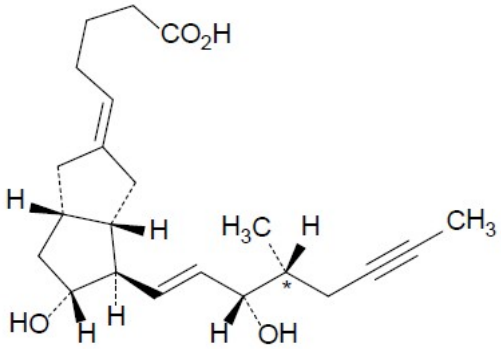
2.6.1　緒言

イロプロストは、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用を有する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。

イロプロストの理化学的性状を以下に記載する。

構造式	 及び C*位エピマー
化学名	(5*E*)-5-{(3a*S*,4*R*,5*R*,6a*S*)-5-Hydroxy-4-[(1*E*,3*S*,4*RS*)-3-hydroxy-4-methyloct-1-en-6-yn-1-yl]hexahydropentalen-2(1*H*)-ylidene}pentanoic acid
分子式	$C_{22}H_{32}O_4$
分子量	360.49
一般名（JAN）	イロプロスト
社内コード	BAY q6256

イロプロストは 4R-及び 4S-メチル-ジアステレオ異性体の混合物である。イロプロストの薬理学的、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。本薬の薬理試験成績には、作用機序が検討されている *in vitro* 試験及び肺高血圧症モデルにおける作用が検討されている *in vivo* 試験を含めた。また、本薬の薬物動態特性（吸収、分布、代謝、排泄）について検討するための非臨床試験を実施した。安全性薬理試験は一般薬理試験として実施し、中枢神経系／自律神経系、心血管系、呼吸器系などについて検討した。毒性試験では、単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生独毒性試験及び局所刺激性試験を実施した。

非臨床試験の詳細と結果を 2.6.2 以降の項に記載する。

本薬の申請［効能・効果］及び申請［用法・用量］を以下に示す。

申請［効能・効果］

肺動脈性肺高血圧症

申請［用法・用量］

通常、成人にはイロプロストとして初回は 1 回 2.5μｇを吸入し、忍容性を確認した上で 2 回目以降は 1 回 5.0μｇに増量して 1 日 6～9 回吸入する。1 回 5.0μｇに忍容性がない場合には、1 回 2.5μｇに減量する。

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

2.6.2 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 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 6
2.6.2.2.1.1 PGI_2受容体への結合性 6
2.6.2.2.1.2 アデニレートシクラーゼ活性化及び cAMP 産生作用 7
2.6.2.2.1.3 血管拡張作用 7
2.6.2.2.1.3.1 摘出肺血管及び摘出灌流肺 7
2.6.2.2.1.3.2 その他の摘出血管 8
2.6.2.2.1.4 血小板凝集抑制作用 8
2.6.2.2.1.5 平滑筋細胞増殖抑制作用 8
2.6.2.2.1.6 炎症性サイトカイン産生抑制作用 9
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 9
2.6.2.2.2.1 肺血行動態及び全身血行動態作用 9
2.6.2.2.2.2 肺高血圧症モデル動物における作用 10
2.6.2.2.2.2.1 U46619 誘発肺高血圧症モデル 10
2.6.2.2.2.2.2 低酸素誘発イヌ肺高血圧症モデル 11
2.6.2.2.3 単一ジアステレオ異性体の効力薬理試験 12
2.6.2.2.3.1 血管拡張作用 12
2.6.2.2.3.2 血小板凝集抑制作用 13
2.6.2.2.4 代謝物テトラノルイロプロストの効力薬理試験 13
2.6.2.3 副次的薬理試験 14
2.6.2.3.1 各種受容体に対する結合試験 14
2.6.2.4 安全性薬理試験 15
2.6.2.4.1 中枢神経系及び自律神経系に及ぼす影響 15
2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響 15
2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験 15
2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験 16
2.6.2.4.3 呼吸器系に及ぼす影響 16
2.6.2.4.3.1 *In vitro* 試験 16
2.6.2.4.3.2 *In vivo* 試験 17
2.6.2.4.4 腎機能に及ぼす影響 17
2.6.2.4.5 胃腸管系に及ぼす影響 17
2.6.2.4.6 雌性生殖器に及ぼす影響 19

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 20
2.6.2.6　考察及び結論 21
2.6.2.7　引用文献一覧 23

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

血管内皮で産生されるアラキドン酸代謝物であるプロスタサイクリン〔プロスタグランジン（PG）I_2〕は、血管の恒常性及び血流の維持に関与する重要な生理活性物質である。PGI_2は、血管平滑筋細胞及び血小板に存在するPGI_2受容体に結合すると、G たん白質を介してアデニレート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。

肺高血圧症患者では、PGI_2の産生低下[1)]及び肺血管の PGI_2 合成酵素の低下[2)]が認められていること、肺高血圧症の病態が、肺動脈の収縮、血管リモデリング、炎症及び肺動脈内血栓形成を特徴とすることを踏まえると、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用を有する PGI_2 の補充療法が肺高血圧症の改善に有用であると考えられる。実際、PGI_2 の持続静注療法により肺高血圧症患者の運動耐容能及び生存率の改善が確認されている[3)]。

イロプロストは PGI_2 の化学的に安定な誘導体であり、肺動脈性肺高血圧症（pulmonary arterial hypertension：PAH）に対する吸入製剤として開発された。

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。イロプロストはヒトへの吸入投与を目的に開発しているが、実験動物を用いた吸入投与による検討は手技的に困難であったことから、イロプロストの薬理作用に関わる *in vivo* 試験の多くは静脈内投与により実施されている。以下に、イロプロストを用いて実施した効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験を要約する。なお、イロプロストは4R-及び 4S-メチル-ジアステレオ異性体がほぼ同じ量含まれる混合物であることから、各ジアステレオ異性体を用いた効力薬理試験も実施された。

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。

麻酔下のウサギ及びブタを用いた *in vivo* 試験において、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）で誘発したウサギ肺高血圧症モデルにおいて、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。低酸素で誘発したイヌ肺高血圧症モデルにおいて、イロプロストの前投与により肺動脈圧及び肺血管抵抗の上昇が抑制された。

イロプロストの 4R-及び 4S-メチル-ジアステレオ異性体（以下、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。

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において、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において、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。

以上、効力を裏付ける試験における *in vitro* 及び *in vivo* 試験成績から、イロプロストは血管平滑筋及び血小板において、アデニレートシクラーゼを活性化し、細胞内 cAMP 産生を促進す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するものと考えられた。更に、肺高血圧症モデル動物において、イロプロストの静脈内投与に加え、吸入投与でも肺高血圧の改善効果が確認された。また、安全性薬理試験では、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対して、治療用量域のイロプロストにより重大な有害作用が発現する可能性は示唆されなかった。中枢神経系及び呼吸器系に対する影響は明らかな血圧低下作用が発現する用量においてみられたもので、1 日最大臨床推奨用量（0.9μg/kg）と比較した場合、十分な安全域があると考えられる。したがって、イロプロストは肺高血圧症の患者に、有効かつ安全な吸入治療薬となることが期待される。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 PGI_2受容体への結合性

参照項目：4.2.1.1.1 Abramovitz M et al., Biochim Biophys Acta 2000:1483:285-293
4.2.1.1.2 Whittle BJ et al., Biochem Pharmacol 2012:84:68-75

PGI_2受容体を含む種々のプロスタノイド受容体に対するイロプロストの結合性が、放射性リガンド結合試験により検討されている（計2試験）。

ヒトPGI_2受容体（IP）を発現させたHEK293細胞より調製した細胞膜画分に、[^{3}H]標識イロプロストを添加後、種々の濃度の非標識イロプロストを添加しインキュベートした。その後、細胞膜画分に結合した[^{3}H]標識イロプロストによる放射能を測定し、IPに対するイロプロストの特異的リガンド結合を評価した。同様に、PGE_2受容体（EP_1、EP_2、EP_3、EP_4）、PGD_2受容体（DP_1）、$PGF_{2\alpha}$受容体（FP）又はトロンボキサンA_2受容体（TP）を発現したHEK293細胞より調製した細胞膜画分に、それぞれ[^{3}H]標識PGE_2、[^{3}H]標識PGD_2、[^{3}H]標識$PGF_{2\alpha}$及び[^{3}H]標識SQ-29548（TPアンタゴニスト）を添加し、更に、非標識イロプロストを添加することにより、各種プロスタノイド受容体におけるイロプロストの特異的リガンド結合を評価した。

