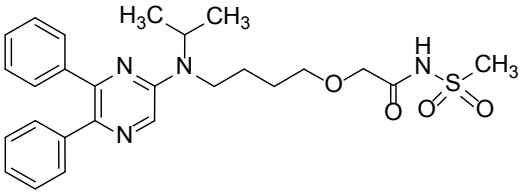
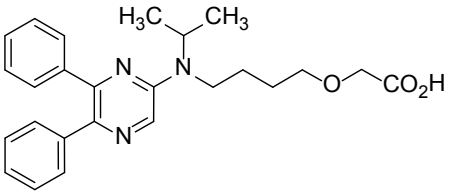
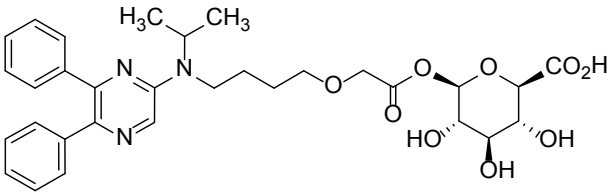
申請品及び関連化合物の名称と構造式

セレキシパグ及び関連化合物	由来
［一般的名称］セレキシパグ ［化合物名］ 2-{4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-yl)(propan-2-yl)amino]butoxy}-*N*-(methanesulfonyl)acetamide ［分子式］$C_{26}H_{32}N_4O_4S$ ［分子量］496.62 ［化学構造式］ 	原薬
［略称］MRE-269 ［化合物名］{4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-yl)(propan-2-yl)amino]butoxy}acetic acid ［分子式］$C_{25}H_{29}N_3O_3$ ［分子量］419.52 ［化学構造式］ 	活性代謝物 分解物
［略称］MRE-6001 ［化合物名］ 1-*O*-({4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-yl)(propan-2-yl)amino]butoxy}acetyl)-*β*-*D*-glucopyranuronic acid ［分子式］$C_{31}H_{37}N_3O_9$ ［分子量］595.64 ［化学構造式］ 	代謝物

2.6.1 緒言

肺動脈性肺高血圧症では、肺動脈内腔の狭窄などにより肺血管抵抗が増大し、肺動脈圧が上昇する。そのため、右室から肺への血液拍出能が制限され、最終的には右心不全により死に至る進行性の疾患である[1)]。この肺動脈血管は種々の内因性活性物質により収縮又は弛緩の調節を受けており、プロスタノイドもその一つである。アラキドン酸代謝物として生成する経路の一つであるプロスタノイドには、プロスタグランジン D_2、プロスタグランジン E_2、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$、プロスタサイクリン（PGI_2）及びトロンボキサン A_2 を含み、それぞれに特異的なプロスタノイド受容体を介して種々の生理作用を惹起する[2)]。このうち、肺動脈では PGI_2 がプロスタノイド受容体のサブタイプの一つであるプロスタサイクリン受容体（IP 受容体）を介して血管拡張作用を担っている[3)]。現在では、PGI_2（医薬品の一般的名称はエポプロステノールナトリウム）及びプロスタノイド構造の類似化合物が肺動脈性肺高血圧症の治療薬として使用されている[1)]。

日本新薬株式会社では、新たにヒト IP 受容体に選択性が高く、非プロスタノイド構造の作動薬としてセレキシパグを創製した[4)]。ヒトに経口投与した場合、セレキシパグは吸収後に肝臓で加水分解を受けて脱メチルスルホニルアミド体（MRE-269）を生成し、この代謝物はセレキシパグよりも高い効力を有する IP 受容体作動薬として作用する。また、MRE-269 はセレキシパグの主代謝物であり、消失半減期はセレキシパグよりも長い。このような特徴から、セレキシパグを 1 日 2 回、反復経口投与することにより肺動脈性肺高血圧症への治療効果が期待でき、新有効成分含有医薬品の医薬品製造販売承認申請を行うに至った。

医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、日本新薬株式会社及び Actelion Pharmaceuticals 社（スイス）はセレキシパグの薬理、薬物動態及び毒性に関する非臨床試験を実施又は委託し、その試験成績を収集した。さらに、活性代謝物である MRE-269 についても *in vitro* 及び *in vivo* 試験で必要な試験成績を収集した。セレキシパグの製造工程及びセレキシパグに含まれる不純物については、復帰突然変異試験を実施した。

これらの試験のうち、安全性薬理試験並びに不純物を用いた試験及び予備試験を除く毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準を遵守して実施した。

2.6.1.1 参考文献一覧

1. Frumkin LR. The Pharmacological treatment of pulmonary arterial hypertension. Pharmacol Rev. 2012;64:583-620. ＜資料番号 4.3-1＞

2. Majed BH, Khalil RA. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. Pharmacol Rev. 2012;64:540-82. ＜資料番号 4.3-2＞

3. Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. ScientificWorldJournal. 2007;7:1359-74. ＜資料番号 4.3-15＞

4. Kuwano K, Hashino A, Asaki T, Hamamoto T, Yamada T, Okubo K, et al. 2-{4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304),

an orally available and long-acting prostacyclin receptor agonist prodrug. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322:1181-8. ＜資料番号 4.3-3＞

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 36
2.6.2.4 安全性薬理試験 37
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 41
2.6.2.6 考察及び結論 41
2.6.2.7 図表 44
2.6.2.8 参考文献 44

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
ADP	adenosine 5'-diphosphate：アデノシン二リン酸
APD	action potential duration：活動電位持続時間 APD_{30}は30%再分極時活動電位持続時間、APD_{90}は90%再分極時活動電位持続時間を表す。
AUC	area under the time-plasma concentration curve：血漿中濃度－時間曲線下面積 AUC_{0-t}は時間0からt（hr）までのAUCを表す。
cAMP	cyclic adenosine 5'-monophosphate：環状アデノシン一リン酸
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DBTSA	（2E）-3-（3',4'-dichlorobiphenyl-2-yl）-N-（2-thienylsulfonyl）acrylamide：（2E）-3-（3',4'-ジクロロビフェニル-2-yl）-N-（2-チエニルスルホニル）アクリルアミド
DP受容体	prostaglandin D_2 receptor：プロスタグランジンD_2受容体
EC_{50}	50% effective concentration：50%効果濃度
EP受容体	prostaglandin E_2 receptor：プロスタグランジンE_2受容体
EPA	extralobar pulmonary arteries：肺葉外動脈
FP受容体	prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor：プロスタグランジン$F_{2\alpha}$受容体
GLP	good laboratory practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G protein-coupled receptor：Gタンパク共役型受容体
HEK293細胞	human embryonic kidney 293 cells：ヒト胎児由来腎臓293細胞
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒトether-a-go-go関連遺伝子
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine：3-イソブチル-1-メチルキサンチン
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
IP受容体	prostacyclin receptor：プロスタサイクリン受容体
Kd	kinetics of dissociation：解離定数
Ki	kinetics of inhibition：阻害定数
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride：NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩
LV＋S	left ventricle + septum：左心室壁及び中隔
PDGF	platelet derived growth factor：血小板由来成長因子
PGD_2	prostaglandin D_2：プロスタグランジンD_2
PGE_2	prostaglandin E_2：プロスタグランジンE_2
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandin $F_{2\alpha}$：プロスタグランジン$F_{2\alpha}$
RV	right ventricle：右心室壁
SIPA	small intralobar pulmonary arteries：肺葉内動脈
t_{max}	time to maximum concentration：最高血漿中濃度到達時間
TP受容体	thromboxane A_2 receptor：トロンボキサンA_2受容体

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

（1） 効力を裏付ける試験

セレキシパグ及び活性代謝物 MRE-269 のプロスタサイクリン受容体（IP 受容体）に対する作用として、受容体結合活性並びにその細胞内情報伝達系への影響を検討した。また、IP 受容体を介する作用として、MRE-269 のラット摘出肺葉内動脈標本に対する弛緩作用、ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞を用いた細胞増殖抑制作用並びに多血小板血漿を用いた血小板凝集抑制作用を検討した。動物試験では、ラット肺高血圧モデルを用いて右心肥大等に対するセレキシパグの影響を検討した。また、高血圧自然発症ラットを用いて本薬の体血圧に対する影響を検討した。

1） IP 受容体に対する作用

ラット組換え型 IP 受容体を安定的に発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の膜標品への[^{3}H]iloprost 結合に対し、セレキシパグ及び MRE-269 は濃度依存的な抑制を示し、その阻害定数（Ki）はそれぞれ 4098.4 ± 566.7 及び 394.3 ± 13.0 nmol/L であった。同様の実験系でのヒト組換え型 IP 受容体結合に対しては、それぞれ 263.0 ± 24.3 及び 19.8 ± 0.6 nmol/L の Ki を示した。

ヒト組換え型 IP 受容体の安定発現 CHO 細胞において、セレキシパグ及び MRE-269 は細胞内環状アデノシン一リン酸（cAMP）の生成量を濃度依存的に増加させ、いずれも最大反応に達した。その 50%効果濃度（EC_{50}）は、それぞれ 76.7（95%信頼区間：63.7～89.7）及び 4.98（95%信頼区間：3.69～6.26）nmol/L であった。このように、セレキシパグ及び MRE-269 は IP 受容体に対してアゴニストとして作用した。一方、β-アレスチンの IP 受容体への動員や IP 受容体の細胞内移行を指標とした検討から、セレキシパグ及び MRE-269 は IP 受容体の脱感作を生じさせにくいと考えられた。また、ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞を用いて細胞形態変化を指標とした検討では、セレキシパグ及び MRE-269 の幾何平均値での EC_{50} はそれぞれ 157 ± 1.3 及び 4.3 ± 1.2 nmol/L であり、MRE-269 の方が約 37 倍高い効力を示した。

2） プロスタノイド受容体に対する作用

ヒトプロスタノイド受容体のサブタイプであるプロスタグランジン D_2（PGD_2）受容体（DP 受容体）、プロスタグランジン E_2（PGE_2）受容体（EP 受容体：EP_1、EP_2、EP_3、EP_4）、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$（$PGF_{2\alpha}$）受容体（FP 受容体）及びトロンボキサン A_2 受容体（TP 受容体）結合に対し、1 μmol/L のセレキシパグ及び MRE-269 による影響は認められなかった。

ヒト、ラット及びイヌ IP、EP_2 及び EP_4 受容体を介した cAMP 生成量を検討したところ、セレキシパグ及び MRE-269 の IP 受容体に対する効力はヒトが最も高く、次いでラット及びイヌの順であった。ラット及びヒトと異なり、イヌでは MRE-269 は弱いながらも IP 受容体（EC_{50}：500 ± 1.1 nmol/L）に近い効力で EP_4 受容体（EC_{50}：660 ± 1.3 nmol/L）に作用した。

3） 摘出平滑筋標本に対する作用

ラット摘出肺葉内動脈の内皮除去標本を用いた検討において、$PGF_{2\alpha}$ による収縮をセレキシパグ及び MRE-269 はいずれも濃度依存的に抑制した。その IC_{50} はそれぞれ 11（95%信頼区間：10～12）

及び 2.7（95%信頼区間：2.4～3.1）μmol/L であり、MRE-269 の弛緩作用はセレキシパグより約 4 倍高い効力を示した。また、MRE-269 の弛緩作用は肺葉外動脈標本及び肺葉内動脈の内皮除去標本の間で違いはなく、その最大弛緩はそれぞれ 96.3%（95%信頼区間：91.2%～101.3%）及び 100.1%（95%信頼区間：89.9%～111.4%）であり、内皮を残した標本でも同様の弛緩作用を示した。

また、ラット摘出胃底部標本を用いた検討では、イロプロスト、ベラプロストナトリウム及びトレプロスチニルが EP_3 受容体を介した収縮反応を示したが、セレキシパグ及び MRE-269 にそのような作用は認められなかった。

4） 細胞増殖能に対する作用

ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞を血小板由来成長因子（PDGF）で刺激したときの細胞増殖能を、MRE-269 は 10 nmol/L 以上で濃度依存的に抑制した。

5） 血小板凝集能に対する作用

ラット及びヒトの全血に MRE-269 を添加した後で多血小板血漿を調製し、アデノシン二リン酸（ADP）で凝集反応を惹起した。MRE-269 による血小板凝集抑制作用の IC_{50} はラットで 8.3（95%信頼区間：6.0～11）μmol/L、ヒトで 69（95%信頼区間：57～82）nmol/L であった。

6） 肺高血圧モデルラットに対する作用

モノクロタリン誘発肺高血圧モデルラットにおいて、セレキシパグ 1 mg/kg を 1 日 2 回、19 日間反復経口投与することにより右心肥大の形成を抑制した。また、肺小動脈の肥厚を抑制し、モノクロタリン処置開始後の生存日数を延長した。さらに、セレキシパグは 10 mg/kg の反復経口投与により、上昇した肺動脈圧を低下させた。

TP 受容体作動薬である U46619 誘発肺高血圧モデルラットにおいて、セレキシパグは上昇した収縮期の右心室圧を 3 mg/kg の単回十二指腸内投与により低下させた。また、この投与量では体血圧及び心拍数にはほとんど影響を及ぼさなかった。

7） 体血圧に対する作用

体循環系への影響として、高血圧自然発症ラットの体血圧を測定したところ、セレキシパグは 10 mg/kg の経口投与により体血圧を低下させた。高血圧自然発症ラットにセレキシパグを 4 日ごとに 10、30、100 及び 300 mg/kg/day に増量して混餌投与したところ、投与量の増加に伴って体血圧は低下した。

（2） 副次的薬理試験

1） 酵素、他の受容体等に対する作用

酵素活性、他の受容体、トランスポーター、イオンチャネル等を対象とした結合実験において、セレキシパグ及び MRE-269 は 10 μmol/L を中心とした検討で 50%阻害濃度（IC_{50}）が得られるような抑制を示さなかった。

（3） 安全性薬理試験

安全性薬理試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。また、その他の器官系に及ぼす影響として、腎・泌尿器系、胃腸管系、体性神経系、血液凝固系及び摘出子宮平滑筋に及ぼす影響について検討した。Irwin の多次元観察法に準じた方法（Irwin 変法）を用いてラットの一般症状及び行動を観察し、中枢神経系に及ぼす影響を検討した結果、セレキシパグは 100 mg/kg で各種症状が認められた。さらにラット経口投与において、30 mg/kg 以上の用量で体温低下、100 mg/kg でヘキソバルビタール誘発睡眠の延長及び圧刺激に対する回避反応閾値の上昇が認められた。また、心血管系に及ぼす影響を検討したイヌの一般状態観察においても、1 mg/kg 以上の用量で嘔吐、3 mg/kg 以上の用量で摂餌量の減少及び軟便、10 mg/kg で下痢便（ゼリー状便）が観察された。心血管系についての *in vitro* 試験では、セレキシパグの 10 μmol/L 以上の濃度で 30%再分極時活動電位持続時間（APD_{30}）の短縮、30 μmol/L 以上の濃度でヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）電流の抑制及び 90%再分極時活動電位持続時間（APD_{90}）の短縮、100 μmol/L で静止膜電位上昇、活動電位振幅減少、収縮力増加及び拍動数増加が認められた。活性代謝物である MRE-269 は 30 μmol/L で収縮力の増加が認められたが、hERG 電流に影響は認められなかった。イヌ経口投与における心血管系への影響は、1 mg/kg 以上の用量で平均血圧の低下、拡張期血圧の低下及び QT 間隔の短縮、3 mg/kg 以上の用量で収縮期血圧の低下及び心拍数の増加が認められた。呼吸系に対しては、ラット経口投与において 30 mg/kg 以上の用量で 1 分間呼吸数、1 回換気量及び分時換気量の増加が認められた。また、イヌ経口投与において 3 mg/kg 以上の用量で呼吸数の増加が認められた。その他の器官系に対しては、ラット経口投与もしくは十二指腸内投与において、10 mg/kg 以上の用量で尿中 Cl^-排泄量の減少、Na^+/K^+比の減少、小腸における炭末移行率の減少並びに胃液量及び胃液総酸度の減少、30 mg/kg 以上の用量で尿量及び尿中 Na^+排泄量の減少、100 mg/kg で胃液 pH の上昇が認められた。*In vitro* 試験では MRE-269 の 30 μmol/L 以上の濃度で摘出子宮平滑筋の自動運動の収縮回数減少が認められた。

（4） 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 IP受容体に対する作用

2.6.2.2.1.1 ラットIP受容体への[^{3}H]iloprost結合に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響（試験番号PH-304-004、資料番号 4.2.1.1-1、評価資料）

ラット IP 受容体結合に対するセレキシパグ及び MRE-269 の影響を検討した。

（1） 方法

ラット組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞から膜標品を調製し、[^{3}H]iloprost 結合実験に供した。[^{3}H]iloprost の特異的結合は、150 μmol/L イロプロスト存在下での結合を非特異的結合とし、非存在下での全結合から差し引くことで算出した。

結合飽和実験では、0.3、0.5、1、3、5、10、30 及び 50 nmol/L の[^{3}H]iloprost を用い、その特異的結合量から非線形回帰により解離定数（Kd）を求めた。結合阻害実験では、10 nmol/L [^{3}H]iloprost 結合に対するセレキシパグ（0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 及び 100 μmol/L）、MRE-269（0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 及び 30 μmol/L）並びに陽性対照であるベラプロストナトリウム（0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1 及び 3 μmol/L）の阻害作用を検討した。結果は、非線形回帰により IC_{50} を推定し、Ki を算出した。

（2） 成績（2.6.3.2.1.1 項参照）

ラット組換え型 IP 受容体への[^{3}H]iloprost 結合の Kd は 15.6 ± 3.2 nmol/L（平均値±標準誤差、n=3）であった。セレキシパグ、MRE-269 及びベラプロストナトリウムは、いずれも[^{3}H]iloprost 結合を濃度依存的に抑制し（図 2.6.2.2.1-1）、その Ki はそれぞれ 4098.4 ± 566.7、394.3 ± 13.0 及び 40.4 ± 8.9 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1-1）。MRE-269 とセレキシパグの最大反応はいずれもほぼ 100%に達しており、同程度の効果を示した。効力については、MRE-269 の方がセレキシパグより約 10 倍高かった。

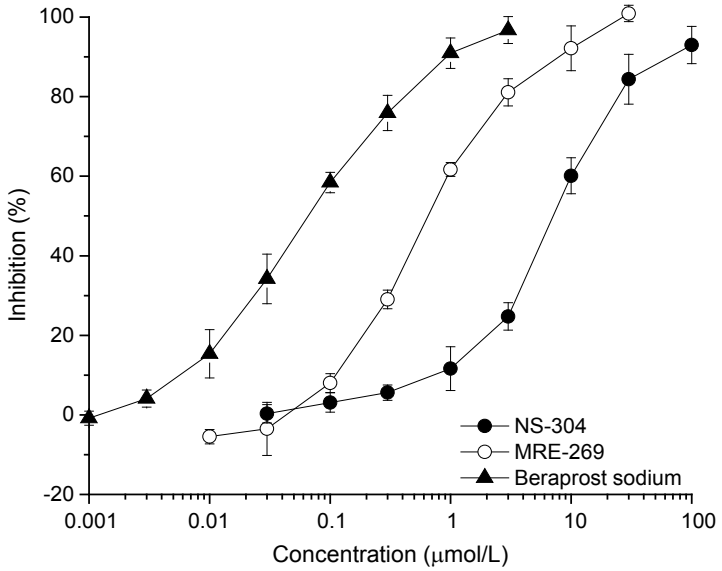


図 2.6.2.2.1-1 ラット組換え型IP受容体への[^{3}H]iloprost結合に対するセレキシパグ、MRE-269 及びベラプロストナトリウムの抑制作用

各点は、セレキシパグ（NS-304、●）、MRE-269（○）及びベラプロストナトリウム（▲）の結合阻害率を平均値±標準誤差（n=3）で表す。

［4.2.1.1-1 p.11 Fig.1 を引用］

2.6.2.2.1.2 ヒトIP受容体への[^{3}H]iloprost結合に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響（試験番号N304-041105、資料番号 4.2.1.1-2、評価資料）

ヒト IP 受容体結合に対するセレキシパグ及び MRE-269 の影響を検討した。

（1） 方法

ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞から膜標品を調製し、[^{3}H]iloprost 結合実験に供した。[^{3}H]Iloprost の特異的結合は、50 µmol/L イロプロスト存在下での結合を非特異的結合とし、非存在下での全結合から差し引くことで算出した。

結合飽和実験では、0.1、0.2、0.4、0.8、1.5、3、5、10、20 及び 40 nmol/L の[^{3}H]iloprost を用い、Kd を求めた。結合阻害実験では、5 nmol/L [^{3}H]iloprost 結合に対するセレキシパグ（0.1、0.3、1、3、10 及び 30 µmol/L）、MRE-269（0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1 及び 3 µmol/L）並びに陽性対照であるベラプロストナトリウム（0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1 及び 3 µmol/L）及びリマプロスト（0.001、0.003、0.01、0.03、0.1 及び 0.3 µmol/L）の阻害作用を検討した。結果は、非線形回帰により IC_{50} を推定し、Ki を算出した。

（2） 成績（2.6.3.2.1.2 項参照）

ヒト組換え型 IP 受容体への[^{3}H]iloprost 結合の Kd は 4.07 ± 0.12 nmol/L（平均値±標準誤差、n=3）であった。セレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム及びリマプロストは、いずれも[^{3}H]iloprost 結合を濃度依存的に抑制し（図 2.6.2.2.1-2）、その Ki はそれぞれ 263.0 ± 24.3、19.8 ± 0.6、39.0 ± 6.1 及び 10.4 ± 1.6 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1-1）。MRE-269 とセレキシパグの最大反応はいずれもほぼ 100%に達しており、同程度の効果を示した。効力については、MRE-269 の方がセレキシパグより約 13 倍高かった。

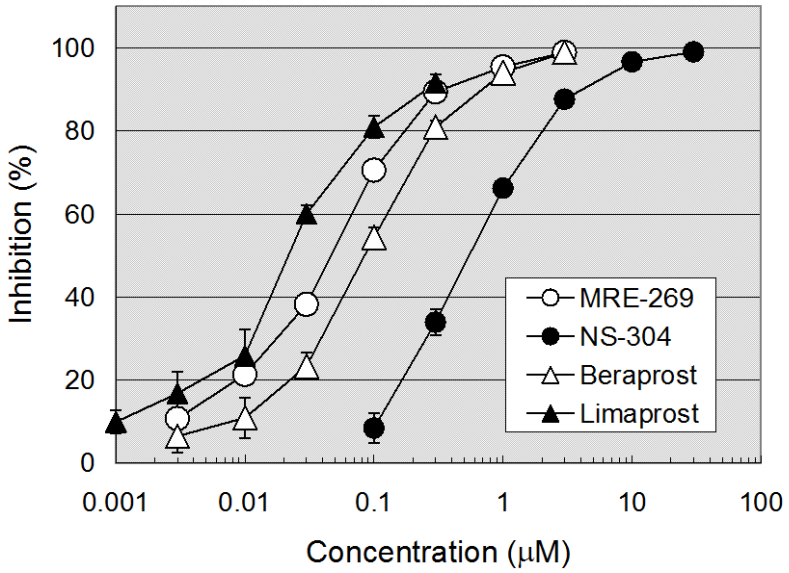


図 2.6.2.2.1-2 ヒト組換え型IP受容体への[^{3}H]iloprost結合に対するセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム及びリマプロストの抑制作用

各点は、セレキシパグ（NS-304、●）、MRE-269（○）、ベラプロストナトリウム（△）及びリマプロスト（▲）の結合阻害率を平均値±標準誤差（n=3）で表す。

［4.2.1.1-2 p.12 Fig.1 を引用］

表 2.6.2.2.1-1 ラット及びヒト組換え型IP受容体結合に対するセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム及びリマプロストの結合親和性

	結合親和性（Ki、nmol/L）[a]	
	ラット	ヒト
セレキシパグ	4098.4 ± 566.7	263.0 ± 24.3
MRE-269	394.3 ± 13.0	19.8 ± 0.6
ベラプロストナトリウム	40.4 ± 8.9	39.0 ± 6.1
リマプロスト	－	10.4 ± 1.6

a：平均値±標準誤差（n=3）、－：実施せず

2.6.2.2.1.3 ヒトIP受容体発現CHO細胞のcAMP生成量に対するセレキシパグ及びMRE-269の影響（試験番号N304-100618、資料番号 4.2.1.1-3、評価資料）

ヒト IP 受容体は Gs 型の G タンパクと共役する G タンパク共役型受容体（GPCR）であるため、IP 受容体を介した反応として cAMP 生成量に対するセレキシパグ及び MRE-269 の影響を検討した。

（1） 方法

ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞を用い、ホスホジエステラーゼ阻害薬である 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）存在下でセレキシパグ（3、10、30、100、300、1000、3000 及び 10000 nmol/L）、MRE-269（0.3、1、3、10、30、100、300 及び 1000 nmol/L）並びに陽

性対照であるベラプロストナトリウム（0.3、1、3、10、30、100、300 及び 1000 nmol/L）を添加し、37℃、15 分間反応させた。細胞中の cAMP 量を酵素免疫法で測定し、非線形回帰により EC_{50} とその 95%信頼区間を推定した。

（2） 成績（2.6.3.2.1.3（1）項参照）

セレキシパグ、MRE-269 及びベラプロストナトリウムは、いずれもヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞中の cAMP 生成量を濃度依存的に増加させ（図 2.6.2.2.1-3）、その EC_{50} はそれぞれ 76.7（95%信頼区間：63.7～89.7）、4.98（95%信頼区間：3.69～6.26）及び 5.84（95%信頼区間：3.99～7.70） nmol/L であった。セレキシパグと MRE-269 はいずれもベラプロストナトリウムと同程度の最大反応を示した。効力については、MRE-269 の方がセレキシパグより約 15 倍高かった。

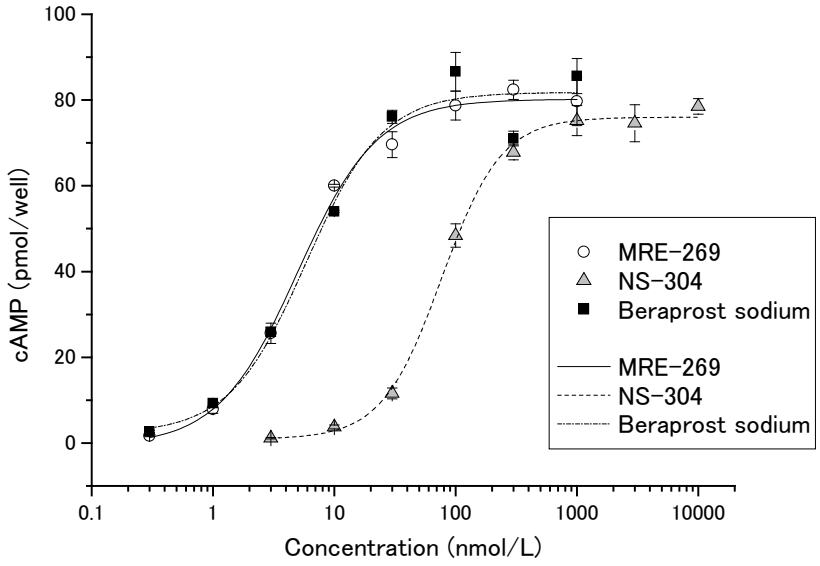


図 2.6.2.2.1-3 ヒト組換え型IP受容体発現CHO細胞のcAMP生成量に対するセレキシパグ、MRE-269 及びベラプロストナトリウムの影響

各点は、セレキシパグ（NS-304、▲）、MRE-269（○）及びベラプロストナトリウム（■）で刺激したときの cAMP 量を平均値±標準誤差（n=3）で表す。

［4.2.1.1-3 p.11 Fig.1 を引用］

2.6.2.2.1.4 ヒトIP受容体発現CHO細胞におけるcAMP生成量、β-アレスチン及び細胞内移行に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響（試験番号B-11.413、資料番号 4.2.1.1-4、評価資料）

