2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

小野薬品工業株式会社

目次

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表.....3
2.6.1　緒言.....3

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

イバブラジン塩酸塩（以下，本薬）は，仏国の Les Laboratories Servier 社（以下，Servier 社）の研究施設（Institut de Recherches Servier）で創出された，過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル（HCN チャネル）遮断薬であり，心臓の洞結節における電気的興奮の頻度を規定する過分極活性化陽イオン電流（funny current，I_f）を抑制し，心拍数を減少させる．

本薬の構造式を図 2.6.1-1 に示す．

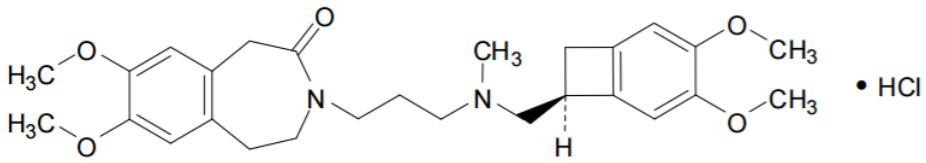


図 2.6.1-1 イバブラジン塩酸塩の構造式

本薬は，2005 年に欧州で安定狭心症の治療薬として承認された．その後，慢性心不全を対象とした開発が行われ，2012 年に欧州，2015 年に米国で慢性心不全の治療薬として承認された．現在，世界 122 の国又は地域で安定狭心症あるいは慢性心不全の適応で承認を取得している（2018 年 7 月現在）．

小野薬品工業株式会社は，2011 年に Servier 社と本薬のライセンス契約を締結し，本邦における慢性心不全での臨床開発を行い，今回申請するに至った．本申請における効能又は効果並びに用法及び用量の案は以下のとおりである．

【効能又は効果】（案）
洞調律かつ投与開始時の安静時心拍数が 75 回/分以上の慢性心不全
ただし、β遮断薬を含む慢性心不全の標準的な治療を受けている患者に限る。

【用量及び用法】（案）
通常、成人にはイバブラジンとして、1 回 2.5mg を 1 日 2 回食後経口投与から開始する。開始後は忍容性をみながら、目標とする安静時心拍数が維持できるように、必要に応じ、2 週間以上の間隔で段階的に用量を増減する。1 回投与量は 2.5、5 又は 7.5mg のいずれかとし、いずれの投与量においても、1 日 2 回食後経口投与とする。なお、患者の状態により適宜減量する。

2.6.2 薬理試験の概要文

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.3 副次的薬理試験 37
2.6.2.4 安全性薬理試験 41
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 58
2.6.2.6 考察及び結論 63
2.6.2.7 参考文献 72

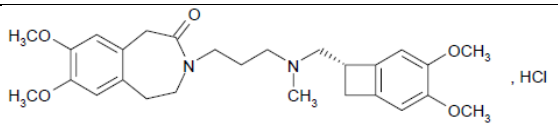
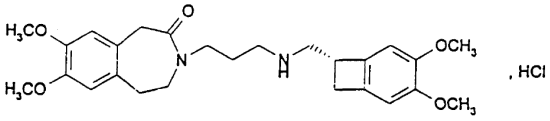
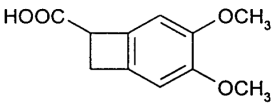
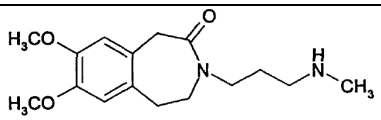
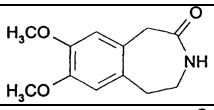
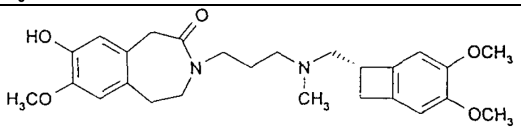
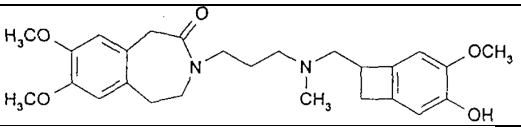
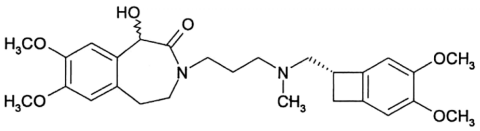
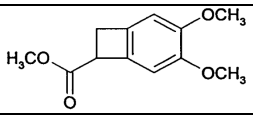
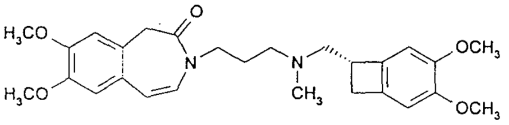
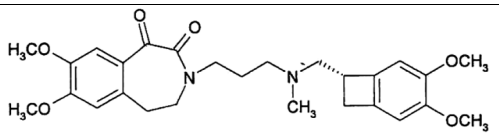
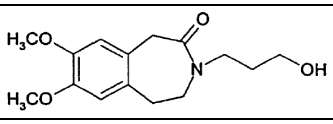
略号一覧

略号	内容又は日本語名称
ACE	アンジオテンシン変換酵素
ANP	心房性ナトリウム利尿ペプチド
AT1 受容体	アンジオテンシンⅡ　1 型受容体
APD30	30%再分極までの活動電位持続時間
APD50	50%再分極までの活動電位持続時間
APD70	70%再分極までの活動電位持続時間
APD75	75%再分極までの活動電位持続時間
APD90	90%再分極までの活動電位持続時間
AUC24h	投与後 24 時間までの濃度－時間曲線下面積
CHO 細胞	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞
Cmax	最高血漿中濃度
DT	E 波の減速時間
ERG	網膜電図
GABA	γ-アミノ酪酸
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	グリア線維酸性タンパク質
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HCN チャネル	過分極活性化型環状ヌクレオチド依存性チャネル
HEK293 細胞	ヒト胎児腎臓由来細胞株
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{30}	30%阻害濃度
IC_{50}	50%阻害濃度
$I_{Ca,L}$	L 型カルシウムイオン電流
$I_{Ca,T}$	T 型カルシウムイオン電流
I_f 及び I_h	過分極活性化陽イオン電流（心臓：I_f，心臓以外：I_h）
I_K	遅延整流カリウムイオン電流
I_{Kr}	急速活性型遅延整流カリウムイオン電流
I_{Ks}	緩徐活性型遅延整流カリウムイオン電流
I_{Kx}	M 様カリウムイオン電流
IP_3	イノシトール三リン酸
IL-6	インターロイキン 6
$K_{0.5}$	50%阻害濃度
K_i	阻害定数
LVdP/dt	左室内圧速度
$LVdP/dt_{max}$	左室内圧立ち上がりの最大速度
$LVdP/dt_{min}$	左室内圧下降脚の最大速度
LVEF	左室駆出率
LVESPVR	左室収縮末期圧容積関係
LVEDPVR	左室拡張末期圧容積関係
mRNA	メッセンジャーRNA
NT-proBNP	脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント
E/A	左室流入血流速波形における拡張早期波と心房収縮期波のピーク流速の比
PKC	プロテインキナーゼ C
proANP	心房性ナトリウム利尿ペプチド前駆体

2.6.2 薬理試験の概要文
イバブラジン塩酸塩

略号	内容又は日本語名称
PR 間隔	心電図 PR 間隔（房室伝導時間）
QRS 幅	Q 波の始まりから S 波の終わりまでの間隔
QT 間隔	Q 波の始まりから T 波の終わりまでの間隔
QTc	心拍数で補正した QT
QTcB	Bazett の補正式により心拍数で補正した QT
QTcF	Fridericia の補正式により心拍数で補正した QT
RAAS	レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系
SD 系ラット	Sprague-Dawley 系ラット
SERCA2a	筋小胞体-滑面小胞体カルシウムアデノシントリフォスファターゼ
SHIFT	Systolic Heart failure treatment with the I_f inhibitor Ivabradine Trial
%SS	局所心筋短縮率
ST	S 波の終りから T 波の始まりまでの部分
Tmax	最高血漿中濃度到達時間
TNF-α	腫瘍壊死因子アルファ
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
WT	野生型

関連化合物の一覧

名称	構造	説明及びその他の名称
イバブラジン塩酸塩		S 16257
ONO-IN-306		代謝物（非開裂体），S 18982
M3		代謝物（開裂体）
M9		代謝物（開裂体）
M10		代謝物（開裂体）
M22b		代謝物（非開裂体）
M26b		代謝物（非開裂体）
M28		代謝物（非開裂体）
M30		代謝物（開裂体）
M31		代謝物（非開裂体）
M32		代謝物（非開裂体）
Y492		代謝物（開裂体）

2.6.2 薬理試験の概要文

各試験において，イバブラジン塩酸塩（以下，イバブラジン）あるいはフリー体を使用したが，本資料では，用量及び薬物濃度はすべてフリー体の量として表記した．

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

イバブラジンは，正常ラットにおいて，単回経口投与で心拍数を用量に応じて減少させ，反復経口投与で 10 日目においても初回投与と同程度に心拍数を減少させた．また，心拍数の減少に応じて一回拍出係数を増加させ，心係数は維持あるいはわずかな低下に留まった．

イバブラジンは，麻酔下ブタにおいて，心拍数を用量に応じて減少させ，平均血圧，LVdP/dt，冠動脈の血流及び血管抵抗，QTcB 及び PR 間隔に影響を及ぼさなかった．運動負荷ブタにおいて，LVdP/dt 及び総末梢血管抵抗に影響を及ぼさずに心拍数を減少させた．また，運動負荷イヌでは，心拍数減少に応じて左室拡張時間を延長させ，心筋酸素消費量を低下させた．

イバブラジンは，心虚血ブタにおいて，安静時の心拍数を減少させたが，平均血圧，LVdP/dt，局所心筋短縮率及び PR 間隔に影響を及ぼさなかった．また，運動負荷時の心拍数を減少させたが，平均血圧及び LVdP/dt には影響を及ぼさず，ST 上昇を抑制するとともに虚血領域の局所心筋短縮率を増加させた．