各種プロスタノイド受容体におけるイロプロストの親和性定数（K_i）を表 2.6.2.2- 1 に示す。イロプロストはPGI_2受容体に対する高い結合親和性を有することが示された。

表 2.6.2.2- 1 イロプロストの各種プロスタノイド受容体に対する結合性

Receptor	K_i [nM]	
IP	11	3.9
EP_1	11	1.1
EP_2	1870	1172
EP_3	56	208
EP_4	284	212
DP_1	1035	1016
FP	619	131
TP	6487	3778
Source	4.2.1.1.1	4.2.1.1.2

2.6.2.2.1.2 アデニレートシクラーゼ活性化及び cAMP 産生作用

参照項目：4.2.1.1.3 Leoncini G et al., Pharmacol Res 1991:23:139-148
4.2.1.1.4 Clapp LH et al., Am J Respir Cell Mol Biol 2002:26:194-201
4.2.1.1.2 Whittle BJ et al., Biochem Pharmacol 2012:84:68-75

イロプロストのアデニレートシクラーゼ活性化及び cAMP 産生作用が、ヒトの血小板及び肺動脈平滑筋細胞を用いてそれぞれ検討されている。

健康成人から採取した血液より調製した多血小板血漿に、イロプロスト 100nM 又は媒体を添加しインキュベートした後、更に[^{3}H]標識 ATP を添加した（4.2.1.1.3 参照）。[^{3}H]標識 ATP から産生された[^{3}H]標識 cAMP を分離後、当該放射能を測定した。また陽性対照にはアデニレートシクラーゼを活性化し cAMP を産生することが知られるフォルスコリン（50μM）を用いた。イロプロスト添加により新規産生された cAMP の濃度は媒体の約 9 倍に上昇したことから（イロプロスト及び媒体の cAMP 濃度：それぞれ 453 及び 48pmol/mg protein/分）、イロプロストの cAMP 産生作用が示され、アデニレートシクラーゼ活性化作用が確認された。陽性対照のフォルスコリンにおいても、cAMP 濃度の上昇が確認された（838pmol/mg protein/分）。

ヒト肺動脈血管平滑筋細胞に、イロプロスト（～1μM）又は媒体を添加しインキュベートした後、細胞内 cAMP 濃度を測定した（n＝6～12）（4.2.1.1.4 参照）。イロプロストは濃度依存的に cAMP を産生し、1μM でイロプロスト添加前の 30 倍以上であった（イロプロスト 1μM 及び添加前の cAMP 濃度：それぞれ 58.7 及び 1.7pmol/mg protein）。また、ヒト PGI_2 受容体を発現させた CHO 細胞に、イロプロスト（1pM～10μM）を添加しインキュベートした後、細胞内 cAMP 濃度を測定したところ、イロプロストの濃度上昇に伴い cAMP 濃度は上昇し、50％有効濃度（EC_{50}）は 0.37nM であった（4.2.1.1.2 参照）。

以上のように、イロプロストはアデニレートシクラーゼを活性化し、血小板及び平滑筋細胞の cAMP 濃度を上昇させるものと考えられた。

2.6.2.2.1.3 血管拡張作用

2.6.2.2.1.3.1 摘出肺血管及び摘出灌流肺

参照項目：4.2.1.1.5 Haye-Legrand I et al., Prostaglandins 1987:33:845-854
4.2.1.1.6 Walch L et al., Br J Pharmacol 1999:126: 859-866
4.2.1.1.7 Dumas M et al., Br J Pharmacol 1997:120:405-410

イロプロストの肺血管拡張作用が、ヒト摘出肺血管及びラット摘出灌流肺を用いて検討されている。

摘出肺血管：肺癌患者（12 例）の手術時に摘出した肺組織における肺動脈血管を用い、らせん標本を作製した。らせん標本にヒスタミン（50μM）を添加し、収縮反応がプラトーに達した後、種々の濃度のイロプロスト又は PGI_2 を添加した（n＝3 又は 4）（4.2.1.1.5 参照）。イロプロストは肺動脈標本におけるヒスタミ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 38nM であった。同様に、PGI_2 においても収縮阻害作用がみられ、その IC_{50} 値は 470nM であった。また、肺癌患者（男性 43 例、女性 3 例）の手術時に摘出した肺組織における肺動脈及び肺静脈血管を用い、リング標本を作製した。各リング標本にノルエピネフリン（10μM）を添加し、収縮反応がプラトーに達した後、種々の濃度のイロプロストを添加した（4.2.1.1.6 参照）。なお、イロプロストの IP に対する作用強度を検討するため、ノルエピネフリン添加前に

EP アンタゴニスト（AH6809）で処置した。イロプロストはノルエピネフリン誘発収縮した肺動脈及び肺静脈のいずれに対しても、濃度依存的な収縮阻害作用を示し、pD_2[a] はそれぞれ 7.84（n＝6）及び 8.25（n＝4）であった。

摘出灌流肺（4.2.1.1.7 参照）：雄性ラット（Wistar、260～320g）より調製した摘出灌流肺を用い、低酸素下（5%CO_2 及び 95%N_2）にイロプロスト（最終濃度：0.1～30nM）を添加後、肺灌流圧を測定した（n＝6～9）。イロプロストは低酸素誘発による肺血管収縮に伴う肺灌流圧上昇を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 1.91nM であった。

これらの試験成績から、イロプロストの肺血管に対する拡張作用が示された。

2.6.2.2.1.3.2 その他の摘出血管

参照項目：4.2.1.1.8 AF18

雄性ウサギ（NZW、2.0～3.2kg）より腸間膜動脈を摘出し、リング標本を作製した。作製した腸間膜動脈リング標本に対し、フェニレフリン（10μM）を添加しあらかじめ標本を収縮させた後、イロプロストを添加した（最終濃度：0.1nM～10μM、n＝6）。イロプロストは、腸間膜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抑制し、その IC_{50} 値は 180nM であった。

2.6.2.2.1.4 血小板凝集抑制作用

参照項目：4.2.1.1.8 AF18

ヒトの血小板を用いて、薬物誘発血小板凝集に対するイロプロストの作用が検討されている。

健康成人から採取した血液より調製した多血小板血漿に、あらかじめ種々の濃度のイロプロストを添加しインキュベートした後、コラーゲン、アデノシン二リン酸（ADP）又はトロンビンを添加し、血小板凝集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＝7 又は 8）。イロプロストは、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濃度依存的に抑制し、IC_{50} 値はそれぞれ 0.8、1.7 及び 0.4nM であった。

このように、イロプロストは種々の血小板凝集誘発物質による血小板凝集を強力に抑制することが示された。

2.6.2.2.1.5 平滑筋細胞増殖抑制作用

参照項目：4.2.1.1.4 Clapp LH et al., Am J Respir Cell Mol Biol 2002:26:194-201
4.2.1.1.9 Wharton J et al., Circulation 2000:102:3130-3136

ヒト肺動脈血管平滑筋細胞の増殖に対するイロプロストの作用が検討されている。

---

a) ノルエピネフリンの最大収縮反応を 50%抑制するのに必要な薬物モル濃度の negative logarithm

牛胎児血清により増殖刺激したヒト肺動脈血管平滑筋細胞に、イロプロスト（0.1nM～10μM）を添加し 48 時間インキュベートした後、生細胞数を測定した（n＝5～12）（4.2.1.1.4 参照）。イロプロストは血管平滑筋細胞の増殖を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 21nM であった。

また、肺又は心疾患を有する患者の肺又は心肺の移植時に得た、肺動脈断片から調製したヒト遠位肺動脈血管平滑筋細胞に、イロプロスト（0.1～100nM）を添加し、血小板由来成長因子（platelet-derived growth factor：PDGF）-BB（10ng/mL）による増殖刺激下／非刺激下で 24 時間インキュベートし、[^{3}H]標識チミジンの DNA への取り込みによって細胞増殖を評価した（n＝6～8）（4.2.1.1.9 参照）。イロプロストは PDGF-BB 刺激の有無によらず、濃度依存的に血管平滑筋細胞の増殖を抑制した。

2.6.2.2.1.6 炎症性サイトカイン産生抑制作用

参照項目：4.2.1.1.10 Eisenhut T et al., Immunopharmacology 1993:26:259-264

単核球のリポポリサッカライド（LPS）刺激により炎症性サイトカイン産生が誘発されることが知られている。LPS 刺激したヒト単核球における炎症性サイトカイン産生に対するイロプロストの作用が検討されている。

健康成人から採取した末梢血液より調製したヒト単核球に、LPS（10ng/mL）存在下で、イロプロスト（0.1～1,000nM）を添加しインキュベートした後、放射免疫測定法により炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF）-αを定量した（n＝8）。イロプロストは濃度依存的に TNF-α産生を抑制し、その IC_{50} 値は 8nM と算出された。

