2.6.6　毒性試験の概要文の目次

2.6.6.1　まとめ 3

2.6.6.2　単回投与毒性試験 8
2.6.6.2.1　マウス単回投与毒性試験 8
2.6.6.2.1.1　経口投与 8
2.6.6.2.1.2　静脈内投与 8
2.6.6.2.2　ラット単回投与毒性試験 9
2.6.6.2.2.1　経口投与 9
2.6.6.2.2.2　静脈内投与 9
2.6.6.2.3　ウサギ単回投与毒性試験 9
2.6.6.2.3.1　静脈内投与 9
2.6.6.2.4　サル単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.4.1　静脈内投与 10

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 11
2.6.6.3.1　ラット反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.1　吸入投与 11
2.6.6.3.1.1.1　4 週間反復吸入投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.1.2　26 週間反復吸入投与毒性試験 13
2.6.6.3.1.2　経口投与 14
2.6.6.3.1.2.1　2 週間反復経口投与試験 14
2.6.6.3.1.2.2　28 週間反復経口（混餌）投与試験 14
2.6.6.3.1.3　静脈内投与 16
2.6.6.3.1.3.1　短期反復静脈内投与試験 16
2.6.6.3.1.3.2　28 週間反復静脈内持続投与試験 17
2.6.6.3.2　イヌ反復投与毒性試験 18
2.6.6.3.2.1　経口投与 18
2.6.6.3.2.2　皮下投与 18
2.6.6.3.3　サル反復投与毒性試験 19
2.6.6.3.3.1　経口投与 19
2.6.6.3.3.2　静脈内投与 21

2.6.6.4　遺伝毒性試験 22
2.6.6.4.1　*In vitro* 試験 22
2.6.6.4.1.1　細菌を用いる復帰変異原性試験 22
2.6.6.4.1.2　哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 22

2.6.6.4.2　*In vivo* 試験 23
2.6.6.4.2.1　マウス骨髄小核試験 23

2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 24
2.6.6.5.1　マウスを用いるがん原性試験 24
2.6.6.5.1.1　混餌投与試験 24
2.6.6.5.1.2　強制経口投与試験 25
2.6.6.5.2　ラットを用いるがん原性試験 26
2.6.6.5.2.1　混餌投与試験 26
2.6.6.5.2.2　強制経口投与試験 27

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 29
2.6.6.6.1　受胎能及び初期胚発生に関する試験 29
2.6.6.6.2　胚・胎児発生に関する試験 30
2.6.6.6.2.1　ラット胚・胎児発生に関する試験 30
2.6.6.6.2.2　ウサギ胚・胎児発生に関する試験 31
2.6.6.6.2.2.1　経口投与試験 31
2.6.6.6.2.2.2　静脈内投与試験 32
2.6.6.6.2.3　サル胚・胎児発生に関する試験 32
2.6.6.6.3　出生前及び出生後発生に関する試験 33
2.6.6.6.4　ラット受胎能及び初期胚、胚・胎児、出生前及び出生後発生を併合した試験 34

2.6.6.7　局所刺激性試験 35

2.6.6.8　その他の毒性試験 35
2.6.6.8.1　皮膚感作性試験 35
2.6.6.8.2　抗原性試験 35
2.6.6.8.3　不純物の毒性評価 36
2.6.6.8.4　異性体の毒性評価 36
2.6.6.8.4.1　単回経口投与毒性 36
2.6.6.8.4.2　単回静脈内投与毒性 36
2.6.6.8.4.3　反復投与毒性 37

2.6.6.9　考察及び結論 38

2.6.6.10　図表 43

引用文献一覧 44

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

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。はじめにイロプロストは、末梢血管閉塞性疾患又はレイノー症候群に対する静脈内投与（持続注入）又は経口投与による治療薬としての開発が行われたことから、非臨床安全性試験の大半は、げっ歯類（ラット、マウス）及び非げっ歯類（イヌ、ウサギ、サル）を用いた静脈内（主として持続注入）、経口又は皮下投与経路で実施されている。更に、本薬剤の開発初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為、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であ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。

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（主として静脈内）及び経口投与による非臨床試験成績に基づいて評価が可能と考えられる。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。予定される吸入投与時の臨床曝露量（Cmax；吸入投与による日本人 PK 試験の平均 Cmax、或いは推定最大 AUC_{0-24}）と反復投与毒性試験における無毒性量での曝露量（Cmax 又は平均血漿中濃度、或いは AUC_{0-24}）との比較に基づく安全域（MoE）を、**表 2.6.6.9- 1**に示した。

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の成績を本概要文に、毒性試験一覧表を**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。

毒性試験成績を以下に要約する。

表 2.6.6.1- 1 毒性試験一覧表

Study Type and Duration	Route Administered	Species	Compound Administered	Report Number
Single dose toxicity				
Single-dose	IV & PO	Mice Rats	Iloprost	4300, 5359, 5389 4301, 5362, AI62,
Single-dose	IV & IV-infusion	Rabbits Monkeys	Iloprost	5326 AL54, AL83
Repeated-dose toxicity				
4 & 26 weeks	Inhalation	Rats	Iloprost	A01317 & A04447
10-16 days	IV-infusion & PO (Gavage)	Rats and Monkeys	Iloprost	4544, 4545,4739, 4858/II, 5456
4 weeks	PO (in diet)	Mice	Iloprost clathrate	A040
4 weeks	IV-infusion	Rats	Iloprost	6075
4 weeks	IV-infusion	Monkeys	Iloprost	5482
12 weeks	PO (Gavage)	Mice	Iloprost clathrate	96028
27 -28 weeks	IV-infusion & PO (in diet)	Rats	Iloprost & iloprost clathrate	AC52, 7948
26 weeks	SC-infusion	Dogs	Iloprost	7949
53 weeks	PO (capsule)	Dogs	Iloprost clathrate	A706
Genotoxicity				
In vitro	-	Bacteria and Mammalian cells	Iloprost	5169, 7466, 7548, 7429, 7160
In vivo	IV	Mice	Iloprost	5360
Carcinogenicity				
2 years	PO (in diet & Gavage)	Mice and Rats	Iloprost clathrate	AP21, AW35[a], BC60, BC61
Reproductive and Development toxicity				
Fertility and embryonic development	IV-infusion	Rats	Iloprost	7778, 7569
Embryo-fetal development	IV-infusion	Rats and Monkeys	Iloprost	7779, 8493
	IV-infusion & PO (Gavage)	Rabbits	Iloprost & iloprost clathrate	97005, 7440
Peri- and postnatal development	IV-infusion	Rats	Iloprost	7780
Combined study	PO (Gavage)	Rats	Iloprost clathrate	97004
Other toxicity				
Dermal sensitization	dermal	Guinea-pig	Iloprost	9908
Antigenicity	SC	Guinea-pig	Iloprost	AM20
Single-dose toxicity	IV	Rats	Stressed iloprost	AL64
	IV & PO (Gavage)	Rats	Isomers (S /R)	AI61, AL26
4 weeks repeated	PO	Rats	Isomers(S /R) & iloprost clathrate	AN54

IV: intravenous, PO: per os, SC: subcutaneous, a: 95-97 weeks

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、肺うっ血、肺浮腫、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 例が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、剖検時に異常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。

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、薬剤投与と関連の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、コレステロール及び総脂質濃度の低下が認められた。コレステロール及びリン脂質濃度の低下に関しては、摂餌量の変化及び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も支持される。

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極めて良好であった。ラットよりもイロプロストによる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関連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用量での吸入療法による副作用は予想されない。

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。

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。

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反復経口(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。

生殖発生毒性試験

雄又は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・胎児発生毒性試験において、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は十分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、ラット及びウサギにイロプロスト徐放性製剤を（器官形成期に）強制経口投与した胚・胎児発生に関する試験においては、いずれの試験用量においても胚致死作用及び催奇形性は認められなかった。

イロプロストを静脈内投与又はその徐放性製剤を強制経口投与した雌ラットにおける出生前・出生後発育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育の障害は認められなかった。

局所刺激性試験

ラットを用いた4及び26週間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。

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の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。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

イロプロストの単回強制経口投与及び静脈内投与後による急性毒性試験をげっ歯類及び非げっ歯類を用いて実施した。技術的に投与可能なエアロゾルの最高用量を長期反復吸入投与後においても毒性所見は認められなかったことから、単回吸入投与時の致死量を求めるための急性毒性試験は実施しなかった。単回投与毒性試験の試験デザイン及び得られた概略の致死量（最小致死量）を**表 2.6.6.2- 1**に示す。また、試験成績一覧を 2.6.7.5 に示す。

表 2.6.6.2- 1 イロプロスト強制経口及び静脈内投与による単回投与毒性試験のデザイン及び概略の致死量（最小致死量）

Species	No. of animals per dose and sex	Route of administration	Minimal lethal dose [mg/kg] (Approximate lethal dose)	Report No.
Mice	3M	PO(Gavage)	M: > 100	4300
Rats	3M	PO(Gavage)	M: > 100	4301
Mice	10M	IV	M: 150	5359
	10F	IV	F: 125	5389
Rats(Wistar)	5M/5F	IV	M: 100, F: 50	5362
(SD)	5M/5F	IV	M: 65, F: 81	AI62
Rabbits	3M/3F	IV	15≧ M >5, F: 5	5326
Monkeys	1M/1F	IV	M, F: >5	AL54
	1-2M	IV-infusion	M: 3.75	AL83

M: Male, F: Female, PO: per os, IV: intravenous

2.6.6.2.1 マウス単回投与毒性試験

2.6.6.2.1.1 経口投与

参照項目：4.2.3.1.1 4300

NMRI 系雄マウスへのイロプロスト強制単回経口投与後の主な所見は、アパシー、側臥又は腹臥位、皮膚の発赤及び歩行障害であった。すべての試験用量（40～100mg/kg）において、投与後 20 分から 3 時間後までに臨床症状が認められた。イロプロスト投与に関連した死亡は認められなかった。また、14 日目の屠殺時の剖検で異常所見は認められなかった。概略の致死量は 100mg/kg より大きかった。

2.6.6.2.1.2 静脈内投与

参照項目：4.2.3.1.2 5359
4.2.3.1.3 5389

NMRI 系雌雄マウスへのイロプロスト静脈内単回投与後に認められた主な所見は、アパシー、眼瞼閉鎖、側臥又は腹臥位、歩行障害、呼吸促進、あえぎ呼吸、振戦・けいれん、意識消失及び死亡であった。すべての用量（125～300mg/kg）で投与直後から 4 日目までに臨床症状がみられた。投与部位周囲の発赤及び壊死を含む尾の青色変色も認められた。死亡は投与直後から 4 日目までにみられた。死亡動物における剖検所見として、肝臓の蒼白化、肺のうっ血、肺浮腫が認められた。14 日目の屠殺時の剖検所見として投与部位の壊死が認められた。概略の致死量は雄で 150mg/kg、雌で 125mg/kg であった。

2.6.6.2.2　　ラット単回投与毒性試験

2.6.6.2.2.1　　経口投与

参照項目：4.2.3.1.4　4301

Wistar 系雄ラットへのイロプロスト強制単回経口投与後に認められた主な所見は、アパシー、腹臥位、歩行障害、皮膚の発赤、流涙・流涎増加及び下痢であった。すべての試験用量（40～100mg/kg）で投与後 20 分から 5 日目までに臨床症状が認められた。死亡は認められなかった。14 日目の屠殺時に剖検所見も認められなかった。概略の致死量は 100mg/kg より大きかった。

2.6.6.2.2.2　　静脈内投与

参照項目：4.2.3.1.5　5362
4.2.3.1.6　AI62

Wistar 系及び SD 系雌雄ラットへのイロプロスト静脈内単回投与後に認められた主な所見は、死亡、アパシー・運動性低下、腹臥又は側臥位、瞳孔散大、正向反射消失、体温低下、歩行障害、振戦、間代性痙攣、後肢痙攣、四肢腫脹、疼痛症状、被毛の乱れ（wet fur）、流涙過多、流涎、黒色調便、四肢及び耳の発赤、結膜炎及び閉眼であった。すべての用量（50～200mg/kg）で投与直後から 3 日目までに臨床症状が認められた。投与部位周囲の壊死を含む尾の青色変色が認められた。死亡は投与直後から 4 日目までにみられた。生存例では試験 3 日目まで一過性の体重及び摂餌量減少がみられたが、7 日目には回復した（SD 系）。死亡動物における剖検所見として、胃粘膜における発赤及び黒色巣又は除去容易な斑状沈着物・血餅付着、小腸暗色内容物が認められた。7 又は 14 日目の屠殺時の剖検所見として投与部位の壊死及び胸腺縮小が認められた。屠殺時の病理組織学的検査で腺胃粘膜の浮腫及びびらん、肝臓及び脾臓における髄外造血、胸腺萎縮が 1 試験に認められた。概略の致死量は Wistar 系雄で 100mg/kg、雌で 50mg/kg、SD 系雄で 65mg/kg、雌で 81mg/kg であった。

2.6.6.2.3　　ウサギ単回投与毒性試験

2.6.6.2.3.1　　静脈内投与

参照項目：4.2.3.1.7　5326

NZW 系雌雄ウサギへのイロプロスト単回静脈内投与後に認められた主な所見は、死亡、アパシー、呼吸速迫、縮瞳、眼瞼閉鎖、耳及び眼瞼の赤色化、啼鳴、振戦・けいれんであり、投与直後に発現した。低用量 2.5mg/kg を含むすべての用量で臨床症状が認められた。死亡は、静脈内投与 1 時間後及び 2 日目までに認められた。死亡動物又は 15 日目に屠殺した動物に特記すべき剖検所見は認められなかった。概略の致死量は雄で 15 と 5mg/kg の間、雌では 5mg/kg であった。

ウサギはげっ歯類に比してイロプロストの静脈内投与により、臨床症状を誘発する用量及び致死量が低かった。

2.6.6.2.4　サル単回投与毒性試験

2.6.6.2.4.1　静脈内投与

参照項目：4.2.3.1.8　AL54
4.2.3.1.9　AL83

各群雌雄各 1 例のカニクイザルにイロプロストの 2.5 又は 5.0mg/kg を単回静脈内投与後に認められた主な所見は、自発活動の低下、口腔粘膜又は皮膚の発赤、しゃがみ込み、背臥又は側臥位、虚脱であった。臨床症状は投与直後に発現し 5～6 時間以内に消失した。死亡例は認められなかった。すべての動物において投与 30 分後に CPK の上昇（筋障害を示唆）が認められた。2.5mg/kg を投与した 1 例において、病理組織学的検査で肝臓に軽度な脂肪化が認められたが、イロプロスト投与に関連した病理組織学的な臓器毒性所見は認められなかった。概略の致死量は 5mg/kg より大きかった（報告書 AL54）。

3 例の雄性カニクイザルにイロプロストの 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0（1 例のみ）mg/kg を各々30 分以上かけて静脈内へ持続投与（投与速度約 10mL/30 分）した用量漸増試験において、3 例中 2 例が死亡した。試験中にモニタリングした収縮期血圧の変化から、これら動物の死因は重度の血圧低下に起因したものと考えられた。総用量 7.75mg/kg を投与した動物（1 例）は投与約 3 時間後に死亡し、総用量 3.75mg/kg を投与した動物 1 例は、投与翌日（午前中）に死亡した。死亡例においては、軽度から重度の虚脱、自発活動の低下、伸筋の緊張性痙攣、心筋虚血を示唆する ECG の変化（ST 低下や T 波逆転など）、CPK の一過性の増加、並びに口腔粘膜、結膜、舌の蒼白が認められた。概略の致死量は 3.75mg/kg であった（報告書 AL83）。

サルはイロプロストの静脈内投与による臨床症状を誘発する用量及び致死量が、げっ歯類よりも低かった。しかしながら、その概略の致死量は臨床用量 0.9μg/kg/日と比較して十分（4000 倍以上）高かった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1 ラット反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 吸入投与

2.6.6.3.1.1.1 4週間反復吸入投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.1 A01317
4.2.3.2.2 B784

イロプロストの吸入による反復投与時の局所及び全身毒性を評価するため、1群雌雄各5例のWistar系ラットに、1日135分間の吸入投与を連日28日間実施した。本吸入投与試験ではイロプロスト10μg/mL製剤について3段階の目標用量（0.9、3.6及び10.8μg/kg）及びイロプロスト20μg/mL製剤について2段階の目標用量（0.9及び24.6μg/kg）を設定した。試験デザインの詳細を**表2.6.6.3- 1**に示す。到達したイロプロストの最高濃度（エアロゾル）である313.4±72.1μg/m^3 airは、ラットでの（吸入可能な粒子サイズ範囲において）技術的に達成可能な最高濃度である。

表2.6.6.3- 1 ラット4週間反復吸入投与毒性試験における試験デザイン

Iloprost Concentration in Nebulizer (μg/mL)	Aerosol Concentration of Iloprost (mean[SD]) (μg/m^3 air)	MMAD (GSD)[a](μm)	Target Iloprost Dose (μg/kg/day)	Achieved Iloprost Dose[b] (μg/kg/day)	Achieved Iloprost Dose (μg/kg/min)
0 (Control)	BDL(< 2.0)	-	0	0	0
10	11.6 (4.1)	1.76 (2.17)	0.9	0.84	0.006
10	49.8 (11.9)	1.78 (2.33)	3.6	3.55	0.026
10	125.6 (38.8)	1.37 (2.49)	10.8	9.15	0.068
20	14.3 (12.3)	1.80 (2.34)	0.9	1.05	0.008
20	313.4 (72.1)	1.29 (2.28)	24.6	22.6	0.167

Control: 生理食塩液, BDL: 検出限界以下
a: MMAD / GSD = 空気力学的メディアン径/ 幾何標準偏差
b:135 分の曝露時間中に到達したイロプロスト用量は 100%気道内に留まると仮定して次式より求めた:
D_L= Ec x MV x T/ BW
D_L = 薬剤到達量(μg active compound/kg body weight)
Ec = チャンバー内実濃度(μg active compound/L air)
MV = Guyton の公式〔$BW(g)^{0.75}$ x 2.1〕による分時容量(mL/min)
T = 時間, 1日曝露時間 (分)
BW = 測定時平均体重(g)

死亡及び投与反応に関して動物を観察した。体重及び摂餌量を毎週測定した。

剖検前にすべての動物から採取した血液及び尿試料について臨床検査を実施した。剖検後、臓器／組織標本を保管し、組織学的検査に供した。すべての動物から採取した呼吸器、及び高用量2群及び対照群のすべての動物から採取した組織の病理組織学的検査を実施した。サテライト動物から血液を採取し、イロプロストの血清中濃度及び薬物動態パラメータを評価した。

試験成績を2.6.7.7A A01317に示す。

一般症状、摂餌量及び体重の測定、血液及び尿の臨床検査、剖検、臓器重量、並びに病理組織学的検査所見において、イロプロスト投与に関連した明確な影響は認められなかった。イロプロスト投与に関連する可能性のある所見として、雄のすべてのイロプロスト投与群で血漿中ビリルビン濃度の低下、10μg/mL 濃度製剤の高用量（実投与量 9.15μg/kg）群及び 20μg/mL 濃度製剤の 2 用量（1.05 及び 22.6μg/kg）群の雌では総脂質、コレステロール、リン脂質濃度の低下が認められた。これらの変動は肝臓を含むいずれの臓器にも病理組織学的異常所見を伴わず、毒性所見とは考えられなかった。また、20μg/mL 濃度製剤の高用量群雌で肺の絶対重量増加がみられたが、肺に組織学的異常所見は認められなかった。したがって、ラット 4 週間の反復吸入投与試験における無毒性量は 22.6μg/kg と推定した。

イロプロストの 4 週間吸入投与試験における、平均血清中濃度の経時的変化から算出した PK パラメータを**表 2.6.6.3- 2** に要約する。イロプロストの全身曝露量は、投与量の増加に依存して増加した。全身曝露量に性差は認められなかった（報告書 B784）。

表 2.6.6.3- 2　　ラット 4 週間反復吸入投与毒性試験における薬物動態パラメータ

	Actual Inhalated Dose					
	0.84 µg/kg		9.15 µg/kg		22.6 µg/kg	
Parameter	Day 1	Day 26	Day 1	Day 26	Day 1	Day 26
Cmax (pg/mL)	<50	n.c.	617	453	766	677
Tmax (h)	N/A	N/A	1.5	0.25	2.25	2.25
$AUC_{0\text{-}Tlast}$ (pg･h/mL)	N/A	N/A	961	910	1309	1409

雌雄合算. n.c.: 計算せず
Cmax = maximum concentration of drug in serum
Tmax = time to reach Cmax
$AUC_{0\text{-}tlast}$ = area under the concentration versus time curve from dosing time to the last time point
N/A = not applicable

2.6.6.3.1.1.2　　26 週間反復吸入投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.3　A04447
4.2.3.2.4　A05405

イロプロストの長期吸入投与時の全身毒性を評価するため、1 群雌雄各 20 例の Wistar 系ラットに、1 日 135 分又は 240 分の吸入投与を連日 26 週間実施した。吸入には 20μg/mL 製剤の 3 段階の目標用量を設定した。投与の詳細を表 2.6.6.3- 3に示す。中及び高用量群で用いたエアロゾルは、ラットでの呼吸可能粒子サイズ範囲において、技術的に達成可能な最高濃度である。26 週間の全投与期間において、240 分/日の投与時間は 1 日当たりで実現可能な最長投与時間である。高用量群における用量は得られた投与可能な最大用量である。患者での吸入投与での治療における目標治療用量と比較するため、低用量を選択した。投与量は 4 週間反復吸入投与毒性試験（2.6.6.3.1.1.1）成績に基づいて選択した。

表 2.6.6.3- 3　　ラット 26 週間吸入投与毒性試験における試験デザイン

Iloprost Concentration in Nebulizer (µg/mL)	Aerosol Concentration of Iloprost (mean[SD]) (µg/L air)	MMAD (GSD)[a] (µm)	Achieved Iloprost Dose (µg/kg/day)	Achieved Iloprost Dose (µg/kg/min)[b]	Duration of Daily Treatment (min)
0 (Control)	-(BLCP)	-	0	0	135
0 (Control)	-(BLCP)	-	0	0	240
20	0.051 (0.012)	1.24 – 1.73 (1.65-2.72)	3.55	0.026	135
20	0.402 (0.060)	0.92 – 2.14 (1.83-2.37)	27.8	0.206	135
20	0.396 (0.065)	1.40 – 1.82 (1.88-2.49)	48.7	0.203	240

Control: 0.9% NaCl solution, BLCP: 最小検定値未満(<0.36µg/mL)
a: MMAD / GSD = 空気力学的メディアン径/ 幾何標準偏差
b:曝露時間中に到達したイロプロスト用量は 100%気道内に留まると仮定して次式より求めた:
D_L= Ec x MV x T/ BW
D_L = 薬剤到達量(µg active compound/kg body weight)
Ec = チャンバー内実濃度(µg active compound/L air)
MV = Guyton の公式〔$BW(g)^{0.75}$ x 2.1〕による分時容量(mL/min)
T = 時間, 1 日曝露時間 (minutes)
BW =測定時平均体重(g)

動物の生死及び投与後の一般症状を観察した。検眼鏡検査を順化期間中及び投与終了の屠殺前に実施した。体重及び摂餌量を毎週測定した。投与後 13 及び 26 週に採取した血液及び尿に関して臨床検査を実施した。剖検及び主要臓器の秤量を行い、臓器／組織検体を保管した。高用量群及び対応する対照群すべての動物について病理組織学的検査を実施した。呼吸器に関しては、イロプロスト投与群及び対照群のすべての器官組織を病理組織学的に検査した。サテライト動物から血液検体を採取し、イロプロストの血清中濃度及び PK パラメータを評価した。

試験成績を 2.6.7.7B A04447 に示す。

ラットへのイロプロストの 26 週間反復吸入投与により、毒性所見の発現は認められなかった。イロプロスト投与に関連する唯一の所見は、肺の絶対及び相対重量の軽度な増加（一部の群で統計学的に有意差あり）であった。増加した肺重量に関連すると考えられる対応する肺の病理組織学的変化は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は 48.7μg/kg（実投与量）と推定された。

イロプロストの 26 週間反復吸入投与時の、平均血清中濃度の経時的変化から導き出される PK パラメータを表 2.6.6.3- 4 に要約する。イロプロストの全身曝露量（AUC）は、投与量の増加にほぼ比例して、また、吸入期間の延長に比例して増加した。全身曝露量に雌雄差は認められず、6 ヵ月間の反復投与による時間依存性の影響も認められなかった（報告書 A05405）。本試験におけるラットでの最大曝露量（無毒性量）は Cmax で評価した場合、予定される臨床用量（5μg）を日本人（n=7）に投与後（試験番号 15266、報告書 A56356；平均 Cmax 142ng/L；表 2.7.6.3-2 参照）の約 16 倍に相当した。

表 2.6.6.3- 4　　ラット 26 週間反復吸入投与毒性試験における薬物動態パラメータ

	Actual Inhaled Dose					
	3.55 μg/kg		27.8 μg/kg		48.7 μg/kg	
Parameter	Day 1	Day 182	Day 1	Day 182	Day 1	Day 182
Cmax (pg/mL)	497	712	1929	1954	1966	2233
Tmax (h)	1.6	1.0	1.9	1.9	1.0	2.5
$AUC_{0\text{-}Tlast}$ (pg･h/mL)	783	1075	3308	2983	4892	7492

雌雄合算
Cmax = maximum concentration of drug in serum
Tmax = time to reach Cmax
$AUC_{0\text{-}tlast}$ = area under the concentration versus time curve from dosing time to the last time point

2.6.6.3.1.2　　経口投与

2.6.6.3.1.2.1　　2 週間反復経口投与試験

参照項目：4.2.3.2.9　4739

イロプロストの短期反復経口投与時の全身毒性を評価するため、1 群当たり雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに、1 日用量 0、0.002、0.02、0.2、2.0mg/kg のイロプロストを 15～16 日間強制反復経口投与した。

0.002mg/kg 群の忍容性は良好であり、イロプロスト投与に関連した所見は認められなかった。0.02mg/kg 群では、雌雄で単球数の減少、雌で好中球数の減少、有核骨髄細胞及び赤血球造血細胞数の増加が観察された。0.2mg/kg 以上では、雄で好中球数の減少及び雌で血清タンパク質の増加が認められた。最高用量 2.0mg/kg 群では、雌でのみ軽度の白血球数の減少、雄に有核骨髄細胞及び赤血球造血細胞数の増加、雌に絶対及び相対甲状腺重量の増加が認められた。しかしながら、甲状腺に組織学的変化は認められず、検討したいずれの用量においても臓器毒性所見は認められなかった（無毒性量 2.0mg/kg/日）。

2.6.6.3.1.2.2　　28 週間反復経口（混餌）投与試験

参照項目：4.2.3.2.12　9940
4.2.3.2.13　9564
4.2.3.2.14　AC52
4.2.3.2.15　AB90

イロプロストの長期経口投与時の全身毒性を評価するため、1 群当たり雌雄各 20 例の Wistar 系ラットに、イロプロストとして 1 日用量 0、0、0.6、1.8、6.0mg/kg となる徐放性製剤を、各々ブランク飼料、プラセボ飼料、1%、3%、10%イロプロスト徐放性製剤混餌飼料として 27

～28 週間反復投与した。投与量はラット 8 日間混餌投与試験成績（報告書 9940）に基づいて設定した。すなわち、当該用量設定試験では、粉砕したイロプロスト 10%含有徐放性製剤（6.0 mg/kg as イロプロスト）を雄ラットに 8 日間混餌投与した結果、軽度の摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められ、栄養不均衡が原因と考えられたことから、10%の混餌飼料を最高濃度として選択した。また、試験 7～8 日目の血漿中イロプロスト濃度は十分高いものであった（報告書 9564）。

試験成績を 2.6.7.7C AC52 に示す。

イロプロスト徐放性製剤の 1%混餌（約 0.6mg/kg/日）では、イロプロスト投与に関連する影響は認められなかった。一方、3%混餌（約 1.8mg/kg/日）では、血清中ナトリウム濃度（雄）の軽度減少及び血清中カルシウム濃度（雌）の軽度増加が認められた。病理組織学的検査では、3%以上の混餌群において認められた唯一の所見は、顎下腺における分泌終末部肥大の発生率の軽度な増加であった。更に 10%混餌（約 6.0mg/kg/日）では、投与後第 1 週の摂餌量に軽度一時的な減少がみられた。この用量では更に、雄 1 例に軽度～中等度の皮膚の発赤、軽度るいそう、中等度アパシー及び重度失調性歩行がみられ、この動物は 2 週目に死亡した。更に、この用量では、血清中グルコース及びカルシウム濃度（雌）の軽度増加、ナトリウム濃度（雄）の軽度低下、比重低下と関連した尿量の増加、並びにナトリウム、カルシウムイオンの増加、塩素イオン（雄）の尿中排泄量の軽度増加が認められた。更に、10%混餌群の雌雄で膵臓の絶対及び相対重量増加、顎下腺の絶対及び相対重量の極めて軽度増加（雌）、並びに雌における胸腺の相対重量の増加が認められた。膵臓及び胸腺の重量変化に対応する組織学的変化は認められなかった。消化管にも毒性所見は認められなかった。無毒性量は 0.6mg/kg/日（1%混餌）と推定された（報告書 AC52）。

投与期間中に測定したイロプロストの血漿中濃度は用量依存的に増加した。ラットへの 6 ヵ月（27～28 週）間の混餌投与における 26 週目の、0.6、1.8 及び 6.0mg/kg/日群雌雄各々の平均血漿中濃度は、418、468、1010、1160、2550 及び 3490pg/mL であった。雌雄の全身曝露量に大きな差は認められなかった（報告書 AB90）。

2.6.6.3.1.3　静脈内投与

2.6.6.3.1.3.1　短期反復静脈内投与試験

参照項目：4.2.3.2.16　4544
4.2.3.2.17　6075

1群雌雄各10例のWistar系ラットを用いてイロプロスト静脈内持続注入による短期反復投与毒性を評価するため、10～11日間及び28日間の静脈内持続投与試験を実施した。試験デザインを**表2.6.6.3- 5**に示す。イロプロストの毒性は臨床症状、血液学的検査、骨髄検査、生化学的検査、血液凝固能検査、並びに剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査成績に基づいて評価した。

表2.6.6.3- 5　ラット10日間及び4週間反復静脈内投与試験における試験デザイン

Duration of Treatment	Iloprost Dose [a]		Application Volume	Report no.
	mg/kg/day	µg/kg/min		
10-11 days, except 2 weekend days (3 hours per day)	0.002 0.02 0.2 2.0	0.011 0.111 1.11 11.1	3 mL/h	4544
28 days (continuously)[b]	0.2(0.124) 0.9 4.3	0.139(0.09) 0.625 2.986	2.23 µL/h	6075

a 28日間静脈内持続投与試験における最低用量0.2 mg/kg/日群の実投与量は、ラット28週間反復投与試験（報告書7706）における種々の濃度の製剤でのAlzet浸透圧ポンプを使用した4週間後の分析成績に基づいてその約62%と推定した。
b Alzet浸透圧ポンプを使用した。.