β-アレスチンは、リガンドで活性化された GPCR と結合することで GPCR の細胞内移行を促進して脱感作を促すアダプタータンパク質である [1)]。この β-アレスチンの IP 受容体への動員及び IP 受容体の細胞内移行について検討した。

（1） 方法

ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞を用い、IBMX 存在下でセレキシパグ（0.32、1.6、8、40、200 及び 1000 nmol/L）、MRE-269 並びに陽性対照であるベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストを添加し、30 分間反応させた。セレキシパグ以外は 0.0064、0.032、0.16、0.8、4、20 及び 100 nmol/L の濃度で検討した。細胞中の cAMP 量を酵素免疫法で測定し、EC_{50} を算出した。また、各試験物質の最大反応を、イロプロストの最大反応に対する百分率で表した。

β-アレスチンの動員を検討する実験では、GPCR との結合を検出可能な β-アレスチンを導入したヒト組換え型 IP 受容体安定発現 CHO 細胞に上述の 5 種類の試験物質（0.51、1.5、4.6、14、41、123、370、1111、3333 及び 10000 nmol/L）を添加し、37℃で 90 分間反応させた。β-アレスチンの IP 受容体への動員を測定し、EC_{50} を算出した。また、各試験物質の最大反応を、イロプロストの最大反応に対する百分率で表した。

IP 受容体の細胞内移行を検討する実験では、ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞に上述の 5 種類の試験物質をそれぞれ 100、1000 及び 10000 nmol/L の濃度で添加し、20 時間反応させた。その後、IP 受容体は抗ヒト IP 受容体抗体を用いて緑色の蛍光を観察した。細胞核はヘキスト 33342 で染色し、青色の蛍光を検出した。

（2） 成績（2.6.3.2.1.3（2）項参照）

セレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストは、cAMP 生成量を増加させた（図 2.6.2.2.1-4A、表 2.6.2.2.1-2）。セレキシパグ及び MRE-269 の効果は最大反応に達しており、イロプロストと同程度であった。その EC_{50}（幾何平均値±標準偏差）はそれぞれ 36 ± 1.4 及び 1.1 ± 1.2 nmol/L であり、効力は MRE-269 の方がセレキシパグより約 33 倍高かった。

次に、β-アレスチンの IP 受容体への動員を検討した（図 2.6.2.2.1-4B）。イロプロストの最大反応を 100%とするとベラプロストナトリウム及びトレプロスチニルの最大反応（算術平均値±標準偏差）は 90 ± 2 及び 67 ± 10%だったのに対し、セレキシパグ及び MRE-269 の最大反応は 24 ± 6 及び 40 ± 6%であった（表 2.6.2.2.1-2）。

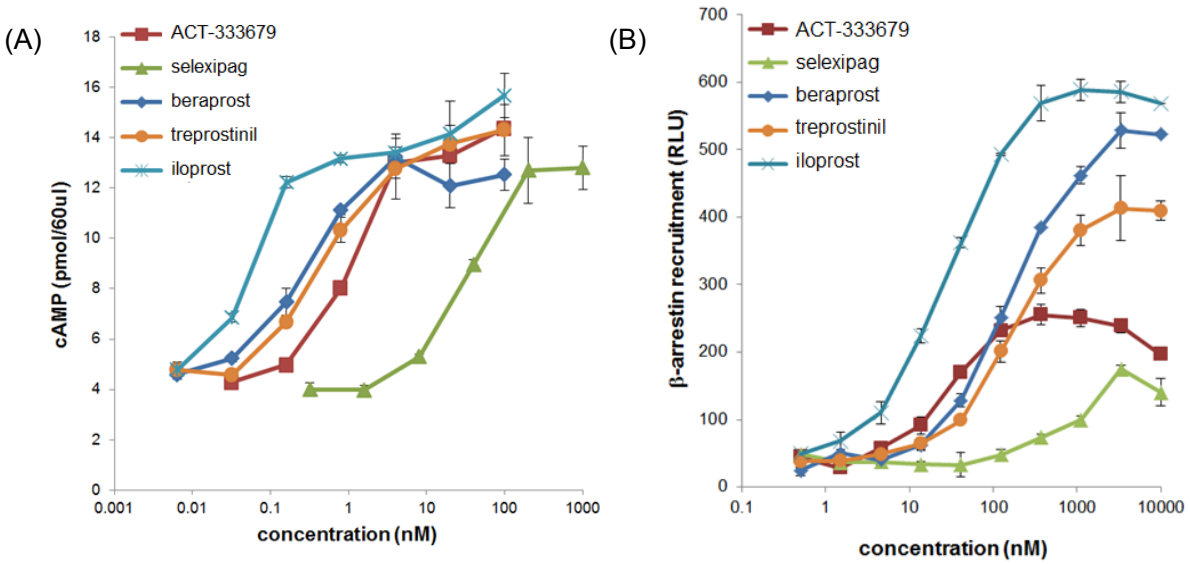


図 2.6.2.2.1-4 ヒト組換え型IP受容体発現CHO細胞のcAMP生成量（A）及びβ-アレスチンの動員（B）に対するセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストの影響

各点は、セレキシパグ（▲）、MRE-269（ACT-333679、■）、ベラプロストナトリウム（◆）、トレプロスチニル（●）及びイロプロスト（＊）で刺激したときの cAMP 量（A）及び β-アレスチンの動員（B）を表す。

［4.2.1.1-4 p.7 Fig.1B 及び p.9 Fig.2B を引用］

表 2.6.2.2.1-2 ヒト組換え型IP受容体発現CHO細胞におけるcAMP生成量、β-アレスチンの動員及びヒト組換え型IP受容体の細胞内移行

	cAMP（n=3）		β-アレスチン（n=6）		細胞内移行
	EC_{50} [a]（nmol/L）	最大反応 [b]（%）	EC_{50} [a]（nmol/L）	最大反応 [b]（%）	最小有効濃度（nmol/L）
セレキシパグ	36 ± 1.4	106 ± 26	794 ± 1.4	24 ± 6	na
MRE-269	1.1 ± 1.2	110 ± 14	51 ± 1.8	40 ± 6	na
ベラプロストナトリウム	0.23 ± 1.2	93 ± 9	212 ± 1.6	90 ± 2	1000
トレプロスチニル	0.57 ± 1.3	103 ± 5	186 ± 1.4	67 ± 10	1000
イロプロスト	0.068 ± 1.4	100 ± 0	35 ± 1.7	100 ± 0	100

a：幾何平均値±標準偏差、b：イロプロストの最大反応に対する百分率の算術平均値±標準偏差、
na：処置濃度（100、1000 及び 10000 nmol/L）では十分な細胞内移行が観察されなかった。

［4.2.1.1-4 p.11 Table1 を引用］

さらに、IP 受容体の細胞内移行を検討したところ、セレキシパグ及び MRE-269 はいずれの処置濃度においても IP 受容体の顕著な細胞内移行が観察されなかった。一方、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストでは、処置濃度が高くなるにつれて IP 受容体の細胞内移行が観察された（図 2.6.2.2.1-5）。

以上のことから、セレキシパグ及び MRE-269 の IP 受容体に対する作用は脱感作を生じにくいと考えられた。

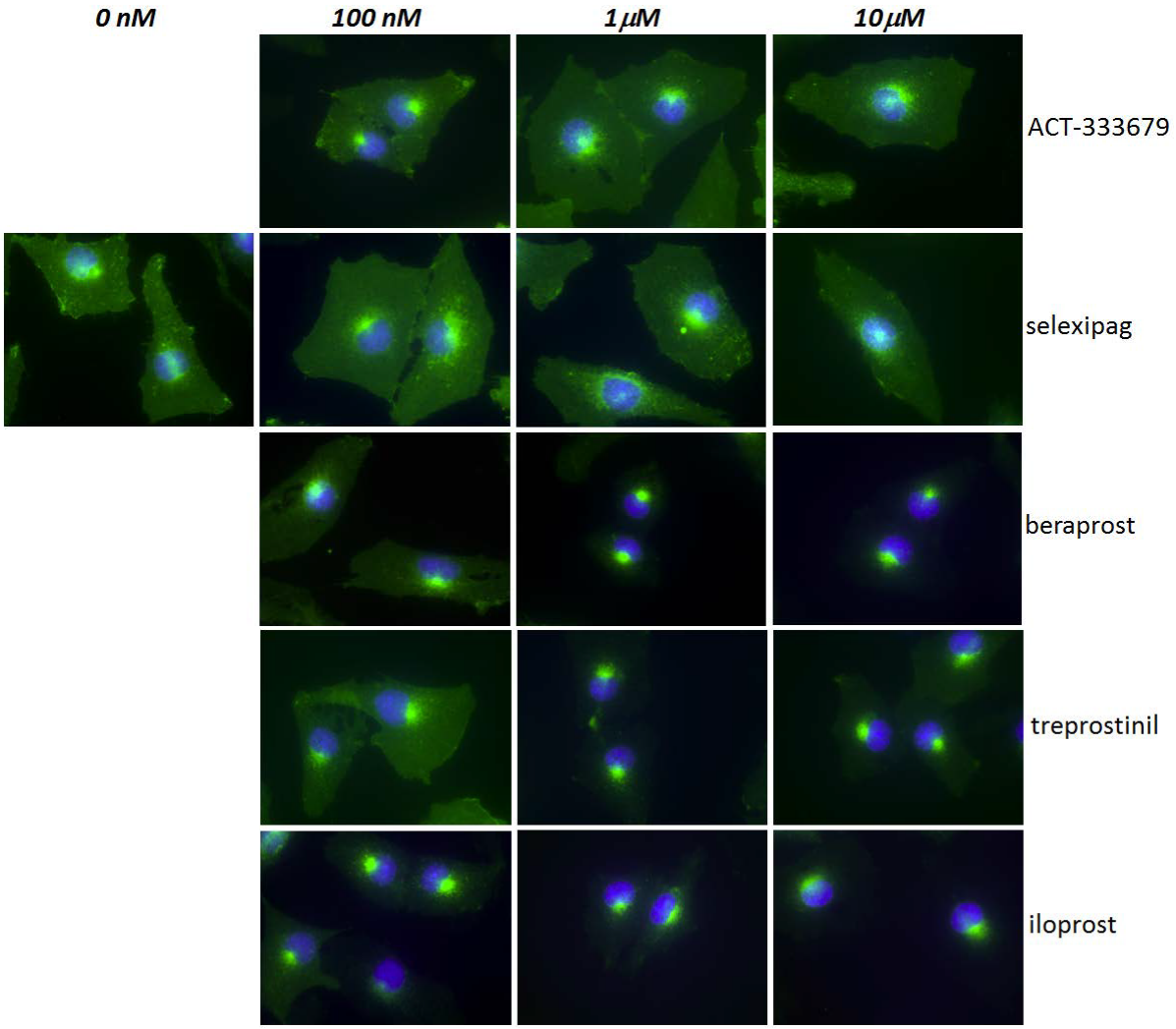


図 2.6.2.2.1-5 ヒト組換え型IP受容体発現CHO細胞のIP受容体の細胞内移行に対するセレキシパグ、MRE-269（ACT-333679）、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストの影響

蛍光顕微鏡下で観察し、緑色は抗ヒト IP 受容体抗体、青色はヘキスト 33342 を表す。

［4.2.1.1-4 p.10 Fig.3 を引用］

2.6.2.2.1.5 ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞の細胞形態の変化に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響（試験番号B-14.046、資料番号 4.2.1.1-5、評価資料）

ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞における IP 受容体を介した反応として、インピーダンス法で細胞形態の変化を検討した。さらに、cAMP はプロテインキナーゼ A を活性化してミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化を促し、アクトミオシンの収縮力を低下させるため、ミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化を検討した。

（1） 方法

ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞をセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストで刺激したときの細胞形態の変化をインピーダンス法で測定し、EC_{50} を求めた。セレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム及びトレプロスチニルは 1、

10、100 及び 1000 nmol/L で、イロプロストは 0.1、1、10、100 及び 1000 nmol/L の濃度で検討した。

さらに、0.1、1、10 及び 100 nmol/L の MRE-269、トレプロスチニル及びイロプロストで刺激した 90 分後のヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞におけるミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化反応を、抗リン酸化ミオシン軽鎖キナーゼ抗体を用いて検討した。

（2） 成績（2.6.3.2.1.3（3）項参照）

ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞をセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストで刺激したところ、インピーダンスはいずれも同程度に低下した（図 2.6.2.2.1-6）。その EC_{50}（幾何平均値±標準偏差、n=3）はそれぞれ 157 ± 1.3、4.3 ± 1.2、2.1 ± 1.1、3.6 ± 1.1 及び 0.12 ± 1.1 nmol/L であり、MRE-269 はセレキシパグより約 37 倍高い効力を示した。

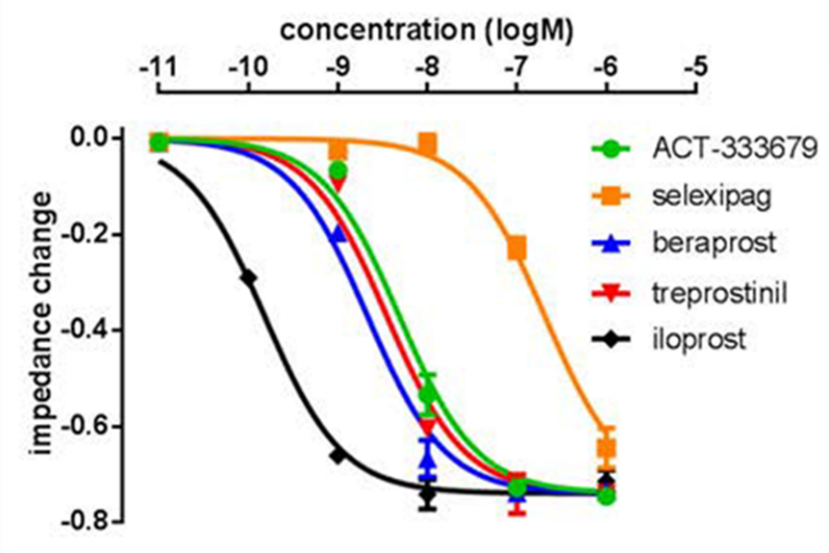


図 2.6.2.2.1-6 ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞のインピーダンスに対するセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、トレプロスチニル及びイロプロストの影響

図は、細胞をセレキシパグ（■）、MRE-269（ACT-333679、●）、ベラプロストナトリウム（▲）、トレプロスチニル（▼）及びイロプロスト（◆）で刺激したときの結果を示す。

［4.2.1.1-5 p.9 Fig.2 を改変］

インピーダンス法での解析において、インピーダンスの低下は Gs 型の G タンパクと共役する GPCR を活性化することで認められる現象であり [2)]、cAMP 生成量の増加との関連が考えられた。そこで、MRE-269、トレプロスチニル及びイロプロストを用いてミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化を検討したところ、いずれも処置濃度の増加に伴ってリン酸化型ミオシン軽鎖キナーゼが増加した（図 2.6.2.2.1-7）。

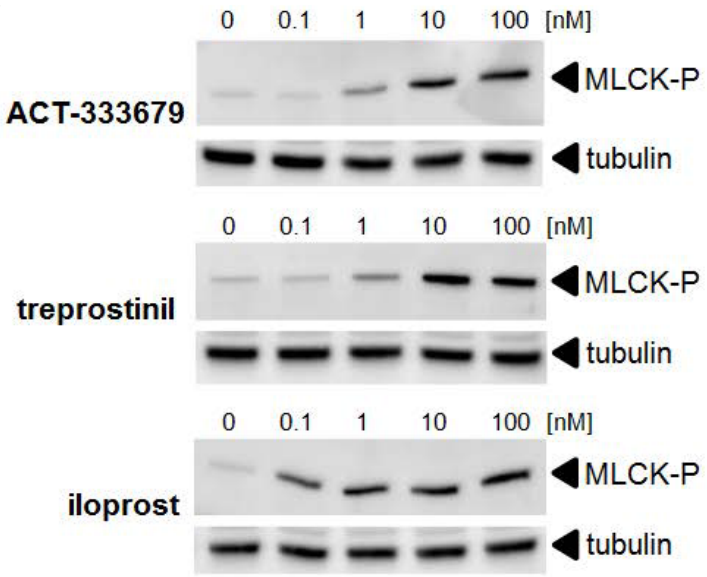


図 2.6.2.2.1-7 ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞のミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化に対する MRE-269（ACT-333679）、トレプロスチニル及びイロプロストの影響

MLCK-P：リン酸化ミオシン軽鎖キナーゼ
マウス抗リン酸化ミオシン軽鎖キナーゼモノクロナル抗体及びウサギ抗 α/β-チュブリン抗体を用いたイムノブロット

［4.2.1.1-5 p.12 Fig.4A を引用］

2.6.2.2.1.6 小括

プロスタノイド構造を有するベラプロストナトリウムの IP 受容体に対する結合親和性がラットとヒトで同程度であったのに対し、非プロスタノイド構造であるセレキシパグ及び MRE-269 はラット IP 受容体に比べてヒト IP 受容体に 10 倍以上高い結合親和性を示した。ヒトとげっ歯類とでは IP 受容体のアミノ酸配列の相同性が高くないため[3,4]、このことが非プロスタノイド構造の化合物では種差を生じる要因となった可能性が考えられた。

セレキシパグ及び MRE-269 の IP 受容体を刺激することによるアゴニスト活性は、cAMP 生成量やインピーダンス法による細胞形態の変化を指標とした検討において、プロスタノイド構造を有するイロプロストと同程度の最大反応を示した。MRE-269 は、ヒト組換え型 IP 受容体を用いた検討において受容体結合能で約 13 倍、cAMP 生成量で約 15～33 倍、またヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞を用いたインピーダンス法による解析で約 37 倍、セレキシパグより高い効力を示した。さらに、IP 受容体を介した cAMP 生成量の増加が肺動脈平滑筋細胞でのアクトミオシンの弛緩につながると考えられた。

このように、セレキシパグ及び MRE-269 はヒト IP 受容体に選択的な作動薬としての特徴を示した。その一方で、プロスタノイド構造の IP 受容体作動薬は IP 受容体の脱感作につながる β-アレスチンの動員や IP 受容体の細胞内移行を誘導するのに対し、セレキシパグ及び MRE-269 はそのような誘導を起こしにくい作動薬であることが示唆された。

2.6.2.2.2 プロスタノイド受容体に対する作用

2.6.2.2.2.1 ヒトプロスタノイド受容体サブタイプの受容体結合に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響（試験番号PH-304-003、資料番号 4.2.1.1-6、評価資料）

ヒトプロスタノイド受容体のサブタイプである IP 受容体に加え、DP 受容体、EP 受容体（EP_1～EP_4）、FP 受容体及び TP 受容体結合に対するセレキシパグ及び MRE-269 の影響を検討した。

（1） 方法

ヒト組換え型 IP、DP、EP_1、EP_2、EP_3、EP_4、FP 及び TP 受容体をそれぞれ発現させた市販の細胞膜標品を用い、各受容体サブタイプの結合実験での 1 μmol/L セレキシパグ及び MRE-269 存在下での阻害率を求めた。それぞれの受容体サブタイプの結合実験における反応条件と陽性対照物質を表 2.6.2.2.2-1 に示す。

表 2.6.2.2.2-1 各プロスタノイド受容体サブタイプの結合実験条件

プロスタノイド受容体サブタイプ [a]	反応			陽性対照
	放射性リガンド	非特異的結合	温度，時間	
IP	15 nmol/L [^{3}H]iloprost	150 μmol/L iloprost	37℃, 1 hr	1 μmol/L iloprost
DP	10 nmol/L [^{3}H]PGD_2	150 μmol/L PGD_2	25℃, 2 hr	1 μmol/L PGD_2
EP_1	10 nmol/L [^{3}H]PGE_2	150 μmol/L PGE_2	25℃, 1 hr	1 μmol/L PGE_2
EP_2	10 nmol/L [^{3}H]PGE_2	150 μmol/L PGE_2	25℃, 1 hr	1 μmol/L PGE_2
EP_3	5 nmol/L [^{3}H]PGE_2	150 μmol/L PGE_2	37℃, 1 hr	1 μmol/L PGE_2
EP_4	5 nmol/L [^{3}H]PGE_2	150 μmol/L PGE_2	37℃, 1 hr	1 μmol/L PGE_2
FP	10 nmol/L [^{3}H]$PGF_{2\alpha}$	150 μmol/L $PGF_{2\alpha}$	27℃, 1 hr	1 μmol/L $PGF_{2\alpha}$
TP	15 nmol/L [^{3}H]SQ29,548	150 μmol/L ICI192605	37℃, 1 hr	10 μmol/L ICI192605

a：試験材料は市販の各受容体サブタイプ発現細胞膜標品

（2） 成績（2.6.3.2.2.1 項参照）

ヒト組換え型 IP 受容体に対し、セレキシパグ及び MRE-269 の結合阻害率は 59%及び 85%であった。ヒト組換え型 DP、EP_1、EP_2、EP_3、EP_4、FP 及び TP 受容体結合に対しては、1 μmol/L のセレキシパグ及び MRE-269 による影響は認められなかった。

2.6.2.2.2.2 ヒト、ラット及びイヌのIP、EP_2及びEP_4受容体に対するセレキシパグ及びMRE-269の影響（試験番号B-13.096、資料番号 4.2.1.1-7、評価資料）

IP、EP_2及びEP_4受容体は、いずれもGs型のGタンパクと共役するGPCRであり、ヒト、ラット及びイヌの組換え型受容体に対する作用をcAMP生成量を指標に検討した。

（1） 方法

ヒト、ラット及びイヌの組換え型IP、EP_2及びEP_4受容体を安定発現したヒト胎児由来腎臓（HEK）293細胞に、IBMX存在下でセレキシパグ及びMRE-269を添加し、30分間反応させた。両被験物質ともIP受容体へは1、10、100、1000及び10000 nmol/L、EP_2及びEP_4受容体へは20、80、400、2000及び10000 nmol/Lの濃度で検討した。また、IP受容体ではイロプロスト（0.01、0.1、1、10及び100 nmol/L）、EP_2受容体ではPGE_2（1、10、100、1000及び10000 nmol/L）及びEP_4受容体ではPGE_2（0.001、0.01、0.1、1及び10 nmol/L）を陽性対照として用いた。細胞中のcAMP量を酵素免疫法で測定し、イロプロスト又はPGE_2の最大反応を基にEC_{50}を算出した。

（2） 成績（2.6.3.2.2.2 項参照）

ヒト、ラット及びイヌのそれぞれの組換え型IP、EP_2及びEP_4受容体を介したcAMP生成量に対するセレキシパグ及びMRE-269の影響を検討した結果を図2.6.2.2.2-1に、cAMP生成量増加のEC_{50}を表2.6.2.2.2-2に示す。

セレキシパグ及びMRE-269は、ヒト、ラット及びイヌにおいてIP受容体を介したcAMP生成量の増加作用を示した。セレキシパグのIP受容体に対するEC_{50}（幾何平均値±標準偏差、n=2～3）はヒト、ラット及びイヌの順で、それぞれ250 ± 1.2、7200 ± 1.4及び19000 ± 1.9 nmol/Lであった。MRE-269のEC_{50}も同様の順であり、それぞれ6.1 ± 1.1、110 ± 1.2及び500 ± 1.1 nmol/Lであった。なお、イロプロストによるcAMP生成量増加作用は、ヒト、ラット及びイヌの間で大きな違いは認められなかった。

EP_2受容体を介したcAMP生成量に対し、セレキシパグの影響は認められなかった。MRE-269は高濃度を要するもののcAMP生成量を増加させ、ヒトでのEC_{50}は8700 ± 1.1 nmol/Lであった。

EP_4受容体を介したcAMP生成量に対し、セレキシパグの影響は認められなかった。MRE-269はラット及びヒトでは作用せず、イヌのcAMP生成量を増加させた。そのEC_{50}は660 ± 1.3 nmol/Lであり、MRE-269のイヌIP受容体に対するEC_{50}（500 ± 1.1 nmol/L）と同程度であった。なお、EP受容体の内因性リガンドであるPGE_2はEP_2受容体に対しては動物種による違いは認められなかったが、EP_4受容体に対する効力がラットとヒトに比べてイヌで低かった。

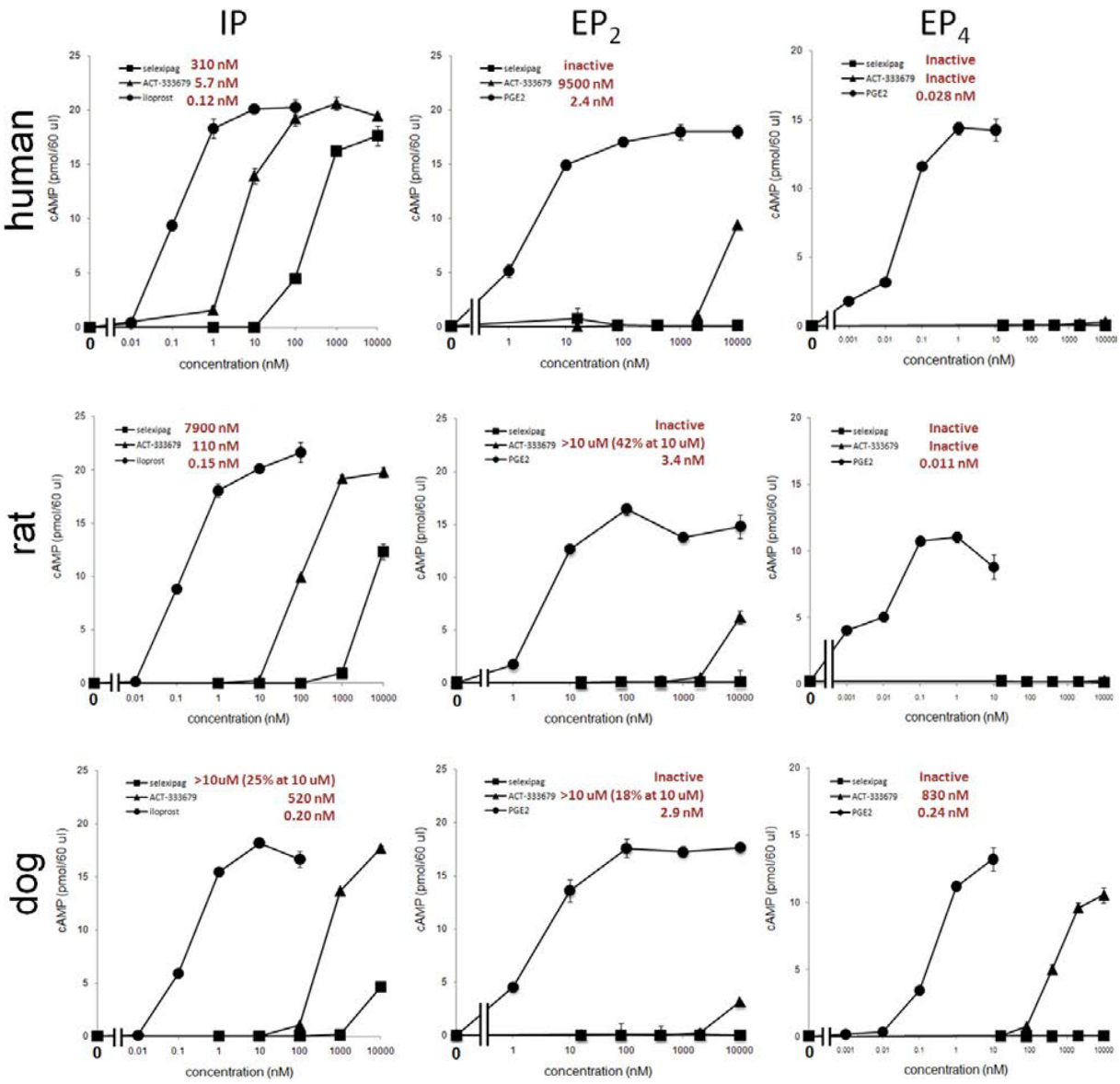


図 2.6.2.2.2-1 組換え型IP、EP_2及びEP_4受容体発現HEK293 細胞のcAMP生成量に対するセレキシパグ、MRE-269、イロプロスト及びPGE_2の影響

