 参照)。リオシグアトによる sGC のヘム基に対する影響について、sGC の紫外可視スペクトルの変化を指標に調べたところ、NO 存在/非存在下のいずれにおいても、リオシグアトは sGC のヘム基に影響を及ぼさなかった (4.2.1.1.2 PH-36760 参照)。以上の結果から、リオシグアトは NO 非依存的及びヘム基依存的機序により sGC 刺激作用を発揮することが示唆された。また、リオシグアトは、NO 非存在下で sGC を活性化させ、NO 存在下では相乗的に sGC を活性化させることから、リオシグアトは NO 非依存的に直接 sGC を刺激すると共に、sGC の NO 感受性を高める可能性が推察された。

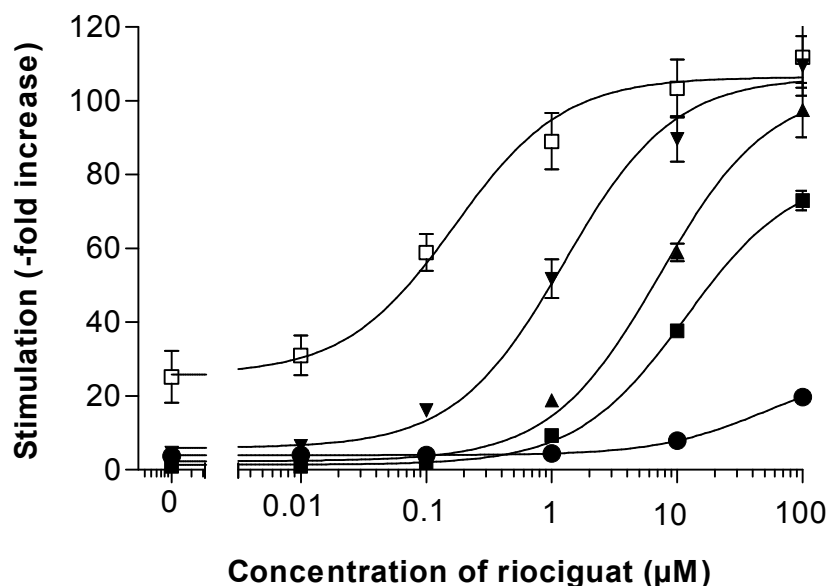


図 2.6.2.2-3 リオシグアトによる精製 sGC の刺激作用

リオシグアト単独 (0.01~100 μM) (■)、DEA/NO 0.001 μM 添加 (▲)、DEA/NO 0.01 μM 添加 (▼)、DEA/NO 0.1 μM 添加 (□) 又は ODQ 添加 (●)

sGC の比活性をベースライン値 (239±7nmol/mg/min 及び ODQ 群については 178±14nmol/mg/min) に対する割合で表示した (平均値±SEM、n=4~8)。

2.6.2.2.1.1.2 sGC 過剰発現 CHO レポーター細胞株

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-33399

4.2.1.1.4 PH-34153

リオシグアトの sGC 刺激作用について、遺伝子導入により sGC を過剰発現させた CHO レポーター細胞株で検討した。

カルシウム感受性の発光たん白質イクオリン及び cGMP ゲート型陽イオンチャネル (CNG2) を共発現する CHO 細胞に、sGC 遺伝子を安定的に導入し、sGC 過剰発現 CHO レポーター細胞株を作製した。この細胞株は sGC の刺激により cGMP が生成されると、CNG2 が活性化しカルシウムの流入が起こる。カルシウム存在下でイクオリンは発光する。

sGC 過剰発現 CHO レポーター細胞株に、イクオリンの発光基質セレンテラジンを添加後、インキュベートした。洗浄後、更にリオシグアト (0.003~10 μM) 又は媒体 (130mM NaCl、5mM KCl、20mM HEPES、1mM MgCl₂、4.8mM NaHCO₃、pH7.4) を添加し、インキュベートした。塩化カルシウムを添加後、イクオリンの発光量を CCD カメラで測定した。被験薬添加細胞の発光量が媒体添加細胞の 3 倍以上のとき、「sGC 刺激作用あり」と判断した (4.2.1.1.3 PH-33399 参照)。また、同試験系を用いて、リオシグアト (0.8nM~25 μM) 単独又は NO 供与体 SIN-1 (100~500nM) と共にインキュベートした。リオシグアトの用量-反応曲線から sGC 刺激作用の 50%有効濃度 (EC₅₀) を算出した (4.2.1.1.4 PH-34153 参照)。

リオシグアトは sGC に対する濃度依存的な刺激作用を示し、最小有効濃度は 100nM であった (4.2.1.1.3 PH-33399 参照)。また、リオシグアトの sGC に対する刺激作用の EC_{50} 値は 180nM であり、NO 供与体 SIN-1 を併用すると、sGC 刺激作用に対する両薬の相乗作用が確認され、SIN-1 (500nM) と併用したとき EC_{50} 値は 1nM まで低下した (4.2.1.1.4 PH-34153 参照)。

2.6.2.2.1.1.3 血管内皮細胞

参照項目：4.2.1.1.5 PH-36780

リオシグアト及び NO の sGC 刺激作用について、ブタの内皮細胞を用いて検討した。また、ODQ による阻害作用及び内因性 NO との併用効果についても検討した。

ブタの動脈血管より調製した血管内皮細胞に、リオシグアト ($0.001\sim 1\mu\text{M}$) を添加し、NO 供与体 DEA/NO ($0.01\sim 1\mu\text{M}$) の存在下/非存在下でインキュベートした ($n=5\sim 8$)。 [^{125}I] 標識抗 cGMP 抗体を用いた放射免疫測定により、産生された cGMP を測定した (mol/ウェル)。

sGC 刺激作用は、無処置群の cGMP 濃度に対する薬剤処置群の割合で示した。また、リオシグアト ($0.001\sim 1\mu\text{M}$) を ODQ ($10\mu\text{M}$) と共に ($n=5$)、又はリオシグアト ($0.03\sim 3\mu\text{M}$) を内因性に NO を放出させるブラジキニン (30nM) と共にインキュベートし ($n=5\sim 11$)、同様に cGMP を測定した。

リオシグアトは $0.01\sim 1\mu\text{M}$ で濃度依存的に内皮細胞内の cGMP 濃度を増加させ、cGMP 濃度は無処置群に比し最大 6.7 倍高かった。リオシグアトによる sGC の刺激作用は、sGC 阻害薬である ODQ の添加によって阻害された。また、リオシグアト単独及び DEA/NO との併用により、sGC 刺激作用を検討した。リオシグアトは前述の試験と同様に、 $1\mu\text{M}$ で cGMP 濃度を最大 6.7 倍に増加させ、DEA/NO は $0.1\mu\text{M}$ で cGMP 濃度を最大 3.2 倍に増加させた。リオシグアトとの併用により、相乗的な cGMP 濃度の増加がみられ、各薬剤の最高濃度 (リオシグアト： $1\mu\text{M}$ 及び DEA/NO： $0.1\mu\text{M}$) の併用において、cGMP 濃度を 37.7 倍に増加させた。ブラジキニン処置により内皮細胞の NO 放出を促進させたところ、細胞内の cGMP は 0.98pmol/ウェル から 1.65pmol/ウェル に増加した。更に、リオシグアトとブラジキニンを併用すると、cGMP 濃度は $11.96\sim 49.60\text{pmol/ウェル}$ に増加し、血管内皮細胞におけるリオシグアトと内因性 NO との相乗作用が確認された。

2.6.2.2.1.2 摘出血管及び組織

参照項目：4.2.1.1.7 PH-32925

雌雄ウサギ (NZW、 $2\sim 3\text{kg}$) より大動脈及び伏在動脈を、雌雄イヌ (FBI、 $20\sim 30\text{kg}$) より大腿静脈を摘出し、リング標本作製した。また雄性ウサギ (NZW、 3kg) より陰茎海綿体切片標本作製した。作製した各標本に対し、フェニレフリンの添加前又は添加後、リオシグアトを添加した (最終濃度： $1\text{ng/mL}\sim 0.01\text{mg/mL}$ 、 $n=5\sim 9$)。同様に、ブタより作製した冠動脈リング標本に、U46619 (トロンボキサン A_2 類似体) を添加後、リオシグアトを添加した (最終濃度： $0.1\text{ng/mL}\sim 0.01\text{mg/mL}$ 、 $n=8$)。

リオシグアトは、ウサギ大動脈及び伏在動脈リング標本、イヌ大腿静脈リング標本、並びにウサギ陰茎海綿体切片標本におけるフェニレフリン誘発収縮を濃度依存的に阻害し、その 50% 阻害濃度 (IC_{50}) はそれぞれ 95、200、340、及び 110nM であった。更に、リオシグアトはブタ冠動脈リング標本の U46619 誘発収縮も濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 380nM であった。

2.6.2.2.1.3 硝酸薬耐性血管

参照項目：4.2.1.1.8 PH-32924

有機硝酸塩を反復投与すると、硝酸薬耐性が速やかに発現することが知られている。硝酸薬耐性血管におけるリオシグアトの効果について、硝酸薬耐性ウサギから摘出した動脈を用い、検討した。

硝酸イソソルビド (150～250mg) を雄性ウサギ (チンチラ、2～3kg) に経皮投与 (1 日 3 回 4 日間+1 回) 後、伏在動脈を摘出しリング標本を作製した。また正常対照として、雌雄ウサギ (NZW) より伏在動脈を摘出しリング標本を作製した。正常又は硝酸薬耐性伏在動脈リング標本のそれぞれにフェニレフリンを添加後、ニトログリセリン (GTN) 又はリオシグアトを添加した (最終濃度：0.1ng/mL～10 μ g/mL、n=8～11)。

GTN は、フェニレフリン誘発収縮させた正常血管に対して阻害作用を示し、その IC₅₀ 値は 13.2nM であった。一方、フェニレフリン誘発収縮させた硝酸イソソルビド処置血管に対しても阻害作用を示したものの、その IC₅₀ 値は 65.1nM であったことから、当該標本が硝酸薬耐性であることが確認された。リオシグアトは、フェニレフリン誘発収縮させた正常及び硝酸薬耐性血管に対して阻害作用を示し、その IC₅₀ 値はそれぞれ、4.8nM 及び 5.6nM であった。このように、GTN とは対照的に、リオシグアトの血管収縮阻害作用には、正常及び硝酸薬耐性血管の間で差はみられなかった。

2.6.2.2.1.4 ランゲンドルフ灌流心臓

参照項目：4.2.1.1.10 PH-34810

ラット (Wistar、250～300g) より摘出した心臓をランゲンドルフ灌流システムに装着後、Krebs-Henseleit 溶液を用いて灌流した。得られたランゲンドルフ摘出灌流心臓にリオシグアトを添加し (最終濃度：0.001～1 μ M)、冠動脈灌流圧、心拍数、最大左室圧及び左室圧最大変化率を測定した (n=6)。

ラットのランゲンドルフ灌流心臓において、リオシグアトは 0.01～1 μ M の範囲で濃度依存的に冠動脈灌流圧を低下させ、1 μ M で最大約 50%の低下がみられた。しかし、リオシグアトは 1 μ M まで心拍数、最大左室圧及び左室圧最大変化率に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2.1.5 ヒト平滑筋細胞

参照項目：4.2.1.1.6 PH-34613

血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor：PDGF) で活性化したヒト冠動脈平滑筋細胞にリオシグアトを添加し (最終濃度：0.1nM～10 μ M)、インキュベートした 24 及び 48 時間後において、平滑筋細胞の遊走距離を顕微鏡下で測定した (n=4)。

リオシグアトはヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走を濃度依存的に阻害し、インキュベート 48 時間後の IC₅₀ 値は 10nM であった。したがって、リオシグアトがヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走に対する強力な阻害作用を有し、その作用は 48 時間にわたって維持されることが明らかとなった。

2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1 血行動態に対する作用

2.6.2.2.2.1.1 ラット

参照項目：4.2.1.1.11 PH-33089

麻酔下の雄性ラット（Wistar、300～350g）を用いて、リオシグアトを静脈内及び経口投与した場合の血行動態作用を検討した。

リオシグアト 3、10、30 及び 100 μ g/kg〔媒体：transcutol/cremophor/生理食塩液（10/10/80、v/v/v）〕を麻酔下のラットに単回静脈内投与すると（n=7～8）、用量依存的かつ持続的な平均動脈圧の低下作用がみられ、投与後 10 分までの最大変化として、それぞれ 7、14、27 及び 55mmHg の血圧低下がみられた〔媒体投与群（n=8）で最大 8mmHg〕。また、リオシグアト 0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg〔媒体：transcutol/cremophor/水（10/20/70、v/v/v）〕を麻酔下のラットに単回経口投与すると（n=6～10）、静脈内投与時と同様に、用量依存的かつ持続的な平均動脈圧の低下がみられ、投与後 120 分までの最大変化として、それぞれ 16、25、36 及び 38mmHg の血圧低下がみられた〔媒体投与群（n=8）で最大 12mmHg〕。心拍数に対する影響はごく軽度であった〔投与後 120 分までの最大変化として、それぞれ 16、26、23 及び 41 回／分の増加（媒体投与群で 28 回／分の増加）〕。

2.6.2.2.2.1.2 自然発症高血圧ラット

参照項目：4.2.1.1.12 PH-34520

4.2.1.1.14 PH-34731

覚醒下の自然発症高血圧ラット（spontaneously hypertensive rat：SHR）を用いて、リオシグアトを単回及び反復投与した場合の血行動態作用を検討した。

単回投与試験（4.2.1.1.12 PH-34520 参照）：リオシグアト 0.03、0.1、0.3、1 及び 3mg/kg、又は媒体〔transcutol/cremophor/水（10/20/70、v/v/v）〕を覚醒下の雌性 SHR に単回経口投与すると（n=6 又は 12、200～250g）、用量依存的かつ持続的な平均動脈圧の低下作用がみられ、媒体投与群に比し 5～36%低下させた。その最大作用は、投与後 2 時間以内に認められた。0.03mg/kg において、血圧低下作用はほとんどみられなかったが、一過性の心拍数増加がみられた。0.1～1mg/kg 投与後 6～10 時間以上にわたり、血圧低下作用はプラトーを維持し、その後、急速に消失した。最高用量 3mg/kg 投与時には、一過性の顕著な最大血圧低下作用を示すと共に、血圧低下作用は持続した。その後、徐々に血圧低下作用は減弱し、24 時間後には媒体投与群レベルに回復した。すべての用量群において、用量依存的な一過性の心拍数増加が認められた（媒体投与群に比し 19～39%の増加）。このような頻脈は最初の数時間内に減弱した。

反復投与試験（4.2.1.1.14 PH-34731 参照）：リオシグアト 0.3 及び 1mg/kg、又は媒体〔PEG400/エタノール/水（50/10/40、v/v/v）〕を覚醒下の雌性 SHR に 1 日 1 回 4 日間反復経口投与すると（n=6、200～250g）、各投与日に用量依存的かつ持続的な平均動脈圧の低下作用がみられた。各投与直後に、心拍数は媒体投与群と比較して増加した。心拍数は用量依存的に増加し、その持続時間も用量依存的に延長した。しかし、このような頻脈の持続時間は、血圧低下作用の持続時間よりも常に短かった。初回投与後又は最終投与後の 24 時間にわたる血圧の経時変

化を検討した結果、いずれも用量依存的な血圧低下作用がみられ、およそ 6～8 時間又は 12～14 時間持続することが確認された。血圧低下の程度は、初回投与後と最終投与後の間でほぼ同等であった。リオシグアト最終投与後 1 日（試験 5 日目）には、リオシグアトによる血行動態作用は完全に消失した。

2.6.2.2.1.3 イヌ

参照項目：4.2.1.1.13 PH-33863

リオシグアト 0.3、1、3、10、30 及び 100 $\mu\text{g/kg}$ [媒体：グリセロール/水/PEG400 (60/100/1129, w/w/w)] を麻酔下の雌雄イヌ (20～30kg) に急速静脈内投与すると ($n=2\sim 6$)、用量依存的な平均動脈圧の低下がみられ、また冠血流量の増加及び心拍数の中等度増加がみられた。冠血流量の増加により、冠静脈洞の酸素飽和度も増加した。30 $\mu\text{g/kg}$ 投与群において、平均動脈圧に平均 24%の低下 (-19mmHg)、冠血流量に平均 29%の増加 (13mL/分)、冠静脈洞の酸素飽和度に 35%の増加がみられ、心拍数に 9%の中等度増加 (8 回/分) が認められた。また 100 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では、平均動脈圧に 33%の低下 (-26mmHg)、冠血流量に 61%の増加 (22mL/分)、冠静脈洞の酸素飽和度に 54%の増加がみられ、心拍数に 14%の増加 (12 回/分) が認められた。血圧低下がみられる閾値用量は 1～3 $\mu\text{g/kg}$ であった (1、3 $\mu\text{g/kg}$ 共に 8%の低下)。冠血流量及び酸素飽和度増加の閾値も 1～3 $\mu\text{g/kg}$ であった (冠血流量：1 $\mu\text{g/kg}$ で 7% 及び 3 $\mu\text{g/kg}$ で 10%の増加、酸素飽和度：1 $\mu\text{g/kg}$ で 6%及び 3 $\mu\text{g/kg}$ で 18%の増加) が、心拍数増加の閾値は 10～30 $\mu\text{g/kg}$ であった (10 $\mu\text{g/kg}$ で 7%及び 30 $\mu\text{g/kg}$ で 9%の増加)。リオシグアトによる左室収縮力 (左室圧最大変化率) に及ぼす影響はみられなかった。

2.6.2.2.2 肺高血圧症モデル動物における作用

2.6.2.2.2.1 低酸素誘発肺高血圧症マウスモデル

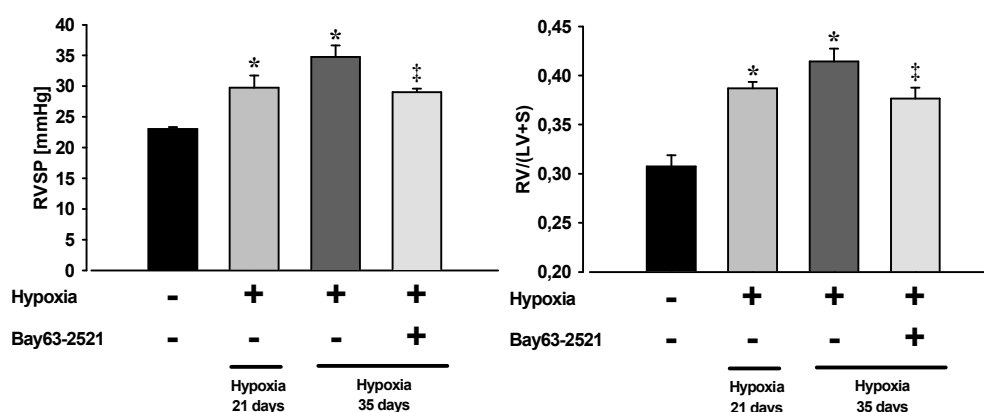
参照項目：4.2.1.1.1 Eur Respir J 2008-32-881

肺が低酸素状態に曝露されると肺高血圧症が惹起されることが知られている。そこで、低酸素により肺高血圧症を実験的に誘導したマウスにおいて、血行動態、右室肥大及び肺血管リモデリングに対するリオシグアトの作用を検討した。マウスに持続的な低酸素曝露 (10%酸素) を 21 又は 35 日間行い、リオシグアト 10mg/kg 又は媒体 (2%メチルセルロース溶液) を低酸素曝露 21 日目から 35 日目まで 1 日 1 回反復経口投与した ($n=10$)。右室収縮期圧、右室心筋重量比及び肺小動脈の筋性化度に対する作用について、図 2.6.2.2-4 及び図 2.6.2.2-5 に示す。右室収縮期圧は、正常酸素圧下の対照群 ($23.0 \pm 0.4\text{mmHg}$) に比し、低酸素曝露 21 日目には $29.8 \pm 1.9\text{mmHg}$ 、35 日目 (媒体投与群) には $34.8 \pm 1.9\text{mmHg}$ にそれぞれ有意に上昇した (図 2.6.2.2-4、左)。また、右室肥大の指標とした右室心筋重量比 [右室 / (左室 + 中隔)] は、対照群 (0.30 ± 0.01) に比し、低酸素曝露 21 日目には 0.38 ± 0.01 、35 日目 (媒体投与群) には 0.41 ± 0.01 にそれぞれ有意に増加した (図 2.6.2.2-4、右)。更に、血管径 20～70 μm の肺小動脈の筋性化度を定量した結果、非筋性化血管の割合 (血管総数に対する割合として表示) は、対照群 ($48.9 \pm 7.8\%$) に比し、低酸素曝露 21 日目には $3.4 \pm 0.9\%$ 、35 日目 (媒体投与群) には $1.0 \pm 0.5\%$ にそれぞれ有意に減少した (図 2.6.2.2-5)。したがって、低酸素曝露による肺高血圧症モデルが作製されたことが確認された。

リオシグアト投与群において、右室収縮期圧は $29.0 \pm 0.6\text{mmHg}$ に、右室心筋重量比は 0.37 ± 0.01 に、それぞれ媒体投与群に比し有意に低下した (図 2.6.2.2-4)。また、リオシグアト投