イバブラジンは，ラット慢性心不全モデルにおいて，冠動脈結紮後 1 週から 12 週間の投与により LVEF を増加させた．冠動脈結紮後 2 カ月から投与を開始したラット重症心不全モデル及びイヌの慢性心不全モデルにおいても，LVEF をはじめとする心機能パラメータを改善させた．また，左室拡張末期容積の増大及び左室の線維化を抑制した．更に，ナトリウム利尿ペプチド，交感神経系，RAAS 及び炎症に関連する血漿中のバイオマーカーを低下させた．

イバブラジンは，HCN4 の強制発現細胞を用いた検討から，HCN4 チャネル電流を添加濃度に応じて阻害し（IC_{50}：0.41 μ mol/L），チャネルの開口頻度に応じた阻害作用を示した．また，チャネルが閉じた状態でも HCN1 チャネル電流を阻害したが，HCN4 チャネル電流に対しては開口時のみ阻害作用を示した．

イバブラジンは，ウサギ洞結節細胞において，I_f を添加濃度に応じて阻害したが（IC_{50}：3.0 μ mol/L），10 μ mol/L の濃度でも $I_{Ca,L}$，$I_{Ca,T}$ 及び I_K を 50%以上阻害しなかった．ウサギ洞結節の活動電位では，活動電位の閾値には影響せず，拡張期脱分極速度を選択的に低下させ，周期長を延長させた．また，ラット右心房の自発拍動数及びウサギ洞結節の自発活動電

位の発生頻度を，0.1 μ mol/L 以上で濃度依存的に減少させ，時間経過とともに減少作用が増強する特徴を認めた．

イバブラジンの代謝物である ONO-IN-306 は，HCN4 チャネル電流及び I_f に対して，イバブラジンと同程度の阻害作用を示した．また，ONO-IN-306 及び代謝物（M22b，M26b 及び M31）は，正常ラットにおいて，イバブラジンと同程度に心拍数を減少させた．5 種類の開裂型代謝物（M9，M3，Y492，M10 及び M30）は，正常ラットの右心房において，10 μ mol/L の濃度で自発拍動数を減少させなかった．一方，非開裂型代謝物（M28 及び M32）は，イバブラジンと同程度に自発拍動数を減少させた．

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

イバブラジンは，19 種類の受容体及びチャネルにおいて，Na^+チャネル及び L 型 Ca^{2+}チャネル（フェニルアルキルアミン結合部位）を除き，結合阻害作用を示さなかった．Na^+チャネル及び L 型 Ca^{2+}チャネル（フェニルアルキルアミン結合部位）の Ki は，それぞれ 4.0 及び 0.9 μ mol/L であった．

イバブラジンは，心虚血ブタにおいて，心拍数を減少させ，心室細動閾値を上昇させた．また，高コレステロール血症ウサギにおいて，拡張不全の重症度を有意に低下させた．更に，マウス脂質異常症モデルにおいて，アセチルコリン誘発拡張作用（血管内皮機能）の低下を抑制した．

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

中枢神経系に及ぼす影響として，ラットの一般症状及び行動に対する作用の評価（Irwin 試験）において 119 mg/kg 以上で鎮静及び体温低下が認められ，無影響量は 59 mg/kg であった．

心血管系に及ぼす影響として，イヌを用いたテレメトリー試験において 1.5 mg/kg（3 mg/kg/日）以上で薬理作用である心拍数の減少が認められ，5 mg/kg（10 mg/kg/日）以上で収縮期血圧の上昇，洞房ブロック及び洞停止が認められたが，QTc の延長作用は 15 mg/kg（30 mg/kg/日）まで認められなかった．*In vitro* 試験において，イバブラジン及び ONO-IN-306 は hERG チャネル電流（I_{Kr}）に対する阻害作用を示し，その IC_{50} はそれぞれ 4.85 及び 15.8 μ mol/L（2.3 及び 7.8 μ g/mL）であった．また，イヌ摘出プルキンエ線維の活動電位に対する影響を評価した結果，12 又は 20 回／分の低頻度刺激時にはイバブラジン及び ONO-IN-306 の I_{Kr} 阻害作用に基づく活動電位持続時間の延長作用がそれぞれ 0.1 及び 0.3 μ mol/L（0.047 及び 0.15 μ g/mL）以上で認められたが，心拍数の変動範囲と考えられる 40 又は 60

回／分の刺激頻度ではいずれも 10 μ mol/L（4.7 及び 4.9 μ g/mL）まで活動電位持続時間の延長作用は認められなかった.

呼吸系に及ぼす影響として，ラットにおいて 20 mg/kg 以上で心拍数の急激な変動に伴う二次的影響である一過性かつ軽度の呼吸数の増加が認められ，無影響量は 5 mg/kg であった.

視覚器系に及ぼす影響として，マウス単離視細胞において薬理作用である網膜電流 I_h の阻害（IC_{50}：2.7 μ mol/L，1.3 μ g/mL）が認められ，ラットにおいて最低用量である 3 mg/kg 以上で網膜の点滅光を識別する能力（時間分解能）を低下させたが，反復投与しても悪化せず，休薬により回復性を示した.

胃腸管系に及ぼす影響として，ラットにおいて最低用量である 5 mg/kg 以上で消化管輸送能の低下が認められた．また，30 mg/kg を経口投与したラットで軽度な胃潰瘍が認められたが，血漿中イバブラジン濃度がより高かった 2 週間反復静脈内投与試験では認められなかった.

腎臓系に及ぼす影響として，ラットにおいて最低用量である 5 mg/kg 以上で尿量の高値，15 mg/kg 以上で尿中 Na 排泄量の高値が認められた.

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用

イバブラジンは，ラット慢性心不全モデルにおいて，ACE 阻害剤であるペリンドプリルとの併用により，血圧に影響を及ぼさず，心拍数を減少させた．イバブラジン及びペリンドプリルの併用では，ペリンドプリル単剤と比較して，左室の伸展性が更に改善することが左室拡張末期圧容積関係（LVEDPVR）の減少より示された.

イバブラジンは，ラット急性心不全モデルにおいて，ドブタミンによる強心作用に影響を及ぼさなかった.

イバブラジンは，アスピリンの抗血小板凝集作用及び胃潰瘍誘発作用，並びにワルファリンの抗凝固作用に影響を及ぼさなかった．また，ベラパミル，ジルチアゼム，ジゴキシン及び硝酸イソソルビド投与時の血行動態及び心電図に対して，特筆すべき影響を及ぼさなかった.

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vivo* 試験

2.6.2.2.1.1 心拍数減少作用

1） 正常ラットの心拍数に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-1］

正常ラットにおいて，イバブラジンを単回経口投与したときの心拍数に対する作用を検討した．

雄 Wistar 系ラットにイバブラジンを 1.5，3 及び 6 mg/kg の用量で単回経口投与し，無拘束下にて心拍数を測定した．対照群には媒体である蒸留水を投与した．

心拍数の変化率の結果を図 2.6.2.2.1.1-1 に示した．イバブラジンは，用量に応じて心拍数を減少させ，1.5 及び 3 mg/kg では投与後 1.5 時間より，6 mg/kg では投与後 0.5 時間より対照群と比較して有意に心拍数を減少させた．イバブラジンは，いずれの用量においても平均血圧に対して影響を及ぼさなかった．

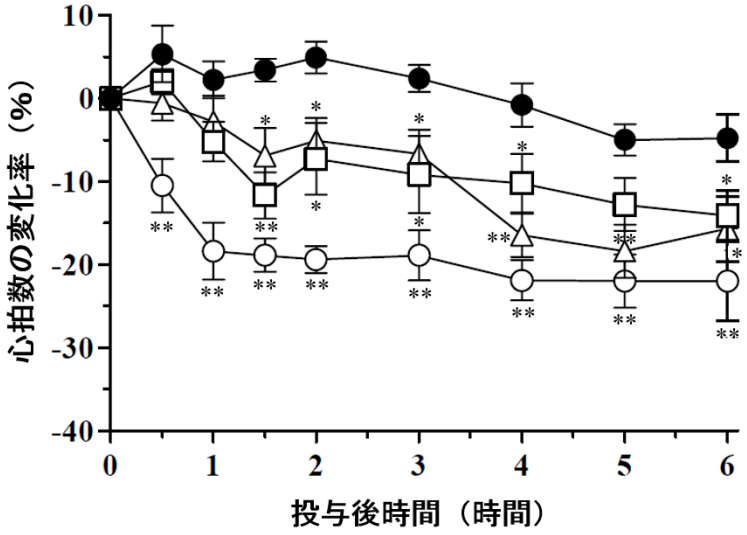


図 2.6.2.2.1.1-1 正常ラットの心拍数に対するイバブラジンの作用（単回経口投与）
データは，投与前の値に対する変化率（%）を平均値±標準誤差（各群 6 例）で示す．
対照群（●），イバブラジン 1.5 mg/kg 群（□），3 mg/kg 群（△），6 mg/kg 群（○）
*p≦0.05，**p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

2） 正常ラットにおける反復投与時の心拍数に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-2］

正常ラットにおいて，イバブラジンを反復経口投与したときの心拍数に対する作用を検討した．

雄 Wistar 系ラットにイバブラジンを 10 日間反復経口投与し，投与 1，6 及び 10 日目にテレメトリーシステムを用いて心拍数及び平均血圧を測定した．投与 1～9 日目は 1 日 1 回 3 mg/kg/日で午前 10 時 30 分に投与し，投与 10 日目は夜間の作用を検討するために，午前 10 時 30 分及び午後 6 時に 1 日 2 回 3 mg/kg で投与した（6 mg/kg/日）．対照群には媒体である蒸留水を投与した．