2.6.2.2 *In vivo* 試験

2.6.2.2.1 肺血行動態及び全身血行動態作用

参照項目：4.2.1.1.11 8158
4.2.1.1.12 8794
4.2.1.1.13 7145

麻酔下のウサギ、ブタ及びラットにおける肺血行動態及び全身血行動態に対するイロプロストの作用を検討した。

ウサギ（4.2.1.1.11 参照）：イロプロスト 0.1、0.33 及び 1μg/kg/分、又は媒体（トロメタモール含有生理食塩液）を、麻酔下の雌雄ウサギ（ノウサギ、2.7～4.1kg）に静脈内持続投与し（0.03mL/kg/分）、肺動脈圧、肺血管抵抗、平均動脈圧、全身血管抵抗、左室圧最大変化率、心拍数及び心拍出量を測定した。イロプロストは、各用量（各 20 分間）を漸増的に累積投与した（n＝6）。イロプロストにより、肺動脈圧及び肺血管抵抗の用量依存的な低下がみられ、0.1、0.33 及び 1μg/kg/分（それぞれ 2、6.6 及び 20μg/kg に相当）を投与したとき、肺動脈圧は投与前値に比しそれぞれ最大 11、21 及び 29%低下し、肺血管抵抗はそれぞれ最大 24、44 及び 45%低下した。同様に、平均動脈圧及び全身血管抵抗の用量依存的な低下がみられ、0.1、0.33 及び 1μg/kg/分を投与したとき、平均動脈圧は投与前値に比しそれぞれ最大 7、15 及び 37%低下し、全身血管抵抗はそれぞれ最大 16、27 及び 45%低下した。1μg/kg/分投与時においてのみ、左室圧最大変化率（左室収縮力の指標）が最大 19%低下したが、これは全身血管抵抗及び左室

充満圧の低下がみられる時期と一致し、心前負荷及び後負荷の低下を反映しているものと考えられた。また、心拍数及び心拍出量には明らかな影響はみられなかった。

ブタ（4.2.1.1.12 参照）：イロプロスト 0.033、0.1、0.333 及び 1μg/kg/分、又は媒体（0.125%炭酸水素ナトリウム含有生理食塩液）を、麻酔下の雄性ブタ（22～67kg）に静脈内持続投与した。イロプロストは、各用量（各 20 分間）を漸増的に累積投与した（媒体群には 10μL/kg/分を 20 分間投与×4、n＝6 又は 7）。イロプロストにより、肺動脈圧及び肺血管抵抗の用量依存的な低下がみられ、0.033、0.1、0.333 及び 1μg/kg/分（それぞれ 0.66、2、6.66 及び 20μg/kg に相当）を投与したとき、肺動脈圧は投与前値に比しそれぞれ最大 14、29、48 及び 51%低下し、肺血管抵抗はそれぞれ最大 16、28、42 及び 46%低下した。同様に、平均動脈圧及び全身血管抵抗の用量依存的な低下がみられ、0.033、0.1、0.333 及び 1μg/kg/分を投与したとき、平均動脈圧は投与前値に比しそれぞれ最大 2、10、36 及び 50%低下し、全身血管抵抗はそれぞれ最大 3、10、39 及び 57%低下した。心拍数、心収縮力及び心拍出量にはほとんど影響はみられなかった。

また、イロプロストの全身血行動態については、ラットにおいても検討した。

ラット（4.2.1.1.13 参照）：イロプロスト 0.3μg/kg/分又は媒体 0.1mL/kg/分（15.8mg/mL トロメタモール含有脱塩液）を、麻酔下の雌雄ラット（Wistar、雌：220～260g、雄：320～410g）に 20 分間の静脈内持続投与を行った（n＝10～12）。血行動態の雌雄差を検討するため、性別ごとにイロプロスト群及び媒体群を設けた。イロプロストの投与により、雌雄ラット共に、約 20%の平均動脈圧の低下及び約 25%の全身血管抵抗の低下がみられ、また、心拍数及び心拍出量のわずかな増加がみられた。投与終了後 5 分以内に、観察された血行動態作用は回復した。作用発現時間及び持続時間についても雌雄差はみられなかった。

2.6.2.2.2.2 肺高血圧症モデル動物における作用

2.6.2.2.2.2.1 U46619 誘発肺高血圧症モデル

参照項目：4.2.1.1.14 Schermuly RT et al., Am J Respir Crit Care Med 2001:164:1694-1700
4.2.1.1.15 Van Obbergh LJ et al., Br J Anaesth 1996:77:227-231

イロプロストの吸入投与による血行動態作用が、ウサギ U46619 誘発肺高血圧症モデルを用いて検討されている。また、イロプロストの静脈内投与による血行動態作用についても、ブタ U46619 誘発肺高血圧症モデルを用いて検討されている。

ウサギ肺高血圧症モデル（4.2.1.1.14 参照）：

U46619（トロンボキサン A_2 類似体）を平均 1.5μg/kg/分の用量で、麻酔下のウサギに静脈内持続投与すると、平均肺動脈圧は約 15mmHg から約 26mmHg に上昇し、肺高血圧症モデルが作製されることが確認された。このとき、平均動脈圧及び心拍出量には明らかな変化はみられなかった。雌雄ウサギに U46619 を静脈内持続投与し、平均肺動脈圧上昇がプラトーに達した後、イロプロストを 40ng/kg/分の用量で 10 分間吸入投与した（n＝8）。イロプロストの吸入投与により、平均肺動脈圧は投与前値に比し最大 25%低下し（$p < 0.05$、unpaired t test）、イロプロストの吸入投与開始 30 分後（吸入投与終了 20 分後）には投与前値レベルに戻った。イロプロストの吸入投与終了直後における肺血管抵抗は投与前値に比し 15～20%低下した。また、心拍出量及び平均動脈圧には明らかな変化はみられなかった。

ブタ肺高血圧症モデル（4.2.1.1.15 参照）：

U46619（20μg/mL）を麻酔下の雌性ブタ（20～25kg）に静脈内持続投与し、平均肺動脈圧が約 40mmHg を 20 分間維持するような投与速度を選択し（U46619 投与前の平均肺動脈圧：24.5±1.4mmHg）、肺高血圧症モデルとした。当該ブタ肺高血圧症モデルにおいて、イロプロスト（媒体：生理食塩液）を 0.1μg/kg/分の用量で静脈内持続投与を開始し、漸増的に用量を増加した（n＝7）。各動物において、平均肺動脈圧が U46619 の投与前値付近に回復、又は平均動脈圧が U46619 の投与前値に比し 20%低下したときのイロプロストの用量（最高用量）を 20 分間持続投与した。

イロプロストの平均最高用量は 0.32μg/kg/分で、このときの主な血行動態パラメータを表 2.6.2.2- 2 に示す。U46619 誘発により上昇した平均肺動脈圧及び肺血管抵抗は、イロプロストの静脈内投与によってそれぞれ約 40%及び約 70%低下した。また平均動脈圧及び全身血管抵抗は、それぞれ約 10%及び約 30%低下した。心拍出量には明らかな変化はみられなかった。

以上の試験成績から、U46619 誘発肺高血圧症モデルにおいて、イロプロストは臨床投与経路である吸入投与、及び静脈内投与により肺血行動態を改善させることが示された。

表 2.6.2.2- 2 U46619 誘発ブタ肺高血圧症モデルにおけるイロプロスト静脈内投与後の血行動態パラメータに対する作用

Parameter	Basal	U46619	Iloprost
MPAP (mmHg)	24.5 ± 1.4	43.2 ± 1.5	25.0 ± 1.2 *
MAP (mmHg)	109 ± 5	110 ± 6	99 ± 5 *
PVR (dyn s cm^{-5})	414 ± 63	1102 ± 166	327 ± 72 *
SVR (dyn s cm^{-5})	3325 ± 315	3910 ± 185	2793 ± 283 *
CO (L/min)	2.53 ± 0.6	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.3

Values are given as mean ± SEM (n=7).
Basal: values before administration of U46619, U46619: values after induction of pulmonary hypertension with U46619, Iloprost: values during iloprost infusion, MPAP: mean pulmonary arterial pressure, MAP: mean systemic arterial pressure, PVR: pulmonary vascular resistance, SVR: systemic vascular resistance, CO: cardiac output
*: p<0.05 vs. U46619 by ANOVA + Bonferroni's test