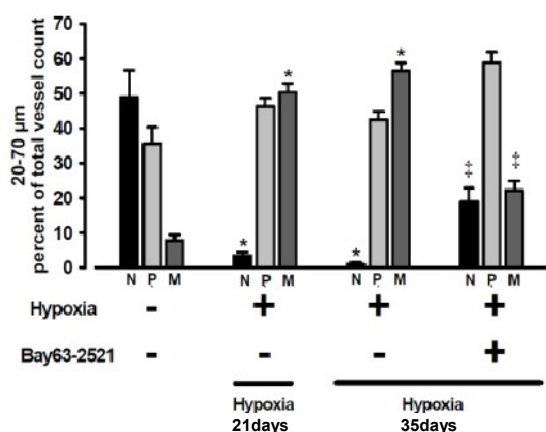
与群における肺小動脈の非筋性化血管の割合 ($18.9 \pm 3.9\%$) は、媒体投与群 ($1.0 \pm 0.5\%$) に比し、有意に増加した (図 2.6.2.2- 5)。リオシグアト投与群の筋性化血管の割合については、媒体投与群に比し有意に減少した。このように、低酸素誘発肺高血圧症マウスモデルにおいて、リオシグアトは、肺高血圧、右室肥大及び肺血管リモデリングを低減することが示された。

更に、心筋線維化の指標として、右室におけるトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) 及び心房性ナトリウム利尿因子 (ANF) の遺伝子発現量を測定した結果、媒体投与群の TGF- β 及び ANF 遺伝子の発現は対照群に比し上昇したが、リオシグアト投与群では媒体投与群に比し低下し、正常レベルに回復する傾向がみられた。



*: $p < 0.05$ vs. control; ‡: $p < 0.05$ vs. hypoxia 35 days. (ANOVA + Newman-Keuls test)

図 2.6.2.2- 4 低酸素曝露マウスにおけるリオシグアト経口投与の右室収縮期圧 (RVSP) 及び右室心筋重量比〔右室 / (左室 + 中隔) : RV/(LV+S)〕に対する作用



*: $p < 0.05$ vs. control; ‡: $p < 0.05$ vs. hypoxia 35 days. (ANOVA + Newman-Keuls test)

図 2.6.2.2- 5 低酸素曝露マウスにおけるリオシグアト経口投与の肺小動脈の筋性化度に対する作用

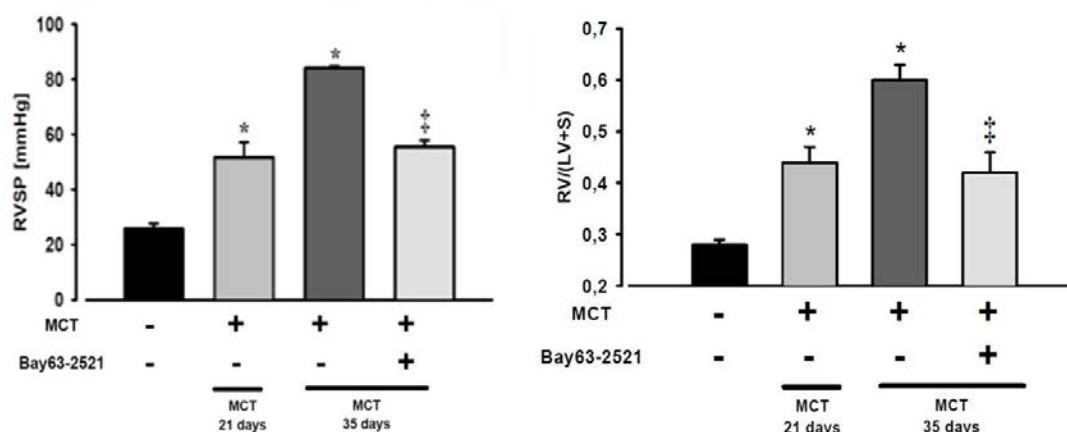
血管径 $20 \sim 70 \mu\text{m}$ の肺小動脈について、「非筋性化 (N)」、「部分筋性化 (P)」、「完全筋性化 (M)」に分け、各血管数を求め、それぞれの血管総数に対する割合を示す。各肺について、合計 $80 \sim 100$ 本の腺房内血管を分析した。

2.6.2.2.2.2 モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットモデル

参照項目：4.2.1.1.1 Eur Respir J 2008-32-881

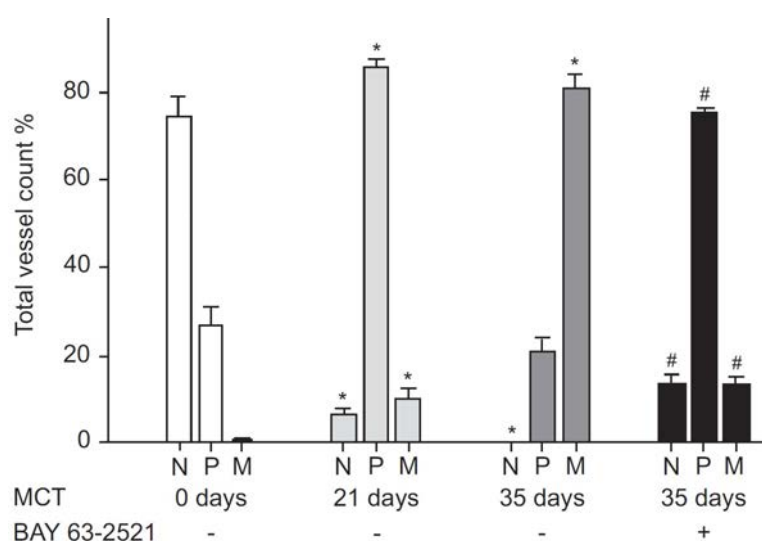
クロタリア属の植物から抽出されるアルカロイドであるモノクロタリン (monocrotaline : MCT) をラットに単回投与すると、肺動脈内皮細胞の損傷及びそれに続く肺動脈平滑筋肥大を引き起こし、持続性の重度の肺高血圧症がみられるようになる。MCT (60mg/kg) をラットに皮下投与し、重度の肺高血圧症を誘発した (対照群には生理食塩液を皮下投与)。リオシグアト 10mg/kg 又は媒体 (2%メチルセルロース溶液) を MCT 投与 21 日目から 35 日目まで 1 日 1 回反復経口投与した (n=8)。右室収縮期圧は対照群の 25.8 ± 1.9 mmHg から MCT 投与 21 日目には 51.7 ± 5.4 mmHg へ顕著に上昇し、35 日目 (媒体投与群) には更に 84.1 ± 0.6 mmHg まで上昇した (図 2.6.2.2- 6、左)。その結果として、MCT 投与ラットでは全肺血管抵抗が顕著に増加し、対照群の 0.91 ± 0.05 mmHg・分/mL/100g 体重から 21 日目には 3.60 ± 0.04 mmHg・分/mL/100g 体重、35 日目 (媒体投与群) には 6.13 ± 0.60 mmHg・分/mL/100g 体重にそれぞれ増加した。右室心筋重量比は対照群の 0.28 ± 0.01 から MCT 投与 21 日目には 0.40 ± 0.03 、35 日目 (媒体投与群) には 0.60 ± 0.03 にそれぞれ増加し、明らかな右室肥大がみられた (図 2.6.2.2- 6、右)。全身動脈圧には変化はみられなかった。また、肺小動脈の筋性化度を定量した結果、対照群では多くの肺動脈が非筋性であったのに対して、MCT 投与群では 21 及び 35 日目のいずれにおいても、非筋性化肺動脈の割合が減少し、同時に完全な筋性化肺動脈の割合が増加した (図 2.6.2.2- 7)。したがって、MCT 投与による肺高血圧症モデルが作製されたことが確認された。

リオシグアト投与群の右室収縮期圧は媒体投与群に比し有意に低下し、 55.4 ± 2.5 mmHg を示した (図 2.6.2.2- 6、左)。リオシグアト投与群の全肺血管抵抗も 4.22 ± 0.08 mmHg・分/mL/100g 体重まで、媒体投与群に比し有意に低下した ($p < 0.05$, ANOVA + Newman-Keuls test)。しかし、全身動脈圧には変化はみられなかった。リオシグアト投与群の右室心筋重量比は媒体投与群に比し有意に低下し、 0.42 ± 0.04 を示した (図 2.6.2.2- 6、右)。また、リオシグアト投与群の肺小動脈の筋性化度は、媒体投与群と比較すると、完全な筋性化肺動脈の割合は有意に減少し、一方、非筋性化肺動脈の割合は有意に増加した (図 2.6.2.2- 7)。このように、MCT 誘発肺高血圧症ラットモデルにおいて、リオシグアトは、肺高血圧、右室肥大及び肺血管リモデリングを低減することが示された。



*: $p < 0.05$ vs. control; ‡: $p < 0.05$ vs. MCT at 35 days. (ANOVA + Newman-Keuls test)

図 2.6.2.2- 6 MCT 誘発肺高血圧症ラットモデルにおけるリオシグアト経口投与の右室収縮期圧 (RVSP) 及び右室心筋重量比 [右室 / (左室 + 中隔) : RV/(LV+S)] に対する作用



*: $p < 0.05$ vs. control; #: $p < 0.05$ vs. MCT at 35 days. (ANOVA + Newman-Keuls test)

図 2.6.2.2-7 MCT 誘発肺高血圧症ラットモデルにおけるリオシグアト経口投与の肺小動脈の筋性化度に対する作用

血管径 $20 \sim 70 \mu\text{m}$ の肺小動脈について、「非筋性化 (N)」、「部分筋性化 (P)」、「完全筋性化 (M)」に分け、各血管数を求め、それぞれの血管総数に対する割合を示す。各肺について、合計 80~100 本の腺房内血管を分析した。

2.6.2.2.2.3 SU5416 及び低酸素誘発肺高血圧症ラットモデル

参照項目：4.2.1.1.15 PLoS One 2012-7-e43433

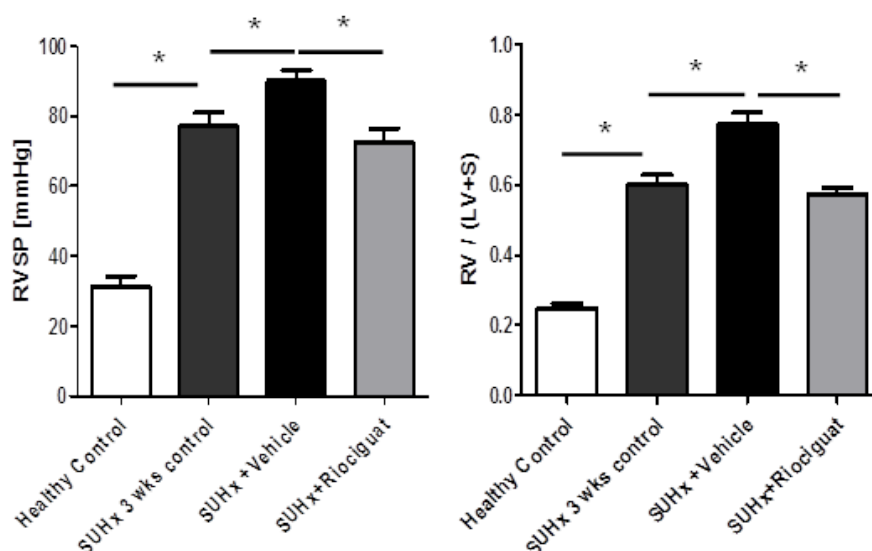
血管内皮増殖因子受容体阻害薬（血管新生阻害薬）である SU5416 及び低酸素曝露により、血管増殖性の肺高血圧症を誘導したラットにおいて、血行動態及び右室肥大に対するリオシグアトの作用を検討した。SU5416 (20mg/kg) を雄性ラット (Sprague-Dawley、200~250g) に皮下投与後、21 又は 35 日間の低酸素曝露 (10%酸素) を行った（対照群には生理食塩液を投与後、正常酸素圧下 35 日間）。低酸素曝露した 21 日後に、右室機能を非侵襲的手法（心エコー図法）により評価したところ、右室肥大及び拡張、並びに運動及び機能障害がみられ、SU5416 及び低酸素曝露誘発による肺高血圧症モデルが作製されたことが確認された。

リオシグアト 10mg/kg 又は媒体を SU5416 投与ラットに低酸素曝露した 21 日目から 35 日目まで 1 日 1 回反復経口投与した。右室収縮期圧及び右室心筋重量比に対する作用について、図 2.6.2.2-8 に示す。リオシグアト投与群の右室収縮期圧は媒体投与群に比し有意に低下した（図 2.6.2.2-8、左）。しかし、リオシグアト投与後、全身動脈圧及び心拍数に変化はみられなかった。また、リオシグアト投与群では、媒体投与群と比較して、右室肥大の有意な低減がみられ（右室心筋重量比の低下、図 2.6.2.2-8、右）、また心拍出量の増加及び全肺血管抵抗の低減がみられた。

更に、リオシグアト投与群では、媒体投与群と比較して、右室機能／形態の改善（心エコーによる評価）及び右室コラーゲン量の低下がみられた。同様に、肺小動脈について、閉塞がみられた動脈の割合及び新生内膜／中膜比は低下した。加えて、肺ホモジネートを用いて、ヘテロ二量体のたん白質 sGC の両サブユニット（sGC $\alpha 1$ 及び sGC $\beta 1$ ）の発現量を評価したところ、リオシ

グアト投与群では媒体投与群に比し増加がみられた。更に、リオシグアト投与群の肺組織における cGMP 濃度は媒体投与群に比し増加した。

このように、重度の肺高血圧及び右室肥大を有するラットモデルにおいて、リオシグアトの良好な改善効果が示された。すなわち、侵襲的及び非侵襲的手法を用いた心血管系評価により、リオシグアトは、肺血管リモデリングを効果的に抑制し、右室機能を顕著に改善することが明らかとなった。



SUHx: SU5416 and hypoxia at 10%O₂

Healthy Control (n=9): normoxia for 35 days, SUHx 3wks (n=7): hypoxia for 21 days,

SUHx + vehicle (n=9) & SUHx + Riociguat (n=9): hypoxia for 35 days

*: p<0.05 (ANOVA + Newman-Keuls test)

図 2.6.2.2- 8 SU5416 投与／低酸素曝露 (SUHx) ラットにおけるリオシグアト経口投与の右室収縮期圧 (RVSP) 及び右室心筋重量比〔右室 / (左室 + 中隔) : RV/(LV+S)〕に対する作用

2.6.2.2.3 代謝物 M-1 の効力薬理試験

代謝物 M-1 (BAY 60-4552) はヒトにおける主要な代謝物であり、活性代謝物として同定され、リオシグアトと同様に *in vitro* 及び *in vivo* において、sGC に対する刺激作用を有することが確認されている。本項目では、M-1 の効力に関わる薬理作用を検討した。なお、ヒトにおいて、主代謝物 M-1 に次いで血漿中に多くみられる代謝物である M-4 は、M-1 の N-グルクロン酸抱合体 (2.6.4.5 参照) であり、こうした第Ⅱ相反応により生成された N-グルクロン酸抱合体は、一般に、薬理学的に不活性であると考えられる⁷⁾ことから、評価対象としなかった。

2. 6. 2. 2. 3. 1 *In vitro* 試験

2. 6. 2. 2. 3. 1. 1 可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激

参照項目：4. 2. 1. 1. 16 PH-34506

4. 2. 1. 1. 17 PH-34152

M-1 の sGC 刺激作用を、2. 6. 2. 2. 1. 1に記載した *in vitro* アッセイにより評価した。

精製 sGC を用いた試験（4. 2. 1. 1. 16 PH-34506 参照）において、M-1 は 0.01～10 μ M で、濃度依存的な sGC 刺激作用を示し、最高濃度 10 μ M での sGC 活性値はベースライン値に比し約 36 倍であった。また、sGC 過剰発現 CHO レポーター細胞株（4. 2. 1. 1. 17 PH-34152 参照）を用いた試験において、M-1 は sGC に対する濃度依存的な刺激作用を示し、EC₅₀ 値は 530nM であった。M-1 と NO 供与体 SIN-1 を併用すると、sGC 刺激作用は増強され、EC₅₀ 値は低下した。

2. 6. 2. 2. 3. 1. 2 摘出血管

参照項目：4. 2. 1. 1. 19 PH-34466

M-1 の摘出血管に対する作用を、2. 6. 2. 2. 1. 2に記載した *in vitro* アッセイにより評価した。

M-1 は、雄性ウサギ（NZW、2～3kg）の大動脈及び伏在動脈リング標本、並びに雌雄イヌ（FBI、20～30kg）の大腿静脈リング標本におけるフェニレフリン誘発収縮を濃度依存的に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 111、610 及び 134nM であった（n=6 又は 7）。更に、M-1 はブタ冠動脈リング標本の U46619 誘発収縮を濃度依存的に阻害し、その IC₅₀ 値は 840nM であった（n=5）。

2. 6. 2. 2. 3. 1. 3 硝酸薬耐性血管

参照項目：4. 2. 1. 1. 20 PH-34467

2. 6. 2. 2. 1. 3に記載した方法により、雄性ウサギ（NZW、2～3kg）を用いて作製した硝酸薬耐性血管を用い、M-1 の作用を検討した。

正常又は硝酸薬耐性伏在動脈リング標本のそれぞれに M-1 又は GTN を添加後、フェニレフリンを添加した（n=9～12）。M-1 は正常及び硝酸薬耐性血管のフェニレフリン誘発収縮に対し、ほぼ同等な収縮阻害作用を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 508 及び 635nM であった。一方、GTN では、正常及び耐性血管に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 2,380 及び 17,640nM であった。

2. 6. 2. 2. 3. 1. 4 ランゲンドルフ灌流心臓

参照項目：4. 2. 1. 1. 21 PH-34414

M-1 のラットのランゲンドルフ灌流心臓に対する作用を、2. 6. 2. 2. 1. 4に記載した *in vitro* アッセイにより評価した。

ラット (Wistar、250～300g) のランゲンドルフ灌流心臓において、M-1 は 0.01～1 μ M で、冠動脈灌流圧を低下させ、最大約 50%の低下がみられた (n=8)。しかし、M-1 は最大左室圧、心拍数及び左室圧最大変化率に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2.3.1.5 ヒト平滑筋細胞

参照項目：4.2.1.1.18 PH-34614

M-1 のヒト平滑筋細胞の遊走に対する作用を、2.6.2.2.1.5に記載した *in vitro* アッセイにより評価した。

M-1 は PDGF 活性化ヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走を濃度依存的に阻害し、インキュベート 48 時間後の IC₅₀ 値は 30nM であった (n=4)。したがって、M-1 がヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走に対する強力な阻害作用を有し、その作用が 48 時間にわたって維持されることが明らかとなった。

2.6.2.2.3.1.6 摘出血管：リオシグアトとの比較

参照項目：4.2.1.1.22 PH-33853

M-1 及びリオシグアトの摘出血管に対する作用を、2.6.2.2.1.2に記載した *in vitro* アッセイにより評価した。ここでは、M-1 の摘出血管に対する作用をリオシグアトと直接比較した。

M-1 は、雄性ウサギ (NZW、2～3kg) の大動脈及び伏在動脈リング標本におけるフェニレフリン誘発収縮を濃度依存的に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 6,862 及び 5,470nM であったが、リオシグアトの IC₅₀ 値はそれぞれ 640nM 及び 554nM であった (n=7 又は 8)。更に、M-1 及びリオシグアトはブタ冠動脈リング標本の U46619 誘発収縮を濃度依存的に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 5,220 及び 601nM であった (n=7)。したがって、検討した摘出血管において、M-1 の *in vitro* での血管収縮阻害作用はリオシグアトに比べて約 1/10 であることが確認された。

2.6.2.2.3.2 *In vivo* 試験

2.6.2.2.3.2.1 血行動態に対する作用

2.6.2.2.3.2.2 ラット

参照項目：4.2.1.1.23 PH-33907

M-1 の麻酔ラットにおける血行動態作用を2.6.2.2.1.1に記載した方法により評価した。

麻酔下の雄性ラット (Wistar、250～300g) において、M-1 を静脈内又は経口投与すると、用量依存的かつ持続的な血圧低下作用がみられ、反射性の軽度な心拍数増加が生じた。M-1 0.01、0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg を静脈内投与した結果 (n=4)、投与直後 (2 分後まで) の最大変化として、それぞれ 0、13、36、68 及び 81mmHg の血圧低下が認められた [媒体投与群 (n=12) で 0mmHg]。また、M-1 0.3、1、3 及び 10mg/kg を経口投与した結果 (n=3～5)、投与後 60 分までの最大変化として、それぞれ 24、35、46 及び 55mmHg の血圧低下が認められた [媒体投与群 (n=13) で 19mmHg]。

2.6.2.2.3.2.3 自然発症高血圧ラット

参照項目： 4.2.1.1.24 PH-34499
4.2.1.1.27 PH-35139

M-1 の単回投与による自然発症高血圧ラット (SHR) における血行動態作用を、2.6.2.2.1.2 に記載した方法により評価した (4.2.1.1.24 PH-34499 参照)。覚醒下の雌性 SHR (200～250g) において、M-1 0.3、1 及び 3mg/kg を単回経口投与すると (n=6)、持続的かつ用量依存的な血圧低下がみられた (最高用量では 19 時間内に最大約 24% の低下)。すべての投与量で用量依存的な頻脈が認められた。

また、M-1 を雌性 SHR (200～250g) に反復投与したときの血行動態作用を検討した (4.2.1.1.27 PH-35139 参照)。M-1 10 及び 30mg/kg [媒体：PEG400/エタノール/水 (50/10/40, v/v/v)] を覚醒下の SHR に 1 日 1 回 12 日間反復経口投与すると (n=6)、各投与日に用量依存的かつ持続的な平均動脈圧の低下作用がみられた。各投与後に一過性の頻脈がみられたものの、その作用は試験期間中に減弱した。血圧低下作用は、10mg/kg 投与群では約 10 時間、30mg/kg 群では 24 時間持続した。30mg/kg 投与群の最大血圧低下及び頻脈の程度は、投与 4 日目以降、10mg/kg 投与群に比し、わずかに大きいのみであった。また、最終投与後、2 日以内に血圧及び心拍数に対する作用は消失した。