セレキシパグ（■）、MRE-269（ACT-333679、▲）、イロプロスト又は PGE_2（●）

［4.2.1.1-7 p.11 Fig.1 を引用］

表 2.6.2.2.2-2 組換え型IP、EP_2及びEP_4受容体発現HEK293 細胞のcAMP生成量に対するセレキシパグ、MRE-269、イロプロスト及びPGE_2の影響

		EC_{50}[a]（nmol/L）		
		ヒト	ラット	イヌ
IP 受容体	セレキシパグ	250 ± 1.2	7200 ± 1.4	19000 ± 1.9
	MRE-269	6.1 ± 1.1	110 ± 1.2	500 ± 1.1
	イロプロスト	0.13 ± 1.1	0.17 ± 1.3	0.18 ± 1.1
EP_2 受容体	セレキシパグ	－	－	－
	MRE-269	8700 ± 1.1	11000 ± 1.2	31000 ± 1.0
	PGE_2	2.6 ± 1.3	4.4 ± 1.4	4.9 ± 1.7
EP_4 受容体	セレキシパグ	－	－	－
	MRE-269	－	－	660 ± 1.3
	PGE_2	0.051 ± 2.4	0.021 ± 2.4	0.24 ± 1.1

a：幾何平均値±標準偏差（n=2～3）、－：50 µmol/L で作用なし

［4.2.1.1-7 p.12 Table2, p.14 Table3 を改変］

2.6.2.2.2.3 小括

セレキシパグ及び MRE-269 はヒトのプロスタノイド受容体に対し、IP 受容体以外のサブタイプには 1 µmol/L で結合活性を示さなかった。ヒトにおけるセレキシパグ及び MRE-269 の血漿中濃度は 1 µmol/L より低いため（2.6.2.6 項参照）、薬効用量では他のプロスタノイド受容体サブタイプへの影響はほとんどないと考えられ、IP 受容体に選択的な作動薬であることが示唆された。一方、イヌに高用量のセレキシパグを投与した場合では、MRE-269 が IP 受容体に加えて EP_4 受容体を介した作用も発現する可能性が考えられた。

2.6.2.2.3 摘出平滑筋標本に対する作用

2.6.2.2.3.1 ラット摘出肺葉内動脈標本を用いたセレキシパグ及びMRE-269 の弛緩作用（試験番号N304-110209、資料番号 4.2.1.1-8、評価資料）

（1） 方法

SD 系雄性ラットから調製した左肺葉内動脈の内皮を除去して輪状にした標本を 10 µmol/L $PGF_{2\alpha}$ で収縮させ、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 及び 30 µmol/L の濃度でセレキシパグ及び MRE-269 の弛緩作用を検討した。その際、セレキシパグはエステラーゼ阻害薬である 100 µmol/L ジイソプロピルフルオロリン酸存在下で処置した。

最大反応は 100 µmol/L パパベリン塩酸塩での弛緩とし、これを基にセレキシパグ及び MRE-269 の弛緩率（%）を求めた。

（2） 成績（2.6.3.2.3.1 項参照）

セレキシパグ及び MRE-269 は、いずれも $PGF_{2\alpha}$ による収縮反応を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2.2.3-1）。その IC_{50} はそれぞれ 11（95%信頼区間：10～12）及び 2.7（95%信頼区間：2.4～3.1）µmol/L であり、MRE-269 はセレキシパグより約 4 倍強い弛緩作用を示した。

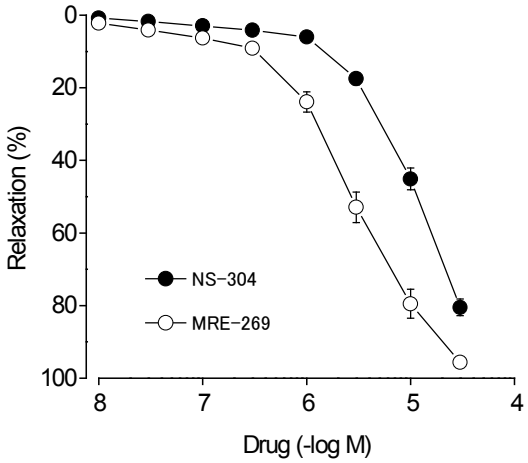


図 2.6.2.2.3-1 ラット摘出肺葉内動脈標本のPGF$_{2\alpha}$刺激誘発収縮に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響

セレキシパグ（NS-304、●）及び MRE-269（○）の弛緩率（%）を平均値±標準誤差（n=7）で表す。

［4.2.1.1-8 p.10 Fig.1 を引用］

2.6.2.2.3.2 ラット摘出肺動脈標本のPGF$_{2\alpha}$刺激誘発収縮に対するMRE-269、ベラプロストナトリウム、イロプロスト、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルの影響（試験番号P-09-057, P-09-056, P-09-058, P-09-059, P-09-060、資料番号 4.2.1.1-9, 4.2.1.1-10, 4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12, 4.2.1.1-13、参考資料）

ラット肺葉外動脈及び肺葉内動脈を用い、MRE-269、ベラプロストナトリウム、イロプロスト、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルの弛緩作用を検討した。

（1） 方法

SD 系雄性ラットから肺葉外動脈及び肺葉内動脈を摘出し、内皮を除去した標本と内皮を残した標本を調製した。これらの輪状標本を 10 μmol/L PGF$_{2\alpha}$ で収縮させ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、イロプロスト、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルを処置した。MRE-269、ベラプロストナトリウム、イロプロスト及びトレプロスチニルは 0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 及び 30 μmol/L で、エポプロステノールナトリウムは 0.01、0.1、1 及び 10 μmol/L の濃度で検討した。なお、摘出標本の調製法の違いによりパパベリン塩酸塩の弛緩反応が異なるため、補正した上で各試験物質の弛緩率（%）を求めた。

また、MRE-269、ベラプロストナトリウム、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルを処置する試験では、内皮を残した標本を用いて一酸化窒素合成酵素の阻害薬である NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩（L-NAME）を 10 又は 100 μmol/L の濃度で併用したときの影響も検討した。

（2） 成績（2.6.3.2.3.2 項参照）

MRE-269 は、内皮を残した肺葉外動脈及び肺葉内動脈の収縮反応をいずれも濃度依存的に抑制し、肺葉外動脈と肺葉内動脈との間に MRE-269 の弛緩反応に違いは認められなかった（図

2.6.2.2.3-2）。また、肺葉外動脈及び肺葉内動脈の内皮除去標本でも同様であり、その最大弛緩はそれぞれ 96.3%（95%信頼区間：91.2%～101.3%）及び 100.1%（95%信頼区間：89.9%～111.4%）であった。さらに、内皮を残した標本では L-NAME 処置の影響はなく、MRE-269 の弛緩反応に内皮依存性は認められなかった。

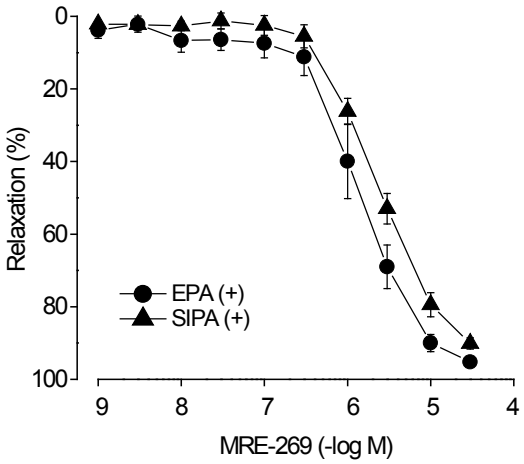


図 2.6.2.2.3-2 ラット摘出肺葉外動脈及び肺葉内動脈の$PGF_{2\alpha}$刺激誘発収縮に対する MRE-269 の影響

EPA（+）：内皮を残した肺葉外動脈、SIPA（+）：内皮を残した肺葉内動脈
各点は弛緩率（%）の平均値±標準誤差（n=7～8）を表す。
EPA（+）と SIPA（+）に有意な差はなかった（反復測定分散分析）

［4.2.1.1-9 p.12 Fig.1C を引用］

次に、プロスタノイド構造を有するベラプロストナトリウム、イロプロスト、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルの肺葉外動脈及び肺葉内動脈標本における弛緩反応を図 2.6.2.2.3-3 に示す。

内皮を残した肺葉外動脈標本に対し、ベラプロストナトリウム、イロプロスト及びトレプロスチニルは濃度依存的に弛緩し、その最大反応は約 80%であった。エポプロステノールナトリウムは 1 μmol/L での 58.8 ± 8.5%が最大の弛緩率であり、より高濃度では弛緩率は減少に転じた。ベラプロストナトリウム、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルによる弛緩反応は、内皮除去及び L-NAME 処置のいずれにおいても減弱したが、イロプロストの弛緩反応は内皮除去の影響を受けなかった。

内皮を残した肺葉内動脈標本に対するベラプロストナトリウム、イロプロスト、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルの弛緩作用の程度は、いずれも肺葉外動脈標本に対する作用より低かった。肺葉内動脈の内皮除去標本での最大弛緩は、それぞれ 30.5%（95%信頼区間：27.3%～33.6%）、74.1%（95%信頼区間：68.3%～78.0%）、15.0 ± 0.8%（弛緩作用が最も強い 1 μmol/L での弛緩率）及び 51.0%（95%信頼区間：39.9%～62.0%）であり、ベラプロストナトリウム、イロプロスト及びトレプロスチニルの弛緩作用は、内皮除去の影響を受けなかった。

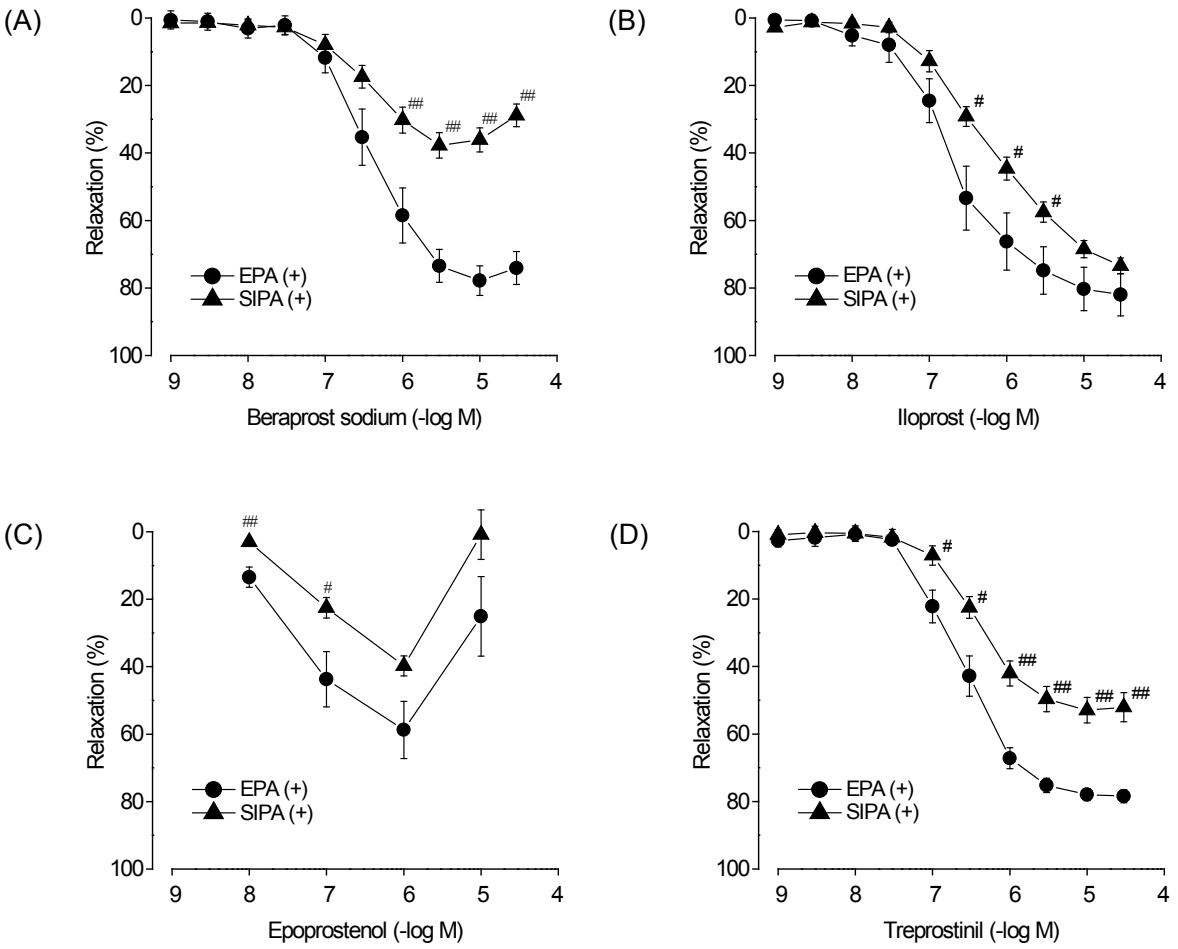


図 2.6.2.2.3-3 ラット摘出肺葉外動脈及び肺葉内動脈の$PGF_{2\alpha}$刺激誘発収縮に対するベラプロストナトリウム(A)、イロプロスト(B)、エポプロステノールナトリウム(C)及びトレプロスチニル(D)の影響

EPA（+）：内皮を残した肺葉外動脈、SIPA（+）：内皮を残した肺葉内動脈
各点は弛緩率（%）の平均値±標準誤差を表す（A：n=7～9、B：n=6～7、C：n=6～7、D：n=7～9）。
$^{\#}P<0.05$、$^{\#\#}P<0.01$（反復測定分散分析後 Student's t-test、vs EPA(+)）

［4.2.1.1-10、4.2.1.1-11、4.2.1.1-12 及び 4.2.1.1-13 のいずれも p.11 Fig.1C を引用］

2.6.2.2.3.3 ラット摘出胃底部標本に対するセレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、イロプロスト及びトレプロスチニルの影響（試験番号B-09.363、資料番号4.2.1.1-14、評価資料）

ラット摘出胃底部標本にはプロスタノイド受容体サブタイプのうち、EP_1、EP_3 及び IP 受容体が発現していることから、セレキシパグ、MRE-269、ベラプロストナトリウム、イロプロスト及びトレプロスチニルの影響を検討した。

（1） 方法

Wistar 系雄性ラットから摘出した胃底部標本を用い、セレキシパグ（0.01、0.1、1、10 及び 100 μmol/L）、MRE-269（0.01、0.1、1、10 及び 100 μmol/L）、ベラプロストナトリウム（0.001、0.01、0.1、1、10 及び 100 μmol/L）、イロプロスト（0.001、0.01、0.1、1 及び 10 μmol/L）及びトレプロ

スチニル（0.001、0.01、0.1、1、10 及び 100 μmol/L、あるいは 0.01、0.1、1、10 及び 100 μmol/L）を処置した。試験物質の反応はコリン作動薬である 10 μmol/L カルバコールによる最大収縮を 100%とした収縮率（%）で表した。

また、試験物質と IP 受容体拮抗薬である CAY10441 又は EP_3 受容体拮抗薬である（2E）-3-（3',4'-dichlorobiphenyl-2-yl）-N-（2-thienylsulfonyl）acrylamide（DBTSA）を併用し、試験物質の反応に関与する受容体を検討した。

（2） 成績（2.6.3.2.3.3 項参照）

セレキシパグと MRE-269 は胃底部標本に対して弱い弛緩反応を示し、収縮反応は認められなかった。セレキシパグによる弛緩は CAY10441 で抑制されたが、MRE-269 は弛緩作用が弱く、CAY10441 の効果は明らかではなかった（図 2.6.2.2.3-4）。

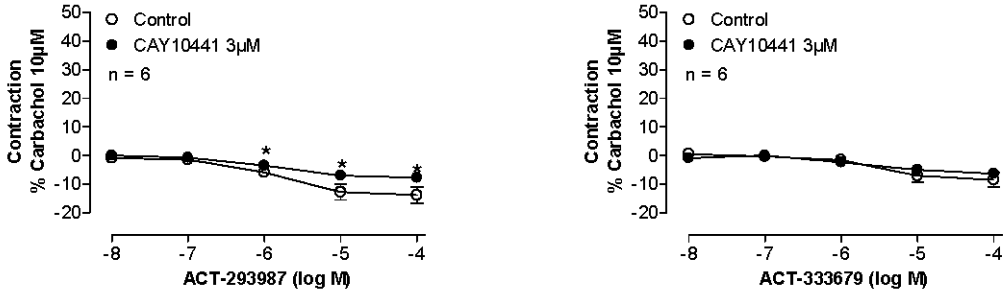


図 2.6.2.2.3-4 ラット摘出胃底部標本に対するセレキシパグ（ACT-293987）及び MRE-269（ACT-333679）の影響

各点は平均値±標準誤差を表す。*P<0.05（paired t-test、vs control）

［4.2.1.1-14 p.16 Fig.3 を引用］

一方、イロプロスト、ベラプロストナトリウム及びトレプロスチニルは胃底部標本に対して収縮作用を示した。この収縮作用は CAY10441 の影響を受けず、DBTSA によって抑制された（図 2.6.2.2.3-5）。

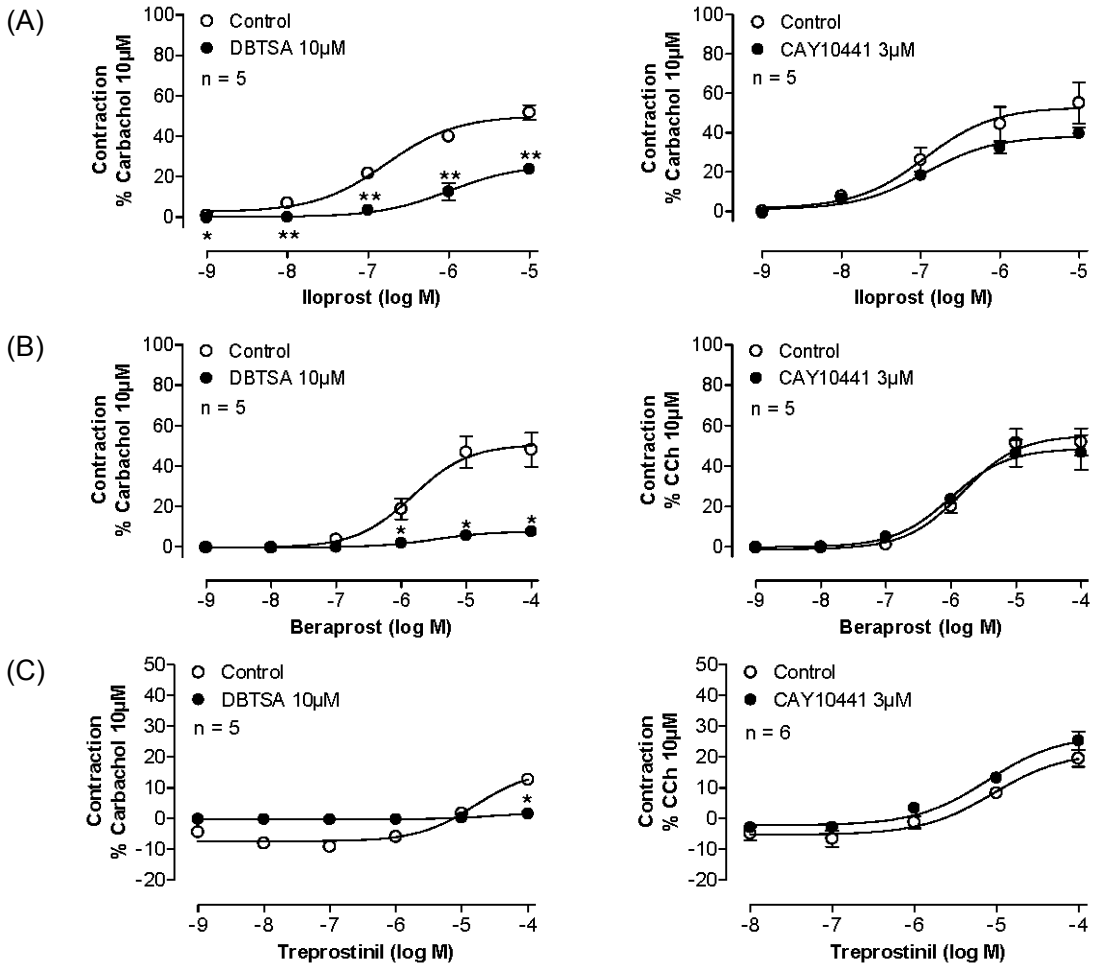


図 2.6.2.2.3-5 ラット摘出胃底部標本に対するイロプロスト(A)、ベラプロストナトリウム(B)及びトレプロスチニル(C)の影響

各点は平均値±標準誤差を表す。*P<0.05、**P<0.01（paired t-test、vs control）

［4.2.1.1-14 p.17-18 Fig.4、5 及び 6 を引用］

2.6.2.2.3.4 小括

肺動脈性肺高血圧症に対する治療においては肺葉内動脈を弛緩させることが重要であり、セレキシパグ及び MRE-269 は濃度依存的に肺葉内動脈弛緩作用を示した。それに対し、ベラプロストナトリウム、イロプロスト、エポプロステノールナトリウム及びトレプロスチニルの肺葉内肺動脈に対する弛緩作用は最大反応に到達しなかった。

一方、ラット胃底部標本に対してイロプロスト、ベラプロストナトリウム及びトレプロスチニルは EP_3 受容体を介した収縮反応を示したが、セレキシパグ及び MRE-269 にそのような作用は認められなかった。

プロスタノイド構造を有する IP 受容体作動薬の一部は EP 受容体にも作用することが報告されており [5,6]、IP 受容体以外のプロスタノイド受容体を介した作用の混在が弛緩/収縮反応を複雑にしている要因の一つと推察された。一方、非プロスタノイド構造のセレキシパグ及び MRE-269 は IP 受容体に選択的に作用し、その弛緩作用は内皮非依存性であると考えられた。

2.6.2.2.4 細胞増殖能に対する作用

2.6.2.2.4.1 ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞の細胞増殖能に対するMRE-269 の影響（試験番号 PH-304-001、資料番号 4.2.1.1-15、評価資料）

（1） 方法

10 ng/mL PDGF で刺激したヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞に対する MRE-269（3、10、30、100、300、1000 及び 3000 nmol/L）の細胞増殖抑制作用を、[^{3}H]thymidine の細胞内への取り込みを指標に測定した。

（2） 成績（2.6.3.2.4.1 項参照）

ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞への[^{3}H]thymidine の取り込みは、PDGF 刺激で増大した。MRE-269 はこの[^{3}H]thymidine の取り込みを 10 nmol/L 以上で濃度依存的に抑制した（図 2.6.2.2.4-1）。

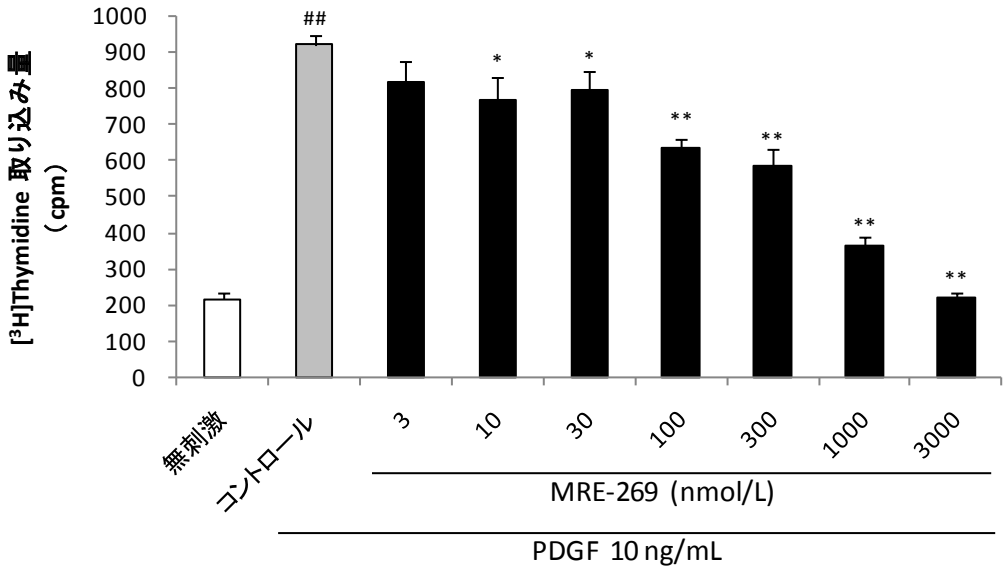


図 2.6.2.2.4-1 PDGFで刺激したヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞への[^{3}H]thymidineの取り込みに対するMRE-269 の影響

各カラムは平均値±標準誤差（n=6）を表す。$^{\#\#}$P<0.01（Student's t-test、無刺激との比較）、
*P<0.05，**P<0.01（Williams の多重比較法、コントロールとの比較）

［4.2.1.1-15 p.8 図を引用］

2.6.2.2.4.2 小括

肺動脈性肺高血圧症では血管内膜の増生は肺動脈が狭窄する一因であり、肺動脈平滑筋細胞の過剰増殖はこの内膜増生に寄与していると考えられている。また、肺動脈性肺高血圧症患者から採取された肺動脈平滑筋細胞は、肺高血圧症でない人から採取された肺動脈平滑筋細胞よりも PDGF で刺激したときの増殖能が高いことが報告されている[7)]。肺高血圧の改善に寄与する機序としてプロスタサイクリンによる細胞増殖抑制作用も提唱されており[8)]、セレキシパグを投与した場合においても IP 受容体を介した細胞増殖抑制作用が薬効に一部寄与すると考えられる。

2.6.2.2.5 血小板凝集能に対する作用

2.6.2.2.5.1 ラット及びヒトの多血小板血漿を用いたADP惹起凝集反応に対するMRE-269 の影響（試験番号N304-081110，N304-081104、資料番号 4.2.1.1-16，4.2.1.1-17、評価資料）