試験成績を2.6.7.6　重要な試験以外の試験　4544 & 6075に示す。

ラットにイロプロストを1日3時間連日静脈内へ10～11日間（投与日数8～9日、週末は投与せず）持続投与した結果、血液学的変化（好酸球及び好中球数の増加、及び骨髄好酸球数の減少）及び血漿中フィブリノーゲン値の上昇がみられた。0.02mg/kg（0.111μg/kg/分）以上の投与群では更に、血清中α_3-グロブリン値の低下がみられ、0.02mg/kg 群の雄 1 例で心筋の瘢痕化がみられた。高用量 2.0mg/kg 群でのみ重度のアパシー、充血、流涙過多、皮膚の冷感、摂餌量の減少、摂水量の増加、血清中コレステロール値の上昇などが認められた。同群では、雌で肝臓及び甲状腺重量の増加、雄で腎臓重量の減少、雄（2 例）に心筋の瘢痕化も認められた（報告書4544）。

ラットにイロプロストを 4 週間反復静脈内持続投与した結果、低用量 0.124mg/kg 群では、一時的な足の発赤及び軽度の胃粘膜充血（雄 1 例）がみられた以外に薬剤投与に関連する影響は認められなかった（毒性所見と判断せず）。中用量 0.9mg/kg 群では、血液学的検査パラメータ（雌におけるヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度の低下並びに軽度な赤血球数減少）及び血液凝固指数の変動（雌に極めて軽度なトロンビン時間延長、雌雄で軽度な血漿中フィブリノーゲン値の上昇）、並びに雄で腎臓の絶対及び相対重量の減少が認められた。この 0.9mg/kg 群雌 1 例に胃粘膜の微小出血が認められた。

高用量4.3mg/kg群の雄2例及び雌3例が4～9日目に死亡した。この群では、アパシー、足及び尾の発赤、湿ってべとつく乱れた被毛、振戦、削痩のような一般症状が認められた。個別の動物において、足の腫脹、結膜炎、姿勢異常、啼鳴、下痢、摂餌量減少、体重減少、血液学的検査パラメータの変動などが認められた。生存動物では、雌に肝臓重量の増加、雄に精巣及び腎臓重

量の減少が認められた。死亡又は屠殺した動物における主な組織学的検査所見は、肺、肝臓、腺胃粘膜、胸腺、副腎皮質の充血であった。3 例に前立腺及び精嚢腺の委縮が認められた。無毒性量（実投与量）は 0.124mg/kg/日と推定された（報告書 6075）。

2.6.6.3.1.3.2　　28 週間反復静脈内持続投与試験

参照項目：4.2.3.2.18　7948
4.2.3.2.19　7442

イロプロスト長期静脈内投与時の全身毒性を評価するため、Wistar 系ラットを用いた 28 週間反復投与試験を実施した。投与には（アルゼット）浸透圧ポンプを使用し、2.58～2.99μL/時の流速で静脈内持続投与した。投与量情報を含む試験デザインを**表 2.6.6.3- 6**に示す。投与量は 4 週間静脈内投与試験（2.6.6.3.1.3.1）に基づいて選択した。毒性は臨床症状、血液学的検査パラメータ及び骨髄検査パラメータ、血液生化学的検査、剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査成績に基づいて評価し、イロプロストの血漿中濃度を測定した。

表 2.6.6.3- 6　　ラット 28 週間反復静脈内投与試験における試験デザイン

Group no.	Number / Sex of Animals	Actual Iloprost Dose	
		mg/kg/day	μg/kg/min
1	26M 32F	0 0	0 0
2	35M 34F	0.02 0.02	0.014 0.014
3	40M 33F	0.06 0.05	0.042 0.035
4	32M 37F	0.5 0.5	0.347 0.347

M: male, F: Female

試験成績を 2.6.7.7D 7948 に示す。

ラットにイロプロストを約 26 週間反復静脈内投与（持続注入）した結果、軽度から中等度の皮膚の発赤、胸腺における軽度の限局性発赤、軽度の赤血球吸収の増加、胸部リンパ節における反応性変化（毒性所見とは判断せず）が認められた。これらの所見はすべての用量で観察され、イロプロストの弱い血行動態作用と関連があると考えられた。中及び高用量の雄及び高用量の雌において、組織学的変化を伴わない軽度の胸腺及び膵臓重量の増加が認められた。骨髄又は肺内動脈にも組織学的変化は認められず、イロプロスト投与に関連する臓器毒性所見は認められなかった。無毒性量は最高用量 0.5mg/kg/日と推定された（報告書 7948）。

開発初期の放射免疫測定法（RIA）にてイロプロストの血漿中濃度を測定した。曝露量は用量依存的に増加し、高用量 0.5mg/kg 群における血漿中濃度は 1.2～19.1ng/mL の範囲内であった（雄平均 7.9、雌平均 5.6ng/mL）。しかしながら、特定検体の GC/MS による再測定の結果、RIA で測定された値の約 63%（0.76～12.0ng/mL に相当）がイロプロスト未変化体によるもので、残りは交差反応を示す代謝物であることが判明した（2.6.4.2.4.1　イロプロスト濃度　参照）。高用量群におけるイロプロストの平均血漿中濃度（補正 RIA 値）は、3.5ng/mL（雌）及び 5.0ng/mL（雄）であった（報告書 7442）。得られた無毒性量での曝露量は、ヒトに臨床用量吸入投与時の Cmax と比べて、雄で 35 倍、雌で 25 倍に相当する。

2.6.6.3.2　　イヌ反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1　　経口投与

参照項目：4.2.3.2.20　9215
4.2.3.2.21　9122
4.2.3.2.22　A706
4.2.3.2.23　A693

イロプロストの長期反復経口投与時の全身毒性を評価するため、1群当たり雌雄各4例のビーグル犬に、イロプロスト包接化合物（徐放性製剤）をカプセルで1日2回53週間経口投与した（2×25又は2×75μgイロプロスト/kg/日、6時間間隔）。投与量は4週間の全身忍容性試験（報告書 9215）に基づいて選択した。当該4週間反復投与試験では、ビーグル犬にイロプロスト包接化合物カプセル（イロプロストとして25及び75μg/kg）を1日2回4週間反復経口投与したところ、低用量群ではイロプロスト投与に関連した所見は認められず、高用量では嘔吐及び下痢が認められた。試験1及び28日目の血漿中イロプロスト濃度に基づくCmax及びAUCは、用量に伴って増加した（報告書9215及び9122）。イヌにおけるイロプロスト長期反復経口投与時の毒性は、臨床所見、血液学的検査、骨髄検査、血液生化学的検査（免疫学的検査含む）、血液凝固検査、血圧・心拍数・心電図記録、剖検所見、臓器重量、病理組織学的検査成績より評価した。

試験成績を2.6.7.7E A706に示す。

高用量 150（2×75）μg/kg 群においてのみ全身性の影響が認められ、下痢及び便中粘液が観察された。これらは次項（2.6.6.3.2.2）に記載するように、イヌにイロプロストの 0.048～0.097mg/kg/日を 26 週間反復皮下投与（持続注入）後に認められた一般症状と同様であった。血液生化学的検査では軽度の血液生化学検査値の変化（血清タンパク質及びカルシウム濃度の低下、並びに血清グルコース値の上昇）が認められた。雌1例が7週目に腸（空腸－回腸－盲腸）捻転のため死亡した。これはおそらく消化管の平滑筋組織に対するイロプロストの薬理作用（平滑筋弛緩作用）に基づく影響と考えられた。無毒性量は 50（2×25）μg/kg/日と推定された（報告書A706）。

低用量50μg/kg群の初回投与及び2回目投与後におけるCmax値は104～696pg/mLの範囲内であり、平均AUC_{0-24}値は2188～3707pg･h/mLであった。高用量150μg/kg群では、初回及び2回目投与後におけるイロプロストのCmax値は108～1547pg/mLの範囲内（平均940±156pg/mL）であり、AUC_{0-24}は3645～9973pg･h/mL（平均5584±1039pg･h/mL）であった。したがって、投与量を3倍に増加した結果、血漿中濃度が2倍となり、用量にほぼ比例して増加した。試験期間中、投与初日と51週目共に動態プロファイルに性差は認められなかった（報告書A693）。

2.6.6.3.2.2　　皮下投与

参照項目：4.2.3.2.24　7573
4.2.3.2.25　7949
4.2.3.2.26　8058

イロプロストの長期皮下投与時の全身毒性を評価するため、イヌを用いた26週間皮下持続投与試験を実施した。投与にはアルゼット浸透圧ポンプを外科的に皮下へ埋植し、2.59～2.72μL/hの流速で反復皮下投与（持続注入）した（0.024～0.097mg/kg/日）。試験デザインを**表 2.6.6.3- 7** に示す。用量は4週間皮下持続注入による用量設定試験（報告書7573）に基づいて選択した。当該用量設定試験では 174ng/kg/分（0.25mg/kg/日）群の忍容性は不良であったため、

5 日目に中止された。87ng/kg/分（0.125mg/kg/日）群では軽度の臨床症状（アパシー、歩行障害、下痢、食欲減退、軽度るいそう等）が認められ、43ng/kg/分（0.0625mg/kg/日）群では 4 週間までの忍容性が良好であった（散発的な嘔吐、アパシー、下痢及び軽度血圧低下のみ）。イロプロストの毒性は臨床症状、血液学的検査パラメータ及び骨髄検査パラメータ、血液生化学的検査、剖検所見、臓器重量、病理組織学的検査成績に基づいて評価した。更に、イロプロストの血漿中濃度を測定した。

表 2.6.6.3- 7　　イヌ 26 週間反復皮下投与試験の試験デザイン

Group no.	Number / Sex of Animals	Actual Iloprost Dose	
		mg/kg/day	µg/kg/min
1	4M 4F	0 0	0 0
2	4M 4F	0.024 0.024	0.017 0.017
3	4M 4F	0.047 0.049	0.033 0.034
4	4M 4F	0.097 0.096	0.067 0.067

M: male, F: female

試験成績を 2.6.7.7F 7949 に示す。

イヌにイロプロストを 26 週間皮下投与した結果、臓器毒性所見は認められなかった。軽度な血清中γ－グロブリン値の上昇がすべての用量で認められたが、持続注入用ポンプ設置時の外科手術に起因した軽度な炎症反応に関連したものと考えられた。中及び高用量群では、特に最初の埋込期間中に下痢の頻度増加が認められた。これは消化管蠕動運動に対する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。高用量群雌では 26 週目に軽度の尿量減少が認められたが、イロプロストの薬理作用（尿量減少）によるものと考えられた。組織学的検査では骨や肺内小動脈に変化は認められなかった。無毒性量（実投与量）は雄 0.097mg/kg/日、雌 0.096mg/kg/日と推定された。高用量群（無毒性量）におけるイロプロストの平均血漿中濃度は、雌で 1.6ng/mL 及び雄で 2.1ng/mL であった（報告書 7949 及び 8058）。

2.6.6.3.3　　サル反復投与毒性試験

2.6.6.3.3.1　　経口投与

1 日 1 回投与試験

参照項目：4.2.3.2.28　4858/Ⅱ

イロプロストの 1 日 1 回連日経口投与による短期反復投与毒性を評価する目的で、1 群当たり雌雄各 2 例のカニクイザル（*Macaca fascicularis*）に、イロプロストを 1 日用量として 0、0.02、0.2、1.0mg/kg を、14～15 日間強制経口投与した（投与容量 10mL/kg）。

低用量 0.02mg/kg 群では、5 日目に死亡した 1 例（3600F）がアパシー、背臥位、気道疾患、血圧低下を示した以外に異常は認められなかった。当該動物では剖検時に消化管出血が認められ、組織学的検査では膵臓壊死が認められた。この死亡に関しては、膵臓の自然発生性病変に起因した可能性が高いと考えられた。中（0.2mg/kg）及び高用量（1.0mg/kg）群で流涎過多が、高用量群で流涙過多がみられた。中又は高用量を投与した動物 2 例（85F、37F）において、心拍数の減少及び血圧の減少傾向が認められた。動物 85F が 15 日目に死亡し、重度の副腎皮質及び小腸の充血、並びに肝臓の類洞及びディッセ腔の拡張が認められた。高用量群における所見として、下

痢、意識不明、側臥又は背臥位、閉瞼、QT 時間の延長（動物 37F：試験前 QT 時間 0.14 秒、9 日目 QT 時間 0.23 秒）、単球数減少及び骨髄リンパ球増加が認められた。高用量群では、1、2，5，10 日目に収縮期血圧及び平均血圧（0.5～4.0 時間まで）の明らかな低下も認められた。高用量群の 1 例（448M）は 7 日目に死亡し、剖検所見で肺に限局性の出血が認められた。

各用量群で 1 例ずつの死亡例がみられたことに関して、中・高用量群ではイロプロストの薬理作用（持続的な血圧低下）に関連した可能性が示唆された。ただし、最終屠殺時まで生存したいずれの動物にも、死亡例に観察されたような剖検所見（臓器の充血又は出血など）は認められなかった。無毒性量は 0.02mg/kg/日と推定された。

サルにイロプロストの 1 日 1 回 14～15 日間反復強制経口投与試験におけるイロプロストの血漿中濃度を**表 2.6.6.3- 8**に要約する。

表 2.6.6.3- 8　サルにおける 1 日 1 回 14-15 日間反復強制経口投与試験におけるイロプロストの血漿中濃度（ng/mL）

Dose (mg/kg)	Animal No. and Sex	Day 1	Day 8	Day 12
0 (Control)	31M	0	(0.7[d])	0
	362M	0	0	0
	3519F	0	0	0
	3536F	0	0	(0.7[d])
0.02	3693F	-[a]	0.8	0.7
	357M	0.8	0.4	1.0
	202M	1.4	0.7	0.8
	3600F	5.0	-	-
0.2	66F	6.4	4.2	5.6
	200M	5.1	-[b]	1.7
	85F	5.3	6.7	4.1
	240M	8.3	9.1	6.2
1.0 (except Day 1 = 2.0 mg/kg, except 448M)	37F	126.5	7.6	13.7
	158M [c]	76.3	- [c]	- [c]
	138F	33.8	5.0	1.2
	304M	75.8	3.5	26.4
	448M	47.9	70.2 [e]	-

M: male, F: female, a: Assay error, b: Sample lost, c: Animal died on Day 1,
d: 検出された血漿中濃度は血漿成分との干渉であると考えられた。
e: Determination on day 7

1 日複数回投与

参照項目：4.2.3.2.27　5456

イロプロストの 1 日複数回経口投与による短期反復投与時の毒性を評価するため、1 群雌雄各 2 例のカニクイザルに、イロプロストの 0、0.02、0.1mg/kg を投与間隔 1 時間で 1 日 8 回（合計 0、0.16、0.8mg/kg/日）10 日間（試験日数 14 日間）反復強制経口投与した（投与容量 10mL/kg）。

低用量 0.16mg/kg 群では 14 日目に雄 1 例において軽度のアパシー及びしゃがみこみ姿勢がみられ、摂餌量の減少及び体重増加抑制の傾向が観察された。高用量 0.8mg/kg 群では、すべての動物に軽度のアパシー及びしゃがみこみ姿勢（2～14 日目）が認められ、摂餌量の減少及び体重増加抑制、並びに血清中総タンパク質及び軽度な総 β－グロブリンの増加も観察された。しかしながら、剖検所見及び臓器毒性所見は認められなかった。

2.6.6.3.3.2 静脈内投与

参照項目：4.2.3.2.29 4545
4.2.3.2.30 5482

イロプロストの静脈内持続投与による短期反復投与毒性を評価する目的で、1 群雌雄各 2 例のカニクイザルを用いた 11 及び 28 日間の反復投与毒性試験を実施した。試験デザインを**表 2.6.6.3- 9**に示す。イロプロストの毒性は、臨床所見、血液学的検査、骨髄検査、血液生化学的検査、血液凝固能検査、血圧評価、剖検所見、臓器重量の解析、病理組織学的検査成績に基づいて評価した。

表 2.6.6.3- 9 サル静脈内持続投与による短期反復投与毒性試験における試験デザイン

Duration of Treatment	Iloprost Dose[a]		Application Volume	Report no.
	mg/kg/day	µg/kg/min		
11 days, except 2 weekend days (3 hours per day)	0.002 0.02 0.2 2.0	0.011 0.111 1.11 11.1	11 mL/h	4545
28 days (Continuously)[b]	0.02 (0.0124) 0.17 1.41	0.014 (0.009) 0.118 0.979	2.1 µL/h	5482

a 28 日間静脈内持続投与試験における最低用量 0.2 mg/kg/日群の実投与量は、ラット 28 週間反復投与試験（報告書 7706）における種々の濃度の製剤での Alzet 浸透圧ポンプを使用した 4 週間後の分析成績に基づいてその約 62%と推定した。
b Alzet 浸透圧ポンプを使用した。

サルに 1 日 3 時間の持続静脈内投与を連日 11 日間実施した（投与日数 9 日間、週末投与なし）結果、最低用量 0.002mg/kg/日（0.011μg/kg/分）群において、呼吸困難の一般症状以外に薬剤投与に関連した影響は認められなかった。低用量 0.02mg/kg/日（0.111μg/kg/分）以上では、投与中及び投与後に、軽度から重度のアパシーが認められた。0.02mg/kg/日群に認められたその他の所見として、流涎過多、皮膚の発赤又は蒼白、歩行障害、虚脱、摂餌量の減少、軽度の血圧低下、軽度の血清γ－グロブリン値の上昇が認められた。さらに、0.02mg/kg 群の雄 1 例が 10 日目（投与終了 15 分後）に死亡した。当該動物では、肝細胞の顕著な空胞変性を伴う類洞の顕著な充血及び類洞周囲の浮腫が認められた。中・高用量（0.2 及び 2.0mg/kg/日）群において 1 日目に雄 1 例ずつが死亡した。認められた所見は 0.02mg/kg/日群の死亡例と類似していた。更に、1 日目に死亡した高用量 2.0mg/kg/日群雄において、急性心筋症（心筋瘢痕）が認められた。死亡例が認められたことから、中・高用量（0.2 及び 2.0mg/kg/日）群に対する投与は中止した（報告書 4545）。

死因を更に詳細に検討するため、雄 1 例にイロプロストを静脈内投与し、同時に血圧を継続的に測定した。1.4μg/kg/分で 36 分間投与を実施したところ、平均血圧が 82mmHg から 28mmHg に低下した。この結果から、中・高用量群雄における 1 日目の死亡は、急激な血圧低下に関連したものであることが示された。低用量 0.02mg/kg 群の死亡は血圧低下及び一般状態の悪化によると推察された。

サル 4 週間持続注入による反復投与試験成績を 2.6.7.7G 5482 に示す。

低用量 0.0124mg/kg を 4 週間反復静脈内投与（持続注入）した際の忍容性は概して良好であり、剖検所見は認められなかった。中及び高用量（0.17 及び 1.41mg/kg）では、すべての動物が投与後最初の 2 週間以内に死亡した。これらの動物で認められた主な臨床症状は、アパシー、姿勢異常、しゃがみこみ姿勢、易刺激性、平衡失調、意識消失、歯ぎしり、下痢、摂餌量及び摂水量の

減少、体重減少、骨髄の変化（有核細胞数、赤血球造血細胞、好中-顆粒球、形質細胞数の減少、未分化細胞及び細網細胞数の増加）、白血球数の減少、生化学的変化（血清中の尿素窒素、クレアチニン、S-GPT、カリウム濃度の上昇、γ－グロブリン、コレステロール、グルコース、カルシウム濃度の低下、トロンボプラスチン時間・活性部分トロンボプラスチン時間延長）であった。病理学では、胃粘膜の発赤・出血性びらん、肝臓、副腎皮質、膵島における類洞の充血、肝細胞の小葉中心性脂肪変性及び壊死が認められた。0.17mg/kg/日群において、投与開始1及び2週目における血圧（収縮期及び平均）は軽度に低下し、1.41mg/kg/日群においては、より顕著に低下した。無毒性量は0.02mg/kg/日（実投与量0.0124mg/kg/日）と推定された（報告書5482）。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

2.6.6.4.1　*In vitro*試験

試験条件及び試験成績の詳細を2.6.7.8A　5169、2.6.7.8B　7466、2.6.7.8C　7548、2.6.7.8D　7160及び2.6.7.8E　7429に示す。

2.6.6.4.1.1　細菌を用いる復帰変異原性試験

参照項目：4.2.3.3.1.1　5169
4.2.3.3.1.2　7466
4.2.3.3.1.3　7548

イロプロストを最高5,000μg/plateまでの濃度範囲で、ネズミチフス菌（プレート法及びプレインキュベーション法）及び大腸菌（プレート法）を用いた復帰変異原性試験を実施した。試験の要約を**表2.6.6.4- 1**に、試験条件及び試験成績の詳細を2.6.7.8A～2.6.7.8Cに示す。

表2.6.6.4- 1　細菌を用いる復帰変異原性試験の要約

Bacteria Test System	Strain/Cells	Concentration/ Dose of Iloprost	Metabolic Activation	Results	Report no.
Salmonella typhimurium (plate incorporation, Ames test)	TA1535, 100, 1537, 1538, 98	10-5000 µg/plate	With/Without S9 mix	No mutagenicity	5169
Salmonella typhimurium (preincubation, Ames test)	TA1535, 100, 1537, 1538, 98	50-5000 µg/plate	With/Without S9 mix	No mutagenicity	7466
Escherichia coli (plate incorporation)	WP2 uvrA	1-5000 µg/plate	With/Without S9 mix	No mutagenicity	7548

いずれの濃度においても代謝活性化系の添加時及び非添加時共に復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

2.6.6.4.1.2　哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

参照項目：4.2.3.3.1.4　7160
4.2.3.3.1.5　7429

最高濃度として細胞毒性を示したiloprostの250μg/mLまでの濃度範囲にてヒトリンパ球を用いる染色体異常試験を、475μg/mLまでの濃度範囲にてチャイニーズハムスター培養細胞を用

いる HGPRT 試験を実施した。試験の要約を**表 2.6.6.4- 2**に、試験条件及び試験成績の詳細を 2.6.7.8D　7160 及び 2.6.7.8E　7429 に示す。

表 2.6.6.4- 2　哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の要約

Mammalian Cell Test System	Strain/Cells	Concentration/ Dose of Iloprost	Metabolic Activation	Results	Report no.
Chromosomal aberration test	Human lymphocytes	5-50 µg/mL 25-250 µg/mL	With/Without S9 mix	No mutagenicity	7160
HGPRT test	Chinese hamster cell line (V79)	25-250 µg/mL 47.5-475 µg/mL	With/Without S9 mix	No mutagenicity	7429

いずれの濃度においても代謝活性化系の添加時及び非添加時共に点突然変異又は染色体異常頻度の増加は認められなかった。

2.6.6.4.2　*In vivo* 試験

2.6.6.4.2.1　マウス骨髄小核試験

参照項目：4.2.3.3.2.1　5360

1 群雌雄各 5 例の NMRI 系マウスにイロプロストの 10、20、40mg/kg を静脈内単回投与後に骨髄を採取して小核の出現頻度を検索した。試験の概略を**表 2.6.6.4- 3**に、試験条件及び試験成績の詳細を 2.6.7.9A　5360 に示す。

表 2.6.6.4- 3　マウス骨髄小核試験の成績要約

Test System	Species/ Strain	Number of animals/Group/Sex	Dose of Iloprost	Result	Report no.
Micronucleus test in mice after single IV application	Mice/ NMRI	15M & 15F/Group (5M & 5F for 3 sampling times 24, 48 and 72 h after application)	10, 20, 40 mg/kg	No mutagenicity	5360

M: male, F: female

いずれの用量群においても、小核の出現頻度の増加は認められなかった。

以上の成績より、イロプロストに遺伝毒性はないと結論した。

2.6.6.5　　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.5.1　　マウスを用いるがん原性試験

2.6.6.5.1.1　　混餌投与試験

参照項目：4.2.3.4.1.1　AW35
4.2.3.4.1.2　AR18
4.2.3.2.5　A040
4.2.3.2.6　9914

雌雄 NMRI 系マウスにイロプロスト徐放性製剤を 95～97 週間混餌することにより、がん原性を評価した。試験デザインを表 2.6.6.5- 1に示す。投与量は混餌投与によるマウス 29 日間全身忍容性（用量設定）試験成績（報告書 A040）に基づいて選択した。当該用量設定試験ではイロプロスト徐放性製剤（遅効性ペレット）を 10%混餌にて雄マウスに 4 週間反復投与したところ、軽度摂餌量減少・グリコーゲン枯渇を伴う肝臓重量の減少がみられ、28～29 日目の平均血中イロプロスト濃度は 1.87～3.64ng/mL（ヒトに臨床用量吸入投与時の Cmax:142ng/L と比較して 13～26 倍相当）であった（報告書 9914）。10%を超える混餌投与は動物の栄養状態に悪影響を及ぼす可能性が考えられるため、高濃度（高用量）として 10%（15.4mg/kg；実投与量：雄 10.3mg/kg、雌 13.3mg/kg）を、低濃度（低用量）として 3%（4.7mg/kg；実投与量：雄 3.1mg/kg、雌 3.7mg/kg）を設定した。

表 2.6.6.5- 1　　混餌投与によるマウスがん原性試験の試験デザイン

Number of animals per group	Test Article	Concent-ration	Dose (mg/kg)			
			Nominal [a]		Actual [b]	
			Iloprost	Iloprost clathrate	Iloprost	Iloprost clathrate
50M/ 50F	Blank diet (control)	-	-	-	-	-
50M/ 50F	Ground placebo pellets (placebo control)	10% (w/w)	-	-	-	-
50M/ 50F	Ground iloprost clathrate pellets	3% (w/w)	4.7	35.7	3.1M [c] 3.7F [c]	23.6M [c] 28.1F [c]
50M/ 50F	Ground iloprost clathrate pellets	10% (w/w)	15.4	117.0	10.3M [c] 13.3F [c]	78.3M [c] 101.1F [c]

M: male, F: female
a 体重 30 g 摂餌量 1 日 6 g と仮定して算出。
b 全試験期間の実摂餌量及び実体重に基づいて平均値を算出。
c 全試験期間より平均値を算出。

粉砕した餌料及び飲用水を適宜提供した。摂餌量、摂水量、体重及びイロプロストの血清中濃度を定期的に測定した。投与終了時（95～97 週目）に、血液学的検査、剖検所見、臓器重量、組織学的検査により、全身毒性及び腫瘍原性を評価した。生存中に得られたパラメータに対し、dunnett 検定を用いて統計学的解析を行った。また、腫瘍発生に関連したパラメータには Peto らの方法に準じた傾向検定を用いた。対照群を含む全群の雌において高い死亡率（約 70%）が認められたため、95～97 週目で試験を終了した。

試験成績を 2.6.7.10A　AW35 に示す。

イロプロスト投与に関連した所見として、試験全期間を通じて 3%及び 10%の両混餌飼料の雌で軽度の摂水量の減少、並びに精巣上体の絶対及び相対重量の軽度減少又は減少傾向が認められた。10%混餌飼料では卵巣の絶対及び相対重量の増加（p＜0.01）が認められた。

しかしながら、イロプロスト投与に関連した腫瘍性又は非腫瘍性病変の増加は認められなかった（報告書 AW35）。

イロプロスト（徐放性製剤）を混餌にて投与することにより、用量依存的なイロプロスト血清中濃度の増加が認められた。高用量群における 95 週目の血清中濃度は、雄で 2.6±0.5ng/mL 及び雌で 3.9±1.3ng/mL であった。その試験期間中の血清中濃度は、雄で 2.6～4.7ng/mL、及び雌で 3.7～9.3ng/mL の範囲にあった（報告書 AR18）。

2.6.6.5.1.2　　強制経口投与試験

参照項目：4.2.3.4.1.3　BC60
4.2.3.2.7　96028
4.2.3.2.8　AM30
4.2.3.4.1.7　SFR-KIST20000009

雌雄 Crl:CD-1(ICR)BR マウスに 1 日 1 回 104 週間以上強制経口投与する試験において、イロプロスト徐放性製剤（約 13% イロプロスト含有）のがん原性を評価した。試験デザインを表 2.6.6.5- 2に要約する。用量はマウスに 5、50、125、250（イロプロストとして 0.69、6.9、17.2、34.4）mg/kg/日を投与した 12 週間経口投与用量設定試験（報告書 96028）に基づいて選択した。当該用量設定試験では、250mg/kg/日群に死亡率の増加が認められ、この用量は最大耐量を上回ると考えられた。125mg/kg/日で一部一般症状がみられたが、生存率に関しては影響を及ぼさなかったことから、当該用量を高用量として選択した。当該用量設定試験では、投与初日及び 72 日目における血漿中イロプロスト濃度に蓄積性は認められず、用量依存的な血漿中濃度及び AUC が認められた（報告書 AM30）。

表 2.6.6.5- 2　　強制経口投与によるマウスがん原性試験の試験デザイン

Number of Animals	Test Article	Concentration (mg/mL)	Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	Dose as iloprost (mg/kg)
70M / 70F	Vehicle	0	0	0
70M / 70F	Iloprost clathrate	0.5	5	0.65
70M / 70F	Iloprost clathrate	5.0	50	6.5
70M / 70F	Iloprost clathrate	12.5	125	16.25

M : male, F : female.
各群雌雄各 5 例の TK モニター用動物（53 週目の投与約 15 分後）を追加で割り付けた。

摂餌量及び体重を定期的に測定し、異常や肉眼的に可視可能な又は触知可能な腫瘤を調べるため、試験期間中定期的に詳細な個別検査を行った。血液学的測定のため、52 週目及び 105 週目（最終屠殺）に血液検体を 1 群当たり雌雄各 10 例の動物から採取した。試験終了時に生存していたマウスは屠殺し、剖検を行い、選択した組織を採取し保存した。対照群及び高用量群の各動物から採取した組織は、死亡又は途中で屠殺した動物から採取した組織と同様に、病理組織学的検査を行った。更に、低及び中用量群から採取した肺、肝臓、腎臓、心臓も同様に採取して組織学的検査を行った。生存、非腫瘍性及び腫瘍性病変の発生、死亡原因の腫瘍解析に関する統計学的解析を実施した。本試験は 105 週目に終了した。

試験成績を 2.6.7.10B　BC60 に示す。

摂餌量、体重、剖検又は病理組織学的検査所見に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。高用量群で認められた唯一の臨床症状は、投与約 1 時間後にみられた傾眠であった。投与に関連した腫瘍性又は組織形態学的変化は認められなかった（報告書 BC60）。

53 週目のイロプロスト血漿中濃度には用量依存的な増加がみられた。高用量群の 53 週目の平均血漿中濃度（Cmax）は雄で 38.3ng/mL、雌で 109ng/mL であった（報告書 SFR-KIST20000009）。

2.6.6.5.2　ラットを用いるがん原性試験

2.6.6.5.2.1　混餌投与試験

参照項目：4.2.3.4.1.4　AP21
4.2.3.4.1.5　A043

雌雄 Wistar 系ラットにイロプロスト包接化合物（徐放性製剤）を 104～108 週間混餌することによりイロプロストの腫瘍原性を評価した。試験デザインを**表 2.6.6.5- 3**に示す。投与量はラットを用いた混餌投与による 28 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.2.2）成績に基づいて行った。当該試験では、1%混餌飼料においてイロプロスト投与に関連した影響は認められず、イロプロスト 10%混餌飼料において最小限の全身作用が観察されたのみであった。10%を超える濃度のイロプロストの混餌では動物の栄養状態に影響を与える可能性が考えられたことから、10%（イロプロストとして 6.0mg/kg/日；実投与量_雄 4.2mg/kg/日、雌 5.3mg/kg/日）を最高濃度に設定した。

表 2.6.6.5- 3　混餌投与によるラットがん原性試験の試験デザイン

Number of Animals	Test Article	Concentration	Dose (mg/kg/day)			
			Nominal		Actual	
			Iloprost	Iloprost clathrate	Iloprost	Iloprost clathrate
50M / 50F	Blank diet (control)	-	-	-	-	-
50M / 50F	Ground placebo pellets (placebo control)	10% (w/w)	-	-	-	-
50M / 50F	Ground iloprost clathrate pellets	3% (w/w)	1.8	13.7	1.3M[a] 1.6F[a]	9.9M[a] 12.2F[a]
50M / 50F	Ground iloprost clathrate pellets	10% (w/w)	6.0	45.6	4.2M[a] 5.3F[a]	31.9M[a] 40.3F[a]

M : male; F : female,
a 全試験期間の平均値。

イロプロストの血漿中濃度を 26、52、104 週目に測定し全身曝露をモニタリングした。腫瘍発生に関連するパラメータを評価するため、Peto らの方法に準じた傾向検定を行い、ブランク食餌群と、プラセボ飼料群、低濃度 3%投与群、高濃度 10%投与群とを比較した。

試験成績を 2.6.7.10C　AP21 に示す。

ブランク食餌群と比較した所見は以下の通りである。

・プラセボ対照群、3%混餌飼料群、10%混餌飼料群における雌での軽度の体重増加抑制

・プラセボ対照群及び 10%混餌飼料群における雄での軽度の膵島細胞腫瘍発生の増加

・10%混餌飼料群で認められた雄における軽度の体重増加抑制

・10%混餌飼料群で認められた雄における摂餌量の一時的な軽度な減少

・10%混餌飼料群で認められた雌における子宮の絶対及び相対重量の軽度な増加

イロプロスト投与群又はプラセボ対照群のいずれにおいても、死亡率、摂水量、臨床所見、剖検所見への影響は認められなかった。臓器重量からは、既述の子宮重量の増加以外にイロプロスト投与に関連した影響は示唆されなかった。組織学的検査では、非腫瘍性又は腫瘍性病変の種類、発生率、重症度、及び／又は臓器分布において、既述の膵島細胞腫瘍がやや増加したことを除き、イロプロスト投与に関連した増加は認められなかった。

対照群と比してイロプロスト包接化合物 10%含有飼料投与で認められた膵島細胞腫瘍発生率の軽度な上昇は、プラセボ飼料群と有意な差が認められなかったことから、栄養バランスの不十分な飼料摂取に関連している可能性が高い。プラセボ混餌飼料及び 10%混餌飼料は、イロプロスト包接化合物の含有以外は同一であることから、10%混餌飼料による栄養バランスの不十分な飼料又は混餌飼料に含有される賦形剤中のラクトース過剰摂取が、膵島細胞腫瘍発生率上昇の原因である可能性が考えられた。本試験の結果より、イロプロストには腫瘍原性がないと考えられた（報告書 AP21）。

イロプロスト（徐放性製剤）を混餌にて投与することにより、用量依存的なイロプロスト血漿中濃度が認められた。104 週目の高用量群における血漿中濃度は、雄で 1.2±0.33ng/mL、雌で 1.5±0.57ng/mL であった。その試験期間中の血漿中濃度は、雄で 1.2～2.0ng/mL、雌で 1.5～2.0ng/mL の範囲内であった（報告書 A043）。

2.6.6.5.2.2　強制経口投与試験

参照項目：4.2.3.4.1.6　BC61
4.2.3.2.10　96029
4.2.3.2.11　AL96
4.2.3.4.1.7　SFR-KIST20000009

雌雄 Sprague Dawley 系ラットにイロプロスト徐放性製剤（イロプロスト約 13%含有）を、1 日 1 回 104 週以上強制経口投与し、長期連続投与によるがん原性を評価した。試験デザインを表 2.6.6.5- 4に示す。投与量は、ラットにイロプロスト徐放性製剤 5、50、125、250（イロプロストとして 0.69、6.9、17.2、34.4）mg/kg/日を 12 週間強制経口投与した用量設定試験（報告書 96029）に基づいて選択した。当該用量設定試験の高用量（125 及び 250mg/kg）群において死亡例は認められず、摂餌量及び体重増加量の減少、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加、いくつかの臓器重量及び血清中アルカリホスファターゼの増加が認められた。125 及び 250mg/kg 群にみられた所見は質的に同様であったため、125mg/kg/日をがん原性試験における最大耐量と推定した。なお、当該用量設定試験の投与初日及び 12 週目に採取した血中 TK 解析において、イロプロストの蓄積性は認められず、用量依存的な血漿中濃度及び AUC が認められた（報告書 AL96）。なお、前述のマウス試験（2.6.6.5.1.2）も含めて、強制経口投与によるがん原性試験は、徐放性経口製剤の臨床開発に際して、FDA からの追加実施指示に従って実施された。

表 2.6.6.5- 4　　強制経口投与によるラットがん原性試験の試験デザイン

Number of Animals	Test Article	Concentration (mg/mL)	Dose (mg/kg)	Dose as iloprost (mg/kg)
70M / 70F	Vehicle	0	0	0
70M / 70F	Iloprost clathrate	0.5	5	0.65
70M / 70F	Iloprost clathrate	5.0	50	6.5
70M / 70F	Iloprost clathrate	12.5/10[a]	125/100[a]	16.25/13[a]

M: male, F: female.
a: 雄では死亡率増加のため 26 週目に投与量を 100mg/kg に変更した。
各群雌雄各 5 例の TK モニター用動物（53 週目の投与約 15 分後）を追加で割り付けた。

摂餌量及び体重を定期的に測定し、異常所見や肉眼的に可視又は触知可能な腫瘤の有無を調べるため、試験期間中定期的に詳細な個別観察を行った。52 及び 105 週目（最終屠殺前）に、1 群当たり雌雄各 10 例の動物から血液学的測定のために採血した。試験終了時に生存していた動物は屠殺・剖検して、選択した組織を採取し保存した。最終屠殺後の対照群及び高用量群の組織は、死亡又は切迫屠殺した動物から採取した組織と同様に、病理組織学的検査を行った。更に、低及び中用量群から採取した膵臓、肺、肝臓及び腎臓、並びに肉眼的病変も採取して組織学的検査を行った。生存率、非腫瘍性及び腫瘍性病変の発生、死因との腫瘍解析に関する統計学的解析を実施した。本試験は 105 週目に終了した。