2.6.2.2.3.2.4 イヌ

参照項目： 4.2.1.1.25 PH-34212
4.2.1.1.26 PH-34220

M-1 3、10、30 及び 100 μ g/kg [媒体：transcutol/生理食塩液 (30/70, v/v)] を麻酔下の雌雄イヌ (20～30kg) に急速静脈内投与すると (n=5～8)、用量依存的な平均動脈圧の低下がみられた (それぞれ 2.7、4.6、14.7 及び 21.4% の低下、媒体投与群で 0.6% の低下)。平均動脈圧の低下と共に、左室収縮期圧、左室拡張末期圧、中心静脈圧、全身血管抵抗及び肺動脈圧の低下、並びに反射性の心拍数及び心筋収縮力の中等度増加がみられた (4.2.1.1.26 PH-34220 参照)。M-1 はまた心拍出量、冠血流量及び冠静脈洞の酸素飽和度を用量依存的に増加させたことから、心筋酸素需給バランスが正に移行したことを示している。

更に、M-1 による血行動態パラメータの変化、特に高圧系 (動脈系) 及び低圧系 (静脈系) における血管弛緩作用について、血圧低下に伴う反射性の心拍数増加による影響を除くため、自律神経系の遮断下で評価した (4.2.1.1.25 PH-34212 参照)。麻酔下の雌雄イヌ (20～30kg) に自律神経系遮断のため、硫酸アトロピンの持続注入を実施した (2mg/時間)。M-1 3、10、30 及び 100 μ g/kg [媒体：transcutol/生理食塩液 (30/70, v/v)] を自律神経系の遮断を施した雌雄の麻酔イヌに急速静脈内投与すると (n=3～4)、用量依存的な平均動脈圧の低下がみられ (それぞれ 1.4、4.7、12.3 及び 23.2% の低下、媒体投与群で 0.4% の低下)、それと共に用量依存的な左室収縮期圧及び左室拡張末期圧の低下もみられた。自律神経系の遮断のため、最高用量 100 μ g/kg においてのみ、一過性の軽微な心拍数増加と共に一過性の心筋収縮力の増加がみられた。肺動脈圧及び中心静脈圧は 2 分間程度軽微に上昇し、以後、媒体投与群と比較して用量依存的な低下傾向を示した。また、M-1 は心拍出量を用量依存的に増加させ、それと共に全身血管抵抗を用量依存的に低下させた。M-1 の作用発現は速やかで、2～3 分以内に最大に達した。こうした M-1 の心血管作用は 1 時間の観察期間中、持続した。

2.6.2.2.3.2.5 イヌ：リオシグアトとの比較

参照項目：4.2.1.1.28 PH-34180

M-1 の麻酔イヌにおける血行動態作用について、リオシグアトと直接比較した。

M-1 100 μ g/kg、リオシグアト 30 μ g/kg 又は媒体 [transcutol/PEG400/DMSO (49.5/49.5/1、v/v/v)] を、自律神経系遮断下の雌雄の麻酔イヌ (20~30kg) に 60 分間の静脈内持続投与を行った (n=3 又は 4)。M-1 の静脈内投与により、投与 15、30、45 及び 60 分後、投与前値と比較して、平均動脈圧はそれぞれ 7.6、13.4、18.3 及び 20.9%低下した。その後、60 分後の血圧が 3 時間の観察期間中、維持された。また、リオシグアトの静脈内投与により、投与 15、30、45 及び 60 分後、投与前値と比較して、平均動脈圧はそれぞれ 7.0、15.3、22.5 及び 28.0%低下した。M-1 と同様に、その後の 3 時間の観察期間中、血圧は維持された。これらの結果から、M-1 100 μ g/kg の静脈内投与による血行動態作用は、リオシグアト 30 μ g/kg の静脈内投与によるものと同等であると考えられた。したがって、投与量を踏まえると、M-1 の血行動態に対する作用はリオシグアトの約 1/3 であると考えられた。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 *In vitro* 試験

2.6.2.3.1.1 特異性

参照項目：4.2.1.2.1 PH-35059
4.2.1.2.2 PH-36560
4.2.1.2.3 PH-36565
4.2.1.2.4 PH-33317
4.2.1.2.5 PH-35420

約 70 種類の受容体及び酵素を用いて、リオシグアトの作用の特異性を検討した（4.2.1.2.4 PH-33317 及び 4.2.1.2.5 PH-35420 参照）。

受容体に対する結合については放射性リガンド結合試験により、また酵素活性に対する影響については酵素分析試験により検討した（ $n=2$ ）。50%以上の受容体結合又は酵素活性阻害が認められた場合、「有意」と判定した。リオシグアトは最高濃度 $10\mu\text{M}$ まで、検討した受容体に対して結合せず、また酵素活性も阻害しなかった。

また、種々の PDE に対するリオシグアトの影響について、放射性リガンドを用いた酵素試験により検討した（4.2.1.2.1 PH-35059 参照）。精製ヒト組換え体 PDE-11A、9A、8A、7B、4B、3B、2A、ヒト血小板より精製した PDE-5、ウシ PDE-6、1 において、PDE-7B に対する IC_{50} 値は $2.9\mu\text{M}$ であったが、そのほかの PDE に対する IC_{50} 値は $10\mu\text{M}$ を超えた（ $n=3$ ）。

更に、グアニル酸シクラーゼ A（GC-A、ANP/BNP 受容体）及びグアニル酸シクラーゼ B（GC-B、CNP 受容体）に対するリオシグアトの刺激作用について、ラット GC-A 又は GC-B を過剰発現した CHO レポーター細胞株を用いて、2.6.2.2.1.1.2 に記載した方法に準じて検討した（4.2.1.2.2 PH-36560 及び 4.2.1.2.3 PH-36565 参照）。リオシグアトは $30\mu\text{M}$ まで、GC-A 及び GC-B に対する刺激作用を示さなかった。

これらの試験成績より、リオシグアトの作用は sGC に極めて特異的であると考えられた。

2.6.2.3.1.2 摘出心房

参照項目：4.2.1.2.9 PH-36514

電氣的に刺激したモルモット摘出心房の収縮性に対するリオシグアトの作用を検討した。

モルモット（Dunkin Hartley、 $600\pm 80\text{g}$ ）より摘出した左心房を電氣的に刺激し、更にイソプロテレノール（ β_1 アドレナリン受容体作用薬）、塩化カルシウム（L 型カルシウムチャネル刺激薬）又はメタコリン（ M_2 ムスカリン受容体作用薬）により刺激した（ $n=4$ ）。イソプロテレノール又は塩化カルシウムは陽性変力作用、またメタコリンは陰性変力作用を示し、これら作用に対するリオシグアトの影響を評価した。50%以上の刺激作用又は拮抗作用が認められた場合、「有意」と判定した。

リオシグアトは $10\mu\text{M}$ で、電気刺激した摘出心房、並びにイソプロテレノール、塩化カルシウム及びメタコリンであらかじめ刺激した摘出心房に対して、刺激作用又は拮抗作用を示さなかった。

これらの成績より、リオシグアトは摘出心臓において、直接的な変力作用を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.3.1.3 血小板凝集

参照項目： 4.2.1.2.7 PH-33141

4.2.1.2.8 PH-36601

血管拡張薬刺激性リンたん白質 (VASP) は cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG) や cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の基質で、これら酵素によってリン酸化された VASP は血小板凝集の阻害に関与する。

ヒト及びラットの血小板を用いて、VASP リン酸化に対するリオシグアト及び NO 供与体の作用を検討した (4.2.1.2.7 PH-33141 参照)。

ヒト及びラット (Wistar, 8 週齢) より採取した洗浄血小板とリオシグアト ($0.03\sim 10\mu\text{M}$) 又は NO 供与体 [SNP ($0.1\sim 30\mu\text{M}$) 又は DEA/NO ($1\sim 300\text{nM}$)] を加えてインキュベートした後、SDS 含有 Tris 塩酸緩衝液に可溶化し SDS ゲル電気泳動を行った。電気泳動後、たん白質をニトロセルロース膜に転写し、VASP の Ser¹⁵⁷ でのリン酸化検出にはマウス抗 VASP モノクローナル抗体又はウサギ抗 VASP ポリクローナル抗体を、VASP の Ser²³⁹ でのリン酸化検出にはマウス抗 Ser²³⁹ リン酸化 VASP モノクローナル抗体を添加した。次にビオチン化抗マウス又はウサギ抗体とインキュベートした後、アビジン-ビオチン-HRP 系により可視化した ($n=4\sim 8$)。また、同様に、血小板とリオシグアト又は NO 供与体をインキュベートした後、^[125I]標識抗 cGMP 抗体を用いた放射免疫測定法により、cGMP 濃度を測定した ($n=7\sim 12$)。

リオシグアトは VASP の Ser²³⁹ 及び Ser¹⁵⁷ におけるリン酸化を濃度依存的に増加させた。NO 供与体もこれらを増加させ、リオシグアトとの併用により相乗作用がみられた。また、リオシグアト単独 ($10\mu\text{M}$) の血小板 cGMP 濃度は 52.3 倍に増加し、また SNP 単独 ($30\mu\text{M}$) 及び DEA/NO 単独 (300nM) ではそれぞれ 12.8 倍及び 20.6 倍に増加した。リオシグアト 0.03 又は $0.1\mu\text{M}$ の単独では cGMP 濃度増加の程度は小さかったが ($0.03\mu\text{M}$ で 1 倍、 $0.1\mu\text{M}$ で 2.3 倍)、SNP ($30\mu\text{M}$) 又は DEA/NO (300nM) と併用すると、22.6 倍 ($0.03\mu\text{M}+\text{SNP } 30\mu\text{M}$)、67.3 倍 ($0.1\mu\text{M}+\text{SNP } 30\mu\text{M}$) 及び 170.8 倍 ($0.1\mu\text{M}+\text{DEA/NO } 300\text{nM}$) に増加し相乗作用がみられた。cAMP 濃度には変化はみられなかった。

これらの成績より、リオシグアトは cGMP-PKG-VASP シグナル経路を活性化する可能性が示唆された。

また、ヒト血小板を用いて、薬物誘発血小板凝集に対するリオシグアトの作用を検討した (4.2.1.2.8 PH-36601 参照)。

健康成人から採取した多血小板血漿にリオシグアト ($2\sim 237\mu\text{M}$) を加えてインキュベートした後、血小板凝集誘発物質として、コラーゲン、アデノシン二リン酸 (ADP) 又はトロンビン受容体活性化ペプチド-6 (TRAP-6) を加え、血小板凝集能測定装置を用いて比濁法により、血小板凝集を測定した ($n=5$ 又は 6)。

リオシグアトはコラーゲン、ADP 又は TRAP-6 誘発血小板凝集を、弱い濃度依存的に阻害した (IC_{50} 値は、それぞれ 59、41 及び $34\mu M$)。したがって、*in vitro* において、リオシグアトは弱い抗血小板作用を示すと考えられた。

2.6.2.3.2 *In vivo* 試験

2.6.2.3.2.1 有害作用スクリーニング

参照項目：4.2.1.2.6 PH-35419

有害作用スクリーニング試験 (*in vitro* 試験も含む) において、リオシグアトの有害作用プロファイルを検討した。

In vitro (モルモット又はラット摘出器官、 $30\mu M$) 及び *in vivo* 試験 (マウス及びラット、 $30mg/kg$) において、種々の評価項目に対するリオシグアトの作用を評価した。

血行動態：リオシグアトを雄性ラット (Wistar、 $250\pm 20g$) に単回経口投与すると ($n=3$)、0.5、1 及び 2 時間後の観察時点において、顕著な血圧低下 (それぞれ投与前値の 70%、79% 及び 73%) 及び心拍数増加 (それぞれ投与前値の 135%、144% 及び 141%) がみられた。

腎機能：リオシグアトと共に生理食塩液 ($15mL/kg$) を雌雄ラット (Wistar、 $150\pm 20g$ 、絶食下) に単回経口投与すると ($n=3$)、尿量及びナトリウム排泄量は顕著に低下した (それぞれ媒体投与群の 15% 及び 1%)。

胃腸管機能：リオシグアトを雌雄ラット (Long Evans、 $150\pm 20g$ 、絶食下) に単回経口投与すると ($n=3$)、胃に対する刺激作用がみられたが (炎症又は潰瘍の重症度をスコアで評価)、対照としたアスピリンよりは程度が小さかった (アスピリン投与群のスコア合計を 100% としたときのリオシグアト投与群のスコア合計の割合：67%)。また、リオシグアト $30mg/kg$ を雌雄マウス (ICR、 $22\pm 2g$ 、絶食下) に単回経口投与すると ($n=5$)、胃腸管運動能の低下がみられた (媒体投与群の 63%)。

出血時間：リオシグアトを雌雄マウス (ICR、 $22\pm 2g$) に単回経口投与すると ($n=5$)、尾部先端を切断後の出血時間は媒体投与群に比し延長した (媒体投与群の 185%)。

血糖：リオシグアトを雌雄マウス (ICR、 $22\pm 2g$ 、絶食下) に単回経口投与すると ($n=5$)、中等度の血糖値の上昇がみられた (媒体投与群の 169%)。

摘出血管：雌雄ラット (Wistar、 $275\pm 25g$) より作製した摘出胸部大動脈リング標本及び摘出門脈にリオシグアトを添加すると ($n=2$)、塩化カリウム誘発収縮に対して共に阻害作用がみられた (それぞれ媒体投与群の 55% 及び 51%)。

腎機能、胃腸管機能、出血時間及び血糖に対する影響については、安全性薬理試験 (2.6.2.4 参照) において詳細に検討されている。

そのほかに、次に示す *in vivo* 試験においては、リオシグアトの単回経口投与により顕著な影響はみられなかった。：自律神経系所見及び死亡、体温、行動抑制、運動協調性、運動刺激性、呼吸、散瞳 (以上、雌雄マウス、ICR、 $22\pm 2g$ 、 $n=3$)、血清コレステロール、高比重リポたん白 (HDL) 及びトリグリセリド (雄性マウス、ICR、 $22\pm 2g$ 、 $n=5$)、アラニントランスアミナー

ゼ (ALT) (雌雄マウス、ICR、 22 ± 2 g、 $n=5$)、胃内酸性度 (雌雄ラット、Wistar、 150 ± 20 g、 $n=3$)

また、モルモット (雌雄、Duncan Hartley、 325 ± 25 g) の摘出心房において、変力作用及び変時作用のいずれに対してもリオシグアトは顕著な影響を及ぼさなかった ($n=2$)。更に、モルモット (雌雄、Duncan Hartley、 325 ± 25 g) の摘出気管及び回腸の塩化カリウム誘発収縮に対して、リオシグアトは顕著な影響を及ぼさなかった ($n=2$)。

2.6.2.3.2.2 勃起反応

参照項目：4.2.1.2.13 PH-32390

陰茎勃起は、陰茎海綿体及び陰茎小動脈の平滑筋細胞内の cGMP 濃度増加により、これら平滑筋が弛緩し発現する。そこで、覚醒ウサギを用いて、リオシグアトの勃起反応に対する作用を検討した。

リオシグアト 0.03、0.1、0.3、1 及び 3mg/kg 又は媒体 [エタノール/PEG400/水 (10/60/30、v/v/v)] を覚醒下の雄性ウサギ (チンチラ、 $2.8 \sim 4.1$ kg) に単回経口投与すると ($n=6$ 又は 12)、3mg/kg のみで軽微な勃起作用がみられた。擬似的な性的興奮を起こすため、リオシグアト投与 90 分後に NO 供与体 SNP (0.2mg/kg) を静脈内投与したところ、顕著な陰茎勃起作用が発現した。すなわち、リオシグアト 0.03mg/kg の経口投与により、SNP 投与直後の陰茎長は 9.0mm となり [$p < 0.001$ vs. 媒体投与群 (1.5mm)、ANOVA+Newman-Keuls test]、その状態は 15 分間持続した。より高用量のリオシグアトを投与すると、更なる陰茎長の増加 (最大 26.3mm) がみられ、勃起持続時間も延長した。このように、リオシグアトにより勃起作用が増強されることが確認された。なお、SNP 単独では勃起作用はみられなかった。

2.6.2.3.2.3 抗アテローム性動脈硬化作用

参照項目：4.2.1.2.10 PH-33296

NO は酸化ストレス (活性酸素)、炎症、血管平滑筋細胞増殖及び血小板凝集の抑制、並びに血管平滑筋弛緩などにより、抗動脈硬化作用を示すことから、sGC の活性化作用を有するリオシグアトの抗動脈硬化作用について検討した。アポリポたん白 E (ApoE) 欠損マウスはアテローム性動脈硬化症モデルとして広く利用されているため、当該マウスを用いて評価した。

リオシグアトを雄性 ApoE 欠損マウス (6~8 週齢) に混餌 (0 又は 300ppm) で 14 週間投与すると ($n=12$)、大動脈起始部の横断面プラーク面積は対照群に比し 53%に有意に縮小した ($p < 0.05$ 、student's t-test)。なお、当該試験のリオシグアトの投与量は、餌の消費量から考慮すると、約 50mg/kg の経口投与に相当すると考えられた。このように、リオシグアトの抗動脈硬化作用が確認された。

2.6.2.3.2.4 高血圧症モデルにおける作用

リオシグアトは心血管系に作用する機序を有することから、種々の高血圧症モデルを用いて心臓や腎臓に対するリオシグアトの作用を検討した。

2.6.2.3.2.4.1 糖尿病惹起 eNOS 欠損マウス

参照項目：4.2.1.2.11 PLoS One 2012-7-e42623

高血圧症モデルの eNOS 欠損マウスに糖尿病を惹起させた動物において、リオシグアト単独又はアンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）テルミサルタンとの併用による作用を検討した。

ストレプトゾトシン（100mg/kg）を eNOS 欠損 C57BL/6J マウス（6 週齢）に 1 日 1 回 2 日間腹腔内投与し、糖尿病を惹起させた。1.5 週間後、リオシグアト 3mg/kg、テルミサルタン 1mg/kg、リオシグアト+テルミサルタン（3+1mg/kg 併用）又は媒体をストレプトゾトシン処置 eNOS 欠損マウスに 1 日 1 回 11 週間経口投与した（n=13~17）。また、ストレプトゾトシンの代わりにクエン酸緩衝液を投与した非糖尿病対照群を設定した（n=14）。被験薬投与開始後、5 及び 8 週目に血糖を、12 週目に血圧及び尿中アルブミンを測定した。更に、13 週目には動物を屠殺し腎臓の組織切片を用いて、マロンジアルデヒド（酸化ストレスの指標）に対する免疫組織化学染色を実施した。

当該糖尿病惹起 eNOS 欠損マウスモデルの全群において、血糖値はほぼ同等な値を示し、非糖尿病対照群に対し高値であることが確認された。リオシグアト投与群において、媒体投与群に比し有意な血圧低下がみられ（リオシグアト投与群：105.2mmHg、媒体投与群：117.1mmHg、 $p<0.05$ 、student's *t*-test）、併用投与群においても媒体投与群に比し有意な血圧低下がみられた（併用投与群：105.0mmHg、 $p<0.05$ 、student's *t*-test）。テルミサルタン投与群では血圧低下の程度は小さかった（テルミサルタン投与群：111.2mmHg）。また糖尿病の惹起により、尿中アルブミンは増加し（媒体投与群：170.8 μ g/24 時間、非糖尿病対照群：31.4 μ g/24 時間）、腎障害が確認された。併用投与群では媒体投与群に比し有意な尿中アルブミンの低下がみられ（併用投与群：47.3 μ g/24 時間、 $p<0.05$ 、student's *t*-test）、非糖尿病対照群と同等なレベルにまで回復した。リオシグアト投与群及びテルミサルタン投与群では併用投与群ほどの低下作用はみられなかった（リオシグアト投与群：97.1 μ g/24 時間、テルミサルタン投与群：97.8 μ g/24 時間）。更に、併用投与群では媒体投与群に比し、マロンジアルデヒド染色領域が小さかったことから、併用による酸化ストレス状態の改善が示唆された。

以上のように、ARB を投与した糖尿病惹起 eNOS 欠損マウスモデルにおいて、リオシグアトは腎障害の軽減作用を有することが示唆された。

2.6.2.3.2.4.2 低 NO/高レニンラット

参照項目：4.2.1.1.9 J Hypertens 2010-28-1666

低 NO/高レニン性高血圧ラットモデルを用いて、血行動態及びホルモン性パラメータに対するリオシグアトの反復投与による作用を検討した。

レニン遺伝子導入ラット（8 週齢）において、NO 合成酵素阻害薬 L-NAME（N-nitro-L-arginine methylester）の飲料水摂取を開始すると共に、リオシグアト 3 及び 10mg/kg を 1 日 1 回 17 日間反復経口投与した（n=12）。

16 日目までの観察期間中、L-NAME 摂取対照群（n=24、以下、対照群）の収縮期血圧は 238mmHg から 281mmHg に顕著に上昇した。しかし、リオシグアト 3 及び 10mg/kg 投与群において、L-NAME 摂取による収縮期血圧の上昇に対する低減作用又は抑制作用がみられた。試験期間を通

して、対照群では 24 例中 13 例が死亡したのに対して、3mg/kg 投与群では 12 例中 1 例のみが死亡し、10mg/kg 投与群では全 12 例が生存した。

主要な血液生化学的パラメータを評価した（表 2.6.2.3- 1）。リオシグアト投与群の血漿中のクレアチニン、尿素及び ANP は対照群に比し有意に低下した。更に、血漿レニン活性はリオシグアト投与により用量依存的に低下した。また、心臓及び腎臓の重量及び線維化について評価した（表 2.6.2.3- 2）。心臓相対重量について、リオシグアト投与による影響はみられなかったが、左心室相対重量は、10mg/kg 投与群で対照群及び 3mg/kg 投与群に比し有意に低下した。心臓の間質線維化は、リオシグアト投与群で対照群に比し有意な抑制作用がみられた。心動脈血管の中膜／内腔比及び心筋細胞径については群間で差はみられなかった。また、腎臓の間質線維化は、リオシグアト投与群で用量依存的な抑制作用がみられた。糸球体硬化度はリオシグアト投与群で対照群に比し有意に低下した。腎動脈血管の中膜／内腔比は、10mg/kg 投与群で対照群に比し差はみられなかったものの、3mg/kg 投与群で対照群に比し有意な低下がみられた。

これらの成績から、低 NO／高レニン性高血圧ラットモデルにおいて、リオシグアトは心臓障害及び腎障害の軽減作用を有することが示唆された。

表 2.6.2.3- 1 低 NO／高レニン性高血圧ラットにおけるリオシグアト経口投与の血液生化学的パラメータに対する作用

Parameter	L-NAME + placebo (control)	L-NAME + riociguat (3 mg/kg/day)	L-NAME + riociguat (10 mg/kg/day)
Creatinine (μM)	130 $\pm$ 22	67 $\pm$ 2*	64 $\pm$ 1*
Urea (mM)	30 $\pm$ 5	13 $\pm$ 1*	14 $\pm$ 1*
PRA (ng/mL per h)	24 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1*†
ANP (pg/mL)	424 $\pm$ 97	198 $\pm$ 40*	127 $\pm$ 9*

Values are given as mean $\pm$ SEM. Plasma values were obtained at study end (day 18) of renin-transgenic rats under L-NAME administration (controls, n=11) with riociguat treatment at 3 mg/kg (n=11) or 10 mg/kg (n=12).

