2.4　非臨床試験の概括評価の目次

2.4.1　非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1　薬理試験 5
2.4.1.2　薬物動態試験 5
2.4.1.3　毒性試験 5
2.4.2　薬理試験 6
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 6
2.4.2.1.1　*In vitro* 試験 6
2.4.2.1.2　*In vivo* 試験 6
2.4.2.2　単一ジアステレオ異性体の効力薬理試験 7
2.4.2.3　安全性薬理試験 7
2.4.3　薬物動態試験 8
2.4.3.1　吸収 8
2.4.3.2　分布 8
2.4.3.3　代謝 9
2.4.3.4　排泄 10
2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用 11
2.4.4　毒性試験 12
2.4.4.1　単回投与毒性試験 12
2.4.4.2　反復投与毒性試験 13
2.4.4.3　トキシコキネティクス 13
2.4.4.4　遺伝毒性試験 14
2.4.4.5　がん原性試験 14
2.4.4.6　生殖発生毒性試験 14
2.4.4.7　局所刺激性試験 15
2.4.4.8　その他の毒性試験 15
2.4.5　総括及び結論 16
2.4.6　参考文献一覧 19

略語一覧

略号	英語名称	日本語名称
ADP	adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
APD_x	action potential duration at x% repolarization	x%再分極時の活動電位持続時間
ASA	active systemic anaphylaxis	全身性アナフィラキシー
AUC	area under the concentration	血漿（清）中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area Under the Concentration from 0 to 24 hours after administration	投与0～24時間までの血漿（清）中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0-tlast}$	Area Under the Concentration from 0 to last data point after administration	投与0～最終採血時間までの血漿（清）中濃度-時間曲線下面積
BDC	bile duct cannulated	胆管カニュレーション
BSA	bovine serum albumin	牛血清アルブミン
cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate	環状アデノシン3',5'-一リン酸
cDNA	complementary DNA	相補的DNA
CL	Clearance	クリアランス
CL_{total}	total clearance	総クリアランス
CO	cardiac output	心拍出量
C_{max}	maximum drug concentration in plasma	最高血漿（清）中濃度
CPK	creatinine phosphokinase	クレアチンホスホキナーゼ
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
D_L	achieved dose level	到達濃度
DP	prostaglandin D_2 receptor	PGD_2受容体
Ec	actual chamber concentration	チェンバー内実濃度
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immune-sorbent assay	酵素免疫測定法
EP	prostaglandin E_2 receptor	PGE_2受容体
F	absolute bioavailability	絶対バイオアベイラビリティ
f_{abs}	fraction of administered dose absorbed	吸収率
FP	prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor	$PGF_{2\alpha}$受容体
GC/MS	gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
GI tract	gastro-intestinal tract	胃腸管
GSD	geometric standard deviation	幾何標準偏差
HPLC	high performance liquid chromatography	液体クロマトグラフィー
IC_{50}	concentration required for 50% inhibition	50%阻害濃度
IP	PGI_2 receptor	PGI_2受容体
IV	Intravenous	静脈内
LOQ	Limit of quantitation	定量下限
LPS	lipopolysaccharide	リポポリサッカライド
LSC	Liquid scintillation counting	液体シンチレーション計測
MAP	mean systemic arterial pressure	平均全身血圧
MPAP	mean pulmonary arterial pressure	平均肺動脈圧
MMAD	mass median aerodynamic diameter	-

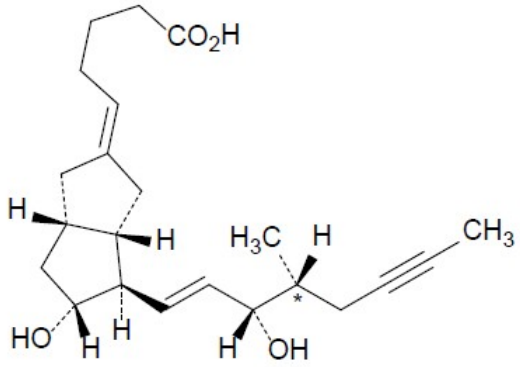
略語一覧（続き）

略号	英語名称	日本語名称
MoE	multiple of exposure/clinical dose	臨床曝露量/臨床用量との比
MV	minute volume	分時容量
NA 又は N/A	not applicable	該当せず
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴分析
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
PAH	pulmonary arterial hypertension	肺動脈性肺高血圧症
PAP	pulmonary artery pressure	肺動脈圧
PCA	passive cutaneous anaphylaxis	受動皮膚アナフィラキシー
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板由来成長因子
PGI_2	prostaglandin I_2	プロスタグランジン I_2
PO	per os	経口
PVR	pulmonary vascular resistance	肺血管抵抗
QCS	quality control sample	QC 試料
RIA	radio-immuno-assay	ラジオイムノアッセイ
SVR	systemic vascular resistance	全身血管抵抗
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
$t_{1/2x}$	elimination half-life in x-phase	第 x 相における消失半減期
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
t_{max}	time to reach C_{max}	最高血漿中濃度到達時間
TP	thromboxane A_2 receptor	トロンボキサン A_2 受容体
V_{dss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
V_{max}	-	最大立ち上がり速度

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

イロプロストは、天然プロスタサイクリン〔プロスタグランジン（PG）I_2〕の化学的に安定な誘導体である。イロプロストは 4R-及び 4S-メチル-ジアステレオ異性体（以下、4R 体及び 4S 体）が[redacted]比で含まれる混合物である（4R 体及び 4S 体が [redacted]：[redacted] の比で含まれる混合物）。化学構造を図 2.4.1- 1に示す。



及び C*位エピマー

図 2.4.1- 1　イロプロストの化学構造

イロプロストは PGI_2 受容体（IP）に対し高い結合親和性を有し、イロプロストが血管平滑筋細胞及び血小板の IP に結合すると、G たん白質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内の環状アデノシン 3',5'-一リン酸（cAMP）産生を促進させることにより、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用を発現する。