試験成績を 2.6.7.10D　BC61 に示す。

薬剤投与に関連したいくつかの所見が 50 及び 125/100mg/kg 群で認められた。認められた所見は、一部の一般症状の発生率の上昇、摂餌量及び体重の減少、膵臓実質変性の発生率及び重症度の上昇であった。高用量群において早期死亡の増加による生存率の低下もみられた。死因のいずれにも被験物質投与との直接的な関連は認められなかったが、高用量群の死亡例（特に雄）の肺に急性炎症の発生率及び重症度の上昇が認められた。この炎症性変化の成因として、本剤 250mg/kg の反復投与時には動物が運動性低下・横臥を呈し、誤嚥を伴う胃内容物の逆流が生じた可能性が考えられた。投与量を 100mg/kg に減量した結果、死亡例（肺の炎症性変化）は明らかに減少した。薬剤投与に関連した腫瘍及び前腫瘍性病変の発生増加は認められなかった（報告書 BC61）。

イロプロスト血漿中濃度には用量依存的な増加が認められた。高用量群の 53 週目の平均血漿中濃度は雄で 60.4ng/mL、雌で 36.0ng/mL であった（報告書 SFR-KIST20000009）。

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

2.6.6.6.1　　受胎能及び初期胚発生に関する試験

参照項目：4.2.3.5.1.1　7569
4.2.3.5.1.2　7778

イロプロストの受胎能及び初期胚発生に対する影響を評価するため、Wistar 系ラット雌雄各々に投与する 2 試験（雄；交配前 66-70 日～交配期間中、雌；交配前 2 週間と交配期間～妊娠 7 日目まで投与）を実施した。イロプロストは**表 2.6.6.6- 1**に示す試験デザインにて、アルゼット浸透圧ポンプを用いて反復静脈内投与（持続注入）した。投与量はラットを用いた 28 日間反復持続静脈内投与試験（2.6.6.3.1.3.1）の成績に基づいて選択した。当該 28 日間反復持続注入試験では、イロプロストの 4.3mg/kg/日（2.986μg/kg/分）での静脈内持続注入により死亡例が認められた一方、0.9mg/kg/日（0.625μg/kg/分）では病理組織学的及び血液生化学的パラメータに軽度の変化が認められたのみであった。更に、妊娠雌ラットを用いた胚・胎児発生に関する予備検討において 1.0mg/kg/日（694ng/kg/分）用量を妊娠 6～21 日目（計 16 日間）に連日持続静脈内投与したところ、明確な毒性所見は認められなかった（2.6.6.6.2.1参照）。したがって、1.0mg/kg/日[694.4ng/kg/分]を受胎能及び生殖能・初期胚発生試験における最高用量として選択した（実投与量は雄試験で約 0.8mg/kg/日[555.5ng/kg/分]、雌試験で 1.0mg/kg/日[694.4ng/kg/分]）。

表 2.6.6.6- 1　　ラット受胎能及び生殖能・初期胚発生試験の試験デザイン

Administered No. Rats per Group	Iloprost Dose[a]		Duration of Treatment	Report no.
	mg/kg/day	ng/kg/min		
30M	0.008 (0.0024) 0.08 (0.048) 0.8	5.5 (1.67) 55.5 (33.3) 555.5	66-70 days prior to start of mating, through the 14-day mating period	7778
30F	0.01 (0.003) 0.1 (0.06) 1.0	6.94 (2.08) 69.4 (41.7) 694.4	14 days prior to start of mating, through Day 7 post conception	7569

M: male, F: female,
A:ラット 28 週間反復投与試験（報告書 7706）における種々の濃度の製剤での Alzet 浸透圧ポンプを使用した 4 週間後の分析成績に基づき、実投与量は各々低用量で投与量の約 30%、中間用量で約 60%、高用量で約 100%と推定した（括弧内は実投与量を示す）。

試験成績を 2.6.7.12A　7778 及び 2.6.7.12B　7569 に示す。

雄ラットに投与した試験で認められた唯一の所見として、高用量（0.8mg/kg）群で投与第 1 週のみに認められた軽度かつ一過性の体重減少傾向がみられたが、毒性所見と判断しなかった。いずれの試験用量においても、帝王切開（約半数）時の胎児に外表・内臓・骨格奇形の発現は認められず、自然分娩（約半数）させた F1 出生児の受胎能及び生殖能、或いは F2 胎児の外表・内臓・骨格への影響も認められなかった。したがって、雄ラットの一般毒性学的及び生殖能に関する無毒性量、並びに胎児及び出生児（及び F2 胎児）の無毒性量はいずれも最高用量 0.8mg/kg/日と推定された（報告書 7778）。

雌ラットに投与した試験で認められた所見は、中及び高用量群の胎児での前頭骨のごく軽度な骨化遅延（$p<0.05$）であった。この所見は出生前発生に対するイロプロスト投与に起因した影響ではなく、薬剤投与に関連しない妊娠後期の中・高用量群母動物におけるごく軽度な体重増加抑制（統計学的有意差なし）に関連したものと考えられた。投与した雌動物における受胎能及び生

殖能はいずれの試験用量においても影響を認めなかった。したがって、雌ラットの一般毒性学的及び生殖能に関する無毒性量、並びに胎児の無毒性量はいずれも最高用量 1.0mg/kg/日と推定された（報告書 7569）。

2.6.6.6.2　　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1　　ラット胚・胎児発生に関する試験

参照項目：4.2.3.5.2.1　7779

Wistar 系妊娠ラット用いてイロプロスト静脈内持続投与による胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。イロプロストを妊娠 6～15 日のラット（1 群 44～48 例）にアルゼット浸透圧ポンプを用いて反復静脈内投与（持続注入）した。試験デザインを**表 2.6.6.6- 2**に要約する。投与量は妊娠ラットを用いた胚・胎児毒性に関する予備検討結果に基づいて選択した。この予備検討では、1.0mg/kg/日（694ng/kg/分）の用量を妊娠 6～21 日目までラットに静脈内持続注入したところ、母動物の一般状態にイロプロスト投与に関連した明らかな影響は認められなかった。したがって、選択した投与量は、雌ラットを用いた受胎能及び生殖能試験（2.6.6.6.1）で使用した用量と同一の 0.01、0.1 及び 1.0mg/kg/日（6.94、69.4 及び 694.4ng/kg/分）を設定した。母動物は帝王切開群（約 2/3）と自然分娩群（約 1/3）に分け、自然分娩群では F1 出生児の身体／行動発達・機能分化を検討後、F1 出生児間で交配し、妊娠検査後帝王切開して F2 胎児検査を実施した。

表 2.6.6.6- 2　　ラット胚・胎児発生試験の試験デザイン

Group no.	No. Dams per Group		Iloprost Dose [a]		Duration of Treatment
	Section subgroups	Delivery subgroups	mg/kg/day	ng/kg/min	
1	31	15	0	0	Days 6-15 post-conception
2	32	16	0.01 (0.003)	6.94 (2.08)	
3	31	16	0.1 (0.06)	69.4 (41.7)	
4	30	14	1.0	694.4	

A: ラット 28 週間反復投与試験（報告書 7706）における種々の濃度の製剤での Alzet 浸透圧ポンプを使用した 4 週間後の分析成績に基づき、実投与量は各々低用量で投与量の約 30%、中間用量で約 60%、高用量で約 100%と推定した（括弧内は実投与量を示す）。

試験成績を 2.6.7.13A 7779 に示す。

妊娠 6～15 日ラットへのイロプロストの反復持続静脈内投与により、高用量群では母動物に体重増加抑制を伴う顕著な胚致死作用（着床後早期死亡の増加：44 母動物中 15 例で全胚吸収）が認められた。

F1 胎児の外表検査において、低及び高用量群の少数に前肢の異常（指の短小）が認められた。この所見は、母動物に対する過度の薬理（血圧低下）作用に起因した影響と考えられた。出生前発生の後期（四肢構造は既に分化完了後）において本剤の降圧作用により、少数の胎児に局所低酸素状態が起き、肢端の成長遅延が生じたと考えられた。中及び高用量群においては、さらに、前頭骨・頭頂骨の骨化遅延及び胸骨分節 4 箇所に変異を有する個体の増加が、高用量群においては波状肋骨・胸骨分節 2 及び 3 箇所に変異を有する個体の増加・椎体の骨化遅延・未骨化肢骨の軽度増加も認められた。低用量群では、頭頂骨の骨化遅延、胸骨分節の 3 及び 4 箇所に変異を有する個体の増加が認められた。

F1 出生児の生後発達・機能分化・受胎能・妊娠期間などに薬剤投与の影響は認められなかった。F2 胎児の外表・内部・骨検査（骨化パラメータを含む）に関しても、薬剤投与の影響は認められなかった。

以上の成績から、母動物の一般毒性学的及び生殖能に対する無毒性量は 0.06mg/kg/日、胎児に対する無毒性量は 0.003mg/kg/日未満、F1 出生児の生後発達・機能分化及びその生殖能並びに F2 胎児に対する無毒性量は 1.0mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.2.2　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.2.1　　経口投与試験

参照項目：4.2.3.5.2.2　96031
4.2.3.5.2.3　AM31
4.2.3.5.2.4　97005

NZW 系妊娠ウサギを用いてイロプロスト経口投与時の胚・胎児発生に対する影響を評価した。イロプロスト包接化合物（徐放性製剤）を 10、20、40mg/kg/日（イロプロストとして 1.3、2.6、5.2mg/kg/日）の用量にて、妊娠 7～20 日のウサギ（1 群当たり 20 例）に強制反復経口投与した。投与量は妊娠ウサギ（妊娠 6～18 日）にイロプロスト徐放製剤 10、40、80 及び 120mg/kg を反復強制経口投与したパイロット試験（報告書 96031）成績に基づいて設定した。当該パイロット試験では 40mg/kg 以上で母動物に体重増加抑制、摂餌量減少、死亡を含む母体毒性、早期吸収胚の増加がみられ、母動物及び子宮内胎児における無毒性量は 10mg/kg 付近と推定された。したがって、本試験では低用量として 10mg/kg を、高用量として 40mg/kg を、中間用量として 20mg/kg を選択した。なお、当該パイロット試験動物の妊娠 6（投与初日）及び 18 日目（最終投与日）に血液を採取し、血漿中イロプロスト濃度推移を検討した（1 群 4 例；投与 5、15 分、1、4、8 及び 24 時間後に採血して血漿中プロファイリングを検討。ただし、80 及び 120mg/kg 群では母動物死亡により投与初日のみ評価）（報告書 AM31）。

試験成績を 2.6.7.13B　97005 に示す。

妊娠ウサギへの反復強制経口投与により、20 及び 40mg/kg 群に母体毒性が認められた。すなわち、40mg/kg 群における 4 例の死亡（血圧低下によると推定）、並びに 20 及び 40mg/kg 群に流産（各々1 及び 2 例）、耳の発赤、糞便頻度の増加、体重増加抑制及び摂餌量減少がみられた。40mg/kg 群においては子宮内死亡率（吸収胚及び着床後胚死亡）も増加した。胎児の外表検査、内臓検査及び骨格検査においては、いずれの試験用量においても薬剤投与に関連する影響は認められず、また、催奇形性も認められなかった。したがって、無毒性量は、母動物の一般毒性及び生殖能に対して 10mg/kg/日（イロプロストとして 1.3mg/kg/日）、胎児に対して 20mg/kg/日（イロプロストとして 2.6mg/kg/日）と推定された（報告書 97005）。

10 及び 40mg/kg 群におけるイロプロストの全身曝露量（Cmax）は、吸入投与後にヒトで予想される曝露量（142pg/mL）のそれぞれ約 131 倍（18.61ng/mL）及び約 300 倍（42.54ng/mL）に相当した。12 日間の投与期間中、血漿中イロプロストに蓄積性は認められなかった（報告書 AM31）。

2.6.6.6.2.2.2　静脈内投与試験

参照項目：4.2.3.5.2.5　7440

NZW 系妊娠ウサギを用いてイロプロスト静脈内持続投与による胚・胎児発生に対する影響を検討した。イロプロストの 0.01、0.1、0.5mg/kg/日（6.94、69.4、347.2ng/kg/分）を、妊娠 6～28 日のウサギ（1 群当たり 20～21 例）に、アルゼット浸透圧ポンプを用いて反復静脈内投与（持続注入）した。投与量は妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備検討成績に基づいて選択した。当該予備検討では、妊娠 6～28 日に 1.0 mg/kg/日（694.4ng/kg/分）を 22 日間持続静脈内投与したところ、顕著な毒性（母動物の死亡率増加及び体重増加抑制、並びに顕著な胚致死作用）が認められたため、本試験の最高用量は 0.5mg/kg/日（347.2ng/kg/分)とし、中用量 0.1mg/kg/日（69.4ng/kg/分）及び低用量 0.01mg/kg/日（6.94ng/kg/分；実投与量 0.006mg/kg/日）を設定した。

試験成績を 2.6.7.13C　7440 に示す。

妊娠 6 日目のウサギに妊娠 28 日目までイロプロストを 22 日間静脈内持続投与した結果、いずれの試験用量においても胚致死作用及び催奇形性は認められなかった。高用量群では胎児発生のわずかな遅延を示唆する、平均胎児体重の軽度減少傾向（統計学的有意差なし）及び少数の骨（椎骨椎弓及び頭頂骨）における軽度かつ可逆性の骨化遅延（不完全骨化の増加）がみられた。中用量群においても椎骨椎弓の不完全骨化の増加がみられた（対照 0%vs.10.3%）が、対照群の値が低く、施設の背景データ範囲内の値であること、他の骨に影響はなかったことから、薬剤投与に関連する変化とは判断されなかった。以上から、本試験における無毒性量は、母動物の一般毒性及び生殖能に対して 0.5mg/kg/日（347.2ng/kg/分)、胎児に対して 0.1mg/kg/日（69.4ng/kg/分）と推定された（報告書 7440）。

2.6.6.6.2.3　サル胚・胎児発生に関する試験

参照項目：4.2.3.5.2.6　8493
4.2.3.5.2.7　9318

妊娠カニクイザルを用いてイロプロスト持続静脈内投与時の胚・胎児発生に対する影響を検討した。1 群 12 例のカニクイザルの妊娠 20～50 日目にイロプロストの 0.004、0.012、0.040mg/kg を、アルゼット浸透圧ポンプを用いて 30 日間反復静脈内投与（持続注入）した。投与量はサルを用いた 4 週間反復静脈内持続投与試験（2.6.6.3.3.2）の結果に基づいて選択した。当該反復投与試験では、イロプロスト（実投与量） 0.17mg/kg/日（0.118μg/kg/分）を 4 週間静脈内持続注入したところ、全動物（雌雄各 2 例）が投与 2 週間以内に死亡した。死因はイロプロストの薬理作用（血管拡張、並びに収縮期血圧及び平均血圧の低下）に起因したものと考えられた。一方、0.0124mg/kg/日（0.014μg/kg/分）では薬剤投与に関連した所見は認められなかった。したがって、本試験では最高用量として、母動物の生存には影響しないと推定された 0.04mg/kg/日を、以下、中・低用量として 0.012 及び 0.004mg/kg/日を設定した。

試験成績を 2.6.7.13D　8493 に示す。

イロプロストを妊娠 20～50 日のサルに 30 日間静脈内持続注入した結果、いずれの用量においても胚致死作用及び催奇形性は認められなかった。したがって、無毒性量は、母動物の一般毒性及び生殖能並びに胎児に対して、いずれも 0.040mg/kg/日（28ng/kg/分）と推定された（報告書 8493）。

イロプロストの血清中濃度には用量依存的な増加傾向がみられたが、個体内及び同一用量でも動物間でばらつきが大きかった。高用量 0.04mg/kg 群におけるイロプロストの平均血漿中濃度は 1,121pg/mL であり、中央値は 383～1,488pg/mL の範囲内にあった（報告書 9318）。

2.6.6.6.3　出生前及び出生後発生に関する試験

参照項目：4.2.3.5.3.1　7780

Wistar 系雌ラットを用いてイロプロストを妊娠後期から授乳期に静脈内持続投与した場合の、出生前・出生後発生に対する影響を検討した。イロプロストを 1 群当たり 30～33 例の雌ラットの妊娠 15 日～出産後 22 日目に、アルゼット浸透圧ポンプを用いて静脈内持続投与した。投与量は静脈内持続投与によるラット胚・胎児発生に関する予備検討成績（1.0mg/kg で薬剤投与に関連する明らかな影響なし）及びラット 4 週間反復投与試験成績（4.3mg/kg で死亡率増加、0.9mg/kg で血液及び血液生化学検査値の軽度な変動のみ；2.6.6.3.1.3.1参照）を参考に、最高用量として 1.0mg/kg（補正後 0.9mg/kg）を、以下、公比 10 で 0.1（0.09）及び 0.01（0.009）mg/kg を設定した。実投与量を含む試験デザインを**表 2.6.6.6- 3**に示す。

表 2.6.6.6- 3　ラット出生前及び出生後発生に関する試験の試験デザイン

Group no.	Number of dams per group	Iloprost Dose [a]		Duration of treatment	Report no.
		mg/kg/day	ng/kg/min		
1	30	0	0	Day 15 post-conception –Day 22 post-partum	7780
2	33	0.009(0.003)	6.25(1.88)		
3	31	0.09(0.054)	62.5(37.5)		
4	31	0.9	625		

a: ラット 28 週間反復投与試験（報告書 7706）における種々の濃度の製剤での Alzet 浸透圧ポンプを使用した 4 週間後の分析成績に基づき、実投与量は各々低用量で投与量の約 30%、中間用量で約 60%、高用量で約 100%と推定した（括弧内は実投与量を示す）。

試験成績を 2.6.7.14A　7780 に示す。

高用量（0.9mg/kg；625.0ng/kg/分）では、母動物に毒性所見（投与 1 週目の体重増加抑制；出産 1 日目まで有意な体重低値）、ごく軽度な妊娠期間延長、一過性かつ軽度な胎児発生の遅延（生存児体重の軽度低下及び 2 母動物 4 出生児に短指節骨）、生後死亡児の軽度増加（生後 1～4 日及び 9～15 日）が認められた。また、低用量（0.003mg/kg）群においても、出生時 F1 の外表検査において手指の異常（1 母動物 5 出生児に短指節骨又は短屈曲指節骨）が認められた。この異常はラット胚・胎児発生試験（2.6.6.6.2.1）で認められたものと同様であった。これらの成績から、本試験においても、同様に過度の薬理（血圧低下）作用による妊娠後期への影響が示唆された。しかしながら、いずれの試験用量においても、出産後の F1 動物における成長・発達・分化及び生殖能に対する障害所見は認められなかった。

以上の結果から、本試験における無毒性量は、母動物の一般毒性・生殖能に対して 0.054mg/kg/日、新生児（出産時）に対しては 0.003mg/kg/日未満、離乳後の出生児に対しては 0.9mg/kg/日と推定された（報告書 7780）。

2.6.6.6.4　　ラット受胎能及び初期胚、胚・胎児、出生前及び出生後発生を併合した試験

参照項目：4.2.3.5.3.2　97004
4.2.3.5.3.3　96030
4.2.3.5.3.4　AM96

生殖及び発生に関わるすべての期間を投与対象とする併合生殖発生毒性試験を実施した。本試験では、イロプロスト徐放性製剤（イロプロスト約 14%）の 0（媒体 trometamol）、5、50、250mg/kg（イロプロストとして約 0.7、7、35mg/kg）を、SD 系雌性ラットの交配開始前 14 日より、交配及び妊娠期間並びに出産後最長 21 日まで連続して反復強制経口投与した。投与量は、イロプロスト徐放製剤 5、50、125、250 及び 500mg/kg を雌ラットの交配開始前 14 日から妊娠 19 日目又は出産後 6 日目まで投与したラット受胎能に関するパイロット試験成績（報告書 96030）を基に設定した。当該パイロット試験では、500mg/kg 群の母動物に死亡（投与 1 週目）・摂餌量減少（妊娠期間中）及び受胎能への影響（吸収胚増加など）が、250mg/kg 群では着床後死亡の軽度増加が、125 及び 50mg/kg 群では総吸収胚の増加あるいは生存児数及び生育率の軽度減少がみられた。したがって、本試験では低、中及び高用量として、5、50 及び 250mg/kg を設定した。なお、パイロット試験の各群母動物より、妊娠 6 及び 16 日目に血液を採取してイロプロストの血漿中プロファイルを検討した。血漿中濃度分析では、Cmax 及び AUC の用量依存的な増加が認められた（報告書 AM96）。徐放性製剤 5、50 及び 250mg/kg を反復経口投与時における妊娠 16 日目のイロプロスト曝露量（Cmax）は、ヒトに最大臨床予定用量を吸入投与時に予想される全身曝露量（Cmax）のそれぞれ 21、273 及び 806 倍に相当した。

本試験では、SD 系雌ラット各群 60 例を、妊娠 13 日目（15 例）、同 20 日目（20 例）又は（出産後）授乳 21 日目（25 例）屠殺の 3 グループに分け、各々屠殺予定の前日まで被験薬を反復経口投与した。

試験成績を 2.6.7.14B　97004 に示す。

高用量（250mg/kg）群では、母動物に体重増加抑制及び分娩時死亡（1 例）、子宮内及び出産後の死亡が認められた。中用量（50mg/kg）以下の群において、母動物の生殖能、胎児及び出生児に薬剤投与に関連した影響は認められなかった。また、いずれの用量においても催奇形性は認められなかった。無毒性量は、雌ラット・母動物の一般毒性及び生殖能、出生児に対していずれも 50mg/kg/日（イロプロストとして 7mg/kg/日；臨床吸入曝露 Cmax と比較して 273 倍相当の Cmax）と推定された（報告書 97004）。

2.6.6.7　　局所刺激性試験

参照項目：4.2.3.2.1　A01317
4.2.3.2.3　A04447

ラットを用いてイロプロスト吸入投与時の全身毒性を評価した 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1.1）及び 26 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1.2）において、イロプロストを投与したすべての動物及び対応する対照群から採取した呼吸器（気管・肺）を検査した。その結果、呼吸器に局所刺激性所見は認められなかった（報告書 A01317 及び A04447）。

2.6.6.8　　その他の毒性試験

試験成績の概略を 2.6.7.17　その他の毒性試験に示す。

2.6.6.8.1　　皮膚感作性試験

参照項目：4.2.3.7.1.1　9908

各群雌雄各 5 例のモルモットを用いてイロプロストの皮膚感作性を maximization 試験で評価した。感作期の皮内注射及び皮下投与では 500μg/mL 液のイロプロストを投与し、誘発には 100μg/mL 液を用いた。事前に実施した局所忍容性試験では、これらの濃度において壊死や刺激症状は認められず、局所忍容性は良好であった。

感作を行った動物又は対照動物のいずれにおいても、適用部位における誘発投与後の局所反応は認められなかった。したがって、モルモットを用いた maximization 試験において、イロプロストに皮膚感作性はないと結論された。

2.6.6.8.2　　抗原性試験

参照項目：4.2.3.7.1.2　AM20

モルモットを用いて、全身性アナフィラキシー（ASA）試験、受動皮膚アナフィラキシー（PCA）試験、イロプロストに対する特異抗体の酵素結合免疫吸着（ELISA）試験においてイロプロストの抗原性を検討した。本試験は、日本製薬工業協会による抗原性試験のガイドライン（1990 年 10 月）に従って実施した。これらの試験ではイロプロスト-卵白アルブミン結合体を ASA 又は PCA 反応の試験に使用して特異的抗体の有無を検討した。更に、イロプロストにおける免疫調節作用を検討するため、ウシ血清アルブミン（BSA）に対するモルモットの抗体反応を、イロプロスト併用投与存在下および非存在下で ELISA を用いて検討した。

感作期間中イロプロストを投与した動物において ASA 反応は認められず、イロプロスト特異的抗体は検出されなかった。更に、事前未処置のモルモットに、感作処置済み動物から採取した血清を皮下投与した試験では、PCA 陽性反応は認められなかった。陽性対照動物（感作用イロプロスト－BSA 混合物処置）及び陰性対照動物（生理食塩液処置）では予測された反応が認められた。

感作期間において、イロプロスト処置動物の抗 BSA 抗体反応と、生理食塩水処置動物における抗 BSA 抗体反応に有意差は認められなかった。

2.6.6.8.3　　不純物の毒性評価

参照項目：4.2.3.7.6.1　AL64

熱ストレスを加えたイロプロストを用いてラット単回静脈内投与試験を実施した。熱ストレスイロプロストは、原薬バルクを 25℃で 1 ヵ月間保管し、アルゴン置換密閉容器に 55℃で 8 日間の熱ストレスを加えた。熱ストレス加イロプロストの純度は 70.1%で、各々約 10%ずつの類縁物質E*　　及び類縁物質F*　　を含有した。熱ストレス加イロプロストの SD ラット（各群雌雄 5 例）への単回静脈内投与時の概略の致死量は、雄で 50mg/kg、雌で 100mg/kg、雌雄合算で 50mg/kg（LD_{50} 値：94mg/kg；95%信頼区間：66～138mg/kg）であった。ストレスをかけていない intact のイロプロストの SD ラット単回静脈内投与時の概略の致死量は、雄で 65mg/kg、雌で 81mg/kg であったこと（2.6.6.2.2.2参照）から、熱ストレスを加えてもイロプロストの急性毒性に明らかな影響は認められないと結論された。

2.6.6.8.4　　異性体の毒性評価

イロプロストはジアステレオ異性体である 4R-イロプロスト及び 4S-イロプロストがほぼ同量含まれる混合物である。

2.6.6.8.4.1　　単回経口投与毒性

参照項目：4.2.3.7.7.1　AI61

イロプロスト（1,000、2,000 及び 4,000mg/kg）及びジアステレオ異性体［4S-イロプロスト（500、1,000、2,000mg/kg）、4R-イロプロスト（1,000、2,000、4,000mg/kg）；いずれも徐放性製剤］の単回経口投与毒性の比較試験を、各群雌雄 5 例の Wistar ラットへの強制経口投与により実施した。一般症状、生死、体重、摂餌量及び摂水量、剖検所見より評価した。雌雄合算でこれら化合物の単回強制経口投与時の概略の致死量は、イロプロストで 1,000mg/kg と 2,000mg/kg の間、4S 体で 1,000mg/kg、4R 体で 2,000mg/kg と 4,000mg/kg の間にあった。

被験物質間で認められた一般症状に質的な差は認められなかった。ほとんどすべての用量で、アパシー、歩行障害（4R 体の低用量を除く）、皮膚の発赤、中用量又は高用量における側臥位、皮膚の青色調変色、胃粘膜発赤、胃における除去可能な黒茶色変色付着物、閉瞼、流涙過多、死亡などがみられた（4R 体では主として高用量のみ）。死亡例の発現状況から、4S 体及びイロプロストと比較した場合、4R 体の忍容性がより良好であることが示された。認められた一般症状から、被験物質の過度の薬理作用が死因である可能性が示唆された。

2.6.6.8.4.2　　単回静脈内投与毒性

参照項目：4.2.3.7.7.2　AL26

イロプロスト（4S 体及び 4R 体 mix）及びジアステレオ異性体（4S-イロプロスト、4R-イロプロスト）に関して、Wistar ラットへ静脈内単回投与したときの急性毒性の比較試験を実施した（投与量：50、125、250mg/kg、各群雌雄 5 又は 10 例）。一般症状、死亡、体重、摂餌量及び摂水量、剖検所見により毒性を評価した。これら化合物の雌雄ラットへの静脈内単回投与時の概略の致死量は、いずれも 50mg/kg と 125mg/kg の間にあった。

化合物間で実質的な差は認められなかった。認められた一般症状は、主にアパシー、歩行又は姿勢障害、皮膚の発赤、尾（注射部位）における変化（変色及び壊死）であった。4S 体では、摂餌量減少及び体重増加抑制に関して、イロプロスト及び 4R 体と比較してやや影響が強かった。

*新薬承認情報提供時に置き換え

4S 体又はイロプロストを静脈内投与後の生存動物において、剖検所見で精巣サイズの縮小がみられた。これら 3 種類の化合物すべての概略の致死量及びみられた一般症状はイロプロストを用いた他の試験と同様であった。

2.6.6.8.4.3　　反復投与毒性

参照項目：4.2.3.7.7.3　AN54

雌雄 Wistar ラット（各群雌雄 10 例）を用いて[徐放性製剤の]イロプロスト及びジアステレオ異性体（4S-イロプロスト、4R-イロプロスト）の反復投与毒性の比較試験を実施した。本試験では、被験物質を約 4 週間（28～38 日間）連日強制経口投与した［各被験物質の徐放製剤の用量：0、5、50、500mg/kg］。生死、摂餌量及び摂水量、体重、一般症状観察、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査、骨髄検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査所見より毒性を評価した。

イロプロスト及びジアステレオ異性体の反復強制経口投与後の主な所見は、イロプロストの薬理学的作用（血圧低下及び血管拡張）及び／又は高用量投与後の過度の薬理作用に関連したものであった。4S 体では、臨床症状（体重増加、摂餌量・摂水量）、血液学的及び生化学的パラメータ、尿検査値の変化、並びに臓器重量の変動及び病理組織学的検査所見に関して、イロプロスト又は 4R 体に比して強い影響が認められた。

2.6.6.9　　考察及び結論

単回投与毒性

単回投与毒性試験において観察されたアパシー、呼吸障害、歩行障害、四肢、耳、眼瞼の発赤などの一般症状の大半は、主に本薬の薬理作用（血管拡張、血圧低下又は血小板機能抑制作用）に関連したものと考えられた。マウスで観察された肝臓の蒼白化、肺うっ血、肺浮腫、ラットで観察された胃粘膜の発赤及び黒色斑状付着物のような剖検所見も、本薬の過度の薬理作用によるものと考えられた。イロプロストの静脈内投与後に生存したラットでみられた胸腺萎縮はストレスによるものと考えられた。イロプロストの静脈内投与時の概略の致死量には動物種間で差が認められた。

ヒトにおける吸入投与時の臨床用量（0.9μg/kg/日）と、動物において急性毒性症状をもたらす用量（少なくとも mg/kg/日オーダー）との差異を考慮すると、単回投与毒性試験の結果は、ヒトでの本薬吸入療法における重度の急性副作用のリスクを示すものではない。

反復投与毒性

ヒトで予定されている吸入投与経路にてイロプロストをラットに 4 週間反復吸入投与した試験において、イロプロスト投与と関連する可能性のある所見は、雄における血漿中ビリルビン濃度の低下及び雌におけるリン脂質、総脂質、コレステロール濃度の低下のみであった。摂餌量の変動又は肝臓や脂質代謝に関連するその他の臓器において、形態学的変化が認められず、又はこれらが用量依存的でない場合、生理的適応反応であると考えられる。同様に、ビリルビン濃度の低下は、肝クリアランスの増加を反映した変化であると考えられる。したがって、血液生化学的検査で観察された軽度の変動はイロプロストの毒性所見とは判断しなかった。このことは、26 週間の長期吸入投与毒性試験においても同様の所見が認められなかったことからも支持される。

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観察された唯一の所見は、中用量（臨床曝露量 Cmax の 14 倍相当）及び高用量群における肺の絶対及び相対重量の軽度な増加（一部は統計学的有意）であった。この変化はイロプロストの薬理作用（血管拡張作用）による血液量増加の可能性が示唆される。増加した肺重量に対応する病理組織学的異常は認められなかった。

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、軽度の組織学的及び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。著しく高い曝露量では、これらの血行動態の変化により死亡例がみられた。しかしながら、イロプロストによる直接的な臓器毒性所見は認められなかった。サルを用いたイロプロスト（0.17 及び 1.41mg/kg/日）の 4 週間反復静脈内投与（持続注入）試験でみられた死亡例における主な死因は、急激で持続的な血圧低下に起因したものと考えられた。この血圧低下は、ヒトの治療用量である 0.9μg/kg/日の 190 倍以上で発現した。

イロプロストを連日 3 時間持続静脈内投与したラット短期反復静脈内投与試験において、雄にみられた心筋の瘢痕は、自然発生病変[3)]としても報告されているものの、プロスタサイクリンを高用量で皮下投与した後にも同様な所見が認められたことが報告されていること[4)]から、本薬投与との関連が示唆される。最高用量で観察された臓器重量の変化（雌における肝臓及び甲状腺重量の増加、雄における腎臓重量の減少）に関して、これらの臓器に対応する病理組織学的変化は認められなかった。ラットを用いた連日 3 時間持続静脈内反復投与時に観察された一般症状（耳

の発赤及び流涙過多）及び摂餌量減少は、プロスタグランジン I_2（PGI_2）の静脈内投与後にも発現したことが報告されている[5)]。イロプロストの 4 週間反復静脈内持続投与後にラットに観察された前立腺及び精嚢腺のサイズ減少は、細胞/組織構造に形態学的変化を認めなかったことから、内分泌障害というより低栄養又は一般的なストレスに関連した変化である可能性が示唆される。

イロプロストをイヌに長期皮下持続投与後に認められた胸腺重量の増加は、細胞保護作用を示している可能性が考えられる。埋込みポンプ適用部位における炎症細胞反応に関して、対照群とイロプロスト投与群との差異は認められなかったが、血清中γ－グロブリン値の軽度な上昇は、ポンプ埋込部位でのイロプロストの異物反応に対する増強作用と考えられる。観察された一過性の下痢の頻度増加は過度の薬理作用と考えられた。PGI_2 及びプロスタサイクリンアナログは下痢を誘導することが知られている[6,7)]。腸壁の電解質バランス又は消化管運動のいずれかに対する作用が原因と推定される。麻酔下のウサギに PGI_2 及びイロプロストを静脈内投与後に、有意ではないものの、腸内圧の軽度の上昇が報告されている（2.6.2.4.5　胃腸管系に及ぼす影響　報告書 4169）。更に、イヌにおいてプロスタサイクリンは迷走神経の緊張を亢進すること[8)]が示されており、これが死亡及び下痢を増加させる原因となった可能性が考えられる。ラットにおいてイロプロスト及び PGI_2 は尿量を減少させることが知られていること（2.6.2.4.4　腎機能に及ぼす影響　報告書 4474）から、雌犬における尿量の軽度な減少も、イロプロストの薬理作用に関連する可能性が考えられる。

吸入投与されたイロプロストを誤嚥した場合の安全性に関しては、イロプロストの混餌及び強制投与を行った試験成績が適用できる。予定臨床用量の吸入投与後のヒトにおける予想血漿中濃度より高い血漿中濃度となる、ラットへのイロプロストの反復経口投与は、臓器毒性を誘発しなかった。血漿中濃度がヒトでの予想血漿中濃度より高くなるイロプロストのサルにおける 2 週間反復経口投与試験においても忍容性は良好であった。イロプロストを反復強制経口投与したサル 2 例における死亡は、イロプロストの薬理作用（血圧低下作用）に関連したものと考えられた。非経口又は吸入用量より高い経口用量を用いた毒性試験において、消化器毒性所見は認められなかったことから、吸入用量の一部を誤嚥することによる副作用発現の可能性は低いと考えられる。

一連の反復投与毒性試験における無毒性量と臨床用量、投与量及び曝露量での比較（安全域 MoE）を**表 2.6.6.9- 1**に要約する。

表 2.6.6.9- 1　　反復投与毒性試験の無毒性量、臨床吸入用量及びそれらの投与量間又は曝露量間の比較

Route of administration	Duration	Species	NOAEL[a] (μg/kg/day)	MoE based on Dose[b]	MoE based on Cmax[c]	MoE based on AUC[d]	Report no.
Repeated-Dose toxicity							
Inhalation	4 weeks	Rat	22.6	25	5	5	A01317 & B784
Inhalation	26 weeks	Rat	48.7	54	10-21[16]	16-33	A04447 & A05405
Oral (gavage)	2 weeks	Rat	2,000	2,222	-	-	4739
Oral (diet)	28 weeks	Rat	600	667	3	33-37[e]	AC52 & AB90
Oral (gavege)	2 weeks	Monkey	20	22	5-7	-	4858Ⅱ
Oral (capsule)	53 weeks	Dog	50	56	2-5	8-10	A706 & A693
IV infusion	10(8) days	Rat	200	222	-	-	4544
IV infusion	11(9) days	Monkey	2	2.2	-	-	4545
IV infusion	4 weeks	Rat	200	222	-	-	6075
IV infusion	4 weeks	Monkey	12.4	13.8	-	-	5482
IV infusion	28 weeks	Rat	500	556	25-35	274-391[e]	7948 & 7442
SC infusion	26 weeks	Dog	96-97	107-108	11-15	125-164[e]	7949

a: Actual dose of iloprost, -: No data available.
b: 0.9 μg/kg/day (患者体重を 50 kg として算定).
c: 142 ng/L (日本人 PK 試験 試験番号 15266: 報告書番号 A56356; 5μg 投与セッションでの平均 Cmax; M2.7.2.2.1).
d: 34.1 ng･h/L(日本人 PK 試験 試験番号 15266: 報告書番号 A56356; 5μg 投与セッションでの平均 AUC; M2.7.2.2.1) 1 日当たり 9 回投与= 306.9 ng･h/L.
e: 持続投与及び混餌投与時の血漿又は血清中濃度は一定とみなして算定 (平均濃度の 24 倍).