心拍数の結果を図 2.6.2.2.1.1-2 に示した．イバブラジンは，投与 1 日目の投与後 2 時間以降に，対照群と比較して有意に心拍数を減少させ，投与 6 及び 10 日目においても同程度に心拍数を減少させた．投与 10 日目の 2 回目の投与後では，心拍数が増加する夜間（1 回目投与の 16 時間後）においても心拍数を減少させた．また，イバブラジンは，いずれの測定ポイントにおいても平均血圧に対して影響を及ぼさなかった．

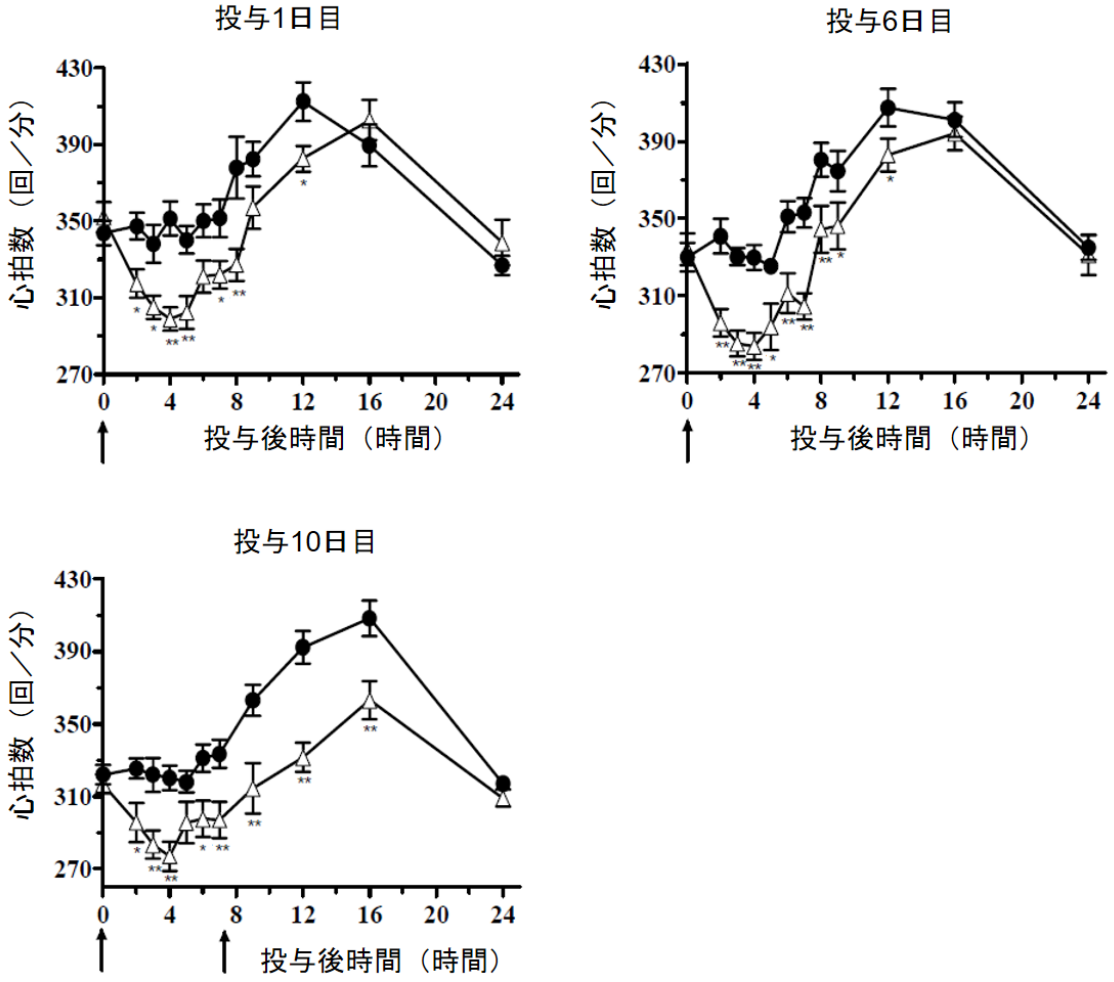


図 2.6.2.2.1.1-2　正常ラットの心拍数に対するイバブラジンの作用（反復経口投与）
データは，平均値±標準誤差（各群 12 例）で示す．
対照群（●），イバブラジン群（△）
矢印は，イバブラジンの投与のタイミングを表す．
*p≦0.05，**p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

2.6.2.2.1.2 血行動態に対する作用

1） ラットの血行動態に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-3］

正常ラットにおいて，イバブラジンを皮下投与したときの血行動態に対する作用を検討した．

雄 Long Evans 系ラットにイバブラジンを 1 mg/kg/日の用量で 4 日間反復皮下投与し，体内に留置したカテーテル及び電磁血流プローブにより血行動態を測定した．対照群には媒体である 5%グルコースを投与した．

投与 1 日目の血行動態の結果を図 2.6.2.2.1.2-1 に示した．イバブラジンは，投与後 2～3 時間を最大とする心拍数減少作用を示し，その作用は投与後 8 時間まで持続した．心拍数減少に応じて，一回拍出係数を増加させ，心係数は維持あるいはわずかな低下に留まった．心拍数減少の程度は，投与 1 日目と 4 日目で大きな違いは認められなかった．

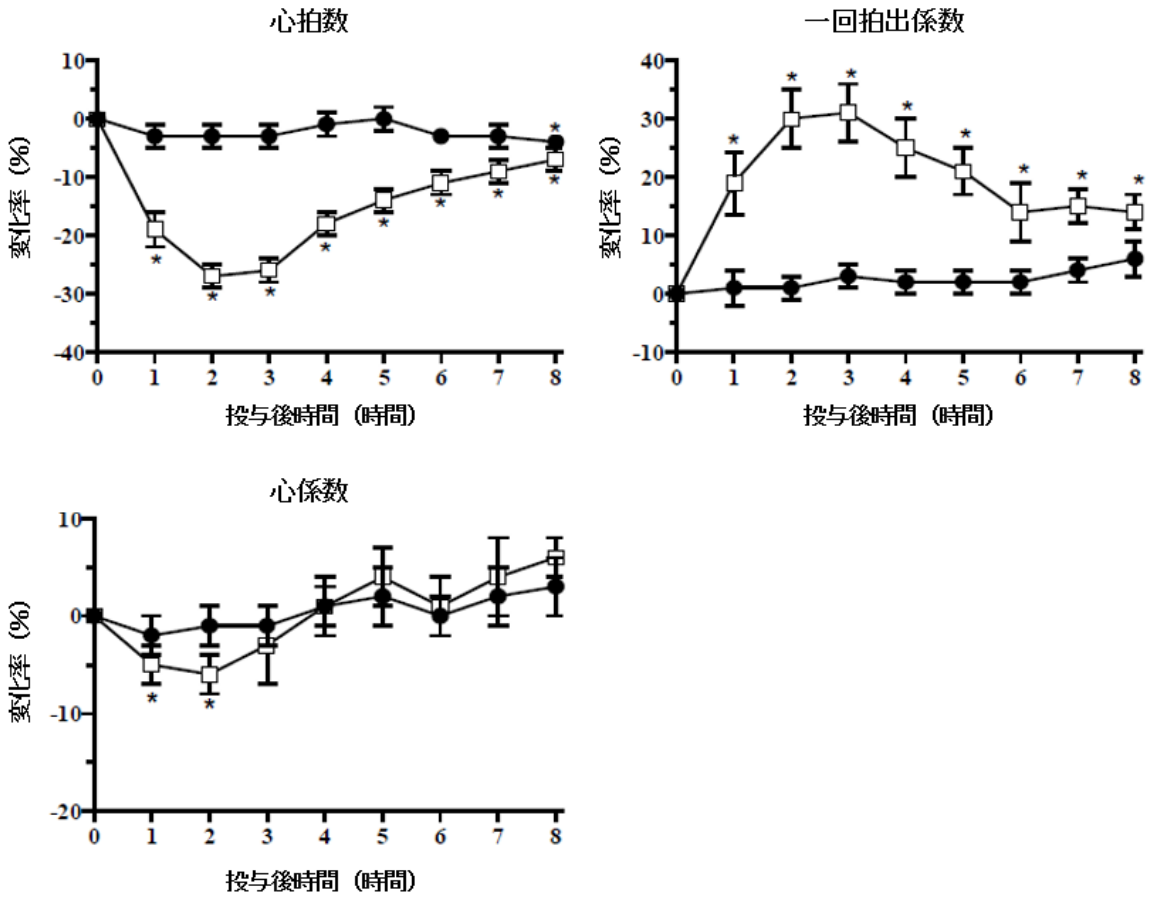


図 2.6.2.2.1.2-1 正常ラットの血行動態に対するイバブラジンの作用
データは，投与前の値に対する変化率（%）を平均値±標準誤差（各群 9 例）で示す．
対照群（●），イバブラジン群（□）
* $p<0.05$：投与前との比較（Friedman 検定）

2） 麻酔下ブタにおける血行動態に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-4］

麻酔下ブタにおいて，イバブラジンを静脈内投与したときの血行動態に対する作用を検討した．

麻酔開胸下にて，雌雄 Large-White 系ブタにイバブラジンを 0.03，0.1，0.3 及び 1 mg/kg の用量で 30 分ごとに 4 回静脈内投与し，血行動態及び心電図を測定した．対照群には媒体である蒸留水を投与した．

血行動態の結果を表 2.6.2.2.1.2-1 に示した．対照群では，平均血圧及び平均冠動脈血管抵抗は徐々に増加し，左室収縮能の指標である LVdP/dt，心拍出量，一回拍出量及び平均冠動脈血流量は徐々に低下した．これらの変化は，麻酔の影響を反映していると考えられた．この条件において，イバブラジンは，用量に応じて有意に心拍数を減少させ，平均血圧，LVdP/dt，冠動脈の血流及び血管抵抗に影響を及ぼさなかった．イバブラジン 0.3 及び 1 mg/kg は，心拍数減少に伴い，心拍出量を低下させた．また，一回拍出量は，いずれの用量においても投与前値からの変化はなく，対照群のような減少傾向は認められなかった．