イロプロストは（症候性の）肺動脈性肺高血圧症の治療薬（吸入剤）として開発されている。イロプロストは、末梢血管閉塞性疾患及びレイノー症候群に対する静脈内投与又は経口投与による治療薬としての開発が先行した。イロプロストの吸入投与後に認められる薬理作用は肺動脈床の血管拡張に基づくものであり、肺動脈圧や肺血管抵抗を改善する。肺高血圧症患者から得られた薬物動態成績から、イロプロストは吸入投与後、速やかに全身に分布することが示された。臨床でイロプロストを使用する際、吸入投与は静脈内投与よりも有効成分を目的部位に適切に送達できると考えられるが、全身投与後と比較して吸入投与後の全身影響に顕著な差はないと考えられる。

イロプロストは肺動脈性肺高血圧症の吸入治療薬として、EU で 2003 年に、米国で 2004 年にそれぞれ承認された。本邦では未承認薬・適応外検討会議を経て、2010 年に厚生労働省より開発要請を受けた。

2.4.1.1 薬理試験

イロプロストの安全性薬理試験は一般薬理試験（GLP 非準拠）として [redacted]年から [redacted]年にかけて実施し、米国 Berlex 社（現 Bayer Pharma 社）における *in vitro* 電気生理学的試験（心血管系）の 1 試験、及び[redacted]における雌生殖器に及ぼす影響を検討した 2 試験を除いて、ドイツ Schering 社（現 Bayer Pharma 社）で実施した。本邦では 2010 年の厚生労働省からの開発要請に基づき、開発を開始したものの、一般薬理試験の生データは既に廃棄されていたことが判明した。したがって、大学で実施した試験と共に、すべての一般薬理試験報告書を参考資料とした。なお、ドイツ Schering 社及び米国 Berlex 社で実施した試験の生データはいずれも、米国での承認後に廃棄されたことが確認されている。

イロプロストの薬理学的特性は、*in vitro* 試験や種々の実験条件下において、複数の動物種を用いた *in vivo* 試験で検討されている。技術的理由から、イロプロストの薬理作用を検討した *in vivo* 試験の多くは静脈内投与によって実施された。

2.4.1.2 薬物動態試験

非臨床薬物動態試験は、全身投与による初期の開発計画を支持するため、主に静脈内及び経口投与にて実施した。本申請の投与経路である吸入投与時の薬物動態に関しては、ラット吸入投与毒性試験におけるトキシコキネティクスにおいて全身曝露を評価した。*In vitro* においては、血漿たん白結合、代謝、薬物相互作用について検討した。

2.4.1.3 毒性試験

イロプロストに関する毒性試験成績の大半は、げっ歯類（ラット及びマウス）及び非げっ歯類（イヌ、ウサギ又はサル）を用いた静脈内（持続注入）、皮下又は経口（強制経口又は混餌）投与経路で実施されている。ネブライザによるイロプロスト吸入投与時の全身影響に関する安全性は、非経口及び経口投与での毒性試験におけるイロプロストの全身曝露量が、ヒトにおける予定臨床用量の吸入投与後の全身曝露量を上回ることから、非吸入投与経路による毒性試験成績に基づいて評価可能である。

開発早期には主薬成分としてイロプロスト βシクロデキストリン包接化合物を含有する徐放性経口製剤が開発候補薬剤として検討されていたため、一部の経口投与による毒性試験は、被験物質として包接化合物を含有する徐放性製剤を使用した。しかしながら、いずれの剤型や投与経路においても、薬理学的な有効成分はイロプロストであり、毒性試験の投与量はイロプロストとしての用量に換算して評価した。

なお、受託機関にて GLP 適用下に実施された一部の毒性試験 3 報（吸入による反復投与試験 2 報及び *in vitro* 遺伝毒性試験 1 報）の生データが欧米での承認取得後に廃棄されたことから、本邦での承認申請時にはこれらの試験報告書を参考資料とした。

2.4.2 薬理試験

イロプロストの効力を裏付ける試験は、薬理学的プロファイルや作用機序などを検討した *in vitro* 試験や肺高血圧症モデルにおける作用を検討した *in vivo* 試験により評価されている。イロプロストのジアステレオ異性体（4R 体及び 4S 体）の効力薬理試験も実施されている。また、イロプロストの安全性薬理試験は一般薬理試験として実施した（2.6.2 及び 2.6.3 参照）。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

イロプロストの効力を裏付ける試験について、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験のそれぞれを要約する。また、ジアステレオ異性体について同様に記載する。

2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

ヒト PGI_2 受容体を発現させた HEK293 細胞において、イロプロストは PGI_2 受容体に対して高い結合親和性を示した。

ヒト多血小板血漿において、イロプロストは cAMP 産生作用を示し、アデニレートシクラーゼ活性化作用が確認された。また、ヒト肺動脈血管平滑筋細胞において、イロプロストは濃度依存的に cAMP 濃度を上昇させた。

ヒト摘出肺血管におけるヒスタミン及びノルエピネフリン誘発収縮、並びにラット摘出灌流肺における低酸素誘発による肺血管収縮に対し、イロプロストは収縮阻害作用を示した。また、ウサギ摘出腸間膜動脈におけるフェニレフリン誘発収縮に対し、イロプロストは収縮阻害作用を示した。