反復投与毒性試験で得られた無毒性量及びその曝露量はいずれも、臨床吸入投与量及びその曝露量より大きく、ヒトで予定される臨床用量のイロプロスト吸入投与に際して、概して問題となる全身毒性はみられないと予想される。

遺伝毒性

代謝活性化系の存在下及び非存在下で、細菌及び哺乳類培養細胞を用いて実施された *in vitro* 試験において、イロプロストは変異原性を示さないことが確認された。更に、マウスに最高 40mg/kg のイロプロストを静脈内投与した *in vivo* 小核試験において小核誘発性は認められなかった。

がん原性

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反復経口(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。この肺炎発現率増加の成因として高用量（125mg/kg）の本薬反復強制経口投与時に胃内容物の逆流及び誤嚥が生じた可能性が示唆され、減量（100mg/kg）により死亡（肺炎発生）率は明らかに減少した。

一連のがん原性試験の最高用量と臨床最大吸入用量及び曝露量の比較を**表 2.6.6.9- 2**に示す。

マウス及びラットのがん原性試験成績から、イロプロストの混餌投与又は強制経口投与はがん原性を持たないことが示された。

表 2.6.6.9- 2 がん原性試験で検討した最高用量と臨床吸入用量及び曝露量の比較

Species / Strain	Route of application	Treatment Duration [weeks]	Maximal Test Dose[a] [mg/kg/day]	MoE based on			Report no.
				Dose[b]	Cmax[c]	AUC[d]	
Mice/ NMRI	PO (diet)	95-97	M: 10.3 F: 13.3	M: 11,444 F: 14,778	M: 18 F: 27	M: 203[e] F: 305[e]	AW35 & AR18
Mice/ CD-1	PO (gavage)	104-105	16.25	18,056	M: 270[f] - 1085[g] F: 768[f] - 775[g]	M: 450[g] F: 570[g]	BC60, SFR-KIST20000009 & AM30
Rats/ Wistar	PO (diet)	104-108	M: 4.2 F: 5.3	M: 4,668 F: 5,889	M: 8 F: 11	M: 94[e] F: 117[e]	AP21 & AO43
Rats/ SD	PO (gavage)	104-105	16.25 - 13.0	18,056 - 14,444	M: 425[f] - 838[h] F: 254[f] - 1183[h]	M: 639[h] F: 749[h]	BC61, SFR-KIST20000009 & AL96

a: Actual dose of iloprost, M: male, F: Female,
b: 0.9 μg/kg/day (患者体重を 50 kg として算定)
c: 142 ng/L (日本人 PK 試験 試験番号 15266: 報告書番号. A56356; 5μg 投与セッションでの平均 Cmax; M2.7.2.2.1)
d: 34.1 ng･h/L(日本人 PK 試験 試験番号 15266: 報告書番号 A56356; 5μg 投与セッションでの平均 AUC; M2.7.2.2.1) 1 日当たり 9 回投与=306.9 ng･h/L
e 混餌投与時の血漿又は血清中濃度は一定とみなして算定(平均濃度の 24 倍)
f: 連日投与 53 週目の投与約 15 分後のデータに基づく (SFR-KIST20000009)
g: 用量設定試験（AM30）のイロプロスト 17.2 mg/kg [徐放性製剤 125 mg/kg] 投与群 72 日目のデータに基づく。
h: 用量設定試験（AL96）のイロプロスト 17.2 mg/kg[徐放性製剤 125 mg/kg] 投与群の 72 日目のデータに基づく。

生殖発生毒性

イロプロストを雄ラットの交配前及び交配期間中、雌ラットの交配前から交配期間及び妊娠の 7 日目まで各々持続静脈内投与した試験、イロプロスト徐放製剤として雌ラットの生殖発生の全期間にわたって連日強制経口投与した併合試験成績から、静脈内投与又は経口投与のいずれにおいても、イロプロストは雌雄ラットにおいて受胎能又は生殖能のいずれにも影響しなかった。

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、用量依存性は明確でないものの、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る。イロプロスト徐放性製剤を雌ラットの全生殖期間にわたって連日強制経口投与した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、全身曝露量が十分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。

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]。イロプロストは、正常血圧ラットにおいて、0.3μg/kg/分の投与速度で 20 分間持続静脈内注入することにより降圧作用を示すことが報告されている（2.6.2.2.2.1 *In vivo* 肺血行動態及び全身血行動態作用 報告書 7145）。更に、イロプロストの降圧用量の静脈内持続注入は、骨格筋及び消化管では血流を増加させ、その他の臓器（腎臓、脾臓、肺及び皮膚）では逆に減少させることが知られていることから、イロプロストは心拍出分布の変動を誘導することが示唆される。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。ただし、後肢に同様の影響が生じない理由については明確ではない。また、この異常はラットへのイロプロストの持続注入においてのみ誘発される可能性が高く、この軽度な発育遅延は概ね可逆性であると予想される。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。

ウサギ及びサルにおける胚・胎児発生に関する試験から、いずれの動物種においてもすべての試験用量で催奇形性は認められなかった。更に、雌ラットを用いた出生前・出生後発生に関する試験では、ヒトにおける吸入投与での治療用量での曝露量（Cmax）の 273 倍相当の連続曝露においても、イロプロスト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。

一連の生殖発生毒性試験における無毒性量、臨床吸入用量及び曝露量間の比較（安全域 MoE）を、**表 2.6.6.9- 3**に示す。

表 2.6.6.9- 3 生殖発生毒性試験における無毒性量と臨床吸入投与、投与量間及び曝露量間の比較

Study type	Route of application	Duration	Species	NOAEL[a]	MoE based on			Report no.
				(µg/kg/day)	Dose[b]	Cmax[c]	AUC[d]	
Fertility tox.	IV infusion	66-70PM+14MT	Rat (M)	M & Fetus: 800	889	-	-	7778
	IV infusion	14PM+MT to G7	Rat(F)	F & Fetus: 1,000	1111	-	-	7569
Embryo-fetal tox.	IV infusion	G6-15	Rat	P: 60 Fetus: < 3 Offspring: 1,000	67 < 3 1111	- - -	- - -	7779
	PO (gavage)	G7-20	Rabbit	P: 1,300 Fetus: 2,600	1,444 2,889	131 300	101 -	97005
	IV infusion	G6-28	Rabbit	P: 500 Fetus: 100	556 111	- -	- -	7440
	IV infusion	G20-50	Monkey	P & Fetus: 40	44	3-10	30-116[f]	8493
Peri- and postnatal develop.	IV infusion	G15～PP22	Rat	P: 54 Newborn: < 3 Offspring[e]: 900	60 < 3 1,000	- - -	- - -	7780
Whole repro-duct. period	PO (gavage)	14PM+MT to 21PP	Rat	P, Fetus & Offspring: 7,000	7,778	273	237	97004

a Actual dose of iloprost, PM: premating, MT: mating, G: gestation, PP: post partuation, P: Parent (Maternal), M: males, F: females, -: no data available.
b: 0.9 µg/kg/day (患者体重を 50 kg として算定).
c: 142 ng/L (日本人 PK 試験 試験番号 15266: 報告書番号 A56356; 5µg 投与セッションでの平均 Cmax; M2.7.2.2.1).
d: 34.1 ng･h/L (日本人 PK 試験 試験番号 15266: 報告書番号 A56356; ; 5µg 投与セッションでの平均 AUC; M2.7.2.2.1) 1 日当たり 9 回投与= 306.9 ng･h/L
e: after weaning,
f: 持続投与時の血漿又は血清中濃度は一定とみなして算定(平均濃度の 24 倍).

局所刺激性

ラットを用いた 4 週間及び 26 週間反復吸入投与毒性試験において、呼吸器系（気管・肺組織）に局所刺激性所見は認められなかった。

その他の試験

モルモットを用いた maximization 試験で皮膚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も認められなかった。

熱ストレスをかけたイロプロストの単回静脈内投与試験の結果、熱ストレスはイロプロストの急性毒性に影響を及ぼさなかった。

ラットにイロプロストジアステレオ異性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、イロプロストの単回静脈内投与後の結果と類似していた。ラットにイロプロスト及びジアステレオ異性体を単回経口投与した結果、一般症状は同様であったが、4S 体の方がイロプロストよりも毒性所見がやや強く、概略の致死量は 4R 体の方がイロプロストよ

りも大きかった。ラットにイロプロスト及びジアステレオ異性体を約 4 週間反復強制経口投与した結果、イロプロストと 4S 体では毒性所見に質的な差は認められなかったが、生じた過度の薬理作用の種類と程度については 4R 体の方がイロプロストよりも弱かった。また、4S 体では 4R 体よりも、一般症状（アパシー、歩行障害、流涙過多、下痢、皮膚の発赤）、血液学的検査所見（血小板数、白血球数、リンパ球数減少）、摂餌量・摂水量の減少、体重増加量の減少、生化学的検査所見（血清中コレステロール、グルコースのわずかな増加、総たん白、αグロブリンのわずかな減少）、前立腺及び精嚢のサイズ減少が強く認められた。

結語

一連のイロプロストの毒性試験成績から、イロプロスト吸入製剤の臨床使用において問題となる毒性所見はみられないと結論された。

2.6.6.10　図表

図表は本文中に適切に記載した。

引用文献一覧

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)

3) Fairweather FA. Cardiovascular disease in rats. In: Cotchin E, Roe F eds. Pathology of laboratory rats and mice. Blackwell Scientific Publications 1967:213 (4.3.9 添付)

4) Creasy DM et al. Preliminary toxicity testing of prostacyclin. In: Vane JR, Bergström S eds. Prostacyclin. New York: Raven Press 1979: 385-391 (4.3.10 添付)

5) Lund JE et al. The toxicology of PGE_1 and PGI_2. In: Wu KK, Rossi EC eds. Prostaglandins in clinical medicine. Chicago, London: Year Book Medical Publishers Inc. 1981: 93- 109 (4.3.11 添付)

6) Schrör K. PROSTAGLANDINS and Related Compounds; Formation, function, and pharmacological modification. Georg Thieme Verlag Stuttgar -New York 1984: 193-201 (4.3.12 添付)

7) Whittle BJR & Boughton-Smith NK. 16-Phenoxy prostacyclin analogs-potent, selective antiulcer compounds. In: Vane JR, Bergström S eds. Prostacyclin. New York. Raven Press 1979: 159-171 (4.3.13 添付)

8) Hintze HT et al. Proc Soc Exp Biol Med 1979: 162: 96-100 (4.3.14 添付)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Test Article: Iloprost

Study type	Species/Strain	Method of administration	Duration	Nominal Iloprost Doses [mg/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number	Location
Single-Dose Toxicity								
	Mice/NMRI (M)	p.o. (gavage)	-	0, 40, 60, 80, 100	Yes	Schering AG	4300	4.2.3.1.1
	Mice/NMRI (M)	i.v.	-	0, 125, 150, 175, 200, 250	Yes	Schering AG	5359	4.2.3.1.2
	Mice/NMRI (F)	i.v.	-	0, 125, 175, 200, 250, 300	Yes	Schering AG	5389	4.2.3.1.3
	Rats/Wistar (M)	p.o. (gavage)	-	0, 40, 60, 80, 100	Yes	Schering AG	4301	4.2.3.1.4
	Rats/Wistar (M/F)	i.v.	-	0, 50, 100, 125, 150, 200	Yes	Schering AG	5362	4.2.3.1.5
	Rats/SD (M/F)	i.v.	-	65, 81, 102, 128, 160, 200	Yes	[redacted]	AI62	4.2.3.1.6
	Rabbits/NZW (M/F)	i.v.	-	0, 2.5, 5.0, 15.0, 25.0	Yes	Schering AG	5326	4.2.3.1.7
	Cynomolgus Monkeys (M/F)	i.v.	-	2.5, 5	Yes	[redacted]	AL54	4.2.3.1.8
	Cynomolgus Monkeys (M)	i.v. (infusion)	-	3.75, 7.75[a]	Yes	[redacted]	AL83	4.2.3.1.9

a: Cumulative dose

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（つづき）

Test Article: Iloprost

Study type	Species/Strain	Method of administration	Duration	Nominal Iloprost Doses [mg/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number	Location
Repeated-Dose Toxicity								
	Rats/Wistar	inhalation	4 weeks	0, 0.9, 3.6, 10.8, 24.6 (µg/ kg)	Yes	[redacted]	A01317	4.2.3.2.1
					Yes	Schering AG	B784 [c]	4.2.3.2.2
	Rats/Wistar	inhalation	26 weeks	0, 3.6, 24.6, 43.7 (µg/ kg)	Yes	[redacted]	A04447	4.2.3.2.3
					Yes	Schering AG	A05405 [c]	4.2.3.2.4
	Mice/ NMRI (M)	p.o. (fin diet)	28-29 days	0, 16.3	Yes	Schering AG	A040	4.2.3.2.5
					Yes	Schering AG	9914 [c]	4.2.3.2.6
	Mice/ CD-1	p.o. (gavage)	12 weeks	0, 5, 50, 125, 250[d] [0, 0.69, 6.9, 17.2, 34.4 as iloprost]	Yes	[redacted]	96028	4.2.3.2.7
					Yes	Schering AG	AM30 [c]	4.2.3.2.8
	Rats/Wistar	p.o. (gavage)	15 - 16 days	0, 0.002, 0.02, 0.2, 2.0	Yes	Schering AG	4739	4.2.3.2.9
	Rats/ SD	p.o. (gavage)	12 weeks	0, 5, 50, 125, 250[d] [0, 0.69, 6.88, 17.2, 34.4 as iloprost]	Yes	[redacted]	96029	4.2.3.2.10
					Yes	Schering AG	AL96 [c]	4.2.3.2.11
	Rats/Wistar (M)	p.o. (in diet)	8 days	0, 6	Yes	Schering AG	9940	4.2.3.2.12
					Yes	Schering AG	9564 [c]	4.2.3.2.13
	Rats/Wistar	p.o. (in diet)	27 - 28 weeks	0, 0 (placebo), 0.6, 1.8, 6.0	Yes	Schering AG	AC52	4.2.3.2.14
					Yes	Schering AG	AB90 [c]	4.2.3.2.15
	Rats/Wistar	i.v.(infusion,3h)	10-11 days	0, 0.002, 0.02, 0.2, 2.0	Yes	Schering AG	4544	4.2.3.2.16
	Rats/Wistar	i.v. (infusion)	28 days	0, 0.2, 1.0, 5.0	Yes	Schering AG	6075	4.2.3.2.17
	Rats/Wistar	i.v. (infusion)	ca. 28 weeks	0, 0.05, 0.10, 0.50	Yes	Schering AG	7948	4.2.3.2.18
					Yes	Schering AG	7442 [c]	4.2.3.2.19
	Beagle Dogs	p.o. (capsule)	4 weeks	0.05, 0.15	Yes	Schering AG	9215	4.2.3.2.20
					Yes	Schering AG	9122 [c]	4.2.3.2.21
	Beagle Dogs	p.o. (capsule)	53 weeks	0, 0 (placebo), 0.05, 0.15	Yes	Schering AG	A706	4.2.3.2.22
					Yes	Schering AG	A693[c]	4.2.3.2.23
	Beagle Dogs	s.c. or i.v. (infusion)	4 - 29 days	s.c.: 0.0625, 0.125, 0.25, i.v.: 0.25, 0.5;	Yes	Schering AG	7573	4.2.3.2.24
	Beagle Dogs	s.c. (infusion)	26 weeks	0, 0.031, 0.063, 0.125	Yes	Schering AG	7949	4.2.3.2.25
					Yes	Schering AG	8058 [c]	4.2.3.2.26

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Iloprost

Study type	Species/Strain	Method of administration	Duration	Nominal Iloprost Doses [mg/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number	Location
Repeated-Dose Toxicity (Continued)								
	Monkeys/ *M.fascicularis*	p.o. (gavage)	10 days	0, 0.16, 0.8	Yes	Schering AG	5456	4.2.3.2.27
	Monkeys/ *M.fascicularis*	p.o. (gavage)	14-15 days	0, 0.02, 0.2, 1.0	Yes	Schering AG	4858/II	4.2.3.2.28
	Monkeys/ *M.fascicularis*	i.v. (infusion)	11 days	0, 0.002, 0.02, 0.2, 2.0	Yes	Schering AG	4545	4.2.3.2.29
	Monkeys/ *M. fascicularis*	i.v. (infusion)	28 days	0, 0.02, 0.2, 2.0	Yes	Schering AG	5482	4.2.3.2.30

b: NOAEL was underlined
c: TK report
d: Doses of iloprost clathrate

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Iloprost

Study type	Species/Strain	Method of administration	Duration	Nominal Iloprost Doses [mg/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number	Location
Genotoxicity								
Reverse mutation assay	*S. typhimurium* (direct plate inc.)	*in vitro*	-	0.01 –5.0 mg/plate (6 concentrations)	Yes	Schering AG	5169	4.2.3.3.1.1
	S. typhimurium (preincubation.)	in vitro	-	0.05 - 5.0 mg/plate (7 concentrations)	Yes	Schering AG	7466	4.2.3.3.1.2
	E. coli (direct plate inc.)	*in vitro*	-	0.001 - 5.0 mg/plate (7 conc.)	Yes	[redacted]	7548	4.2.3.3.1.3
Chromosome aberration	Human lymphocytes	*in vitro*	-	-S9: 5, 25, 50 µg/mL, +S9: 25, 100, 250 µg/mL	Yes	Schering AG	7160	4.2.3.3.1.4
HGPRT test	Chinese hamster V79 cells	*in vitro*	-	-S9: 25, 100, 150, 250 µg/mL, +S9: 47.5, 100, 300, 475 µg/mL	Yes	[redacted]	7429	4.2.3.3.1.5
Micronucleus test	Mice/NMRI	i.v.	Single-dose	0, 10, 20, 40	Yes	Schering AG	5360	4.2.3.3.2.1
Carcinogenicity								
	Mice/NMRI	p.o. (in diet)	Ca. 96 weeks	0, 35.7, 117.0[d] [3.1/3.7, 10.3/13.3 mg/kg as iloprost]	Yes	Schering AG	AW35	4.2.3.4.1.1
					Yes	Schering AG	AR18[c]	4.2.3.4.1.2
	Mice/CD-1	p.o. (gavage)	104 weeks	0, 5, 50, 125[d] [0.65, 6.5, 16.25 mg/kg as iloprost]	Yes	[redacted]	BC60	4.2.3.4.1.3
	Rats/Wistar	p.o. (in diet)	104 weeks	0, 13.7, 45.6[d] [1.3/1.6, 4.2/5.3 mg/kg as iloprost]	Yes	Schering AG	AP21	4.2.3.4.1.4
					Yes	Schering AG	AO43[c]	4.2.3.4.1.5
	Rats/SD	p.o. (gavage)	104 weeks	0, 5, 50, 125/100[d] [0.65, 6.5, 16.25/13 mg/kg as iloprost]	Yes	[redacted]	BC61	4.2.3.4.1.6
					No[e]	Schering AG	SFR-KIST20000009[c]	4.2.3.4.1.7

c: TK report,
d: Doses of iloprost clathrate,
e: TK report for BC 30 & BC61; Analysis of plasma sample (at ca. 15 min. post application at week 53 in daily repeated administration) were done in non-GLP.

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Iloprost

Study type	Species/Strain	Method of administration	Duration	Nominal Iloprost Doses [mg/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number	Location
Reproductive and Development Toxicity								
Seg.I	Rats/Wistar (F)	i.v.(infusion)	PM14- G7	0, 0.01, 0.1, 1.00	Yes	Schering AG	7569	4.2.3.5.1.1
	Rats/Wistar (M)	i.v.(infusion)	PM 66 through 14 day mating period	0, 0.008, 0.08, 0.8	Yes	Schering AG	7778	4.2.3.5.1.2
Seg.II	Rats/Wistar	i.v.(infusion)	G 6-15	0, 0.01, 0.1,1.0	Yes	Schering AG	7779	4.2.3.5.2.1
	Rabbits/NZW (pilot study)	p.o. (gavage)	G6 - 18	10, 40, 80, 120 [d] [1.3, 5.2, 10.4, 15.6 as iloprost]	Yes	[redacted]	96031	4.2.3.5.2.2
					Yes	Schering AG	AM31[c]	4.2.3.5.2.3
	Rabbits/NZW	p.o. (gavage)	G 7 - 20	0, 10, 20, 40 [d] [0, 1.3, 2.6, 5.2 as iloprost]	Yes	[redacted]	97005	4.2.3.5.2.4
	Rabbits/NZW	i.v.(infusion)	G 6 - 28	0, 0.01, 0.1, 0.5	Yes	Schering AG	7440	4.2.3.5.2.5
	Cynomolgus Monkeys	i.v.(infusion)	G 20 - 50	0, 0.004, 0.012, 0.04	Yes	[redacted]	8493	4.2.3.5.2.6
					Yes	Schering AG	9318[c]	4.2.3.5.2.7
Seg. III	Rats/Wistar	i.v.(infusion)	PC 15 – PP22	0, 0.009, 0.09, 0.9	Yes	Schering AG	7780	4.2.3.5.3.1
Seg. I - III	Rats/SD	p.o. (gavage)	PM14 – G13 or G20 or PP21	0, 5, 50, 250[d] [0, 0.7, 7, 35 as iloprost]	Yes	[redacted]	97004	4.2.3.5.3.2
	Rats/SD	p.o. (gavage)	PM14 – G19 or PP6	0, 5, 50, 125, 250, 500[d] [0, ca.0.7, 7, 35 as iloprost]	Yes	[redacted]	96030	4.2.3.5.3.3
					No	Schering AG	AM96[c]	4.2.3.5.3.4

c: TK report
d: Doses of iloprost clathrate
PM: Pre Mating, G: Gestation, PP: Post Parturition

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Iloprost

Study type	Species/Strain	Method of administration	Duration	Nominal Iloprost Doses [mg/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number	Location
Other Toxicity Studies								
Maximization test	Guinea pigs	dermal	Day 1, 9, 23	Days 1& 9: 0.5 mg/mL, Day 23: 0.1 mg/mL	Yes	Schering AG	9908	4.2.3.7.1.1
Antigenicity test	Guinea pigs	s.c.	Day 1, 15	Day 1: 0.25 mg/animal Day 15: 0.05, 0.25 mg/animal	Yes	[redacted]	AM20	4.2.3.7.1.2
Impurities	Rats/SD	i.v.	Single dose	50, 100, 200[e]	Yes	[redacted]	AL64	4.2.3.7.6.1
Isomers	Rats/Wistar	p.o. (gavage)	Single dose	S-form: 500, 1000, 2000 Mixture and R-form: 1000, 2000, 4000	Yes	Schering AG	AI61	4.2.3.7.7.1
Isomers	Rats/Wistar	i.v.	Single dose	0, 50, 125, 200 ；Same doses of R- ,S-forms and iloprost (R+S)	No	Schering AG	AL26	4.2.3.7.7.2
Isomers	Rats/Wistar	p.o. (gavage)	28 - 38 days	0, 5, 50, 500; Same doses of R- and S-forms and iloprost clathrate (S+R)	Yes	Schering AG	AN54	4.2.3.7.7.3
Others (Bioanalysis)	Rats/Wistar	i.v. (infusion)	28 weeks (+ 4 weeks intermitted analysis)	0, 0.05, 0.10, 0.50	Yes	Schering AG	7706	4.2.3.7.7.4

e: Test material was forcibly aged iloprost

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Iloprost

Study Type	Species/Strain	Method of Administration	Nominal Iloprost or Iloprost clathrate Dose [mg/kg]	GLP Compliance	Report Number	Location
Repeated-Dose Toxicity						
4 weeks repeated-dose toxicity	Rats/Wistar	inhalation	0.9, 10.8, 24.6 µg/kg (iloprost)	Yes	B784	4.2.3.2.2
26-week repeated-dose toxicity	Rats/Wistar	inhalation	3.6, 24.6, 43.7µg/kg (iloprost)	Yes	A05405	4.2.3.2.4
28-week repeated-dose toxicity	Rats/Wistar	p.o. (diet)	0.6, 1.8, 6.0 mg/kg (as iloprost)	Yes	AB90	4.2.3.2.15
28-week repeated-dose toxicity	Rats/Wistar	i.v.(infusion)	0.05, 0.1, 0.5 mg/kg (iloprost)	Yes	7442	4.2.3.2.19
26-week repeated-dose toxicity	Beagle Dogs	s.c.(infusion)	0.031, 0.063, 0.125 mg/kg (iloprost)	Yes	8058	4.2.3.2.26
53-week repeated-dose toxicity	Beagle Dogs	p.o. (capsule)	0.05, 0.15 mg/kg (iloprost)	Yes	A693	4.2.3.2.23
2-week repeated-dose toxicity	Monkeys/*macaca fascicularis*	p.o.(gavage)	0.02, 0.2, 1 mg/kg (iloprost)	Yes	4858/II	4.2.3.2.28
Carcinogenicity						
96-week carcinogenicity study	Mice/MNRI	p.o. (diet)	4.7, 15.4 mg/kg (iloprost clathrate; 3.1/3.7, 10.3/13.3 mg/kg as iloprost)	Yes	AR18	4.2.3.4.1.2
12 weeks DRF tumorigenicity study	Mice/CD-1	p.o. (gavage)	5, 50, 125, 250 mg/kg (iloprost clathrate)	Yes	AM30	4.2.3.2.8
104-week carcinogenicity study	Rats/Wistar	p.o. (diet)	1.8, 6.0 mg/kg (iloprost clathrate; 1.3/1.6, 4.2/5.3 mg/kg as iloprost)	Yes	AO43	4.2.3.4.1.5
12 weeks DRF tumorigenicity study	Rats/SD	p.o.(gavage)	5, 50, 125, 250 mg/kg (iloprost clathrate)	Yes	AL96	4.2.3.2.11
Reproductive & Development Toxicity						
Seg.II	Rabbits/NZW	p.o. (gavage)	10, 40 mg/kg (iloprost clathrate; 1.3, 5.2 mg/kg as iloprost)	Yes	AM31	4.2.3.5.2.3
Seg. II	Cynomolgus Monkeys	i.v. (infusion)	0.004, 0.012, 0.04 mg/kg (iloprost)	Yes	9318	4.2.3.5.2.7
Seg.I-III	Rats/Wistar	p.o. (gavage)	5, 50, 250 mg/kg (iloprost clathrate; 0.7, 7, 35 mg/kg as iloprost)	No	AM96	4.2.3.5.3.4

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose (mg/kg/day)	Plasma/Serum Concentration (pg/mL) Mice Male	Mice Female	Rats Male	Rats Female	Rabbits Female	Dogs Male	Dogs Female	Monkeys Male	Monkeys Female			Adm. Route [Report no.]
0.00084			<50	<50	(15')						4 weeks	Inhalation [B784]
0.00355			676	747							26 weeks	Inhalation [A05405]
0.004									364		Segment Ⅱ	IV-infusion[9318]
0.00915			348	559	(15')					Day 26	4 weeks	Inhalation [B784]
0.012									1060		Segment Ⅱ	IV-infusion [9318]
0.02								900	700	Day 12	2 weeks	Oral(gavage) [4858/II]
			<1100	<1100							28 weeks	IV-infusion [7442]
0.0226			466	783	(135')					Day 26	4 weeks	Inhalation [B784]
0.024						400	400			Whole	26 weeks	SC-infusion [7949]
0.0278			1750	2158							26 weeks	Inhalation [A05405]
0.04									1121		Segment Ⅱ	IV-infusion [9318]
0.047						900				Whole	26 weeks	SC-infusion [7949]
0.0487			1467	2998							26 weeks	Inhalation [A05405]
0.049							900			Whole	26 weeks	SC-infusion [7949]
0.05				<1100							28 weeks	IV-infusion [7442]
						349	696				53 weeks	Oral(gavage) [A693]
0.06			1240								28 weeks	IV-infusion [7442]
0.096							1600			Whole	26 weeks	SC-infusion [7949]
0.097						2100				Whole	26 weeks	SC-infusion [7949]
0.15						958	1407				53 weeks	Oral(gavage) [A693]
0.2								3950	4850	Day 12	2weeks	Oral(gavage) [4858/II]
0.5			5000	3500							28 weeks	IV-infusion [7442]
0.6			418	468						Day 181	28 weeks	Oral(in diet) [AB90]
0.65	1230	1520								Week 53	Tumorigen.	Oral (gavage) [SFR-]
0.7				3000						G16	Seg. I-Ⅲ	Oral(gavage) [AM96]

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧（つづき）

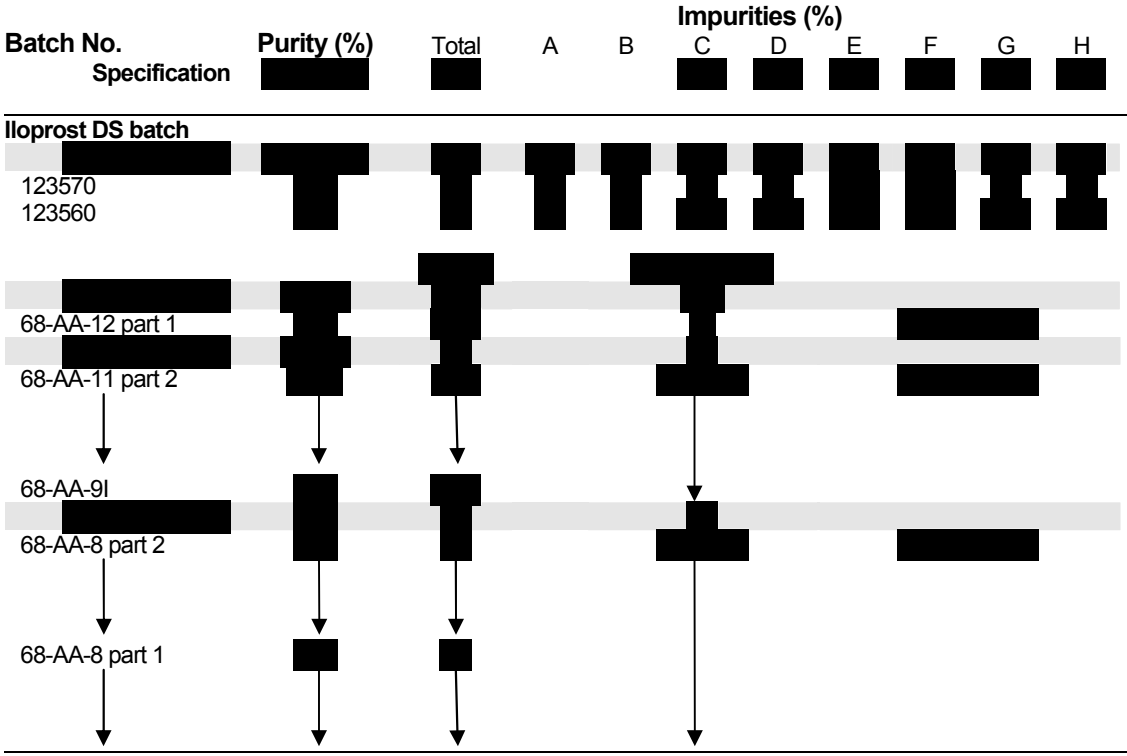
Test Article: Iloprost

Daily Dose (mg/kg/day)	Plasma/Serum Concentration (pg/mL) Mice Male	Mice Female	Rats Male	Rats Female	Rabbits Female	Dogs Male	Dogs Female	Monkeys Male	Monkeys Female			Adm. Route [Report no.]
1.0								26400	7450	Day 12	14-15days	Oral(gavage) [4858/II]
1.3					18610					G18	Segment Ⅱ	Oral(gavage)[AM31]
			390							Week 104	Tumorigen.	Oral(diet)[AO43]
1.6				459						Week 104	Tumorigen.	Oral(diet)[AO43]
1.8			1010	1160						Day 181	28 weeks	Oral(in diet) [AB90]
3.1	900									Week 95	Tumorigen.	Oral(in diet) [AR18]
3.7		470								Week 95	Tumorigen.	Oral(in diet) [AR18]
4.2			1240							Week 104	Tumorigen.	Oral(diet)[AO43]
5.2					42540					G18	Segment Ⅱ	Oral(gavage)[AM31]
5.3				1464						Week 104	Tumorigen.	Oral(diet)[AO43]
6.0			2550	3490						Day 181	28 weeks	Oral(in diet) [AB90]
6.5	18000	25200								Week 53	Tumorigen.	Oral (gavage) [SFR-]
7.0				38800						G16	Seg. Ⅰ-Ⅲ	Oral(gavage)[AM96]
10.3	2600									Week 95	Tumorigen.	Oral(in diet) [AR18]
13.3		3900								Week 95	Tumorigen.	Oral(in diet) [AR18]
16.25	38300	109000								Week 53	Tumorige.	Oral (gavage) [SFR-]
35				114500	(n=1)					G16	Seg. Ⅰ-Ⅲ	Oral(gavage) [AM96]

a: Steady state for IV-infusion or administered in diet, approximate Cmax for per os by gavage.
SFR-: SFR-KIST 20000009