心電図パラメータの結果を表 2.6.2.2.1.2-2 に示した．イバブラジンは，いずれの用量においても，再分極の指標である QTcB 及び房室伝導時間の指標である PR 間隔に影響を及ぼさなかった．

表 2.6.2.2.1.2-1　麻酔下ブタの血行動態に対するイバブラジンの作用

用量	心拍数	平均血圧	LVdP/dt	心拍出量	一回拍出量	MCBF	MCVR
	対照						
1 回目	-0.1±1.5	4.8±2.4	-3.0±1.5	-2.0±2.4	-1.8±2.5	-2.9±3.7	10.6±8.0
2 回目	1.0±2.1	4.6±3.2	-9.3±2.6	-7.5±2.4	-8.1±3.2	-8.7±5.5	20.0±11.3
3 回目	4.4±3.3	8.2±4.7	-13.8±4.5	-9.3±3.4	-11.9±3.6	-10.9±6.2	28.2±13.5
4 回目	3.5±3.2	9.2±4.9	-20.2±4.7	-14.3±2.7	-16.8±2.7	-18.3±7.5	44.3±15.9
	イバブラジン						
0.03 mg/kg	-6.2±1.4	4.0±3.6	-10.1±1.9	-8.4±3.3	-3.4±3.7	-5.4±2.5	9.4±3.8
0.1 mg/kg	-14.1±3.1 **	4.1±4.3	-17.4±3.1	-17.7±2.5	-3.4±5.1	-15.6±3.2	23.6±5.4
0.3 mg/kg	-23.5±3.2 **	-3.5±4.1	-23.7±4.8	-23.8±2.9 *	0.4±5.4	-27.9±2.5	33.8±6.6
1.0 mg/kg	-29.3±4.1 **	-5.5±5.1	-28.5±6.5	-28.3±4.0 *	2.7±5.4	-37.1±5.2	54.8±10.4

データは，投与後 20 分の値を採用し，投与前の値に対する変化率（%）を平均値±標準誤差（対照群 10 例，イバブラジン群 8～9 例）で示す．
MCBF：平均冠動脈血流量，MCVR：平均冠動脈血管抵抗
*p≦0.05，**p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

表 2.6.2.2.1.2-2　麻酔下ブタの心電図パラメータに対するイバブラジンの作用

用量	心拍数	QTcB	PR 間隔
	対照		
1 回目	-2.4±0.9	-0.2±1.8	0.6±1.2
2 回目	-2.6±1.8	2.0±2.0	0.1±1.7
3 回目	1.1±3.4	0.5±1.1	-0.4±1.2
4 回目	0.9±3.7	1.5±1.3	-1.8±1.5
	イバブラジン		
0.03 mg/kg	-8.0±1.5	-1.0±1.0	0.4±1.3
0.1 mg/kg	-15.7±3.0 *	0.0±1.3	-2.3±1.7
0.3 mg/kg	-27.1±3.6 **	2.4±2.1	-0.7±2.5
1.0 mg/kg	-36.8±4.1 **	4.8±4.3	6.8±3.4

データは，心拍数が最大作用を示した時点を採用し，投与前の値に対する変化率（%）を平均値±標準誤差（各群 10 例）で示す.
*p≦0.05，**p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

3)　ブタ運動負荷時の血行動態に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-5］

運動負荷時のマイクロブタにおいて，イバブラジンを経口投与したときの血行動態に対する作用をβ遮断薬であるプロプラノロールと比較検討した.

雌雄 Yucatan 系マイクロブタにイバブラジン又はプロプラノロールを 5 mg/kg の用量で単回経口投与し，血行動態の測定時にトレッドミルによる運動負荷（3.5 km/h で 5 分間）を施した．対照群には媒体である蒸留水を投与した.

投与前の血行動態の実測値を，安静時は表 2.6.2.2.1.2-3 に，運動負荷時は表 2.6.2.2.1.2-4 に示した．また，運動負荷時の薬剤による変化率を表 2.6.2.2.1.2-5 に示した．イバブラジンは，プロプラノロールと同程度に心拍数を減少させた．一方，イバブラジンは，LVdP/dt に有意な影響を及ぼさなかったが，プロプラノロールは，有意に LVdP/dt を低下させた．また，イバブラジンは，一回拍出量を増加させる傾向を示し，プロプラノロールと同様に心拍出量を低下させたが，その程度はプロプラノロールよりも小さかった．更に，イバブラジンは，総末梢血管抵抗に有意な影響を及ぼさなかったが，プロプラノロールは，総末梢血管抵抗を有意に増加させた.

表 2.6.2.2.1.2-3　ブタ運動負荷時の血行動態に対するイバブラジン及びプロプラノロールの作用（投与前実測値，安静時）

	心拍数（回／分）	LVdP/dt（mmHg/s）	心拍出量（L/分）	一回拍出量（mL）	総末梢血管抵抗（mmHg/L/分）
対照	92.4±5.1	2370±111	2.84±0.43	30.1±3.8	35.0±5.1
イバブラジン	92.4±5.0	2300±190	2.73±0.20	30.6±3.2	36.6±5.3
プロプラノロール	87.8±7.2	2280±139	2.90±0.09	35.0±3.9	31.6±2.3

データは，平均値±標準誤差（各群 4～5 例）で示す.

表 2.6.2.2.1.2-4　ブタ運動負荷時の血行動態に対するイバブラジン及びプロプラノロールの作用（投与前実測値，運動負荷時）

	心拍数（回／分）	LVdP/dt（mmHg/s）	心拍出量（L/分）	一回拍出量（mL）	総末梢血管抵抗（mmHg/L/分）
対照	171.4±10.9	3560±501	4.65±0.59	28.0±1.7	25.1±3.0
イバブラジン	180.2±7.9	3700±455	5.25±0.21	30.4±2.3	21.9±1.7
プロプラノロール	162.0±11.2	3460±366	5.20±0.35	34.3±2.3	20.8±2.1

データは，平均値±標準誤差（各群 4～5 例）で示す.

表 2.6.2.2.1.2-5　ブタ運動負荷時の血行動態に対するイバブラジン及びプロプラノロールの作用（変化率，運動負荷時）

	変化率（%）				
	心拍数	LVdP/dt	心拍出量	一回拍出量	総末梢血管抵抗
対照	3.6±3.4	1.9±6.1	1.7±6.3	-2.5±2.1	-3.9±5.0
イバブラジン	-22.0±3.9**	-6.5±2.3	-12.4±4.6*	14.5±7.8	9.1±8.5
プロプラノロール	-17.7±1.2**	-25.0±5.7**$$	-21.6±3.1**$	-4.6±3.9	33.6±11.5**$$

データは，投与後 3 時間の値を採用し，投与前値（運動負荷時）に対する変化率を平均値±標準誤差（各群 4～5 例）で示す.

*p≦0.05，**p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）
$p≦0.05，$$p≦0.01：イバブラジン群との比較（Newman-Keuls 検定）

4）　イヌ運動負荷時の心筋酸素消費量及び左室拡張時間に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-6］

運動負荷時のイヌにおいて，イバブラジンを静脈内投与したときの心筋酸素消費量及び左室拡張時間に対する作用をβ遮断薬であるアテノロールと比較検討した.

雄雑種イヌにイバブラジン又はアテノロールを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，トレッドミルによる運動負荷（10 km/h で 10 分間）時の血行動態，心筋酸素消費量及び左室拡

張時間を測定した．対照群には媒体である生理食塩液を投与した．また，心拍数減少による影響を除くために，250 回／分の頻度で心房ペーシングを実施した．

血行動態，心筋酸素消費量及び左室拡張時間の結果を表 2.6.2.2.1.2-6 及び図 2.6.2.2.1.2-2 に示した．イバブラジンは，安静時及び運動負荷時の心拍数をアテノロールと同程度減少させたが，$LVdP/dt_{max}$ に影響を及ぼさなかった．イバブラジン及びアテノロールは，運動負荷時に心筋酸素消費量を対照群に比べ有意に低下させた．また，イバブラジン及びアテノロールは，安静時及び運動負荷時の左室拡張時間を延長させたが，イバブラジンではより延長が認められた．運動負荷時のイバブラジンの左室拡張時間及び心筋酸素消費量に対する作用は，心房ペーシングにより完全に消失した．一方，アテノロールの $LVdP/dt_{max}$ 及び心筋酸素消費量に対する作用は心房ペーシングによって消失せず，左室拡張時間は短縮した．

表 2.6.2.2.1.2-6　イヌ運動負荷時の血行動態，心筋酸素消費量及び左室拡張時間に対するイバブラジン及びアテノロールの作用

		安静時	運動負荷時	運動負荷時 ペーシング処置
心拍数 （回／分）	対照	108±5	222±5	249±1
	イバブラジン	91±4*	151±5*	250±1
	アテノロール	99±3*	152±4*	247±3
$LVdP/dt_{max}$ （mmHg/s）	対照	3591±245	7398±828	7560±685
	イバブラジン	3619±335	6781±709	8101±1155
	アテノロール	2561±159*$	3570±279*$	4438±468*$
心筋酸素消費量 （mL O_2/分）	対照	3.0±0.4	8.1±0.6	8.6±0.8
	イバブラジン	2.8±0.3	6.7±0.6*	8.4±0.9
	アテノロール	2.5±0.3	4.7±0.6*$	6.3±0.5*$
左室拡張時間 （ms）	対照	340±11	123±4	103±3
	イバブラジン	462±22*	233±11*	111±3
	アテノロール	396±22*$	195±6*$	91±3*$

データは，平均値±標準誤差（各群 8 例）で示す．

*p<0.05：対照群との比較（対応のある t 検定，Bonferroni 型の補正）
$p<0.05：イバブラジン群との比較（対応のある t 検定，Bonferroni 型の補正）