ヒトの多血小板血漿におけるコラーゲン、アデノシン二リン酸（ADP）又はトロンビン誘発血小板凝集を、イロプロストは抑制した。

牛胎児血清又は血小板由来成長因子（PDGF）-BB により増殖刺激したヒト肺動脈血管平滑筋細胞において、イロプロストは細胞増殖を抑制した。

リポポリサッカライド（LPS）により腫瘍壊死因子（TNF）-αの産生を誘発したヒト単核球において、イロプロストは TNF-α産生を抑制した。

2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

イロプロストの *in vivo* 血行動態に対する作用を、正常動物及び肺高血圧症モデル動物において検討した。

麻酔下のウサギ及びブタにおいて、イロプロストは用量依存的に肺動脈圧及び肺血管抵抗、並びに平均動脈圧及び全身血管抵抗を低下させた。また、麻酔下のラットにおいて、イロプロストは平均動脈圧及び全身血管抵抗を低下させた。

U46619（トロンボキサン A_2 類似体）で誘発した肺高血圧症ウサギモデルにおいて、吸入投与（臨床投与経路）により、イロプロストは肺動脈圧及び肺血管抵抗を低下させた。また、U46619

誘発ブタ肺高血圧症モデルにおいて、イロプロストは肺動脈圧及び肺血管抵抗、並びに平均動脈圧及び全身血管抵抗を低下させた。低酸素で誘発した肺高血圧症イヌモデルにおいて、前投与により、イロプロストは肺動脈圧及び肺血管抵抗の上昇を抑制した。

2.4.2.2 単一ジアステレオ異性体の効力薬理試験

イロプロストのジアステレオ異性体（4R 体及び 4S 体）それぞれについて、血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用が検討された。ウサギ腸間膜動脈血管におけるフェニレフリン誘発収縮に対し、4R 体及び 4S 体は共に収縮阻害作用を示した。また、ラットを用いた *in vivo* 試験において、4R 体及び 4S 体は共に平均動脈圧を低下させた。ヒトの多血小板血漿におけるコラーゲン、ADP 又はトロンビン誘発血小板凝集を、4R 体及び 4S 体はいずれも抑制した。4R 体及び 4S 体における血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用の強度をイロプロスト（4R 体及び 4S 体の混合物）と比較すると、いずれも 4S 体で強く、4R 体で弱かった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験は一般薬理試験として実施し、イロプロストの中枢神経系／自律神経系、心血管系、呼吸器系、腎機能、胃腸管系及び雌性生殖器に及ぼす影響を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。主な所見について以下に記載する。

マウスにおいて、イロプロストによる活動低下、及び中枢神経系／自律神経系への刺激作用がみられた。イロプロストによる過度の血圧低下作用がみられる用量で、中枢神経系に対する影響が認められるものと考えられた。

麻酔下のウサギにおいて、イロプロストによる平均動脈圧の低下（イロプロストの作用機序に起因）がみられた。

イヌのプルキンエ線維／心室筋、及びモルモットの乳頭筋を用いた *in vitro* 試験において、活動電位に対する影響はみられなかった。また、モルモットの拍動摘出心房において、イロプロストは心拍数を増加させたが、心収縮力には影響を及ぼさなかった。

モルモット及びウサギの摘出気管を用いた *in vitro* 試験において、イロプロストによるわずかな収縮作用又はアセチルコリン誘発収縮に対する阻害作用がみられた。ウサギを用いた *in vivo* 試験において、イロプロストによる呼吸数の増加及び呼吸気量の低下がみられた。イロプロストによる過度の血圧低下作用がみられる用量で、呼吸器系に対する影響が認められるものと考えられた。

イロプロストの血圧低下用量において、ラットの尿量、尿中ナトリウム及びカリウム排泄量の低下がみられ、イロプロストの投与終了後には投与前値に回復する傾向がみられた。

モルモットの摘出回腸を用いた *in vitro* 試験において、イロプロストによる収縮作用がみられた。ラットを用いた *in vivo* 試験において、胃腸管運動の抑制作用、止瀉作用及び小腸内貯留抑制作用がみられた。ウサギを用いた *in vivo* 試験においては、ほとんど影響はみられなかった。

イロプロストは、モルモットの摘出子宮において収縮作用を示したが、ヒトの摘出子宮において収縮・弛緩の二相性の作用を示した。ウサギを用いた *in vivo* 試験において、イロプロストは子宮内圧や運動性に影響を及ぼさなかったが、妊娠モルモットにイロプロストを投与すると、流産が誘発された。

2.4.3 薬物動態試験

放射性標識又は非標識のイロプロストをマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びカニクイザルに、種々の経路（経口、静脈内、経皮）で投与し、*in vivo*にて非臨床薬物動態を検討した。また、臨床投与経路である吸入投与時の薬物動態については、毒性試験におけるトキシコキネティックスで得られた全身曝露により評価した。さらに、*in vitro*において、血漿たん白結合、代謝、薬物相互作用の検討を実施した。

2.4.3.1 吸収

イロプロストをラットに吸入投与したとき、吸収は速やかであり、3.6、27.8 及び 48.7μg/kg の用量では全身曝露（$AUC_{0\text{-}tlast}$）はほぼ吸入量に比例し、また、吸入時間に比例して増加した。別試験で 9.15 及び 22.6μg/kg を吸入投与したとき、全身曝露の増加は用量比を下回った。いずれの試験においても、全身曝露に反復投与の影響及び性差は認められなかった。ウサギの摘出灌流肺に吸入投与したとき、イロプロストは速やかに灌流液に移行した。各種動物にイロプロスト静脈内投与後、未変化体は血漿中から急速に消失した。ラットにおいては、終末相における消失は緩慢であったが、これは用いた RIA 法の代謝物に対する交差反応のためと考えられた。マウス、ラット、イヌ及びサルに経口投与したとき、イロプロストは速やかに、かつ完全に吸収されたが、絶対バイオアベイラビリティはマウス、ラット、イヌ及びサルで低く、約 10%であった。サルにおける経皮吸収率は、使用した剤形によって異なるが 1～6%の範囲であった。