ANP: atrial natriuretic peptide, PRA: plasma renin activity

*: p<0.05 vs. control, †: p<0.05 vs. 3 mg/kg/day by unpaired t-test

表 2. 6. 2. 3- 2 低 NO／高レニン性高血圧ラットにおけるリオシグアト経口投与の心臓及び腎臓に対する作用

Parameter	L-NAME + placebo (control)	L-NAME + riociguat (3 mg/kg/day)	L-NAME + riociguat (10 mg/kg/day)
Relative heart weight (% of body weight)	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.08	3.7 ± 0.04
Relative left ventricle (% of body weight)	3.1 ± 0.09	3.0 ± 0.06	2.8 ± 0.03*†
Cardiac interstitial fibrosis (% of section)	3.01 ± 0.5	1.4 ± 0.3*	1.1 ± 0.2*
Cardiac myocyte diameter (µm)	21.2 ± 0.5	21.2 ± 0.6	20.2 ± 0.4
Cardiac media-lumen ratio	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.3	1.8 ± 0.2
Renal interstitial fibrosis (% of section)	5.7 ± 0.8	4.0 ± 0.7	1.8 ± 0.4*†
Glomerulosclerosis (score)	3.2 ± 0.07	2.7 ± 0.05**	2.6 ± 0.07**
Renal media-lumen ratio	4.2 ± 0.3	3.5 ± 0.2*	4.3 ± 0.3†

Values are given as mean ± SEM. Organ weights and histological results of heart and kidney samples were obtained at study end (day 18) of renin-transgenic rats under L-NAME administration (controls, n=11) with riociguat treatment at 3 mg/kg (n=11) or 10 mg/kg (n=12).

*: p<0.05 vs. control, **: p<0.001 vs. control, †: p<0.05 vs. 3 mg/kg/day by unpaired t-test

2. 6. 2. 3. 2. 4. 3 Dahl 食塩感受性ラット

参照項目 : 4. 2. 1. 2. 12 PLoS One 2011-6-e21853

Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いて、リオシグアトの作用を検討した。

雄性 Dahl 食塩感受性ラット（8 週齢）に高食塩食（8%食塩含有）を持続的に与え、高血圧症を誘導後、リオシグアト（3、10mg/kg）又は媒体〔transcutol/cremophor/水（10/20/70、v/v/v）〕を 1 日 1 回 14 週間反復投与した（n=13 又は 21）。また、無食塩の標準食を与えた対照群を設定した（n=10）。

媒体投与群では試験期間を通して、21 例中 14 例が死亡したのに対して（生存率 33%）、リオシグアトの 3 及び 10mg/kg 投与群ではいずれも 13 例中 2 例のみに死亡がみられ（生存率 85%）、リオシグアト投与群における生存率は媒体投与群に比し有意に上昇した（p<0.05、Kaplan-Meier 法/log-rank-test）。媒体投与群の体重は 36.7g 増加したのに対して、3mg/kg 投与群及び 10mg/kg 投与群では、それぞれ 58.1g 及び 57.2g 増加した。また、投与開始 6 週目まで、収縮期血圧は全群で上昇し、媒体投与群では 7 週目で最大に達した後、13 週目においても投与前値に比し 32.8mmHg 高値であった。これに対して、3mg/kg 投与群の収縮期血圧は 13 週目には投与前値にまでは回復し（投与前値に対し 0.7mmHg の上昇）、10mg/kg 投与群では投与前値に比しわずかに低下した（投与前値に対し 12.3mmHg の低下）。心拍数については全群で顕著な変化はみられなかった。

リオシグアト投与後の心臓及び腎臓重量の結果を表に示す（表 2. 6. 2. 3- 3）。10mg/kg 投与群において、心臓及び左心室の相対重量は媒体投与群に比し有意に減少した。更に、10mg/kg 投与群において、腎臓の相対重量も媒体投与群に比し有意に減少した。

心エコー図法を用いて心機能パラメータを測定した（表 2. 6. 2. 3- 4）。左室心筋収縮力のパラメータである左室内径短縮率は、媒体投与群では顕著に低下したが、リオシグアト投与群では媒体投与群に比し有意な増加がみられ、正常値レベルが維持された。リオシグアト投与群におい

て、心室中隔厚及び左室自由壁厚の相対的増加は媒体投与群の約 2 倍であったが、左室自由壁対心室中隔比、並びに左室拡張末期径及び左室収縮末期径は媒体投与群に比し有意に減少した。全体的に、心機能パラメータはリオシグアト投与により改善がみられた。

左心室及び腎皮質において、線維化バイオマーカーのオステオポンチン (OPN)、組織マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬-1 (TIMP-1) 及びプラスミノゲン活性化阻害薬-1 (PAI-1) の遺伝子発現量を測定した。媒体投与群では、これら線維化バイオマーカーの mRNA 発現量は正常対照群に比し増加し、特に、腎皮質における TIMP-1 及び PAI-1 で顕著であった。リオシグアト投与により、腎皮質におけるこれら線維化バイオマーカーの mRNA 発現量は媒体投与群に比し減少し、左心室においても程度は小さいものの、減少傾向がみられた。すなわち、リオシグアトによる線維化バイオマーカーの増加抑制作用が示唆された。また、血漿中 OPN、TIMP-1 及び PAI-1 たん白質の発現量を測定した。媒体投与群では正常対照群に比し、これらたん白質は顕著に増加したが、リオシグアト投与群では媒体投与群に比し減少した。更に、リオシグアト投与群における AST、ANP 及び BNP の血漿中濃度は媒体投与群に比し減少した。

リオシグアトの組織線維化に対する作用を評価するため、腎臓及び心臓について、病理組織学的検査を実施した。媒体投与群において、腎皮質では重度の細尿管症がみられ、左心室の心内膜下領域では広範な心筋線維症がみられた。リオシグアト投与により腎臓及び心臓における変性及び炎症性変化は減少した。すなわち、腎臓の病理組織学的所見において、媒体投与群と比較すると、リオシグアト投与群では糸球体硬化、並びに間質及び血管周囲の線維化の減少がみられた。同様に、心臓の病理組織学的所見において、媒体投与群と比較すると、心間質線維化及び心筋細胞径の減少がみられた。血管周囲の線維化には変化はみられなかった。

これらの成績から、リオシグアトが全身性の血圧低下作用を発揮すると共に、心筋及び腎皮質における線維性の組織リモデリングの軽減作用を有することが示唆された。

表 2.6.2.3- 3 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおけるリオシグアト経口投与の心臓及び腎臓重量に対する作用

Parameter (g/kg)	Vehicle	Riociguat (3 mg/kg/day)	Riociguat (10 mg/kg/day)
Relative heart weight	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.3	3.7 ± 0.1**
Relative left ventricle weight	3.3 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.7 ± 0.1*
Relative right ventricle weight	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.09	0.6 ± 0.01
Relative left kidney weight	5.1 ± 0.3	4.5 ± 0.1**	4.2 ± 0.1***
Relative right kidney weight	5.3 ± 0.3	4.4 ± 0.1**	4.2 ± 0.08***

Values are given as mean ± SEM. Vehicle: n=17, Riociguat (3 mg/kg/day)(n=13), Riociguat (10 mg/kg/day)(n=13) Measurements were obtained at the study end.

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. Vehicle by ANOVA + Newman-Keuls test

表 2.6.2.3-4 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおけるリオシグアト経口投与の心エコー図法による心機能パラメータに対する作用

Parameter	Vehicle	Riociguat (3 mg/kg/day)	Riociguat (10 mg/kg/day)
Fractional shortening (%)	19.7 ± 1.8	43.9 ± 1.8***	46.5 ± 2.2***
Relative increase in thickness of IVS (%)	28.2 ± 5.5	53.9 ± 5.6**	54.5 ± 4.4**
Relative increase in thickness of LfW (%)	29.0 ± 7.1	45.8 ± 6.1*	61.6 ± 6.0**
LfW:IVS	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1*	1.0 ± 0.03***
LVD diastole (mm)	8.9 ± 0.2	7.7 ± 0.3**	7.9 ± 0.1**
LVD systole (mm)	7.2 ± 0.2	4.4 ± 0.3***	4.2 ± 0.2***

Values are given as mean ± SEM. Vehicle: n=17, Riociguat (3 mg/kg/day)(n=13), Riociguat (10 mg/kg/day)(n=13)
IVS=intraventricular septum, LfW=left free wall, LVD=left ventricular diameter
Measurements were obtained at the study end.

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. Vehicle by ANOVA + Newman-Keuls test

2.6.2.3.2.4.4 低レニンラット

参照項目：4.2.1.1.9 J Hypertens 2010-28-1666

中等度の高血圧を伴う慢性腎不全モデルとして、レニン分泌を低下させた腎摘出モデルが使用される。5/6 腎摘出ラットモデルを用いて、リオシグアトの作用を検討した。

雄性ラット (Wistar、320～340g) の右腎を摘出し、その 2 週間後、更に左腎の 2/3 を摘出し、全腎臓の 5/6 に相当する腎臓を摘出したラットを、低レニン性ラットモデルとして試験に用いた。リオシグアトを当該ラットモデルに混餌 (0 又は 300ppm) で 18 週間投与した (n=15)。300ppm は 15mg/kg/日に相当すると考えられた。また、偽手術を施した対照群を設定した (n=10)。

低レニン対照群では偽手術群に比し、顕著な収縮期血圧の上昇がみられた。低レニン対照群でみられた収縮期血圧の顕著な上昇は、リオシグアト投与により低減することが試験終了時に確認された。試験期間中、低レニン対照群では 15 例中 6 例に死亡がみられたのに対して、リオシグアト投与群の死亡は 15 例中 4 例に減少した。なお、偽手術群では死亡はみられなかった。そのほかに、主要な血液生化学的パラメータ及び線維化パラメータについて評価した (表 2.6.2.3-5 及び表 2.6.2.3-6)。

低レニン対照群及びリオシグアト投与群 (両摘出群) の血漿クレアチニン及び尿素は偽手術群に比し有意に上昇したが、リオシグアト投与群では低レニン対照群に比し共に約 50%低下した。血漿総たん白質及びレニン活性については、両摘出群で偽手術群に比し有意に低下したが、両摘出群の間には有意な差はみられなかった。低レニン対照群の血漿 ANP は偽手術群に比し有意に増加したが、リオシグアト投与群と偽手術群との間には有意な差はみられなかったことから、リオシグアトによる ANP の低下が示唆された。また、両摘出群のクレアチニンクリアランスは偽手術群に比し、試験期間を通して低値を示した。しかし、試験開始時には同程度であった両摘出群のクレアチニンクリアランスは、試験終了時にはリオシグアト投与群で低レニン対照群に比し上昇し、リオシグアトによる回復作用が示唆された。

両摘出群の体重は偽手術群に比し有意に低かった。両摘出群の左心室相対重量及び心筋細胞径は偽手術群に比し有意に増加したが、両摘出群において比較した結果、リオシグアト投与によりこれらパラメータの増加抑制作用が確認された。また、両摘出群の腎間質線維化は偽手術群に比

し有意に増加したが、両摘出群において比較した結果、リオシグアト投与により線維化の低減作用が確認された。しかし、糸球体硬化度の増加はリオシグアト投与により変化しなかった。腎内動脈の中膜／内腔比については全群で差はみられなかった。

これらの結果から、低レニン性ラットモデルにおいて、リオシグアトは心臓障害及び腎障害の軽減作用を有することが示唆された。

表 2. 6. 2. 3- 5 低レニン性ラットモデルにおけるリオシグアト経口投与の血液生化学的パラメータに対する作用

Parameter	5/6 NX	5/6 NX + riociguat	Sham operated
Creatinine (μM)	$209 \pm 37^*$	$112 \pm 5^{*,\dagger}$	52 ± 1
Urea (mM)	$38 \pm 7^*$	$22 \pm 1^{*,\dagger}$	6 ± 0.3
Protein (g/L)	$55 \pm 2^{**}$	$54 \pm 1^{**}$	66 ± 1
PRA (ng/mL per h)	$0.7 \pm 0.2^{**}$	$0.7 \pm 0.1^{**}$	2.6 ± 0.4
ANP (pg/mL)	$487 \pm 54^*$	$286 \pm 37^\dagger$	319 ± 51

Values are given as mean $\pm$ SEM. Plasma values were obtained at study end (week 18) of 5/6 nephrectomized rats (n=9), riociguat-treated 5/6 nephrectomized rats (n=8) and sham-operated rats (n=10).

NX: nephrectomy, ANP: atrial natriuretic peptide, PRA: plasma renin activity.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ vs. sham operated, † : $p < 0.05$ vs. 5/6 NX by unpaired t -test

表 2. 6. 2. 3- 6 低レニン性ラットモデルにおけるリオシグアト経口投与の体重、心臓及び腎臓に対する作用

Parameter	5/6 NX	5/6 NX + riociguat	Sham operated
Body weight (g)	$415.0 \pm 16.45^*$	$408.73 \pm 10.93^*$	502.0 ± 23.84
Relative left ventricle (% of body weight)	$0.32 \pm 0.02^*$	$0.25 \pm 0.01^{*,\dagger}$	0.21 ± 0.02
Cardiac myocyte diameter (μm)	$19 \pm 1.5^*$	$15 \pm 0.6^{*,\dagger}$	12 ± 0.3
Renal interstitial fibrosis (% of section)	$2.4 \pm 0.4^{**}$	$1.0 \pm 0.2^{*,\dagger}$	0.2 ± 0.1
Glomerulosclerosis (score)	$2.4 \pm 0.2^{**}$	$2.1 \pm 0.2^{**}$	1.0 ± 0.1
Media-lumen ratio (intrarenal arteries)	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3

Values are given as mean $\pm$ SEM. Organ weights and histological results of heart and kidney samples were obtained at study end (week 18) of 5/6 nephrectomized rats (n=9), riociguat-treated 5/6 nephrectomized rats (n=8) and sham-operated rats (n=10).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ vs. sham operated, † : $p < 0.05$ vs. 5/6 NX by unpaired t -test

2.6.2.3.2.5 代謝物 M-1 の副次的薬理試験

M-1 における副次的薬理作用について、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。

2.6.2.3.2.5.1 特異性

参照項目： 4.2.1.2.14 PH-34540
4.2.1.2.15 PH-36724
4.2.1.2.16 PH-36725
4.2.1.2.17 PH-35060

M-1 の特異性について、2.6.2.3.1.1に記載した *in vitro* アッセイにより評価した。

M-1 は最高濃度 $10\ \mu\text{M}$ まで、検討した種々の受容体に対して結合しなかった ($n=2$) (4.2.1.2.14 PH-34540 参照)。検討した PDE (11A、9A、8A、7B、5、4B、3B、2A、6、1) に対する M-1 の IC_{50} 値は $10\ \mu\text{M}$ を超えた ($n=3$) (4.2.1.2.17 PH-35060 参照)。また、M-1 は $30\ \mu\text{M}$ まで、GC-A 及び GC-B レポーター細胞株に対する刺激作用を示さなかった (4.2.1.2.15 PH-36724 及び 4.2.1.2.16 PH-36725 参照)。これらの成績より、M-1 と sGC の相互作用は特異的であると考えられた。

2.6.2.3.2.5.2 血小板凝集

参照項目： 4.2.1.2.19 PH-36784
4.2.1.2.20 PH-34507

M-1 のヒトの血小板における VASP リン酸化について、2.6.2.3.1.3に記載した *in vitro* アッセイにより評価した (4.2.1.2.20 PH-34507 参照)。

M-1 ($0.1\sim 10\ \mu\text{M}$) は洗浄血小板において、PKG の基質である VASP の Ser²³⁹ リン酸化を濃度依存的に増加させ、NO 供与体 (SNP 及び DEA/NO) と併用すると、リン酸化 VASP は相乗的に増加した ($n=5$ 又は 7)。また、M-1 単独 ($10\ \mu\text{M}$) は血小板 cGMP 濃度を 19 倍増加させた。M-1 0.03 及び $0.1\ \mu\text{M}$ では cGMP 濃度の増加はみられなかったが、NO 供与体と併用すると、cGMP 濃度は相乗的に増加した ($n=7$ 又は 8)。cAMP 濃度には変化はみられなかった。

また、ヒト血小板を用いて、薬物誘発血小板凝集に対する M-1 の作用を検討した (4.2.1.2.19 PH-36784 参照)。

健康成人から採取した血液を用いて調製した多血小板血漿又は洗浄血小板に、M-1 を加えてインキュベートした後、血小板凝集誘発物質として、コラーゲン、ADP、U46619、TRAP-6 又はトロンビン (これは洗浄血小板のみ) を加え、血小板凝集能測定装置を用いて比濁法により、血小板凝集を測定した ($n=4$)。

多血小板血漿において、M-1 はコラーゲン、ADP、U46619 又は TRAP-6 誘発血小板凝集を、弱い濃度依存的に阻害した (IC_{50} 値は、それぞれ 27.5 、 18.2 、 33.9 及び $15.9\ \mu\text{M}$)。また、洗浄血小板において、M-1 はコラーゲン、ADP、U46619、TRAP-6 又はトロンビン誘発血小板凝集を、濃度依存的に阻害し、多血小板血漿と比較すると、血小板凝集に対する抑制作用は強かった (IC_{50} 値は、それぞれ 4.8 、 15.5 、 3.0 、 6.1 及び $2.2\ \mu\text{M}$)。

これらの成績から、*in vitro* において、M-1 は弱い抗血小板作用を示すと考えられた。

2.6.2.3.2.5.3 有害作用スクリーニング

参照項目：4.2.1.2.18 PH-34541

M-1の有害作用プロファイルについて、2.6.2.3.2.1に記載した方法により評価した。

In vitro (30 μ M) 及び *in vivo* (30mg/kg、経口) 試験において、M-1を検討した結果、ラット（雄、Wistar、250 $\pm$ 20g、n=5）で血圧の低下（1時間後に投与前値の49%）、生理食塩液を負荷したラット（雌雄、Wistar、150 $\pm$ 20g、n=5）でナトリウム排泄量の低下（媒体投与群の27%）、絶食マウス（雌雄、CD-1、22 $\pm$ 2g、n=5）で胃腸管の運動性低下（媒体投与群の69%）が認められ、またラット（雌雄、Wistar、275 $\pm$ 25g、n=2）の摘出胸部大動脈リング標本の塩化カリウム誘発収縮に対する阻害作用がみられた（媒体投与群の53%）。そのほかにはM-1による顕著な影響はみられなかった。腎機能及び胃腸管運動能に対するM-1の影響については、安全性薬理試験でも検討されている（2.6.2.4.5 参照）。

2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は「安全性薬理試験ガイドラインについて」（ICH S7A）及び「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価について」（ICH S7B）に従い、特に記載した場合を除き、GLP に準拠して実施した。リオシグアト及びその主代謝物 M-1（BAY 60-4552）の安全性薬理試験として、生命維持に重要な器官系（中枢神経系、心電図を含む心血管系、呼吸器系）及びその他の器官・機能（胃腸管系、腎機能、糖・脂質代謝、血液及び血液凝固系）に及ぼす影響を、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。なお、*in vivo* 試験における投与量は、ラット及びイヌで明らかになっている血行動態作用の用量－反応曲線に基づき、選択した。