2.6.2.2.2.2.2 低酸素誘発イヌ肺高血圧症モデル

参照項目：4.2.1.1.16 Archer SL et al., J Am Coll Cardiol 1986:8:1189-1194

低酸素により肺高血圧を惹起したイヌモデルを用いて、イロプロスト前処置による血行動態に対する作用が検討されている。

麻酔下の雌雄イヌ（雑種）を低酸素（10%酸素）下に 15 分間曝露（初回曝露）し、正常酸素下に 15 分間戻した。その直後、イロプロスト 0.4μg/kg/分の静脈内持続投与を 5 分間行い、再度、低酸素下に 15 分間曝露（再曝露）した（n＝6）。

低酸素曝露前（Normoxia）、初回曝露後（1st hypoxia）、正常酸素下（Normoxic control）、イロプロスト投与後、及び再曝露後（2nd hypoxia）における主な血行動態パラメータを表

2.6.2.2- 3 に示す。初回曝露 8 分後において、平均肺動脈圧、肺血管抵抗及び平均動脈圧は低酸素曝露前に比し、それぞれ約 86%、約 100%及び約 17%上昇したことから、低酸素曝露により急性の肺高血圧が誘導されたことが確認された。初回曝露後、正常酸素下に戻すと、これらのパラメータはいずれも低酸素曝露前のレベルに回復した。イロプロストの静脈内投与終了直後（投与 5 分後）において、平均肺動脈圧及び肺血管抵抗に明らかな変化はみられなかった。しかし、再曝露後においても、初回曝露後にみられたような平均肺動脈圧及び肺血管抵抗の有意な上昇はみられず、再曝露後の当該パラメータは初回曝露後に比し有意な低値を維持した。したがって、イロプロスト前処置による平均肺動脈圧及び肺血管抵抗の上昇抑制作用が示された。また、平均動脈圧及び全身血管抵抗は、イロプロスト投与 5 分後において有意に低下し、再曝露後にはいずれも初回曝露後レベルにまで上昇する傾向がみられた。心拍出量はいずれの時点においても明らかな変化はみられなかった。

このように、イロプロストの肺高血圧に対する予防的作用が示された。

表 2.6.2.2- 3 低酸素誘発イヌ肺高血圧症モデルにおけるイロプロスト前処置による血行動態パラメータに対する作用

	MPAP (mmHg)	MAP (mmHg)	PVR (mmHg/L/min)	SVR (mmHg/L/min)	CO (L/min)
Normoxia	14 ± 1	147 ± 5	3.1 ± 0.3	53 ± 8	3.0 ± 0.4
1st hypoxia after 8 min	26 ± 3	172 ± 7	6.2 ± 1.1	52 ± 5	3.4 ± 0.4
1st hypoxia after 15 min	24 ± 2	165 ± 6	5.6 ± 0.8	49 ± 5	3.5 ± 0.3
Normoxic control	13 ± 1	138 ± 6	3.0 ± 0.1	54 ± 6	2.8 ± 0.4
Iloprost after 5 min	11 ± 1	94 ± 10 $	2.6 ± 0.2	35 ± 3 $	2.9 ± 0.6
2nd hypoxia after 8 min	13 ± 1 **	150 ± 7	2.8 ± 0.2 *	55 ± 6	2.9 ± 0.4
2nd hypoxia after 15 min	16 ± 2 #	152 ± 6	3.4 ± 0.4 #	48 ± 5	3.4 ± 0.3

Values are given as mean ± SEM (n=6).
MPAP: mean pulmonary arterial pressure, MAP: mean systemic arterial pressure, PVR: pulmonary vascular resistance, SVR: systemic vascular resistance, CO: cardiac output
*: p<0.05, **: p<0.01 vs. 1st hypoxia after 8 min, #: p<0.05 vs. 1st hypoxia after 15 min, $: p<0.05 vs. Normoxic control by ANOVA + Tukey's test

2.6.2.2.3 単一ジアステレオ異性体の効力薬理試験

イロプロストは 4R-及び 4S-メチル-ジアステレオ異性体の混合物であることから、各ジアステレオ異性体の効力に関わる作用が検討されている。

2.6.2.2.3.1 血管拡張作用

参照項目：4.2.1.1.8 AF18

ウサギ摘出血管及びラット *in vivo* 試験において、4R 体及び 4S 体の作用が検討されている。

摘出血管：ウサギより作製した腸間膜動脈リング標本に対し、フェニレフリン（10μM）を添加しあらかじめ標本を収縮させた後、4R 体及び 4S 体を添加した（最終濃度：0.1nM～10μM、n

＝5 又は 6）。4R 体及び 4S 体はいずれも、腸間膜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抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ 740nM 及び 62nM であった。イロプロストの IC_{50} 値は 180nM であった（2.6.2.2.1.3.2）。

ラット：イロプロスト、4R 体及び 4S 体（媒体：エタノール含有生理食塩液）を 0.1、0.3、1、3、10μg/kg の用量で、麻酔下の雄性ラット（Wistar-Kyoto、290～320g）に静脈内投与した（n＝5）。イロプロスト、4R 体及び 4S 体のいずれにおいても、用量依存的な平均動脈圧の低下がみられた。平均動脈圧が投与前値に比し 20mmHg 低下したときの用量（ED_{20mmHg}）はそれぞれ 0.8、30 及び 0.4μg/kg、平均動脈圧が投与前値に比し 10mmHg 低下したときの用量（ED_{10mmHg}）はそれぞれ 0.25、1 及び 0.15μg/kg と概算された。

以上の試験成績から、4S 体及び 4R 体はいずれも薬理活性を有しているが、4S 体の血管拡張作用はイロプロストより強く、4R 体はイロプロストより弱いことが示された。

2.6.2.2.3.2　血小板凝集抑制作用

参照項目：4.2.1.1.8 AF18

ヒトの血小板を用いて、薬物誘発血小板凝集に対する 4R 体及び 4S 体の作用が検討されている。

ヒト多血小板血漿に、あらかじめ種々の濃度の 4R 体及び 4S 体を添加しインキュベートした後、コラーゲン、ADP 又はトロンビンを添加し、被験薬の血小板凝集を測定した（n＝7 又は 8）（2.6.2.2.1.4）。4R 体及び 4S 体はいずれも、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濃度依存的に抑制し、4R 体の IC_{50} 値はそれぞれ 2.1、7.8 及び 1.5nM で、4S 体の IC_{50} 値はそれぞれ 0.5、1.1 及び 0.3nM であった。イロプロストの IC_{50} 値はそれぞれ 0.8、1.7 及び 0.4 nM であった（2.6.2.2.1.4）。

以上の試験成績から、4S 体の血小板凝集抑制作用はイロプロストより強く、4R 体はイロプロストより弱いことが示された。

2.6.2.2.4　代謝物テトラノルイロプロストの効力薬理試験

参照項目：4.2.1.1.17 8172

イロプロストのヒトにおける代謝物であるテトラノルイロプロストについて、血小板凝集抑制作用及び自然発症高血圧ラットにおける血行動態作用を検討した。

ヒト多血小板血漿に、あらかじめテトラノルイロプロスト（0.1～10μg/mL）又は媒体（0.1%炭酸水素ナトリウム溶液）を添加しインキュベートした後、ADP を添加し、血小板凝集能を測定した。その結果、テトラノルイロプロストは最高濃度 10μg/mL（約 30μM）において、ヒト多血小板血漿における ADP 誘発血小板凝集をわずかに増加したが（媒体に比し最大 7%）、1μg/mL（約 3μM）まで ADP 誘発血小板凝集に影響はみられなかった。

また、テトラノルイロプロスト（媒体：0.125%炭酸水素ナトリウム含有生理食塩液）を 60μg/kg/分の用量で、麻酔下の自然発症高血圧ラット（雄性、310～400g）に 60 分間の静脈内持続投与を行ったところ、収縮期及び拡張期血圧、並びに心拍数のいずれに対しても影響はみられなかった（n＝6）。

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　各種受容体に対する結合試験

参照項目：4.2.1.2.1 8268

プロスタノイド以外の各種受容体など（約 70 種類）を用いて、イロプロストの結合能が検討されている。当該試験には、アドレナリン、アンジオテンシン、ベンゾジアゼピン、コレシストキニン、ドパミン、エンドセリン、ヒスタミン、ムスカリン、セロトニンなどの各種受容体のほかに、トランスポーター（ノルアドレナリン、ドパミン）、及びイオンチャネル（カルシウム、カリウムなど）が含まれた。

各種受容体などに対する結合能は、放射性リガンドを用いた結合試験により検討し、50%以上の放射性リガンドの結合阻害が認められた場合を「結合」と判定した。イロプロストは 10μM まで、検討したプロスタノイド以外の各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対して結合しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