イロプロスト及びジアステレオ異性体（4R 体及び 4S 体）の血漿中濃度をラット及びイヌで検討した。ラットにおいて、イロプロスト及びジアステレオ異性体投与後の 4R 及び 4S 体の血漿中濃度推移は類似しており、異性体変換は認められなかった。また、イヌにイロプロスト投与後の 4R 体/4S 体比は、6 時間の注入時間を通して一定であり、4R 体又は 4S 体投与後に異性体変換は認められなかった。

2.4.3.2 分布

ラットに ^{3}H-イロプロストを単回静脈内投与時の臓器・組織への分布を全身オートラジオグラフィー並びに組織計数法により検討した。放射能は投与後、速やかに全身に分布し、もっとも高い放射能濃度は肝臓、腎臓（皮質）及び胃に認められ、次いで肺、心臓、胎盤の放射能濃度が高かった。肝臓、腎臓、肺、筋肉、血漿における放射能濃度の消失半減期は約 45 分であった。検討した臓器・組織において放射能濃度の残留はみられなかった。血液脳関門を通過した放射能はわずかであり、脳中放射能濃度は、最高でも血漿中濃度の約 6%に過ぎなかった。ウサギ及びラットにおいて血液胎盤関門を通過した放射能はわずかであった。妊娠ウサギに ^{3}H-イロプロストを単回静脈内投与 10 分後における最高放射能濃度は、母動物血漿：胎児で 50：1 であった。投与 10 分以降では、胎児における放射能濃度は検出下限未満であった（＜100pg-eq/mL）

ウサギ摘出肺灌流試験において、エアロゾルとして気管支肺胞内に ^{3}H-イロプロストを投与したときの灌流液、気管支肺胞洗浄液、肺ホモジネート中の放射能を測定した。3 時間の灌流終了後、気管肺胞洗浄液からは投与量の 1%未満、肺のホモジネートからは約 5%の放射能が回収されたに過ぎなかった。

ヒト血漿におけるイロプロストのたん白結合率は低く、約 60%であり、主要な結合たん白はアルブミンであった。ラット及びイヌにおいて、^{3}H-イロプロスト投与後の血液中放射能は主に血漿に存在した。

2.4.3.3　代謝

ラットにおいてイロプロストの代謝経路を明らかにした。ラットではイロプロストのカルボキシル側鎖がβ酸化され、ダイノルイロプロスト、テトラノルイロプロストに代謝された。また、テトラノルイロプロストの抱合体及び水酸化体も認められた。マウス及びヒト尿中代謝物組成は、ラットと類似していた。また、イヌ及びサルについても主要な尿中代謝物はテトラノルイロプロストであり、ほかの動物と明らかな差異はみられなかった。*In vitro* でウサギの摘出灌流肺を用いて代謝を検討したところ、^{3}H-イロプロストの添加方法（灌流液に添加又は気管支肺胞内吸入）によらず、代謝物産生のパターンは同じであった。さらに、吸入投与時のバイオアベイラビリティは 63%で、肺における初回通過代謝の寄与は小さいと考えられた。イロプロストは天然型のプロスタグランジン I_2 と同様にβ酸化による代謝を受けた。