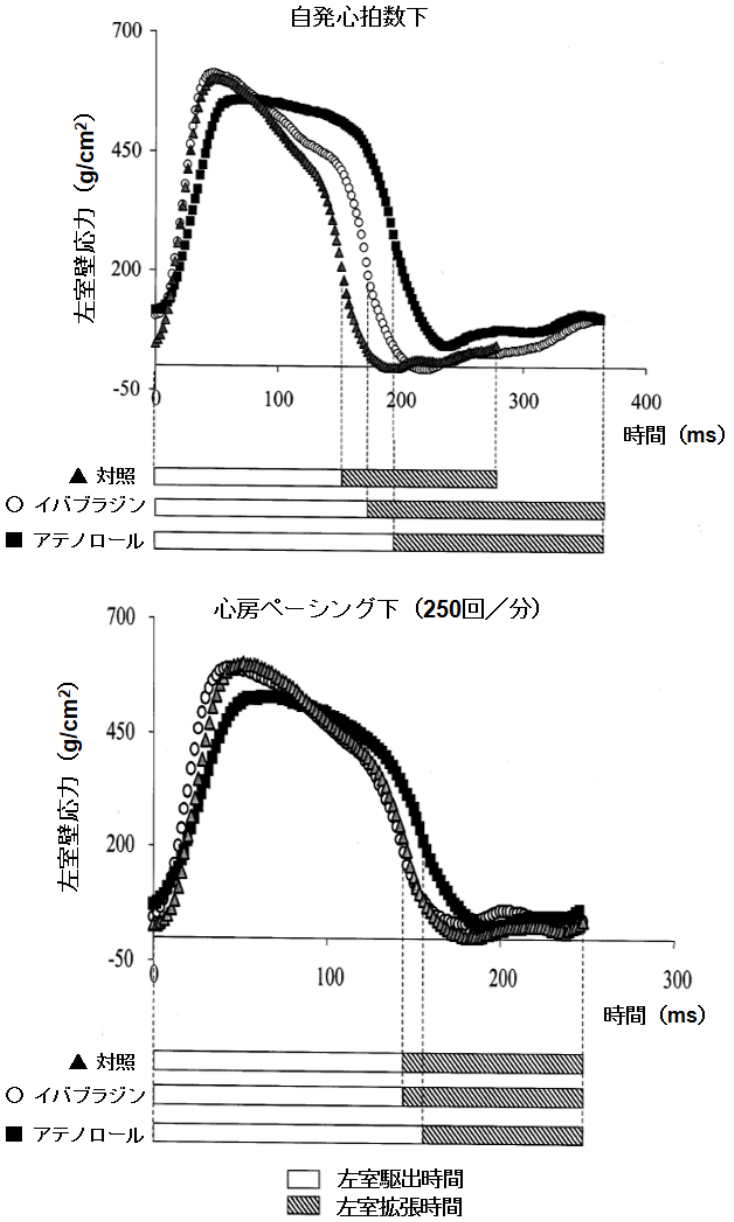


図 2.6.2.2.1.2-2　イヌ運動負荷時の心拍動あたりの左室駆出時間及び左室拡張時間に対するイバブラジン及びアテノロールの作用

データは，1 拍動あたりの時間推移の典型例を示す.
対照群（▲），イバブラジン群（○），アテノロール群（■）

5）　運動誘発性心虚血ブタの血行動態に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-7］

運動誘発性心虚血ブタにおいて，イバブラジンを単回経口投与したときの血行動態及び心機能に対する作用をプロプラノロールと比較検討した.

左冠動脈前下行枝を狭窄させた雌雄 Yucatan 系マイクロブタに，イバブラジン又はプロプラノロールを 5 mg/kg の用量で単回経口投与した．投与前及び投与後 3 時間の計 2 回，ト

レッドミルによる運動負荷（2.5 km/h で 2 分間，5 km/h で 3 分間）を実施し，運動誘発による虚血時の血行動態及び ST 上昇，並びに虚血部位及び非虚血部位の局所心筋短縮率（%SS）を評価した．対照群には媒体である蒸留水を投与した．

安静時及び運動負荷時の結果をそれぞれ表 2.6.2.2.1.2-7 及び表 2.6.2.2.1.2-8 に示した．安静時において，イバブラジンは心拍数を減少させたが，平均血圧，LVdP/dt，%SS 及び PR 間隔に影響を及ぼさなかった．一方，プロプラノロールは，イバブラジンと同程度に心拍数を減少させたが，同時に LVdP/dt 及び%SS を低下させ，PR 間隔を延長させた．

運動負荷時において，イバブラジンは心拍数を減少させたが，平均血圧及び LVdP/dt に影響を及ぼさず，ST 上昇を抑制するとともに虚血領域の%SS を増加させた．一方，プロプラノロールは，心拍数を減少させ，ST 上昇を抑制したが，LVdP/dt も低下させ，虚血領域の%SS の増加作用はイバブラジンより弱かった．

表 2.6.2.2.1.2-7　運動誘発性心虚血ブタの安静時血行動態に対するイバブラジン及びプロプラノロールの作用

	投与前（安静時）に対する変化率（%）					
	心拍数	**平均血圧**	**LVdP/dt**	**%SS（na）**	**%SS（ia）**	**PR 間隔**
対照	-0.6±2.4	-0.9±5.6	-2.0±2.5	5.2±2.2	8.4±2.5	2.6±2.6
イバブラジン	-14.1±2.6***	-4.5±2.0	-2.5±6.3$	3.5±3.7$	12.4±6.6$	0.0±0.0$$
プロプラノロール	-16.6±2.9***	-2.8±3.1	-18.3±4.5*	-6.2±2.6*	-5.6±1.9*	19.0±3.3**

データは，平均値±標準誤差（各群 5 例，%SS（na）については各群 4 例）で示す．
%SS：局所心筋短縮率，（na）：非虚血領域，（ia）：虚血領域
*p≦0.05，**p≦0.01，***p≦0.001：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）
$p≦0.05，$$p≦0.01：プロプラノロール群との比較（Newman-Keuls 検定）

表 2.6.2.2.1.2-8　運動誘発性心虚血ブタの運動負荷時血行動態に対するイバブラジン及びプロプラノロールの作用

	投与前（運動負荷時）に対する変化率（%）					
	心拍数	**平均血圧**	**LVdP/dt**	**%SS（na）**	**%SS（ia）**	**ST 変化**
対照	-4.3±1.9	5.1±3.2	-4.2±3.1	-0.3±2.1	-6.9±4.7	6.7±6.7
イバブラジン	-23.1±2.5**	-4.4±1.9	-3.4±6.5$$	10.2±4.3	78.6±20.7**$	-83.3±10.5***
プロプラノロール	-21.0±3.8**	0.8±3.9	-35.8±4.0**	-3.4±8.0	26.1±18.2	-80.0±9.4***

データは平均値±標準誤差（各群 5 例，%SS（na）については 4 例）で示す．
%SS：局所心筋短縮率，（na）：非虚血領域，（ia）：虚血領域
p≦0.01，*p≦0.001：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）
$p≦0.05，$$p≦0.01：プロプラノロール群との比較（Newman-Keuls 検定）

2.6.2.2.1.3 心不全モデルに対する効果

1） ラット慢性心不全モデルに対する効果

［評価資料：4.2.1.1-8］

ラット心筋梗塞後慢性心不全モデルを用いて，心機能に対するイバブラジンの効果を評価した．

雄 Wistar 系ラットの左冠動脈前下行枝を 1 時間結紮し，1 週後に心機能が低下した動物（LVEF が 45%より高い又は 10%より低い動物は不採用）を対照群及びイバブラジン群へ割り付けた．冠動脈を結紮せずに同一の手術を施した動物を偽手術群とした．イバブラジンは，12 mg/kg/日になるように 12 週間混餌投与した．投与開始後 4，8，12 週に盲検下で超音波検査により心機能を評価し，12 週後の LVEF を主要評価項目とした．

心拍数の結果を図 2.6.2.2.1.3-1 に示した．イバブラジンは，投与開始後 4，8，12 週に対照群と比較して有意に心拍数を減少させた．心機能の指標である LVEF の結果を図 2.6.2.2.1.3-2 及び図 2.6.2.2.1.3-3 に示した．投与開始後 12 週において，イバブラジンは，対照群と比較して有意に LVEF を増加させ，心機能の改善作用を示した．また，投与開始後 12 週に LVEF が 45%より高い個体は，対照群では 15 例中 1 例（7%）に対し，イバブラジン群では 15 例中 8 例（53%）であり，イバブラジンは，半数以上の個体で心機能の改善作用を示した．一回拍出量及び心拍出量の結果を図 2.6.2.2.1.3-4 に示した．イバブラジンは，一回拍出量を偽手術レベルまで回復させ，対照群と同レベルの心拍出量が投与開始後 12 週まで保持された．

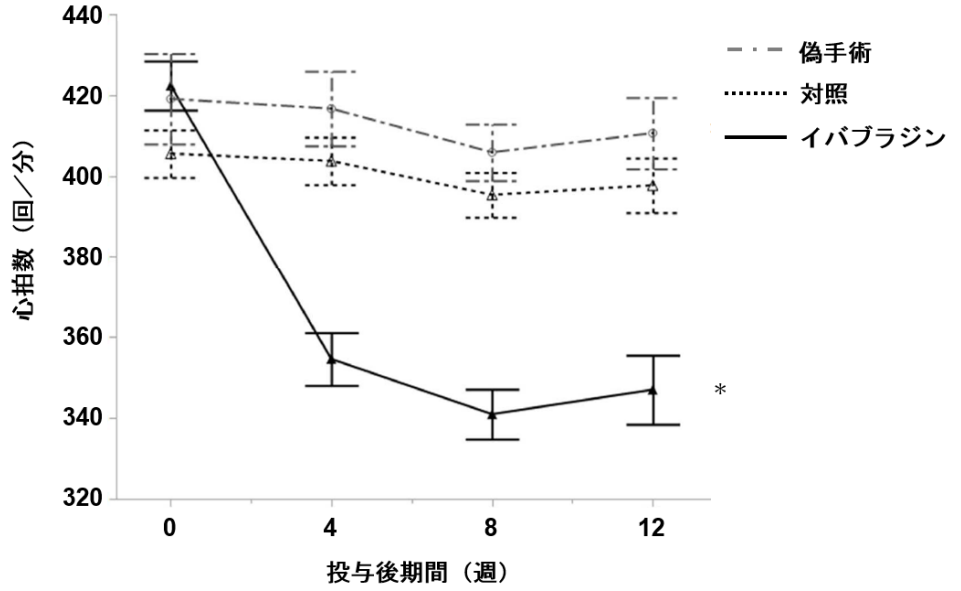


図 2.6.2.2.1.3-1 ラット慢性心不全モデルの心拍数に対するイバブラジンの作用
データは，平均値±標準誤差（偽手術群 10 例，対照群及びイバブラジン群 15 例）で示す．
*p<0.05：対照群とイバブラジン群を因子とする二元配置分散分析