麻酔下のイヌにおけるリオシグアト及び M-1 の最高血漿中濃度（ C_{max} ）は、心血管系の検討で使用した動物で測定した。覚醒下のイヌ及びラットにおける C_{max} は、反復投与毒性試験でのトキシコキネティクスデータから推定した（表 2.6.2.4-1）。

表 2.6.2.4-1 リオシグアト投与後のリオシグアト及びその主代謝物 M-1（BAY 60-4552）の最高血漿中濃度（ C_{max} ）

Animal	Dose riociguat [mg/kg]	C _{riociguat} [µg/L]		C _{BAY 60-4552} [µg/L]	
		total	unbound	total	unbound
anesthetized dog ^a	0.01	6.26	1.07	0.846	0.14
anesthetized dog ^a	0.3	91.4	15.6	24.5	4.04
conscious dog ^b	0.3	114	19.5	41.9	6.91
conscious dog ^c	0.3	145	24.8	33.5	5.53
conscious rat ^d	3	121	19.0	7.25	0.78

a Source: 4.2.1.3.4 PH-33352; PH-33352A

b Source: 4.2.3.2.10 PH-34778

c Source: 4.2.3.2.11 PH-35050

d Source: 4.2.3.2.6 PH-34674

Protein binding riociguat (fraction unbound): dog 17.1 %, rat 15.7 % (4.2.2.3.1 PH-33817)

Protein binding BAY 60-4552 (fraction unbound): dog 16.5 %, rat 10.7 % (4.2.2.7.10 PH-35330)

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.7 PH-33270
4.2.1.3.8 PH-33241

リオシグアトの中枢神経系に及ぼす影響を検討するため、ラットを用いて、2 試験を実施した。

リオシグアト 0.3、1 及び 3mg/kg、又は媒体（0.5%Tylose）を雄性ラット（Wistar）に単回経口投与後、一般症状、体温及びオープンフィールドでの自発運動（n=6、193～217g）

(4.2.1.3.7 PH-33270 参照)、並びにペンチレンテトラゾールの痙攣誘発閾値、熱刺激に対する侵害受容反応及びヘキソバルビタール誘発睡眠時間 ($n=7\sim 8$ 、 $181\sim 220\text{g}$) を評価した (4.2.1.3.8 PH-33241 参照)。

リオシグアトは一般症状、体温及び自発運動に影響を及ぼさなかった。また、ペンチレンテトラゾールの痙攣誘発閾値に影響を及ぼさず、痙攣誘発作用及び抗痙攣作用はみられなかった。ヘキソバルビタール誘発睡眠時間に影響を及ぼさなかった。熱刺激に対する侵害受容反応に対しては、用量依存的な反応時間の延長がみられ、 3mg/kg 投与時に媒体対照群に比し統計学的に有意な延長がみられた [媒体対照: 20.6 ± 5.0 秒、 0.3mg/kg : 25.8 ± 7.8 秒、 1mg/kg : 31.6 ± 12.2 秒、 3mg/kg : 39.4 ± 20.1 秒 ($p<0.05$ 、ANOVA+Duncan's test)]。

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験

参照項目: 4.2.1.3.1 R-8313
4.2.1.3.2 PH-32778

リオシグアトの hERG カリウム電流に及ぼす影響を検討するため、hERG を安定的に発現させた CHO 細胞を用い、パッチクランプ法によりカリウム電流を測定した (4.2.1.3.1 R-8313 参照)。更に、リオシグアトの心筋活動電位に及ぼす影響を検討し、*in vitro* における心室再分極について評価した (4.2.1.3.2 PH-32778 参照)。なお、両試験共に ICH S7B 施行前に実施されており、GLP 非準拠で実施されたものの、評価可能と考えられた。

リオシグアト 0.1 、 1 及び $10\ \mu\text{M}$ (媒体: DMSO) について、hERG カリウム電流に及ぼす影響を検討したところ、最高濃度 $10\ \mu\text{M}$ まで影響はみられなかった。

雌性ウサギ (チンチラ、 $2\sim 5\text{kg}$) の摘出心臓プルキンエ線維にリオシグアト 0.1 、 1 及び $10\ \mu\text{M}$ (媒体: DMSO) を灌流すると ($n=4$)、静止膜電位、活動電位振幅、最大立ち上がり速度、プラトー電位、並びに 20% 及び 50% 再分極時における活動電位持続時間 (APD_{20} 及び APD_{50}) に影響はみられなかった。 0.1 及び $1\ \mu\text{M}$ で 90% 再分極時における活動電位持続時間 (APD_{90}) に影響はみられなかった。 $10\ \mu\text{M}$ において、 APD_{90} はリオシグアトの灌流前に比し、統計学的に有意に延長したものの ($p<0.05$ 、ANOVA+Dunnett's test)、その程度は軽微であった ($14\pm 3\%$ の延長)。

2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験

リオシグアトの心血管系 (心電図を含む) に及ぼす影響を検討するため、麻酔イヌ、並びにテレメーターを装着した覚醒イヌ及びラットを用いて、3 試験を実施した。

2.6.2.4.2.2.1 麻酔イヌ

参照項目: 4.2.1.3.4 PH-33352、PH-33352A

リオシグアト 0.01 、 0.03 、 0.1 及び 0.3mg/kg 又は媒体 [エタノール/PEG400 ($10/90$ 、 v/v)] を麻酔下の雌雄ビーグル犬 ($10.6\sim 15.7\text{kg}$) に単回十二指腸内投与し、心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響を検討した ($n=3$)。呼吸器系に及ぼす結果については 2.6.2.4.3 に示す。心血管系

パラメータとして、動脈収縮期圧及び拡張期圧、左室収縮期圧及び拡張終期圧、左室圧最大変化率、心拍出量、中心静脈圧、心拍数、1 回拍出量及び全末梢血管抵抗を測定した。また、心電図パラメータとして、PQ、QT 及び QRS 間隔を測定した。QT 間隔については、Bazett 式 (QTcB)、Fridericia 式 (QTcF) 及び van de Water 式 (QTcV) を用いて、心拍数補正を行った。

0.03mg/kg 投与後に心拍数の軽微な上昇 (18%) がみられたことを除き、0.01 及び 0.03mg/kg 投与後に心血管系パラメータに対し明らかな影響はみられなかった。0.1mg/kg 以上の用量において、左室拡張終期圧の低下 (最大約 1.5mmHg) 及び心拍出量の増加 (0.3mg/kg で最大 46%) と共に血管拡張作用 (全末梢血管抵抗は 0.3mg/kg で最大 44% の低下) がみられた。血圧低下 (0.3mg/kg で最大 22%) に対する反射性の交感神経活性化により、心拍数及び左室圧最大変化率の増加がみられた (0.3mg/kg でそれぞれ最大 49% 及び 45%)。

心電図では心拍数の増加に伴い PQ 及び QT 間隔が短縮した。QT/QTc 間隔に対するリオシグアトの作用を表 2.6.2.4-2 に示す。QT 間隔を Bazett 式により心拍数補正を行うと、媒体投与群及びリオシグアト投与群のいずれにおいても、QTcB 間隔に一過性の延長 (平均 1~11msec) が認められた。また、QT 間隔を Fridericia 式により心拍数補正を行うと、QTcF 間隔に問題となる延長作用はみられなかった。すなわち、媒体投与群及びリオシグアト投与群のいずれにおいても、QTcF 間隔の延長は平均 3msec 以下で、最大延長作用の個体間の差異も 10msec 以下であった。更に、van de Water 式で心拍数補正を行うと、QTcV 間隔の延長はみられなかった。したがって、心拍数補正を Bazett 式で行った場合、頻脈による QT 間隔の短縮が十分に補正されなかったものと考えられた。

表 2.6.2.4-2 麻酔下のイヌにおける心拍数及び QT/QTc 間隔に対するリオシグアトの作用

Dose [mg/kg i.d.]	HR	QT	QTcB	QTcF	QTcV
0.01	+11 %	-5 msec / -2%	+8 msec / +3%	+3 msec / +1%	+1 msec / ±0%
0.03	+12 %	-7 msec / -2%	+9 msec / +3%	+3 msec / +1%	±0 msec / ±0%
0.1	+4 %	-4 msec / -2%	+2 msec / +1%	±0 msec / ±0%	-2 msec / -1%
0.3	+49 %	-41 msec / -15%	+11 msec / +4%	-9 msec / -3%	-20 msec / -7%

i.d.: intraduodenal, HR: heart rate

Source: 4.2.1.3.4 PH-33352 (QTcV values calculated manually, not included in PH-33352)

2.6.2.4.2.2.2 テレメーターを装着した覚醒イヌ

参照項目 : 4.2.1.3.5 PH-35276

リオシグアトを媒体 (0.5%Tylose) に懸濁し、ゼラチンカプセルに封入したものを、0.05、0.1 及び 0.3mg/kg の用量で、テレメーターを装着した覚醒下の雌雄ビーグル犬 (13.1~19.0kg) に単回経口投与し、15 時間にわたって動脈圧 (収縮期及び拡張期)、心拍数及び心電図パラメータ (PQ、QRS 及び QT 間隔) を測定した (n=5)。QT 間隔については、Bazett 式 (QTcB)、Fridericia 式 (QTcF)、及び van de Water 式 (QTcV) を用いて、心拍数補正を行った。対照群には媒体を投与した。

リオシグアトは用量依存的に動脈圧を低下させ、0.05 及び 0.1mg/kg では軽微な低下であった (0.1mg/kg で 10% の収縮期圧の低下) が、0.3mg/kg では顕著な動脈圧の低下が長時間持続した。

（最大 25%の収縮期圧の低下）。血圧低下作用に反応した反射性の交感神経活性化によると考えられる心拍数の顕著な増加がみられた（0.3mg/kg で最大 66%の増加）。これらの作用は 15 時間の観察期間終了時にはほぼ完全に回復した。

心電図において、QRS 間隔に影響はみられなかった。心拍数の増加に伴い、PQ 間隔（最大 16%又は 18msec）及び QT 間隔（最大 12%又は 27msec）は短縮した。QT/QTc 間隔に対するリオシグアトの作用を表 2.6.2.4- 3に示す。QT 間隔を Bazett 式及び Fridericia 式で心拍数補正を行うと、QTcB 間隔（最大 14%又は 37msec）及び QTcF 間隔（最大 6%又は 14msec）は延長した。対照的に、van de Water 式により心拍数補正を行うと、最大心拍数においても QTcV 間隔には影響はみられなかった。Bazett 式及び Fridericia 式は心拍数が高い場合に QT 間隔を過剰に補正することが知られていること、及び van de Water 式による QTcV 間隔には影響がみられず、未補正の QT 間隔は心拍数の増加に伴って最大 12%の短縮がみられたことから、観察された QTcB 及び QTcF 間隔の延長は、リオシグアトによる影響ではなく、不十分な補正計算によるものと考えられた。

表 2.6.2.4- 3 覚醒下のイヌにおける心拍数及び QT/QTc 間隔に対するリオシグアトの作用

Dose [mg/kg p.o.]	HR	QT	QTcB	QTcF	QTcV
0.05	+10 %	-2 msec / -1 %	+16 msec / +6 %	+9 msec / +4 %	+6 msec / +2 %
0.1	+33 %	-18 msec / -8 %	+16 msec / +6 %	+2 msec / +1 %	-3 msec / -1 %
0.3	+64 %	-22 msec / -10 %	+37 msec / +14 %	+14 msec / +6 %	+3 msec / +1 %

p.o.: per os, HR: heart rate

Source: 4.2.1.3.5 PH-35276

2.6.2.4.2.2.3 テレメーターを装着した覚醒ラット

参照項目：4.2.1.3.6 A48371

リオシグアト 0.5、1 及び 3mg/kg、又は媒体（0.5%Tylose）を、テレメーターを装着した覚醒下の雌性ラット（Wistar、285～335g）に単回経口投与し、22 時間にわたって動脈圧（収縮期及び拡張期）、心拍数及び心電図パラメータ（PQ、QRS 及び QT 間隔）を測定した（n=4）。また、体温及び自発運動量についても測定した。なお、当該試験は GLP 非準拠で実施した。

リオシグアトは用量依存的に動脈圧を低下させ、0.5 及び 1mg/kg で約 10%、3mg/kg で最大 23%の低下がみられた。こうした血圧低下作用は、0.5 及び 1mg/kg で約 10 時間、3mg/kg では約 20 時間持続した。血圧低下作用に反応した反射性の心拍数増加がみられた（3mg/kg で最大 40%の増加）。心電図パラメータ、並びに体温及び自発運動にリオシグアトによる影響はみられなかった。

2.6.2.4.3 呼吸器系に及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.4 PH-33352、PH-33352A

麻酔下の雌雄ビーグル犬を用いて、リオシグアトの呼吸器系に及ぼす影響を検討した (2.6.2.4.2.2.1 参照)。

リオシグアトはいずれの用量においても、最大吸気圧及び呼気圧、呼吸量、コンプライアンス及び抵抗、呼気中及び吸気中の酸素及び二酸化炭素濃度、動脈血ガス（酸素及び二酸化炭素分圧）、酸－塩基平衡、並びに血漿カリウム及びナトリウム濃度に特に問題となる影響を及ぼさなかった。ヘマトクリット値については全用量で軽微な増加がみられた（2.3～5%）。

2.6.2.4.4 その他の器官・機能に及ぼす影響

2.6.2.4.4.1 胃腸管系

参照項目：4.2.1.3.3 PH-33290
4.2.1.3.10 PH-33277

腸管平滑筋を用いた *in vitro* 試験及びラットを用いた *in vivo* 試験において、リオシグアトの消化管運動に及ぼす影響を検討した。

雄性モルモット (Hsd/Poc : DH、377g) より摘出した回腸を試験に用いた。リオシグアト（媒体：DMSO）添加前後で、アセチルコリン、ヒスタミン、セロトニン又は塩化バリウム誘発によるモルモット摘出回腸収縮を測定したとき〔リオシグアト最終濃度 0.1 又は 1mg/L（0.24 又は 2.4 μ M）、n=4〕、リオシグアト 1mg/L はアセチルコリン誘発収縮をリオシグアト添加前に比し 12%阻害したものの（ $p<0.05$ 、*t*-test）、ヒスタミン、セロトニン及び塩化バリウム誘発収縮に対しては、リオシグアトは明らかな影響（10%以上の阻害作用）を及ぼさなかった（4.2.1.3.3 PH-33290 参照）。

リオシグアト 0.3、1 及び 3mg/kg 又は媒体（0.5%Tylose）を雄性ラット（Wistar、191～231g）に単回経口投与し、その 30 分後に硫酸バリウム懸濁液を経口投与した（n=5）。更に、30 分経過後にラットを屠殺し、硫酸バリウムの腸管内輸送距離を測定した（4.2.1.3.10 PH-33277 参照）。リオシグアト投与により硫酸バリウムの腸管内輸送は用量依存的に阻害され、1mg/kg で 18%、3mg/kg で 29%の統計学的に有意な阻害作用がみられた（ $p<0.05$ vs. 媒体投与群、Duncan's test）。したがって、リオシグアトは検討した用量範囲において、胃腸管運動能を低下させると考えられた。これは、リオシグアトの作用機序である平滑筋弛緩作用に起因するものと考えられた。

2.6.2.4.4.2 腎機能及び代謝

参照項目：4.2.1.3.9 PH-33301
4.2.1.3.11 PH-33278

リオシグアト 0.3、1 及び 3mg/kg、又は媒体（0.5%Tylose）を雄性ラット（Wistar、173～218g）に単回経口投与後、120 分間にわたり、尿を採取し、尿量及び電解質（Na⁺、K⁺、Cl⁻）排泄量を測定した（n=10）（4.2.1.3.9 PH-33301 参照）。その後、血液を採取し血漿中トリグリ

セリド及びコレステロール濃度を測定した。また、リオシグアト 0.3、1 及び 3mg/kg、又は媒体 (0.5%Tylose) を絶食及び非絶食下の雄性ラット (Wistar、絶食下：177～216g、非絶食下：200～233g) に単回経口投与し、30、60、120 及び 180 分後に血液を採取し血糖値を測定した (n=6) (4.2.1.3.11 PH-33278 参照)。

リオシグアトは最高用量 3mg/kg で、媒体投与群に比し尿量を統計学的に有意に減少させた (32%の減少、 $p<0.05$ 、Kruskal Wallis test)。しかし、リオシグアトは電解質排泄量及び脂質代謝に影響を及ぼさなかった。また、絶食及び非絶食下のラットにおいて、リオシグアトは最高用量 3mg/kg で、媒体投与群に比し血糖値を有意に上昇させたが、その程度は軽度であった (絶食ラットで 30%及び非絶食ラットで 13%の上昇、 $p<0.05$ 、Dunnett's test)。

2.6.2.4.4.3 血液系

2.6.2.4.4.3.1 血液学的検査

参照項目：4.2.1.3.9 PH-33301

リオシグアト 0.3、1 及び 3mg/kg、又は媒体 (0.5%Tylose) を雄性ラット (Wistar、173～218g) に単回経口投与し、120 分後に血液を採取し、血球数 (赤血球数、白血球数、血小板数)、ヘマトクリット値、総ヘモグロビン及び遊離ヘモグロビン濃度、並びにトロンビン及びトロンボプラスチン時間を測定した (n=10)。

リオシグアトは白血球数、血小板数及び血液凝固に対して、明らかな影響を及ぼさなかった。しかし、1 及び 3mg/kg における赤血球数、0.3～3mg/kg におけるヘマトクリット値及び総ヘモグロビン濃度に、ほぼ用量依存のかつ統計学的に有意な減少がみられた (最大 11～12%の減少、 $p<0.05$ vs. 媒体投与群、ANOVA+Dunnett's test)。これは、リオシグアトの血管拡張作用により血管内容積の増大をきたし、結果的に血液が希釈されたためと考えられた。

2.6.2.4.4.3.2 出血時間

参照項目：4.2.1.3.12 PH-36050

リオシグアト 0.3、1 及び 3mg/kg、又は媒体 (0.5%Tylose) を雄性ラット (Wistar、198～240g) に単回経口投与し、約 45 分後にペントバルビタールナトリウム (60mg/kg) の腹腔内投与により麻酔した。その 15 分後、ラットの尾を先端から 2mm の部位で切断し、37℃の生理食塩液に浸した後、止血するまでの時間を測定した (n=11 又は 12)。当該試験は GLP 非準拠で実施した。なお、リオシグアト 3mg/kg をペントバルビタールナトリウム麻酔下のテレメーター装着ラットに投与したとき、収縮期血圧の 36%の低下及び体温の約 1℃の低下がみられた (4.2.1.3.6 A48371 参照)。

リオシグアトは最高用量 3mg/kg で出血時間の延長傾向がみられたものの、軽微であり、統計学的にも有意ではなかった (媒体投与群：176±51 秒、3mg/kg 投与群：218±75 秒)。このように、検討した用量範囲において、ラットの尾部切断による出血時間に対し、特に問題となる出血時間の延長はみられなかった。

2.6.2.4.5 代謝物 M-1 の安全性薬理試験

M-1 を用いた安全性薬理試験について以下に示す。

2.6.2.4.5.1 中枢神経系に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.19 PH-34423

4.2.1.3.20 PH-34424

M-1 1、3 及び 10mg/kg、又は媒体 (0.5%Tylose) を雄性ラット (Wistar) に単回経口投与後、一般症状、体温及びオープンフィールドでの自発運動 (n=6、166~233g) (4.2.1.3.19 PH-34423)、並びにペンチレンテトラゾールの痙攣誘発閾値、熱刺激に対する侵害受容反応及びヘキソバルビタール誘発睡眠時間 (n=5~8、177~213g) を評価した (4.2.1.3.20 PH-34424 参照)。

M-1 1 及び 3mg/kg 投与群において、中枢神経系に対して特に問題となる影響はみられなかった。最高用量 10mg/kg 投与群において、不規則な呼吸、活動低下、筋緊張の低下、眼瞼下垂、立毛、及び体温の軽度低下がみられた (4.2.1.3.19 PH-34423 参照)。

2.6.2.4.5.2 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.5.2.1 *In vitro* 試験

参照項目： 4.2.1.3.13 PH-33844

4.2.1.3.14 PH-34361

M-1 の hERG カリウム電流に及ぼす影響を検討するため、hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞を用い、パッチクランプ法によりカリウム電流を測定した (4.2.1.3.13 PH-33844 参照)。更に、ウサギ (雌性、NZW、2~5kg) の心筋活動電位に及ぼす影響を検討した (4.2.1.3.14 PH-34361 参照)。なお、両試験共に GLP 非準拠で実施した (hERG 試験については ICH S7B 施行前に実施)。

M-1 の hERG カリウム電流に対する 20%阻害濃度は $11\mu\text{M}$ であった。また、M-1 は $10\mu\text{M}$ でウサギの摘出心臓プルキンエ線維の APD_{90} を軽微であるものの、M-1 の灌流前に比し統計学的に有意に延長した (n=5、6.4%延長、 $p<0.05$ 、ANOVA+Dunnett's test)。

2.6.2.4.5.2.2 *In vivo* 試験

参照項目： 4.2.1.3.16 PH-34551

4.2.1.3.17 PH-35131

M-1 0.15、0.5 及び 1.5mg/kg、又は媒体 (0.5%Tylose) を、テレメーターを装着した覚醒下の雌雄ビーグル犬 (11.7~17.7kg) に単回経口投与し (n=5)、心血管系 (心電図を含む) に及ぼす影響を検討した (4.2.1.3.17 PH-35131 参照)。また、M-1 0.1、0.3 及び 1mg/kg、又は媒体 (PEG400) を、麻酔下の雌雄ビーグル犬 (10.0~15.1kg) に単回十二指腸内投与し (n=3)、心血管系 (心電図を含む) 及び呼吸器系に及ぼす影響を検討した (4.2.1.3.16 PH-34551 参照)。呼吸器系に及ぼす影響については2.6.2.4.5.3に示す。