イロプロストの推定代謝経路を図 2.4.3.3- 1に示す。

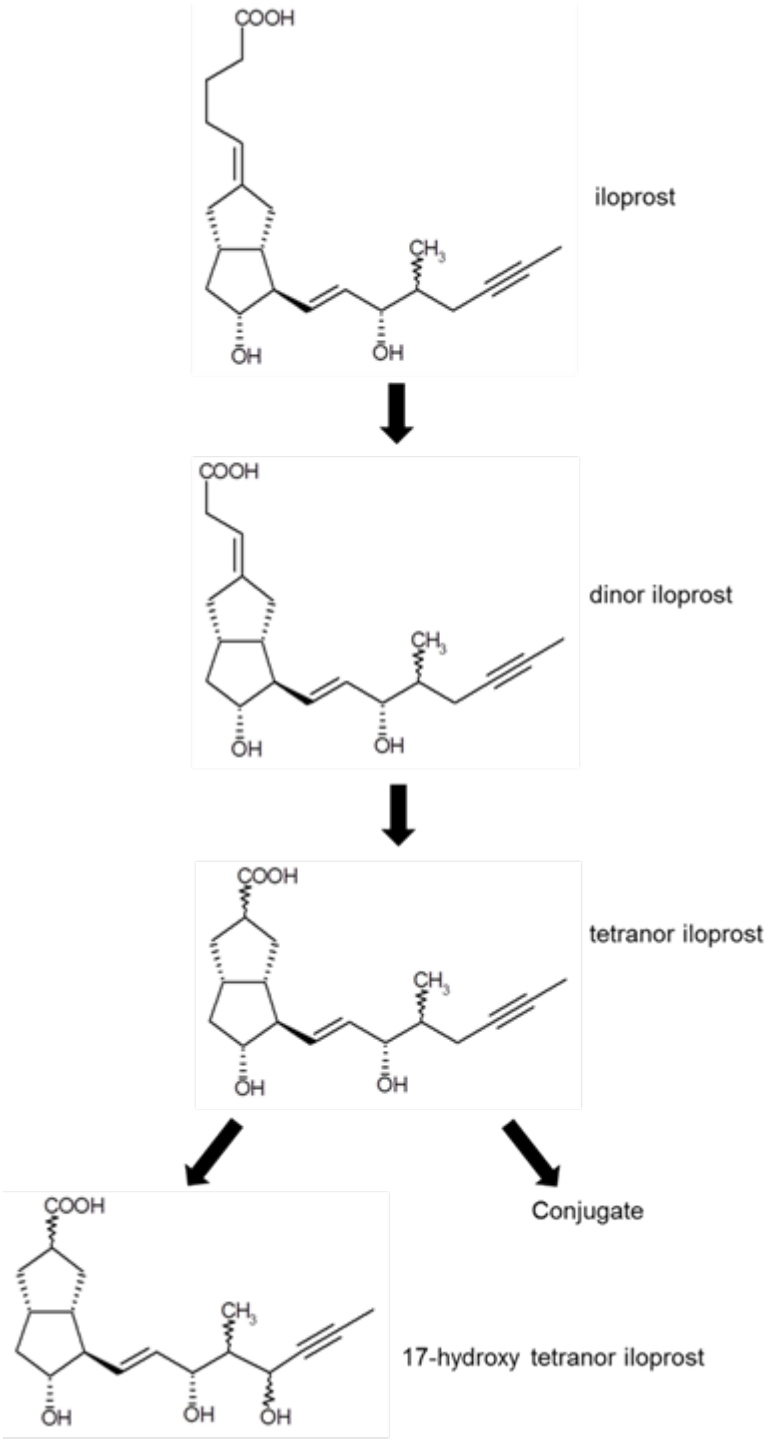


図 2.4.3.3- 1　イロプロストの推定代謝経路（ラットのデータに基づく）

2.4.3.4　　排泄

マウス、ラット、イヌ及びカニクイザルに ^{3}H-イロプロストを静脈内投与及び経口投与したときの放射能の排泄経路を検討した。放射能は尿及び糞中に排泄され、尿糞中にほぼ同じ割合で、又は尿中に多く排泄された。放射能の排泄は完全であり、臓器・組織分布試験の結果と矛盾はなかった。マウス及びラット尿中放射能はすべて代謝物であり、未変化体は認められなかった。

ラットでは、投与した放射能の約 3 分の 1 は胆汁中に排泄され、胆汁に排泄された放射能のうち約 3 分の 2 が再吸収された（腸肝循環）。ラットにおいてごく少量の放射能（投与量の 1%未満）が乳汁中へ移行した。

2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用

ラットに 7 日間反復投与後の肝重量、ミクロソームたん白含量、チトクローム P450 含量、チトクローム b_5 含量、薬物代謝酵素活性に対する影響を検討した結果、肝酵素量及び酵素活性に影響は認められなかった。ヒト肝ミクロソーム及び CYP 発現系ミクロソームを用いた検討で、イロプロストの代謝に対する CYP 酵素の寄与は小さかった。*In vitro* において、CYP 酵素に対する阻害作用は認められなかった。

2.4.4 毒性試験

ネブライザによるイロプロスト吸入投与時の全身的な安全性は、非経口（主として静脈内）及び経口投与による毒性試験に基づいて評価可能と考えられる。これら投与経路によるイロプロストの全身曝露は、肺高血圧症患者における治療用量での吸入投与時の全身曝露を上回ることから、このような評価が可能と判断した。臨床での吸入反復投与時の局所及び全身忍容性を支持する目的で、ラットを用いた吸入投与による短期（4 週間）及び長期（6 ヵ月間）反復投与毒性試験を新たに実施した。非げっ歯類を用いた吸入投与試験からは有用な追加情報が期待できないことから、非げっ歯類を用いた新たな吸入投与試験は実施しなかった。

吸入を含めたイロプロストの毒性試験成績の概略を本項に示す。毒性試験一覧を表 2.6.6.1-1 及び 2.6.7.1 に示す。すべての重要な試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

イロプロストのマウス、ラット、ウサギ及びサルにおける単回静脈内投与時の概略の致死量（最小致死量）はそれぞれ 125～150mg/kg、50～100mg/kg、5～15mg/kg 及び 3.75mg/kg であった。静脈内投与後の概略の致死量には種差が認められ、マウス及びラットでは忍容性が高かった。

げっ歯類における主な臨床症状はアパシー、歩行障害、姿勢異常、皮膚の発赤であった。静脈内投与の投与直後及び 4 日目までに死亡が認められた。死亡動物において、マウスでは肝臓の蒼白化、肺のうっ血又は浮腫、ラットでは胃粘膜の発赤及び黒色巣が認められた。14 日目の屠殺時まで生存した動物における主要な剖検所見は投与部位の壊死であった。マウス及びラットにイロプロスト 100mg/kg を強制経口投与したところ、死亡は認められず、剖検時に異常所見も認められなかった。

イロプロストの静脈内投与時の臨床症状を発現させる用量及び概略の致死量は、ウサギ及びサルではげっ歯類よりも低く、忍容性が低かった。ウサギの死亡例は、静脈内投与 15 分後から 2 日目までに認められた。サルを用いた静脈内投与による用量漸増試験において、総用量 7.75mg/kg を投与した動物が投与約 3 時間後に死亡し、総用量 3.75mg/kg を投与した動物 2 例中 1 例は投与翌日に死亡した。死因は重度の血圧低下に関連したものと判断された。ウサギ及びサルの試験における臨床症状はげっ歯類と類似していたが、サルでは投与 90 分後にクレアチニンホスホキナーゼ（CPK）の増加が認められた。試験中に死亡あるいは 15 日目に屠殺したウサギにおいて、剖検時に肉眼所見はみられなかった。サルにおいても死亡例あるいは 6 日間の観察期間終了後屠殺例にイロプロスト投与に起因した病理組織学的変化は（静脈内投与時の投与部位での局所所見を除き）認められなかった。

一連の単回投与毒性試験成績を総合的に評価したところ、高用量静脈内投与時の臨床症状、死亡、剖検所見はイロプロストの過度の薬理作用（血圧低下、血管拡張及び血小板機能の阻害）に関連するものと考えられた。ヒトで吸入投与時の治療用量（0.9μg/kg/日）と動物における種々の投与経路での概略の致死量（3.75～150mg/kg）及び臨床症状発現量（2.5mg/kg 以上）との差異、さらに、後述するラット吸入投与による 26 週間反復投与毒性試験の最高用量 48.7μg/kg/日（無毒性量）の投与 1 日目の曝露量 Cmax（1,966ng/L）が、ヒトに臨床用量吸入投与時の平均曝露量 Cmax（142ng/L）の約 14 倍に相当することも考慮すると、単回投与毒性試験の結果は、臨床におけるイロプロスト吸入療法での急性副作用発現のリスクを示唆するものとは考えられなかった。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