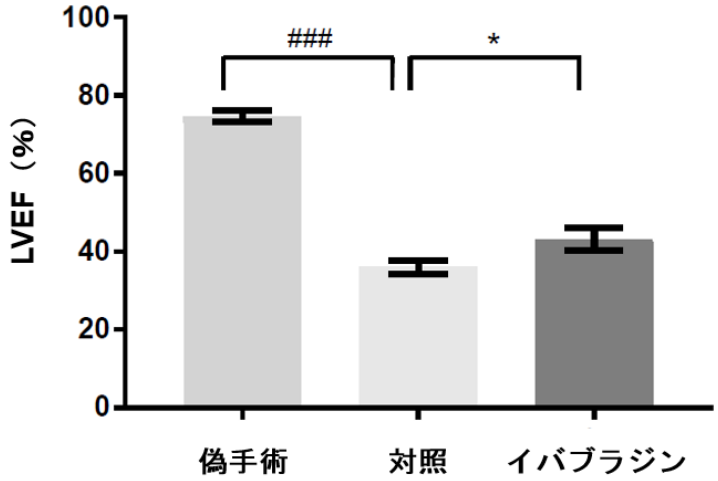


図 2.6.2.2.1.3-2　ラット慢性心不全モデルの LVEF に対するイバブラジンの作用（投与後 12 週）

データは，平均値±標準誤差（偽手術群 10 例，対照群及びイバブラジン群 15 例）で示す.
###p<0.001：偽手術群と対照群との比較（t 検定）
*p<0.05：対照群とイバブラジン群との比較（t 検定）

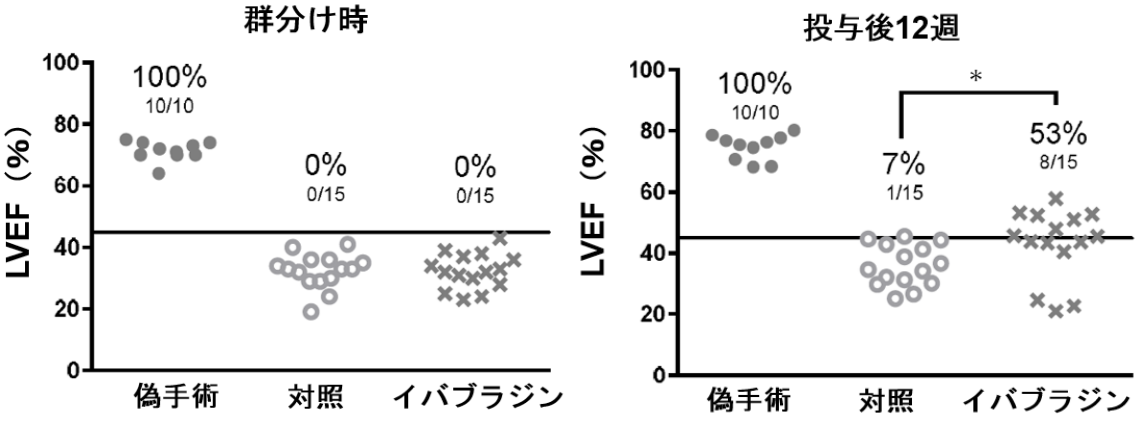


図 2.6.2.2.1.3-3　ラット慢性心不全モデルの LVEF に対するイバブラジンの作用（LVEF>45%の割合）

データは，各個体の LVEF（偽手術群 10 例，対照群及びイバブラジン群 15 例）で示す.
図中の%は，LVEF が 45%より高い個体の割合を示す.
*p<0.05：対照群とイバブラジン群との比較（Fisher の直接確率検定）

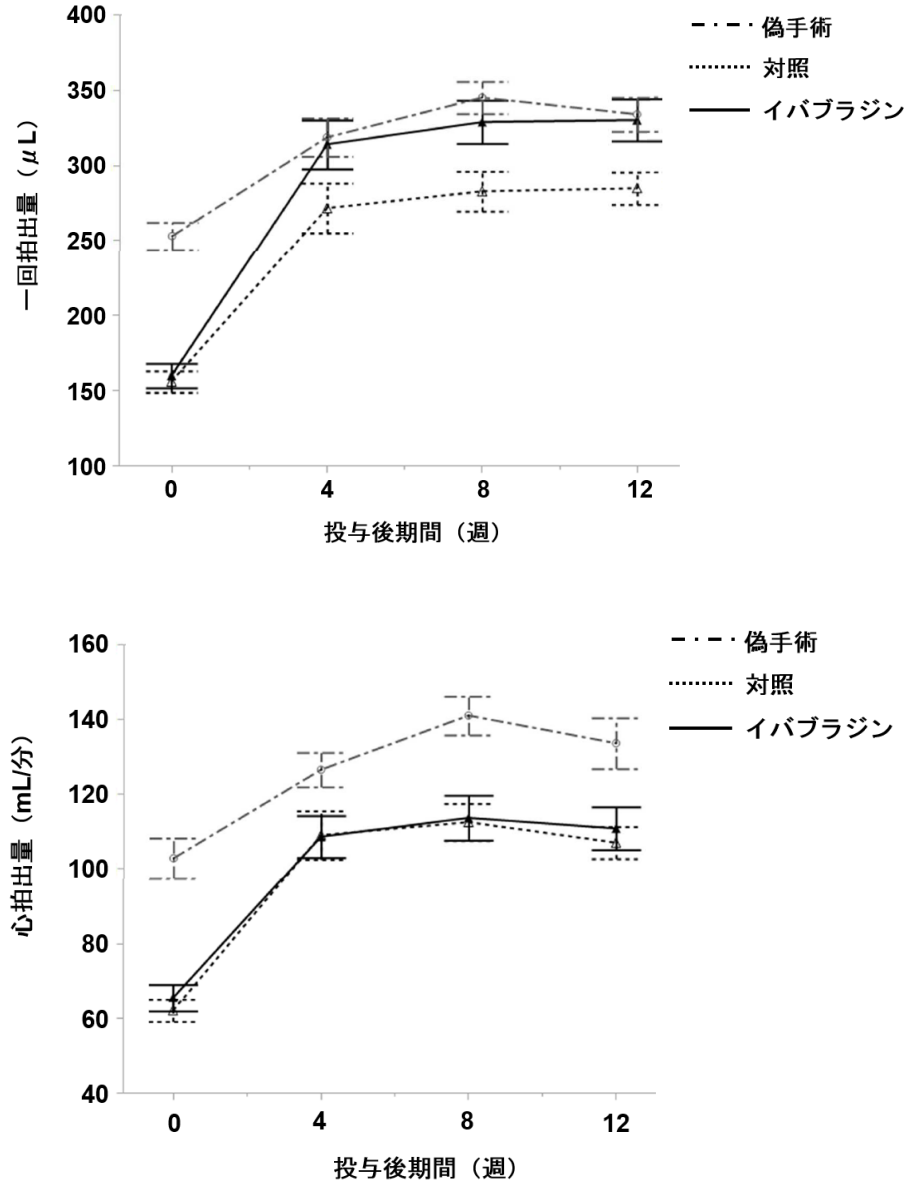


図 2.6.2.2.1.3-4　ラット慢性心不全モデルの一回拍出量と心拍出量に対するイバブラジンの作用

データは，平均値±標準誤差（偽手術群 10 例，対照群及びイバブラジン群 15 例）で示す．
　統計解析は実施しなかった．

2)　ラット重症心不全モデルに対する効果

［参考資料：4.2.1.1-9］

ラット重症心不全モデルを用いて，イバブラジンを長期投与したときの効果を検討した．

雄 Wistar 系ラットの左冠動脈前下行枝を完全結紮し，2 カ月後に心臓の超音波検査結果をもとに対照群及びイバブラジン群へ割り付けた．冠動脈結紮をせずに同一の手術を施した動物を偽手術群とした．イバブラジンは，10 mg/kg/日の用量で 3 カ月間飲水投与した．3 カ月間の投与後に，心臓の超音波検査を実施した．また，心室での RAAS の mRNA 量及びタンパク発現量，並びに線維化を間質コラーゲン割合を用いて評価した．

心機能パラメータの結果を表 2.6.2.2.1.3-1 に示した．対照群では，心筋梗塞後 2 カ月に，偽手術群と比較して，有意に左室拡張末期容積及び左室収縮末期容積が増大し，LVEF が低下した．イバブラジンは，心筋梗塞後 2 カ月の心不全状態から 3 カ月間の投与により，更なる左室拡張末期容積及び左室収縮末期容積の増大を抑制し，対照群と比較して有意に LVEF を増加させた．また，イバブラジンは，拡張機能障害を反映する左房径の拡大及び左室拡張末期圧の上昇を抑制した．

心室の間質コラーゲン割合の結果を図 2.6.2.2.1.3-5 に示した．対照群では，間質コラーゲン割合が大きく増加したが，イバブラジンは，間質コラーゲン割合の増加を有意に抑制した．