2.6.7.4　　毒性試験：　被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article：　Iloprost



Type of study	Report No.
6 months repeated-dose inhalation study in rats	A04447
4 weeks repeated-dose inhalation study in rats	A01317
Segment II study in monkeys	8493
26 weeks repeated-dose SC study in dogs	7949
4 weeks repeated-dose IV/SC study in dogs	7573
Reverse mutation in *S. typhimurium* (preincubation)	7466
Reverse mutation in *E. coli*	7548
28 weeks repeated-dose IV study in rats	7948
28 weeks repeated-dose IV study in rats	7948
Chromosomal aberration in human lymphocytes	7160
Segment I study in male rats	7778
Segment III study in rats	7780
HGPRT test in Chinese hamster V79 cells	7429
Segment I study in female rats	7569
Segment II study in rats	7779
Segment II study in rabbits (IV)	7440

A: Sum of unidentified; B: Unidentified single; C: 類縁物質C* ; D: 類縁物質D* ; E: 類縁物質E* ; F: 類縁物質F* ; G: 類縁物質G* ; H: 類縁物質H*

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4　　毒性試験：　被験物質（バッチ毎）一覧（つづき）

Test Article：　Iloprost

Batch No.	**Purity (%)**	**Impurities (%)** Total	**Type of study**	**Report No.**
Iloprost DS batch				
68-AA-2/68-AA-3			28 days repeated-dose IV study in rats	6075
68-AA-1/1			Single dose IV toxicity study in mice (M)	5359
			Single dose IV toxicity study in mice (F)	5389
			Single dose IV toxicity study in rats	5362
			Single dose IV toxicity study in rabbits	5326
			4 weeks repeated-dose IV study in monkeys	5482
UT901			Reverse mutation assay in *S. typhimurium*	5169
			Micronucleus test in mice	5360
			10 days repeated-dose PO study in monkeys	5456
KC 1845-A			14-15 days repeated-dose PO study in monkeys	4858/II
			15-16 days repeated-dose PO study in rats	4739

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧（つづき）

Test Article： Iloprost

Batch No.	Purity (%)	Impurities (%) Total	Sum of unidentified	Unidentified single	Type of study	Report No.
Iloprost Clathrate DS batch						
[redacted]						
117880					Carcinogenicity study in mice (ig)	BC60
					Carcinogenicity study in rats (ig)	BC61
117860					Carcinogenicity study in rats	BC61
117820					Carcinogenicity study in rats	BC61
117810					Carcinogenicity study in mice	BC60
					Carcinogenicity study in rats	BC61
117800					Carcinogenicity study in mice	BC60
115050					Segment II study in rabbits (ig)	97005
					Segment I-III study in rats (ig)	97004
115020					Segment I-III study in rats (ig)	97004
108920					Tumorigenicity study in mice (in diet)	AW35
107550					Tumorigenicity study in rats (in diet)	AP21
107510					Tumorigenicity study in rats	AP21
106760					Tumorigenicity study in rats	AP21
					53 week repeated-dose PO toxicity study in dogs	A706

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	Maximal Non-lethal Dose (mg/kg)	Approximate lethal dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Location &Report No
Mice/NMRI	PO (Gavage; Aqueous solution of DAB 7, EtOH, NaCl, tris buffer, pH 8.5)	0 40 60 80 100	3M	100	> 100	Main symptoms: apathy, lateral or prone position, skin reddening, disturbances in gait 100: 1 death post 1 h application presumed to be error in administration (autopsy: aqueous clear fluid in lungs)	4.2.3.1.1 4300
Mice/NMRI	IV (Aqueous solution of NaCl and Trometamol EtOH; pH 8.3)	0 125 150 175 200 250	10M	125	150	Main symptoms: apathy, prone position, gasping, eyelid closure, tremor, reddening and necrosis near administration site, blue-colored tail. No autopsy findings in animals dying before end of observation period; in others, necrosis at tip of tail. Deaths: 2 at 150; 5 at 175; 3 at 200; 8 at 250.	4.2.3.1.2 5359
Mice/NMRI	IV (Aqueous solution of Trometamol; pH 8.2)	0 125 175 200 250 300	10F	< 125	125	Main symptoms: apathy, lateral or prone position, unconsciousness, spasmodic twitching, accelerated respiration, gasping, disturbances in gait, eyelid closure, alterations at administration site (redness, necrosis, blue color in tail). Autopsy findings: lung congestion and pale liver at 125 and above; lung edema at 250. Deaths: 2 at 125; 1 at 175; 6 at 200; 10 at 250, 10 at 300.	4.2.3.1.3 5389

2.6.7.5 単回投与毒性試験（つづき）

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	Maximal Non-lethal Dose (mg/kg)	Approximate lethal dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Location &Report No.
Rats/Wistar	PO (Gavage; Aqueous solution of DAB 7, EtOH, NaCl, tris buffer, pH 8.3)	0 40 60 80 100	3M	100	> 100	Main symptoms: apathy, lateral or prone position, skin reddening, disturbances in gait, increased lacrimation, increased salivation and diarrhea	4.2.3.1.4 4301
Rats/Wistar	IV (Aqueous solution of Trometamol at pH 8.2)	0 50 100 125 150 200	5M/5F	M: 50 F: < 50	M: 100 F: 50	Main symptoms: apathy, lateral or prone position, disturbances in gait, dacryorrhea, tremor, ruffled or wet fur, cramped hindlimbs, pain symptoms, reddening of limbs and ears, conjunctivitis, eyelid closure, scabby, reddening and necrosis at administration site, blue color at the tail tip. Autopsy findings: reddening, spot-like black foci or removable deposit on the gastric glandular mucosa. Deaths: 2F at 50; 3M at 100; 3M/1F at 125; 2M/3F at 150; 5M/5F at 200.	4.2.3.1.5 5362
Rats/ SD	IV (Aqueous solution of NaCl, EtOH, and Trometamol)	65 81 102 128 160 200	5M/5F	M: < 65 F: 65	M: 65 F: 81	Main symptoms: clonic convulsions, prone position, hypoactivity, flushing of limbs and auricles, swelling of limbs, mydriasis, lacrimation, salivation, lack of righting reflex (M), low body temperature (F), black feces (F). Transient decrease of BW and food consumption by day 3. Autopsy findings: reduced size of thymus, changes at application site, adhesion of blood clots to glandular stomach, dark red content in small intestine (F). Histopathology findings: edema and erosion of the glandular stomach (F), atrophy of thymus, extramedullary hematopoiesis in liver and spleen (F). Deaths: 1M at 65; 1F at 81; 2M at 102; 3M/2F at 128; 3M/2F at 160; 4M/5F at 200.	4.2.3.1.6 AI62

2.6.7.5 単回投与毒性試験（つづき）

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	Maximal Non-lethal Dose (mg/kg)	Approximate lethal dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Location &Report No.
Rabbits/ NZW	IV (Aqueous solution of NaCl, EtOH, and Trometamol; pH 8.3)	0 2.5 5 15 25	3M/3F	M: 5 F: 2.5	15> M >5 F: 5	Main symptoms: apathy, accelerated respiration, unconsciousness, vocalization, miosis, reddened ears, spasmodic twitches, eyelid closure, reddened eyelids. No compound-related autopsy findings. Deaths: 1F at 5; 3M/1F at 15; 3M/3F at 25.	4.2.3.1.7 5326
Cynomolgus Monkeys	IV	2.5 5	1M/1F	M & F:5	M & F: > 5	Main symptoms: slight to severe collapse, hypoactivity, prone, dorsal, lateral or squatting position, reddening of oral mucosa and skin, dose-related increase of CPK serum levels. No abnormalities in autopsy findings. No deaths within the observation period.	4.2.3.1.8 AL54
Cynomolgus Monkeys	IV (dose escalation IV infusion)	0.25+0.5+ 1.0+2.0 (total 3.75) 0.25+0.5+ 1.0+2.0 +4.0 (total 7.75)	1-2M	M: < 3.75	M: 3.75	In escalating-dose IV infusion of consecutive iloprost doses of 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 (1 M) mg/kg, each over 30 minutes, led to death in 2 of 3 animals, most probably due to the severe decrease in blood pressure. The animal that received a total dose of 7.75 mg/kg died about 3 hours after start of dosing, while 1 of 2 M that received a total dose of 3.75 mg/kg was found dead in the morning of the day after treatment. Additional salient findings included slight to severe collapse, reduced spontaneous activity, tonic extensor convulsions, ECG changes suggesting myocardial ischemia (such as decrease of ST and reversion of T-wave), transient increase in CPK, and paleness of the oral mucosa, conjunctiva and tongue. loss of response to touch and sound 10 min. post application (2/3), no food consumption on the treatment day. decreased body weight in surviving ainimal. marked decrease in systolic blood pressure from 8-9 min onward, dark reddening of skin or hemorrhage or thrombus at injection site.	4.2.3.1.9 AL83

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of treatment	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Report No.	Location:
Mice/ NMRI	PO (diet)	28-29 days	016.3(10% in diet)	10M (0%), 40M (10%)	Not established	Decreased food consumption, decreased liver weights, moderate to marked hepatic glycogen depletion	A040	4.2.3.2.5
Mice/ CD-1	PO (Gavage; Aqueous Solution ofTris buffer, HCl or NaOH, pH 8.3)	12 weeks	0 0.69 (5[a]) 6.9 (50[a]) 17.2 (125[a]) 34.4 (250[a])	15M/15F + 36M/36F for TK subgoups (no control)	6.9 (50[a])	Mortalities (2M/5F) were found at 34.4 mg/kg group.Clinical findings observed at 17.2 and 34.4 mg/kg included hypoactivity and coolness to the touch during the first few days of dosing and decreased body weight gain or body weight loss, decreased food consumption during 1st week.	96028	4.2.3.2.7
Rats/ Wistar	PO (Gavage; Aqueous Solution of NaCl, Tris buffer, EtOH, pH 8.3)	15-16 days	0 0.002 0.02 0.2 2.0	10M/10F	2.0	Minor hematologic and bone marrow changes from 0.02 mg/kg; minor biochemical changes from 0.2 mg/kg; minor thyroid weight changes at 2.0 mg/kg.	4739	4.2.3.2.9
Rats/ SD	PO (Gavage; Aqueous solution ,Tris buffer , HCl or NaOH pH 8.3)	12 weeks	0 0.69 (5[a]) 6.9 (50[a]) 17.2 (125[a]) 34.4 (250[a])	15M/15F + 18M/18F for TK subgroups (no control)	0.69	Clinical signs observed following the administration of doses of 6.9 mg/kg and higher included hypoactivity, salivation and reddening of the visible surfaces of the body. Body weight gain was dose-dependently decreased at 6.9 mg/kg and higher (M). Food consumption was lower (M). Compound-related hematological findings included lower platelet counts (6.9 mg/kg and higher) and higher erythrocyte counts, hemoglobin, and hematocrit values (17.2 and 34.4 mg/kg). Serum values for amylase (F; 6.9 mg/kg and higher), ALP (F; 17.2 and 34.4 mg/kg), total protein, albumin (M; 17.2 and 34.4 mg/kg), and total cholesterol (17.2 and 34.4 mg/kg) were higher.	96029	4.2.3.2.10

a: as iloprost clathrate

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験（つづき）

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of treatment	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Report No.	Location:
Rats/ Wistar	PO (diet)	8 days	0 6 (10% in diet=70.4 mg/kg diet)	5M 15M	Not established	Slight decreases in food consumption and body weight gain. Very slight increase in incidence of prominent Peyer's patches of intestine.	9940	4.2.3.2.12
Rats/ Wistar	IV infusion (Aqueous Solution of NaCl, Tris buffer, EtOH)	10-11days	0 0.002 0.02 0.2 2.0	10M/10F	0.2	Myocardial scarring in 1M at 0.02 mg/kg and 2M at 2.0 mg/kg; minor hematology and bone marrow changes at all dose levels. Decrease in food and increased water consumption; some changes in kidney, liver, and thyroid weights at 2.0 mg/kg.	4544	4.2.3.2.16
Rats/ Wistar	IV infusion (Aqueous Trometamol, pH 8.2)	28 days	0 0.124 1.0 5.0 (as approximate mean per group)	10M/10F	0.124	Five deaths in the high-dose group. High-dose group showed clinical symptoms, including decreased food consumption, changes in hematology and organ weights (kidney, liver, testes), and histology findings possibly related to the drug. At the middle dose, minor changes in hematology and blood coagulation with one small hemorrhage in gastric mucosa. At the low dose, only minor clinical symptoms. Main histological findings: congestion of lung, liver, mucosa of glandular stomach, thymus, adreno conrtex, atrophy of prostate and seminal vesicle.	6075	4.2.3.2.17

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験（つづき）

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of treatment	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Report No.	Location:
Beagle Dogs	PO (capsule)	28-30 days (2 application /day)	0.05, 0.15 (0.025x2, 0.075x2)	3M/3F	0.15	0.05: no treatment-related finding, 0.15: increased vomiting and diarrhea (no adverse finding)	9215	4.2.3.2.20
Beagle Dogs	SC or IV infusion (Aqueous solution Trometamol, pH 8.3)	4-29 days	IV: 0.25, 0.5, SC: 0.0625, 0.125, 0.25	1M/1F (1M, 2F at high IV dose)	0.0625 (SC)	Low-SC-dose animals; sporadic vomiting, apathy, diarrhea, slight decrease in BP. Mid-SC dose: same symptoms plus inappetence, slight emaciation, ataxic gait and drawn flanks. At higher doses (0.25 mg/kg SC and IV and 0.5 mg/kg IV): increased intensity of same symptoms as above plus tremor and convulsions, body weight loss, prolongation of QT-interval, slight decrease in heart rate, changes in clinical chemistry and hematology parameters. IV only: head stretched forwards and abdominal spasm.	7573	4.2.3.2.24
Monkeys/ *Macaca fascicularis*	PO (Gavage Aqueous solution of NaCl, Trometamol, EtOH, pH 8.3)	14-15 days	0, 0.02, 0.2, 1.0	2M/2F	0.02	One death in each dose group. No other compound-related findings at low dose. At mid and high doses: apathy, increased salivation, decreased heart rate and BP. At high dose: diarrhea, eyelid closure, increased lacrimation, loss of consciousness, lateral or supine position, prolongation of QT- interval, decreased monocytes, increased bone marrow lymphocytes.	4858/II	4.2.3.2.28

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験（つづき）

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of treatment	Dose (mg/kg)	Gender & Number per group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Report No.	Location:
Monkeys/*Macaca fascicularis*	PO (Gavage; Aqueous solution of NaCl, Trometamol, EtOH, pH 8.3)	10 days	0, 0.02, 0.1 x 8 times/day (total doses/day; 0, 0.16, 0.8)	2M/2F	0.16	Low dose: slight apathy, squatting position, slight decrease in food consumption and body weight gain (n.s.). High dose: same symptoms plus slight increase in serum total protein and total betaglobulin.	5456	4.2.3.2.27
Monkeys/*Macaca fascicularis*	IV infusion (Aqueous solution of NaCl, Tris buffer, EtOH; pH 8.3)	11 days	0, 0.002, 0.02, 0.2, 2.0	2M/2F (2M, 0F in 2 highest dose groups)	0.002	1M in each of two high-dose groups died during first dose, associated with a drastic decrease in BP, so females were not dosed in these groups and surviving males were not given further doses. 1M in 0.02 mg/kg dose group died on day 10. Organ changes: sinusoid hyperemia and perisinusoid edema with frequent vacuolization of hepatocytes in liver of dead animals. At highest dose, foci of acute myocardiosis and prostration. Low dose: dyspnea. 0.02 mg/kg dose: apathy, increased salivation, pale skin, atactic gait, decreased food consumption, slight decrease in BP, increase in serum gamma-globulin.	4545	4.2.3.2.29

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

2.6.7.7A 4-weeks Inhalation Toxicity Study in Rats_A01317

Report Title: [redacted]: Four week inhalation toxicity study with ILOPROST nebulising suspension in the rat
Report No.: A01317 **Location:** 4.2.3.2.1
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Rat/Wistar **Duration of Dosing:** 4 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 8-14 weeks **Duration of Postdose:** None
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Inhalation
Vehicle/Formulation: 0.9% NaCl solution

Special Features: Satellite animals used to determine blood serum concentrations (Report No. B784)
No Observed Adverse Effect Level: 24.6/22.6 µg/kg/day (Target/Actual dose)

Daily Dose (µg/kg) Target/Actual [iloprost concentration]	0 (Control)		0.9/0.84 [10µg/mL]		3.6/3.55 [10µg/mL]		10.8/9.15 [10µg/mL]		0.9/1.05 [20µg/mL]		24.6/22.6 [20µg/mL]	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics:												
Cmax (pg/mL): Day 26	ne	ne	< 50	< 50	ne	ne	453		ne	ne	677	
AUC (pg·h/mL): Day 26	ne	ne	nc	nc	ne	ne	911		ne	ne	1414	
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g, %)[a]	(288.8)	(212.5)	+5.4	+2.0	+10.9	+1.2	-0.9	+2.0	+7.5	-2.5	+4.1	+1.4
Food Consumption (g/animal/day, %)	(21.9)	(17.2)	-1.4	-3.5	+11.9	-9.3	-4.1	+2.3	+11.4	-10.5	+0.9	+7.4
Clinical Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings ne: not examined nc: not calculated
a: At end of dosing period for body weight. Days 21-28 for food consumptions. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). No statistically significant differences between treated and control groups.

2.6.7.7A 4-weeks Inhalation Toxicity Study in Rats_A01317 (Continued)

Report Title: RCC Project 7090402: Four week inhalation toxicity study with ILOPROST nebulising suspension in the rat
Report No.: A01317 **Location:** 4.2.3.2.1
Test Article: Iloprost

Daily Dose (µg/kg) Target/Actual [iloprost concentration]	0 (Control)		0.9/0.84 [10µg/mL]		3.6/3.55 [10µg/mL]		10.8/9.15 [10µg/mL]		0.9/1.05 [20µg/mL]		24.6/22.6 [20µg/mL]	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry (Week 4)												
Bilirubin (µmol/L)	2.13	1.53	1.51**	2.10	1.32**	1.69	1.55**	1.59	1.51**	1.93	1.41**	1.62
Total lipids (g/L)	2.98	2.53	2.57	2.21	2.84	2.24	2.96	1.70**	2.56	1.84*	2.53	1.97
Cholesterol (mmol/L)	2.16	1.81	1.76	1.47	2.00	1.56	2.06	1.11**	1.75	1.22*	1.78	1.29*
Phospholipids (mmol/L)	1.85	2.04	1.63	1.81	1.76	1.77	1.86	1.33**	1.64	1.51**	1.65	1.59*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights[b]												
Lungs (absolute, g)	1.15	1.04	1.16	1.09	1.22	1.00	1.13	1.03	1.27	0.99	1.23	1.14*
(relative body weight, %)	0.44	0.56	0.43	0.57	0.43	0.53	0.44	0.54	0.45*	0.54	0.45	0.60
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings.
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett-test
b: Absolute weights differed significantly from controls in high-dose females as indicated, but relative weights, compared to either body weight, were not significantly different.

2.6.7.7B 6-months Inhalation Toxicity Study in Rats_A04447

Report Title: [redacted]: ILOPROST: Six month inhalation toxicity study with a nebulising solution in the rat
Report No.: A04447 **Location:** 4.2.3.2.3
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Rat/Wistar **Duration of Dosing:** 26 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 9-12 weeks **Duration of Postdose:** None
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Inhalation
Vehicle/Formulation: 0.9% NaCl solution

Special Features: Satellite animals used for toxicokinetics determination (Report No. A05405)
No Observed Adverse Effect Level: 48.7 µg/kg/day

Daily Dose (µg/kg)	0 (Control) [135 min/day]		0(Control) [240 min/day]		3.55 [135 min/day]		27.8 [135 min/day]		48.7 [240 min/day]	
Number of Animals	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Toxicokinetics:										
Cmax (pg/mL) at Day 182 :	nq	nq	ne	ne	676	747	1750	2158	1467	2998
$AUC_{(0\text{-}Tlast)}$(ng·min/mL)at Day 182:	nc	nc	ne	ne	60	69	167	191	295	604
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g, %) [a]	(411.8)	(246.1)	+4.4	+1.3	+0.1	+0.1	+2.9	+0.2	+3.4	-0.7
Food Consumption (g/animal/day, %) [a]	(22.7)	(15.4)	+3.1	+5.2	-7.0	±0	+0.9	+0.6	+4.4	+3.9
Clinical Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings nq: not quantifiable ne: not examined nc: not calculated
a: At end of dosing period for body weight. Last week of dosing for food consumptions.. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). No statistically significant differences between treated and control groups.

2.6.7.7B 6-months Inhalation Toxicity Study in Rats_A04447 (Continued)

Report Title: RCC Project 709423: ILOPROST: Six month inhalation toxicity study with a nebulising solution in the rat
Report No.: A04447 **Location:** 4.2.3.2.3
Test Article: Iloprost

Daily Dose (µg/kg)	0 (Control) [135 min/day]		0(Control) [240 min/day]		3.55 [135 min/day]		27.8 [135 min/day]		48.7 [240 min/day]	
Number of Animals	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights										
Lungs (absolute, g)	1.51	1.16	1.55	1.13	1.53	1.14	1.64*	1.20	1.63	1.20
(relative body weight, %)	0.39	0.50	0.38	0.49	0.39	0.50	0.41	0.52	0.41	0.53*
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
*: $p < 0.05$ Dunnett-test

2.6.7.7C Chronic Dietary Repeated-Dose Toxicity Study in Rats_AC52

Report Title: Iloprost clathrate: Systemic tolerance study (including local tolerance) in rats with daily dietary administration of ground iloprost clathrate retard pellets for retard formulation SH K 529 I/M over 27 to 28 weeks
Report No.: AC52 **Location:** 4.2.3.2.14
Test Article: Iloprost (Iloprost clathrate)
Species/Strain: Rat/Wistar **Duration of Dosing:** 27-28 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 6 weeks **Duration of Postdose:** None
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Oral (in diet)
Vehicle/Formulation: Blank diet; Diet containing ground placebo pellets
Special Features: Plasma concentrations were determined at weeks 2, 5, 13 and 26 (Report No. AB90)
No Observed Adverse Effect Level: 0.6 mg/kg/day for both genders

Nominal Daily Dose (mg/kg) [% Active in diet]	0 (Control)		0(Placebo control)		0.6 [1%]		1.8 [3%]		6.0 [10%]	
Number of Animals	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Toxicokinetics:										
Mean Plasma concentration (pg/mL): at day181 (week 26)	<QL	<QL	<QL	<QL	418	468	1010	1160	2550	3490
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	2[a]	1[a]	1[a]	1[b]	1[b]	2[c]	0
Body Weights (g, %)[d]	(306)	(147)	(318)	(148)	-0.9	-0.7	+2.8	-2.7	-5.0	-3.4
Food Consumption (g/day, %)[d]	(21)	(16)	(22)	(17)	±0	-5.9	±0	-5.9	-4.5	-5.9

a: The cause of deaths is considered to be due to technical manipulation (not compound treatment-related). QL: qualitative limit
b: The cause of deaths is considered to be due to trauma induced by either technical manipulation or accident (not compound treatment-related).
c: The cause of death for one of two animals is considered to be due to technical manipulation (not compound treatment-related). The cause of death for other considered to be possible test article treatment-related.
d: At end of dosing period for body weight. Mean food consumptions at weeks 1-26. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from placebo controls are shown (mean body weight gain or mean food consumption). Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). At the 1st week, slight transient reduction of food consumption was seen in the highest dose males and females.

2.6.7.7C Chronic Dietary Repeated-Dose Toxicity Study in Rats_AC52 (Continued)

Report Title: Iloprost clathrate: Systemic tolerance study (including local tolerance) in rats with daily dietary administration of ground iloprost clathrate retard pellets for retard formulation SH K 529 I/M over 27 to 28 weeks
Report No.: AC52 **Location:** 4.2.3.2.14
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg) [% Active in diet]		0 (Control)		0(Placebo control)		0.6 [1%]		1.8 [3%]		6.0 [10%]	
Number of Animals		**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Water consumption		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observation											
Moderate apathy, severe atactic gait, slight emaciation, slight to moderate skin reddening (hairless part)										1 (died in week 2)	
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology / Bone marrow		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry											
Sodium (mmoL/L)	Week 5	143	142	142	142	143	140*	141**	141	141**	142
	Week 13	146	142	144*	143	145	144	144*	143	144*	143
	Week 26	146	140	142**	141	144	141	140**	143	140**	142
Calcium (mmoL/L)	Week 5	2.62	2.59	2.62	2.59	2.63	2.59	2.65	2.64	2.65	2.70*
	Week 13	2.67	2.65	2.62	2.72	2.72	2.73	2.68	2.73	2.75	2.78**
	Week 26	2.62	2.60	2.59	2.71*	2.66	2.67	2.58	2.75**	2.65	2.81**
Glucose (mg/dL)	Week 5	78	71	77	73	83	81*	88*	80*	88*	82*
	Week 13	80	79	93	85	96**	84	85	79	95*	90*
	Week 26	70	77	73	80	78	83	83**	86	87**	82

-: No noteworthy findings
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett-test

2.6.7.7C Chronic Dietary Repeated-Dose Toxicity Study in Rats_AC52 (Continued)

Report Title: Iloprost clathrate: Systemic tolerance study (including local tolerance) in rats with daily dietary administration of ground iloprost clathrate retard pellets for retard formulation SH K 529 I/M over 27 to 28 weeks
Report No.: AC52 **Location:** 4.2.3.2.14
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg) [% Active in diet]		0 (Control)		0(Placebo control)		0.6 [1%]		1.8 [3%]		6.0 [10%]	
Number of Animals		**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Urinalysis											
Volume (mL)	Week 4	4.3	<1.0	6.2*	<1.0	3.8	<1.0	5.5	<1.0	8.5**	2.0
	Week 12	5.8	3.0	7.1	<1.0	5.8	2.8	7.1	3.2	11.1**	<1.0
	Week 25	5.4	4.3	7.3	<1.0	5.8	4.1	7.1	4.7	10.5**	6.2*
Sodium (UmoL/24h)	Week 4	448	229	427	202	381	255	433	222	636**	219
	Week 12	525	241	570	276	583	268	653	303	1114**	426*
	Week 25	453	311	420	296	483	297	575	285	987**	524*
Chloride (UmoL/24h)	Week 4	596	350	600	276	564	340	625	285	809*	261
	Week 12	459	276	417	237	516	279	580	289	831**	370
	Week 25	460	338	406	277	486	353	565	319	877**	415
Calcium (UmoL/24h)	Week 4	18	12	30	9	21	9	23	11	33*	10
	Week 12	25	23	49*	30	39	28	44	25	48*	47**
	Week 25	27	41	49*	55*	38	55	45	53	57*	83**
Specific gravity (g/mL)	Week 4	1.046	1.049	1.036**	1.052	1.049	1.047	1.036*	1.047	1.027**	1.048
	Week 12	1.044	1.045	1.041	1.045	1.044	1.045	1.039	1.041	1.028**	1.035*
	Week 25	1.051	1.034	1.042	1.036	1.049	1.035	1.041	1.029	1.035**	1.030
Coagulation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunology		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
*: p < 0.05, **: p< 0.01 Dunnett-test

2.6.7.7C Chronic Dietary Repeated-Dose Toxicity Study in Rats_AC52 (Continued)

Report Title: Iloprost clathrate: Systemic tolerance study (including local tolerance) in rats with daily dietary administration of ground iloprost clathrate retard pellets for retard formulation SH K529 I/M over 27 to 28 weeks
Report No.: AC52 **Location:** 4.2.3.2.14
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg) [% Active in diet]	**0 (Control)**		**0(Placebo control)**		**0.6 [1%]**		**1.8 [3%]**		**6.0 [10%]**	
Number of Animals	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Organ Weights										
Submandibular salivary gland (g)	0.77	0.49	0.79	0.51	0.77	0.51	0.83	0.54	0.79	0.54
(g/100g BW)	0.18	0.20	0.18	0.21	0.18	0.21	0.19	0.22*	0.19	0.23*
Pancreas (g)	1.05	0.87	1.15	0.92	1.15	0.86	1.21	0.87	1.30**	1.00
(g/100g BW)	0.25	0.36	0.27	0.38	0.27	0.36	0.28	0.36	0.32**	0.42*
Thymus (mg)	198	173	179	189	154*	175	190	184	178	208
(mg/100g BW)	47	71	42	78	36*	73	44	77	44	88*
Necropsy										
Involution of thymus, hyperemia of lungs, liver and lymph nodes, red-black-brown covering of gastrointestinal tract associated with mucosal hemorrhage									1 (died in week 2)	
Histopathology										
Enlargement of secretory end-pieces in submandibular salivary gland			2 (+1, ++1)		2 (+2)		4 (+4)	2 (+2)	5 (+1, ++3, +++1)	4 (+1, ++3)

-: No noteworthy findings, +: minimal,, ++: slight, +++: moderate
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett-test
BW: body weight

2.6.7.7D Chronic Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Rats_7948

Report Title: ZK 36.374: Systemic tolerance study in rats after continuous intravenous infusion using the alzet(R)- osmotic-pump over a period of about 28 weeks
Report No.: 7948 **Location:** 4.2.3.2.18
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Rat/Wistar **Duration of Dosing:** Approx. 26 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: unknown **Duration of Postdose:** None
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** IV infusion
Vehicle/Formulation: Aqueous trometamol solution, pH 8.3

Special Features: Continuous infusion using Alzet Osmotic Pump. Plasma samples collected at terminal sacrifice. (Report No. 7442)
No Observed Adverse Effect Level: 0.50 mg/kg/day for both genders

Actual Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.06(M)/0.05(F)**		**0.5**	
Number of Evaluated Animals [a]	**M: 26**	**F: 32**	**M: 35**	**F: 34**	**M: 40**	**F: 33**	**M: 32**	**F: 37**
Toxicokinetics:								
Plasma concentration (pg/mL):mean RIAx63%[b]			< 1100	< 1100	1240	< 1100	5000	3500
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	1[c]	1[c]	1[c]	2[c]				
Body Weight (g, %)[d]	(427)	(263)	+0.5	+1.5	+1.8	+0.8	+4.0	+4.2
Body Weight gain (g)[e]	103	45	104	44	108	46	121*	53*
Water Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observation								
- Skin reddening (slight to moderate)			3		6		32	15

a: Animals with pump rates less than 65% and animals with a mistake in calculation or in which estimation of the infused amount could not be measured were excluded from evaluation. Also animals with prematurely accidentally dying or prematurely sacrificed for human reasons were not included in the assessment.
b: Re-measurement of selected samples by GC/MS indicated that iloprost contributed approximately 63% of RIA values, with the remainder consisting of cross-reacting.
c: No treatment-related death
d: At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data.
e: From start of study to end of dosing period. *: p<0.05 Dunnett-test -: No noteworthy finding

2.6.7.7D Chronic Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Rats_7948 (Continued)

Report Title: ZK 36.374: Systemic tolerance study in rats after continuous intravenous infusion using the alzet (R)- osmotic- pump over a period of about 28 weeks

Report No.: 7948 **Location:** 4.2.3.2.18

Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.06/0.05**		**0.5**	
Number of Animals	**M: 26**	**F: 32**	**M: 35**	**F: 34**	**M: 40**	**F: 33**	**M: 32**	**F: 37**
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/ Bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights								
Pancreas (g)	1.12	0.89	1.17	0.96	1.33*	1.02	1.46**	1.14**
(g/100g BW)	0.27	0.34	0.28	0.36	0.32*	0.39	0.34**	0.42**
Thymus (mg)	105	122	125	160	139*	148	145*	189**
(mg/100g BW)	25	47	30	60	33*	57	34*	69**
Necropsy								
Thymus; focal reddening			3	1	6	5	2	7
Lymph node in chest: enlarged	4	4	7	9	6	10	8	13
reddish/red-brown discolored	3	4	5	8	4	9	6	11

*: p<0.05, **: p<0.01 Dunnett-test -: No noteworthy finding

2.6.7.7D Chronic Continuous Intravenous Infusion Study in Rats_7948 (Continued)

Report Title: ZK 36.374: Systemic tolerance study in rats after continuous intravenous infusion using the alzet (R)- osmotic- pump over a period of about 28 weeks
Report No.: 7948 **Location:** 4.2.3.2.18
Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.06(M)/0.05(F)**		**0.5**	
Number of Animals	**M: 26**	**F: 32**	**M: 35**	**F: 34**	**M: 40**	**F: 33**	**M: 32**	**F: 37**
Histopathology								
Thymus; involusion	8 (++1, +++3,++++3)	13 (++4,+++6, ++++3)	NE	NE	NE	NE	6 (++3,+++1, ++++2)	9 (++2,+++4, ++++3)
Thymus; erythrocytic infiltration	1 (+1)	1 (+1)	NE	NE	NE	NE	2 (++2)	8 (++8)
Lymph node in chest; blood resorption	4 (+++1,++++3)	3 (+++1,++++2)	NE	NE	NE	NE	4 (+++3,++++1)	10 (++1,+++7, ++++2))
Lymph node in chest; hemosiderosis	4 (++4)	3 (++3)	NE	NE	NE	NE	3 (++3)	10 (++9,+++1)
Lymph node in chest; hyperplasia	4 (+++3,++++1)	4 (+++1,++++3)	NE	NE	NE	NE	6 (+++6)	7 (+++4,++++3)