ラットにイロプロストを 4 週間連日吸入投与した結果、薬剤投与と関連がある可能性のある唯一の所見として、雄では血漿中ビリルビン濃度の低下、雌ではリン脂質、総脂質及びコレステロール濃度の低下が認められた。摂餌量の変化あるいは肝臓又は脂質代謝に関与する他の臓器に病理組織学的変化は認められなかったこと、これらの所見が用量依存的でなかったことから、生理的適応反応と考えられた。同様に、ビリルビン濃度の低下は肝クリアランス増加を反映している可能性が考えられた。この考察は 26 週間の長期反復吸入投与試験において、同様の検査値変化が認められなかったことから支持される。

種々の投与経路を用いてげっ歯類及び非げっ歯類で実施した反復投与毒性試験成績を総合的に評価したところ、イロプロスト投与に関連して認められた所見は、主にイロプロストの血行動態作用に起因するものと考えられた。高濃度のイロプロストに曝露されると、血行動態の変化（血圧低下）のために動物は死に至ったが、臓器毒性所見は認められなかった。ラットにおいて吸入、静脈内、経口投与による高用量の反復投与時の忍容性は良好であった。ラットよりもイロプロストの血圧低下作用に感受性が高いと考えられるサルにおいてさえ、非経口及び経口投与後に軽微な一般症状しか発現しない、忍容性の認められた用量は、ヒトの目標治療用量と同程度又は高い用量範囲にあった。

ラットに、技術的に達成可能な最大濃度のイロプロストを 26 週間連日吸入投与した結果、中及び高用量群で肺の絶対及び相対重量にわずかな増加が認められた。この増加はイロプロストの血管拡張作用に関連した変化と考えられ、血行動態に及ぼす作用に関連したものと考えられる。肺重量の増加に関連した肺組織の病理組織学的異常所見は認められなかった。すなわち、ラットにイロプロストを 26 週間反復吸入投与した結果、本化合物の薬理学的特性に関連する軽度な影響（血行動態に及ぼす影響）が認められたが、臓器毒性は認められなかった。

イヌにイロプロストを 26 週間反復皮下投与（持続注入）した場合にも臓器毒性は認められなかった。観察された下痢の頻度増加は消化管蠕動運動に対する過度の薬理作用に起因するものであり、尿量のわずかな減少もイロプロストの薬理作用に起因したものと考えられた。

ラットにイロプロスト徐放性製剤 0.6mg/kg（1%混餌）を 27～28 週間経口投与した結果、薬剤投与に関連する毒性所見は認められなかった。イヌにイロプロスト徐放性製剤を約 9 ヵ月間経口投与した結果、最高用量では下痢が認められた。この影響はイヌに 6 ヵ月間反復皮下投与後に認められた変化と同様であった。

反復投与毒性試験では、ヒトの予定用量の数倍～数百倍以上のイロプロストを様々な動物種に種々の投与経路で投与した結果、いずれも忍容性は良好であった。イロプロストは臓器毒性をもたらさず、観察された軽微な臨床症状及び所見は本化合物の薬理作用に起因したものと考えられた。これらの成績に基づくと、ヒトにおけるイロプロストの予定臨床用量での吸入療法では副作用は予想されない。

2.4.4.3　トキシコキネティクス

反復投与時の血漿又は血清中イロプロスト濃度は用量依存的に増加し、明らかな性差及び蓄積性は認められなかった。毒性試験における全身曝露量は概して予定臨床用量吸入投与後の曝露量を上回っていた。一連の毒性試験における無毒性量又は最大投与量での曝露量と臨床曝露量との比較の詳細を、表 2.6.6.9-1（反復投与毒性試験）、表 2.6.6.9-2（がん原性試験）及び表 2.6.6.9-3（生殖発生毒性試験）に示す。

2.4.4.4 遺伝毒性試験

イロプロストは細菌及び哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験及び *in vivo* マウス骨髄小核試験のいずれにおいても、変異原性を示さなかった。

2.4.4.5 がん原性試験

マウスにイロプロスト徐放性製剤を反復経口（混餌）投与した結果、雌の高用量群で死亡率が増加し、雌雄の中・高用量群では摂水量の減少がみられた。中・高用量群で精巣上体重量の減少又は減少傾向、高用量群で卵巣重量増加がみられた以外イロプロスト投与に関連した影響は認められなかった。マウスにイロプロスト徐放性製剤を反復(強制)経口投与した結果、摂餌量、体重、血液学的検査パラメータ、剖検所見に影響は認められなかった。投与約 1 時間後、高用量群のマウスに軽微な傾眠が認められた。

ラットにイロプロスト徐放性製剤を長期間経口（混餌）投与した結果、死亡率、摂水量、臨床所見、剖検所見に影響は認められなかった。高用量群で子宮重量が増加したことを除き、臓器重量に薬剤投与に関連した影響は認められなかった。組織学的検査において、プラセボ群及び高用量群の雄ラットで膵島細胞腫瘍発生率がやや上昇したことを除き、イロプロスト投与に関連した非腫瘍性又は腫瘍性病変の型の変化、発現率及び重症度の増加は認められなかった。膵島細胞腫瘍は栄養バランスの不均衡な食餌投与に関連した影響である可能性が高い。ラットにイロプロストを反復強制経口投与した結果、50 及び 125/100mg/kg/日で、一部の一般症状の発現率増加、摂餌量及び体重の減少、膵臓の実質変性の発現率増加及び重症化など、本薬投与に関連したいくつかの所見が認められ、高用量では生存率低下も認められた。死因は薬剤投与と直接関連するものではなかったが、高用量群では肺の急性炎症の発現率増加と重症化が認められた。