RAAS の mRNA 量及びタンパク発現量の結果を図 2.6.2.2.1.3-6 に示した．対照群では，心室の ACE 及び AT1 受容体の mRNA 量及びタンパク発現量が増加したが，イバブラジンは，対照群と比較してこれらの増加を有意に抑制した．

表 2.6.2.2.1.3-1　ラット重症心不全モデルの心機能パラメータに対するイバブラジンの作用

	投与前			投与後 3 カ月		
	偽手術	対照	イバブラジン	偽手術	対照	イバブラジン
心拍数（回／分）	307±18	342±27*	341±27*	309±22	342±24†	299±45†‡
左房径（mm）	0.41±0.01	0.56±0.02*	0.56±0.02*	0.41±0.01	0.62±0.01†	0.55±0.02†‡
左室拡張末期容積（mL）	0.80±0.01	1.72±0.09*	1.75±0.08*	0.83±0.01	2.21±0.08†	1.77±0.02†‡
左室収縮末期容積（mL）	0.29±0.03	1.34±0.08*	1.36±0.07*	0.32±0.02	1.84±0.07†	1.34±0.05†‡
一回拍出量（mL）	0.54±0.03	0.39±0.05*	0.39±0.07*	0.52±0.03	0.37±0.03†	0.42±0.04†‡
心拍出量（mL/分）	176±11	134±10*	133±11*	174±14	127±11†	130±12
LVEF（%）	66±1	28±1*	29±1*	67±1	21±1†	31±1†‡
左室拡張末期圧（mmHg）	10±1	32±1*	32±1*	11±1	38±1†	24±1†‡

データは，平均値±標準誤差（各群 11 例）で示す．
* p<0.01，†p<0.001：偽手術群との比較（t 検定，Bonferroni 型の補正）
‡ p<0.01：対照群との比較（t 検定，Bonferroni 型の補正）

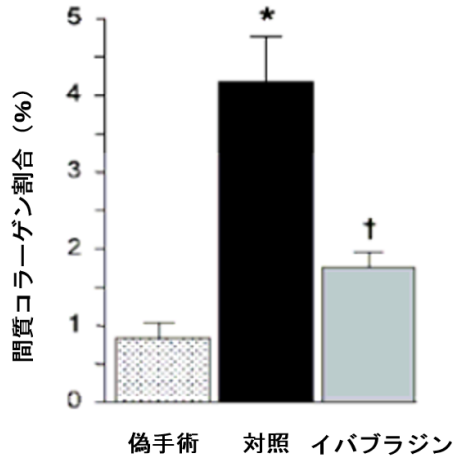


図 2.6.2.2.1.3-5　ラット重症心不全モデルにおける心室の間質コラーゲン割合に対するイバブラジンの作用

データは，平均値±標準誤差（各群 7～11 例）で示す.
* p<0.001：偽手術群との比較（t 検定，Bonferroni 型の補正）
† p<0.001：対照群との比較（t 検定，Bonferroni 型の補正）

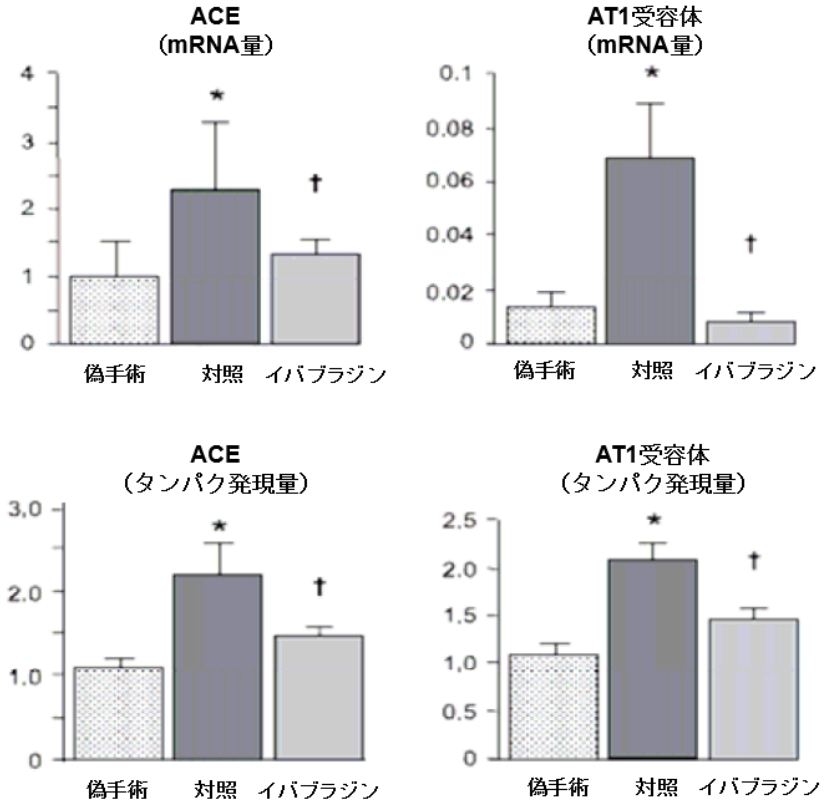


図 2.6.2.2.1.3-6　ラット重症心不全モデルにおける心室の RAAS の mRNA 量及びタンパク発現量に対するイバブラジンの作用

データは，平均値±標準誤差（各群 6～8 例）で示す.
mRNA 量は，GAPDH に対する割合で示す.
* p<0.01：偽手術群との比較（t 検定，Bonferroni 型の補正）
† p<0.01：対照群との比較（t 検定，Bonferroni 型の補正）

3)　イヌ慢性心不全モデルに対する効果

［参考資料：4.2.1.1-10］

イヌ慢性心不全モデルを用いて，心機能及び各種バイオマーカーに対するイバブラジンの効果を検討した．

慢性心不全モデルは，雄雑種イヌの LVEF が 30～40%となるまで，冠動脈（回旋枝及び前下行枝）にマイクロスフェアを毎週注入し，作製した．その後，イバブラジンは，15，30 mg/body を 1 日 2 回，3 カ月間反復経口投与し，3 カ月投与後に，心臓の超音波検査を実施した．対照群には空カプセルを投与した．

心機能の結果を図 2.6.2.2.1.3-7 及び表 2.6.2.2.1.3-2 に示した．対照群では，投与前と比較して，有意に左室拡張末期容積及び左室収縮末期容積が増大し，LVEF が低下したが，イバブラジンは，左室拡張末期容積及び左室収縮末期容積の増大を抑制し，投与前と比較して有意に LVEF を増加させた．拡張機能のパラメータ（E/A，DT）に関しても，イバブラジンは，対照群と比較して有意な改善効果を示した．

各種バイオマーカーの結果を図 2.6.2.2.1.3-8，表 2.6.2.2.1.3-3 及び図 2.6.2.2.1.3-9 に示した．イバブラジンは，ナトリウム利尿ペプチド（NT-proBNP，proANP），交感神経系（ノルエピネフリン），RAAS（ACE，アルドステロン，アンジオテンシンⅡ），炎症（IL-6，TNF-α）に関連する血漿中のバイオマーカーを有意に低下させた．また，心臓組織中のカルシウムハンドリング関連分子（SERCA2a，ホスホランバン，リアノジン受容体）mRNA 量を有意に増加させた．

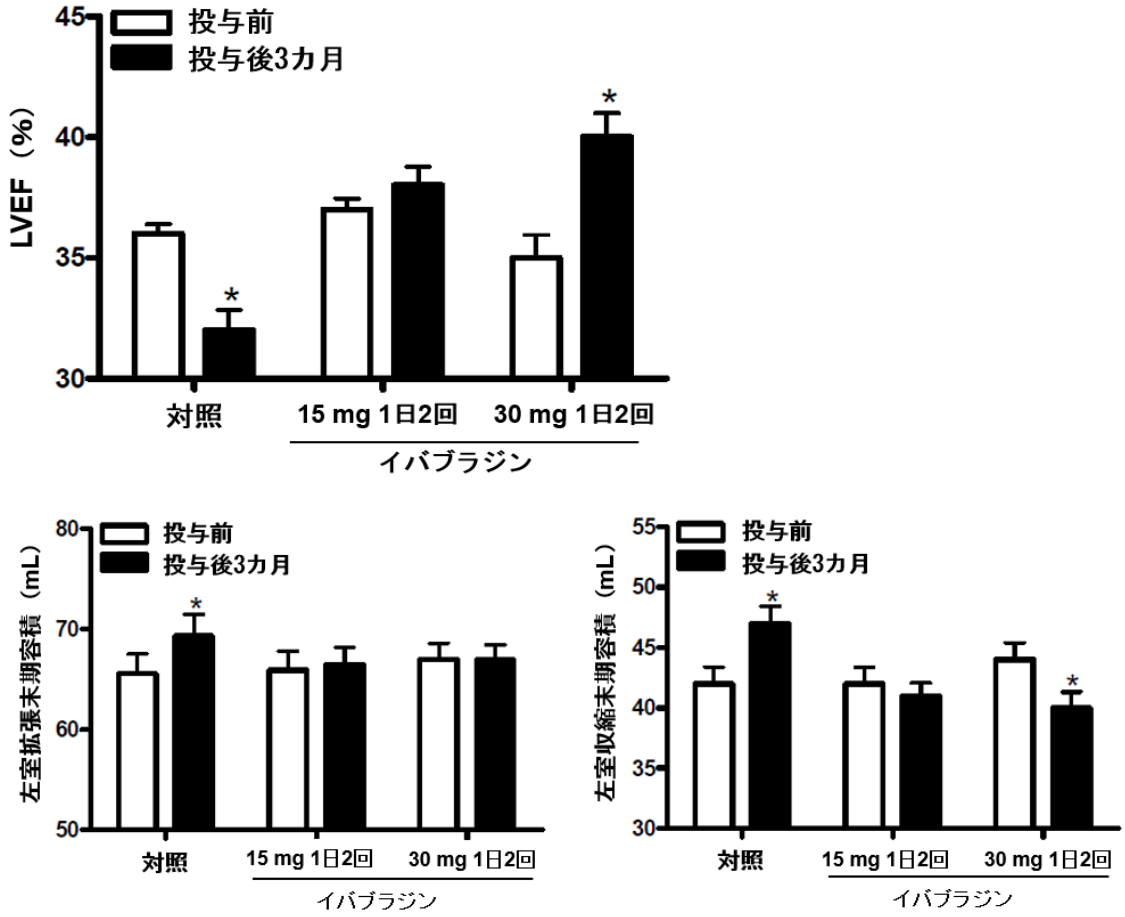


図 2.6.2.2.1.3-7　イヌ慢性心不全モデルの心機能に対するイバブラジンの作用
データは，平均値±標準誤差（各群 8 例）で示す.
*p<0.05：各群の投与前との比較（対応のある t 検定）