イロプロスト単回投与後の中枢神経系／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対する影響について、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。これらの試験はいずれも 2001 年の ICH S7A ガイドラインの施行前に、GLP 非適用下で一般薬理試験として実施した。

イロプロストの曝露評価には、イロプロストの 1 日最大臨床推奨用量〔ヒトに 1 回 5μg を最大 9 回吸入投与（体重 50kg とした場合、0.9μg/kg に相当）〕を用いた。

2.6.2.4.1 中枢神経系及び自律神経系に及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.1 4309

イロプロストを 25～3,130μg/kg（媒体：エタノール含有 0.05M Tris 緩衝生理食塩液）の用量で、雌雄マウス（NMRI、20～25g）に単回静脈内投与及び腹腔内投与により、Irwin 試験を実施したところ、50μg/kg 未満では一般症状に対する影響はみられなかった（n＝3）。50μg/kg 以上の用量においてみられた所見を以下に示す。

静脈内投与試験：390μg/kg 以上の用量で、活動低下（自発運動の減少、体緊張の低下、眼瞼下垂）及び体温の低下、並びに自律神経系又は中枢神経系に対する刺激作用（流涙過多、散瞳、刺激時の発声、体緊張の亢進）がみられた。これらの所見は投与 4 時間後に比し 30 分後において顕著であった。

腹腔内投与試験：影響がみられた閾値用量は静脈内投与時に比し低かったものの（50μg/kg）、静脈内投与時と質的にはほぼ類似した所見がみられた。

以上の試験成績より、NOAEL（無毒性量）は 50μg/kg と考えられ、これは 1 日最大臨床推奨用量（0.9μg/kg）の約 55 倍に相当した。中枢神経系に対する影響とみられた所見は、イロプロストの血管拡張作用や血圧低下作用などの過剰な薬理作用によるものと考えられ、例えば、体温の低下は末梢での血管拡張作用による熱放出に起因したものと考えられる。

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：4.2.1.3.2 6058
4.2.1.3.3 9648
4.2.1.3.4 7318

イロプロストの心筋活動電位に及ぼす影響を検討するため、イヌの心臓プルキンエ線維及び心室筋、並びにモルモットの乳頭筋を用いて検討した。また、モルモットの拍動摘出心房を用いて、イロプロストの変力及び変時作用を検討した。

イヌ（雑種）の摘出プルキンエ線維及び心室筋（それぞれ 1Hz 及び 0.25Hz 刺激）に、イロプロスト 1pM～10μM を添加し、50％及び 95％再分極時における活動電位持続時間（APD_{50} 及び

APD_{95}）、並びに最大立ち上がり速度（V_{max}）を測定した（n＝1～5）。イロプロストは 10μM まで、イヌのプルキンエ線維及び心室筋の活動電位に特に問題となる影響を及ぼさなかった（4.2.1.3.2 参照）。同様に、雌雄モルモット（250～450g）の摘出乳頭筋（1Hz 刺激）に、イロプロスト 0.01、0.1 及び 1μM を添加し、静止膜電位、活動電位振幅、APD_{50} 及び APD_{95}、並びに V_{max} を測定したところ、イロプロストは 1μM まで、乳頭筋の活動電位に影響を及ぼさなかった（n＝6～8）（4.2.1.3.3 参照）。

また、雌雄モルモット（250～500g）の拍動摘出心房に、イロプロスト 1nM～2.15μM を添加したところ（n＝7 又は 8）、4.64nM より濃度依存的に心拍数は増加し、媒体群（対照）に比し最大 15％の増加がみられた。しかし、イロプロストは心収縮力には影響を及ぼさなかった（4.2.1.3.4 参照）。

2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験

参照項目：4.2.1.3.5 4169

イロプロスト 5 及び 20μg/kg、並びに PGI_2 1 及び 4μg/kg、又は媒体（Tris 緩衝生理食塩液）を麻酔下の雌性ウサギ（チンチラ、2.4～3.4kg）に単回静脈内投与し、心血管系、呼吸器系、胃腸管系、生殖器系に及ぼす影響を検討した（n＝6）。なお、呼吸器系、胃腸管系、生殖器系に及ぼす影響については別項に記載する（それぞれ、2.6.2.4.3、2.6.2.4.5、2.6.2.4.6）。

心血管系パラメータとして、拡張期及び収縮期血圧、心拍数を被験薬投与後 30 分間にわたって測定した。イロプロストは用量依存的に拡張期及び収縮期血圧を低下させ、5μg/kg を投与したとき、拡張期及び収縮期血圧は投与前値に比しそれぞれ最大約 50%及び約 25%低下し、20μg/kg を投与したとき、それぞれ最大約 65%及び約 40%低下した。また、心拍数は 20μg/kg を投与したとき、最大約 10%低下した。これらのイロプロストによる心血管系の作用は、30 分間の観察期間内にほぼ完全に回復した。平均動脈圧の低下がみられた 5μg/kg は、1 日最大臨床推奨用量（0.9μg/kg）の約 5.5 倍に相当した。PGI_2 1 及び 4μg/kg 投与においてもイロプロストと同様に、用量依存的な拡張期及び収縮期血圧の低下がみられ（イロプロスト 5 及び 20μg/kg 投与時とそれぞれ同程度）、4μg/kg 投与により心拍数低下がみられた（イロプロスト 20μg/kg 投与時と同程度）。

イロプロストの心血管系に対する作用については、効力を裏付ける試験においても検討している（2.6.2.2.2.1）。いずれの試験においても、明らかな平均動脈圧の低下がみられた用量（ウサギ：6.6μg/kg、ブタ：6.66μg/kg、ラット：6μg/kg）は、1 日最大臨床推奨用量の 6 倍以上に相当した。

2.6.2.4.3 呼吸器系に及ぼす影響

摘出気管を用いた *in vitro* 試験、及び麻酔下のウサギを用いた *in vivo* 試験（2.6.2.4.2.2）において、イロプロストの呼吸器系に及ぼす影響を検討した。

2.6.2.4.3.1 *In vitro* 試験

参照項目：4.2.1.3.6 4157

雌性モルモット（Pirbright white、300～400g）及び雌性ウサギ（ノウサギ、2.5～3.5kg）より気管を摘出し、それぞれリング標本を作製した。モルモットの摘出気管リング標本に、イロプ

ロスト（2 及び 4μg/mL）及び PGI_2（0.002～2μg/mL）を添加した（n＝4）。イロプロストは 4μg/mL（＞10μM）において、弱いが収縮作用を示した。PGI_2 はイロプロストと同様に高濃度で弱いが収縮作用を示した。また、ウサギの摘出気管リング標本に、アセチルコリンを添加後、イロプロスト（2 及び 4μg/mL）及び PGI_2（2 及び 4μg/mL）を添加した（n＝4）。イロプロストはいずれの濃度においても、アセチルコリン誘発収縮をわずかに阻害した。同様に、PGI_2 はいずれの濃度においても、アセチルコリン誘発収縮をわずかに阻害した。

2.6.2.4.3.2　*In vivo* 試験

参照項目：4.2.1.3.5 4169

イロプロスト 5 及び 20μg/kg、並びに PGI_2 1 及び 4μg/kg、又は媒体を麻酔下のウサギに単回静脈内投与し、呼吸数、呼吸気量、コンプライアンス及び呼吸抵抗を被験薬投与後 30 分間にわたって測定した（n＝6）。イロプロストの 20μg/kg 投与により、一過性であるが顕著な呼吸数の増加（投与前値に比し最大 50%の増加）及び呼吸気量の低下（投与前値に比し最大 25%の低下）がみられた。しかし、顕著な血圧低下がみられる用量である 5μg/kg において（2.6.2.4.2.2）、呼吸機能パラメータに対する明らかな影響はみられなかった。また、PGI_2 投与時（4μg/kg）にも、イロプロストと同様に、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、PGI_2 共に、コンプライアンス及び呼吸抵抗に対し明らかな影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.4　腎機能に及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.7 4474

イロプロスト 1、2、4 及び 8μg/kg/分、並びに PGI_2 0.1、0.2、0.25、0.4、0.5、0.8 及び 1μg/kg/分（媒体：Tris 緩衝液、又は 0.2%NaCl/4.3%グルコース溶液）を覚醒下の雄性ラット（Wistar、約 150g）に、3 時間の静脈内持続投与を行った（n＝8～10）（被験薬投与前及び投与後に、媒体をそれぞれ 2 時間及び 3 時間静脈内持続投与した）。合計 8 時間の静脈内持続投与の期間、1 時間ごとに尿を採取し、尿量、尿中ナトリウム及びカリウム排泄量を測定した。