テレメーターを装着したイヌにおいて、0.5mg/kg 以上の用量で動脈圧低下がみられ、1.5mg/kg では長時間にわたり作用が持続したが（動脈収縮期圧は最大 27%低下）、試験終了時点ではほぼ回復した。血圧低下作用に反応した反射性の交感神経活性化により心拍数の増加がみられた（1.5mg/kg で最大 84%の増加）。麻酔下のイヌにおいて、0.3mg/kg 以上の用量で左室前負荷（1mg/kg で左室拡張終期圧の最大 41%の低下）及び後負荷（1mg/kg で、全末梢血管抵抗の最大 42%の低下及び拡張期圧の最大 27%の低下）の軽減作用がみられた。また、1mg/kg において、反射性の交感神経活性化（心拍数の最大 18%及び左室圧最大変化率の最大 38%の増加）がみられた。当該試験における C_{max} は用量依存的に上昇し、1mg/kg 投与後には C_{max} は $156 \mu\text{g/L}$ （非結合型として $26 \mu\text{g/L}$ 、イヌにおける M-1 の血漿中非結合型分率は 16.5%、表 2.6.4.8-14）に達した。心電図（QT 及び QTc 評価を含む）については、両試験共に、心拍数増加に伴った変化を除き、特に問題となる影響はみられなかった。

2.6.2.4.5.3 呼吸器系に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.16 PH-34551
4.2.1.3.18 PH-34478

麻酔下の雌雄ビーグル犬（4.2.1.3.16 PH-34551、2.6.2.4.5.2.2 参照）及びテレメーターを装着した雌性ラット（Wistar、236～376g）（4.2.1.3.18 PH-34478）を用いて、M-1 の呼吸器系に及ぼす影響を検討した。麻酔下のイヌにおいて、M-1 0.3～1.0mg/kg の十二指腸内投与により、呼吸、肺機能及び血液ガスに対し特に問題となる影響はみられなかった。テレメーターを装着した覚醒下のラットにおいて、M-1 1、3 及び 10mg/kg 又は媒体（0.5%Tylose）を単回経口投与すると（ $n=6$ ）、最高用量 10mg/kg でみられた呼吸数の軽度の増加（投与前値に対し 20%の増加、媒体投与群で 9%の増加）を除き、呼吸器系に対する影響はみられなかった。

2.6.2.4.5.4 その他の器官・機能に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.15 PH-34744
4.2.1.3.21 PH-34495
4.2.1.3.22 PH-34425
4.2.1.3.23 PH-34426

胃腸管系：M-1（媒体：DMSO）添加前後で、アセチルコリン、ヒスタミン、セロトニン又は塩化バリウム誘発によるモルモット（雄、Hsd/Poc：DH、371g）の摘出回腸収縮を測定したとき（M-1 最終濃度 0.5 又は $5 \mu\text{M}$ 、 $n=4$ ）、M-1 $5 \mu\text{M}$ はアセチルコリン誘発収縮を M-1 添加前に比し 10%阻害したものの（ $p<0.05$ 、 t -test）、ヒスタミン、セロトニン及び塩化バリウム誘発収縮に対しては影響を及ぼさなかった（4.2.1.3.15 PH-34744 参照）。また、M-1 1、3 及び 10mg/kg（媒体：0.5%Tylose）を雄性ラット（Wistar、183～210g）に単回経口投与したとき（ $n=5$ ）、用量依存的かつ統計学的に有意な腸管運動能の阻害がみられた（1mg/kg：13%、3mg/kg：15%、10mg/kg：35%、 $p<0.05$ vs. 媒体投与群、Duncan's test）（4.2.1.3.22 PH-34425 参照）。

腎機能、代謝及び血液系：M-1 1、3 及び 10mg/kg（媒体：0.5%Tylose）を雄性ラット（Wistar、174～208g）に単回経口投与したとき（ $n=7\sim10$ ）、尿中電解質排泄量、血液凝固、白血球数、血小板数、及び脂質代謝に対し影響を及ぼさなかった（4.2.1.3.21 PH-34495 参照）。しかし、10mg/kg における尿量（60%の減少、 $p<0.05$ 、Kruskal Wallis test）、並びに 3 及び 10mg/kg における赤血球数、総ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値に対しては媒体投与群に比し統計学的に有意な減少がみられた（最大 9～11%の減少、 $p<0.05$ 、Dunnett's test）。また、

M-1 1、3 及び 10mg/kg (媒体 : 0.5%Tylose) を雄性ラット (Wistar、絶食下 : 192~218g、非絶食下 : 198~246g) に単回経口投与したとき ($n=6$)、最高用量 10mg/kg で、媒体投与群に比し統計学的に有意な血糖値の上昇がみられた (絶食ラットで 40%未満及び非絶食ラットで 20%未満の上昇、 $p<0.05$ 、Dunnett's test) (4.2.1.3.23 PH-34426 参照)。

以上をまとめると、用量依存的な腸管運動能の阻害、3mg/kg 以上又は 10mg/kg でみられた血糖値の上昇、尿量の減少、並びに赤血球数、総ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少は、その程度が軽度であるため、生理学的な意義が小さいもの、もしくは M-1 の平滑筋弛緩作用又は血管拡張作用に起因したものと考えられる。

雌雄ラット (Wistar) を用いた 13 週間反復投与毒性試験 (4.2.3.7.5.6 PH-35365 参照) のトキシコキネティクスデータから、M-1 を 5mg/kg の用量で雄性ラットに経口投与したときの $C_{\max}$ (試験 1 日目) は $595 \mu\text{g/L}$ であった。したがって、M-1 を 10mg/kg の用量でラットに経口投与したときの安全性薬理試験における $C_{\max}$ は、 $1190 \mu\text{g/L}$ (非結合型として $127 \mu\text{g/L}$) と算出された。これは、リオシグアトを臨床用量 (1 日 2.5mg を 3 回) で肺高血圧症患者に投与したときの M-1 の $C_{\max}$ ($111 \mu\text{g/L}$ 、非結合型として $4.0 \mu\text{g/L}$) (2.7.2.3.1.6 参照) に比しはるかに高かった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

2.6.2.5.1 血行動態に対する影響

麻酔ラット、覚醒自然発症高血圧ラット、麻酔イヌ及び U46619 誘発肺高血圧症ウサギモデルを用いて、リオシグアトを PDE-5 阻害薬（バルデナフィル又はシルデナフィル）又は硝酸薬（ニトログリセリン）と併用したときの血行動態に対する影響を検討した。

2.6.2.5.1.1 PDE-5 阻害薬との併用

2.6.2.5.1.1.1 ラットにおけるバルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.1 PH-34819

麻酔下の雄性ラット（Wistar、270～320g）を用いて、リオシグアトをバルデナフィルと併用したときの血行動態に及ぼす影響を検討した。投与量として、リオシグアトは 0.1、0.3、1 及び 3 μ g/kg/分、バルデナフィルは 1 及び 10 μ g/kg/分を用い、併用は、リオシグアト各用量とバルデナフィル 1 μ g/kg/分、及びリオシグアト 1 又は 3 μ g/kg/分とバルデナフィル 10 μ g/kg/分の組み合わせを用いた（n=9～12）。対照群には媒体〔transcutol/cremophor/水（10/10/80、v/v/v）〕を投与した（n=10）。

リオシグアト 0.1、0.3、1 及び 3 μ g/kg/分の静脈内持続投与により、60 分間の観察期間において、平均動脈圧はそれぞれ最大 17、31、32 及び 50mmHg 低下し、バルデナフィル 1 及び 10 μ g/kg/分では、平均動脈圧はそれぞれ最大 17 及び 25mmHg 低下した（媒体投与群では最大 15mmHg の低下）。また心拍数は、リオシグアト投与群（0.1、0.3、1 及び 3 μ g/kg/分）ではそれぞれ最大 0、1、20 及び 42 回/分増加し、バルデナフィル投与群（1 及び 10 μ g/kg/分）ではそれぞれ最大 8 及び 29 回/分増加した（媒体投与群では増加なし）。

リオシグアト 0.1、0.3、1 及び 3 μ g/kg/分とバルデナフィル 1 μ g/kg/分を併用投与したとき、平均動脈圧はそれぞれ最大 30、36、45 及び 59mmHg 低下し、心拍数は最大 3、6、39 及び 35 回/分増加した。またリオシグアト 1 又は 3 μ g/kg/分とバルデナフィル 10 μ g/kg/分を併用したとき、平均動脈圧はそれぞれ最大 60 及び 70mmHg 低下し、心拍数はそれぞれ最大 41 及び 71 回/分増加した。媒体投与群での血圧低下を踏まえると、両薬の併用により血圧低下作用は増強されと考えられた。また両薬の併用により心拍数増加も増強されと考えられた。血圧低下及び心拍数増加は、両薬の高用量を併用したとき、より増強される傾向がみられた。

2.6.2.5.1.1.2 自然発症高血圧ラットにおけるバルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.2 PH-35570

リオシグアト 0.1 及び 0.3mg/kg、バルデナフィル 3 及び 10mg/kg、リオシグアトとバルデナフィルの両方（各用量の組み合わせ）、又は媒体〔transcutol/cremophor/水（10/20/70、v/v/v）〕を、テレメーターを装着した覚醒下の雌性自然発症高血圧ラット（SHR、200～250g）に経口投与し、平均動脈圧及び心拍数を測定した（n=6）。

リオシグアト 0.1 又は 0.3mg/kg とバルデナフィル 3mg/kg を併用すると、平均動脈圧はそれぞれ最大 33.2 及び 52.4mmHg 低下し（リオシグアト 0.1 及び 0.3mg/kg の単独：それぞれ 18.4 及び 23.7mmHg の低下、バルデナフィル 3mg/kg 単独：23.7mmHg の低下）、心拍数はそれぞれ最大 79.6 及び 79.8 回/分増加した（リオシグアト 0.1 及び 0.3mg/kg の単独：それぞれ 44.1 及び 60.6 回/分の増加、バルデナフィル 3mg/kg の単独：67.2 回/分の増加）。また、リオシグアト 0.1 又は 0.3mg/kg とバルデナフィル 10mg/kg を併用すると、平均動脈血圧はそれぞれ最大 34.0 及び 47.2mmHg 低下し（バルデナフィル 10mg/kg の単独：36.9mmHg の低下）、心拍数はそれぞれ最大 73.9 及び 64.9 回/分増加した（バルデナフィル 10mg/kg の単独：87.4 回/分の増加）。

リオシグアト 0.1 又は 0.3mg/kg とバルデナフィルでほぼ最大の血圧低下作用が得られる 3mg/kg を併用すると、血圧低下作用の増強がみられ、リオシグアト単独投与時に比し約 2 倍の血圧低下がみられた。反射性の心拍数増加については、軽度の増強がみられた。バルデナフィル 10mg/kg と併用すると、血圧低下のわずかな増強がみられたが、心拍数増加は増強されなかった。

2.6.2.5.1.1.3 イヌにおけるシルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.3 PH-35443

リオシグアト 3、10、30 及び 100 μ g/kg、又は媒体〔グリセロール/水/PEG400（60/100/1129、w/w/w）〕を麻酔下の雌雄イヌ（20～30kg、自律神経遮断下）に、30 分間隔で急速静脈内投与した（媒体、3、10、30、100 μ g/kg の順序で累積投与）。当該試験では、シルデナフィルとの併用による作用を検討するため、リオシグアトの投与開始 60 分前より、あらかじめ、シルデナフィル 30、100 及び 300 μ g/kg/時間、又は媒体〔transcutol/PEG400/DMSO（49.5/49.5/1、v/v/v）、0.25mL/kg/時間〕を静脈内持続投与した（n=3～5）。

リオシグアト 3、10、30 及び 100 μ g/kg の投与により（シルデナフィルの媒体の静脈内持続投与を伴う）、平均動脈血圧は用量依存的に低下した。血圧低下作用と共に、心拍数、左室圧最大変化率及び心拍出量の用量依存的な軽微増加、並びに肺動脈圧、中心静脈圧、全身血管抵抗及び肺血管抵抗の用量依存的な低下もみられた。シルデナフィルを静脈内持続投与中にリオシグアトを投与した場合にも、リオシグアトによる血圧低下の程度は単独投与時と比較して同様であったことから、リオシグアトの血圧低下作用は維持されると考えられた。このように、リオシグアトをシルデナフィルと併用した場合、リオシグアトによる血行動態作用は増強されることが示唆された。

2.6.2.5.1.1.4 U46619 誘発肺動脈高血圧症ウサギモデルにおけるシルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.1.1 Eur Respir J 2008-32-881

U46619（トロンボキサン A₂ 類似体）70～160pmol/kg/分をウサギに静脈内持続投与したところ、肺動脈圧は 30 分以内に平均 23.4 $\pm$ 0.9mmHg 上昇し、その後、少なくとも 300 分間にわたり、肺動脈圧は維持され（<2mmHg）、急性の肺高血圧症モデルが作製されたことが確認された。

ウサギに U46619 を静脈内持続投与した 30 分後、リオシグアト 1 及び 10mg/kg、シルデナフィル 10mg/kg をそれぞれ単独、又はリオシグアト 1mg/kg 及びシルデナフィル 10mg/kg を併用で経口投与した（n=5～8）。対照群には U46619 の静脈内持続投与のみを行った（n=5）。

シルデナフィル投与群では肺動脈圧のみの低下がみられたが、リオシグアト投与群では肺動脈圧に加え、全身動脈圧についても用量に依存した低下がみられた。リオシグアト 1mg/kg（低用量）とシルデナフィルを併用すると、肺動脈圧の低下作用は増強され、程度は小さいが、全身動脈圧の低下作用も増強された。

以上、PDE-5 阻害薬との併用における血行動態に対する影響を検討した 4 試験の結果から、リオシグアトと PDE-5 阻害薬との併用によって、肺動脈圧及び全身血圧の低下作用は増強されることが示唆された。

2.6.2.5.1.2 イヌにおける硝酸薬との併用

参照項目：4.2.1.4.4 PH-33852

ニトログリセリン (GTN) 0.5、1 及び 3 μ g/kg を麻酔下の雌雄イヌ（20～30kg、自律神経系遮断下）に各用量を 30～50 分間隔で（すべての心血管系パラメータが投与前値付近まで回復した後）に順次、同動物に追加投与）急速静脈内投与すると（サイクル 1）、用量依存的な短時間の平均動脈圧の低下がみられた（それぞれ投与前値の 6、12 及び 18%の低下、 $n=3$ ）。更に、媒体〔グリセロール/水/PEG400（60/100/1129、w/w/w）〕の静脈内持続投与を開始後（60～120 分）、再び GTN 同用量を同動物に急速静脈内投与すると（サイクル 2）、同程度の平均動脈圧の低下がみられたことから（それぞれ投与前値の 8、10 及び 19%の低下、 $n=3$ ）、当該試験系では硝酸薬耐性は生じないことが確認された。また、GTN 3 μ g/kg 静脈内投与時の血圧低下作用は、リオシグアト 60 μ g/kg/時の静脈内投与時と同程度であることが確認された。

当該試験系において、サイクル 1 の終了後、リオシグアトを 60 μ g/kg/時の用量で静脈内持続投与中（60～120 分）に、GTN 各用量を急速静脈内投与すると（サイクル 2、 $n=5$ ）、リオシグアトによる血圧低下は増強され、GTN の用量依存的な血圧低下がみられた（GTN 3 μ g/kg で、投与前値に対し 26 %低下）。その変化の程度は GTN 単独の場合と同様であった（GTN 3 μ g/kg 単独で、投与前値に対し 24%低下）。また、サイクル 2 において、リオシグアトの静脈内持続投与と同時に、ノルアドレナリンを短期静脈内持続投与し（血管収縮を誘導させた条件下）、GTN を急速静脈内投与した（ $n=5$ ）。その結果、血圧は用量依存的に低下したが、GTN による血圧低下の程度は GTN 単独投与時と比較して大きかった（GTN 3 μ g/kg で、単独時に投与前値に対し 20%低下、リオシグアト及びノルアドレナリン併用時に 32%低下）。

これらの成績から、リオシグアトは GTN の存在下においても、リオシグアトによる平均動脈圧の低下作用は維持されることが確認され、併用により増強されと考えられた。しかし、両薬の併用による血圧低下作用には、*in vitro* 試験における NO とリオシグアトの併用による相乗的な cGMP の産生増加から予測されるような相乗作用はみられなかった。これは *in vivo* における生理的条件下では、正常血圧からの過度な血圧低下が生じないことを示している可能性が考えられる。一方、顕著な血管収縮下においては、両薬の併用により相乗的な血圧低下作用の増強がみられた。

したがって、リオシグアトと硝酸薬との併用によって、全身血圧の低下作用は増強されることが示唆された。

2.6.2.5.2 ラットにおけるリバーロキサバン、iloprost、クロピドグレル及びアスピリンとの併用による止血に対する影響

参照項目：4.2.1.4.5 PH-36185 Version 2

ラットを用いて、リオシグアトを抗凝固薬であるリバーロキサバンや抗血小板薬である iloprost、クロピドグレル及びアスピリンと併用したときの止血に対する影響を検討した。出血時間は雄性ラット（Wistar、186～241g）を用い、2.6.2.4.4.3.2に記載した方法で評価した。なお、30分以上続く出血は30分として算出した。

投与量として、リオシグアトは0.5及び3mg/kg（媒体：0.5%Tylose、出血時間測定60分前経口投与）、併用するリバーロキサバンは3mg/kg（媒体：PEG400、出血時間測定60分前経口投与）、iloprostは2mg/kg（媒体：100mM Tris 緩衝生理食塩液、出血時間測定30分前経口投与）、クロピドグレルは1mg/kg（媒体：PEG400、出血時間測定120分前経口投与）及びアスピリンは45mg/kg〔媒体：エタノール/PEG400/水（10/40/50、v/v/v）、出血時間測定60分前経口投与〕を用いた（n=10又は14）。

試験結果を表2.6.2.5-1に示す。リオシグアトの単独投与群（0.5及び3mg/kg）では媒体投与群（リオシグアト0mg/kg）に比し出血時間の軽度の延長傾向がみられたものの、生理学的な意義は小さいものと考えられた。

リバーロキサバン、クロピドグレル及び iloprost は、それぞれ単独で媒体投与群に比し出血時間を延長したが、リオシグアトとの併用により、いずれも出血時間の更なる延長はみられなかった。

アスピリンは単独で媒体投与群に比し出血時間を延長し、リオシグアト3mg/kgと併用したとき、出血時間の更なる延長がみられた。

以上の結果から、リオシグアトとアスピリンとの併用により、ラットの出血時間は延長することが明らかとなった。リオシグアト単独では、生理学的に問題となるような出血時間の延長を示さなかった。

表 2.6.2.5-1 ラット出血時間に対するリオシグアト単独、並びにリバーロキサバン、iloprost、クロピドグレル及びアスピリン（ASA）との併用の影響

Dose of riociguat for alone or combination	Riociguat (alone)	Rivaroxaban : 3 mg/kg	Iloprost : 2 mg/kg	Clopidogrel : 1 mg/kg	ASA : 45 mg/kg
0	[159 ± 46]	857 ± 670 ^a	969 ± 796 ^a	281 ± 49 ^a	346 ± 219
0.5 mg/kg	214 ± 57	396 ± 164	220 ± 37	259 ± 44	595 ± 490 ^c
3 mg/kg	206 ± 55	1054 ± 678 ^b	529 ± 674	292 ± 36 ^b	1028 ± 538 ^{b, d}

Values are given as mean ± S.D. (second, n=10-14). [] shows vehicle treatment group.

a: p<0.05 vs. vehicle, b: p<0.05 vs. Riociguat 3mg/kg alone, c: p<0.05 vs. Riociguat 0.5mg/kg alone, d: p<0.05 vs. ASA 45mg/kg alone by ANOVA + Dunn's test/Kruskal-Wallis test

2.6.2.5.3 代謝物 M-1 の薬力学的薬物相互作用

2.6.2.5.3.1 血行動態に対する影響

M-1 を PDE-5 阻害薬及び硝酸薬と併用したときの血行動態に対する影響を評価した。

2.6.2.5.3.1.1 ラットにおけるバルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.6 PH-35040

麻酔下の雄性ラット（Wistar、270～320g）を用いて、M-1 をバルデナフィルと併用したときの血行動態に及ぼす影響を検討した。投与量として、M-1 及びバルデナフィルはいずれも 1、3 及び 10 μ g/kg/分を用い、併用は、M-1 各用量とバルデナフィル 1 μ g/kg/分、及び M-1 1 μ g/kg/分とバルデナフィル 3 又は 10 μ g/kg/分の組み合わせを用いた（n=9～12）。対照群には媒体〔transcutol/cremophor/水（10/10/80、v/v/v）〕を投与した（n=17）。

M-1 1、3 及び 10 μ g/kg/分の静脈内持続投与により、60 分間の観察期間において、平均動脈圧はそれぞれ最大 19、31 及び 48mmHg 低下し、バルデナフィル 1、3 及び 10 μ g/kg/分では、平均動脈圧はそれぞれ最大 17、28 及び 25mmHg 低下した（媒体投与群では最大 15mmHg）。M-1 1 及び 3 μ g/kg/分とバルデナフィル 1 μ g/kg/分を併用したとき、平均動脈圧はそれぞれ 33 及び 43mmHg 低下した。媒体投与群での血压低下を踏まえると、両薬の併用により血压低下作用は増強すると考えられた。