イロプロストはマウス及びラットへの混餌又は強制経口投与による長期試験において、がん原性を示さなかった。

2.4.4.6 生殖発生毒性試験

雄雌ラットにイロプロストを静脈内持続投与又は徐放性製剤を強制経口投与した結果、イロプロストは受胎能及び／又は生殖能に影響を及ぼさなかった。一方、妊娠 6～15 日目にイロプロストを静脈内投与（持続注入）したラットを用いた胚・胎児発生に関する試験において、用量依存性はないものの最低用量から胎児の前肢手指の異常（短小）が認められた。妊娠 15 日目（器官形成完了後）にイロプロストの持続静脈内投与を開始したラットを用いた出生前・出生後発生に関する試験においても、数例の出生児の出産後観察で同様の手指の異常（指骨短小）が認められたことから、この異常は手指の分化過程に対する直接的な催奇形性ではなく、既に分化した手指への二次的な影響（発育遅延）であると考えられる。

同様の手指の異常は、妊娠 13～15 日目のラットの子宮血管を結紮することにより生じることが報告されている[1,2]。すなわち、静脈内投与したイロプロストの降圧作用により、母体胎盤への血液供給が障害されたため、胎児の前肢遠位部に低酸素症が生じた可能性が推測される。このような所見はイロプロストを妊娠後期に持続静脈内投与したラットでのみ誘発され、離乳後の出生児において身体発達・学習能・生殖能等に影響は認められず、この発育遅延性所見はおおむね可逆性変化であると考えられた。後肢に同様の影響が生じない理由は明らかでない。イロプロスト徐放性製剤を（妊娠後期も含めた）全生殖期間を通じて長期間連日強制経口投与したラット併合投与試験、ウサギ及びサルを用いた胚・胎児発生毒性試験では、投与量又は全身曝露量が高かったにもかかわらず、手指の異常は認められなかった。

ウサギ及びサルにイロプロストを静脈内投与した、また、ラット及びウサギにイロプロスト徐放性製剤を強制経口投与した胚・胎児発生に関する試験において、いずれの試験用量でも胚致死作用及び催奇形性作用は認められなかった。

イロプロストを静脈内投与又は徐放性製剤を強制経口投与した雌ラットを用いた出生前・出生後発生に関する試験において、イロプロストの乳汁中への移行による出生後発生の障害は認められなかった。

2.4.4.7　局所刺激性試験

ラットを用いた反復吸入投与毒性試験において、局所刺激性を示唆する呼吸器症状及び肺・気管の組織学的変化は認められなかった。

2.4.4.8　その他の毒性試験

モルモットを用いた maximization 試験でイロプロストに感作性は示されなかった。更に、モルモットを用いた全身性アナフィラキシー試験でイロプロストに対する特異抗体の出現は認められず、受動的皮膚アナフィラキシー反応も認められなかった。

熱ストレスを加えたイロプロストの急性毒性は無処置のイロプロストと同様であった。

ラットに 2 種のイロプロストジアステレオ異性体（4R 体又は 4S 体）を単回静脈内投与した場合の概略の致死量及び単回経口投与後の一般症状は、イロプロスト（4R 体と 4S 体のほぼ同量混合物）の単回静脈内投与後の結果と類似していた。

2.4.5 総括及び結論

イロプロストの非臨床試験では、一般に広く使用されている実験動物、並びにヒトにおけるイロプロストの使用予定に関連した用量及び投与経路を用いた。試験は適宜、GLP に準じて実施し、必要に応じて、推奨される統計データ評価方法を用いた。イロプロストの薬理試験、薬物動態試験、毒性試験の結果から以下の結論を導くことができる。

In vitro 試験において、イロプロストは PGI_2 受容体（IP）に対する高い結合親和性を示した。また、ヒト多血小板血漿において、イロプロストは cAMP 産生作用を示し、アデニレートシクラーゼ活性化作用が確認され、同様に、ヒト肺動脈血管平滑筋細胞において、cAMP 産生作用を示した。イロプロストはヒト摘出肺血管における薬物誘発収縮に対する阻害作用を示し、またヒト多血小板血漿における薬物誘発血小板凝集に対する抑制作用を示した。*In vivo* 肺高血圧症モデルにおいて、イロプロストは肺血行動態を改善した。

以上の効力を裏付ける試験成績より、イロプロストは、血管平滑筋細胞及び血小板において、cAMP 産生を促進させることにより血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用を発揮し、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。

イロプロストの安全性薬理試験（一般薬理試験）では、中枢神経系／自律神経系、心血管系、呼吸器系、腎機能、胃腸管系及び雌性生殖器に及ぼす影響について *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。その結果、これらの器官系及び機能に対して、治療用量域のイロプロストにより重大な副作用が発現する可能性は示唆されなかった。

雌雄ラットにイロプロストを吸入投与したとき、吸収は速やかであった。3.6、27.8 及び 48.7 μg/kg の用量では全身曝露（$AUC_{0\text{-}tlast}$）はほぼ吸入量に比例し、また、吸入時間に比例して増加した。別試験で 9.15 及び 22.6 μg/kg を吸入投与したとき、全身曝露の増加は用量比を下回った。いずれの試験においても、全身曝露に反復投与の影響及び性差は認められなかった。ウサギの摘出灌流肺において、吸入投与による代謝物産生は顕著ではなく、バイオアベイラビリティは 63％と良好であった。すなわち、吸入投与時の肺における初回通過代謝は経口投与時（10％未満）と比べると小さいと考えられた。