イロプロストの投与により、ほぼ用量依存的な尿量、尿中ナトリウム及びカリウム排泄量の低下がみられ、投与前値に比しそれぞれ最大 50～100%、90～100%及び 70～100%低下した。イロプロスト投与後 3 時間の媒体投与期間中に、これらパラメータは投与前値に回復する傾向がみられた。PGI_2 についても同様に、尿量、尿中ナトリウム及びカリウム排泄量のほぼ用量依存的な低下がみられ（投与前値に比しそれぞれ最大 30～70%、90～100%及び 60～100%の低下）、PGI_2 投与後 3 時間の媒体投与期間中に回復傾向がみられた。

2.6.2.4.5　胃腸管系に及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.6 4157
4.2.1.3.8 4047
4.2.1.3.9 5962
4.2.1.3.5 4169

腸管平滑筋を用いた *in vitro* 試験、並びにラット及びウサギを用いた *in vivo* 試験において、イロプロストの胃腸管系に及ぼす影響を検討した。

摘出回腸（4.2.1.3.6 参照）：雌性モルモット（Pirbright white、300～400g）より摘出した回腸に、イロプロスト（0.5～500ng/mL：1.4nM～1.4μM）及び PGI_2（5～5,000ng/mL）を添加した（n＝4）。イロプロストは用量依存的に摘出回腸を収縮させた。PGI_2 は同様に、用量依存的に摘出回腸を収縮させ、作用強度はイロプロストとほぼ同程度であった。

麻酔ラット（4.2.1.3.8 参照）：麻酔下の雄性ラット（Wistar、約 270g）を用いて、胃酸分泌を測定するために胃を灌流装置に接続した。胃酸分泌を促すため、当該ラットにヒスタミンの静脈内持続投与（計 120 分間）を開始し、持続投与開始 60 分後、更に、イロプロスト（4μg/kg/分、媒体：生理食塩液）並びに PGI_2（2 及び 20μg/kg/分、媒体：0.15M Tris 緩衝液）を静脈内持続投与（計 60 分間）した（n＝5 又は 6）。イロプロストはヒスタミンにより促進された胃酸分泌を約 30%抑制した。PGI_2 は同様に、胃酸分泌を抑制した（2 及び 20μg/kg/分で、それぞれ約 30%及び約 55%）。

覚醒ラット（4.2.1.3.9 参照）：覚醒下の雄性ラット（Wistar、約 200g）を用いて、イロプロスト及び PGI_2（媒体は共に、0.15M Tris 緩衝液）の胃内容排出速度、腸管内輸送能、ヒマシ油誘発による下痢、及び小腸内液量に及ぼす影響を検討した。測定項目ごとに以下に記載する。

胃内容排出速度：イロプロスト（10、50、250μg/kg）及び PGI_2（10、100、1,000μg/kg）をラットに単回皮下投与し、その 10 分後、フェノールレッド含有メチルセルロース溶液を経口投与した（n＝6）。更に、20 分後にラットを屠殺し、胃内に残存するフェノールレッド量から胃内容排泄速度を評価したところ、イロプロストは 250μg/kg で胃内容排出をほぼ完全に抑制した。PGI_2 は 1,000μg/kg で胃内容排出をほぼ完全に抑制した。

腸管内輸送能：イロプロスト（10、100、500μg/kg）及び PGI_2（100～1000μg/kg）をラットに単回皮下投与し、その 10 分後、寒天グラファイト懸濁液を経口投与した（n＝6～12）。更に、30 分後にラットを屠殺し、寒天グラファイトの腸管内輸送距離を測定した。イロプロストは用量依存的に寒天グラファイトの腸管内輸送を抑制し、100μg/kg で約 90%抑制した。PGI_2 は同様に、用量依存的に寒天グラファイトの腸管内輸送を抑制し、500μg/kg で約 90%抑制した。

ヒマシ油誘発による下痢：イロプロスト（500、750、1,000μg/kg）及び PGI_2（1,000μg/kg）をラットに単回皮下投与し、その 10 分後、下痢を促す目的でヒマシ油を経口投与した（n＝10）。その後、下痢が発現するまでの時間を測定した。対照群にはヒマシ油のみを経口投与した。対照群ではすべての動物で 1 時間以内に下痢が発現したのに対し、イロプロストでは用量依存的に下痢の発現が遅延した（2～4 時間に発現）。PGI_2 では同様に下痢の発現が遅延したが（1～2 時間に発現）、イロプロストに比し作用は弱かった。

小腸内液量：イロプロスト及び PGI_2（8～1,000μg/kg）をラットに単回皮下投与し、その 10 分後、ヒマシ油を経口投与した（n＝6）。更に、30 分後にラットを屠殺し、小腸内液量を測定した。対照群にはヒマシ油のみを経口投与した。対照群でみられた小腸内液量の増加は、イロプロストの 50μg/kg でほぼ完全に抑制された。同様に、PGI_2 の 250μg/kg で、小腸内液量の増加はほぼ完全に抑制された。

ウサギ（2.6.2.4.2.2、4.2.1.3.5 参照）：イロプロスト 5 及び 20μg/kg、並びに PGI_2 1 及び 4μg/kg、又は媒体を麻酔下のウサギに単回静脈内投与し、腸内圧を被験薬投与後 30 分間にわたって測定した（n＝6）。イロプロストの 20μg/kg で、軽微かつ一過性の腸内圧の上昇がみられた。PGI_2 の 4μg/kg でも同様な作用がみられた。

以上の試験成績をまとめると、イロプロストは PGI_2 と同様に、*in vitro* で摘出回腸に対し収縮作用を示し、*in vivo* 試験において、胃酸分泌抑制作用、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を示すことが確認された。

2.6.2.4.6　　雌性生殖器に及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.10 8991
4.2.1.3.11 9105
4.2.1.3.6 4157
4.2.1.3.5 4169
4.2.1.3.12 4447

ヒト及びモルモットの摘出子宮筋を用いた *in vitro* 試験、並びにウサギ及びモルモットを用いた *in vivo* 試験において、イロプロストの雌性生殖器に及ぼす影響を検討した。

摘出子宮筋：

ヒト：子宮摘出術を実施した閉経前の患者より得た非妊娠子宮筋に、イロプロスト（～28nM）及び PGI_2 を添加した（n＝5 又は 7）（4.2.1.3.10 参照）。イロプロスト、PGI_2 共に、摘出子宮筋に対し収縮・弛緩の二相性の作用を示した。すなわち、イロプロストは 0.028～28nM で、濃度依存的な摘出子宮の弛緩作用を示し（最大弛緩時間：7.6 分間）、一方、被験薬添加前の背景データと同程度の収縮作用がみられる濃度（ED_1）は 2.74nM と算出された。PGI_2 の最大弛緩時間及び ED_1 値は、それぞれ 11.7 分間及び 3.65nM であった。また、帝王切開術を実施した患者より得た妊娠子宮筋に、イロプロスト（～13.9nM）を添加したところ、非妊娠子宮筋における作用と同様に、妊娠子宮筋に対して収縮・弛緩の二相性の作用を示した（n＝6）（4.2.1.3.11 参照）。

モルモット：雌性モルモット（300～400g）より摘出した子宮に、イロプロスト（1.25～125ng/mL：3.5～350nM）及び PGI_2（62.5ng/mL）を添加したところ、イロプロストは用量依存的に摘出子宮を収縮させた。PGI_2 は同様に、摘出子宮を収縮させた（n＝4）（4.2.1.3.6 参照）。

ウサギ（2.6.2.4.2.2、4.2.1.3.5 参照）：イロプロスト 5 及び 20μg/kg、並びに PGI_2 1 及び 4μg/kg、又は媒体を麻酔下のウサギに単回静脈内投与し、子宮内圧及び子宮運動（子宮収縮の振幅を指標）を被験薬投与後 30 分間にわたって測定した（n＝6）（2.6.2.4.2.2）。イロプロストは子宮内圧及び子宮運動に影響を及ぼさなかった。PGI_2 も同様に子宮内圧及び子宮運動に影響を及ぼさなかった。

モルモット（4.2.1.3.12 参照）：妊娠した雌性モルモット（Pirbright white、約 1kg）を用いて、イロプロスト（媒体：安息香酸ベンジルとヒマシ油を 1 対 2 の割合で混合した溶液）を 0.3、1、3mg/kg の用量で（n＝3、実験 1）、又は 0.03、0.1、0.3mg/kg の用量で（n＝5、実験 2）、妊娠後 43 及び 44 日目に皮下投与した。実験 1 において、1 及び 3mg/kg を投与した全動物が流産せずに死亡した。また、実験 2 において、0.1mg/kg 以上の用量で母動物に流産及び死亡がみられ、0.3mg/kg を投与した全動物が死亡した。これらの試験成績より、イロプロストに流産促進作用のある可能性が示唆された。