2.6.2.5.3.1.2 イヌにおけるニトログリセリンとの併用

参照項目：4.2.1.4.7 PH-34262

M-1 とニトログリセリン（GTN）の併用による相互作用について、2.6.2.5.1.2に記載した方法により評価した。

麻酔下の雌雄イヌ（20～30kg）において、サイクル 1 の終了後（GTN 0.5、1 及び 3 μ g/kg の急速静脈内投与後）、M-1 を 50 μ g/kg/時〔媒体：transcutol/PEG400/DMSO（49.5/49.5/1、v/v/v）〕の用量で静脈内持続投与中（60～120 分）に、GTN 0.5、1 及び 3 μ g/kg を急速静脈内投与すると（サイクル 2、n=5）、M-1 による血压低下作用は、GTN の用量依存的に増強された（GTN 3 μ g/kg で、投与前値に対し 19%の低下）。その変化の程度は GTN 単独の場合と同程度であった（GTN 3 μ g/kg 単独で、投与前値に対し 14%の低下）。また、M-1 の静脈内持続投与と同時に、ノルアドレナリンの静脈内持続投与を行うと（サイクル 2、n=5）、血压は GTN の用量依存的に低下したが、その程度は GTN 単独投与時と比較してやや大きかった（GTN 3 μ g/kg で、単独時に投与前値に対し 14%低下、M-1 及びノルアドレナリン併用時に 22%低下）。

2.6.2.5.3.2 勃起反応に対する影響

M-1 を PDE-5 阻害薬と併用したときの勃起反応に対する影響について、勃起不全（ED）ラットモデルやウサギモデルにより評価した。

2.6.2.5.3.2.1 海綿体神経破壊 ED ラットモデルにおけるバルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.8 PH-35847

雄性ラット（Sprague-Dawley、8 週齢）を用いて、陰茎海綿体神経を破壊した ED ラットモデルを作製し試験に用いた。勃起反応の指標として、陰茎海綿体圧を用いた。

投与量として、M-1 0.03 及び 0.3mg/kg [媒体：transcutol/cremophor/リン酸緩衝生理食塩液 (10/20/70、v/v/v)]、バルデナフィル 0.03mg/kg (媒体：生理食塩液) を用い、併用は共に 0.03mg/kg を用いた (n=12)。M-1 0.03mg/kg 及びバルデナフィル 0.03mg/kg をそれぞれ単独で麻酔下の当該ラットモデルに静脈内投与したとき、勃起反応は部分的に回復した。併用により勃起反応は増強し、勃起反応は完全に回復した。

2.6.2.5.3.2.2 L-NAME 処置 ED ラットモデルにおけるバルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.10 PH-36096 Version 2

雄性ラット（Wistar、150～250g）に NO 合成酵素阻害薬 L-NAME (3mg/kg) を静脈内投与し、内因性 NO 産生を低下させ、ED を誘導した。2.6.2.5.3.2.1と同様に、勃起反応の指標として、陰茎海綿体圧を用いた。

投与量として、M-1 0.03 及び 0.1mg/kg、バルデナフィル 0.1mg/kg を用い、併用は M-1 0.01 又は 0.03mg/kg とバルデナフィル 0.03mg/kg の組み合わせを用いた (n=6～11)。バルデナフィル単独で麻酔下の当該ラットモデルに静脈内投与したとき、勃起反応は部分的に回復した。M-1 の単独投与により、バルデナフィルと比較すると、更なる勃起反応の回復がみられた。併用により勃起反応は増強し、勃起反応の完全な回復がみられた。

2.6.2.5.3.2.3 SNP 処置ウサギモデルにおけるバルデナフィルとの併用

参照項目：4.2.1.4.9 PH-35848

M-1 をバルデナフィルと併用したときの勃起反応に対する影響について、NO 産生が十分な条件（高 NO）及び ED における NO 産生が低下した条件（低 NO）を擬似的に再現したウサギモデルを用いて検討した。

投与量として、M-1 0.1、0.3、1、3 及び 10mg/kg、バルデナフィル 0.3 及び 1mg/kg、併用は M-1 及びバルデナフィル各用量の組み合わせを用いた（少なくとも n=10）。対照群には媒体 [エタノール/PEG400/水 (10/60/30、v/v/v)] を用いた。被験薬を覚醒下の雄性ウサギ（チンチラ、2.5～4.5kg）に単回経口投与した 90 分後に、NO 供与体 SNP を 0.2mg/kg（高 NO）又は 0.02mg/kg（低 NO）の用量で静脈内投与した。

高 NO 条件下において、M-1、バルデナフィルは共に用量依存的かつ顕著な勃起反応を示した。一方、低 NO 条件下において、M-1 は高 NO 条件下と同様に、用量依存的かつ顕著な勃起反応を示したが、バルデナフィルによる勃起反応は減弱した。低 NO 条件下において、M-1 をバルデナフィルと併用すると、勃起反応は完全に回復し、M-1 単独における作用を上回った。

2.6.2.6 考察及び結論

リオシグアトは sGC に特異的に作用する直接的刺激薬である。sGC は内皮細胞由来 NO の受容体であり、リオシグアトは NO-sGC 経路を活性化することにより、血管緊張、細胞増殖、線維化及び炎症のような細胞機能の調節に重要な役割を担っている cGMP の産生を向上させる。

In vitro において、リオシグアトは 0.1~100 μ M で濃度依存的に精製 sGC に対する刺激作用を示した。リオシグアトを NO と併用すると、相乗的な sGC 刺激作用の増強がみられた。sGC のヘム基を酸化又は除去することにより不活性化した状態では、リオシグアトによる sGC の刺激作用は阻害されたことから、リオシグアトは NO 非依存的及びヘム基依存的機序により、sGC 刺激作用を発揮すると考えられた。また、遺伝子導入により sGC を過剰発現させた CHO レポーター細胞株で検討したところ、リオシグアトは sGC に対する濃度依存的な刺激作用を示し、最小有効濃度は 100nM、EC₅₀ 値は 180nM であった。NO 供与体 SIN-1 を併用すると、相乗的な sGC 刺激作用の増強が確認された。更に、血管内皮細胞において、リオシグアトは 0.01~1 μ M で濃度依存的な sGC 刺激作用を示し、NO 供与体 DEA/NO 又はブラジキニン（内因性 NO の放出薬剤）を併用すると、sGC 刺激作用は相乗的に増強された。これらの試験成績から、リオシグアトは 2 つの作用機序を有すると考えられる。NO と sGC の結合を安定化させ、NO に対する sGC の感受性を高める作用と NO 非依存的に直接 sGC を刺激する作用である。こうした機序により、リオシグアトは NO-sGC-cGMP シグナル伝達経路を回復させ、cGMP 生成を増強させると考えられる。

種々の受容体及び酵素（PDE-1~9 及び PDE-11 を含む）を用いた放射性リガンド結合試験及び酵素分析試験、並びに受容体グアニル酸シクラーゼ GC-A（ANP/BNP 受容体）及び GC-B（CNP 受容体）を過剰発現させた安定 CHO レポーター細胞株を用いた GC-A 及び GC-B の刺激試験の結果から、リオシグアトの sGC に対する相互作用は極めて特異性が高いことが明らかとなった。

リオシグアトは前述した sGC 刺激作用により cGMP の産生を促進し、血管拡張作用をもたらす。これは、*in vitro* 試験において、ウサギ大動脈及び伏在動脈、イヌ大腿静脈におけるフェニレフリン誘発収縮、並びにブタ冠動脈における U46619 誘発収縮に対し、リオシグアトが阻害作用を示したことから確認された。また、ニトログリセリンとは異なり、リオシグアトによる血管収縮阻害作用は硝酸薬耐性の有無により影響されなかった。更に、麻酔下のラット、覚醒下の自然発症高血圧ラット、並びに麻酔下及び覚醒下のイヌを用いた *in vivo* 試験において、全身動脈圧の低下がみられたことから、リオシグアトによる血管拡張作用が確認された。なお、硝酸薬とは対照的に、リオシグアトによる種々の長期反復投与試験において、耐性又はタキフィラキシーはみられなかった。

低酸素（マウス）又はモノクロタリン誘発（ラット）による肺高血圧症モデルを用いた *in vivo* 試験において、リオシグアトは右室収縮期圧、右室肥大及び肺小動脈血管の筋性を軽減し、抗肺高血圧症効果を示すことが明らかとなった。更に、低酸素及び SU5416 で誘発した重度の肺高血圧症ラットモデルにおいて、右室収縮期圧、全肺血管抵抗、右室肥大及び線維化を軽減したことから、リオシグアトは肺血管リモデリングを抑制し、右室機能を改善したと結論される。したがって、リオシグアトは、障害された NO-sGC-cGMP 経路において、cGMP 産生を促進することにより、血管拡張作用及び肺血管リモデリング抑制作用を発揮し、こうした作用により肺高血圧症の改善効果を示すものと考えられる。

肺高血圧症ラットモデルにおいて、リオシグアトが肺高血圧症の改善効果を示した用量 10mg/kg を、ラットに反復経口投与（1 日 1 回 13 週間）したときのリオシグアトの曝露量 [AUC(0-24)] は 3,699 μ g·h/L [非結合型の AUC(0-24) [AUC(0-24), u] : 581 μ g·h/L] であった

(表 2.6.6.10-4)。臨床用量 (1 日 2.5mg を 3 回) を肺高血圧症患者に投与したときの曝露量 [84 日目の AUC(0-24) 4,161 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ [AUC(0-24), u : 206.8 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$] (2.7.2.3.1.6 参照)] と大きな開きはみられない [血漿中非結合型分率 (fu) は、ラット血漿で 15.7%及びヒト血漿で 5.0% (表 2.6.4.4-2)]。

リオシグアトの主代謝物 M-1 はリオシグアトと同様に、*in vitro* 及び *in vivo* において、sGC 刺激作用を示すが、種々の摘出血管を用いた *in vitro* 試験において、M-1 の血管弛緩作用の強度はリオシグアトの約 1/10 であり (2.6.2.2.3.1.6 参照)、麻酔下のイヌを用いた *in vivo* 試験において、M-1 の血圧低下作用はリオシグアトの約 1/3 であった (2.6.2.2.3.2.5 参照)。臨床用量 (1 日 2.5mg を 3 回) のリオシグアトを投与したときのヒトにおける M-1 の曝露量は、 $C_{\max}$ 111 $\mu\text{g/L}$ ($C_{\max}$, u : 4.0 $\mu\text{g/L}$) 及び AUC(0-24) 2,604 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ [AUC(0-24), u : 93.7 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$]、未変化体の曝露量は、 $C_{\max}$ 203 $\mu\text{g/L}$ ($C_{\max}$, u : 10.1 $\mu\text{g/L}$) 及び AUC(0-24) 4,161 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ [AUC(0-24), u : 206.8 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$] であることから (2.7.2.3.1.6 参照)、M-1 の薬理活性がリオシグアトの 1/3~1/10 と仮定すると、臨床におけるリオシグアトの抗肺高血圧症効果への M-1 の寄与は限定的と考えられる [M-1 の fu は、ヒト血漿で 3.6% (表 2.6.4.8-14)]。

リオシグアトは心血管系に広く作用する機序を持つため、種々の高血圧症モデルを用いて、リオシグアトが心臓及び腎臓などに及ぼす影響を検討した。まず、リオシグアトは高レニン性モデル (L-NAME 摂取させたレニン遺伝子導入ラット) や低レニン性モデル (5/6 腎摘出ラット) の生存率を改善し、心臓及び腎障害を軽減した。次に、Dahl 食塩感受性高血圧モデル (食塩を高度に負荷した Dahl 食塩感受性ラット) において、リオシグアトは全身血圧を低下させ、心機能を改善し、生存率も改善した (33%から 85%)。病理組織学的所見から、リオシグアトによる心臓及び腎臓における線維性の組織リモデリングの軽減作用、並びに変性及び炎症性変化の軽減作用がみられた。更に、糖尿病を誘導した eNOS 欠損マウスにおいて、リオシグアトは単独又はテルミサルタンとの併用により全身血圧を低下させ、尿中アルブミン排泄量を軽減した。以上の高血圧症モデルにおける試験成績から、リオシグアトは心臓及び腎障害に対する軽減作用を有することが示された。

リオシグアトは硝酸薬や PDE-5 阻害薬と同様に、NO-sGC-cGMP 経路上で作用する。したがって、リオシグアトとの併用が血行動態に及ぼす影響について、ラット、ウサギ及びイヌを用いて検討した。血圧低下作用がみられる用量の PDE-5 阻害薬 (バルデナフィル又はシルデナフィル) と併用すると、血圧低下作用、反射性頻脈は共に増強されたが、重大な低血圧や頻脈はみられなかった。硝酸薬 (ニトログリセリン) との併用によっても血圧低下作用は増強された。

安全性薬理試験では、リオシグアト及びその主代謝物 M-1 が生命維持に重要な器官系 (中枢神経系、心電図を含む心血管系、呼吸器系) 及びその他の器官・機能 (胃腸管系、腎機能、糖・脂質代謝、血液及び血液凝固系) に及ぼす影響を、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。

ラット及びイヌにおいて、リオシグアトを最高用量 (ラット : 3mg/kg、イヌ : 0.3mg/kg) で投与したときのリオシグアトの $C_{\max}$, u (表 2.6.2.4-1) は、臨床用量 (1 日 2.5mg を 3 回) のリオシグアトを投与したときのヒトの $C_{\max}$, u (10.1 $\mu\text{g/L}$) に比し約 2 倍であった。ラット及びイヌにリオシグアトをこれら最高用量で投与すると、顕著な血管拡張作用と共に逆調節性反射 (心拍数増加など) が生じたため、安全性薬理試験を当該最高用量を超える用量で検討する意義は小さいと判断した。また、リオシグアトを最高用量でラット及びイヌに投与したときの M-1 の $C_{\max}$, u (表 2.6.2.4-1) は、臨床用量のリオシグアトを投与したときのヒトでの M-1 の $C_{\max}$, u (4.0 $\mu\text{g/L}$) と比較すると、イヌ (4.04~6.91 $\mu\text{g/L}$) ではほぼ同等であったが、ラット (0.78 $\mu\text{g/L}$) では低かった。しかし、M-1 を投与した試験において、ラット及びイヌにおける M-1 の $C_{\max}$, u はそれぞれ 127 $\mu\text{g/L}$ (2.6.2.4.5.4 参照) 及び 26 $\mu\text{g/L}$ (2.6.2.4.5.2.2 参照) であり、これらはヒトにおける M-1 の $C_{\max}$, u (4.0 $\mu\text{g/L}$) の 6 倍 (イヌ) ~30 倍 (ラット) に相当した。

安全性薬理試験でみられたリオシグアトによる作用は、主に、心血管系に対するリオシグアトの薬理作用機序に起因するものと考えられた。リオシグアトは用量依存的に血管を拡張させ、動脈圧の低下作用を示した。血管拡張作用の閾値用量は、麻酔下のイヌでは 0.03mg/kg、覚醒下のイヌでは 0.05mg/kg、及び覚醒下のラットでは 0.5mg/kg であった。これらの血管拡張作用には心拍数の増加を伴った。麻酔下のイヌにおいて、詳細に検討したところ、心室前負荷（左室拡張終期圧）及び後負荷（全末梢血管抵抗）の軽減、並びに反射性の交感神経活性化による心拍数及び心収縮性の増加に伴う心拍出量の増加がみられた。また、M-1 についても安全性薬理試験で検討したところ、約 3 倍の用量でリオシグアトとほぼ同等の薬理作用を示した。

ヒトにおける QT 間隔延長リスクの可能性を検討するために、hERG アッセイ及び心筋活動電位アッセイによる *in vitro* 試験、並びにビーグル犬を用いた QT 及び QTc 間隔試験を実施した。覚醒下及び麻酔下のイヌの心電図において、QRS 間隔に影響はみられなかったが、PQ 及び QT 間隔は心拍数の顕著な増加に伴い短縮した。心拍数の変化について、QT 間隔を補正するために、Bazett 式 (QTcB)、Fridericia 式 (QTcF)、及び van de Water 式 (QTcV) を用いた。QTcB 間隔には延長がみられ、それよりは程度が小さいものの、QTcF 間隔にも延長がみられた。しかし、van de Water 式により補正した QTcV 間隔には影響はみられなかった。Bazett 式及び Fridericia 式は心拍数が高い場合には、QT 間隔を過剰に補正する傾向があることが知られているため、ビーグル犬については特に van de Water 式を用いた QT 間隔の補正が適切であると考えられた^{8), 9), 10), 11)}。したがって、観察された QTcB 及び QTcF 間隔の軽度な延長は、リオシグアトによる影響ではなく、不十分な補正計算によるアーチファクトであると結論される。これらの *in vivo* 試験の結果は、*in vitro* 試験において、リオシグアトの hERG カリウム電流及び心筋活動電位に対する作用が弱かったことから支持される。また、M-1 の hERG カリウム電流及び心筋活動電位に対する作用は弱く、ビーグル犬において、ヒトの $C_{max,u}$ に比し 6 倍高い濃度でも QTc 間隔の延長はみられなかった。以上のことから、ヒトにリオシグアトの臨床推奨用量を投与後、催不整脈作用が生じる可能性は低いと考えられる。

心血管系以外にみられたリオシグアトの作用は、リオシグアトの作用機序である平滑筋弛緩作用もしくはそれに続発したものと考えられる。すなわち、胃腸管運動能の用量依存的な抑制作用は平滑筋弛緩作用に起因し、また電解質排泄量の変化を伴わない尿量の減少、ヘマトクリット値及びヘモグロビンの減少は血管拡張作用に続発する血管内容積の増大（血液希釈）に起因したものと考えられ、更に、血糖値の上昇は血管拡張作用に続発する交感神経活性化に起因したものと考えられる。

リオシグアトは呼吸及び肺機能、脂質代謝、白血球数、血小板数及び血液凝固に対して影響を及ぼさなかった。ラットにおいて、熱に対する侵害受容反応時間の軽度の延長がみられたことを除き、中枢神経系（行動、体温、痙攣誘発作用／抗痙攣作用）に対する影響はみられなかった。熱に対する侵害受容反応時間の軽度の延長について、リオシグアトによる当該鎮痛作用に対する機序は不明であるものの、その程度は軽度であったことから、生理学的な意義は小さいものと考えられる。

リオシグアトは *in vitro* において臨床的に意義のある濃度では血小板凝集を阻害しなかった。すなわち、*in vitro* での血小板凝集阻害作用は 2 桁の μM 濃度でみられたが、この濃度は前述したヒトにおける $C_{max,u}$ 値の 1,000 倍を超える濃度に相当する。また、リオシグアト 30mg/kg をマウスに経口投与した *in vivo* 試験において、媒体投与群に比し 2 倍未満の出血時間の延長がみられたが（2.6.2.3.2.1 参照）、3mg/kg をラットに投与した試験においては統計学的に有意な出血時間の延長はみられなかった（2.6.2.4.4.3.2 参照）。リオシグアトをリバーロキサバン、クロピドグレル又は iloprost と併用したとき、ラットの出血時間は延長しなかったが、アスピリンと併用したとき、出血時間は延長した（2.6.2.5.2 参照）。前述したように、*in vitro* におけるリオシグアトの血小板凝集に及ぼす影響を検討した試験成績より、*in vivo* において、リ

オシグアトが抗血小板活性を発揮する可能性は低いと考えられる。マウスにおいてみられたリオシグアト単独での出血時間の延長、及びラットにおいてみられたアスピリンとの併用による出血時間の延長については、その機序は不明である。しかし、健康被験者において、リオシグアトとアスピリンの併用により、薬力学的及び薬物動態学的な相互作用はみられなかった(2.7.2.2.3.3.2 参照)。

以上のことから、新規の sGC 刺激薬リオシグアトは、cGMP 産生を促進し、血管拡張作用をはじめとして、肺血管リモデリング抑制作用や右室肥大軽減作用などにより、種々の肺高血圧症の動物モデルに対し肺高血圧症の改善効果を示すことが明らかとなった。安全性薬理試験において、リオシグアトの血管拡張作用による心血管系への顕著な作用がみられたものの、そのほかにみられた作用については、その程度が軽度であるため、生理学的な意義が小さいもの、もしくは作用機序である血管拡張作用又は平滑筋弛緩作用に起因したものと考えられる。したがって、リオシグアトに関する非臨床薬理試験で明らかとなった効力、特異性及び安全性に関する薬理学的プロファイルから、リオシグアトは肺高血圧症に対する安全かつ有効な経口治療薬となることが期待される。

2.6.2.7 引用文献一覧

- 1) Evgenov OV et al., Nat Rev Drug Discov 2006:5:755-768 (4.3.28 添付)
- 2) Stasch JP et al., Handb Exp Pharmacol 2009:191:277-308 (4.3.29 添付)
- 3) Stasch JP et al., Circulation 2011:123:2263-2273 (4.3.68 添付)
- 4) Mittendorf J et al., ChemMedChem 2009:4:853-865 (4.3.69 添付)
- 5) Schermuly RT et al., Expert Opin Investig Drugs 2011:20:567-576 (4.3.70 添付)
- 6) Stasch JP et al., Handb Exp Pharmacol 2013 (4.3.71 添付)
- 7) FDA. Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites, Feb 2008, Pharmacology and Toxicology (4.3.76 添付)
- 8) Hanson LA et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2006:54:116-129 (4.3.72 添付)
- 9) Hanton G et al., Toxicology Methods 2001:11:21-40 (4.3.73 添付)
- 10) Miyazaki H et al., Exp Anim 2002:51:465-475 (4.3.74 添付)
- 11) Tattersall ML et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2006:53:11-19 (4.3.75 添付)