NE: Not examined
+: minimal, ++: slight, +++: moderate, ++++: marked

2.6.7.7E Chronic Oral Toxicity Study in Dogs_A706

Report Title: Systemic tolerance study (including local tolerance) in Beagle dogs after daily oral administration of retard formulation of iloprost (iloprost clathrate, SH K 529 I/M) over 53 weeks (2 applications per day at a 6-hour interval)
Report No.: A706 **Location:** 4.2.3.2.22
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Beagle dogs **Duration of Dosing:** 53 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 11-26 months **Duration of Postdose:** None
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Oral (tweice daily at a 6-hour interval)
Vehicle/Formulation: Empty capsules; placebo capsules

Special Features: Blood samples taken from study animals at various study time points for plasma level determinations. (Report No. A693)
No Observed Adverse Effect Level: 0.05 mg/kg/day for both gender

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0 (Placebo)		0.05		0.15	
Number of Animals	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Toxicokinetics:								
Cmax d1(pg/mL; at week 51)	nq	nq	nq	nq	349	696	958	1407
$AUC_{(0-24)}$ (pg·h/mL; at week 51)	nc	nc	nc	nc	2491	3154	5528	6092
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	1[a]	0	1
Body Weight (kg, %)[b]	(11.9)	(10.9)	+10.0	-5.5	-2.5	-6.4	-7.6	-7.3
Body Weight gain (kg)[c]	0.7	1.7	1.8	1.1	1.0	1.1	0.8	1.3
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observation								
- Diarrhea (by 8 weeks) and mucous in feces							4	2

nq: not quantified, nc: not calculated
a: Sacrificed for humane reasons in week 44 because this animal was suffering repeatedly from a necrotic stomatitis (not considered to be compound-related).
b: At necropsy. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from placebo controls are shown
c: From start of study to end of dosing period. -: No noteworthy finding

2.6.7.7E Chronic Oral Toxicity Study in Dogs_A706 (Continued)

Report Title: Systemic tolerance study (including local tolerance) in Beagle dogs after daily oral administration of retard formulation of iloprost (iloprost clathrate, SH K 529 I/M) over 53 weeks (2 applications per day at a 6-hour interval)
Report No.: A706 **Location:** 4.2.3.2.22
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)		0 (Placebo)		0.05		0.15	
Number of Animals		**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography/ Heart rate/ Blood pressure		-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/ Bone marrow		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemostry									
Total protein (g/dL)	Week 5	5.50	5.57	5.37	5.47	5.17	5.42	4.90**	4.73**
	Week 13	5.88	6.00	6.09	6.03	5.65	6.07	5.95	5.55*
	Week 26	5.51	5.79	5.49	5.58	5.26	5.58	5.23	5.02**
	Week 52	5.71	5.87	5.52	5.86	5.38*	6.10	5.50	5.28*
Calcium (mmol/L)	Week 5	2.51	2.61	2.58	2.65	2.50	2.56	2.42	2.31**
	Week 13	2.59	2.70	2.65	2.67	2.56	2.69	2.58	2.52**
	Week 26	2.56	2.65	2.57	2.58	2.46	2.56	2.45	2.51
	Week 52	2.53	2.68	2.51	2.63	2.40	2.56	2.41	2.38**
Glucose (mg/dL)	Week 5	83	81	88	85	83	86	96*	93*
	Week 13	90	86	99	92	94	93	100	102*
	Week 26	83	82	95	87	92*	94*	100**	95*
	Week 52	87	89	95	84	94	98	106**	103**

*: p<0.05, **: p<0.01 Dunnett-test -: No noteworthy finding,

2.6.7.7E Chronic Oral Toxicity Study in Dogs_A706 (Continued)

Report Title: Systemic tolerance study (including local tolerance) in Beagle dogs after daily oral administration of retard formulation of iloprost (iloprost clathrate, SH K 529 I/M) over 53 weeks (2 applications per day at a 6-hour interval)
Report No.: A706 **Location:** 4.2.3.2.22
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0 (Placebo)		0.05		0.15	
Number of Animals	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Nerves function test	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunology	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy								
Jejuno-ileo-cecal torsion of the gut (volvulus)	-	-	-	-	-	-	-	1 (dead anima)
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy finding

2.6.7.7F Chronic Subcutaneous infusion Toxicity Study in Dogs_7949

Report Title: ZK 36.374: Systemic tolerance study in beagle dogs after continuous subcutaneous infusion with the Alzet(R) osmotic pump over 26 weeks
Report No.: 7949 **Location:** 4.2.3.2.25
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Beagle dogs **Duration of Dosing:** 26 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 75-191 month **Duration of Postdose:** None
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Subcutaneous continuous infusion
Vehicle/Formulation: Aqueous Trometamol solution, pH 8.3
Special Features: Plasma concentrations determined 8 sampling points (Reported within this toxicology report. & TK report 8058)
No Observed Adverse Effect Level: 0.125 mg/kg (Actual dose; M: 0.097mg/kg/day, F: 0.096 mg/kg/day)

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.031**		**0.063**		**0.125**	
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**		**0.024**		**0.047**	**0.049**	**0.097**	**0.096**
Number of Animals	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Toxicokinetics:								
Mean Plasma Concentration (pg/mL)			400	400	900	900	2100	1600
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (kg, %)[a]	(9.1)	(8.2)	+7.7	-3.7	±0	-3.7	+2.2	-2.4
Body Weight gain (kg)[b]	0.5	0.4	1.0	0.4	1.0*	0.8	0.6	0.0
Food Consumption (g) [b]	342	333	407	332	385	338	366	333
Water Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Diarrhea (transient **but** dose-dependent increase)					+	+	+	+
Prolapse of rectum, reset surgically (day 30)								1

a: At necropsy. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from placebo controls are shown
b: From start of study to end of dosing period. * : $p < 0.05$; Dunnett-test -: No noteworthy finding

2.6.7.7F Chronic Subcutaneous infusion Toxicity Study in Dogs_7949 (Continued)

Report Title: ZK 36.374: Systemic solerance study in beagle dogs after continuous subcutaneous infusion with the Alzet (R) osmotic pump over 26 weeks
Report No.: 7949 **Location:** 4.2.3.2.25
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**		**0.031**		**0.063**		**0.125**	
Actual Daily Dose (mg/kg)		**0**		**0.024**		**0.047**	**0.049**	**0.097**	**0.096**
Number of Animals		**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography/ Blood pressure, Heart rate		-	-	-	-	-	-	-	-
Nerves Functional Test		-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/ Bone marow									
Urinalysis									
Volume (mL)	Week 4	223.0	254.5	146.5	247.8	163.8	214.8	118.9*	206.3
	Week 12	129.3	94.3	174.0	40.0	76.3	88.3	91.8	109.8
	Week 26	179.0	240.5	192.9	138.0*	160.5	173.0	211.8	90.0**
Blood Chemistry									
ɤ-globrin (g/dL) abs	Week 4	0.32	0.38	0.41	0.36	0.42	0.43	0.44	0.43
	Week 12	0.38	0.34	0.38	0.43	0.52*	0.39	0.52*	0.44
	Week 26	0.40	0.39	0.47	0.51	0.56**	0.55	0.51	0.60
ɤ-globrin (%) rel	Week 4	6.2	7.1	7.6	6.6	7.7	8.1	7.9	7.6
	Week 12	7.0	6.2	7.4	8.0	9.5*	7.2	9.9*	8.2
	Week 26	7.1	7.0	8.3	8.7	9.9**	9.3	9.0	10.1
Coagulation		-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights		-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology		-	-	-	-	-	-	-	-

*: p<0.05, **: p<0.01 Dunnett-test -: No noteworthy finding

2.6.7.7G 4-weeks Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Monkeys_5482

Report Title: Systemic tolerance study of ZK 36.374 in monkey (Macaca fascicularis) after continuous intravenous infusion using the alzet-osmotic-pump over a period of four weeks

Report No.: 5482 **Location:** 4.2.3.2.30

Test Article: Iloprost

Species/Strain: Monkeys/*Macaca fascicularis* **Duration of Dosing:** 28 days **GLP Compliance:** Yes

Initial Age: unknown **Duration of Postdose:** None

Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** IV-infusion

Vehicle/Formulation: Aqueous Trometamol solution, pH 8.2

Special Features: Continuous infusion using an implanted pump.

No Observed Adverse Effect Level: 0.02 mg/kg/day for both gender

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**		**0.02**		**0.17**		**1.41**	
Number of Animals	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics:	Not conducted							
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund [a]	0	0	0	0	2	2	2	2
Body Weight Gain (kg) [b]	0.0	-0.05	±0	+0.15	↓(n=1; -0.4, day 8)	ND	ND	↓(n=1; -0.3, day 8)
Food Consumption (g/day)	103	84/89	94/102	104/87	↓	ND	ND	↓
Water Consumption (g)	278	253/413	268/416	327/353	↓	ND	ND	↓

ND: Not determined -: No noteworthy finding

a: All animals in the mid- and high-dose groups died by the end of week 2 of dosing. To clarify their bad condition, the blood pressure was measured in 2M and 1F & 1M and 2F in mid & high dose groups and it was found to be reduced. It can be concluded that the death was associated with a substance-treatment related drop of blood pressure.

b: From start of study to end of dosing period. ↓: decreased.

2.6.7.7G 4-weeks Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Monkeys_5482 (Continued)

Report Title: Systemic tolerance study of ZK 36.374 in monkey (Macaca fascicularis) after continuous intravenous infusion using the alzet osmotic-pump over a period of four weeks
Report No.: 5482 **Location:** 4.2.3.2.30
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**				**0.02**				**0.2**				**2.0**			
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**				**0.02**				**0.17**				**1.41**			
Number of Animals	**M:**	**2**	**F:**	**2**	**M:**	**2**	**F:**	**2**	**M:**	**2**	**F:**	**2**	**M:**	**2**	**F:**	**2**
Clinical Observations																
Apathy			+						+～+++		+～+++		+～+++		+～+++	
Unconsciousness											2					
Lateral, prone, supine or squatting position	1		1						2		2		2		2	
Disequilibrium									1				1		2	
Irritability													2		1	
Croaking													1			
Gnashing of teeth									1		1					
Wailing									1							
Sialorrhea													1			
Diarrhea							1				1				1	
Ophthalmoscopy	-		-		-		-		-		-		-		-	
Electrocardiography	-		-		-		-		ND		ND		ND		ND	
Blood pressure	-		-		-		-		↓(+)		↓(+)		↓(+++)		↓(+++)	
Heart rate	-		-		-		-		ND		ND		ND		ND	

-: No noteworthy finding.
ND: Not determined
↓: decreaed; +: slight, ++ : moderate, +++: severe

2.6.7.7G 4-weeks Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Monkeys_5482 (Continued)

Report Title: Systemic tolerance study of ZK 36.374 in monkey (Macaca fascicularis) after continuous intravenous infusion using the alzet-osmotic-pump over a period of four weeks
Report No.: 5482 **Location:** 4.2.3.2.30
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**		**0.02**		**0.17**		**1.41**	
Number of Animals	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Hematology [c]								
Leukocytes (1000/mm^3)	17.5 ± 5.8		14.7±3.8		10.9/4.8	8.6	5.0	2.8/7.2
Bone Marrow [c]								
Plasma cells (‰)	19±15		18±11		ND	12/0	12	18
(10^3/mg)	33±33		26±18		ND	6	11	28
Nucleated cells (mio/mg)	1.598±0.350		1.389±0.183		0.667/0.362	0.525	0.885/1.487	0.631/1.575
Erythropoietic immature (E1-3) cells (‰)	32±6		37±3		ND	8/10	8	10
mature (E4-5) cells (‰)	309±18		324±87		ND	256/140	308	340
Erythropoietic cells (10^3/mg)	541±87		498±115		ND	139	280	551
Neutrophil granulopoietic cells (10^3/mg)	612±140		490±82		ND	187	198	425
Reticulum cells (‰)	24±14		21±7		ND	90/108	76	62
Undifferentiated cells (‰)	0±0		0±0		ND	36/34	36	0
Coagulation								
Thromboplastin time (sec)	13.07±1.96		11.43±0.92		17.10	17.10	ND	ND
Activated partial thromboplastin time (sec)	24.97±3.37		22.75±2.90		30.90	30.80	ND	ND

ND: Not determined,
Test article-treatment related changes were underlined
c : Mean ± SD at day 29 was shown for control (n=3) and low dose (n=4) groups, individual values at day 4 - 14 for mid and high dose group

2.6.7.7G 4-weeks Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Monkeys_5482 (Continued)

Report Title: Systemic tolerance study of ZK 36.374 in monkey (Macaca fascicularis) after continuous intravenous infusion using the alzet –osmotic-pump over a period of four weeks

Report No.: 5482 **Location:** 4.2.3.2.30

Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**				**0.02**				**0.2**				**2.0**			
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**				**0.02**				**0.17**				**1.41**			
Number of Animals	**M:**	**2**	**F:**	**2**	**M:**	**2**	**F:**	**2**	**M:**	**2**	**F:**	**2**	**M:**	**2**	**F:**	**2**
Blood chemistry (Day 29)									(Day 10/7)		(Day 9/4)		(Day 10/7)		(Day 9/4)	
ALT(U/L)	22		31/20		32/20		34/30		176/43		ND/58		ND/33		96/66	
Glucose (mg/dL)	174		90/195		182/180		186/230		139ND		ND/66		ND-/97		19/34	
Urea nitrogen (mg/dL)	35		22/44		38/34		33/37		40/128		ND/54		ND/198		214/121	
Creatinine (mg/dL)	ND		ND/ND		ND/ND		ND/ND		0.90/ND		ND/1.30		ND/ND		3.50/2.00	
Total cholesterol	156		135/100		136/133		122/161		68/109		ND/97		ND/67		33/99	
Calcium	10.80		10.70/10.60		11.40/11.20		11.10/11.40		10.20/8.20		ND/11.30		ND/6.50		6.80/9.10	
gamma-globrin (% of total globrin)	15		14/17		15/12		13/8		7/11		ND8		ND/7		10/9	
Urinalysis	-		-		-		-		ND		ND		ND		ND	
Organ weights	-		-		-		-		ND		ND		ND		ND	
Necropsy																
Gastric mucosa- redness									1				1		1	
Gastric hemorrhagic erosions									1		1					
Liver- yelloow focus													1			

ND: Not determined,
-: no remarkable change
Test article-treatment related changes were underlined

2.6.7.7G 4-weeks Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Monkeys_5482 (Continued)

Report Title: Systemic tolerance study of ZK 36.374 in monkey (Macaca fascicularis) after continuous intravenous infusion using the alzet –osmotic-pump over a period of four weeks

Report No.: 5482 **Location:** 4.2.3.2.30

Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**		**0.02**		**0.17**		**1.41**	
Number of Animals	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Histopathology								
Stomach- acute gastric erosions					1	1		
Liver – centrilobular sinusoidal hyperemia					2	1	1	2
- centrilobular necrosis					1			2
- centrilobular fatty change							1	
Adrenal cortex- focal sinusoidal hyperemia					1		1	1
Pancreas – sinusoidal hyperemia					1		1	

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8A Ames Salmonella Mutagenicity Assay_5169

Report Title: Evaluation of ZK36.374 in the Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Test
Report No.: 5169 **Location:** 4.2.3.3.1.1
Test Article: Iloprost

Test for Induction of : Reverse mutation in bacterial cells **No. of Independent Assay:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium* **No. of Replicate Cultures:** 3
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver (S9 mix) **No. of Cells Analyzed/Culture:** - **Date of Treatment** [redacted]
Vehicles: **For Test Article:** Phosphate buffer **For Positive Controls:** Acetone or phosphate buffer
Treatment: 72 hrs.
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean±SD)				
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
Without Activation	Phosphate buffer	0 (0.1 mL/plate)	15 ± 1.5	105 ± 5.8	9 ± 1.0	12 ± 3.2	16 ± 3.0
	Acetone	0 (0.1 mL/plate)	20 ± 4.5	108 ± 10.2	11 ± 1.2	12 ± 2.5	17 ± 3.0
	Iloprost	0.01	14 ± 3.5	103 ± 5.0	9 ± 2.7	14 ± 4.0	15 ± 3.1
		0.025	18 ± 1.5	108 ± 17.4	11 ± 1.2	11 ± 4.6	13 ± 2.5
		0.1	17 ± 1.5	105 ± 10.0	12 ± 3.8	10 ± 1.5	15 ± 1.2
		0.25	16 ± 1.7	100 ± 6.7	10 ± 1.5	12 ± 2.3	16 ± 0.6
		1	17 ± 1.2	117 ±7.1	12 ± 1.5	13 ± 1.7	16 ± 3.8
		5	18 ± 2.7	85 ± 9.6	7 ± 1.0	14 ± 2.1	18 ± 3.1
	2-aminoanthracene	0.002	--	124 ± 10.8	--	--	13 ± 1.5
		0.005	13 ± 1.7	--	6 ± 2.3	15 ± 2.1	--
	MNNG	0.003	744 ± 13.2	--	--	--	--
	Cyclophosphamide	0.4	26 ± 6.6	--	--	--	--
	Benzo(a)pyrene	0.01	--	110 ± 5.5	--	--	--
		0.02	--	--	12 ± 2.7	11± 0.6	18 ± 3.5
	2-nitrofluorene	0.01	--	936 ± 94.7	80 ± 12.1	919 ± 136.3	775 ± 29.8

2.6.7.8A Ames Salmonella Mutagenicity Assay_5169 (Continued)

Report Title: Evaluation of ZK36.374 in the Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Test
Report No.: 5169 **Location:** 4.2.3.3.1.1
Test Article: Iloprost

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean±SD)				
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
With Activation	Phosphate buffer	0 (0.1 mL/plate)	13 ± 3.5	88 ± 8.4	15 ± 2.1	16 ± 6.0	27 ± 5.5
	Acetone	0 (0.1 mL/plate)	10 ± 1.7	108 ± 7.6	15 ± 4.5	21 ± 2.9	34 ± 4.6
	Iloprost	0.01	11 ± 2.1	110 ± 9.7	18 ± 0.6	20 ± 2.7	25 ± 6.7
		0.025	10 ± 3.5	108 ± 7.6	14 ± 5.1	24 ± 2.7	33 ± 4.5
		0.1	10 ± 3.0	109 ± 5.1	17 ± 2.7	21 ± 8.1	31 ± 3.6
		0.25	10 ± 2.3	106 ± 10.4	19 ± 4.0	19 ± 3.6	31 ± 1.5
		1	11 ± 2.1	92 ± 9.1	22 ± 3.6	20 ± 1.7	27 ± 5.06
		5	11± 5.2	102 ± 9.2	13 ± 3.2	22 ± 5.5	31 ± 2.7
	2-aminoanthracene	0.002	--	1038 ± 122	--	--	260 ± 47.1
		0.005	152 ± 4.0	--	98 ± 9.9	621 ± 23.6	--
	MNNG	0.003	707 ± 18.6	--	--	--	--
	Cyclophosphamide	0.4	82 ± 9.1	--	--	--	--
	Benzo(a)pyrene	0.01	--	825 ± 48.6	--	--	--
		0.02	--	--	59 ± 3.2	67 ± 7.2	166 ± 12.5
	2-nitrofluorene	0.01	--	689 ± 26.4	68 ± 13.1	306 ± 82.4	276 ± 16.2

-- : Not examined

2.6.7.8B Ames Salmonella Mutagenicity Assay with Preincuvation_7466

Report Title: ZK36.374 Evaluation in the Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Test with Preincubation
Report No.: 7466 **Location:** 4.2.3.3.1.2
Test Article: Iloprost

Test for Induction of : Reverse mutation in bacterial cells **No. of Independent Assay:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium* **No. of Replicate Cultures:** 3
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver (S9 mix) **No. of Cells Analyzed/Culture:** - **Date of Treatment** [redacted]
Vehicles:; For Test Article: DMSO **For Positive Controls:** DMSO or phosphate buffer
Treatment: 72 hrs.
Cytotoxic Effects: Growth inhibition of the background lawn at highest concentration
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean±SD)				
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
Without Activation	DMSO	0 (0.1 mL/plate)	29 ± 4	119 ± 4	11 ± 4	18 ± 3	29 ± 6
	Phosphate buffer	0 (0.1 mL/plate)	28 ± 3	119 ± 5	13 ± 3	14 ± 2	44 ± 9
	Iloprost	0.05	33 ± 6	115 ± 10	12 ± 5	14 ± 2	40 ± 4
		0.1	23 ± 3	108 ± 8	8 ± 5	12 ± 3	30 ± 3
		0.25	28 ± 5	112 ± 5	12 ± 6	19 ±5	35 ± 5
		0.5	25 ± 8	102 ± 11	12 ± 3	13 ±3	31 ± 5
		1.00	32 ± 8	117 ± 11	12 ± 3	10 ± 1	38 ± 6
		2.50	29 ± 3 *	108 ± 3	7 ± 3	11 ±1	35 ± 13
		5.00	28 ± 2 *	104 ± 10 *	0 ± 0 *	12 ± 2 *	22 ± 5 *
	2-aminoanthracene	0.005	28 ± 2	149 ± 16	20 ± 3	15 ± 4 *	34 ± 9
	Cyclophosphamide	0.4	80 ± 12	--	--	--	--
	Sodium azide	0.005	685 ± 24	706 ± 32	--	--	--
	DMNA	0.005 mL/plate	--	175 ± 17	--	--	--
	Benzo(a)pyrene	0.005	--	--	10 ± 6	--	--
		0.01	--	--	--	11±4	31 ± 8
	9-acridinamine	0.04	--	--	106 ± 34	--	
	2-nitrofluorene	0.01	--	--	--	1355 ± 121	1178 ± 80

*: background lawn reduced --: Not examined

2.6.7.8B Ames Salmonella Mutagenicity Assay with Preincuvation_7466 (Continued)

Report Title: ZK36.374 Evaluation in the Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Test with Preincubation
Report No.: 7466 **Location:** 4.2.3.3.1.2
Test Article: Iloprost

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean±SD)				
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
With Activation	DMSO	0 (0.1 mL/plate)	17± 2	118 ± 11	23 ± 6	22 ± 3	31 ± 3
	Phosphate buffer	0 (0.1 mL/plate)	21 ± 2	135 ± 7	22 ± 6	25 ± 1	37 ± 3
	Iloprost	0.05	15 ± 3	112 ± 10	23 ± 8	18 ± 1	38 ± 2
		0.1	18 ± 4	122 ± 13	23 ± 3	16 ± 2	27 ± 4
		0.25	15 ± 7	104 ± 10	22 ± 4	23 ± 3	36 ± 3
		0.5	16 ± 5	128 ± 2	24 ± 5	21± 3	33 ± 1
		1.00	16 ± 5	109 ± 7	20 ± 4	18 ± 1	32 ± 4
		2.50	20*± 5	116 ± 10	19 ± 5	17 ± 3	28 ± 9
		5.00	18* ± 3	117* ± 11	11* ± 6	13* ± 5	20* ± 3
	2-aminoanthracene	0.005	111 ± 17	579 ± 63	66 ± 8	526 ± 17	508 ± 14
	Cyclophosphamide	0.4	708 ± 12	--	--	--	--
	Sodium azide	0.005	27 ± 2	163 ± 15	--	--	--
	DMNA	0.005 mL/plate	--	1763 ± 87	--	--	--
	Benzo(a)pyrene	0.005	--	--	63 ± 3	--	--
		0.01	--	--	--	77 ± 10	129 ± 4
	9-acridinamine	0.04	--	--	71± 4	--	--
	2-nitrofluorene	0.01	--	--	--	204 ± 13	224 ± 11

*: background lawn reduced --: Not examined

2.6.7.8C Reverse Mutation Assay with E. coli_7548

Report Title: Mutagenicity Evaluation of ZK36.374 in the Reverse Mutation Assay with E. coli Strain WP2 uvrA
Report No.: 7548 **Location:** 4.2.3.3.1.3
Test Article: Iloprost

Test for Induction of : Reverse mutation in bacterial cells **No. of Independent Assay:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *E. coli (WP2 uvrA)* **No. of Replicate Cultures:** 3
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver (S9 mix) **No. of Cells Analyzed/Culture:** - **Date of Treatment** [redacted]
Vehicles:; For Test Article: DMSO **For Positive Controls:** Water or DMSO
Treatment: ca.48 hrs.
Cytotoxic Effects: None (precipitates in the agar starting at 1 mg/plate)
Genotoxic Effects: None

Test Article	Concentration (mg/plate)	Revertants per Plate (Mean±SD)			
		Assay 1		Assay 2	
		Without Activation	With Activation	Without Activation	With Activation
DMSO	0 (0.05 mL/plate)	24.7 ± 5.0	29.0 ± 3.5	55.0 ± 10.4	66.0 ± 6.9
Iloprost	0.001	29.3 ± 7.0	27.0 ± 7.2	61.7 ± 5.7	62.7 ± 9.1
	0.01	28.7 ± 2.5	26.3± 4.2	64.3 ± 8.0	60.0 ± 7.8
	0.1	28.0 ± 4.4	25.3 ± 1.2	58.0 ± 7.2	62.7 ± 7.2
	0.5	30.0 ± 5.2	29.3 ± 3.5	59.0± 5.0	60.0 ± 3.0
	1.0	25.3 ± 3.2	29.0 ± 2.6	60.0 ± 8.7	64.0± 6.2
	2.5	26.7 ± 3.5	27.3 ± 4.0	62.7 ± 3.2	59.3 ± 3.8
	5.0	33.7 ± 3.1	36.0 ± 2.6	65.3 ± 4.2	66.7 ± 5.5
Ethylmethanesulfonate	0.01 mL/plate	2009.3 ± 166.5	--	2083.0 ± 23.4	--
2-aminoanthracene	0.01	--	788.3 ± 8.1	--	392.3 ± 23.6

--: Not examined

2.6.7.8D Chromosomal aberration test in human lymphocytes_7160

Report Title: ZK36.374 Evaluation of the Clastogenic Potential in the Human Lymphocyte Test
Report No.: 7160 **Location:** 4.2.3.3.1.4
Test Article: Iloprost

Test for Induction of : Chromosomal aberrations in human lymphocytes **No. of Independent Assay:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: Not applicable **No. of Replicate Cultures:** 2
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver (S9 mix) **No. of Cells Analyzed/Culture:** 100 (pos. control 50) **Date of Treatment** [redacted]
Vehicles:; For Test Article: DMSO **For Positive Controls:** DMSO
Treatment Without activation: 31 h; with activation: 3 h with 22 hrs. recovery
Cytotoxic Effects: Reduction of the mitotic index at the highest conc. scored for chromosomal aberrations: 60% without activation; 63% with activation
Genotoxic Effects: None

Test Article	Concentration	Without Activation		With Activation	
	(µg/mL)	Cytotoxicity [a] (% of control)	% Aberrant Metaphases[b]	Cytotoxicity [a] (% of control)	% Aberrant Metaphases[b]
DMSO	0 (1%)	100	0.5	100	1.5
Iloprost	2.5	100	Not evaluated	100	Not evaluated
	5	97	1.5	79	Not evaluated
	10	85	Not evaluated	61	Not evaluated
	25	73	0	72	1.0
	50	40	0.5	46	Not evaluated
	100	16	Not evaluated	48	0
	250	0	Not evaluated	37	0
	500	0	Not evaluated	23	Not evaluated
	1000	0	Not evaluated	4	Not evaluated
Triaziquone	$1x10^{-7}$ M	34	15[a]	--	--
Cyclophosphamide	$2x10^{-5}$ M	--	--	22	14

a: based on mitotic indices --: Not examined
b: Types of aberrations included were: B′ (chromatid breaks, fragments, deletions), B″ (isochromatid/chromosome breaks and deletions, isofragments), RB′(chromatid exchanges), DIC (dicentric chromosomes), and RING (ring chromosomes).

2.6.7.8E HGPRT test with V79 cells_7429

Report Title: Test Report of Study [redacted]:ZK36.374 - Detection of Gene Mutations in Somatic Mammalian Cells in Culture: HGPRT Test with V79 Cells
Report No.: 7429 **Location:** 4.2.3.3.1.5
Test Article: Iloprost

Test for Induction of : Gene Mutations **No. of Independent Assay:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Strains: Chinese Hamster V79 cells **No. of Replicate Cultures:** 5
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver (S9 mix) **No. of Cells Analyzed/Culture:** - **Date of Treatment** [redacted]
Vehicles:; For Test Article: DMSO **For Positive Controls:** DMSO
Treatment: 4 h; mut. express.: 7 days; mut. select.: 7 days
Cytotoxic Effects: Max. reduction of PE at highest conc.: 72% and 77 % without activation; 82% and 76 % with activation
Genotoxic Effects: None

Test Article	Concentration (µg/mL)	Number of Mutant Colonies							
		Without Activation				With Activation			
		Assay 1		Assay 2		Assay 1		Assay 2	
		Mean ± SD	Mutant Cols./10^6 Cells	Mean ± SD	Mutant Cols./10^6 Cells	Mean ± SD	Mutant Cols./10^6 Cells	Mean ± SD	Mutant Cols./10^6 Cells
Untreated cells	0	6.2 ± 1.8	18.8	14.0 ± 3.7	41.8	11.2 ± 2.4	23.4	7.0 ± 3.0	31.4
DMSO	0	5.2 ± 1.9	13.7	4.2 ± 3.7	12.7	8.8 ± 3.3	21.4	4.0 ± 1.7	15.3
Iloprost	25.0	2.4 ± 1.3	9.4	0.6 ± 0.9	2.9	--	--	--	--
	47.5	--	--	--	--	4.8 ± 2.7	11.8	6.8 ± 1.8	35.4
	100	7.4 ± 1.8	23.8	0.2 ± 0.4	0.6	8.4 ± 1.9	20.1	8.4 ± 5.4	41.4
	150	6.4 ± 2.5	19.9	0.2 ± 0.4	0.6	--	--	--	--
	250	7.6 ± 2.8	20.0	.0 ± 0.0	0.0	--	--	--	--
	300	--	--	--	--	13.0 ± 3.5	35.8	5.0 ± 1.9	31.6
	475	--	--	--	--	10.2 ± 1.8	36.9	11.8 ± 2.0	47.4
Ethylmethanesulfonate	1000	113.4 ± 6.0	446.3	192.2 ±14.3	854.6	--	--	--	--
9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene	15.4	--	--	--	--	48.0 ± 9.7	139.0	78.4 ±10.4	438.3

--: Not examined

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9A Micronucleus Test in Mice_5360

Report Title: Studies on the Mutagenic Potential of ZK36.374 in the Mouse Micronucleus Test
Report No.: 5360 **Location:** 4.2.3.3.2.1
Test Article: Iloprost

Test for Induction of: Micronuclei **Treatment Schedule:** Single dose **GLP Compliance:** Yes
Species/Strain: Mice/NMRI **Sampling Time:** 24, 48, 72 h after dosing
Age: 9 – 10 weeks **Method of Administration:** Intravenous (Pos. con. : i.p.) **Date of Dosing:** [redacted]
Cells Evaluated: Polychromatic and normochromatic erythrocytes **Vehicle/Formulation:** Aqueous solution of Trometamol, NaCl and EtOH at pH 8.3
No. of Cells Analyzed/Animal: 1000 PCE and 1000 NCE each by 2 readers
Toxic/Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None
Evidence of Exposure: IV Administration

Reader 1

	Dose		24 hours					48 hours					72 hours				
		No. of Animals	% PCEs	Micronuc. PCEs		Micronuc. NCE		% PCEs	Micronuc. PCEs		Micronuc. NCE		% PCEs	Micronuc. PCEs		Micronuc. NCE	
Test Article	(mg/kg)			Mean	Rng	Mean	Rng		Mean	Rng	Mean	Rng		Mean	Rng	Mean	Rng
Vehicle	0 (10 mL/kg)	5M/5F	53	1.7	0-4	1.9	0-4	50	1.1	0-3	0.9	0-2	59	1.3	0-3	1.0	0-4
Iloprost	10	5M/5F	51	2.1	0-6	1.5	0-3	53	1.6	0-4	0.9	0-3	60	1.1	0-2	1.2	0-3
	20	5M/5F	51	1.8	0-5	0.9	0-2	50	1.3	0-3	1.2	0-4	56	1.4	0-3	0.6	0-3
	40	5M/5F	51	2.0	0-5	1.3	0-3	53	1.6	0-3	1.4	0-3	56	1.3	0-5	1.1	0-4
Triaziquone	0.125	5M/5F	41	46.0*	21-66	3.4	0-7	32	9.3*	1-19	11.4*	8-20	42	3.4	0-6	6.6*	1-17

* -p<0.05 Compared to vehicle control

2.6.7.9A Micronucleus Test in Mice_5360 (Continued)

Report Title: Studies on the Mutagenic Potential of ZK36.374 in the Mouse Micronucleus Test
Report No.: 5360 **Location:** 4.2.3.3.2.1
Test Article: Iloprost

Reader 2

	Dose		24 hours					48 hours					72 hours				
		No. of Animals	% PCEs	Micronuc. PCEs		Micronuc. NCE		% PCEs	Micronuc. PCEs		Micronuc. NCE		% PCEs	Micronuc. PCEs		Micronuc. NCE	
Test Article	(mg/kg)			Mean	Rng	Mean	Rng		Mean	Rng	Mean	Rng		Mean	Rng	Mean	Rng
Vehicle	0 (10 mL/kg)	5M/5F	55	1.7	0-4	1.7	1-4	52	0.7	0-2	0.7	0-2	59	0.8	0-2	1.0	0-2
Iloprost	10	5M/5F	50	1.6	0-3	1.0	0-2	55	1.0	0-2	0.6	0-1	63	0.8	0-2	1.0	0-3
	20	5M/5F	49	0.9	0-2	1.3	0-3	51	1.5	1-3	0.9	0-4	56	1.2	0-2	0.8	0-2
	40	5M/5F	50	1.1	0-2	1.1	0-3	53	1.2	0-3	1.7	0-3	58	1.3	0-3	0.8	0-3
Triaziquone	0.125	5M/5F	36	44.0*	28 -52	4.0*	1-7	28	5.3*	1-9	9.9*	2-18	33	0.9	0-2	5.0*	2-8

* -p<0.05 Compared to vehicle control

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10A Tumorigenicity Study in Mice after Daily Dietary Administration_AW35

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Mice After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 96 Weeks

Report No.: AW35 **Location:** 4.2.3.4.1.1

Test Article: Iloprost

Species/Strain: Mice/ NMRI **Duration of Dosing:** Approx. 96 weeks **Treatment of Controls:** Blank diet containing ground placebo formulation

Initial Age: Unknown **Method of Administration:** Diet **GLP Compliance:** Yes

Date of First Dose: [redacted] **Vehicle/Formulation:** In diet

Basis for High-Dose Selection: As a result of a DRF study (Report A040), 10% iloprost clathrate containing diet feeding up to 29 days in male mice revealed slight decrease of food consumption and increase of liver weight with depletion of glycogen. So, 10% iloprost clathrate containing diet was considered maximal feasible concentration considering that higher concentration may affect nutritional adverse effect on animals when feeding for 2 years. Further, $AUC_{0\text{-}12h}$: at 4 weeks obtained at the 10% diet group is sufficiently high. And 3% in diet was set as the low dose in order to obtain a reasonable dose graduation.