2.6.2.5　　薬力学的薬物相互作用

添付資料なし。

2.6.2.6 考察及び結論

イロプロストは、PGI_2 の化学的に安定な誘導体である。イロプロストの薬理学的特性について、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討されている。

ヒト PGI_2 受容体（IP）を発現させた HEK293 細胞を用いた放射性リガンド結合試験において、イロプロストは IP に対する高い結合親和性を示し、その K_i 値は 3.9nM 又は 11nM であった。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 産生を増強させた。このように、イロプロストは、血管平滑筋及び血小板の IP への結合を介して、アデニレートシクラーゼを活性化し、cAMP 産生を促進させると考えられる。

IP 以外の各種プロスタノイド受容体（EP_1、EP_2、EP_3、EP_4、DP_1、FP、TP）に対するイロプロストの結合性が検討された結果、EP_1（PGE_2 受容体のサブタイプ）に対する結合親和性の K_i 値は 1.1 又は 11nM であったが、その他のプロスタノイド受容体に対するイロプロストの結合性は弱かった。

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、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、並びに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。また、麻酔下のウサギ及びブタを用いた *in vivo* 試験において、肺動脈圧及び平均動脈圧の低下がみられ、イロプロストによる血管拡張作用が示された。同様に、麻酔下のラットにおいて平均動脈圧の低下がみられた。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に対し、イロプロストは抑制作用を示した。以上のように、イロプロストは、cAMP の産生を促進することにより、血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用を発揮することが確認された。

また、*in vitro* において、イロプロストの細胞増殖抑制作用及び炎症性サイトカイン産生抑制作用が検討された。牛胎児血清又は 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することが確認された。また、LPS により 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 産生を抑制することが確認された。

U46619 誘発によるウサギ肺高血圧症モデルを用いた *in vivo* 試験において、イロプロストの臨床投与経路である吸入投与により検討され、肺動脈圧及び肺血管抵抗が低下することが確認された。また、U46619 誘発による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。更に、低酸素誘発によるイヌ肺高血圧症モデルにおいて、イロプロストの前投与により肺動脈圧及び肺血管抵抗の上昇が抑制された。

イロプロストは 4R-及び 4S-メチル-ジアステレオ異性体の混合物であることから、ジアステレオ異性体（4R 体及び 4S 体）のそれぞれについて、血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用が検討された。4R 体及び 4S 体は共に、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、及びラットを用いた *in vivo* 試験において、それぞれ収縮阻害作用及び平均動脈圧の低下作用を示した。また、薬物誘発血小板凝集に対しても、4R 体及び 4S 体は共に血小板凝集抑制作用を示した。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と比較すると、いずれの作用も 4S 体で強く、4R 体で弱かった。

したがって、イロプロストは、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。また、*in vitro* 試験でみられた、イロプロストの炎症性サイトカイン産生抑制作用や肺動脈血管平滑

筋細胞の増殖抑制作用についても、抗肺高血圧効果に寄与することが示唆される。なお、イロプロストは平滑筋収縮に関与している EP_1 にも結合親和性を有し、細胞内カルシウム濃度を上昇させることが確認されている（4.2.1.1.2 参照）が、EP_1 は主に腎臓に分布しているのに対し[4]、IP は主に肺、心臓や動脈に分布している[5]ことが報告されている。加えて、前述したように、ヒト摘出肺血管やラット摘出灌流肺、並びにウサギ及びブタを用いた *in vivo* 試験において、イロプロストによる肺血管収縮阻害作用及び肺動脈圧の低下がみられていることから、肺高血圧症治療に対する標的部位である肺血管においては、IP への結合を介して薬理作用を発揮しているものと推測される。

ウサギ肺高血圧症モデルにおいて、イロプロストが吸入投与で肺動脈圧の低下作用を示した用量〔吸入用量：0.4μg/kg（40ng/kg/分×10 分）〕は、臨床推奨用量（0.1μg/kg：5μg を体重 50kg に単回吸入投与した場合）と大きな開きはみられない。

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、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（主に、静脈内及び皮下投与）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有害作用が発現する可能性は示唆されなかった。

中枢神経系及び呼吸器系に対する影響は、明らかな血圧低下作用が発現する用量においてみられ、中枢神経系における閾値用量〔50μg/kg（マウス）〕及び呼吸器系に影響がみられなかった用量〔5μg/kg（ウサギ）〕は 1 日最大臨床推奨用量（0.9μg/kg）に比しそれぞれ 55 倍及び 5.5 倍高かったことから、十分な安全域があると考えられる。

また、イロプロストのモルモット及びイヌ心筋活動電位アッセイにおいて影響がみられなかったこと、並びにヒトでの QTc 評価試験においてイロプロストの吸入投与は心電図パラメータに臨床的に意味のある影響を及ぼさなかったことから（2.7.2.3.2.3 参照）、イロプロストが臨床使用において QT 間隔延長作用を発現する可能性は示唆されなかった。

以上のことから、イロプロストは、cAMP 産生を促進し、主に血管拡張作用や血小板凝集抑制作用により肺高血圧症の改善効果を示すと考えられる。また、臨床投与経路である吸入投与により肺高血圧症モデル動物における肺動脈圧の低下作用が確認されている。したがって、イロプロストに関する非臨床薬理試験で明らかとなった効力及び安全性に関わる薬理学的特性から、イロプロストは肺高血圧症に対する安全かつ有効な吸入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) Christman BW et al., N Engl J Med 1992:327:70-75 (4.3.1 に添付)

2) Tuder RM et al., Am J Respir Crit Care Med 1999:159:1925-1932 (4.3.2 に添付)

3) Barst RJ et al., N Engl J Med 1996:334:296-301 (4.3.3 に添付)

4) Watanabe A et al., J Biol Chem 1993:268:20175-20178 (4.3.4 に添付)

5) Nakagawa O et al., Circulation 1994:90:1643-1647 (4.3.5 に添付)

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、2.6.3.5を参照。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test article: **Iloprost**

Primary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Report No. / Reference	Location in CTD
Prostanoid receptor binding profiling	PGI_2 or other prostanoid receptor expressing cells	*In vitro*	Merck Frosst Centre, Canada	Biochim Biophys Acta 2000-1483-285	4.2.1.1.1
			Queen Mary University of London, UK	Biochem Pharmacol 2012-84-68	4.2.1.1.2
Adenylate cyclase activation	Human platelet-rich plasma	*In vitro*	University of Genova, Italy	Pharmacol Res 1991-23-139	4.2.1.1.3
cAMP production	Human pulmonary artery smooth muscle cells	*In vitro*	University College London, UK	Am J Respir Cell Mol Biol 2002-26-194	4.2.1.1.4
	PGI_2 receptor expressing cells	*In vitro*	Queen Mary University of London, UK	Biochem Pharmacol 2012-84-68	4.2.1.1.2
Vasodilatory action	Isolated human pulmonary artery	*In vitro*	INSERM U.200, University, France	Prostaglandins 1987-33-845	4.2.1.1.5
	Isolated human pulmonary artery and vein	*In vitro*	CNRS, France	Br J Pharmacol 1999-126-859	4.2.1.1.6
	Isolated rat perfused lung	*In vitro*	University of Burgundy, France	Br J Pharmacol 1997-120-405	4.2.1.1.7
	Isolated rabbit mesenteric artery	*In vitro*	[redacted]	AF18	4.2.1.1.8
Inhibition of platelet aggregation	Human platelet-rich plasma	*In vitro*	[redacted]	AF18	4.2.1.1.8
Inhibition of proliferation of cells	Human pulmonary artery smooth muscle cells	*In vitro*	University College London, UK	Am J Respir Cell Mol Biol 2002-26-194	4.2.1.1.4
			Imperial College School of Medicine, UK	Circulation 2000-102-3130	4.2.1.1.9