2.6.3.1. 薬理試験： 一覧表

試験一覧表は、2.6.3.2、2.6.3.3、2.6.3.4 及び 2.6.3.5 を参照。

2. 6. 3. 2. 効力を裏付ける試験

別途記載のない限り、すべての試験は Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Germany で行なわれた。

Test article: **Riociguat**

Primary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration/ Doses	Report No. /Reference	Location in CTD
Isolated soluble guanylate cyclase	<i>In vitro</i>		0.01 - 100 µM	Eur Respir J 2008-32-881 ^b PH-36760	4.2.1.1.1 4.2.1.1.2
sGC overexpressing cells	<i>In vitro</i>		0.003 - 10 µM 0.8 nM - 25 µM	PH-33399 PH-34153	4.2.1.1.3 4.2.1.1.4
Vascular endothelial cells	<i>In vitro</i>		0.001 - 3 µM	PH-36780	4.2.1.1.5
Inhibition of human coronary smooth muscle cell migration	<i>In vitro</i>		0.1 nM - 10 µM	PH-34613	4.2.1.1.6
Isolated vessels and tissues	<i>In vitro</i>		0.1 ng/mL - 10 µg/mL	PH-32925	4.2.1.1.7
Nitrate-tolerant vessels	<i>In vitro</i>		0.1 ng/mL - 10 µg/mL	PH-32924	4.2.1.1.8
Langendorff-perfused hearts	<i>In vitro</i>		0.001 - 1 µM	PH-34810	4.2.1.1.10
Hemodynamic effects in anesthetized rats	Rat	Intravenous & oral	Intravenous: 3, 10, 30, 100 µg/kg Oral: 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg	PH-33089	4.2.1.1.11
Hemodynamic effects in conscious spontaneously hypertensive rats	Rat	Oral	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg	PH-34520	4.2.1.1.12
Hemodynamic effects in anesthetized dogs	Dog	Intravenous	0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µg/kg	PH-33863	4.2.1.1.13
Multiple administrations in spontaneously hypertensive rats	Rat	Oral	0.3, 1 mg/kg	PH-34731	4.2.1.1.14
Hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice	Mouse	Oral	10 mg/kg	Eur Respir J 2008-32-881 ^b	4.2.1.1.1
Monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats	Rat	Oral	10 mg/kg	Eur Respir J 2008-32-881 ^b	4.2.1.1.1
Pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats	Rat	Oral	10 mg/kg	PLoS One 2012-7-e43433 ^a	4.2.1.1.15

^a External study (University of Giessen, Germany)

^b External and internal study (External: University of Giessen, Germany)

2. 6. 3. 2. 効力を裏付ける試験（続き）

Test article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Primary Pharmacodynamics - Overview**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration/ Doses	Report No. / Reference	Location in CTD
Isolated soluble guanylate cyclase	<i>In vitro</i>		0.001 - 10 μ M	PH-34506	4.2.1.1.16
sGC overexpressing cells	<i>In vitro</i>		0.8 nM - 25 μ M	PH-34152	4.2.1.1.17
Inhibition of coronary artery smooth muscle cells migration	<i>In vitro</i>		0.1 nM - 10 μ M	PH-34614	4.2.1.1.18
Isolated vessels	<i>In vitro</i>		0.1 ng/mL - 10 μ g/mL	PH-34466	4.2.1.1.19
Nitrate-tolerant vessels	<i>In vitro</i>		10 ng/mL - 10 μ g/mL	PH-34467	4.2.1.1.20
Langendorff-perfused hearts	<i>In vitro</i>		0.01 - 1 μ M	PH-34414	4.2.1.1.21
Comparison of riociguat and its main metabolite BAY 60-4552 in isolated vessels	<i>In vitro</i>		1 ng/mL - 10 μ g/mL	PH-33853	4.2.1.1.22
Anesthetized rats	Rat	Intravenous & oral	Intravenous: 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg Oral: 0.3, 1, 3, 10 mg/kg	PH-33907	4.2.1.1.23
Hemodynamics in spontaneously hypertensive rats	Rat	Oral	0.3, 1, 3 mg/kg	PH-34499	4.2.1.1.24
Hemodynamics in anesthetized dogs	Dog	Intravenous	3, 10, 30, 100 μ g/kg	PH-34212	4.2.1.1.25
	Dog	Intravenous	3, 10, 30, 100 μ g/kg	PH-34220	4.2.1.1.26
Multiple administrations in spontaneously hypertensive rats	Rat	Oral	10, 30 mg/kg	PH-35139	4.2.1.1.27
Comparison of riociguat and its main metabolite BAY 60-4552 in anesthetized dogs	Dog	Intravenous	100 μ g/kg	PH-34180	4.2.1.1.28

2.6.3.3. 副次的薬理試験

別途記載のない限り、すべての試験は Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Germany で行なわれた。

Test article: **Riociguat**

Secondary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration/ Doses	Report No./ Reference	Location in CTD
Selectivity in enzyme and radioligand binding assays	<i>In vitro</i>		0.08 - 10 µM 0.3 nM - 30 µM 0.3 nM - 30 µM 10 µM	PH-35059 PH-36560 PH-36565 PH-33317 ^a	4.2.1.2.1 4.2.1.2.2 4.2.1.2.3 4.2.1.2.4
Adverse event profiling	<i>In vitro</i>		10 µM	PH-35420 ^a	4.2.1.2.5
Effects on platelets	<i>In vitro</i>		30 µM	PH-35419 ^a	4.2.1.2.6
	<i>In vitro</i>		0.03 - 10 µM	PH-33141	4.2.1.2.7
	<i>In vitro</i>		2 - 237 µM	PH-36601	4.2.1.2.8
Effects on isolated guinea pig atria	<i>In vitro</i>		10 µM	PH-36514 ^a	4.2.1.2.9
Adverse event profiling	Mouse, rat, guinea pig	Oral	30 mg/kg	PH-35419 ^a	4.2.1.2.6
Anti-atherosclerotic effects	Mouse	Oral	300 ppm	PH-33296	4.2.1.2.10
Diabetic nephropathy in diabetic eNOS knockout mice on top of angiotensin II receptor blockade	Mouse	Oral	3 mg/kg	PLoS One 2012-7-e42623 ^b	4.2.1.2.11
Effects on bleeding time	Rat	Oral	0.3, 1, 3 mg/kg	PH-33141	4.2.1.2.7
18-day study in L-NAME-treated renin transgenic rats (high-renin model)	Rat	Oral	3, 10 mg/kg	J Hypertens 2010-28-1666 ^b	4.2.1.1.9
18-week study in 5/6 nephrectomized rats (low-renin model)	Rat	Oral	300 ppm	J Hypertens 2010-28-1666 ^b	4.2.1.1.9
Fibrotic tissue remodeling and survival in salt-sensitive Dahl rats	Rat	Oral	3, 10 mg/kg	PLoS One 2011-6-e21853	4.2.1.2.12
Erectile response in conscious rabbit model	Rabbit	Oral	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg	PH-32390	4.2.1.2.13

^a External study [REDACTED], Taiwan, PH-36514: [REDACTED], Taiwan)

^b External and internal study (External: University of Potsdam, Germany)

2.6.3.3. 副次の薬理試験（続き）

Test article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Secondary Pharmacodynamics - Overview**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration/ Doses	Report No./ Reference	Location in CTD
Selectivity in enzyme and radioligand binding assays	<i>In vitro</i>		10 µM	PH-34540 ^a	4.2.1.2.14
			0.3 nM - 30 µM	PH-36724	4.2.1.2.15
			0.3 nM - 30 µM	PH-36725	4.2.1.2.16
			0.08 - 10 µM	PH-35060	4.2.1.2.17
Adverse event profiling	<i>In vitro</i>		30 µM	PH-34541 ^a	4.2.1.2.18
Effects on platelets	<i>In vitro</i>		0.01 - 1000 µM	PH-36784	4.2.1.2.19
	<i>In vitro</i>		0.03 - 10 µM	PH-34507	4.2.1.2.20
Adverse event profiling	Mouse, rat guinea pig	Oral	30 mg/kg	PH-34541 ^a	4.2.1.2.18

^a External study ([REDACTED], Taiwan)

2.6.3.4. 安全性薬理試験

別途記載のない限り、すべての試験は Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Germany で行なわれた。

Test Article: **Riociguat**

Safety Pharmacology - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report No.	Location in CTD
Effects on hERG K ⁺ current	Transfected CHO cells	<i>In vitro</i>		R-8313	4.2.1.3.1
Effects on duration and shape of action potential	Isolated rabbit Purkinje fibers	<i>In vitro</i>	Bayer HealthCare AG	PH-32778	4.2.1.3.2
Effects on ileal contractility	Isolated guinea pig ileum	<i>In vitro</i>	Bayer HealthCare AG	PH-33290	4.2.1.3.3
Effects on cardiovascular and respiratory system	Anesthetized dog	Intraduodenal	Bayer HealthCare AG	PH-33352 PH-33352A	4.2.1.3.4
Effects on cardiovascular system	Conscious dog	Oral	Bayer HealthCare AG	PH-35276	4.2.1.3.5
Effects on cardiovascular system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	A48371	4.2.1.3.6
Effects on central nervous system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-33270 PH-33241	4.2.1.3.7 4.2.1.3.8
Effects on renal/urinary system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-33301	4.2.1.3.9
Effects on gastrointestinal system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-33277	4.2.1.3.10
Effects on glucose and lipid metabolism	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-33278 PH-33301	4.2.1.3.11 4.2.1.3.9

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）Test Article: **Riociguat****Safety Pharmacology - Overview**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report No.	Location in CTD
Effects on blood cell parameter and coagulation	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-33301	4.2.1.3.9
Effects on bleeding time	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-36050	4.2.1.3.12

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Safety Pharmacology - Overview**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report No.	Location in CTD
Effects on hERG K ⁺ current	Transfected HEK293 cells	<i>In vitro</i>	Bayer HealthCare AG	PH-33844	4.2.1.3.13
Effects on duration and shape of action potential	Isolated rabbit Purkinje fibers	<i>In vitro</i>	Bayer HealthCare AG	PH-34361	4.2.1.3.14
Effects on ileal contractility	Isolated guinea pig ileum	<i>In vitro</i>	Bayer HealthCare AG	PH-34744	4.2.1.3.15
Effects on cardiovascular and respiratory system	Anesthetized dog	Intraduodenal	Bayer HealthCare AG	PH-34551	4.2.1.3.16
Effects on cardiovascular system	Conscious dog	Oral	Bayer HealthCare AG	PH-35131	4.2.1.3.17
Effects on respiratory system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-34478	4.2.1.3.18
Effects on central nervous system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-34423 PH-34424	4.2.1.3.19 4.2.1.3.20
Effects on renal/urinary system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-34495	4.2.1.3.21
Effects on gastrointestinal system	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-34425	4.2.1.3.22
Effects on glucose and lipid metabolism	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-34426 PH-34495	4.2.1.3.23 4.2.1.3.21
Effects on blood cell parameter and coagulation	Rat	Oral (gavage)	Bayer HealthCare AG	PH-34495	4.2.1.3.21

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）Test Article: **Riociguat****Safety Pharmacology - *In-vitro* studies**

Organ Systems Evaluated	Test system	Concentration	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Electrophysiology						
hERG K ⁺ current	Transfected CHO cells	0 - 0.1 - 1 - 10 µM	None	No	R-8313	4.2.1.3.1
Duration and shape of action potential	Isolated rabbit Purkinje fibers	0 - 0.1 - 1 - 10 µM	Small (>10%) prolongation of APD ₉₀ at 10 µM	No	PH-32778	4.2.1.3.2
Smooth muscle contractility						
Ileal contractions	Isolated guinea pig ileum	10 ⁻⁷ g/mL -10 ⁻⁶ g/mL	Acetylcholine-mediated contraction reduced at 10 ⁻⁶ g/mL	Yes	PH-33290	4.2.1.3.3

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）

Test Article: Riociguat

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Central nervous system								
Behavioral and physiological state	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (6)	None	Yes	PH-33270	4.2.1.3.7
Psychomotoric activity (open field test)				male (6)	None			
Body temperature				male (6)	None			
Anti- / pro-convulsive effect (pentylene-tetrazole threshold test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (6-7)	None	Yes	PH-33241	4.2.1.3.8
Nociceptive responsiveness (hot plate test)				male (8)	Increase in latency to nocifensive response at 3 mg/kg			
Duration of hexobarbital-induced anesthesia				male (5-7)	None			

a single dose unless specified otherwise

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）

Test Article: Riociguat

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Cardiovascular and respiratory system								
Cardio-Hemodynamics, ECG	Dog/ Beagle ^b	Intra-duodenal	0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3	male & female (3)	Vasodilation (TPR: -44%), reflex-tachycardia (49%) and LV dP/dt increase (45%). Slight decrease in LVEDP. Threshold dose for cardiovascular effects: 0.03 mg/kg. ECG: no substantial effects	Yes	PH-33352 PH-33352A	4.2.1.3.4 4.2.1.3.4
Blood pressure, heart rate, ECG	Dog/ Beagle	Oral	0, 0.05, 0.1, 0.3	male & female (5)	Dose-dependent blood pressure reduction (up to 25%), reflex tachycardia starting at 0.1 mg/kg ECG: no substantial effects	Yes	PH-35276	4.2.1.3.5
Blood pressure, heart rate, ECG	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.5, 1, 3	female (4)	Dose-dependent long lasting blood pressure reduction (up to 23%), reflex tachycardia, starting at 0.5 mg/kg. ECG: no effects	No	A48371	4.2.1.3.6

a single dose unless specified otherwise

b anesthetized dogs

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）

Test Article: Riociguat

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Respiratory system								
Lung mechanics, blood gases	Dog/ Beagle ^b	Intra-duodenal	0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3	male & female (3)	None	Yes	PH-33352 PH-33352A	4.2.1.3.4 4.2.1.3.4
Renal / urinary system								
Urine volume, electrolyte excretion	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (10)	Electrolyte excretion unaffected, urine volume decreased at 3 mg/kg	Yes	PH-33301	4.2.1.3.9
Gastrointestinal system								
Gastrointestinal motility	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (5)	Inhibition (up to 29%) of intestinal transport at 1 and 3 mg/kg	Yes	PH-33277	4.2.1.3.10
Metabolism								
Blood glucose	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (6)	Increase in fasted (30%) and fed rats (13%) at 3 mg/kg	Yes	PH-33278	4.2.1.3.11
Lipid metabolism	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (10)	None	Yes	PH-33301	4.2.1.3.9

a single dose unless specified otherwise

b anesthetized dogs

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）

Test Article: Riociguat

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Blood								
Blood cell counts, hemoglobin, coagulation	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (10)	No effects on coagulation, number of leukocytes and platelets, reduction (11-12%) of number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, no hemolysis	Yes	PH-33301	4.2.1.3.9
Bleeding time	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 0.3, 1, 3	male (11-12)	No substantial effects	No	PH-36050	4.2.1.3.12

^a single dose unless specified otherwise

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Safety Pharmacology - *In-vitro* studies**

Organ Systems Evaluated	Test system	Concentration	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Electrophysiology						
hERG K ⁺ current	Transfected HEK293 cells	0 - 1 - 10 - 100 µM	IC ₅₀ 57 µM	No	PH-33844	4.2.1.3.13
Duration and shape of action potential	Isolated rabbit Purkinje fibers	0 - 1 - 10 - 50 µM	Prolongation (23%) of APD ₉₀ and triangulation at 50 µM	No	PH-34361	4.2.1.3.14
Smooth muscle contractility						
Ileal contractions	Isolated guinea pig ileum	0.5 - 5 µM	Acetylcholine-mediated contraction reduced at 5 µM	Yes	PH-34744	4.2.1.3.15

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Safety Pharmacology - *In-vivo* studies**

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Central nervous system								
Behavioral and physiological state Psychomotoric activity (open field test) Body temperature	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (6)	Reduced muscle tone, irregular breathing, ptosis at 10 mg/kg Hypoactivity at 10 mg/kg Reduced body temperature at 10 mg/kg	Yes	PH-34423	4.2.1.3.19
Anti- / pro-convulsive effect (pentylentetrazole threshold test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (5-7)	None	Yes	PH-34424	4.2.1.3.20
Nociceptive responsiveness (hot plate test)				male (8)	None			
Duration of hexobarbital-induced anesthesia				male (7-8)	None			

^a single dose unless specified otherwise

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）

Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Safety Pharmacology - *In-vivo* studies**

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Cardiovascular and respiratory system								
Cardio-Hemodynamics, ECG	Dog/ Beagle ^b	Intra-duodenal	0, 0.1, 0.3, 1	male & female (3)	Vasodilation (TPR: -42%), reflex-tachycardia (18%) and LV dP/dt increase (38%), decrease in LVEDP starting at 0.3 mg/kg. ECG: no substantial effects	Yes	PH-34551	4.2.1.3.16
Blood pressure, heart rate, ECG	Dog/ Beagle	Oral	0, 0.15, 0.5, 1.5	male & female (5)	Dose-dependent blood pressure reduction (up to 27%), reflex tachycardia starting at 0.5 mg/kg ECG: no substantial effects	Yes	PH-35131	4.2.1.3.17
Respiratory system								
Lung mechanics, blood gases	Dog/ Beagle ^b	Intra-duodenal	0, 0.1, 0.3, 1	male & female (3)	None	Yes	PH-34551	4.2.1.3.16
Respiratory function	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	female (6)	Slight increase in respirations rate at 10 mg/kg	Yes	PH-34478	4.2.1.3.18

a single dose unless specified otherwise; b anesthetized dogs

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）

Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Safety Pharmacology - *In-vivo* studies**

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Renal / urinary system Urine volume, electrolyte excretion	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (10)	Electrolyte excretion unaffected, urine volume decreased at 10 mg/kg	Yes	PH-34495	4.2.1.3.21
Gastrointestinal system Gastrointestinal motility	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (5)	Inhibition of intestinal transport starting at 1 mg/kg	Yes	PH-34425	4.2.1.3.22
Metabolism Blood glucose	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (6)	Increase in fasted rats (<40%) at 10 mg/kg, in fed rats (<20%) at 1 mg/kg	Yes	PH-34426	4.2.1.3.23
Lipid metabolism	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (10)	None	Yes	PH-34495	4.2.1.3.21

a single dose unless specified otherwise

2.6.3.4. 安全性薬理試験（続き）Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Safety Pharmacology - *In-vivo* studies**

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses ^a [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Report No.	Location in CTD
Blood Blood cell counts, hemoglobin, coagulation	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0, 1, 3, 10	male (10)	No effects on coagulation, number of leukocytes and platelets, reduction (9-11%) of number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, no hemolysis	Yes	PH-34495	4.2.1.3.21

a single dose unless specified otherwise; b anesthetized dogs

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

別途記載のない限り、すべての試験は Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Germany で行なわれた。

Test Article: **Riociguat**

Pharmacodynamic interactions - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration/ Doses	Report No./ Reference	Location in CTD
Interaction with PDE5 inhibitor vardenafil in anesthetized rats	<i>In vivo</i>	Intravenous	0.1, 0.3, 1, 3 µg/kg/min	PH-34819	4.2.1.4.1
Interaction with PDE5 inhibitor vardenafil in conscious spontaneously hypertensive rats	<i>In vivo</i>	Oral	0.1, 0.3 mg/kg	PH-35570	4.2.1.4.2
Interaction with PDE5 inhibitor sildenafil in anesthetized dogs	<i>In vivo</i>	Intravenous	3, 10, 30, 100 µg/kg	PH-35443	4.2.1.4.3
Interaction with organic nitrates in anesthetized dogs	<i>In vivo</i>	Intravenous	60 µg/kg/h	PH-33852	4.2.1.4.4
Acute effects of sildenafil and riociguat on U46619-induced PAH in intact animals	<i>In vivo</i>	Oral	1, 10 mg/kg	Eur Respir J 2008-32-881 ^b	4.2.1.1.1
Interaction with rivaroxaban, iloprost, clopidogrel and ASA in rat tail transection bleeding time model	<i>In vivo</i>	Oral	0.5, 3 mg/kg	PH-36185 Version 2	4.2.1.4.5

^b External and internal study (External: University of Giessen, Germany)

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験（続き）

Test Article: **Metabolite M-1 (BAY 60-4552)****Pharmacodynamic interactions - Overview**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration/ Doses	Report No.	Location in CTD
Interaction with PDE5 inhibitor vardenafil in anesthetized rats	<i>In vivo</i>	Intravenous	1, 3, 10 µg/kg/min	PH-35040	4.2.1.4.6
Interaction with organic nitrates in anesthetized dogs	<i>In vivo</i>	Intravenous	50 µg/kg/h	PH-34262	4.2.1.4.7
Interaction with PDE5 inhibitor vardenafil on the erectile responses in anesthetized rats after bilateral cavernous nerve crush injury	<i>In vivo</i>	Intravenous	0.03, 0.3 mg/kg	PH-35847	4.2.1.4.8
Interaction with PDE5 inhibitor vardenafil for the treatment of PDE5-resistant erectile dysfunction	<i>In vivo</i>	Oral	0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg	PH-35848	4.2.1.4.9
Interaction with PDE5 inhibitor vardenafil on the erectile responses in anaesthetized, L-NAME treated rats	<i>In vivo</i>	Intravenous	0.01, 0.03, 0.1 mg/kg	PH-36096 Version 2	4.2.1.4.10