（1） 方法

ラット及びヒトから採取した全血から多血小板血漿を調製し、ラットには 10 μmol/L、ヒトには 2.5 μmol/L ADP を添加したときの血小板凝集に伴う透過度の変化を 7 分間測定し、その曲線下面積を血小板凝集能の指標とした。MRE-269 とベラプロストナトリウムを全血に添加してから、多血小板血漿を調製した。MRE-269 はラット全血に 0.3、1、3、10、30 及び 100 μmol/L、ヒト全血に 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3 及び 1 μmol/L、ベラプロストナトリウムはラット全血に 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3 及び 1 μmol/L、ヒト全血に 0.0003、0.001、0.003、0.01、0.03 及び 0.1 μmol/L の濃度で検討した。

（2） 成績（2.6.3.2.5.1 項参照）

ラットの全血に MRE-269 及びベラプロストナトリウムを添加することで多血小板血漿の透過度は低下した。その IC_{50} は、それぞれ 8.3（95%信頼区間：6.0～11）及び 0.063（95%信頼区間：0.047～0.080）μmol/L であった（表 2.6.2.2.5-1）。

ヒトの全血に対しては、MRE-269 は 69（95%信頼区間：57～82）nmol/L、ベラプロストナトリウムは 5.8（95%信頼区間：5.3～6.4）nmol/L の IC_{50} で血小板凝集抑制作用を示した（表 2.6.2.2.5-1）。

表 2.6.2.2.5-1 多血小板血漿を用いたADP惹起凝集反応に対するMRE-269 及びベラプロストナトリウムの影響

	IC_{50}（95%信頼区間）	
	MRE-269	ベラプロストナトリウム
ラット	8.3（6.0～11）μmol/L	0.063（0.047～0.080）μmol/L
ヒト	69（57～82）nmol/L	5.8（5.3～6.4）nmol/L

2.6.2.2.5.2 小括

肺動脈性肺高血圧症では血小板の凝集能が活性化しており、血栓の出現は肺動脈を狭窄する一因であると考えられている [9]。また、抗凝血薬が肺動脈性肺高血圧症の治療に有効であることも報告されている [10]。プロスタサイクリンの血小板凝集抑制作用も肺高血圧の改善に寄与する機序として提唱されており [8]、血小板凝集抑制作用も薬効に一部寄与すると考えられる。

2.6.2.2.6 肺高血圧モデルラットに対する作用

2.6.2.2.6.1 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの右心肥大に対するセレキシパグの反復経口投与の影響（試験番号N304-050207、資料番号 4.2.1.1-18、評価資料）

（1） 方法

肺高血圧モデルラットは、SD 系雄性ラット（6 週齢、167～178 g）にモノクロタリン 40 mg/kg を皮下投与することにより作製した。引き続き、媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）、セレキシパグ（1 mg/kg）又はベラプロストナトリウム（0.1 mg/kg）を 1 日 2 回、19 日間反復経口投与した。

処置開始 20 日目にラットから摘出した心臓を右心室壁（RV）及び左心室壁＋中隔（LV+S）部位に分離し、これらの湿重量を測定した。右心肥大は、LV+S に対する RV の湿重量比［RV/（LV+S）比］を指標として表した。

（2） 成績（2.6.3.2.6.1 項参照）

ラットへのモノクロタリン処置により、RV/（LV+S）比は増加した。セレキシパグ及びベラプロストナトリウムを肺高血圧モデルに反復経口投与することにより、RV/（LV+S）比の増加は抑制された（図 2.6.2.2.6-1）。

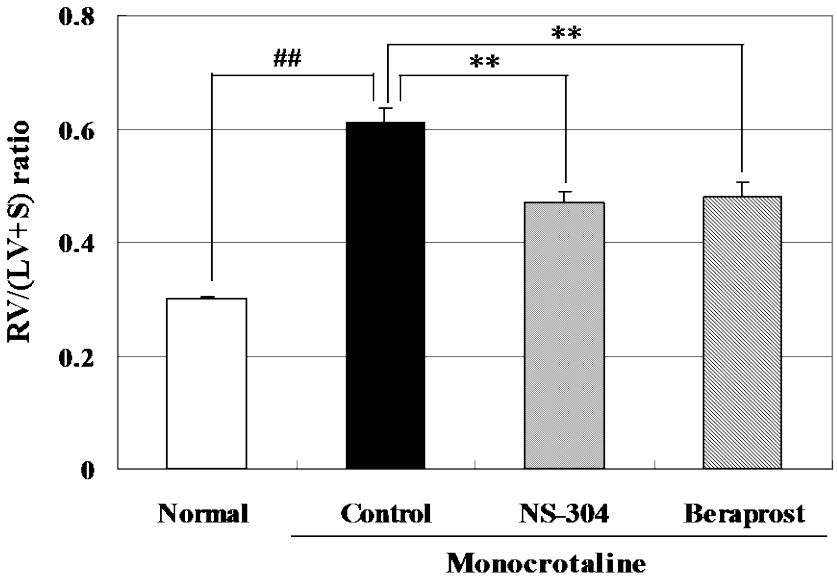


図 2.6.2.2.6-1 モノクロタリン誘発肺高血圧モデルラットの右心肥大に対するセレキシパグ及びベラプロストナトリウム反復経口投与の影響

NS-304：セレキシパグ（1 mg/kg）、beraprost：ベラプロストナトリウム（0.1 mg/kg）
各カラムは平均値±標準誤差（n=12）を表す。
##P<0.01（Welch-test、normal 群との比較）、** P<0.01（Dunnett の多重比較、control 群との比較）

［4.2.1.1-18 p.9 図 1 を引用］

2.6.2.2.6.2 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺小動脈肥厚に対するセレキシパグの反復経口投与の影響（試験番号P-07-002、資料番号 4.2.1.1-19、参考資料）

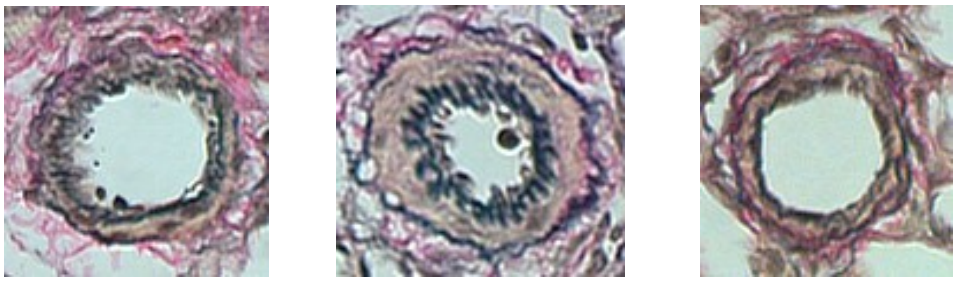
（1） 方法

肺高血圧モデルラットは、SD 系雄性ラット（6 週齢、182～205 g）にモノクロタリン 40 mg/kg を皮下投与することにより作製した。引き続き、媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（1 mg/kg）を 1 日 2 回、19 日間反復経口投与した。

処置開始 20 日目にラットから摘出した左肺組織の中央部位から 4 μm 厚の断片を分離し、elastin van Gieson 染色した。顕微鏡下でこれらの肺小動脈の外径と血管壁の厚さを測定した。肺小動脈の肥厚の指標は、［（血管壁の厚さ×2）/血管の外径］×100 で表した。

（2） 成績（2.6.3.2.6.2 項参照）

ラットへのモノクロタリン処置により、血管壁の肥厚が観察され、セレキシパグの反復経口投与により肥厚は改善した（図 2.6.2.2.6-2）。モノクロタリン処置により血管壁の外径に対する割合（%）は増加し、セレキシパグの反復経口投与はこの増加を抑制した（図 2.6.2.2.6-3）。



A. Normal　B. Control　C. NS-304

図 2.6.2.2.6-2 モノクロタリン誘発肺高血圧モデルラットの肺小動脈の elastin van Gieson染色像

A. normal（モノクロタリン無処置/媒体投与）、B. control（モノクロタリン処置/媒体投与）、C. NS-304（モノクロタリン処置/セレキシパグ投与）

［4.2.1.1-19 p.9 Fig.2 を引用］

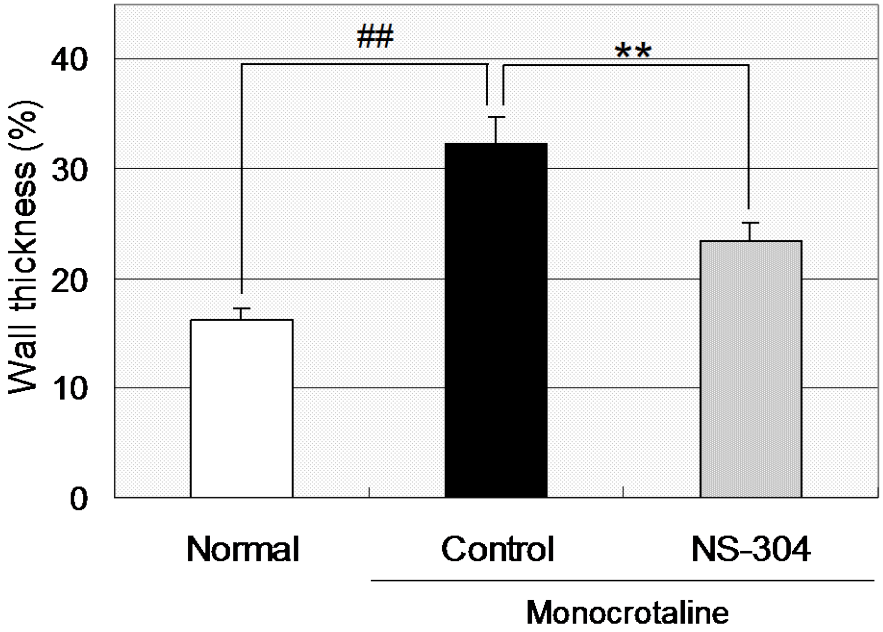


図 2.6.2.2.6-3 モノクロタリン誘発肺高血圧モデルラットの肺小動脈肥厚に対するセレキシパグ反復経口投与の影響

NS-304：セレキシパグ（1 mg/kg）
各カラムは平均値±標準誤差（normal 群 n=8、control 及び NS-304 群 n=10）を表す。
##P<0.01（Welch-test、normal 群との比較）、** P<0.01（Student's t-test、control 群との比較）

［4.2.1.1-19 p.9 Fig.1 を引用］

2.6.2.2.6.3 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの生存に対するセレキシパグの反復経口投与の影響（試験番号P-07-009、資料番号 4.2.1.1-20、参考資料）

（1） 方法

肺高血圧モデルラットは、SD 系雄性ラット（8 週齢、274～300 g）にモノクロタリン 60 mg/kg を皮下投与することにより作製した。引き続き、媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（1 mg/kg）を 1 日 2 回、46 日間反復経口投与を行った。これらのラットの生存を、処置開始 45 日後まで観察した。

（2） 成績（2.6.3.2.6.3 項参照）

モノクロタリン処置開始 45 日後の生存数は、媒体投与群が 8 匹/30 匹（27%）、セレキシパグ投与群が 16 匹/30 匹（53%）であり、セレキシパグはモノクロタリン誘発肺高血圧ラットの生存率を改善した（P=0.0416、log-rank test）（図 2.6.2.2.6-4）。

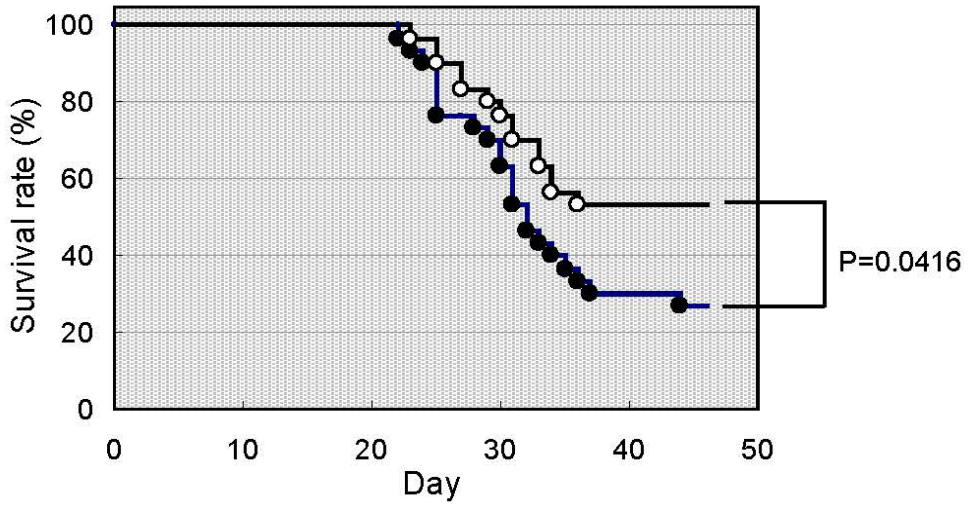


図 2.6.2.2.6-4 モノクロタリン誘発肺高血圧モデルラットの生存に対する セレキシパグ反復経口投与の影響

●：媒体（n=30）、○：セレキシパグ（1 mg/kg、n=30）
Kaplan-Meier 法を用いた生存曲線を示す。

［4.2.1.1-20 p.3 Fig.1 を引用］

2.6.2.2.6.4 U46619 誘発肺高血圧ラットの収縮期の右心室圧に対するセレキシパグの単回十二指腸内投与の影響（試験番号PH-304-002、資料番号 4.2.1.1-21、評価資料）

（1） 方法

肺高血圧モデルラットは、麻酔下の SD 系雄性ラット（8 週齢、264～310 g）に TP 受容体作動薬である U46619 を持続的に静脈内投与し、収縮期の右心室圧を 50 mmHg 前後に上昇した状態を維持することにより作製した。この条件下で媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（3 mg/kg）を十二指腸内に単回投与し、収縮期の右心室圧、体血圧及び心拍数を測定した。

（2） 成績（2.6.3.2.6.4 項参照）

U46619 誘発肺高血圧ラットにセレキシパグを 3 mg/kg で十二指腸内投与したところ、媒体投与と比べて収縮期の右心室圧は低下した（図 2.6.2.2.6-5）。

一方、セレキシパグ投与後の体血圧に影響は認められなかった（図 2.6.2.2.6-6）。同様に、心拍数も変化しなかった。

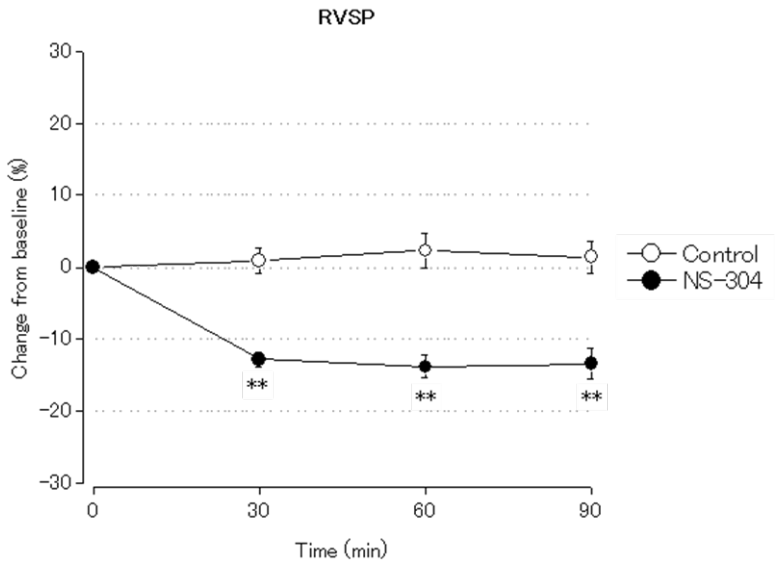


図 2.6.2.2.6-5 U46619 誘発肺高血圧ラットの収縮期の右心室圧（RVSP）に対する
セレキシパグ単回十二指腸内投与の影響

○：媒体対照、●：セレキシパグ（NS-304、3 mg/kg）
投与 0 分の収縮期の右心室圧（媒体対照群 48.4 ± 0.9 mmHg、セレキシパグ群 51.6 ± 0.5 mmHg）に対する個体ごとの変化率を平均値±標準誤差（n=8）で表す。
**P<0.01（Student's t-test、媒体対照との比較）

［4.2.1.1-21 p.13 図 1 を引用］

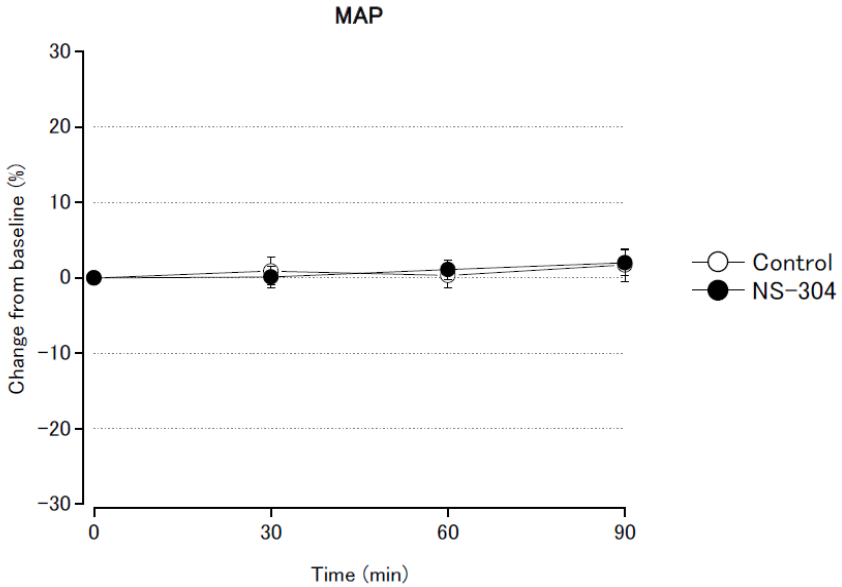


図 2.6.2.2.6-6 U46619 誘発肺高血圧ラットの体血圧（MAP）に対する
セレキシパグ単回十二指腸内投与の影響

○：媒体対照、●：セレキシパグ（NS-304、3 mg/kg）
投与 0 分の体血圧（媒体対照群 94.4 ± 2.1 mmHg、セレキシパグ群 93.0 ± 1.7 mmHg）に対する個体ごとの変化率を平均値±標準誤差（n=8）で表す。

［4.2.1.1-21 p.14 図 2 を引用］

2.6.2.2.6.5 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺動脈圧に対するセレキシパグの反復経口投与の影響（試験番号B-13.066、資料番号 4.2.1.1-22、評価資料）

（1） 方法

肺高血圧モデルラットは、テレメトリー式心電送信機を装着した Wistar 系雄性ラット（4 月齢、328～428 g）にモノクロタリン 60 mg/kg を皮下投与することにより作製した。

モノクロタリン処置した 4 から 5 週後に、媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（10 mg/kg）を 1 日 2 回、5 日間反復経口投与し、その間の肺動脈圧及び心拍数を記録した。

（2） 成績（2.6.3.2.6.5 項参照）

ラットへのモノクロタリン処置により、肺動脈圧は 50 mmHg 以上に上昇した。セレキシパグを 1 日 2 回、5 日間反復経口投与した後の肺動脈圧の推移を図 2.6.2.2.6-7 に示す。媒体投与では肺動脈圧に投与後の変化は認められなかった。セレキシパグによる肺動脈圧の低下は 5 日間とも認められ、反復経口投与による作用の減弱は認められなかった。なお、投与後の肺動脈圧低下の最大変化量は、朝が 2 日目の-16 ± 2 mmHg であり、夕が 2 日目に-9 ± 3 mmHg、5 日目に-9 ± 4 mmHg であった（表 2.6.2.2.6-1）。

心拍数については、投与期間中に顕著な変化は認められなかった。

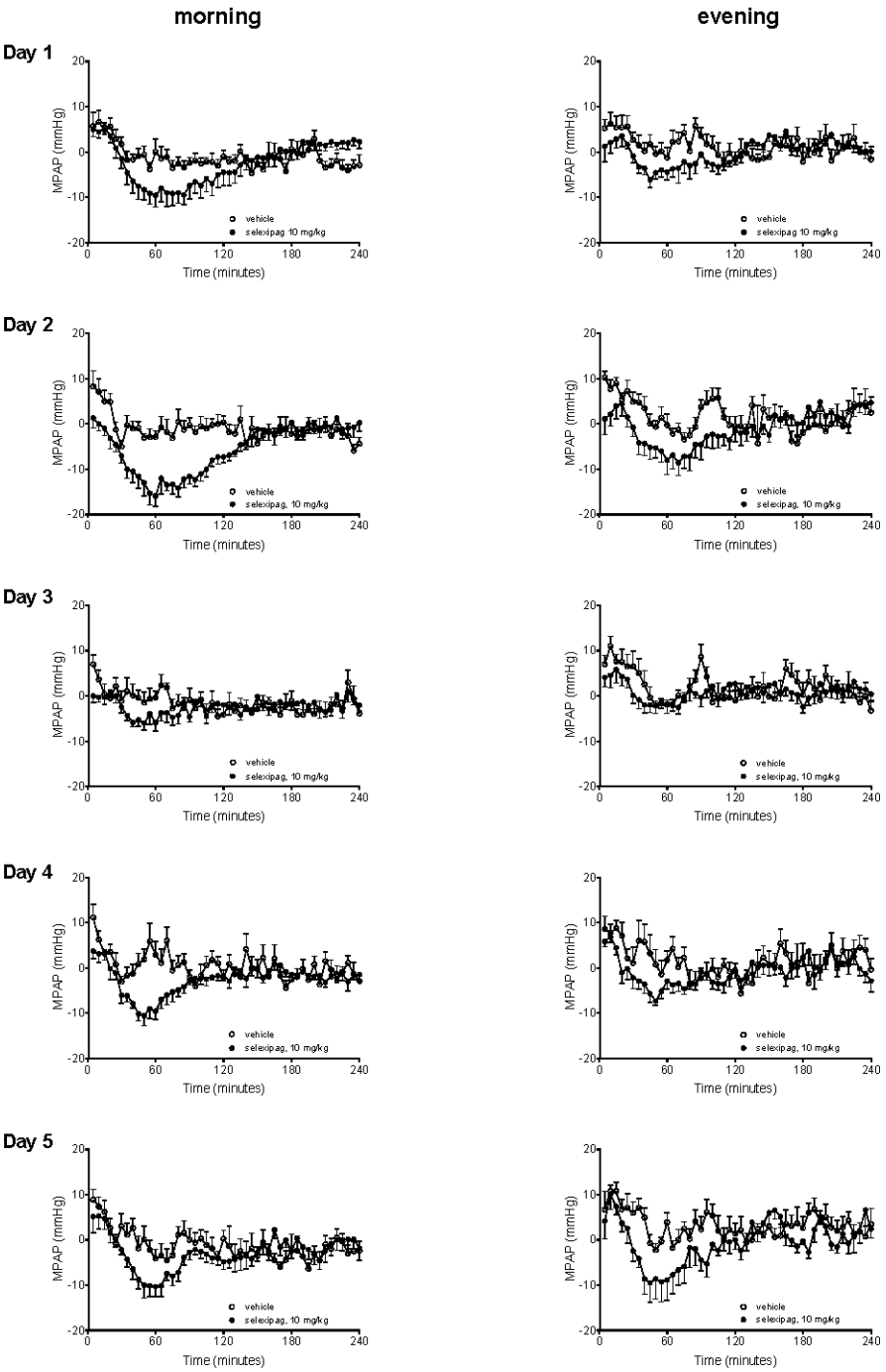


図 2.6.2.2.6-7　モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺動脈圧に対する
セレキシパグ反復経口投与の影響

○：媒体対照、●：セレキシパグ（10 mg/kg）
各点は、5 分間あたりの肺動脈圧（MPAP）を平均値±標準誤差（n=7～8）で表す。

［4.2.1.1-22 p.18 Fig.3、p.19 Fig.4 を引用］

表 2.6.2.2.6-1 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットにセレキシパグを投与後の肺動脈圧の最大変化量

		媒体又はセレキシパグ投与後の肺動脈圧の変化量（mmHg）[a]				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
朝	媒体対照	0 ± 3	-3 ± 1	-1 ± 1	2 ± 2	-2 ± 2
	セレキシパグ	-9 ± 3	-16 ± 2	-6 ± 2	-11 ± 2	-10 ± 2
夕	媒体対照	2 ± 2	-1 ± 1	0 ± 1	1 ± 3	0 ± 1
	セレキシパグ	-6 ± 2	-9 ± 3	-2 ± 1	-7 ± 1	-9 ± 4

a：投与後の各時点の 5 分間あたりの肺動脈圧を投与前の 1 時間あたりの平均値から差し引き、最大変化時点の変化量を平均値±標準誤差（n=7～8）で表す。

［4.2.1.1-22 p.23 Table 4 を引用］

2.6.2.2.6.6 小括

肺動脈性肺高血圧症の動物モデルであるモノクロタリン誘発肺高血圧モデルでは、肺動脈が狭窄しており、最終的に右心不全を生じて死に至る [11]。セレキシパグはモノクロタリン誘発肺高血圧モデルにおいて右心肥大の形成を抑制し、上昇した肺動脈圧の低下、肺小動脈の肥厚形成抑制、モノクロタリン処置開始後の生存期間の延長が認められた。また、U46619 誘発肺高血圧モデル [12] では、収縮期の右心室圧の上昇に対し、セレキシパグ 3 mg/kg での十二指腸内投与による抑制効果が確認された。なお、U46619 誘発肺高血圧モデルラットの体血圧及び心拍数にセレキシパグ投与による影響は認められなかった。一方、高血圧自然発症ラットにセレキシパグを 10 mg/kg で経口投与した場合では、体血圧の低下が認められた（2.6.2.2.7.1 項）。体血圧に影響する用量より低い 1 及び 3 mg/kg から肺高血圧モデルラットへの薬効が認められており、肺高血圧症の治療に有用であることが示唆された。

2.6.2.2.7 体血圧に対する作用

2.6.2.2.7.1 高血圧自然発症ラットの体血圧に対するセレキシパグの反復経口投与の影響（試験番号B-13.066，B-13.067、資料番号 4.2.1.1-22，4.2.1.1-23、評価資料）

（1） 方法

テレメトリー式心電送信機を装着した高血圧自然発症ラット（SHR、雄性、6～10 月齢、343～501 g）に媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（10 mg/kg）を 1 日 2 回、5 日間反復経口投与し、この間の体血圧と心拍数をテレメトリーシステムで記録し、5 分間あたりの体血圧及び心拍数を記録した（B-13.066）。

セレキシパグを粉末飼料に加え、高血圧自然発症ラット（SHR、雄性、5～15 月齢、410～483 g）に混餌で反復経口投与した。セレキシパグは 10 mg/kg/day で 4 日間、以後同様の方法で 4 日ごとに 30、100 及び 300 mg/kg/day に増量して投与し、その後通常の粉末飼料（0 mg/kg/day）を 2 日間与えた。この間の体血圧と心拍数をテレメトリーシステムで記録し、5 分間あたりの計測値を 6 時間集計し、6 時間あたりの平均値として体血圧と心拍数を表した（B-13.067）。

また、高血圧自然発症ラット（SHR、雄性、4～5 月齢、352～475 g）にプロスタノイド構造を有する IP 受容体作動薬であるトレプロスチニルを、浸透圧ポンプを用いて 30 μg/kg/hr で 48 時間

持続静脈内投与した。この間の体血圧と心拍数をテレメトリーシステムで記録し、5 分間あたりの計測値を 1 時間集計し、1 時間あたりの平均値として体血圧と心拍数を表した（B-13.067）。