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Test article: **Iloprost**

Primary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Report No. / Reference	Location in CTD
Inhibition of production of inflammatory cytokine	Human peripheral blood mononuclear cells	*In vitro*	Ludwig Maximilians university Munich , Germany	Immunopharmacology 1993-26-259	4.2.1.1.10
Pulmonary and systemic hemodynamics	Rabbit	IV	Schering AG [a)], Germany	8158	4.2.1.1.11
	Pig	IV	Schering AG [a)], Germany	8794	4.2.1.1.12
	Rat	IV	Schering AG [a)], Germany	7145	4.2.1.1.13
Efficacy in pulmonary hypertension models	U46619-induced rabbit model	Inhalation	Justus-Liebig-University Giessen, Germany	Am J Respir Crit Care Med 2001-164-1694	4.2.1.1.14
	U46619-induced pig model	IV	University of Montreal, Canada	Br J Anaesth 1996-77-227	4.2.1.1.15
	Hypoxia-induced dog model	IV	University of Minnesota, US	J Am Coll Cardiol 1986-8-1189	4.2.1.1.16
Efficacy of isomer (R-, S-diastereomer					
Vasodilatory action	Isolated rabbit mesenteric artery	*In vitro*	[redacted]	AF18	4.2.1.1.8
Inhibition of platelet aggregation	Human platelet-rich plasma	*In vitro*	[redacted]	AF18	4.2.1.1.8
Efficacy of tetranor metabolite					
Inhibition of platelet aggregation	Human platelet-rich plasma	*In vitro*	Schering AG [a)], Germany	8172	4.2.1.1.17
Systemic hemodynamics	SH-rats	IV	Schering AG [a)], Germany	8172	4.2.1.1.17

a) Currently, Bayer Pharma AG
IV = intravenous

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test article: **Iloprost**

Primary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Report No. / Reference	Location in CTD
Receptor binding assay	Radioligand	*In vitro*	[redacted]	8268	4.2.1.2.1

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Schering社（現Bayer Pharma社）、ドイツで実施された。

Test article: **Iloprost**

Safety Pharmacology - Overview

Type of Study	Test System	Method of Admin.	Report No.	Location in CTD
Central and autonomic nervous systems	Mouse	IV, IP	4309	4.2.1.3.1
Cardiovascular function	Dog Purkinje fibers and ventricular muscle	*In vitro*	6058 a)	4.2.1.3.2
	Guinea pig papillary muscle	*In vitro*	9648	4.2.1.3.3
	Guinea pig beating atria	*In vitro*	7318	4.2.1.3.4
	Rabbit	IV	4169	4.2.1.3.5
Respiratory function	Rabbit and guinea pig trachea rings	*In vitro*	4157	4.2.1.3.6
	Rabbit	IV	4169	4.2.1.3.5
Renal system	Rat	IV	4474	4.2.1.3.7
Gastrointestinal system	Guinea pig ileum strips	*In vitro*	4157	4.2.1.3.6
	Rat	IV	4047	4.2.1.3.8
	Rat	SC	5962	4.2.1.3.9
	Rabbit	IV	4169	4.2.1.3.5
Female reproductive system	Human uterus	*In vitro*	8991 b)	4.2.1.3.10
	Human uterus	*In vitro*	9105 b)	4.2.1.3.11
	Guinea pig uterus	*In vitro*	4157	4.2.1.3.6
	Rabbit	IV	4169	4.2.1.3.5
	Guinea pig	SC	4447	4.2.1.3.12

a) Performed at Berlex, Inc, US (currently, Bayer Pharma AG)
b) Performed at [redacted]
IV = intravenous, SC = subcutaneous

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test article: **Iloprost**

Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. or Doses [a]	No. per Group (Gender)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD/ (Report No.)
CNS, autonomic system (ANS)	Mouse/ NMRI	IV, IP	25, 50, 100, 200, 390, 780, 1560, 3130 µg/kg	3 (M or F)	IV doses ≥ 390 µg/kg produced depression, hypothermia, and, at high doses, ANS or CNS stimulation; intensity 30 min post dosing > 4 h later. IP dosing produced similar clinical signs but at lower doses (depression seen at doses ≥50 µg/kg).	No	4.2.1.3.1 (4309)
Cardiovascular function	Dog/ mongrel	*In vitro*	Purkinje fibers and ventricular muscle: 10^{-12} - 10^{-5} M	1 - 5	No significant electrophysiological effects in normal isolated dog Purkinje fibers and ventricular muscle	No	4.2.1.3.2 (6058)
	Guinea pig	*In vitro*	Papillary muscle: 10^{-8} - 10^{-6} M	6 - 8 (M or F)	No effect on electrophysiological properties of guinea pig ventricular papillary muscle	No	4.2.1.3.3 (9648)
	Guinea pig	*In vitro*	Beating atria: 10^{-9} - 2.15 X 10^{-6} M	7 or 8 (M or F)	At ≥ 4.64 X 10^{-9} M, concentration- dependent increase in heart rate by maximally 15 % compared to control (solvent)	No	4.2.1.3.4 (7318)
	Rabbit/ Chinchilla	IV	5, 20 µg/kg	6 (F)	In anesthetized rabbits, decrease in blood pressure and heart rate at the 20 µg/kg	No	4.2.1.3.5 (4169)

[a] Single dose unless specified otherwise.

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test article: **Iloprost**

Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. or Doses [a]	No. per Group (Gender)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD/ (Report No.)
Respiratory function	Rabbit/ Hare; Guinea pig/ Pirbright white	*In vitro*	Isolated trachea: 2.0, 4.0 µg/mL	4 (F)	Weak inhibition of acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit trachea rings; non-significant increase in basal tone in isolated guinea pig trachea rings.	No	4.2.1.3.6 (4157)
	Rabbit/ Chinchilla	IV	5, 20 µg/kg	6 (F)	In anesthetized rabbits, transient increase in respiratory rate and decrease in respiratory volume at the 20 µg/kg; no effect on lung compliance or bronchial resistance	No	4.2.1.3.5 (4169)
Renal function	Rat/ Wistar	IV	1, 2, 4, 8 µg/kg/min	8 -10 (M)	In conscious rats, dose-dependent decrease in urine flow, sodium excretion and potassium excretion	No	4.2.1.3.7 (4474)
Gastrointestinal function	Guinea pig/ Pirbright white	*In vitro*	Isolated ileum: 0.5 - 500ng/mL	4 (F)	Concentration-dependent contraction	No	4.2.1.3.6 (4157)
	Rat/ Wistar	IV	4 µg/kg/min: 60min dose duration	6 (M)	Inhibition of histamine-stimulated gastric acid secretion in anesthetized rats	No	4.2.1.3.8 (4047)

[a] Single dose unless specified otherwise.

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test article: **Iloprost**

Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. or Doses [a]	No. per Group (Gender)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD/ (Report No.)
Gastrointestinal function	Rat/ Wistar	SC	10, 50, 250 µg/kg	6 (M)	Inhibition of gastric emptying	No	4.2.1.3.9 (5962)
	Rat/ Wistar	SC	10, 100, 500 µg/kg	6-12 (M)	Inhibition of intestinal transit	No	4.2.1.3.9 (5962)
	Rat/ Wistar	SC	500, 750, 1,000 µg/kg	10 (M)	Prevention of castor oil-induced diarrhea	No	4.2.1.3.9 (5962)
	Rat/ Wistar	SC	8-1,000 µg/kg	6 (M)	Inhibition of increase in small intestinal fluid volume	No	4.2.1.3.9 (5962)
	Rabbit/ Chinchilla	IV	5, 20 µg/kg	6 (F)	Slight, transient increase in intestinal pressure at high dose	No	4.2.1.3.5 (4169)
Female reproductive	Human	*In vitro*	2.8 x 10^{-8} M or less	7 (F)	Biphasic response in non-pregnant human uterine strips, inhibition of spontaneous contractions and stimulation of contraction of the myometrium	No	4.2.1.3.10 (8991)
	Human	*In vitro*	13.9 x 10^{-9} M or less	6 (F)	Biphasic response in uterine preparations obtained from pregnant donors not in labor, inhibition of spontaneous contractions and stimulation of contraction of the myometrium.	No	4.2.1.3.11 (9105)
	Guinea pig/ Pirbright white	*In vitro*	1.25-125 ng/mL	4 (F)	Concentration-dependent contraction	No	4.2.1.3.6 (4157)

[a] Single dose unless specified otherwise.

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test article: **Iloprost**

Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. or Doses [a]	No. per Group (Gender)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD/ (Report No.)
Female reproductive	Rabbit/ Chinchilla	IV	5, 20 µg/kg	6 (F)	No effects on intrauterine pressure and amplitude of uterine contractions	No	4.2.1.3.5 (4169)
	Guinea pig/ Pirbright white	SC	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/animal/day on Days 43-44 of pregnancy	3 - 5 (F)	Spontaneous abortions observed at doses of 0.1 mg/animal/day and higher; in one study 5 of 5 dams died at the 0.3 mg/animal/day dose. All dams died at the 1 and 3 mg/animal/day doses, without prior abortions.	No	4.2.1.3.12 (4447)

[a] Single dose unless specified otherwise.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

添付資料なし。