Special Features: Extended-release formulation administered rather than drug substance, to mimic proposed human exposure Additional animals (20M, 20F in treated groups; 5M, 5F controls) were used for toxicokinetic monitoring (Report AR18). Study stopped early due to poor survival of females in all groups, including controls.

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**35.7(3% in diet)[a]**		**117.0 (10% in diet)[a]**	
Actual dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0**		**3.1**	**3.7**	**10.3**	**13.3**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics:								
Serum conc. (pg/mL) at Week 95	--	--	--	--	900	1100	2600	3900
Number of Animals								
At Start	50	50	50	50	50	50	50	50
Died/Sacrificed Moribund	19	34	19	35	14	30	18	35
Terminal Sacrifice	31	16	31	15	36	20	32	15

a: Amounts shown as nominal iloprost clathrate dose

2.6.7.10A Tumorigenicity Study in Mice after Daily Dietary Administration_AW35 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Mice After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 96 Weeks

Report No.: AW35 **Location:** 4.2.3.4.1.1

Test Article: Iloprost

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**35.7**		**117.0**	
Actual dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0**		**3.1**	**3.7**	**10.3**	**13.3**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Survival (%)	62	32	62	30	72	40	64	30
Body Weight[a]	45.4/3.7	34.5/2.4	44.4/4.0	36.1/3.3	43.7/3.6	34.7/3.3	44.1/3.0	35.0/2.5
Food Consumption[b]	5.4/0.5	5.1/1.0	5.5/0.6	5.3/1.1	5.4/0.5	5.0/1.0	5.5/1.1	5.4/1.4
Water Consumption								
Mean/S.D. g/day (at Week 1-14)	6.2/0.6	7.2/1.0	6.5/0.9	7.2/1.4	6.6/0.8	6.3/0.7**	6.6/0.8	6.5/0.9*
(at Week 25-91)	6.2/0.5	9.9/2.8	6.8/1.0	8.6/3.3	6.6/0.9	6.9/1.4**	6.4/0.8	6.7/1.4**
Necropsy:	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight								
Absolute Epididymides/Ovary weight (g/mg)	0.11	16	0.10	35*	0.10*	18	0.10*	49**
Relative Epididymides//Ovary weight (g/mg/100g BW)	0.24	40	0.22	89*	0.22	49	0.21*	123**
Histopathology								
Non-neoplastic lesion	-	-	-	-	-	-	-	-
Neoplastic lesions								
Number of Animals with Tumors								
Spinal cord: Sarcoma		1						
Heart: Mesothelioma, atriocaval	1							
Lungs: alveolar/bronchial adenoma	14	7	16	4	13	8	14	5
alveolar/bronchial carcinoma	11	6	10	3	9	9	3	2

a: Week 25. Group means/standard deviations are shown (grams).
b: Weeks 25-26. Group means/standard deviations are shown (grams/day).
*: p<0.05, **: p<0.01 Dunnett-test

2.6.7.10A Tumorigenicity Study in Mice after Daily Dietary Administration_AW35 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Mice After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 96 Weeks

Report No.: AW35 **Location:** 4.2.3.4.1.1

Test Article: Iloprost

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**35.7**		**117.0**	
Actual dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0**		**3.1**	**3.7**	**10.3**	**13.3**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals with Tumors (Continued)								
Stomach: squamous cell carcinoma						1		
Cecum: adenocarcinoma		1						
Colon: adenocarcinoma				3		1		
Liver: hepatocellular adenoma	6		5		1		1	
hepatocellular carcinoma		1	1			1		
hemangioma	1	1	1	1	1	1	1	
Kidneys: tubular cell adenoma	1							
Prostate: adenocarcinoma		N/A		N/A	1	N/A		N/A
Seminal vesicles: granular cell tumor	1	N/A		N/A		N/A		N/A
adenocarcinoma		N/A	1	N/A		N/A		N/A
hemangioma		N/A		N/A	1	N/A		N/A
Ovaries: : cystadenoma	N/A		N/A		N/A	1	N/A	
Uterus: adenomatous polyp	N/A		N/A	1	N/A	1	N/A	2
hemangioma	N/A	1	N/A		N/A		N/A	
Cervix: leiomyoma	N/A	2	N/A	1	N/A		N/A	
leiomyosarcoma	N/A	1	N/A		N/A		N/A	1
schwannoma	N/A	1	N/A		N/A	1	N/A	
stromal polyp	N/A		N/A		N/A		N/A	1
granular cell tumor	N/A		N/A	1	N/A		N/A	
adenocarcinoma: mucinous	N/A		N/A		N/A	1	N/A	
Pituitary gland: adenoma of pars distalis		3	1	4		3		4
Thyroid gland: follicular cell adenoma								2
Adrenal cortex: A-cell adenoma			2		1			
Adrenal medulla: pheochromocytoma		1				1	1	

N/A: not applicable

2.6.7.10A Tumorigenicity Study in Mice after Daily Dietary Administration_AW35 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Mice After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 96 Weeks

Report No.: AW35 **Location:** 4.2.3.4.1.1

Test Article: Iloprost

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**35.7**		**117.0**	
Actual dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0**		**3.1**	**3.7**	**10.3**	**13.3**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals with Tumors (Continued)								
Hemolymphoret. Sys.: lymphoma	11	29	13	29	13	27	12	31
Histiocytic sarcoma				1	1	1	1	
Spleen: hemangiosarcoma		2				1		
Bone Marrow: hemangiosarcoma			1					
Thymus: thymoma	2							
Harderian glands: adenoma	2	2	5	4	4	4	4	4
adenocarcinoma	1		1	1				
Mammary gland area: adenocarcinoma				4		2		1
Skin: granular cell tumor		1						
hemangiosarcoma	1							
schwannoma								1
sarcoma							1	
Bone: chondroma	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1/1	NE
Body cavities: hemangiosarcoma								1
Femur: osteoma				1				

NE: not examined

2.6.7.10B Carcinogenicity Study in Mice _BC60

Report Title: Carcinogenicity Study of Iloprost Clathrate in Mice
Report No.: BC60 **Location:** 4.2.3.4.1.3
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Mice/Crl:CD-1 **Duration of Dosing:** 2 years **Treatment of Controls:** Vehicle solution, 10 mL/kg/day
Initial Age: Approx. 6 weeks **Method of Administration:** Oral (gavage) **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Tris buffer solution, pH 8.3
Basis for High-Dose Selection: Results from a 12-week study (Report 96028) showed a decrease in survival at 250 mg/kg/day. Therefore, 250 mg/kg/day exceeded the maximum tolerated dose, and 125 mg/kg/day was chosen as the maximum dose for the 2-year study.
Special Features: Additional animals (5M, 5F per active dose group) were designated for toxicokinetic monitoring at week 53 (Report # SFR-KIST 20000009)

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	0 (Control)		5		50		125	
Actual Dose as iloprost (mg/kg)	0		0.65		6.5		16.25	
Gender	M:	F:	M:	F:	M:	F:	M:	F:
Toxicokinetics:								
Mean Cmax at week 11 [ng/mL][a]	Not aplicable		4.7	3.6	26.4	40.2	154	110
Mean AUC_{0-24} at week 11 [ng·h/mL][a]	Not aplicable		5.4	4.6	49.4	46.7	138	175
Mean Cmax (15min. post dosing at week 53) [ng/mL]	Not aplicable		1.23	1.52	18.0	25.2	38.3	109
Number of Animals								
At Start	70	70	70	70	70	70	70	70
Died/Sacrificed Moribund	45	30	38	45	37	41	42	31
Terminal Sacrifice	25	40	32	25	33	29	29	39

a: Data derived from TK report of 12 weeks DRF study (Report No. AM30).

2.6.7.10B Carcinogenicity Study in Mice _BC60 (Continued)

Report Title: Carcinogenicity Study of Iloprost Clathrate in Mice
Report No.: BC60 **Location:** 4.2.3.4.1.3
Test Article: Iloprost

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**50**		**125**	
Actual Dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0.65**		**6.5**		**16.25**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Survival [a] **(%)**	36	59	47	37	48	42	43	57
Observation								
appearing “sleepy” approximately 1 hour after dosing							observed	observed
Body Weight [b]	39.6/3.20	30.9/2.72	37.1*/3.26	30.5/2.88	39.5/3.62	30.9/2.25	39.4/3.33	32.1*/2.36
Food Consumption [c]	38/3.3	37/3.9	36*/3.5	36/4.0	35*/3.3	38/4.8	36*/3.2	36/3.6
Necropsy:	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Non-neoplastic lesion	-	-	-	-	-	-	-	-
Neoplastic lesions								
Number of Animals with Tumors								
Lung: adenoma	14	10	11	7	7	15	10	8
carcinoma	8	12	9	6	7	9	8	12
Liver: adenoma	2	2	7	0	3	1	5	0
carcinoma	7	1	7	1	1	1	3	0
Hematopoietic: lymphoma	7	8	3	5	1	12	1	12
Histiocytic sarcoma	1	7	2	3	0	3	2	2

a: Animals dying after Week 104, but before terminal sacrifice at Week 105, and animals dying due to accident, not included in the survival calculation
b: Week 26 Group means/standard deviations are shown (grams). * Significantly different from control value, $p < 0.05$
c: Week 25 Group means/standard deviations are shown (gram/week). * Significantly different from control value, $p < 0.05$

2.6.7.10C Tumorigenicity Study in Rats after Daily Dietary Administration _AP21

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Rats After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 2 Years
Report No.: AP21 **Location:** 4.2.3.4.1.4
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Rat/Wistar **Duration of Dosing:** 2 years **Treatment of Controls:** Blank diet containing ground placebo formulation
Initial Age: Unknown **Method of Administration:** Diet **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] **Vehicle/Formulation:** In diet
Basis for High-Dose Selection: As a result of 28 weeks repeated-dose toxicity study (Report AC52), 1% diet group exhibited only minor clinicopathological effect, thus a lower dose than 3% was not selected. 10% iloprost clathrate containing diet was considered maximal feasible concentration with considering that higher concentration may affect nutritional adverse effect on animals when feeding for 2 years. Furthermore, expected systemic exposure of 10% iloprost clathrate in diet was considered to sufficiently high (Report AB90).
Special Features: Additional animals (20M and 20F in all groups) were used for toxicokinetic monitoring (Report AO43).

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**13.7[a] (3% in diet)**		**45.6[a] (10% in diet)**	
Actual Daily Dose of Iloprost (mg/kg)	**0**		**0**		**1.3**	**1.6**	**4.2**	**5.3**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics:								
Plasma concentration (pg/mL) at week 104	--	--	--	--	390	459	1240	1464
Number of Animals								
At Start	50	50	50	50	50	50	50	50
Died/Sacrificed Moribund	14	13	16	13	20	12	11	14
Terminal Sacrifice	36	37	34	37	30	38	39	36
Survival (%)	72	74	68	74	60	76	78	72
Body Weight[b]	462/41	262/23	460/33	259/20	461/39	258/24	444/32	253/20
Food Consumption[c]	22/2	17/1	23/1	17/1	23/2	17/1	22/2	17/1

a: Amounts shown as iloprost clathrate dose
b: Week 25 Group means/standard deviations are shown (grams).
c: Weeks 17-26 Group means/standard deviations are shown (grams/day).

2.6.7.10C Tumorigenicity Study in Rats after Daily Dietary Administration _AP21 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Rats After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 2 Years

Report No.: AP21 **Location:** 4.2.3.4.1.4

Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose of Iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**1.3**		**1.6**		**4.2**		**5.3**	
Gender	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**
Necropsy	-		-		-		-		-		-	
Organ Weights												
Uterus (g / g per 100g BW)		0.71/0.23				0.74/0.25				0.85/0.32		0.96*/0.35*
Histopathology												
Non-neoplastic lesion	-		-		-		-		-		-	
Neoplastic lesions												
Number of Animals with Tumors												
Cerebrum: Granular cell tumor	1				1				1			
Mixed glioma											1	
Spinal cord, thoracic: Schwannoma		1										
Saphenous nerve: Schwannoma												
Heart: Schwannoma		1			1				2		1	
Lungs: alveolar/bronchial adenoma		1				1			2		1	1
adenocarcinoma					1							
Rectum: adenoma											1	
Liver: hepatocellular adenoma		1										
Pancreas: Islet cell adenoma	2	1			4				1		2	6*
Islet cell carcinoma											1	
Kidneys: lipomatous tumor									2			
Testes: Mesothelioma	1										1	
Epididymides: Carcinosarcoma	1											

*: P<0.05 in comparison to Group 1, but not significant in comparison to Group 2.

2.6.7.10C Tumorigenicity Study in Rats after Daily Dietary Administration _AP21 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Rats After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 2 Years

Report No.: AP21 **Location:** 4.2.3.4.1.4

Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose of Iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**1.3**		**1.6**		**4.2**		**5.3**	
Gender	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**
Number of Animals with Tumors (Continued)												
Ovaries: granulosa theca cell tumor		2		2				4				5
fibroma								1				
thecoma												1
Uterus: stromal polyp		11		7				8				10
adenomatous polyp								1				1
adenoma				1								
adenocarcinoma		1		3				3				
leiomyoma		1										
schwannoma				1				1				1
Cervix: stromal polyp		1		1				1				1
squamous carcinoma				1								
Vagina: Stromal polyp		1		1				1				1
Preputial gland: Squamous carcinoma		1		1				2				2
Clitoral glands: Leiomyosarcoma												1
Pituitary gland: adenoma of pars distalis	22	41	26	26	27		32		20		33	
pars intermedia adenoma	2		2		1		1					
Thyroid gland: C-cell adenoma	9	10	6	5	11		8		9		5	
C-cell carcinoma	1											
follicular cell adenoma	3	2			1		1		1		1	
follicular cell carcinoma				1	1							
Parathyroid glands: adenoma									1			

2.6.7.10C Tumorigenicity Study in Rats after Daily Dietary Administration _AP21 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Rats After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 2 Years

Report No.: AP21 **Location:** 4.2.3.4.1.4

Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose of Iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**1.3**		**1.6**		**4.2**		**5.3**	
Gender	**M: 50**	**F: 50**	**M: 50**	**F: 50**	**M: 50**	**F: 50**	**M: 50**	**F: 50**	**M: 50**	**F: 50**	**M: 50**	**F: 50**
Number of Animals with Tumors (Continued)												
Adrenal cortex: adenoma	1	3	1									
Adrenal medulla: pheochromocytoma			1									
ganglioneuroma										2		
Hemolymphoret. Sys.: Lymphocyt. M. lymphoma				1		2		1		1		
Lymphobl. M. lymphoma		2										
Mal. Fib. Histiocytoma			2					1				
Mesent. lymph node: hemangioma	4		6		2		1			6		2
hemangiosarcoma	1											
Salivary glands: carcinoma			1									
Harderian glands: adenoma			1									
adenocarcinoma			1									
sarcoma (NOS)				1								
Mammary gland: fibroadenoma		9		4				7				9
adenoma		2		1								
adenocarcinoma		4		2				4				6

2.6.7.10C Tumorigenicity Study in Rats after Daily Dietary Administration _AP21 (Continued)

Report Title: Iloprost Clathrate Tumorigenicity Study in Rats After Daily Dietary Administration of the Ground Extended Release Formulation SH K 529 Over Approximately 2 Years

Report No.: AP21 **Location:** 4.2.3.4.1.4

Test Article: Iloprost

Actual Daily Dose of Iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**		**0 (Placebo control)**		**1.3**		**1.6**		**4.2**		**5.3**	
Gender	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**	**M:**	**50**	**F:**	**50**
Number of Animals with Tumors (Continued)																
Skin: squamous papilloma	1										1					
squamous carcinoma	1						1									
lipoma							1							1		
fibroma	2				1				1					1		
fibrosarcoma											1					
sebaciosquamous papilloma														1		
schwannoma	1		1				1				1					
keratoacanthoma									2					1		
Zymbal's gland carcinoma	1								1							
carcinosarcoma														1		
sarcoma (NOS)			1													
liposarcoma			1													
Body cavities: sarcoma (NOS)					1											
schwannoma					1											
ossifying sarcoma							1									
Femur: sarcoma (NOS)														1		

2.6.7.10D Carcinogenicity Study in Rats _BC61

Report Title: Carcinogenicity Study of Iloprost Clathrate in Rats
Report No.: BC61 **Location:** 4.2.3.4.1.6
Test Article: Iloprost

Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley **Duration of Dosing:** 2 years **Treatment of Controls:** Vehicle solution, 10 mL/kg/
Initial Age: Approx. 6 weeks **Method of Administration:** Oral gavage **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Tris buffer solution, pH 8.3
Basis for High-Dose Selection: In a DRF 12 weeks study in rats (CHV 2031-145), decrease in body weight gain and food consumption, increased RBC parameters and serum ALP and increased some organ weights at 125 and 250 mg/kg. The 125 mg/kg/day dose level was considered to be the maximum tolerated dose in rats for the carcinogenicity study.
Special Features: Additional animals (5M, 5F per active dose group) were designated for toxicokinetic monitoring at week 53 (Report # SFR-KIST 20000009)

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**50**		**125/100[a]**	
Actual Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0.65**		**6.5**		**16.25/13**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics:								
Mean Cmax at week 11 [ng/mL][b]	Not aplicable		5.8	5.9	45.1	78.8	119	168
Mean AUC_{0-24} at week 11 [ng·h/mL] b	Not aplicable		9.8	9.6	130.8	100.2	195.6	230.2
Mean Cmax (15min. post dosing at week 53) [ng/mL]	Not aplicable		5.78	2.73	18.3	27.6	60.4	36.0
Number of Animals								
At Start	70	70	70	70	70	70	70	70
Died/Sacrificed Moribund	39	36	35	41	35	26	52	43
Terminal Sacrifice	31	34	35	29	35	44	18	27

a: Male dose lowered from 125 mg/kg/day to 100 mg/kg/day at Week 26 due to high mortality
b: The data were derived from TK report of 12 weeks DRF study (Report no. AL96)

2.6.7.10D Carcinogenicity Study in Rats _BC61 (Continued)

Report Title: Carcinogenicity Study of Iloprost Clathrate in Rats
Report No.: BC61 **Location:** 4.2.3.4.1.6
Test Article: Iloprost

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**50**		**125/100**	
Actual Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0.65**		**6.5**		**16.25/13**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Survival (%)	45	49	50	41	50	63	26	39
Body Weight [c]	601/59.2	316/30.8	600/59.0	318/35.9	551*/61.4	302*/25.2	533*/53.7	299*/28.5
Food Consumption[d]	180/17.2	130/12.8	180/17.4	132/18.2	169*/17.5	122*/12.1	172*/17.8	126/15.0
Necropsy	-	-	-	-	-	-	Liver: enlarged [e]	-
Histopathology								
Non-neoplastic lesion								
Number of Animals with Lesions[f]								
Lung: acute inflammation	5		5	1	1		19	8
hemorrhage			2	1	3		2	5
Pancreas: degeneration	35	18	32	19	50	48	43	50

c: Week 26 Group means/standard deviations are shown (grams).
d: Week 25 Group means/standard deviations are shown (gram/week).
e: Livers were more frequently enlarged in high-dose males, probably a result of agonal congestion, associated with increased mortality in this group
f: Only those lesions that were significantly increased in treated groups as compared to controls are shown

2.6.7.10D Carcinogenicity Study in Rats _BC61 (Continued)

Report Title: Carcinogenicity Study of Iloprost Clathrate in Rats
Report No.: BC61 **Location:** 4.2.3.4.1.6
Test Article: Iloprost

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**50**		**125/100**	
Actual Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0**		**0.65**		**6.5**		**16.25/13**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Neoplastic lesions								
Number of Animals with Tumors								
Liver: hepatocellular carcinoma			1		1		2	
hepatocellular adenoma			1					
hepatocellular adenoma/carcinoma			2		1		2	
Pancreas: Islet cell adenoma	4		9		2		4	
carcinoma	1		2		1		2	
adenoma/carcinoma	5		11		3		6	
Thyroid gland: C-cell adenoma	4	7	3	1	2	1	2	4
C-cell carcinoma		4	2			3		0
(C-cell adenoma + carcinoma)		(11)		(1)		(4)		(4)
Follicular. cell adenoma	4		2				1	
Mammary gland: Carcinoma		15		9		14		6
fibroadenoma		14		17		19		9
(fibroadenoma + carcinoma)		(28)		(24)		(29)		(15)

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: iloprost

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of treatment	Dose as iloprost (mg/kg)	Noteworthy findings	Report No.	Section:
Rats	PO (gavage)	PM14-PP6	0.7, 7, 17.5, 35, 70 (5, 50, 125, 250, 500 as iloprost clathrate)	70 mg/kg: decreased food consumption in pregnant period and mortalities (2/10) at the 1st week of treatment in maternal animals, and early resorption of embryos. 35 mg/kg: slight increased post-implantation loss. 17.5 mg/kg and higher: livebirth and viability indices were slightly lower but there was no clear patern.	96030	4.2.3.5.3.3
Rabbits	PO (gavage)	G6 - 18	1.3, 5.2, 10.4, 15.6 (10, 40, 80, 120 as iloprost clathrate)	5.2 mg/kg and higher: decrease of body weight, food consumption, and mortalities (5.2 mg/kg: 1/5, 10.4 mg/kg: 2/5, 15.6 mg/kg: 4/5) were found in maternal animals, and early resorption of embryos was found.	96031	4.2.3.5.2.2

2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.7.12A Study of Fertility in Male Rats after IV treatment during Premating and Mating Period_7778

Report Title: ZK 36.374 - Study of the fertility and general reproductive performance in the rat after treatment of males during the premating and mating period by continuous intravenous infusion.
Report No.: **7778** **Location:** 4.2.3.5.1.2
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.1? Yes **Duration of Dosing:** **Males:** 70-84 days; during the premating and mating period **Females:** No dosing
Species/Strain: Rat / Wistar **Day of Mating** Day 0 post conception **Vehicle/Formulation:** Aqueous Trometamol Solution
Initial Age: Sexually matured **Day of C-Section:** 21 days post conception (50% of Dam)
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Intravenous infusion **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Study included examination of untreated F0 dams during gestation and lactation, examination of untreated F1 offspring during lactation and the growth period (including examination of physical development parameters), examination of reproductive performance of the untreated F1 generation during mating and gestation, and autopsy of the untreated F1 generation on Day 21 PC (including examination of the F2 fetuses).
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Males:** 0.8 mg/kg/day **F_0 Females** Not applicable **F_1 Litters:** 0.8 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**		**0.0024**		**0.048**		**0.8**	
Males								
Toxicokinetics: Not Conducted								
No. Evaluated	23		23		27		21	
No. Died or Sacrificed Moribund (surgical procedure-related) [a]	0(4)		0(4)		0(3)		0(8)	
Clinical Observations	-		-		-		-	
Body Weight (g; after 4 wks of dosing)	316		318		326		315	
No. Males that Mated	25		23		28		21	
No. Fertile Males	22	88%	21	91%	25	89%	17	81%

-: no treatment-related finding
a: Pathological examination revealed that hematological sarcoma, thickened fibrous capsule or small nodule of connective tissue around the pump implantation site were observed in all groups.

2.6.7.12A Study of Fertility in Male Rats after IV treatment during Premating and Mating Period_7778 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 - Study of the fertility and general reproductive performance in the rat after treatment of males during the premating and mating period by continuous intravenous infusion.
Report No.: **7778** **Location:** 4.2.3.5.1.2
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.0024**	**0.048**	**0.8**
Untreated Females				
Toxicokinetics: Not Conducted				
No. Evaluated	25	23	28	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Premating Body Weight (g; Day 0 PC)	216	219	215	216
Gestation Body Weight (g; Day 21 PC)	321	333	325	326
Mean No. Mating Days until Day 0 PC	2.8	2.3	2.6	3.1
No. Females Sperm Positive	22	20	22	13
No. Pregnant Females	21	12	21	11
No. Pregnant Females for C-Sectioned	**11**	**6**	**11**	**7**
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean No. Corpora Lutea/Animal	11.5	12.2	12.3	13.0
Mean No. Implantations/Animal	10.0	10.8	10.4	10.9
Mean % Preimplantation Loss/Animal	12.8	11.4	19.1	15.9
Mean No. Live Fetuses/Animal	9.2	10.3	9.8	10.3
Mean No. Resorptions/Animal	0.8	0.5	0.5	0.6
No. Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss/Animal	8.9	4.9	8.4	5.4
Mean weight of living fetuses (g)	5.2	5.3	5.2	5.2

2.6.7.12A Study of Fertility in Male Rats after IV treatment during Premating and Mating Period_7778 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 - Study of the fertility and general reproductive performance in the rat after treatment of males during the premating and mating period by continuous intravenous infusion.
Report No.: **7778** **Location:** 4.2.3.5.1.2
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.0024**	**0.048**	**0.8**
No. Litters with Fetal Anomalies (F1):				
Examined litters (n)	11	6	11(10[a])	7
External anomalies				
Examined fetuses (n)	101	62	108	72
Fetus with malformation (n)	0	0	0	0
Fetus with variation (n/ % of litter)	8/ 7.0	3/ 6.5	8/ 8.5	6/ 7.4
Visceral anomalies				
Examined fetuses (n)	50	32	53	38
Fetus with malformation (n)	0	0	0	0
Fetus with variation (n/ % of litter)	1/1.5	3/ 9.8*	0/ 0	0/ 0
Skeletal anomalies				
Examined fetuses (n)	51	30	54	34
Fetus with malformation (n)	0	0	0	0
Fetus with variation (n/ % of litter)	11/19.5	11/ 33.7	11/19.1	9/ 25.9
Spontaneous Delivery Collectives				
Pregnant females with living pups delivered	10(9[b])	6	10	4
Mean gestation period (days)	22.5	22.2	22.4	22.5
Mean implantations	12.1	10.5	10.1	11.8
Mean no. living young at delivery (day 1)	10.2	9.3	8.8	10.8

a: n=10 for skeletal examination; *: $p<0.05$ (by Kruskal-Wallis-test)
b: one female with only dead young at delivery.

2.6.7.12A Study of Fertility in Male Rats after IV treatment during Premating and Mating Period_7778 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 - Study of the fertility and general reproductive performance in the rat after treatment of males during the premating and mating period by continuous intravenous infusion.
Report No.: **7778** **Location:** 4.2.3.5.1.2
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.0024**	**0.048**	**0.8**
F1 Offspring;				
Viability index (% at day 4)	94.4	94.7	93.3	100
Lactation index (% at day 22)	98.0	100	98.8	100
Examined no. offspring (n)	108	57	89	43
External examination (no. litter examined)	10	6	10	4
pup with external variation (n/ % per litter)	1/ 1.0	0/ 0	0/ 0	0/ 0
Physical Development of F1 offspring [a]	-	-	-	-
Total no. mated females (n)	20	24	26	6[b]
Total no. inseminated females (n/ %)	20/100	24/ 100	26/ 100	6/ 100
Total no. pregnant females (n/ %)	18/ 90.0	15/ 62.5	20/ 76.9	5/ 83.3
Total fetal death (n/ % litter)	1/ 5.6	1/ 7.1	0/ 0	0/ 0
Eliminated (n)	0	1	0	0
Mean no. Corpora lutea (n/Litter)	13.6	13.7	14.7	12.4
Mean no. Preimplantation loss (n/ % Litter)	37/ 16.0	32/ 17.1	47/ 15.4	5/ 8.5
Mean no. implantation site (no. per Litter)	11.5	11.4	12.3	11.4
Mean no. living fetus (no. per Litter)	11.1	9.9	11.6	10.6
Resorptions (% of implantation per Litter)	10.5	22.2	5.9	7.0
Postimplantation loss (n/ % of impl. Litter)	8/ 10.5	22/ 22.2	15/ 5.9	4/ 7.0
F2 Fetus (F1 litters)				
External malformation (n/ no. examined)	0/199	0/ 138	0/ 231	0/ 53
Visceral malformation (n/ no. examined)	0/ 98	0/ 70	0/ 115	0/ 26
Skeletal malformation (n/ no. examined)	0/ 101	0/ 68	0/ 116	0/ 27

- : no treatment-related effect
a: Auricle unfolding, Hair growth, Teeth eruption, Complete fur, Separation of eyelids, Descent of testes and Opening of vagina were examined.
b: Due to low number of animals, further assessment was done separately.

2.6.7.12B Study of Fertility in Female Rats after IV infusion treatment from Premating to Gestation_7569

Report Title: ZK 36.374 - Study of the fertility and general reproductive performance in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump in female animals for 14 days before start of mating to day 7 of gestation
Report No.: **7569** **Location:** 4.2.3.5.1.1
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.1? Yes **Duration of Dosing:** **Males:** No dosing **Females:** 22-28 days (14 days premating to G7)
Species/Strain: Rat / Wistar **Day of Mating** Day 0 post conception **Vehicle/Formulation:** Aqueous Trometamol Solution
Initial Age: Sexually matured **Day of C-Section:** 21 days post conception **GLP Compliance:** Yes
Date of 1st Dosing: [redacted] **Method of Administration:** Intravenous infusion **Special Features:** --
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Males:** Not applicable **F_0 Females** 1.0 mg/kg/day **F_1 Fetus:** 1.0 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.1	1.0
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.06**	**1.0**
Females				
Toxicokinetics: Not conducted				
No. Evaluated	20	24	19	23
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Premating Body Weight (g; D15 of premating period)	227	233	229	230
Gestation Body Weight (g; D21 PC)	332	343	331	332
Body weight gain (g; D15 PC-D21PC)	64	64	56	59
No. Females Sperm Positive	30	30	23	30
No. Pregnant Females	26	30	22	28
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	2	0
Mean No. Corpora Lutea/Animal	12.6	14.3	14.2	13
Mean No. Implantations/Animal	11.1	12.0	11.8	11.1
Mean % Preimplantation Loss/ group	12.0	16.3	16.7	14.4
Mean No. Live Fetuses/ Animal	10.6	11.3	10.7	10.3
Mean No. Resorptions/Animal	0.5	0.7	1.1	0.8
No. Dead Fetuses	0	0	0	1
Mean % Postimplantation Loss/Animal	4.7	6.0	17.2	7.7
Fetus Skeletal Variations				
Incomplete ossification of Os frontale (n; %)	14;13.5	26;18.8	33;32.4*	43; 37.4*

*: p<0.05 (Chi-square test)

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13A Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Rat_7779

Report Title: ZK 36.374 Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump from day 6 to day 15 of gestation
Report No.: **7779** **Location:** 4.2.3.5.2.1
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.3? Yes **Duration of Dosing:** G6 to G15
Species/Strain: Rat / Wistar **Day of C-Section:** **21 days post conception (ca. 2/3 of F0)**
Initial Age: Sexually matured **Method of Administration:** Intravenous infusion **GLP Compliance:** Yes
Date of 1st Dosing: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Aqueous Trometamol Solution
Special Features: Study included examination of functional and behavioral parameters in the untreated F1 offspring during the growth period, examination of reproductive performance in the F1 generation during the mating and gestation periods, and autopsy of untreated F1 females on Day 21 PC (including examination of F2 fetuses). *Results were similar to those in the more comprehensive Segment I-III Study (Report 97004).*
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Dam 0.006 mg/kg/day F_1 Litters: <0.003 mg/kg/day F_2: 1.0 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.06**	**1.0**
Dams:				
Toxicokinetics				
Not determined	-	-	-	-
Number of Dams of C-section collectives	31	32	31	30
Number of Dams for delivery collectives	15	16	16	14
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[a]
Clinical Observations				
Hemorrhagic seroma in pump implantation site in some animals (due to surgical procedure of infusion pump)	+	+	+	+
Mean Body Weight Gain (g; D6 - D21 PC)	19	22	17	10*

a: One dam died on G7 due to (possible spontaneous) enteritis (confirmed by necropsy) was not considered to be the test compound treatment-related.
*: $p < 0.05$; Dunnett-test

2.6.7.13A Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Rat_7779 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump from day 6 to day 15 of gestation
Report No.: **7779** **Location:** 4.2.3.5.2.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.06**	**1.0**
Dams (Continued)				
Mean No. Corpora Lutea/Animal	12.9	13.5	13.1	13.1
Mean No. Implantations/Animal	11.1	11.3	11.5	10.9
Total No. Implantations	344	360	355	327
Mean % Preimplantation Loss/Animal	13.9	16.4	11.6	17.4
Total No. Abortions	0	0	0	0
Litters				
No. Litters Evaluated	31	31	31	16
No. Live Fetuses	325	332	327	162
Total No. Resorptions	19	28	28	165
Litters with total resorption	0/46	1/48	1/46	15/44
Mean No. Resorptions/Animal	0.6	0.9	0.9	5.5
No. Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean No. Postimplantation Loss/Animal	0.6	0.9	0.9	5.5
Mean Fetal Body Weight (g)	4.5	4.6	4.4	4.3
Fetal Sex Ratios (%M:F)	50.5 : 49.5	51.5 : 48.5	49.5 : 50.5	50 : 50
No. Litters with Fetal Anomalies (F1):				
External (Major/Minor)	1/0	1/0	0/0	3/0
Digits of forelimb shortened (litter %)	0(0)	1(3)	0(0)	2(12.5)
Edematous (litter %)	1(3)	0(0)	0(0)	0(0)
Encephalocele, agnathia inferior (litter %)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.25)
Soft Tissue (Major/Minor)	0/8	0/5	0/6	0/0
Skeletal (Major/Minor)	0/30	0/30	0/29	0/16

Major: Malformation, Minor: Variation

2.6.7.13A Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Rat_7779 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump from day 6 to day 15 of gestation
Report No.: **7779** **Location:** 4.2.3.5.2.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.06**	**1.0**
F_1 Fetuses :Skeletal Variation (including Ossification indeces)				
Examined fetuses (n)	160	165	167	83
Fetuses with (n; %)				
- os frontale not completely ossified	42; 26.3	48; 29.1	76;45.5*	50; 60.2*
- os parietale not completely ossified	45; 28.1	71; 43.0*	95; 56.9*	56; 67.5*
- wavy ribs	6; 3.8	13; 7.9	4; 2.4	9; 10.8*
- vertebral body(ies) not completely ossified	11; 6.9	17; 10.3	20; 12.0	21; 25.3*
- variations of 2 sternebra	35; 21.9	37; 22.4	43; 25.7	45;54.2*
- 3 sternebra	25; 15.6	39; 23.6*	34; 20.4	28; 33.7*
- 4 sternebra	31; 19.4	49; 29.7*	50; 29.9*	38; 45.8*
- total no. of feet bones not ossification	1943; 22.5	1934; 21.7	1970; 21.8	1169; 26.1*
Litters (Spontaneous Delivery Collectives)				
No. Litters Evaluated	15	16	16	14
No.Litters with living pups at delivery	15	16	15	13
No. Litters with total Prenatal death	0	0	1	1
Mean No. Implantations/Animal	12.2	10.4	11.5	11.6
Gestation Length in days	22.1	22.1	22.3	22.3
No. Live pups/ no. per Dam	167/ 11.1	150/ 9.4	160/ 10.7	130/ 10.0
No. Dead pups/ no. per Dam	2/ 0.1	1/ 0.1	0/0	1/ 0.1
F1 Offsprings				
Mean body weights of all pups at Day 1 (g)	5.5	5.7	5.6	5.5
Males % at Day 1	53.3	48.0	50.0	43.8
Viability index at day 4 (n/ %)	163/ 96.4	146/ 96.7	154/ 96.3	129/ 98.5
Lactation index at day 22 (n/ %)	154/ 94.5	142/ 97.3	136/ 88.3*	117/ 90.7

*: p< 0.05, Chi-Square- / Fisher- test

2.6.7.13A Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Rat_7779 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump from day 6 to day 15 of gestation
Report No.: **7779** **Location:** 4.2.3.5.2.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.06**	**1.0**
F_1 Offsprings (Continued)				
Physical Development (days post parturition)				
Auricles unfolding (mean days)	3.8	3.7	3.6	3.6
Hair eruption (mean days)	6.3	6.6	6.6	6.5
Teeth eruption (mean days)	11.3	10.7	11.0	11.1
Complete fur (mean days)	15.1	14.6	14.4	14.8
Separation of eyelids (mean days)	15.8	15.4	15.5	15.3
Descent of testes (mean days)	24.3	24.2	22.1	23.2
Opening of vagina (mean days)	39.0	38.8	38.8	37.5
Examined no. offspring	169	151	160	131
External malformation (n/ % per Litter)	0	0	3/ 1.8	2/ 2.5
Behavioral development [a]	-	-	-	-
Mean mating days until G0	2.7	2.9	2.8	2.9
No. pregnant females with living fetus	27	29	25	22
Mean corrected body weight gain G7- G21	18	15	17	18
Mean no. Corpora lutea per animal	13.7	13.8	13.2	14.1
Preimplantation loss % per animal	13.6	14.4	15.0	19.7
Mean Implantations per animal	11.7	11.7	11.0	11.2
Postimplantation loss % of impl. per animal	4.8	5.1	1.6	2.9
No. Living fetus per animal	11.1	11.1	10.8	10.9
No. resorption (% of impl. Per animal)	4.8	5.1	1.6	2.9
Mean body weight of fetus per litter (g)	5.2	5.1	5.2	5.2
External malformation (n/ examined)	0/ 301	0/ 322	0/ 270	0/ 240

a: Surface righting, Inclined plane, Acoustic startle, Bar holding, Rotating run, Visual placing, Open field and Water-T maze (Learning, Memory & Reverse learning) were assessed.
-: no treatment-related effect.