（2） 成績（2.6.3.2.7.1 項参照）

体血圧が 160 mmHg 前後の高血圧自然発症ラットへの媒体投与では体血圧及び心拍数に影響は認められなかった。セレキシパグ 10 mg/kg を 1 日 2 回、5 日間反復経口投与したところ、投与後の体血圧は朝、夕とも最大で約-20 mmHg 低下し、この期間中に反復経口投与による作用の減弱は認められなかった（表 2.6.2.2.7-1）。なお、心拍数にセレキシパグ投与の影響は認められなかった。

表 2.6.2.2.7-1 高血圧自然発症ラットにセレキシパグを投与後の体血圧の最大変化量

		媒体又はセレキシパグ投与後の体血圧の変化量（mmHg）[a]				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
朝	媒体対照	10 ± 4	22 ± 5	-4 ± 7	3 ± 4	-2 ± 6
	セレキシパグ	-11 ± 7	-21 ± 6	-19 ± 5	-16 ± 5	-17 ± 4
夕	媒体対照	12 ± 4	3 ± 9	-5 ± 3	-2 ± 5	11 ± 2
	セレキシパグ	-20 ± 3	-15 ± 4	-21 ± 3	-15 ± 5	-20 ± 3

a：投与後の各時点の 5 分間あたりの体血圧を投与前の 1 時間あたりの平均値から差し引き、最大変化時点の変化量を平均値±標準誤差（n=4～6）で表す。

［4.2.1.1-22 p.21 Table 2 を引用］

セレキシパグを混餌で反復経口投与する前の高血圧自然発症ラットの体血圧は 170 mmHg 前後であり、心拍数は 300 bpm 前後であった。セレキシパグを 4 日ごとに混餌投与で増量するにつれて、体血圧は低下した（図 2.6.2.2.7-1）。対照群と比較したときの 24 時間あたりの体血圧の最大の低下量は、30、100 及び 300 mg/kg/day でそれぞれ 4 ± 2、14 ± 2 及び 29 ± 3 mmHg であった。セレキシパグの投与を中止後は、投与前の体血圧にまで上昇した。なお、心拍数にセレキシパグ投与の影響は認められなかった。

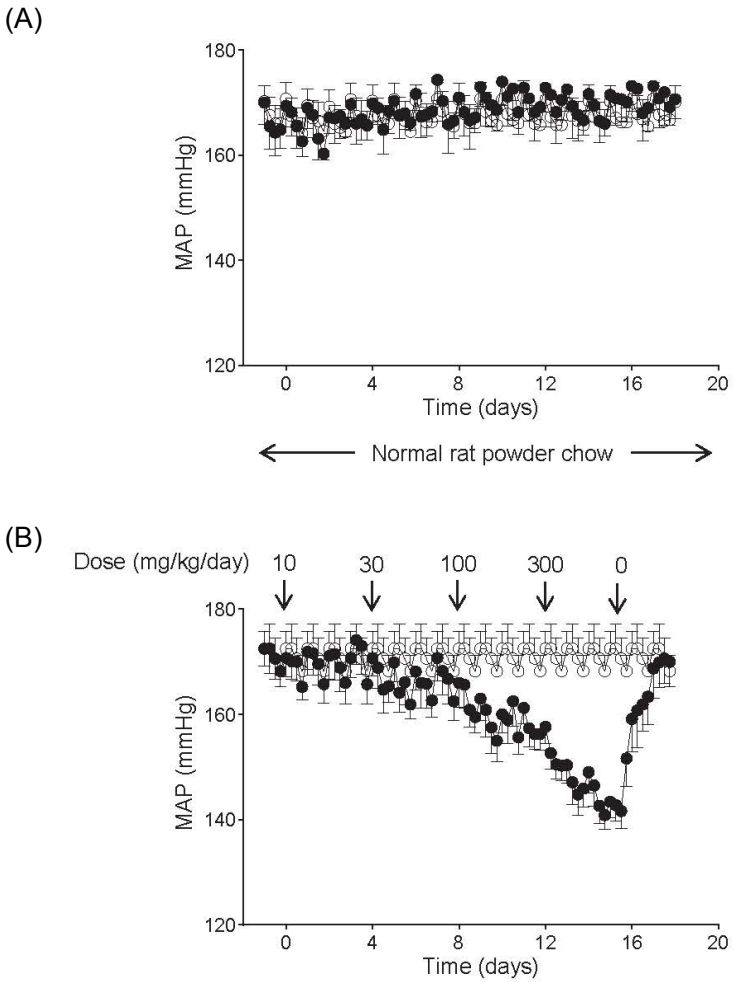


図 2.6.2.2.7-1 高血圧自然発症ラットの体血圧に対するセレキシパグの反復経口投与の影響

●：対照（A、n=7）及びセレキシパグ（B、n=8）の 6 時間あたりの体血圧（MAP）を平均値±標準誤差で表す。
○：無処置ラットでの変化を表す。

［4.2.1.1-23 p.21 Fig.6 を引用］

トレプロスチニルを持続静脈内投与する前の高血圧自然発症ラットの体血圧は 160 mmHg 前後であり、心拍数は 320 bpm 前後であった。トレプロスチニルを持続静脈内投与することで、体血圧は低下した（図 2.6.2.2.7-2）。媒体群と比較したときの体血圧の最大の低下量は、約 30 mmHg であった。その後もトレプロスチニルの投与を継続したところ、体血圧低下作用は徐々に減弱し、持続静脈内投与開始後 48 時間で媒体群と同程度の体血圧を示した。

心拍数については、媒体群とトレプロスチニル群は同様の経過をたどり、トレプロスチニルの影響は認められなかった。

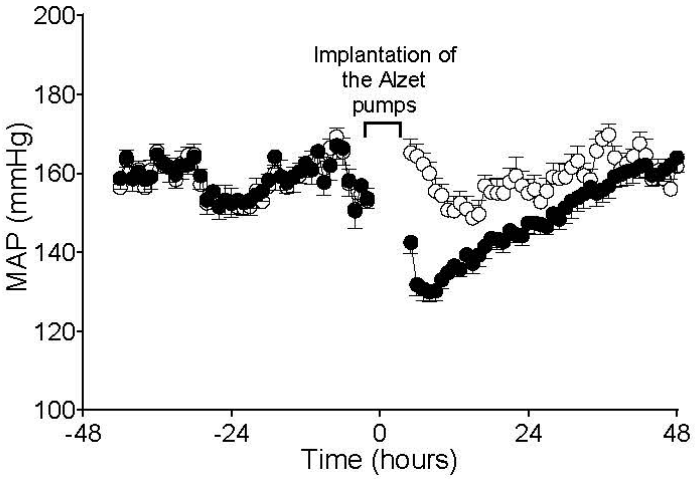


図 2.6.2.2.7-2 高血圧自然発症ラットの体血圧に対するトレプロスチニルの持続静脈内投与の影響

○：媒体（ジメチルホルムアミド/リン酸緩衝液）、トレプロスチニル（●、30 μg/kg/hr）
各点は、1 時間あたりの体血圧（MAP）を平均値±標準誤差（n=10～15）で表す。

［4.2.1.1-23 p.27 Fig.12 を引用］

2.6.2.2.7.2 小括

体血圧が上昇した高血圧自然発症ラットにセレキシパグを混餌投与したところ、投与量の増加とともに体血圧が低下した。プロスタサイクリンは血管内皮細胞で生成する弛緩因子であり、IP 受容体も多くの血管平滑筋に存在することが知られていることから [13,14]、本薬の血管拡張作用により体血圧が低下すると考えられた。

また、トレプロスチニルの持続静脈内投与においても体血圧の低下が認められた。しかしながら、トレプロスチニルの投与を継続することによりこの体血圧低下作用は徐々に減弱した。セレキシパグでは反復投与による体血圧低下作用の減弱が認められなかったことから、セレキシパグはプロスタノイド構造の IP 受容体作動薬であるトレプロスチニルとは異なり、反復投与による作用の減弱を起こしにくい作動薬であることが示唆された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 酵素、他の受容体等に対する作用

2.6.2.3.1.1 酵素活性、他の受容体等の結合活性に対するセレキシパグ及びMRE-269 の影響（試験番号 1009021/1028885, 1009473/1028885, 1005432/1018091, 1009021/1018091, 1009473/1018091、資料番号 4.2.1.2-1, 4.2.1.2-2, 4.2.1.2-3, 4.2.1.2-4, 4.2.1.2-5、参考資料）

種々の酵素活性、神経伝達物質受容体、その他の受容体、イオンチャネル、トランスポーター等の結合活性に対する影響を検討した。

（1） 方法

各種組織、細胞、組換え型受容体等の発現細胞を用い、酵素活性及び結合活性に対するセレキシパグ（4.2.1.2-1 及び 4.2.1.2-2）及び MRE-269（4.2.1.2-3、4.2.1.2-4 及び 4.2.1.2-5）の影響を 10 μmol/L の濃度を中心に検討した。

（2） 成績（2.6.3.3.1 項参照）

種々の酵素活性、神経伝達物質受容体、その他の受容体、イオンチャネル及びトランスポーター等の結合活性に対し、セレキシパグ及び MRE-269 は IC_{50} が得られるような抑制を示さなかった。

2.6.2.3.1.2 小括

セレキシパグ及び MRE-269 について 10 μmol/L の濃度を中心に検討したところ、プロスタノイド受容体以外の一部の試験項目で 20%を超える阻害率を示した。しかしながら、ヒトにおけるセレキシパグ及び MRE-269 の血漿中濃度は 1 μmol/L より低いため（2.6.2.6 項参照）、薬効用量では他の受容体等への影響はほとんどないと考えられた。

2.6.2.4 安全性薬理試験

セレキシパグの安全性薬理試験として、ラット及びイヌを用いて中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を単回経口投与により検討した。心血管系においては、hERG チャネルを安定発現させた CHO-K1 細胞及びモルモット摘出標本（乳頭筋、右心房）を用いて *in vitro* での検討を行った。その他の器官系については、ラットを用いて腎・泌尿器系、胃腸管系及び血液凝固系に及ぼす影響を検討した。セレキシパグの活性代謝物である MRE-269 については、心血管系では hERG チャネル安定発現 CHO-K1 細胞及びモルモット摘出標本（右心房）、その他の器官系ではラット摘出標本（子宮）を用いた *in vitro* での検討及びモルモットへの点眼による表面麻酔作用に関する検討を行った。

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 一般症状に及ぼす影響（試験番号 4812，4813、資料番号 4.2.1.3-1，4.2.1.3-2、評価資料）

SD（IGS）系ラット（6 週齢、151.9～167.6 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体：0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与し、Irwin 変法を用いて、一般症状及び行動に及ぼす影響を評価した。セレキシパグは 30 mg/kg の用量まで影響を及ぼさなかった。100 mg/kg で 6 例中 5 例に皮膚の紅潮、4 例に円背位姿勢、受動性の低下、爪先立ち歩行、3 例に体温低下傾向、2 例に正向反射において“体側部からの着地”、1 例に姿勢において“長時間に亘り後肢で立つ”、呼吸深大、軟便、針金動作において“後肢で掴めない”が認められた。これらの症状は、投与後 24 時間には消失していた。また、100 mg/kg において体重の増加抑制が認められた。

セレキシパグを 10、30 及び 100 mg/kg の用量で SD（IGS）系ラット（6 週齢、148.8～175.1 g、n=4）に単回経口投与したときの血漿中セレキシパグの最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）はそれぞれ 0.5、1 及び 1 hr、最高血漿中濃度（C_{max}）はそれぞれ 0.35、0.75 及び 3.26 µg/mL、投与開始から 24 時間後までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24hr}$）はそれぞれ 0、3 及び 19 µg·hr/mL であった。また、血漿中 MRE-269 の t_{max} はそれぞれ 1、2 及び 1 hr、C_{max} はそれぞれ 1.57、5.43 及び 13.15 µg/mL、$AUC_{0\text{-}24hr}$ はそれぞれ 12、46 及び 196 µg·hr/mL であった。

2.6.2.4.1.2 体温に及ぼす影響（試験番号 6225、資料番号 4.2.1.3-3、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、189.2～219.5 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体：0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与し、正常体温に及ぼす影響を検討した。30 mg/kg 以上の用量で媒体群と比較して体温の低下が認められた。

陽性対照物質であるクロルプロマジン塩酸塩は 4 mg/kg で媒体群と比較して体温の低下が認められた。

2.6.2.4.1.3 ヘキソバルビタール誘発睡眠に及ぼす影響（試験番号 6225、資料番号 4.2.1.3-3、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、195.9～215.7 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体：0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与し、ヘキソバルビタール誘発睡眠に及ぼす影響を検討した。100 mg/kg で媒体群と比較して睡眠時間の延長が認められた。

陽性対照物質であるクロルプロマジン塩酸塩は 4 mg/kg で媒体群と比較して睡眠時間の延長が認められた。

2.6.2.4.1.4 痛覚に及ぼす影響（試験番号 6225、資料番号 4.2.1.3-3、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、175.7～203.8 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体：0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与し、痛覚に及ぼす影響を検討した。100 mg/kg で媒体群と比較して圧刺激に対する回避反応閾値が上昇し、鎮痛作用が認められた。

陽性対照物質であるモルヒネ塩酸塩は 5 mg/kg で媒体群と比較して回避反応閾値が上昇した。

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 hERG電流に及ぼす影響（試験番号 4814，4815、資料番号 4.2.1.3-4，4.2.1.3-5、評価資料）

hERG チャネルを安定発現させた CHO-K1 細胞にセレキシパグを 0（媒体：0.1%ジメチルスルホキシド）、3、10、30 及び 100 µmol/L の濃度で適用し、hERG 電流に及ぼす影響を検討した。セレキシパグは 10 µmol/L の濃度まで影響を及ぼさなかった。30 µmol/L 適用時の hERG 電流は適用前値の 85.2%であり、抑制が認められた。なお、100 µmol/L では、ホールセル状態が維持できず電流測定ができなかったため評価できなかった。

同様に、MRE-269 を 0（媒体：0.1%ジメチルスルホキシド）、3、10 及び 30 µmol/L の濃度で適用し、hERG 電流に及ぼす影響を検討した。30 µmol/L の濃度まで影響は認められなかった。

陽性対照物質である E-4031 は 1 μmol/L で hERG 電流を顕著に抑制した。

2.6.2.4.2.2 心血管系に及ぼす影響（試験番号 4811、資料番号 4.2.1.3-6、評価資料）

ビーグル犬（7～8 ヵ月齢、8.8～10.4 kg、n=4）にセレキシパグを 0（媒体：0.5%メチルセルロース水溶液）、1、3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与し、心血管系に及ぼす影響をテレメトリーシステムを用いて検討した。なお、試験では同一個体を繰り返し使用するため、1 週間の休薬期間をおいて各用量を投与した。

一般状態観察では、1 mg/kg 以上の用量で嘔吐が、3 mg/kg 以上の用量で摂餌量の減少及び軟便が観察された。さらに、10 mg/kg で下痢便（ゼリー状便）が観察された。心電図では 1 mg/kg 以上の用量で QT 間隔の短縮が認められたが、QTc には影響が認められなかった。血圧においては、1 mg/kg 以上の用量で平均血圧及び拡張期血圧の低下が認められた。さらに、3 mg/kg 以上の用量で収縮期血圧の低下が認められた。心拍数においては、3 mg/kg 以上の用量で増加が認められた。

セレキシパグを 1、3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与したときの血漿中セレキシパグの t_{max} はいずれの用量も 1 hr、C_{max} はそれぞれ 1.00、4.14 及び 10.93 μg/mL、$AUC_{0\text{-}24hr}$ は 2、9 及び 31 μg·hr/mL であった。また、血漿中 MRE-269 の t_{max} はいずれの用量も 3 hr、C_{max} はそれぞれ 2.51、7.75 及び 17.39 μg/mL、$AUC_{0\text{-}24hr}$ は 33、87 及び 199 μg·hr/mL であった。

2.6.2.4.2.3 心筋活動電位に及ぼす影響（試験番号 5615、資料番号 4.2.1.3-7、評価資料）

モルモット摘出乳頭筋標本にセレキシパグを 0（媒体：0.1%ジメチルスルホキシド）、10、30 及び 100 μmol/L の濃度で適用し、心筋活動電位に及ぼす影響を検討した。10 μmol/L 以上の濃度で APD_{30} の短縮が認められた。また、30 μmol/L 以上の濃度で APD_{90} の短縮が認められた。さらに、100 μmol/L で静止膜電位の上昇と活動電位振幅の減少が認められた。

陽性対照物質であるソタロールは 100 μmol/L で、APD_{30} 及び APD_{90} の延長が認められた。

2.6.2.4.2.4 収縮力及び拍動数に及ぼす影響（試験番号 5614, 6061、資料番号 4.2.1.3-8, 4.2.1.3-9、評価資料）

モルモット摘出右心房標本にセレキシパグ及び MRE-269 を 0（媒体：0.1%ジメチルスルホキシド）、3、10、30 及び 100 μmol/L の濃度で適用し、収縮力及び拍動数に及ぼす影響を検討した。セレキシパグは 100 μmol/L で収縮力及び拍動数の増加が認められた。MRE-269 は 30 μmol/L で収縮力の増加が認められた。

陽性対照物質であるイソプロテレノールは 0.01 μmol/L で収縮力及び拍動数を増加させた。

2.6.2.4.3 呼吸系

2.6.2.4.3.1 ラットの呼吸系に及ぼす影響（試験番号 5612、資料番号 4.2.1.3-10、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（7～8 週齢、220.3～287.2 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体、0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30、100 mg/kg の用量で単回経口投与し、呼吸系に及ぼす影響を検討した。30 mg/kg 以上の用量で、1 分間呼吸数、1 回換気量及び分時換気量の増加が認められた。

陽性対照物質であるテオフィリンは 100 mg/kg で 1 分間呼吸数及び分時換気量を増加させた。

2.6.2.4.3.2 イヌの呼吸系に及ぼす影響（試験番号 4811、資料番号 4.2.1.3-6、評価資料）

心血管系に及ぼす影響を検討したビーグル犬において、3 mg/kg 以上の用量で呼吸数の増加が認められた。ヘモグロビン酸素飽和度には、いずれの用量でも影響は認められなかった。

2.6.2.4.4 その他の器官系

2.6.2.4.4.1 腎・泌尿器系に及ぼす影響

（1） 水及び電解質排泄に及ぼす影響（試験番号 5613、資料番号 4.2.1.3-11、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（7 週齢、235.7～250.0 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体、0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30、100 mg/kg の用量で単回経口投与し、水及び電解質排泄に及ぼす影響を検討した。10 mg/kg 以上の用量で、尿中 Cl^-排泄量及び Na^+/K^+比の減少が認められた。さらに、30 mg/kg 以上の用量で、尿量及び尿中 Na^+排泄量の減少が認められた。

陽性対照物質であるフロセミドは 40 mg/kg で尿量、尿中 Na^+排泄量、尿中 K^+排泄量及び尿中 Cl^-排泄量を増加させ、浸透圧を低下させた。

2.6.2.4.4.2 胃腸管系に及ぼす影響

（1） 小腸輸送能に及ぼす影響（試験番号 6057、資料番号 4.2.1.3-12、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、186.5～203.9 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体、0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30、100 mg/kg の用量で単回経口投与し、小腸輸送能に及ぼす影響を検討した。10 mg/kg 以上の用量で小腸における炭末移行率の減少が認められた。

陽性対照物質であるアトロピンは 20 mg/kg で、炭末移行率を減少させた。

（2） 胃液分泌に及ぼす影響（試験番号 6057、資料番号 4.2.1.3-12、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、186.2～203.8 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体、0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30、100 mg/kg の用量で十二指腸内投与し、胃液分泌に及ぼす影響を検討した。10 mg/kg 以上の用量で胃液量の減少及び胃液総酸度の減少が認められた。さらに、100 mg/kg で胃液の pH の上昇が認められた。

陽性対照物質であるシメチジンは 30 mg/kg で胃液量及び総酸度を減少させ、胃液の pH を上昇させた。

2.6.2.4.4.3 体性神経系に及ぼす影響

（1） 表面麻酔作用に及ぼす影響（試験番号 6060、資料番号 4.2.1.3-13、評価資料）

Slc:Hartley モルモット（5 週齢、330.8～404.2 g、n=6）の眼に MRE-269 を 0（媒体、0.1%ジメチルスルホキシド含有タイロード液）、0.001%、0.003%及び 0.01%の濃度で点眼し、表面麻酔作用に及ぼす影響を検討した。いずれの用量でも、角膜反射の消失は認められなかった。

陽性対照物質であるリドカイン塩酸塩（2%）は角膜反射を消失させ、表面麻酔作用を示した。

2.6.2.4.4.4 血液凝固系に及ぼす影響

（1） 出血時間に及ぼす影響（試験番号 6058、資料番号 4.2.1.3-14、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、175.9～194.4 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体、0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30、100 mg/kg の用量で単回経口投与し、出血時間に及ぼす影響を検討した。いずれの用量においても、影響は認められなかった。

陽性対照物質であるワルファリンは 2 mg/kg で出血時間を延長させた。

（2） 凝固能に及ぼす影響（試験番号 6058、資料番号 4.2.1.3-14、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（6 週齢、177.7～196.6 g、n=6）にセレキシパグを 0（媒体、0.5%メチルセルロース水溶液）、10、30、100 mg/kg の用量で単回経口投与し、凝固能に及ぼす影響を検討した。いずれの用量においても、影響は認められなかった。

陽性対照物質であるワルファリンは 2 mg/kg でプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を延長させた。

2.6.2.4.4.5 摘出子宮平滑筋に及ぼす影響（試験番号 6059、資料番号 4.2.1.3-15、評価資料）

ラット摘出子宮標本に MRE-269 を 0（媒体、0.1%ジメチルスルホキシド）、10、30 及び 100 µmol/L の濃度で適用し、摘出子宮平滑筋に及ぼす影響を検討した。30 µmol/L 以上の濃度で自動運動の収縮回数の減少が認められた。

陽性対照物質であるオキシトシンは 1 U/L で自動運動の振幅及び収縮回数を増加させた。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.6 考察及び結論

近年、肺動脈性肺高血圧症の治療にプロスタサイクリン（医薬品の一般的名称はエポプロステノールナトリウム）を含むプロスタノイド構造の IP 受容体作動薬が有効であることが認められてきている [15,16]。非プロスタノイド構造のセレキシパグ及び活性代謝物である MRE-269 は選択的な IP 受容体作動薬であり、ラットでの結合親和性はそれぞれ 4098.4 ± 566.7 及び 394.3 ± 13.0 nmol/L であった。肺高血圧モデルラットでは、1 及び 3 mg/kg で薬効を示した。ラットにセレキシパグ 10 mg/kg を経口投与したときの C_{max} はそれぞれ 0.35 及び 1.57 µg/mL であった（2.6.2.4.1.1 項参照）。この値を用いて概算すると、セレキシパグを 1～3 mg/kg で投与したときのセレキシパグの血漿中濃度は約 70～210 nmol/L、同様に MRE-269 は約 370～1100 nmol/L であった。セレキシパグは吸収後に血中でも MRE-269 に代謝されるため、セレキシパグの血漿中濃度は MRE-269 より低い水準であった。ラットにセレキシパグの 10、30 及び 100 mg/kg を経口投与したときのセレキシパグの $AUC_{0\text{-}24hr}$ はそれぞれ 0、3 及び 19 µg·hr/mL、MRE-269 の場合はそれぞれ 12、46 及び 196 µg·hr/mL であり（2.6.2.4.1.1 項参照）、セレキシパグの曝露量は MRE-269 の 0.1 倍に満たなかった。これ

らの薬物動態に関する知見及び *in vitro* 薬理試験における効力も踏まえると、肺高血圧モデルラットで認められたセレキシパグの右心肥大の形成抑制等の薬理作用は、主に MRE-269 によってもたらされると考えられた。

一方、セレキシパグ及び MRE-269 のヒト IP 受容体への結合親和性はそれぞれ 263.0 ± 24.3 及び 19.8 ± 0.6 nmol/L であり、いずれもラットより高い効力を示した。ヒト組換え型 IP 受容体の安定発現 CHO 細胞において、セレキシパグ及び MRE-269 はいずれも濃度依存的に細胞内 cAMP 生成量を最大反応にまで増加させ、その EC_{50} はそれぞれ 76.7（95%信頼区間：63.7～89.7）及び 4.98（95%信頼区間：3.69～6.26）nmol/L であった。また、ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞を用いて細胞形態の変化を指標とした検討では、セレキシパグ及び MRE-269 の幾何平均値での EC_{50} はそれぞれ 157 ± 1.3 及び 4.3 ± 1.2 nmol/L であり、MRE-269 の方が約 37 倍高い効力を示した。肺動脈性肺高血圧症患者への本薬の投与は、被験者ごとに至適な用量を設定するため 0.2～1.6 mg を 1 日 2 回の反復経口としている。国内第 I 相試験（NS304/P1/01）において、日本人健康成人に 0.2 mg を 1 日 2 回、食後に反復経口投与したときの定常状態におけるセレキシパグ及び MRE-269 の C_{max} はそれぞれ 2.98 ± 0.85 及び 4.24 ± 0.81 ng/mL であり、$AUC_{0\text{-}12hr}$ はそれぞれ 6.53 ± 2.36 及び 22.8 ± 5.8 ng･hr/mL であった（2.7.2.2.2.2 項参照）。このように、ヒトでの C_{max} からセレキシパグは MRE-269 の 0.7 倍程度の血漿中濃度が存在し、この値から 0.2～1.6 mg 投与時のセレキシパグ及び MRE-269 の血漿中濃度を概算すると、それぞれ約 6～48 及び約 10～80 nmol/L であった。一方、血中のセレキシパグは時間経過とともに MRE-269 への代謝が進むのに対し、MRE-269 は主代謝物として存在し、t_{max} よりも長い $t_{1/2}$ を示した。そのため、曝露量では、セレキシパグは MRE-269 の 0.3 倍程度であった。これらの知見から、ヒトにセレキシパグを投与したときの薬効発現の主体が MRE-269 であることに変わりはないものの、セレキシパグの作用が寄与する割合はラットより高い可能性が考えられた。これらのことを踏まえ、海外第 III 相試験（AC-065A302）ではセレキシパグと MRE-269 の AUC に両者の効力比を加味したものを本薬の曝露量（$AUC_{combined}$）として、有効性や安全性との関連を検討している（2.7.2.3.6.2 項参照）。

安全性薬理試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。また、その他の器官系に及ぼす影響として、腎・泌尿器系、胃腸管系、体性神経系、血液凝固系及び摘出子宮平滑筋に及ぼす影響についても検討した。

肺動脈性肺高血圧症患者への 1 日最大投与量は、1600 μg を 1 日 2 回（b.i.d.）である。海外第 I 相試験（AC-065-106）において、健康成人に NS-304（1600 μg、b.i.d.）を反復経口投与した 3 日目のセレキシパグの C_{max}（幾何平均値）及び $AUC_{0\text{-}12hr}$（幾何平均値）を 2 倍した値はそれぞれ 18.0 ng/mL 及び 88.0 ng·hr/mL、同じく MRE-269 のそれはそれぞれ 26.9 ng/mL 及び 276 ng·hr/mL であり（2.7.2.2.2.11 項参照）、安全域の算出にはこれらの値を用いた。