各種動物にイロプロスト静脈内投与後、未変化体は血漿から急速に消失した。ラットにおいては、終末相の半減期が緩慢であったが、これは用いた RIA 法の代謝物に対する交差反応のためと考えられた。マウス、ラット、イヌ及びサルに経口投与したとき、イロプロストは速やかに、かつ完全に吸収されたが、絶対バイオアベイラビリティはマウス、ラット、イヌ及びサルで約 10％であり、ヒトにおけるバイオアベイラビリティと類似し、低値であった。

ラットに ^{3}H-イロプロストを単回静脈内投与後、放射能は速やか、かつ全身に分布し、もっとも高い放射能濃度は肝臓、腎臓（皮質）及び胃に認められ、次いで肺、心臓、胎盤の放射能濃度が高かった。肝臓、腎臓、肺、筋肉、血漿における放射能濃度の消失半減期は同様で、約 45 分であった。検討した臓器・組織において放射能濃度の経時的な増加はみられなかった。血液脳関門を通過した放射能はわずかであった。放射能の胎児移行がわずかに認められた。

ヒト血漿におけるイロプロストのたん白結合率は低く、約 60％であった。

イロプロストはプロスタグランジン I_2（PGI_2）の誘導体であることから、PGI_2 において認められるβ酸化によって、主に肝臓で代謝された。ラットではイロプロストのカルボキシル側鎖がβ酸化され、ダイノルイロプロスト、テトラノルイロプロストに代謝された。抱合体及び水酸化体

も認められた。サル、イヌ、マウス及びヒト尿中代謝物のパターンは、ラットと類似していた。ヒト肝ミクロソーム及びヒト CYP の cDNA 発現系ミクロソームを用いた検討で、イロプロストの代謝に対する CYP 酵素の寄与は小さかった。

マウス、ラット、イヌ及びカニクイザルに ^{3}H-イロプロストを静脈内投与及び経口投与時の放射能は、投与経路及び用量によらず、尿糞中に同じ割合で、又は尿中に多く排泄された。放射能の排泄は完全であった。マウス及びラット尿中放射能はすべて代謝物であった。ラットでは、投与した放射能の約 3 分の 1 は胆汁中に排泄され、胆汁に排泄された放射能のうち相当量が再吸収されたことから、腸肝循環が示唆された。ラットにおいてごく少量の放射能（投与量の 1%未満）が乳汁中へ移行した。

ラットに 7 日間反復投与後の肝重量、ミクロソームたん白含量、チトクローム P450 含量、チトクローム b_5、薬物代謝酵素活性に対する影響を検討した結果、反復投与による肝酵素量及び酵素活性に影響は認められなかった。ヒト CYP 分子種に対する阻害作用は認められなかった。

以上より、イロプロストは吸入投与後、肺より循環血中へ速やかに吸収され、全身に広く分布した後に、主に肝臓でβ酸化により代謝を受け、尿糞中に速やかに、かつ完全に排泄されると考えられた。イロプロストの代謝において CYP 分子種の寄与は小さく、イロプロストは CYP 分子種に対する阻害作用を示さなかったことから、CYP 分子種を介した薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

技術的に達成可能な最高用量（臨床曝露量 Cmax の 16 倍相当）までのイロプロストをラットに約 6 ヵ月間連日吸入投与した試験で、局所及び全身性の毒性所見は観察されなかったことから、臨床で肺高血圧症患者において予定されるイロプロストの吸入投与時の安全性に関する特段の懸念はない。げっ歯類及び非げっ歯類を用いて様々な投与経路で行った反復投与毒性試験において、認められたイロプロスト投与に関連する所見（種々の一般症状、軽度の生化学的検査値変動、種々の臓器における充血）は、主にイロプロストの過度の薬理作用によるものと考えられた。臓器特異的な毒性所見やイロプロストの主要な薬理学的特性とは無関係の毒性所見は認められなかった。イロプロスト 10 又は 20μg/mL の吸入投与は上・下気道に局所刺激性をもたらさなかった。

イロプロストに遺伝毒性及びがん原性は認められなかった。

妊娠 6～15 日目のラットにイロプロストを静脈内持続注入した胚・胎児発生に関する試験において、最低用量から少数の胎児に前肢手指の異常（短小）が認められた。妊娠 15 日目（器官形成完了後）にイロプロストの静脈内持続注入を開始したラット出生前及び出生後発生に関する試験においても、数例の新生児に同様の手指の異常が認められたことから、この異常は手指の分化過程に対する直接的な催奇形性というより、既に分化が完了した手指に対する二次的な作用（発育遅延）の結果であると考えられた。妊娠 13～15 日目のラットの子宮血管を結紮することにより、同様の手指の異常が認められることが報告されている[1,2]。すなわち、イロプロストの降圧作用により、母体の胎盤への血液供給が障害されたため、胎児の前肢遠位部に低酸素状態が生じた可能性が推測される。一方、イロプロスト徐放性製剤を連日強制経口投与した雌ラットの全生殖期間にわたる併合投与試験及びウサギ胚・胎児発生に関する試験、イロプロストの持続注入によるウサギ及びサルにおける胚・胎児発生に関する試験では、全身曝露量が高かったにもかかわらず、手指の異常は認められなかった。したがって、この異常はラットへのイロプロストの持続注入時においてのみ誘発される可能性が高い。しかしながら、妊婦への本薬吸入投与による胎児・新生児への影響は明らかでない。

イロプロストの予定される臨床用量及び用法［1回約0.1μgの吸入投与（1日最大9回）］に基づくと、イロプロストの全身忍容性及び局所刺激性に関する毒性試験、並びに変異原性及びがん原性試験で得られた結果は、ヒトにおける副作用リスクを示唆するものではない。

2.4.6　参考文献一覧

1) Leist KH & Grauwiler J. Teratology 1973; 8: 227-228 (4.3.7　添付)

2) Leist KH & Grauwiler J. Teratology 1974: 10: 55-67 (4.3.8　添付)