2.6.7.13B Oral Developmental Toxicity Study in Rabbit_97005

Report Title: Oral Developmental Toxicity Study of Iloprost Clathrate in Rabbits
Report No.: 97005 **Location:** 4.2.3.5.2.4
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.1? Yes **Duration of Dosing:** G7 to G20
Species/Strain: Rabbit/ NZW **Day of C-Section:** 29 days post conception
Initial Age: ca. 5-6 months **Method of Administration:** Oral by gavage **GLP Compliance:** Yes
Date of 1st Dosing: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Tris-buffer solution
Special Features: Toxicokinetics data taken from animals in a pilot study (Report No. AM31)
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females 1.3 mg/kg/day F_1 Litters: 2.6 mg/kg/day

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**20**	**40**
Nominal Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**	**1.3**	**2.6**	**5.2**
Dams:				
Toxicokinetics				
Plasma concentration at Cmax G18 (pg/mL)	Not performed	18610	Not perfomed	42540
No. of inseminated females	20	20	20	20
No. Died or Sacrificed due to abortion	0	0	1 (abortion)	6 (4 died#+2 abortions)
No. of non-pregnant	1	0	1	0
Clinical Observations				
reddened ears (within Ca.1hr post-dosing)			++	+++
ataxia & tremor (died)				4
feces	2	1	7	9
Body Weight (g & % of control ; D29)	4055.7	-1.1	+4.4	-2.3
Body Weight gain (g; D 7-9)	20.37	-29.45*, a	-59.05**	-123.21**
(g; D 7-21)[b]	204.84	113.65	140.95	-196.88**
Food Consumption (g; mean D 7-9)	200.0	170.6*, a	147.8**	95.1**
(g; mean D 9-11)	185.7	160.4	164.5	91.4**
(g; mean D 11-15)[b]	180.4	147.7*, a	138.5**	75.0**
(g; mean D 15-18)	157.8	178.2	149.6	87.4**
(g; mean D 18-21)[b]	193.5	160.7	153.0	92.4**

*: p<0.05, **: p<0.01, #: due to possible hypotension
a: These findings were not considered to be toxic since they were minimal changes.
b: Data analyzed following rank transformation

2.6.7.13B Oral Developmental Toxicity Study in Rabbit_97005 (Continued)

Report Title: Oral Developmental Toxicity Study of Iloprost Clathrate in Rabbits
Report No.: 97005 **Location:** 4.2.3.5.2.4
Test Article: Iloprost

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**20**	**40**
Nominal Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**	**1.3**	**2.6**	**5.2**
Dams (Continued):				
Necropsy Findings(total number of finding)	1	2	5[c]	12 [c]
(dead animals) distended urinary bladder, enlarged thymus, distended intestines				+
(aborted animals) pale liver/kidneys			+	+
pale liver	1	1		
pale heart		1		
flaccid heart			1	
granular heart				1
abdominal cavity mass without fetuses				1
distended intestines			1	
No. Pregnant animals	19	20	19	20
Mean No. Corpora Lutea/Litter	9.3	9.1	9.4	9.6
Mean No. Implantations/Litter	8.3	8.6	8.8	8.8
Total No. Implantations	158	171	159	123
Mean % Preimplantation Loss	10.4	5.6	6.3	8.6
Mean % Resorptions	6.9	5.1	1.6*	30.5
Total No. Abortions	0	0	1	2

*: p<0.05, **: p<0.01
c: Includes finding of uterus gravid

2.6.7.13B Oral Developmental Toxicity Study in Rabbit_97005 (Continued)

Report Title: Oral Developmental Toxicity Study of Iloprost Clathrate in Rabbits
Report No.: 97005 **Location:** 4.2.3.5.2.4
Test Article: Iloprost

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	0 (Control)	10	20	40
Nominal Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**	**1.3**	**2.6**	**5.2**
Litters (from Dams with Live Fetuses):				
No. Litters Evaluated	19	20	18	11
No. Live Fetuses	147	163	156	84
Mean No. Resorptions/Animal	0.6	0.4	0.2	1.2
No. of Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss/Animal	6.9	5.1	1.6*	11.5
Mean Viable Fetus Body Weight (g)	43.29	43.70	43.08	41.67
Fetal Sex Ratios (Male %)	53	51	60	68
Fetal Anomalies:				
External (Major/Minor)	0/0	0/0	1/0	0/0
malrotated hindlimbs				
Fetal incidence (Number/%)	0(0)	0(0)	1(0.6)	0(0)
Litter incidence(Number/%)	0(0)	0(0)	1(5.6)	0(0)
Visceral (Major/Minor)	0/16	0/15	1/20	0/13
kidney(s) malpositioned				
Fetal incidence (Number/%)	0(0)	0(0)	1(0.6)	0(0)
Litter incidence (Number/%)	0(0)	0(0)	1(5.6)	0(0)

*: $p<0.05$
Major: malformation (findings were shown); Minor: Variation

2.6.7.13B Oral Developmental Toxicity Study in Rabbit_97005 (Continued)

Report Title: Oral Developmental Toxicity Study of Iloprost Clathrate in Rabbits
Report No.: 97005 **Location:** 4.2.3.5.2.4
Test Article: Iloprost

Daily Dose as iloprost clathrate (mg/kg)	0 (Control)	10	20	40
Nominal Daily Dose as iloprost (mg/kg)	**0 (Control)**	**1.3**	**2.6**	**5.2**
Fetal Anomalies (Continued):				
Skeletal (Major/Minor)	3/114	0/125	2/132	1/80
vertebral anomaly w/wo rib anomaly				
Fetal incidence (Number/%)	0(0)	0(0)	2(1.3)	1(1.2)
Litter incidence(Number/%)	0(0)	0(0)	2(11)	1(9.1)
major fusion of sternebrae				
Fetal incidence (Number/%)	2(1.4)	0(0)	0(0)	0(0)
Litter incidence(Number/%)	2(11)	0(0)	0(0)	0(0)
forked/fused rib(s)				
Fetal incidence (Number/%)	1(0.7)	0(0)	0(0)	0(0)
Litter incidence(Number/%)	1(5.3)	0(0)	0(0)	0(0)

Major: malformation (findings were shown); Minor: Variation

2.6.7.13C Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Rabbit after IV infusion_7440

Report Title: ZK 36.374 ; Embryotoxicity including teratogenicity study in the rabbit after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump from day 6 to day 28 of gestation
Report No.: 7440 **Location:** 4.2.3.5.2.5
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.3? Yes **Duration of Dosing:** G6 to G28
Species/Strain: Rabbit/ NZW **Day of C-Section:** 28 days post conception
Initial Age: Sexually matured **Method of Administration:** Intravenous infusion **GLP Compliance:** Yes
Date of 1st Dosing: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Aqueous Trometamol Solution
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Dams 0.5 mg/kg/day F_1 Litters: 0.1 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01(0.006) [a]	0.1	0.5
Dams:				
Toxicokinetics		Not conducted		
No. of inseminated females	20	21	21	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	2(1:died,1:moribund)	1(moribund)	1(moribund)
No. of non-pregnant	1	2	0	3
No. Pregnant	19	18	21	16
Clinical Observations				
(moribund sacrifice) poor general condition [b]	-	1	1	1
Body Weight gain (g/kg; D0-28)	3.9	4.0	4.0	4.0
Mean No. Corpora Lutea/Animal	9.6	10.2	9.8	10.3
Mean No. Implantations/Animal	8.1	8.5	7.8	8.6
Total No Implantations	113	85	149	103
Mean % Preimplantation Loss/Animal	14.6	15.6	19.3	17.0
Total No. Resorptions	12	18	13	9
Total No. Abortions	1	0	0	0

a :Actual dose
b: Due to consequence of the presence of purulent exsudate around the implanted pump (unlikely test article treatment-related effect).

2.6.7.13C Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Rabbit after IV infusion_7440 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 ; Embryotoxicity including teratogenicity study in the rabbit after continuous intravenous infusion with the Alzet®-Osmotic-Pump from day 6 to day 28 of gestation
Report No.: 7440 **Location:** 4.2.3.5.2.5
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01(0.006) [a]	0.1	0.5
Litters				
No. Litters Evaluated	14	10	19	12
No. Live Fetuses	100	66	136	94
Mean No. Resorptions/Animal	0.9	1.8*	0.7	0.8
No. Dead Fetuses	1	1	0	0
Mean No. Postimplantation Loss/Animal	0.9	1.9*	0.7	0.8
Weight of Living Fetuses/Litter (g)	265.5	273.6	295.9	274.6
Mean weight per litter (g)	38.0	39.4	38.3	35.9
Fetal Sex Ratios (Males %)	61.0	65.2	52.2	47.9
Fetal Anomalies:				
External (Major/Minor)	0/0	1[c]/0	1[d]/0	1[e]/1
Internal (Major/Minor)	0/0	1[f]/0	0/3	0/0
Skeletal (Major/Minor)	0/1	0/4	1[g]/9	0/22
Number of examined fetus	51	32	68	48
Os parietale not completely ossified (n;%)	0	0	1;1.5	5;10.4*
Vertebral bow not completely ossified (n;%)	0	2;6.3	7;10.3*	11;22.9*

Major: malformation; Minor: Variation, * : $p<0.05$, Chi-Square- / Fisher- test
a:Actual dose
c: malformed head (hypoplasia of nasal region, medial dislocation of eyes, frontal process)
d: rudimentary tail and fusion of the few remaining caudal vertebrae
e: aplasia of tail, umbilical hernia
f: brain and eye lenses reduced in size, hydrocephalus
g: absence of most caudal vertebrae

2.6.7.13D Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Monkeys after IV infusion_8493

Report Title: ZK 36.374 ; Embryotoxicity including Teratogenicity Study in the Monkey (Cynomolgus) After Continuous Intravenous Infusion from Day 20 to 50 of Gestation
Report No.: 8493 **Location:** 4.2.3.5.2.6
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.3? Yes **Duration of Dosing:** G20 to G50
Species/Strain: Monkey /Cynomolgus **Day of C-Section:** 100 days post conception
Initial Age: Sexually matured **Method of Administration:** Intravenous infusion **GLP Compliance:** Yes
Date of 1st Dosing: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Aqueous Trometamol Solution
Special Features: Toxicokinetics assessments reported separately in Report 9318.
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Dams 0.04 mg/kg/day F_1 Litters: 0.04 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.004	0.012	0.04
Dams:				
Toxicokinetics				
Mean plasma concentration (pg/mL)	nd	364	1060	1121
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
No. Pregnant	12	12	12	12
Body Weight (kg; D 100 PC)	3.7	3.7	3.4	3.8
Total No. Implantations	12	12	12	12
Total No. Abortions	7	7	9	2
Litters				
No. Live Fetuses	5	4	3	9
No. Dead Fetuses	0	1	0	1
Mean Fetal Body Weight (g)	118.8	113.6	114.9	112.0
Fetal Sex Ratios (Males :Females)	2:3	3:1	1:2	5:4

nd: not determined,
-: no remarkable finding

2.6.7.13D Embryotoxicity Including Teratogenicity Study in Monkeys after IV infusion_8493 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 ; Embryotoxicity including Teratogenicity Study in the Monkey (Cynomolgus) After Continuous Intravenous Infusion from Day 20 to 50 of Gestation

Report No.: 8493 **Location:** 4.2.3.5.2.6

Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.004	0.012	0.04
Fetal Anomalies (Number of. Fetuses/ Number of Fetuses with findings)				
External Anomalies	5/3 bent tail end:1, small tissue ball at tail end:2	5/0 -	3/1 prepuce not pate	10/6 small tissue ball at tall end:2 prepuce not pate:2, bent tail end:1, slightly bent tail end: 2
Visceral Anomalies	5/2 scattered punctiform hemorrhage at cardia:2	4/0 -	3/1 scattered punctlform hemorrhage at cardia	10/6 scattered punctiform hemorrhage at cardis:4, left adrenal enlarge:1, hemorrhages at cardia :1
Skeletal Anomalies	5/5 A: 6th sternebra not ossified; 2nd,5th & 7th sternebrae incompletely ossified B: 1st, 2nd & 6th sternebrae not ossified C: zygostyle asymmetrically ossified; 2nd, 6th & 7th sternebrae not ossified; 3rd to 5th sternebrae incompletely ossified D: 12th rib on the left side shortened; 6th & 7th sternebrae not ossified; 1st to 5th sternebrae incompletely ossified E: 1st, 2nd & 5th to 7th sternebrae not ossified, 3rd & 4th sternebrae incompletely ossified	4/4 F: 2nd & 6th sternebrae not ossified; 4th & 5th sternebrae incompletely ossified G: 1st, 2nd & 6th sternebrae not ossified; 3rd to 5th sternebrae incompletely ossified H: 1st & 6th sternebrae not ossified; 2nd to 5th & 7th sternebrae incompletely ossified I: extra rib on the left side; 1st, 2nd, 6th & 7th sternebrae not ossified; 3rd to 5th sternebrae incompletely ossified	3/3 J: 6th & 7th sternebrae not ossified; 1st to 5th sternebrae Incompletely ossified K: 2nd, 5th & 6th sternebrae incompletely ossified L:1st, 2nd, 6th & 7th sternebrae not ossified; 3rd, 4th & 5th sternebrae incompletely ossified	10/10 M:12th pair of ribs shortened; 6th sternebra not oss ified; 1st to 5th & 7th sternebrae incompletely ossified N:1st, 2nd, 6th & 7th sternebrae not ossified; 3rd to 5th sternebrae incompletely ossified O:2nd, 6th & 7th sternebae not ossified; 1st, 3rd, 4th & 5th sternebra incompletely ossified P:1st to 3rd, 6th & 7th sternebrae not ossified; 4th & 5th sternebra incompletely ossified Q:1st & 6th sternebrae not ossified; 2nd, 4th & 5th sternebrae incompletely ossified R:12th pair of ribs shortened; 6th & 7th sternebrae not ossified; 2nd to 5th sternebrae incompletely ossified S:2nd & 6th sternebrae incompletely ossified T:1st, 2nd & 4th to 7th sternebrae not ossified; 3rd sternebrae incompletely ossified U:2nd , 6th, & 7th sternebrae not ossified; 5th sternebrae incompletely ossified V: zygostyle asymmetrically ossified;; 6th sternebrae not ossified; 2nd, 5th & 7th sternebrae incompletely ossified

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.7.14A Peri- and Postnatal Development study in Rats_7780

Report Title: ZK 36.374 – Peri- and postnatal study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®- Osmotic Pump from day 15 of gestation to day 22 postpartum
Report No.: 7780 **Location:** 4.2.3.5.3.1
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.2? Yes **Duration of Dosing:** D 15 PC to D 22 PP
Species/Strain: Rats / Wistar **Day of Mating** D 0 GLP Compliance: Yes
Initial Age: Sexually matured **Method of Administration:** IV infusion
Date of 1st Dose: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Aqueous Trometamol Solution
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Dams 0.054 mg/kg/day F_1 Offspring preweaning <0.003 mg/kg/day Offspring post weaning: 0.9 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.009**	**0.09**	**0.9**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.054**	**0.9**
F0 Females:				
Toxicokinetics		Not conducted		
No. Pregnant	29	29	30	29
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0(+3[a])	0(+1 [a])	0(+1 [a])
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body weights				
Mean g on Day 21 PC	305	320	303	275*
Mean gain g/day during Days 0 PC to 21 PC	102	114	99	72*
Mean g on Day 22 PP	292	302	297	296

a: Died and excluded due to surgical procedure including anesthesia (no treatment-related)
*: $p < 0.05$ (Dunnett-test)

2.6.7.14A Peri- and Postnatal Development study in Rats_7780 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 – Peri- and postnatal study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®- Osmotic Pump from day 15 of gestation to day 22 postpartum
Report No.: 7780 **Location:** 4.2.3.5.3.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.009	0.09	0.9
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.054**	**0.9**
Untreated F1 Litters (Pre Weaning)				
Mean Duration of Gestation (days)	22.0	22.1	22.2	22.3
Abnormal Parturition	0	0	0	0
No. Litters Evaluated (D 90 PP)	27	26	29	25
No. Animals with Implantations	29	29	30	29
Mean No. Pups/Litter	9.5	10.1	9.3	8.6
No. Liveborn Pups/Litter	9.4	10.0	9.2	8.5
No. Stillborn Pups/Litter	0.04	0.1	0.1	0.1
Postnatal Survival to D 4 (%)	97.7	92.9*	98.1	88.8*
Postnatal Loss D 22 to D 90 PP	9	14	8	8
Mean Pup Body Weight (g; D 1 PP)	5.9	5.8	5.8	5.2
Mean Pup Body Weight (g; D 90; M/F)	319/218	323/216	322/213	304/212
Pup Sex Ratio (% of Males)	55	44	48	49

2.6.7.14A Peri- and Postnatal Development study in Rats_7780 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 – Peri- and postnatal study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®- Osmotic Pump from day 15 of gestation to day 22 postpartum
Report No.: 7780 **Location:** 4.2.3.5.3.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.009**	**0.09**	**0.9**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.054**	**0.9**
No. Pups Evaluated for anomalies (D1 PP, newborn; Pre-weaning)	256	282	270	233
No. Pup External Anomalies (Major/Minor)	0/1	6[b]/1	0/0	5[c]/1
<Malformation> % of group	0	2.1[#]	0	2.1[#]
(Litter/Number of fetuses)				
Phalanges shorted	0/0	1/4	0/0	2/4
Phalanges severely shortened and flexed	0/0	1/1	0/0	0/0
Slight flexion of hindlimbs; head shaped longish	0/0	1/1	0/0	0/0
hydrocephalus	0/0	0/0	0/0	1/1

PP: post partition
Major: malformation, Minor: variation
b: phalanges shortened (left forelimb)(3), phalanges shortened (forelimbs)(1), phalanges severely shortened and flexed (1), slight flexion of hindlimbs with head shaped longish (1)
c: hydrocephalus (1), phalanges severely shortened (left forelimb)(1), phalanges severely shortened (forelimbs)(2), phalanges severely shortened (left forelimb)(1)
*: $p < 0.05$ (Chi-/ Fisher-test), #: $p<0.05$ (Chi-Square-test)

2.6.7.14A Peri- and Postnatal Development study in Rats_7780 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 – Peri- and postnatal study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®- Osmotic Pump from day 15 of gestation to day 22 postpartum
Report No.: 7780 **Location:** 4.2.3.5.3.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.009	0.09	0.9
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.054**	**0.9**
Untreated F 1 Males (Post Weaning):				
No. Alive D 1 PP	139	124	128	112
Mean Body Weight (g; D 90)	319	323	322	304
Physical development of F1				
Auricles unfolding (mean days PP) [d]	3.7	3.7	3.5	3.6
Hair Growth (mean days PP) [d]	6.0	6.1	5.9	6.3
Teeth eruption (mean days PP) [d]	11.1	11.1	10.9	11.4
Separation of eyelids (mean days PP) [d]	16.1	16.1	15.9	16.2
Complete Fur (mean days PP) [d]	16.3	16.4	16.4	16.9
Descent of testis (mean days PP)	27.1	27.2	27.0	27.3
Behavioral development of F1 (M+F)[e]				
Surface Righting (% positive response)	92.7	93.9	94.0	93.2
Inclined Plane (% positive response)	90.7	88.5	88.1	85.5
Acoustic Startle (% positive response)	100	100	99.1	97.8
Visual Placing (% positive response)	100	99	100	100

d: combined males and females
e: Bar holding, Rotating rod and open field were also investigated and have no treatment-related effects.

2.6.7.14A Peri- and Postnatal Development study in Rats_7780 (Continued)

Report Title: ZK 36.374 – Peri- and postnatal study in the rat after continuous intravenous infusion with the Alzet®- Osmotic Pump from day 15 of gestation to day 22 postpartum
Report No.: 7780 **Location:** 4.2.3.5.3.1
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.009**	**0.09**	**0.9**
Actual Daily Dose (mg/kg)	**0**	**0.003**	**0.054**	**0.9**
Behavioral development of F1 Males [f]				
Learning (% correct escapes) Trials 1-3	64.2	53.9	57.9	46.3*[g]
(% correct escapes) Trials 4-6	89.9	89.6	86.7	84.3
Memory (% correct escapes)	85.2	81.9	81.0	77.8
Reverse learning (% correct escapes) Trials 1-3	19.5	25.0	26.4	27.1
(% correct escapes) Trials 4-6	54.1	54.2	66.7	57.9
Behavioral development of F1 Females [f]				
Learning (% correct escapes) Trials 1-3	58.6	57.6	59.6	50.2
(% correct escapes) Trials 4-6	88.3	85.9	79.1*	82.9
Memory (% correct escapes)	84.6	89.4	82.2	83.3
Reverse learning (% correct escapes) Trials 1-3	15.0	19.2	24.5	24.4
(% correct escapes) Trials 4-6	48.4	54.8	54.2	52.2
Untreated F 1 Females (Post Weaning):				
No. Evaluated Post Weaning	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Mean Premating Body Weight (g; D 0 PC)	221	213	210	211
Mean Gestation Body Weight Gain (g;D 6 - 21 PC)	19	18	20	20
Mean Age of Vaginal Patency (days)	39.8	40.9*	40.3	40.3
Mean No. Days Prior to Mating	3.1	3.2	2.8	2.9
No. Pregnant Females	23	22	25	24
No. Females with Sperm	24	24	25	25
Mean No. Corpora Lutea/Litter	12.6	12.7	11.9	12.3
Mean No. Implantations/Litter	10.9	11.2	10.2	10.7
Mean % Preimplantation Loss/Animal	13.8	10.4	14.8	13.3

f: Water T-Maze Test, *: $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis-test),
g: Since there was no evidence of a learning deficit in this group, when the data from the 10 additional trials were evaluated , these changes were not considered as a compound related effect.

2.6.7.14B Combined Study of Fertility, Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development study in Rats_97004

Report Title: Combined Study of Fertility and Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function, of Iloprost Clathrate in Female Rats
Report No.: 97004 **Location:** 4.2.3.5.3.2
Test Article: Iloprost

Design similar to ICH 4.1.1 and 4.1.3? Yes **Duration of Dosing:** D 14 Premating to D 21 PP
Species/Strain: Rats / Sprague Dawley **Day of Mating:** D 0 of gestation **Day of C-Section:** D 13 and D 20 PC
Initial Age: ca. 8 weeks **Method of Administration:** Oral Gavage **GLP Compliance:** Yes
Date of 1st Dosing: [redacted] **Vehicle/Formulation:** Tris Buffer Solution
Special Features: Toxicokinetics data taken from animals in a pilot study - Report AM96.
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Dams 7 mg/kg/day F_1 Fetus: 7 mg/kg/day F1 Offspring: 7 mg/kg/day

Nominal Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**50**	**250**
Actual iloprost dose (mg/kg)	**0**	**0.7**	**7**	**35**
Dams:				
Toxicokinetics				
Cmax at G16 (ng/mL)	-	3.0	38.8	114.5 (n=1)
AUC 0-24h at G16(ng･h/mL)	-	8.9	72.7	269.6
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	2[a] (during lactation)	1 (in parturition period)
Clinical Observations				
Reddened extremities (PM &G periods)	-	-	few animals (PM period)	over half animals (M period) & few animals (G &Lactation periods)
Body weights				
First few days of treatment & G0-G3	-	-	-	decreased
Food Consumption				
First few days of treatment	-	-	-	decreased

PM: premating, G: gestation
a: no treatment-related

2.6.7.14B Combined Study of Fertility, Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development study in Rats_97004 (Continued)

Report Title: Combined Study of Fertility and Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function, of Iloprost Clathrate in Female Rats
Report No.: 97004 **Location:** 4.2.3.5.3.2
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	50	250
Actual iloprost dose (mg/kg)	**0**	**0.7**	**7**	**35**
Day 13 PC correctives				
No. Pregnant	15	15	15	15
Body Weight (g; minus gravid uterine weight)	291.3	309.0	305.2	308.2
Mean No. Corpora Lutea/Animal	16.5	19.1	19.1	19.5
Total No. Implantations/ Animal	14.3	17.0	17.4	17.5
Mean % Preimplantation Loss/Animal	16.1	10.4	8.7	9.4
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss/Animal	17.5[b]	3.7	6.7	17.6[c]
Dead Fetuses	0	0	0	0
Day 20 PC correctives				
No. Pregnant	20	20	20	20
Body Weight (g; minus gravid uterine weight)	315.4	320.5	311.9	307.8
Mean No. Corpora Lutea/Animal	18.2	18.1	19.1	19.6
Total No. Implantations/ Animal	16.1	16.0	17.0	17.5
Mean % Preimplantation Loss/Animal	10.7	11.4	11.5	10.6
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0

b: due to a dam with no visible fetuses
c: due to a high number of early resorptions throughout the litters

2.6.7.14B Combined Study of Fertility, Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development study in Rats_97004 (Continued)

Report Title: Combined Study of Fertility and Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function, of Iloprost Clathrate in Female Rats
Report No.: 97004 **Location:** 4.2.3.5.3.2
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	50	250
Actual iloprost dose (mg/kg)	**0**	**0.7**	**7**	**35**
Day 20 PC correctives (Continued)				
No. Litters Evaluated	20	20	20	20
No. Live Fetuses	309	310	320	297
Mean No. Resorptions	0.7	0.5	0.9	2.7
No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	3.9	3.0	7.9	15.0*
Mean Fetal Body Weight (g)	3.42	3.46	3.51	3.34
Fetal Sex Ratios (Males %)	50	51	53	48
Fetal Anomalies:				
External (Major/Minor)	0/0	0/0	0/0	0/0
Visceral (Major/Minor)	0/2	0/8	0/3	1d/3
Skeletal (Major/Minor)	1e/135	0/131	0/133	0/125

d: microphthalmia
e: major fusion of sternabrae
* $p<0.05$

2.6.7.14B Combined Study of Fertility, Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development study in Rats_97004 (Continued)

Report Title: Combined Study of Fertility and Embryonic Development and Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function, of Iloprost Clathrate in Female Rats
Report No.: 97004 **Location:** 4.2.3.5.3.2
Test Article: Iloprost

Nominal Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	50	250
Actual iloprost dose (mg/kg)	**0**	**0.7**	**7**	**35**
Day 21 PP correctives (spontaneous delivery)				
No. Pregnant	22	25	23	24
Mean Duration of Gestation	21.9	22.1	22.2	22.6*
No. Litters Evaluated	22	25	23	23
Mean No. Implantations	15.45	16.60	15.13	17.39
Mean No. Pups/Litter	13.64	14.96	14.87	14.22
No. Liveborn Pups	299	373	335	303
No. Stillborn Pups	1	1	6	22
No. Alive Day 4 / No. Liveborn (%)	98	98	95	90
No. Alive at Weaning/No. Alive Day 4 Post Cull (%)	99	100	95	94
Pup Sex Ratio at Birth (Male %)	56	50	52	51
Pup Necropsy Incidence	5	4	3	25

* $p<0.05$

2.6.7.15　新生児を用いた試験

No studies were conducted and therefore, a tabulated summary is not provided

2.6.7.16　局所刺激性試験

No specific local tolerance studies were conducted and therefore, a tabulated summary is not provided, however,assessment of local tolerance on trachea and lung were done by repeated-dose toxicity studies by inhalation in rats. See 2.6.7.7A and 2.6.7.7B.

2.6.7.17 その他の毒性試験

Test Article: Iloprost

Species/Strain	Method of Administration	Duration of dosing	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy findings	Report No.	Location:
Dermal Sensitization							
Guinea Pigs	Dermal	Treatment days 1 & 9 Challenge day 23	Day 1: 500 µg/mL Day 9: 500 µg/mL Day 23 100 µg/mL	5M, 5F	No sensitizing potential observed in the maximization test.	9908	4.2.3.7.1.1
Antigenicity							
Guinea Pigs	SC (Induction) IV (Challenge)	Treatment days 1 & 15 Challenge day 30	Day 1: 0.25 mg/animal; Day 15: 0.05 or 0.25 mg/animal Day 30: 0.25mg/animal (0.1 mg 1 animal)	10M, 5M (positive controls)	No antigenic properties detected for iloprost from active anaphylaxis testing, passive cutaneous anaphylaxis testing, or testing for specific antibody formation using ELISA. Iloprost coupled to a high molecular weight protein did show some antigenic properties. No significant difference in anti-BSA antibody response for treated animals vs controls, but controls had a tendency to higher anti-BSA titers than treated animals.	AM20	4.2.3.7.1.2
Impurities							
Rat/ SD	IV	Single dose	50, 100, 200 mg/kg (heat stressed iloprost)	5M, 5F	No significant change in acute toxicity of heat-stressed iloprost (about 30% impurities). Approximal (minimal)lethal dose ; M+F: 50 mg/kg, M: 50 mg/kg, F: 100 mg/kg, Mortality; M 50: 2/5, 100:4/5, 200: 5/5, F 50: 0/5, 100: 1/5, 200: 5/5	AL64	4.2.3.7.6.1

2.6.7.17. その他の毒性試験（つづき）

Test Article: Iloprost

Species/Strain	Method of Administration	Duration of dosing	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy findings	Report No.	Location:
Diastereoisomers							
Rats/Wistar	PO (Gavage)	Single dose	1,000, 2,000, 4,000 mg/kg iloprost clathrate (R+S) and R-form; 500, 1,000, 2,000 mg/kg for S-form	5M, 5F	(M+F) Approximate (minimal) lethal dose (mg/kg): 1,000 < iloprost clathrate (R+S) <2,000; 1,000 for S-form; 2,000< R-form <4,000. General observations not substantially different among compounds. R-form better tolerated on a mg/kg basis than S-form or iloprost clathrate (R+S).	AI61	4.2.3.7.7.1
Rats/Wistar	IV	Single dose	0, 50, 125, 200 mg/kg Same doses of R- and S-forms and iloprost (R+S)	10M, 10F at 125 5M, 5F in other groups	(M+F) Approximate (minimal) lethal dose (mg/kg): 50 < iloprost (R+S), R-form & S-form <125. : No significant difference in lethal dose among 3 compounds. General observations not substantially different among compounds. S-form slightly more potent impact on reducing food consumption and body weight gain.	AL26	4.2.3.7.7.2
Rats/Wistar	PO (Gavage)	28-38 days daily repeated-dosing	0, 5, 50, 500 mg/kg/day Same doses of R- and S-forms and iloprost clathrate (S+R)	10M, 10F	The S-form was qualitatively similar to iloprost in effect profile, but the S-form was more potent in its effects on clinical signs, hematological and biochemical parameters, organ weight changes, and microscopic findings. The R-form was less potent in type and extent of its effects.	AN54	4.2.3.7.7.3