ラットを用いて中枢神経系について検討した結果、体温低下を除き 30 mg/kg の用量まで影響は認められず、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 41.7 倍、AUC 比で 34.1 倍、MRE-269 の C_{max} 比で 202 倍、AUC 比で 167 倍であった。ラットでの体温低下に関しては無影響量は 10 mg/kg であり、安全域は C_{max} 比でセレキシパグで 19.4 倍、MRE-269 で 58.4 倍であった。なお、一般状態観察で認められた皮膚の紅潮については臨床試験においてプロスタサイクリン関連有害事象として認め

られており（2.7.4.2.1.1（1）項参照）、セレキシパグの薬理作用である血管拡張作用に起因するものと考えられた。

イヌで認められた嘔吐（1 mg/kg 以上）、軟便（3 mg/kg 以上）及び下痢便（10 mg/kg）の消化器症状も、臨床試験においてプロスタサイクリン関連有害事象として認められている（2.7.4.2.1.1（1）項参照）。また、ラットでは小腸輸送能低下（10 mg/kg 以上）、胃液量及び胃液総酸度の減少（10 mg/kg 以上）が認められた。イヌで認められた嘔吐、ラットで認められた消化器症状は、それぞれ最低用量から作用が認められており安全域が算出できないものの、軟便に関しては無影響量は 1 mg/kg であり、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 55.6 倍、AUC 比で 22.7 倍、MRE-269 の C_{max} 比で 93.3 倍、AUC 比で 120 倍であった。また、下痢便に関しては無影響量は 3 mg/kg であり、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 230 倍、AUC 比で 102 倍、MRE-269 の C_{max} 比で 288 倍、AUC 比で 315 倍であった。さらに、摘出ラット胃底部を用いた試験においては、セレキシパグ及び MRE-269 は 1 mmol/L の濃度までカルバコール誘発胃底部平滑筋収縮力に影響を与えなかった（2.6.2.2.3.3 項参照）ことから、セレキシパグは胃に対する直接的な弛緩作用はないと考えられた。

心血管系において、セレキシパグの 10 μmol/L（=4966.2 ng/mL）の濃度まで hERG 電流には影響は認められず、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 276 倍であった。一方、モルモット摘出乳頭筋標本に対しては、30 μmol/L で APD_{90} の短縮が認められた。イヌ単回経口投与では、10 mg/kg の用量まで QT 延長は認められておらず、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 607 倍、AUC 比で 352 倍、MRE-269 の C_{max} 比で 646 倍、AUC 比で 721 倍であった。さらに、海外第 I 相試験（AC-065-106）における QT/QTc 評価試験においても、セレキシパグの QT 延長作用が陰性であることが確認された（2.7.2.2.2.11 項参照）。また、イヌ 2 週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.5 項参照）において、20 mg/kg 投与群において QTc の延長が認められているが、これは血液生化学的検査においてカリウムの低値が認められたことから、低カリウム血症による二次的な QTc 延長であり、セレキシパグによる直接作用ではないと考えられた。これらの結果から、セレキシパグがヒトで直接 QT 延長を引き起こすリスクは低いと考えられた。

イヌで認められた血圧低下作用については、セレキシパグの薬理作用である血管拡張作用に基づく変化と考えられた。また、心拍数の増加は血圧低下に伴う変化と考えられた。

イヌを用いて呼吸系に及ぼす影響を検討したところ、無影響量は 1 mg/kg であり、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 55.6 倍、AUC 比で 22.7 倍、MRE-269 の C_{max} 比で 93.3 倍、AUC 比で 120 倍であった。ラットを用いて呼吸系に及ぼす影響を検討したところ、無影響量は 10 mg/kg であり、安全域はセレキシパグの C_{max} 比で 19.4 倍、MRE-269 の C_{max} 比で 58.4 倍であった。

セレキシパグの血液凝固系に及ぼす影響をラットを用いて検討した結果、100 mg/kg の用量まで出血時間、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間には影響がなかった。

MRE-269 に関しては、さらに体性神経系及び摘出子宮平滑筋に対する作用を検討した。体性神経系に対しては 0.01%の濃度まで影響が認められておらず、安全域は C_{max} 比で 3720 倍であった。また、摘出子宮平滑筋に対する作用では、30 μmol/L 以上の濃度で自動運動の収縮回数の減少が認められたことから、無影響量は 10 μmol/L（=4195.2 ng/mL）であり、安全域は C_{max} 比で、156 倍であった。

これらの安全性薬理試験から、プロスタサイクリンに関連した事象を除いて臨床使用にあたり特別に注意を要する作用は認められなかった。

セレキシパグ及び MRE-269 は IP 受容体に選択的に作用して平滑筋弛緩作用を示し、肺動脈圧を低下させた。また、プロスタノイド構造の IP 受容体作動薬と異なり、セレキシパグは作用の減弱を起こしにくい作動薬であることが示唆された。これらの特徴から、セレキシパグは肺動脈性肺高血圧症治療薬として有用と考えられた。

2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1. 渡 健治, 黒瀬 等. β-アレスチンの生理的機能. 日薬理誌. 2013;141:53-4. ＜資料番号4.3-32＞
2. Miyano K, Sudo Y, Yokoyama A, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Takebayashi M, et al. History of the G protein–coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. J Pharmacol Sci. 2014;126:302-9. ＜資料番号 4.3-33＞
3. Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, Irie A, Negishi M, Narumiya S, et al. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. FEBS Lett. 1994;344:74-8. ＜資料番号 4.3-4＞
4. Sasaki Y, Usui T, Tanaka I, Nakagawa O, Sando T, Takahashi T, et al. Cloning and expression of a cDNA for rat prostacyclin receptor. Biochim Biophys Acta. 1994;1224:601-5. ＜資料番号 4.3-5＞
5. Wilson RJ, Giles H. Piglet saphenous vein contains multiple relaxatory prostanoid receptors: evidence for EP_4, EP_2, DP and IP receptor subtypes. Br J Pharmacol. 2005;144:405-15. ＜資料番号 4.3-6＞
6. Orie NN, Clapp LH. Role of prostanoid IP and EP receptors in mediating vasorelaxant responses to PGI_2 analogues in rat tail artery: Evidence for $G_{i/o}$ modulation via EP_3 receptors. Eur J Pharmacol. 2011;654:258-65. ＜資料番号 4.3-7＞
7. Fujio H, Nakamura K, Matsubara H, Fukushima Kusano K, Miyaji K, Nagase S, et al. Carvedilol inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. J Cardiovasc Pharmacol. 2006;47:250-5. ＜資料番号 4.3-8＞
8. Magnani B, Galie N. Prostacyclin in primary pulmonary hypertension. Eur Heart J. 1996;17:18-24. ＜資料番号 4.3-9＞
9. Lannan KL, Phipps RP, White RJ. Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. Drug Discovery Today. 2014;19:1230-5. ＜資料番号 4.3-10＞

10. Olsson KM, Delcroix M, Ghofrani HA, Tiede H, Huscher D, Speich R, et al. Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: Results from the comparative, prospective registry of newly initiated therapies for pulmonary hypertension (COMPERA). Circulation. 2014;129:57-65. ＜資料番号 4.3-11＞

11. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012;302:L363-9. ＜資料番号 4.3-12＞

12. Pankey EA, Bhartiya M, Badejo Jr AM, Haider U, Stasch JP, Murthy SN, et al. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60–2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;300:H792-802. ＜資料番号 4.3-13＞

13. Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007;82:109-18. ＜資料番号 4.3-14＞

14. Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. ScientificWorldJournal. 2007;7:1359-74. ＜資料番号 4.3-15＞

15. Frumkin LR. The Pharmacological treatment of pulmonary arterial hypertension. Pharmacol Rev. 2012;64:583-620. ＜資料番号 4.3-1＞

16. 渡邉裕司. ターニングポイントを迎えた肺高血圧症の薬物治療. 日薬理誌. 2014;143:165-72. ＜資料番号 4.3-16＞

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 28
2.6.3.4 安全性薬理試験 33
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用 38
2.6.3.6 参考文献 38

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

一覧表（1/4）

被験物質：selexipag、MRE-269

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
効力を裏付ける試験					
IP 受容体に対する作用	ラット組換え型 IP 受容体発現細胞の膜標品（結合親和性）	*in vitro*	日本新薬	PH-304-004	4.2.1.1-1（評価資料）
	ヒト組換え型 IP 受容体発現細胞の膜標品（結合親和性）	*in vitro*	日本新薬	N304-041105	4.2.1.1-2（評価資料）
	ヒト組換え型 IP 受容体発現細胞（cAMP）	*in vitro*	日本新薬	N304-100618	4.2.1.1-3（評価資料）
	ヒト組換え型 IP 受容体発現細胞（cAMP）	*in vitro*	Actelion Pharmaceuticals（スイス）	B-11.413	4.2.1.1-4（評価資料）
	ヒト肺動脈平滑筋細胞（細胞形態の変化）	*in vitro*	Actelion Pharmaceuticals（スイス）	B-14.046	4.2.1.1-5（評価資料）
プロスタノイド受容体に対する作用	ヒトプロスタノイド受容体サブタイプ発現細胞の膜標品（結合能）	*in vitro*	日本新薬	PH-304-003	4.2.1.1-6（評価資料）
	ヒト、ラット、イヌ IP、2 型及び 4 型 EP 受容体（EP_2、EP_4）発現細胞（cAMP）	*in vitro*	Actelion Pharmaceuticals（スイス）	B-13.096	4.2.1.1-7（評価資料）
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺葉内動脈標本	*in vitro*	日本新薬	N304-110209	4.2.1.1-8（評価資料）
	ラット摘出肺葉外及び肺葉内動脈標本	*in vitro*	日本新薬	P-09-057	4.2.1.1-9（参考資料）
	ラット摘出肺葉外及び肺葉内動脈標本	*in vitro*	日本新薬	P-09-056	4.2.1.1-10（参考資料）
	ラット摘出肺葉外及び肺葉内動脈標本	*in vitro*	日本新薬	P-09-058	4.2.1.1-11（参考資料）

IP 受容体：プロスタサイクリン受容体、cAMP：環状アデノシン一リン酸、EP 受容体：プロスタグランジン E_2 受容体

一覧表（2/4）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
摘出平滑筋標本に対する作用 （続き）	ラット摘出肺葉外及び肺葉内動脈標本	*in vitro*	日本新薬	P-09-059	4.2.1.1-12 （参考資料）
	ラット摘出肺葉外及び肺葉内動脈標本	*in vitro*	日本新薬	P-09-060	4.2.1.1-13 （参考資料）
	ラット摘出胃底部標本	*in vitro*	Actelion Pharmaceuticals（スイス）	B-09.363	4.2.1.1-14 （評価資料）
細胞増殖能に対する作用	ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞	*in vitro*	日本新薬	PH-304-001	4.2.1.1-15 （評価資料）
血小板凝集能に対する作用	ラット多血小板血漿	*in vitro*	日本新薬	N304-081110	4.2.1.1-16 （評価資料）
	ヒト多血小板血漿	*in vitro*	日本新薬	N304-081104	4.2.1.1-17 （評価資料）
肺高血圧モデルラットに対する作用	ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデル	*in vivo*	日本新薬	N304-050207	4.2.1.1-18 （評価資料）
	ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデル	*in vivo*	日本新薬	P-07-002	4.2.1.1-19 （参考資料）
	ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデル	*in vivo*	日本新薬	P-07-009	4.2.1.1-20 （参考資料）
	ラット U46619 誘発肺高血圧モデル	*in vivo*	日本新薬	PH-304-002	4.2.1.1-21 （評価資料）
	ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデル	*in vivo*	Actelion Pharmaceuticals（スイス）	B-13.066	4.2.1.1-22 （評価資料）
体血圧に対する作用	高血圧自然発症ラット	*in vivo*	Actelion Pharmaceuticals（スイス）	B-13.067	4.2.1.1-23 （評価資料）
副次的薬理試験					
酵素、他の受容体等に対する作用	組織、組換え型受容体等の発現細胞（酵素活性、結合能）	*in vitro*	[redacted]（台湾）	1009021/ 1028885	4.2.1.2-1 （参考資料）
	組織、組換え型受容体等の発現細胞（酵素活性、結合能）	*in vitro*	[redacted]（台湾）	1009473/ 1028885	4.2.1.2-2 （参考資料）
	組織、組換え型受容体等の発現細胞（酵素活性、結合能）	*in vitro*	[redacted]（台湾）	1005432/ 1018091	4.2.1.2-3 （参考資料）

一覧表（3/4）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
酵素、他の受容体等に対する作用（続き）	組織（酵素活性）	*in vitro*	[redacted]（台湾）	1009021/ 1018091	4.2.1.2-4 （参考資料）
	組織、組換え型受容体等の発現細胞（酵素活性、結合能）	*in vitro*	[redacted]（台湾）	1009473/ 1018091	4.2.1.2-5 （参考資料）
安全性薬理試験					
一般症状に及ぼす影響	ラット	経口	[redacted]	4812	4.2.1.3-1 （評価資料）
血漿中薬物濃度測定	ラット	経口	[redacted]	4813	4.2.1.3-2 （評価資料）
中枢神経系に及ぼす影響	ラット	経口	[redacted]	6225	4.2.1.3-3 （評価資料）
hERG 電流に及ぼす影響（セレキシパグ）	hERG チャネル安定発現 CHO- K1 細胞	*in vitro*	[redacted]	4814	4.2.1.3-4 （評価資料）
hERG 電流に及ぼす影響（MRE-269）	hERG チャネル安定発現 CHO- K1 細胞	*in vitro*	[redacted]	4815	4.2.1.3-5 （評価資料）
心血管系及び呼吸系に及ぼす影響	イヌ	経口	[redacted]	4811	4.2.1.3-6 （評価資料）
心筋活動電位に及ぼす影響	モルモット	*in vitro*	[redacted]	5615	4.2.1.3-7 （評価資料）
収縮力及び拍動数に及ぼす影響（セレキシパグ）	モルモット	*in vitro*	[redacted]	5614	4.2.1.3-8 （評価資料）
収縮力及び拍動数に及ぼす影響（MRE-269）	モルモット	*in vitro*	[redacted]	6061	4.2.1.3-9 （評価資料）
呼吸系に及ぼす影響	ラット	経口	[redacted]	5612	4.2.1.3-10 （評価資料）
腎・泌尿器系に及ぼす影響	ラット	経口	[redacted]	5613	4.2.1.3-11 （評価資料）
胃腸管系に及ぼす影響	ラット	経口、十二指腸内	[redacted]	6057	4.2.1.3-12 （評価資料）
体性神経系に及ぼす影響	モルモット	点眼	[redacted]	6060	4.2.1.3-13 （評価資料）

hERG：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子、CHO：チャイニーズハムスター卵巣

一覧表（4/4）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
血液凝固系に及ぼす影響	ラット	経口	[redacted]	6058	4.2.1.3-14 （評価資料）
子宮筋に及ぼす影響	ラット	*in vitro*	[redacted]	6059	4.2.1.3-15 （評価資料）
薬力学的薬物相互作用試験：該当試験なし					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 IP受容体に対する作用

2.6.3.2.1.1 ラットIP受容体を安定発現したCHO細胞膜標品への 10 nmol/L [^{3}H]iloprost結合実験

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績				試験番号
		適用濃度（nmol/L）		結合阻害率（%）[b]	Ki（nmol/L）[c]	（CTD 記載箇所）
IP 受容体（結合実験）	ラット組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞膜標品 [a]	セレキシパグ	30	0.29 ± 2.31	4098.4 ± 566.7	PH-304-004（4.2.1.1-1、評価資料）
			100	3.11 ± 2.42		
			300	5.60 ± 1.93		
			1000	11.63 ± 5.51		
			3000	24.74 ± 3.45		
			10000	60.11 ± 4.54		
			30000	84.39 ± 6.26		
			100000	92.97 ± 4.66		
		MRE-269	10	-5.48 ± 1.80	394.3 ± 13.0	
			30	-3.51 ± 6.68		
			100	7.99 ± 2.35		
			300	29.02 ± 2.35		
			1000	61.68 ± 1.74		
			3000	81.09 ± 3.42		
			10000	92.15 ± 5.62		
			30000	100.91 ± 2.05		
		ベラプロストナトリウム	1	-0.85 ± 1.76	40.4 ± 8.9	
			3	4.10 ± 2.13		
			10	15.37 ± 6.06		
			30	34.20 ± 6.22		
			100	58.41 ± 2.55		
			300	75.89 ± 4.41		
			1000	90.94 ± 3.83		
			3000	96.72 ± 3.38		

a：[^{3}H]iloprost 結合の Kd は 15.6 ± 3.2 nmol/L（平均値±標準誤差、n=3）であった。
b：結合阻害率は 3 例の平均値±標準誤差を表す。
c：Ki は 1 回の実験ごとに求め、3 例の平均値±標準誤差を表す。

2.6.3.2.1.2　ヒトIP受容体を安定発現したCHO細胞膜標品への 5 nmol/L [^{3}H]iloprost結合実験

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績				試験番号
		適用濃度（nmol/L）		結合阻害率（%）[b]	Ki（nmol/L）[c]	（CTD 記載箇所）
IP 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞膜標品 [a]	セレキシパグ	100	8.4 ± 3.6	263.0 ± 24.3	N304-041105（4.2.1.1-2、評価資料）
			300	33.9 ± 3.2		
			1000	66.2 ± 1.4		
			3000	87.6 ± 0.9		
			10000	96.6 ± 1.1		
			30000	99.0 ± 0.6		
		MRE-269	3	10.7 ± 1.2	19.8 ± 0.6	
			10	21.3 ± 0.7		
			30	38.2 ± 0.6		
			100	70.5 ± 2.1		
			300	89.4 ± 2.6		
			1000	95.4 ± 1.7		
			3000	98.9 ± 2.2		
		ベラプロストナトリウム	3	6.5 ± 4.0	39.0 ± 6.1	
			10	10.9 ± 4.8		
			30	23.3 ± 3.2		
			100	54.3 ± 2.5		
			300	80.9 ± 1.6		
			1000	94.0 ± 0.8		
			3000	98.9 ± 0.4		
		リマプロスト	1	9.9 ± 2.8	10.4 ± 1.6	
			3	16.8 ± 5.2		
			10	25.9 ± 6.3		
			30	60.0 ± 2.0		
			100	80.9 ± 2.7		
			300	91.5 ± 2.1		

a：[^{3}H]iloprost 結合の Kd は 4.07 ± 0.12 nmol/L（平均値±標準誤差、n=3）であった。
b：結合阻害率は 3 例の平均値±標準誤差を表す。
c：Ki は 1 回の実験ごとに求め、3 例の平均値±標準誤差を表す。

2.6.3.2.1.3　ヒトIP受容体を介した細胞内情報伝達系への作用

（1）　ヒト IP 受容体安定発現 CHO 細胞における cAMP 生成

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績				試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（nmol/L）		cAMP 量（pmol/well） [a]	EC_{50}（95%信頼区間）（nmol/L）	
IP 受容体（cAMP）	ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞	セレキシパグ	3	1.13 ± 0.187	76.7（63.7 - 89.7）	N304-100618（4.2.1.1-3、評価資料）
			10	3.76 ± 0.464		
			30	11.6 ± 1.27		
			100	48.4 ± 2.71		
			300	67.8 ± 1.75		
			1000	75.2 ± 3.52		
			3000	74.6 ± 4.31		
			10000	78.5 ± 1.83		
		MRE-269	0.3	1.70 ± 0.224	4.98（3.69 - 6.26）	
			1	7.89 ± 0.977		
			3	25.6 ± 2.35		
			10	60.0 ± 0.332		
			30	69.6 ± 3.02		
			100	78.7 ± 3.37		
			300	82.4 ± 2.25		
			1000	79.7 ± 5.69		
		ベラプロストナトリウム	0.3	2.63 ± 0.264	5.84（3.99 - 7.70）	
			1	9.29 ± 0.168		
			3	25.9 ± 1.06		
			10	54.0 ± 0.287		
			30	76.1 ± 1.51		
			100	86.6 ± 4.54		
			300	71.0 ± 1.72		
			1000	85.6 ± 4.09		

a：cAMP 量は 3 例の平均値±標準誤差を表す。試験物質非存在下での基礎値は、0.748 ± 0.0841 pmol/well であった。

（2） ヒト IP 受容体安定発現 CHO 細胞における cAMP 生成、β-アレスチンの動員及び IP 受容体の細胞内移行

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績						試験番号（CTD 記載箇所）
		試験物質	cAMP 生成（n=3）		β-アレスチンの動員（n=6）		IP 受容体の細胞内移行	
			EC_{50} [a]（nmol/L）	最大反応 [b]（%）	EC_{50} [a]（nmol/L）	最大反応 [b]（%）	最小有効濃度 [c]（nmol/L）	
IP 受容体（脱感作）	ヒト組換え型 IP 受容体を安定発現した CHO 細胞	セレキシパグ	36 ± 1.4	106 ± 26	794 ± 1.4	24 ± 6	na	B-11.413（4.2.1.1-4、評価資料）
		MRE-269	1.1 ± 1.2	110 ± 14	51 ± 1.8	40 ± 6	na	
		ベラプロストナトリウム	0.23 ± 1.2	93 ± 9	212 ± 1.6	90 ± 2	1000	
		トレプロスチニル	0.57 ± 1.3	103 ± 5	186 ± 1.4	67 ± 10	1000	
		イロプロスト	0.068 ± 1.4	100 ± 0	35 ± 1.7	100 ± 0	100	

a：幾何平均値±標準偏差、b：イロプロストの最大反応に対する百分率の算術平均値±標準偏差、c：100、1000 及び 10000 nmol/L で処置。
na：処置濃度では十分な細胞内移行が観察されなかったため判定できず。

（3） ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞の細胞形態の変化：インピーダンス法による解析

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）
		試験物質	EC_{50} [a]（nmol/L）	
IP 受容体（細胞形態の変化）	ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞	セレキシパグ	157 ± 1.3	B-14.046（4.2.1.1-5、評価資料）
		MRE-269	4.3 ± 1.2	
		ベラプロストナトリウム	2.1 ± 1.1	
		トレプロスチニル	3.6 ± 1.1	
		イロプロスト	0.12 ± 1.1	

a：幾何平均値±標準偏差（n=3）

2.6.3.2.2 プロスタノイド受容体に対する作用

2.6.3.2.2.1 ヒトプロスタノイド受容体サブタイプに対する結合実験

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績			試験番号
		適用濃度（μmol/L）		結合阻害率（%）[a]	（CTD 記載箇所）
IP 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 IP 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	59	PH-304-003（4.2.1.1-6、評価資料）
		MRE-269	1	85	
		イロプロスト	1	87	
DP 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 DP 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	8	
		MRE-269	1	9	
		プロスタグランジン D_2	1	68	
EP_1 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 EP_1 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	2	
		MRE-269	1	1	
		プロスタグランジン E_2	1	91	
EP_2 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 EP_2 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	10	
		MRE-269	1	4	
		プロスタグランジン E_2	1	80	
EP_3 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 EP_3 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	6	
		MRE-269	1	7	
		プロスタグランジン E_2	1	99	
EP_4 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 EP_4 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	10	
		MRE-269	1	10	
		プロスタグランジン E_2	1	95	
FP 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 FP 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	8	
		MRE-269	1	5	
		プロスタグランジン $F_{2\alpha}$	1	93	
TP 受容体（結合実験）	ヒト組換え型 TP 受容体発現細胞膜標品	セレキシパグ	1	-4	
		MRE-269	1	6	
		ICI192605	10	71	

DP 受容体：プロスタグランジン D_2 受容体、FP 受容体：プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 受容体、TP 受容体：トロンボキサン A_2 受容体
a：結合阻害率は 2 例の平均値を表す。

2.6.3.2.2.2　ヒト、ラット及びイヌのIP、EP_2及びEP_4受容体を介したcAMP生成量に対する作用

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績				試験番号（CTD 記載箇所）
		試験物質	EC_{50}[a]（nmol/L）			
			ヒト	ラット	イヌ	
IP 受容体（cAMP）	組換え型 IP 受容体を安定発現した HEK293 細胞	セレキシパグ	250 ± 1.2	7200 ± 1.4	19000 ± 1.9	B-13.096（4.2.1.1-7、評価資料）
		MRE-269	6.1 ± 1.1	110 ± 1.2	500 ± 1.1	
		イロプロスト	0.13 ± 1.1	0.17 ± 1.3	0.18 ± 1.1	
EP_2受容体（cAMP）	組換え型 EP_2受容体を安定発現した HEK293 細胞	セレキシパグ	作用なし	作用なし	作用なし	
		MRE-269	8700 ± 1.1	11000 ± 1.2	31000 ± 1.0	
		PGE_2	2.6 ± 1.3	4.4 ± 1.4	4.9 ± 1.7	
EP_4受容体（cAMP）	組換え型 EP_4受容体を安定発現した HEK293 細胞	セレキシパグ	作用なし	作用なし	作用なし	
		MRE-269	作用なし	作用なし	660 ± 1.3	
		PGE_2	0.051 ± 2.4	0.021 ± 2.4	0.24 ± 1.1	

HEK293 細胞：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
a：幾何平均値±標準偏差（n=2～3）

2.6.3.2.3　摘出平滑筋標本に対する作用

2.6.3.2.3.1　ラット摘出肺葉内動脈標本

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	試験系	試験成績				試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）		弛緩率（%）[a]	IC_{50}（μmol/L）	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺葉内動脈（内皮除去）標本	セレキシパグ	0.01	0.8 ± 0.3	11（95%信頼区間：10～12）	N304-110209（4.2.1.1-8、評価資料）
			0.03	1.8 ± 0.6		
			0.1	3.0 ± 0.5		
			0.3	4.2 ± 0.6		
			1	6.0 ± 0.7		
			3	17.5 ± 1.7		
			10	45.1 ± 3.0		
			30	80.5 ± 2.3		
		MRE-269	0.01	2.2 ± 0.4	2.7（95%信頼区間：2.4～3.1）	
			0.03	4.1 ± 0.7		
			0.1	6.3 ± 1.0		
			0.3	9.1 ± 1.3		
			1	23.9 ± 2.8		
			3	52.9 ± 4.2		
			10	79.5 ± 4.0		
			30	95.6 ± 1.2		

a：平均値±標準誤差（n=7）

2.6.3.2.3.2　ラット摘出肺葉外標本及び肺葉内動脈標本

被験物質：MRE-269

［MRE-269］

試験項目	試験系	試験成績							試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	弛緩率[a]（%）						
			肺葉外動脈（EPA）			肺葉内動脈（SIPA）			
			内皮（＋）	内皮（－）	内皮（＋）	内皮（＋）	内皮（－）	内皮（＋）	
			L-NAME（－）	L-NAME（－）	L-NAME（＋）[b]	L-NAME（－）	L-NAME（－）	L-NAME（＋）[c]	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺動脈標本	0.001	3.8 ± 2.2（7）	1.8 ± 0.7（7）	2.8 ± 0.9（8）	2.1 ± 0.5（8）	1.5 ± 1.0（7）	0.6 ± 0.5（8）	P-09-057（4.2.1.1-9、参考資料）
		0.003	2.2 ± 2.2（7）	4.4 ± 1.4（7）	4.5 ± 1.1（8）	2.3 ± 0.7（8）	2.4 ± 0.9（7）	0.1 ± 0.8（8）	
		0.01	6.7 ± 3.2（7）	5.9 ± 0.9（7）	6.9 ± 1.5（8）	2.7 ± 1.3（8）	5.4 ± 1.3（7）	1.1 ± 1.2（8）	
		0.03	6.4 ± 3.0（7）	8.3 ± 1.7（7）	8.9 ± 1.7（8）	1.3 ± 2.2（8）	8.1 ± 2.0（7）	1.7 ± 1.5（8）	
		0.1	7.4 ± 4.0（7）	10.3 ± 1.4（7）	11.9 ± 3.0（8）	2.5 ± 2.7（8）	11.4 ± 3.4（7）	2.7 ± 1.8（8）	
		0.3	11.1 ± 5.1（7）	11.4 ± 1.7（7）	13.2 ± 3.4（8）	5.5 ± 3.2（8）	13.1 ± 2.4（7）	5.2 ± 2.0（8）	
		1	39.9 ± 10.3（7）	28.4 ± 2.5（7）	33.2 ± 3.6（8）	26.2 ± 3.6（8）	30.4 ± 3.7（7）	17.2 ± 2.8（8）	
		3	69.0 ± 6.0（7）	62.7 ± 4.3（7）	65.3 ± 3.3（8）	53.0 ± 4.2（8）	56.0 ± 4.9（7）	44.3 ± 4.3（8）	
		10	90.0 ± 2.3（7）	86.2 ± 2.3（7）	82.6 ± 2.0（8）	79.4 ± 3.3（8）	82.8 ± 3.2（7）	77.8 ± 3.9（8）	
		30	95.2 ± 1.4（7）	94.2 ± 0.9（7）	88.7 ± 1.8（8）	90.1 ± 1.6（8）	92.4 ± 2.3（7）	87.9 ± 2.7（8）	
		最大弛緩（%）	96.7（95%信頼区間：87.0～106.4）	96.3（95%信頼区間：91.2～101.3）	90.1（95%信頼区間：84.8～95.4）	93.5（95%信頼区間：86.1～101.0）	100.1（95%信頼区間：89.9～111.4）	92.6（95%信頼区間：85.4～99.9）	

L-NAME：NG-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride（一酸化窒素合成酵素阻害薬）、a：平均値±標準誤差（例数）、b：100 μmol/L 、c：10 μmol/L

［ベラプロストナトリウム］

試験項目	試験系	試験成績						試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	弛緩率[a]（%）					
			肺葉外動脈（EPA）			肺葉内動脈（SIPA）		
			内皮（＋）L-NAME（－）	内皮（－）L-NAME（－）	内皮（＋）L-NAME（＋）[b]	内皮（＋）L-NAME（－）	内皮（－）L-NAME（－）	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺動脈標本	0.001	0.6 ± 2.7（8）	1.8 ± 0.5（8）	1.9 ± 0.6（9）	1.6 ± 0.7（8）	1.2 ± 0.2（7）	P-09-056（4.2.1.1-10、参考資料）
		0.003	1.1 ± 2.5（8）	3.6 ± 0.7（8）	2.5 ± 0.7（9）	1.4 ± 1.0（8）	3.7 ± 1.0（7）	
		0.01	3.1 ± 2.8（8）	5.9 ± 1.0（8）	4.7 ± 1.3（9）	2.2 ± 1.6（8）	4.4 ± 0.4（7）	
		0.03	2.1 ± 2.7（8）	8.1 ± 1.6（8）	6.1 ± 1.6（9）	2.7 ± 2.3（8）	6.1 ± 0.6（7）	
		0.1	11.8 ± 4.5（8）	12.3 ± 1.5（8）	9.6 ± 3.1（9）	7.9 ± 3.1（8）	10.5 ± 1.1（7）	
		0.3	35.3 ± 8.3（8）	22.1 ± 4.3（8）	18.0 ± 6.8（9）	17.4 ± 3.4（8）	16.5 ± 1.6（7）	
		1	58.5 ± 8.2（8）	36.3 ± 5.4（8）	27.8 ± 7.9（9）	30.3 ± 3.8（8）	26.1 ± 2.2（7）	
		3	73.4 ± 4.9（8）	42.8 ± 6.4（8）	39.4 ± 8.1（9）	37.8 ± 3.8（8）	30.4 ± 3.6（7）	
		10	77.8 ± 4.4（8）	49.2 ± 6.6（8）	45.7 ± 8.2（9）	36.1 ± 3.6（8）	31.1 ± 3.7（7）	
		30	74.1 ± 4.9（8）	48.5 ± 6.4（8）	44.5 ± 7.8（9）	28.9 ± 3.4（8）	27.9 ± 3.2（7）	
		最大弛緩（%）	76.6（95%信頼区間：69.6～83.7）	50.5（95%信頼区間：42.1～58.9）	47.6（95%信頼区間：34.6～60.6）	34.3（95%信頼区間：30.7～38.0）	30.5（95%信頼区間：27.3～33.6）	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：100 μmol/L

［イロプロスト］

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	弛緩率[a]（%）				
			肺葉外動脈（EPA）		肺葉内動脈（SIPA）		
			内皮（＋）	内皮（－）	内皮（＋）	内皮（－）	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺動脈標本	0.001	0.5 ± 1.3（6）	2.0 ± 0.9（6）	2.8 ± 1.1（7）	1.0 ± 0.5（7）	P-09-058（4.2.1.1-11、参考資料）
		0.003	0.8 ± 1.8（6）	4.1 ± 1.1（6）	1.3 ± 1.0（7）	2.7 ± 0.9（7）	
		0.01	5.2 ± 3.1（6）	9.0 ± 2.6（6）	1.6 ± 1.3（7）	4.4 ± 1.0（7）	
		0.03	8.0 ± 5.1（6）	13.2 ± 3.7（6）	2.8 ± 1.6（7）	6.7 ± 1.0（7）	
		0.1	24.5 ± 6.5（6）	23.0 ± 5.1（6）	12.8 ± 3.1（7）	12.5 ± 0.9（7）	
		0.3	53.4 ± 9.5（6）	43.6 ± 6.8（6）	29.2 ± 2.9（7）	22.5 ± 1.2（7）	
		1	66.2 ± 8.5（6）	66.6 ± 3.9（6）	44.6 ± 3.4（7）	39.6 ± 1.9（7）	
		3	74.8 ± 7.0（6）	76.9 ± 2.4（6）	57.5 ± 3.0（7）	51.9 ± 2.1（7）	
		10	80.3 ± 6.4（6）	85.9 ± 1.3（6）	68.5 ± 2.5（7）	63.1 ± 2.3（7）	
		30	82.0 ± 6.3（6）	89.5 ± 0.8（6）	73.5 ± 2.3（7）	69.2 ± 3.1（7）	
		最大弛緩（%）	80.6（95%信頼区間：72.2～89.0）	91.0（95%信頼区間：84.0～98.0）	75.5（95%信頼区間：69.3～81.7）	74.1（95%信頼区間：68.3～78.0）	

a：平均値±標準誤差（例数）

［エポプロステノールナトリウム］

試験項目	試験系	試験成績							試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	弛緩率[a]（%）						
			肺葉外動脈（EPA）			肺葉内動脈（SIPA）			
			内皮（＋）	内皮（－）	内皮（＋）	内皮（＋）	内皮（－）	内皮（＋）	
			L-NAME（－）	L-NAME（－）	L-NAME（＋）[b]	L-NAME（－）	L-NAME（－）	L-NAME（＋）[c]	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺動脈標本	0.01	13.5 ± 3.0（7）	1.9 ± 0.7（6）	1.3 ± 0.4（7）	3.0 ± 0.8（7）	1.8 ± 0.3（7）	0.4 ± 0.7（7）	P-09-059（4.2.1.1-12、参考資料）
		0.1	43.7 ± 8.2（7）	16.2 ± 3.0（6）	17.3 ± 1.7（7）	22.5 ± 3.0（7）	7.2 ± 0.6（7）	11.1 ± 2.4（7）	
		1	58.8 ± 8.5（7）	26.2 ± 3.9（6）	27.1 ± 2.4（7）	39.8 ± 3.0（7）	15.0 ± 0.8（7）	22.8 ± 4.4（7）	
		10	25.1 ± 11.8（7）	-6.0 ± 5.1（6）	-1.2 ± 2.4（7）	0.9 ± 7.3（7）	0.5 ± 1.3（7）	-0.4 ± 2.2（7）	
		最大弛緩[d]（%）	58.8 ± 8.5	26.2 ± 3.9	27.1 ± 2.4	39.8 ± 3.0	15.0 ± 0.8	22.8 ± 4.4	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：100 μmol/L、c：10 μmol/L、d：弛緩作用が最も強い 1 μmol/L での弛緩率を最大弛緩とした。

［トレプロスチニル］

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	弛緩率[a]（%）				
			肺葉外動脈（EPA）		肺葉内動脈（SIPA）		
			内皮（＋）L-NAME（－）	内皮（－）L-NAME（－）	内皮（＋）L-NAME（＋）[b]	内皮（＋）L-NAME（－）	内皮（－）L-NAME（－）	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出肺動脈標本	0.001	2.7 ± 1.9（9）	1.7 ± 0.9（8）	1.0 ± 0.3（8）	0.9 ± 1.4（8）	1.7 ± 0.5（7）	P-09-060（4.2.1.1-13、参考資料）
		0.003	1.8 ± 2.6（9）	5.4 ± 2.2（8）	1.2 ± 0.3（8）	0.3 ± 1.9（8）	3.8 ± 1.2（7）	
		0.01	0.8 ± 2.1（9）	7.6 ± 1.7（8）	2.4 ± 0.5（8）	0.6 ± 2.2（8）	5.9 ± 1.5（7）	
		0.03	2.5 ± 1.2（9）	10.6 ± 2.3（8）	3.6 ± 0.6（8）	1.7 ± 2.4（8）	8.3 ± 2.1（7）	
		0.1	22.2 ± 4.8（9）	15.5 ± 2.3（8）	6.9 ± 0.7（8）	7.1 ± 2.9（8）	11.9 ± 2.6（7）	
		0.3	42.8 ± 6.0（9）	24.0 ± 3.3（8）	12.6 ± 2.0（8）	22.5 ± 3.2（8）	19.3 ± 3.4（7）	
		1	67.2 ± 3.1（9）	37.6 ± 4.4（8）	31.4 ± 4.9（8）	42.0 ± 3.7（8）	30.4 ± 4.7（7）	
		3	75.2 ± 2.1（9）	49.0 ± 5.0（8）	48.1 ± 5.1（8）	49.6 ± 3.8（8）	39.7 ± 5.2（7）	
		10	78.0 ± 1.7（9）	54.9 ± 5.0（8）	55.7 ± 5.5（8）	53.0 ± 3.8（8）	45.2 ± 5.4（7）	
		30	78.4 ± 1.9（9）	58.4 ± 4.9（8）	63.1 ± 4.6（8）	52.0 ± 4.3（8）	47.8 ± 5.5（7）	
		最大弛緩（%）	78.6（95%信頼区間：74.4～82.8）	62.4（95%信頼区間：51.3～73.4）	63.7（95%信頼区間：56.0～71.4）	52.6（95%信頼区間：48.5～56.8）	51.0（95%信頼区間：39.9～62.0）	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：100 μmol/L

2.6.3.2.3.3　ラット摘出胃底部標本

被験物質：selexipag、MRE-269

［セレキシパグ、MRE-269］

試験項目	試験系	試験成績							試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	収縮率[a]（%）						
			媒体対照	セレキシパグ	セレキシパグ +CAY10441[b]	媒体対照	MRE-269	MRE-269 +CAY10441[b]	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出胃底部標本	0.01	0.058 ± 0.201（4）	-0.845 ± 0.569（4）		0.067 ± 0.574（4）	-0.142 ± 0.09（4）		B-09.363（4.2.1.1-14、評価資料）
		0.1	-0.78 ± 0.726（4）	-0.377 ± 0.825（4）		-0.19 ± 0.234（4）	-1.11 ± 0.614（4）		
		1	-0.338 ± 0.295（4）	-1.42 ± 0.777（4）		-0.501 ± 0.448（4）	-1.225 ± 0.535（4）		
		10	-0.278 ± 0.647（4）	-3.395 ± 0.993（4）		-0.49 ± 0.616（4）	-3.71 ± 1.143（4）		
		100	-0.783 ± 0.339（4）	-3.735 ± 1.272（4）		-0.48 ± 0.806（4）	-4.823 ± 1.279（4）		
		0.01		-0.888 ± 0.344（6）	-0.002 ± 0.828（6）		0.493 ± 0.589（6）	-0.925 ± 0.596（6）	
		0.1		-1.442 ± 0.611（6）	-0.737 ± 1.122（6）		-0.315 ± 0.647（6）	-0.065 ± 1.785（6）	
		1		-5.882 ± 1.399（6）	-3.497 ± 1.206（6）		-1.627 ± 0.995（6）	-2.42 ± 0.394（6）	
		10		-12.777 ± 2.716（6）	-7.013 ± 1.241（6）		-7.077 ± 2.225（6）	-4.99 ± 0.81（6）	
		100		-13.847 ± 2.868（6）	-7.79 ± 1.168（6）		-8.513 ± 2.59（6）	-6.353 ± 0.833（6）	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：3 μmol/L（IP 受容体拮抗薬）

［イロプロスト］

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	収縮率[a]（%）				
			イロプロスト	イロプロスト + DBTSA[b]	イロプロスト	イロプロスト + CAY10441[c]	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出胃底部標本	0.001	0.76 ± 0.287（5）	-0.382 ± 0.193（5）	0.144± 0.455（5）	-0.928 ± 0.392（5）	B-09.363（4.2.1.1-14、評価資料）
		0.01	7 ± 1.024（5）	-0.062 ± 0.172（5）	7.788± 1.906（5）	6.566 ± 1.669（5）	
		0.1	21.58 ± 0.9（5）	3.41 ± 2.243（5）	26.22 ± 6.149（5）	18.38 ± 2.343（5）	
		1	39.86 ± 2.209（5）	12.51 ± 4.206（5）	44.42 ± 8.78（5）	32.44 ± 2.994（5）	
		10	51.68 ± 3.671（5）	23.6 ± 1.977（5）	55.16 ± 10.554（5）	39.58 ± 2.954（5）	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：10 μmol/L｛EP_3受容体拮抗薬［（2E）-3-（3',4'-dichlorobiphenyl-2-yl）-N-（2-thienylsulfonyl）acrylamide］｝、c：3 μmol/L

［ベラプロストナトリウム］

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	収縮率[a]（%）				
			ベラプロストナトリウム	ベラプロストナトリウム+ DBTSA[b]	ベラプロストナトリウム	ベラプロストナトリウム+ CAY10441[c]	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出胃底部標本	0.001	-0.308 ± 0.193（5）	-0.168 ± 0.094（5）	-0.348 ± 0.226（5）	-0.232 ± 0.281（5）	B-09.363（4.2.1.1-14、評価資料）
		0.01	-0.386 ± 0.3 （5）	-0.252 ± 0.066（5）	-0.11 ± 0.425（5）	0.14 ± 0.517（5）	
		0.1	3.678 ± 1.95 （5）	-0.198 ± 0.2 （5）	1.178 ± 1.383（5）	4.978 ± 0.915（5）	
		1	18.76 ± 5.131（5）	1.822 ± 0.872（5）	20.08 ± 3.331（5）	23.58 ± 2.793（5）	
		10	46.8 ± 7.807（5）	5.546 ± 1.066（5）	51.44 ± 6.783（5）	46.32 ± 6.687（5）	
		100	48 ± 8.436（5）	7.6 ± 1.068（5）	51.86 ± 6.688（5）	46.68 ± 8.523（5）	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：10 μmol/L、c：3 μmol/L

［トレプロスチニル］

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）	収縮率[a]（%）				
			トレプロスチニル	トレプロスチニル＋DBTSA[b]	トレプロスチニル	トレプロスチニル＋CAY10441[c]	
摘出平滑筋標本に対する作用	ラット摘出胃底部標本	0.01	-8.018 ± 1.726（5）	-0.284 ± 0.085（5）	-4.823 ± 2.297（6）	-2.92 ± 1.101（6）	B-09.363（4.2.1.1-14、評価資料）
		0.1	-9.126 ± 1.715（5）	-0.342 ± 0.108（5）	-6.525 ± 2.596（6）	-2.797 ± 1.386（6）	
		1	-5.988 ± 1.404（5）	-0.27 ± 0.137（5）	-1.225 ± 1.977（6）	3.368 ± 0.745（6）	
		10	1.662 ± 0.811（5）	0.28 ± 0.205（5）	8.283 ± 1.769（6）	13.217 ± 1.034（6）	
		100	12.66 ± 0.719（5）	1.524 ± 0.285（5）	19.517 ± 2.761（6）	25.283 ± 3.048（6）	

a：平均値±標準誤差（例数）、b：10 μmol/L、c：3 μmol/L

2.6.3.2.4　細胞増殖能に対する作用

2.6.3.2.4.1　ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞への[^{3}H]thymidineの取り込み

被験物質：MRE-269

試験項目	試験系	試験成績				試験番号（CTD 記載箇所）
		PDGF（10 ng/mL）	適用濃度（μmol/L）		[^{3}H]Thymidine の取り込み量[a]（cpm）	
[^{3}H]thymidine の取り込みに対する作用	ヒト初代培養肺動脈平滑筋細胞	－	MRE-269	0	218 ± 14	PH-304-001（4.2.1.1-15、評価資料）
		＋		0	921 ± 26[b]	
		＋		0.003	817 ± 59	
		＋		0.01	767 ± 63[c]	
		＋		0.03	794 ± 55[c]	
		＋		0.1	635 ± 24[d]	
		＋		0.3	587 ± 46[d]	
		＋		1	367 ± 22[d]	
		＋		3	223 ± 15[d]	

PDGF：血小板由来成長因子
a：平均値±標準誤差（n=6）
b：P<0.01（Student’s t-test、PDGF（－）との比較）
c：P<0.05、d：P<0.01（Williams の多重比較法、PDGF（+）の MRE-269 0 μmol/L との比較）

2.6.3.2.5　血小板凝集能に対する作用

2.6.3.2.5.1　ラット及びヒトの多血小板血漿を用いたアデノシンニリン酸（ADP）惹起凝集反応に対するMRE-269 の影響

被験物質：MRE-269

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		適用濃度（μmol/L）		曲線下面積値 [a]		IC_{50}（95%信頼区間）	
血小板凝集反応に対する作用	ラット多血小板血漿	MRE-269	0	2174	2884	2715	8.3（6.0～11）μmol/L	N304-081110（4.2.1.1-16、評価資料）
			0.3	2175	2595	2792		
			1	1875	2801	2740		
			3	1584	2909	2133		
			10	455	1402	1637		
			30	45	120	598		
			100	182	148	206		
		ベラプロストナトリウム	0	3170	3293	3076	0.063（0.047～0.080）μmol/L	
			0.003	2804	3383	3062		
			0.01	2573	3628	2998		
			0.03	1975	3438	2801		
			0.1	668	470	1177		
			0.3	136	185	292		
			1	331	194	172		
	ヒト多血小板血漿	MRE-269	0	5058	5139	4987	69（57～82）nmol/L	N304-081104（4.2.1.1-17、評価資料）
			0.003	4414	4904	5086		
			0.01	4756	4691	4580		
			0.03	5043	4104	3907		
			0.1	2213	1586	991		
			0.3	602	302	237		
			1	81	48	114		
		ベラプロストナトリウム	0	4880	4779	4986	5.8（5.3～6.4）nmol/L	
			0.0003	5082	4772	4814		
			0.001	4878	4746	4713		
			0.003	4710	3945	4065		
			0.01	1115	607	840		
			0.03	221	76	210		
			0.1	27	60	56		

a：ラットに 10 μmol/L ADP、ヒトに 2.5 μmol/L ADP で多血小板血漿の凝集を惹起したときの 7 分間の透過度の曲線下面積（3 例の個別値）を凝集反応の指標とした。

2.6.3.2.6　肺高血圧モデルラットに対する作用

2.6.3.2.6.1　モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの右心肥大に対するセレキシパグの反復経口投与の影響

被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績			試験番号（CTD 記載箇所）
		モノクロタリン（40 mg/kg）[a]	反復経口投与（1 日 2 回、19 日間）	RV/（LV+S）比 [c]	
右心肥大に対する作用	モノクロタリン誘発肺高血圧ラット（SD 系、雄性）	－	媒体[b]	0.3002 ± 0.0040	N304-050207（4.2.1.1-18、評価資料）
		＋	媒体[b]	0.6127 ± 0.0237[d]	
		＋	セレキシパグ（1 mg/kg）	0.4710 ± 0.0185[e]	
		＋	ベラプロストナトリウム（0.1 mg/kg）	0.4806 ± 0.0258[e]	

a：モノクロタリン（＋）又は生理食塩水（－）を皮下投与、b：0.5 % メチルセルロース水溶液
c：左心室壁及び中隔（LV+S）に対する右心室壁（RV）の湿重量比の平均値±標準誤差（n=12）
d：P<0.01（Welch-test、モノクロタリン（－）との比較）、e：P<0.01（Dunnett の多重比較、モノクロタリン（＋）の媒体投与との比較）

2.6.3.2.6.2　モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺小動脈肥厚に対するセレキシパグの反復経口投与の影響

被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績			試験番号（CTD 記載箇所）
		モノクロタリン（40 mg/kg）[a]	反復経口投与（1 日 2 回、19 日間）	肺小動脈肥厚（%）[c]	
肺小動脈肥厚に対する作用	モノクロタリン誘発肺高血圧ラット（SD 系、雄性）	－	媒体[b]	16.2 ± 1.0（8）	P-07-002（4.2.1.1-19、参考資料）
		＋	媒体[b]	32.2 ± 2.5（10）[d]	
		＋	セレキシパグ（1 mg/kg）	23.5 ± 1.5（10）[e]	

a：モノクロタリン（＋）又は生理食塩水（－）を皮下投与、b：0.5 % メチルセルロース水溶液
c：［（血管壁の厚さ×2）/血管の外径］×100 の平均値±標準誤差（例数）
d：P<0.01（Welch-test、モノクロタリン（－）との比較）、e：P<0.01（t-test、モノクロタリン（＋）の媒体投与との比較）

2.6.3.2.6.3　モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの生存に対するセレキシパグの反復経口投与の影響

被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績			試験番号（CTD 記載箇所）
		動物番号	生存日数 [a]		
			媒体	セレキシパグ	
生存率に対する作用	モノクロタリン誘発肺高血圧ラット（SD 系、雄性）	1	45	45	P-07-009（4.2.1.1-20、参考資料）
		2	29	31	
		3	34	23	
		4	45	45	
		5	33	45	
		6	23	45	
		7	31	45	
		8	30	27	
		9	28	25	
		10	25	45	
		11	45	29	
		12	24	27	
		13	32	25	
		14	25	45	
		15	36	45	
		16	31	45	
		17	45	45	
		18	45	31	
		19	25	33	
		20	25	34	
		21	37	33	
		22	30	45	
		23	32	45	
		24	31	36	
		25	45	34	
		26	44	45	
		27	45	45	
		28	45	30	
		29	22	45	
		30	35	45	

a：モノクロタリン（60 mg/kg）を皮下投与し、引き続き媒体（0.5 % メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（1 mg/kg）を 1 日 2 回、46 日間反復経口投与した。モノクロタリン処置開始 45 日後まで観察し、最終日に生存している動物は 45 日と記録した。

2.6.3.2.6.4　U46619 誘発肺高血圧ラットで増加した右心室圧に対するセレキシパグの単回十二指腸内投与の影響

被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績								試験番号（CTD 記載箇所）
		測定項目	試験物質	U46619　持続静脈内投与						
				-	+					
					媒体又はセレキシパグ投与後の経過時間（分）					
					0	0	30	60	90	
				実測値（mmHg 又は bpm）[a]		投与前値からの変化率 [b]（%）				
収縮期の右心室圧、体血圧及び心拍数に対する作用	U46619 誘発肺高血圧ラット（SD 系、雄性）	収縮期の右心室圧	媒体対照	38.1 ± 0.7	48.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.9 ± 1.8	2.3 ± 2.3	1.4 ± 2.2	PH-304-002（4.2.1.1-21、評価資料）
			セレキシパグ	38.5 ± 1.1	51.6 ± 0.5	0.0 ± 0.0	-12.8 ± 1.0 [c]	-13.8 ± 1.6 [c]	-13.4 ± 2.2 [c]	
		体血圧	媒体対照	89.8 ± 3.3	94.4 ± 2.1	0.0 ± 0.0	0.9 ± 1.8	0.3 ± 1.6	1.7 ± 2.2	
			セレキシパグ	84.4 ± 1.4	93.0 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.1 ± 1.4	1.1 ± 1.3	2.0 ± 1.7	
		心拍数	媒体対照	431.6 ± 9.7	422.6 ± 8.4	0.0 ± 0.0	0.1 ± 1.0	0.6 ± 1.3	-0.1 ± 1.5	
			セレキシパグ	398.5 ± 9.9	405.5 ± 11.8	0.0 ± 0.0	2.0 ± 1.1	4.2 ± 1.5	3.3 ± 1.5	

結果は平均値±標準誤差（n=8）で示す。

a：収縮期の右心室圧及び体血圧は mmHg、心拍数は bpm

b：媒体（0.5 % メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（3 mg/kg）の単回十二指腸内投与前値（0 分）からの変化率。

c：P<0.01（Student’s t-test、媒体対照の変化率との比較）

2.6.3.2.6.5　モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺動脈圧に対するセレキシパグの反復経口投与の影響

［Day 1 から Day 5 の投与前の肺動脈圧及び心拍数］　被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績							試験番号（CTD 記載箇所）
		測定項目	試験物質 [a]	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
肺動脈圧及び心拍数に対する作用	モノクロタリン誘発肺高血圧ラット（Wistar 系、雄性）	朝							B-13.066（4.2.1.1-22、評価資料）
		肺動脈圧 [b]（mmHg）	媒体対照	61 ± 2	58 ± 2	58 ± 2	56 ± 1	56 ± 2	
			セレキシパグ	63 ± 3	64 ± 2	64 ± 3	63 ± 2	63 ± 3	
		心拍数 [c]（bpm）	媒体対照	392 ± 11	376 ± 11	371 ± 9	359 ± 12	363 ± 16	
			セレキシパグ	396 ± 5	404 ± 14	397 ± 7	388 ± 11	387 ± 17	
		夕							
		肺動脈圧 [b]（mmHg）	媒体対照	58 ± 2	57 ± 2	56 ± 2	55 ± 2	53 ± 2	
			セレキシパグ	63 ± 3	62 ± 2	61 ± 2	63 ± 3	61 ± 2	
		心拍数 [c]（bpm）	媒体対照	373 ± 9	371 ± 7	358 ± 6	349 ± 10	339 ± 8	
			セレキシパグ	404 ± 9	397 ± 5	382 ± 13	375 ± 14	376 ± 14	

a：媒体（0.5 % メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（10 mg/kg）を朝夕の 1 日 2 回、5 日間経口投与する群。
b：投与前 1 時間あたりの肺動脈圧の平均値（mmHg）を平均値±標準誤差（n=7-8）で表す。
c：投与前 1 時間あたりの心拍数の平均値（bpm）を平均値±標準誤差（n=7-8）で表す。

［Day 1 から Day 5 の投与後の肺動脈圧の最大変化量］　被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績							試験番号（CTD 記載箇所）
		測定項目	試験物質 [a]	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
肺動脈圧に対する作用	モノクロタリン誘発肺高血圧ラット（Wistar 系、雄性）	朝							
		肺動脈圧 [b]（mmHg）	媒体対照	0 ± 3	-3 ± 1	-1 ± 1	2 ± 2	-2 ± 2	B-13.066（4.2.1.1-22、評価資料）
			セレキシパグ	-9 ± 3	-16 ± 2	-6 ± 2	-11 ± 2	-10 ± 2	
		夕							
		肺動脈圧 [b]（mmHg）	媒体対照	2 ± 2	-1 ± 1	0 ± 1	1 ± 3	0 ± 1	
			セレキシパグ	-6 ± 2	-9 ± 3	-2 ± 1	-7 ± 1	-9 ± 4	

a：媒体（0.5 % メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（10 mg/kg）を朝夕の 1 日 2 回、5 日間経口投与。
b：投与後の各時点の 5 分間あたりの肺動脈圧を投与前の 1 時間あたりの平均値から差し引き、最大変化時点の変化量を平均値±標準誤差（n=7～8）で表す。

2.6.3.2.7　体血圧に対する作用

2.6.3.2.7.1　高血圧自然発症ラットの体血圧に対するセレキシパグの反復経口投与の影響

［Day 1 から Day 5 の投与後の体血圧の最大変化量］　被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績							試験番号（CTD 記載箇所）
		測定項目	試験物質 [a]	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
体血圧に対する作用	高血圧自然発症ラット（SHR、雄性）	朝							
		体血圧 [b]（mmHg）	媒体対照	10 ± 4	22 ± 5	-4 ± 7	3 ± 4	-2 ± 6	B-13.066（4.2.1.1-22、評価資料）
			セレキシパグ	-11 ± 7	-21 ± 6	-19 ± 5	-16 ± 5	-17 ± 4	
		夕							
		体血圧 [b]（mmHg）	媒体対照	12 ± 4	3 ± 9	-5 ± 3	-2 ± 5	11 ± 2	
			セレキシパグ	-20 ± 3	-15 ± 4	-21 ± 3	-15 ± 5	-20 ± 3	

a：媒体（0.5 % メチルセルロース水溶液）又はセレキシパグ（10 mg/kg）を朝夕の 1 日 2 回、5 日間経口投与。
b：投与後の各時点の 5 分間あたりの体血圧を投与前の 1 時間あたりの平均値から差し引き、最大変化時点の変化量を平均値±標準誤差（n=4～6）で表す。

＜混餌による反復経口投与＞　被験物質：selexipag

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		経過日数	体血圧（mmHg）[a]		心拍数（bpm）[a]		
			対照[c]	セレキシパグ[d]	対照[c]	セレキシパグ[d]	
体血圧及び心拍数に対する作用	高血圧自然発症ラット（SHR、雄性）	Day 0[b]	170 ± 3	171 ± 4	313 ± 5	326 ± 6	B-13.067（4.2.1.1-23、評価資料）
		Day 1	168 ± 3	172 ± 3	312 ± 5	324 ± 6	
		Day 2	167 ± 3	171 ± 4	308 ± 6	322 ± 7	
		Day 3	170 ± 2	171 ± 4	306 ± 5	319 ± 6	
		Day 4	170 ± 3	171 ± 3	312 ± 5	326 ± 6	
		Day 5	171 ± 3	170 ± 4	310 ± 5	329 ± 6	
		Day 6	172 ± 3	168 ± 4	318 ± 4	324 ± 7	
		Day 7	174 ± 3	171 ± 4	314 ± 4	321 ± 6	
		Day 8	171 ± 3	166 ± 5	314 ± 5	335 ± 6	
		Day 9	173 ± 3	163 ± 4	313 ± 5	333 ± 5	
		Day 10	174 ± 4	160 ± 4	313 ± 4	327 ± 6	
		Day 11	173 ± 3	161 ± 3	317 ± 5	322 ± 7	
		Day 12	173 ± 4	158 ± 3	311 ± 6	337 ± 5	
		Day 13	172 ± 3	150 ± 3	313 ± 7	331 ± 5	
		Day 14	172 ± 3	149 ± 4	314 ± 6	319 ± 7	
		Day 15	171 ± 3	143 ± 3	308 ± 6	312 ± 8	
		Day 16	173 ± 4	159 ± 6	312 ± 7	295 ± 11	
		Day 17	173 ± 4	169 ± 6	314 ± 5	297 ± 8	
		Day 17.75	170 ± 3	170 ± 5	295 ± 10	290 ± 10	

a：体血圧及び心拍数は 6 時間の平均値とし、各日の 0、0.25、0.5 及び 0.75 day のうち、Day 0～Day 17 は 0 時点の体血圧及び心拍数を抜粋して平均値±標準誤差（対照 n=7、セレキシパグ n=8）で表す。最終は Day 17.75 のデータを示す。

b：投与開始 1 日目を Day 0 としており、Day 0 の 0 時点の体血圧と心拍数は投与前値を表す。投与開始前の 24 時間あたりの対照群及びセレキシパグ群の体血圧（平均値±標準誤差）は、それぞれ 167 ± 3（n=7）及び 170 ± 3（n=8）mmHg であった。
心拍数については、それぞれ 295 ± 4（n=7）及び 303 ± 8（n=8）bpm であった。

c：対照は粉末飼料を与えた。

d：セレキシパグを粉末飼料に加え、混餌投与で 4 日ごとに増量した。すなわち、Day 0～Day 3 に 10 mg/kg/day、Day 4～Day 7 に 30 mg/kg/day、Day 8～Day 11 に 100 mg/kg/day 及び Day 12～Day 15 に 300 mg/kg/day とし、その後の Day 16～Day 17 は 0 mg/kg/day として粉末飼料を与えた。

［トレプロスチニルの持続静脈内投与］

試験項目	試験系	試験成績					試験番号（CTD 記載箇所）
		経過時間	体血圧（mmHg）[a]		心拍数（bpm）[a]		
			対照 [b]	トレプロスチニル [c]	対照 [b]	トレプロスチニル [c]	
体血圧及び心拍数に対する作用	高血圧自然発症ラット（SHR、雄性）	-40	159 ± 3（15）	159 ± 3（15）	346 ± 10（15）	341 ± 8（15）	B-13.067（4.2.1.1-23、評価資料）
		-30	165 ± 3（15）	164 ± 3（15）	336 ± 5（15）	329 ± 6（15）	
		-20	156 ± 3（15）	155 ± 3（15）	297 ± 7（15）	289 ± 6（15）	
		-10	163 ± 3（13）	166 ± 4（13）	340 ± 6（13）	341 ± 6（13）	
		-1	165 ± 3（10）	167 ± 2（10）	319 ± 7（10）	326 ± 9（10）	
		0					
		5	165 ± 3（11）	143 ± 3（11）	400 ± 7（11）	389 ± 12（11）	
		6	164 ± 3（15）	132 ± 3（15）	392 ± 9（15）	381 ± 8（15）	
		7	162 ± 3（15）	131 ± 3（15）	394 ± 9（15）	376 ± 8（15）	
		8	160 ± 3（15）	130 ± 3（15）	386 ± 10（15）	385 ± 8（15）	
		9	156 ± 3（15）	130 ± 3（15）	375 ± 8（15）	386 ± 8（15）	
		10	154 ± 3（15）	133 ± 2（15）	366 ± 8（15）	379 ± 9（15）	
		15	149 ± 3（15）	137 ± 2（15）	333 ± 8（15）	355 ± 11（15）	
		20	155 ± 3（15）	143 ± 3（15）	328 ± 7（15）	344 ± 7（15）	
		25	156 ± 4（15）	147 ± 3（15）	332 ± 7（15）	362 ± 9（15）	
		30	159 ± 3（15）	151 ± 4（15）	355 ± 7（15）	374 ± 8（15）	
		35	166 ± 3（15）	155 ± 3（15）	364 ± 10（15）	361 ± 9（15）	
		40	163 ± 2（15）	161 ± 4（15）	338 ± 11（15）	362 ± 12（15）	
		45	161 ± 3（15）	160 ± 3（15）	324 ± 10（15）	351 ± 10（15）	

a：体血圧及び心拍数を投与前の-42 時間から投与後 48 時間後までの 1 時間ごとのデータから抜粋して、平均値±標準誤差（例数）で表す。
投与開始（0 時間）から 5 時間までの間は、持続静脈内投与のためのポンプ装着などのため、データなし。
b：媒体：ジメチルホルムアミド/リン酸緩衝液（5 μL/hr）、c：トレプロスチニル（30 μg/kg/hr）

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 酵素、他の受容体等に対する作用

（1/5）

被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目		試験系	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）
			セレキシパグ（μmol/L）	阻害率（%）		MRE-269（μmol/L）	阻害率（%）	
シクロオキシゲナーゼ	COX-1	ヒト血小板				10	87	1005432/1018091（4.2.1.2-3、参考資料）
			10	-19	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	3	1009021/1018091（4.2.1.2-4、参考資料）
			1	-16		1	5	
			0.1	16		0.1	0	
	COX-2	ヒト組換え型 COX-2 を発現した Sf9 昆虫細胞	10	10		10	8	1005432/1018091（4.2.1.2-3、参考資料）
ホスホジエステラーゼ	PDE-3	ヒト血小板	10	29		100	49	
トロンボキサン合成酵素	－	ヒト血小板	10	3		10	23	
アデノシン受容体	A_1	ヒト組換え型アデノシン A_1 受容体を発現した CHO 細胞	10	30		10	42	
	A_{2A}	ヒト組換え型アデノシン A_{2A} 受容体を発現した HEK293 細胞	10	-3		10	3	
	A_{2B}	ヒト組換え型アデノシン A_{2B} 受容体を発現した HEK293 細胞				10	6	
アドレナリン受容体	α_{1A}	Wistar ラット顎下腺	10	-15	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	-2	
	α_{1B}	Wistar ラット肝臓	10	4		10	13	
	α_{1D}	ヒト組換え型 α_{1D} アドレナリン受容体を発現した HEK293 細胞	10	9		10	-5	
	α_{2A}	ヒト組換え型 α_{2A} アドレナリン受容体を発現した Sf9 昆虫細胞	10	1		10	7	
	α_{2B}	ヒト組換え型 α_{2B} アドレナリン受容体を発現した CHO-K1 細胞	10	1		10	2	
	β_1	ヒト組換え型 β_1 アドレナリン受容体を発現した Rex 16 細胞	10	-2		10	25	

COX：シクロオキシゲナーゼ、PDE：ホスホジエステラーゼ

（2/5）

試験項目		試験系	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）
			セレキシパグ（μmol/L）	阻害率（%）		MRE-269（μmol/L）	阻害率（%）	
アドレナリン受容体（続き）	β_2	ヒト組換え型 β_2 アドレナリン受容体を発現した CHO-NBR1 細胞	10	1	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	-10	1005432/1018091（4.2.1.2-3、参考資料）
ノルエピネフリントランスポーター	—	ヒト組換え型ノルエピネフリントランスポーターを発現した MDCK 細胞	10	17		10	36	
ブラジキニン受容体	B_1	ヒト Hs729 細胞	10	-1		10	18	
	B_2	ヒト組換え型ブラジキニン B_2 受容体を発現した CHO-K1 細胞	10	7		10	6	
カルシウムチャネル	L	Wistar ラット脳（ベンゾチアゼピン結合部位）	10	-3		10	-10	
	L	Wistar ラット大脳皮質（ジヒドロピリジン結合部位）	10	10		10	9	
	N	Wistar ラット脳（前頭葉）	10	1		10	11	
ドパミン受容体	D_1	ヒト組換え型ドパミン D_1 受容体を発現した CHO 細胞	10	-6		10	13	
	D_{2L}	ヒト組換え型ドパミン D_{2L} 受容体を発現した CHO 細胞	10	-10		10	1	
	D_3	ヒト組換え型ドパミン D_3 受容体を発現した CHO 細胞	10	12		10	5	
	$D_{4.2}$	ヒト組換え型ドパミン $D_{4.2}$ 受容体を発現した CHO 細胞	10	-7		10	-19	
ドパミントランスポーター	—	ヒト組換え型ドパミントランスポーターを発現した CHO 細胞	10	11		10	17	
エンドセリン受容体	ET_A	ヒト組換え型エンドセリン ET_A 受容体を発現した CHO 細胞	10	-4		10	3	
	ET_B	ヒト組換え型エンドセリン ET_B 受容体を発現した CHO 細胞	10	-11		10	8	
上皮成長因子受容体	EGF	ヒト A431 細胞	10	1		10	5	
エストロゲン受容体	ERα	ヒト組換え型エストロゲン受容体 α を発現した Sf9 昆虫細胞	10	-6		10	-15	

（3/5）

試験項目		試験系	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）
			セレキシパグ（μmol/L）	阻害率（%）		MRE-269（μmol/L）	阻害率（%）	
GABA トランスポーター	－	Wistar ラット大脳皮質	10	13	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	17	1005432/1018091（4.2.1.2-3、参考資料）
GABA 受容体	$GABA_A$	Wistar ラット脳（小脳を除く）（アゴニスト結合部位）	10	-3		10	1	
	$GABA_A$	Wistar ラット脳（小脳を除く）（ベンゾジアゼピン結合部位）	10	-13		10	-28	
	$GABA_B$	Wistar ラット脳	10	9		10	18	
グルココルチコイド受容体	－	ヒト Hela S3 細胞	10	15		10	27	
グルタミン酸受容体	Kainate	Wistar ラット脳（小脳を除く）（カイニン酸結合部位）	10	-9		10	8	
	NMDA	Wistar ラット大脳皮質（アゴニスト結合部位）	10	3		10	-1	
	NMDA	Wistar ラット大脳皮質（グリシン結合部位）	10	-7		10	-1	
	NMDA	Wistar ラット大脳皮質（フェンサイクリジン結合部位）	10	-8		10	-4	
ヒスタミン受容体	H_1	モルモット小脳	10	12		10	10	
	H_2	Duncan Hartley モルモット線条体	10	8		10	-3	
	H_3	Wistar ラット脳	10	-1		10	-6	
イミダゾリン受容体	I_2	Wistar ラット大脳皮質	10	8		10	7	
インターロイキン受容体	IL-1α	マウス 3T3 細胞	10	0		10	3	
ロイコトリエン B_4 受容体	－	ヒト U937 細胞	10	26		10	19	
ロイコトリエン D_4 受容体	－	Duncan Hartley モルモット肺	10	-2		10	-5	
ムスカリン性アセチルコリン受容体	M_1	ヒト組換え型 M_1 アセチルコリン受容体を発現した Sf9 昆虫細胞	10	-1		10	-3	
	M_2	ヒト組換え型 M_2 アセチルコリン受容体を発現した Sf9 昆虫細胞	10	-2		10	-2	
	M_3	ヒト組換え型 M_3 アセチルコリン受容体を発現した Sf9 昆虫細胞	10	-2		10	4	

GABA：γ-アミノ酪酸、NMDA：N-メチル-D-アスパラギン酸

（4/5）

試験項目		試験系	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）
			セレキシパグ（μmol/L）	阻害率（%）		MRE-269（μmol/L）	阻害率（%）	
ニューロペプチド Y 受容体	Y_1	ヒト組換え型 Y_1 ニューロペプチド Y 受容体を発現した SK-N-MC 細胞	10	11	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	2	1005432/1018091（4.2.1.2-3、参考資料）
	Y_2	ヒト KAN-TS 神経芽細胞腫細胞	10	1		10	1	
ニコチン性アセチルコリン受容体	－	Wistar ラット脳	10	-1		10	15	
オピオイド受容体	δ	ヒト組換え型 δ オピオイド受容体を発現した CHO 細胞	10	36		10	25	
	κ	ヒト組換え型 κ オピオイド受容体を発現した HEK-293 細胞	10	-5		10	7	
	μ	ヒト組換え型 μ オピオイド受容体を発現した CHO-K1 細胞	10	11		10	11	
ホルボルエステル受容体	－	ICR マウス脳	10	1		10	-1	
血小板活性化因子受容体	PAF	ヒト血小板	10	-12				
		New Zealand White ウサギ血小板				10	-10	
カリウムチャネル	K_{ATP}	Syrian ハムスター膵臓 β 細胞 HIT-T15 細胞	10	5		10	-3	
プロスタグランジン E_2 受容体	EP_1	ヒト組換え型 1 型プロスタグランジン E_2 受容体を発現した HEK-293 細胞	10	42		10	43	
			10	42				
			1	1		1	4	
			1	1				
			0.1	3		0.1	-9	
			0.1	3				
	EP_4	ヒト組換え型 4 型プロスタグランジン E_2 受容体を発現した HEK-293 細胞				10	96	
						1	75	
						0.1	24	
プリン受容体	P_{2X}	New Zealand White ウサギ膀胱	10	23	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	10	
	P_{2Y}	Wistar ラット脳	10	-19		10	-4	

(5/5)

試験項目		試験系	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）	試験成績		試験番号（CTD 記載箇所）
			セレキシパグ（μmol/L）	阻害率（%）		MRE-269（μmol/L）	阻害率（%）	
セロトニン受容体	5-HT_{1A}	ヒト組換え型 5-HT_{1A} 受容体を発現した CHO 細胞	10	6	1009021/1028885（4.2.1.2-1、参考資料）	10	9	1005432/1018091（4.2.1.2-3、参考資料）
	5-HT_{2A}	ヒト組換え型 5-HT_{2A} 受容体を発現した CHO-K1 細胞	10	3		10	14	
	5-HT_3	ヒト組換え型 5-HT_3 受容体を発現した HEK-293 細胞	10	6		10	-1	
セロトニントランスポーター	—	ヒト組換え型セロトニントランスポーターを発現した HEK-293 細胞	10	-17		10	-7	
シグマ受容体	σ_1	ヒト Jurkat 細胞	10	1		10	-3	
	σ_2	Wistar ラット脳	10	-7		10	-7	
ナトリウムチャネル	Site 2	Wistar ラット脳	10	23		10	28	
タキキニン受容体	NK_1	ヒト組換え型 NK_1 受容体を発現した CHO 細胞	10	2		10	4	
テストステロン受容体	—	ラット組換え型テストステロン受容体を発現した大腸菌	10	4		10	18	
トロンボキサン A_2 受容体	TxA_2	ヒト組換え型トロンボキサン A_2 受容体を発現した HEK-293 EBNA 細胞	10	72				
		New Zealand White ウサギ血小板				10	56	
フォスフォリパーゼ A_2	PLA_2-I	ブタ膵臓	10	25	1009473/1028885（4.2.1.2-2、参考資料）	10	25	1009473/1018091（4.2.1.2-5、参考資料）
	PLA_2-II	ヘビ	10	-1		10	10	
トロンボキサン A_2 受容体	TxA_2	ヒト組換え型トロンボキサン A_2 受容体を発現した HEK-293 EBNA 細胞	10	70		10	50	
			1	13		1	5	
			0.1	6		0.1	4	

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

（1/2）

被験物質：selexipag

<table>
<tr><th>試験項目</th><th>動物種/
系統</th><th>投与方法</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>性別及び
動物数/群</th><th>特記すべき所見</th><th>GLP
適用</th><th>試験番号
（CTD 記載箇所）</th></tr>
<tr><td>一般症状
（Irwin 変法）</td><td>ラット/
SD(IGS)</td><td>経口</td><td>0, 10, 30, 100</td><td>雄　6</td><td>100 mg/kg：皮膚紅潮、円背位姿勢、受動性低下、爪先立ち歩行、体温低下傾向、正向反射において“体側部からの着地”、姿勢において“長時間に亘り後肢で立つ”、呼吸深大、軟便、針金動作において“後肢で掴めない”、体重増加抑制</td><td>適</td><td>4812
（4.2.1.3-1、
評価資料）</td></tr>
<tr><td>トキシコキネティクス測定</td><td>ラット/
SD(IGS)</td><td>経口</td><td>10, 30, 100</td><td>雄　4/時点</td><td>血漿中セレキシパグの薬物動態パラメータ
<table>
<tr><th>投与量
(mg/kg)</th><th>C_{max}
(μg/mL)</th><th>t_{max}
(hr)</th><th>$AUC_{0\text{-}24hr}$
(μg·hr/mL)</th></tr>
<tr><td>10</td><td>0.35</td><td>0.5</td><td>0</td></tr>
<tr><td>30</td><td>0.75</td><td>1</td><td>3</td></tr>
<tr><td>100</td><td>3.26</td><td>1</td><td>19</td></tr>
</table>
血漿中MRE-269の薬物動態パラメータ
<table>
<tr><th>投与量
(mg/kg)</th><th>C_{max}
(μg/mL)</th><th>t_{max}
(hr)</th><th>$AUC_{0\text{-}24hr}$
(μg·hr/mL)</th></tr>
<tr><td>10</td><td>1.57</td><td>1</td><td>12</td></tr>
<tr><td>30</td><td>5.43</td><td>2</td><td>46</td></tr>
<tr><td>100</td><td>13.15</td><td>1</td><td>196</td></tr>
</table></td><td>適</td><td>4813
（4.2.1.3-2、
評価資料）</td></tr>
</table>

C_{max}：最高血漿中濃度、t_{max}：最高血漿中薬物濃度到達時間、$AUC_{0\text{-}24hr}$：投与開始から 24 hr までの血漿中濃度時間曲線下面積

（2/2）

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
正常体温	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	30 mg/kg≦：体温低下	適	6225（4.2.1.3-3、評価資料）
ヘキソバルビタール誘発睡眠	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	100 mg/kg：睡眠時間の延長	適	
痛覚	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	100 mg/kg：圧刺激に対する回避反応閾値の上昇	適	

2.6.3.4.2　心血管系に及ぼす影響

（1/3）　被験物質：selexipag、MRE-269

試験項目	動物種/系統	投与方法	適用量（μmol/L）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
hERG 電流（セレキシパグ）	hERG チャネル安定発現 CHO-K1 細胞	*in vitro*	0, 3, 10, 30, 100	6例	30 μmol/L：hERG電流を適用前値の85.2%へ低下させた 100 μmol/L：灌流開始後10分までホールセル状態を維持できなかった	適	4814（4.2.1.3-4、評価資料）
hERG電流（MRE-269）	hERG チャネル安定発現 CHO-K1 細胞	*in vitro*	0, 3, 10, 30	6例	影響なし	適	4815（4.2.1.3-5、評価資料）

（2/3）

<table>
<tr><th>試験項目</th><th>動物種/
系統</th><th>投与方法</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>性別及び
動物数/群</th><th>特記すべき所見</th><th>GLP
適用</th><th>試験番号
（CTD 記載箇所）</th></tr>
<tr><td>心血管系</td><td>イヌ
/Beagle</td><td>経口</td><td>0, 1, 3, 10</td><td>雄　4</td><td>一般状態
1 mg/kg≦：嘔吐、3 mg/kg≦：摂餌量の減少、軟便
10 mg/kg：下痢便（ゼリー状便）

心電図
1 mg/kg≦：QT間隔の短縮
PR間隔、QRS持続時間、QTc影響なし

血圧
1 mg/kg≦：平均血圧低下、拡張期血圧低下
3 mg/kg≦：収縮期血圧低下

心拍数
3 mg/kg≦：増加

＜トキシコキネティクス測定＞
血漿中セレキシパグの薬物動態パラメータ
<table>
<tr><th>投与量
(mg/kg)</th><th>C_{max}
(μg/mL)</th><th>t_{max}
(hr)</th><th>$AUC_{0\text{-}24hr}$
(μg·hr/mL)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>1.00</td><td>1</td><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td>4.14</td><td>1</td><td>9</td></tr>
<tr><td>10</td><td>10.93</td><td>1</td><td>31</td></tr>
</table>
血漿中MRE-269の薬物動態パラメータ
<table>
<tr><th>投与量
(mg/kg)</th><th>C_{max}
(μg/mL)</th><th>t_{max}
(hr)</th><th>$AUC_{0\text{-}24hr}$
(μg·hr/mL)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>2.51</td><td>3</td><td>33</td></tr>
<tr><td>3</td><td>7.75</td><td>3</td><td>87</td></tr>
<tr><td>10</td><td>17.39</td><td>3</td><td>199</td></tr>
</table>
</td><td>適</td><td>4811
（4.2.1.3-6、
評価資料）</td></tr>
</table>

（3/3）

試験項目	動物種/系統	投与方法	適用量（μmol/L）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
摘出乳頭筋標本	モルモット/Slc:Hartley	*in vitro*	0, 10, 30, 100	6例	10 μmol/L≦：APD_{30}短縮 30 μmol/L≦：APD_{90}短縮 100 μmol/L：静止膜電位上昇、活動電位振幅減少	適	5615（4.2.1.3-7、評価資料）
摘出右心房標本（セレキシパグ）	モルモット/Slc:Hartley	*in vitro*	0, 3, 10, 30, 100	6例	100 μmol/L：収縮力増加、拍動数増加	適	5614（4.2.1.3-8、評価資料）
摘出右心房標本（MRE-269）	モルモット/Slc:Hartley	*in vitro*	0, 3, 10, 30, 100	6例	30 μmol/L：収縮力増加	適	6061（4.2.1.3-9、評価資料）

APD_{30}：30%再分極時活動電位持続時間、APD_{90}：90%再分極時活動電位持続時間

2.6.3.4.3 呼吸系に及ぼす影響

被験物質：selexipag

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
呼吸機能	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	30 mg/kg≦：1分間呼吸数増加、1回換気量増加、分時換気量増加	適	5612（4.2.1.3-10、評価資料）
呼吸系	イヌ/Beagle	経口	0, 1, 3, 10	雄　4	3 mg/kg≦：呼吸数増加 ヘモグロビン酸素飽和度：影響なし	適	4811（4.2.1.3-6、評価資料）

2.6.3.4.4　その他の器官系に及ぼす影響

2.6.3.4.4.1　腎・泌尿器系

被験物質：selexipag

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
尿量、尿中電解質、浸透圧	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	10 mg/kg≦：尿中Cl^-排泄量減少、Na^+/K^+比減少 30 mg/kg≦：尿量減少、尿中Na^+排泄量減少	適	5613（4.2.1.3-11、評価資料）

2.6.3.4.4.2　胃腸管系

被験物質：selexipag

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
小腸輸送能	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	10 mg/kg≦：炭末移行率減少	適	6057（4.2.1.3-12、評価資料）
胃液分泌	ラット/Crl:CD(SD)	十二指腸内	0, 10, 30, 100	雄　6	10 mg/kg≦：胃液量減少、胃液総酸度減少 100 mg/kg：胃液pH上昇	適	

2.6.3.4.4.3　体性神経系

被験物質：MRE-269

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量（%）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
表面麻酔作用	モルモット/Slc:Hartley	点眼	0, 0.001, 0.003, 0.01	雄　6	影響なし	適	6060（4.2.1.3-13、評価資料）

2.6.3.4.4.4　血液凝固系

被験物質：selexipag

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
出血時間	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	影響なし	適	6058（4.2.1.3-14、評価資料）
凝固能	ラット/Crl:CD(SD)	経口	0, 10, 30, 100	雄　6	影響なし	適	

2.6.3.4.4.5　摘出子宮平滑筋

被験物質：MRE-269

試験項目	動物種/系統	投与方法	適用量（μmol/L）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
摘出子宮標本	ラット/Crl:CD(SD)	*in vitro*	0, 10, 30, 100	雌　6	30 μmol/L≦：収縮回数減少 （100 μmol/L：自動運動消失6例中2例）	適	6059（4.2.1.3-15、評価資料）

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用

該当試験なし。

2.6.3.6　参考文献

なし。