表 2.6.2.2.1.3-2　イヌ慢性心不全モデルの拡張機能に対するイバブラジンの作用

	対照	イバブラジン **15 mg 1 日 2 回**	イバブラジン **30 mg 1 日 2 回**
E/A	-0.28±0.13	0.06±0.16*	0.36±0.1*
DT（ms）	-8.8±2.9	5.9±14.0*	5.0±7.8*

データは，投与前からの変化量の平均値±標準誤差（各群 8 例）で示す.
E/A：左室流入血流速波形における拡張早期波（E 波）と心房収縮期波（A 波）のピーク流速の比，DT：E 波の減速時間
*p<0.05：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

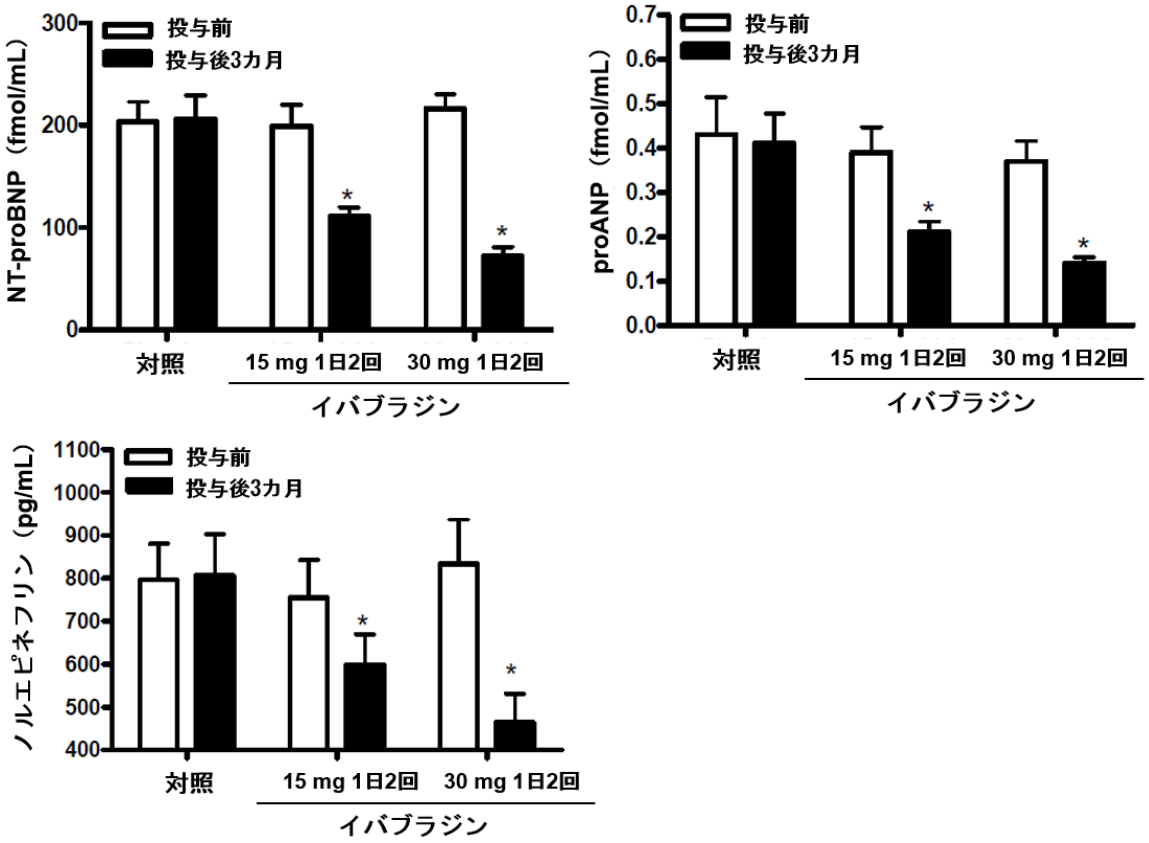


図 2.6.2.2.1.3-8　イヌ慢性心不全モデルのバイオマーカーに対するイバブラジンの作用
データは，平均値±標準誤差（各群 8 例）で示す.
*p<0.05：各群の投与前との比較（対応のある t 検定）

表 2.6.2.2.1.3-3　イヌ虚血性心不全モデルのバイオマーカーに対するイバブラジンの作用

	対照		イバブラジン 15 mg 1 日 2 回		イバブラジン 30 mg 1 日 2 回	
	投与前	3 カ月後	投与前	3 カ月後	投与前	3 カ月後
ACE（ng/mL）	28±7	29±7	32±8	24±7	31±4	22±4*
アルドステロン（pg/mL）	3098±639	3042±413	3335±589	2120±889*	3530±525	1813±652*
アンジオテンシン II（pg/mL）	220±40	220±32	229±43	155±31*	225±48	93±31*
IL-6（pg/mL）	71±14	74±14	73±14	60±9	71±13	45±14*
TNF-α（pg/mL）	3.01±1.05	2.92±0.73	2.97±0.88	1.64±0.75*	3.03±0.91	1.21±0.57*

データは，平均値±標準誤差（各群 8 例）で示す.
*p<0.05：各群の投与前との比較（対応のある t 検定）

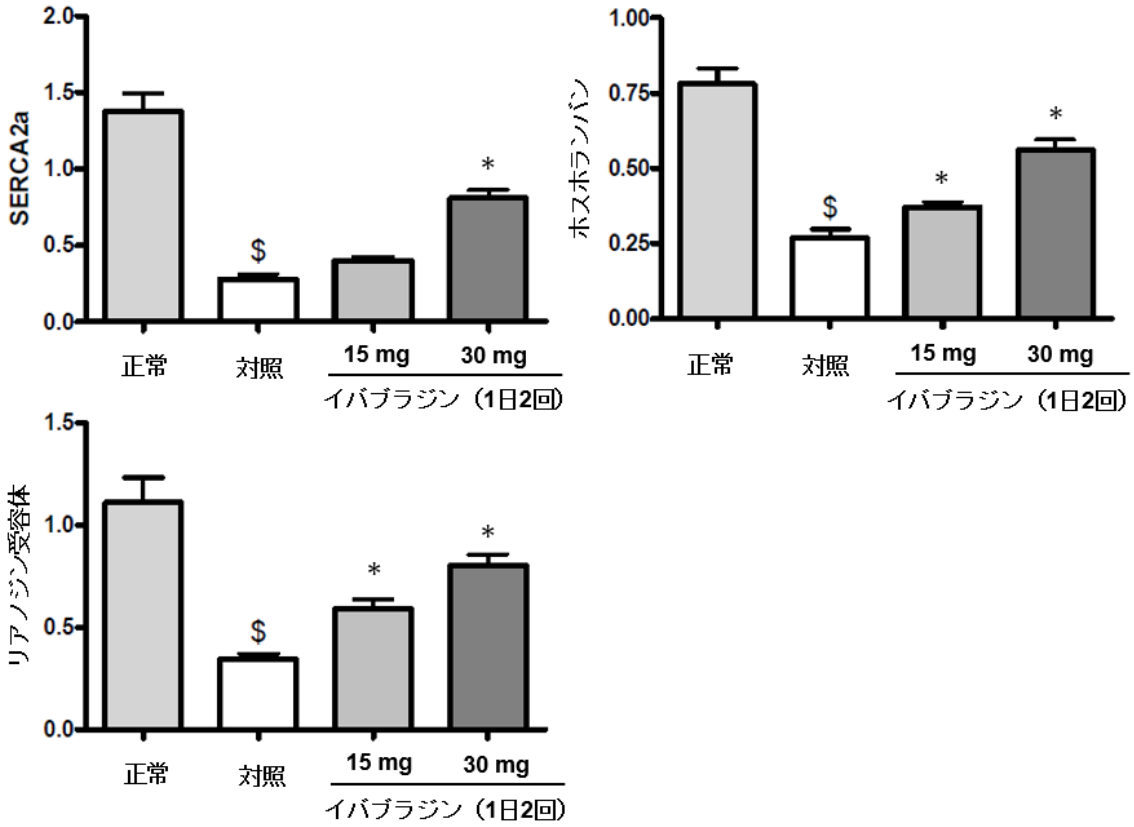


図 2.6.2.2.1.3-9　イヌ慢性心不全モデルのカルシウムハンドリング関連分子 mRNA 量に対するイバブラジンの作用

データは，平均値±標準誤差（正常群 6 例，その他の各群 8 例）で示す.
$^{\$}p<0.05$：正常群との比較（Newman-Keuls 検定），*p<0.05：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

2.6.2.2.2 *In vitro* 試験

2.6.2.2.2.1 HCN4 チャネル電流に対する阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-11］

HCN4 チャネル電流に対するイバブラジンの阻害作用を検討した．検討濃度は 0.1，0.3，1，3 及び 10 μmol/L とし，媒体はパッチクランプ用細胞外溶液を用いた．ヒト HCN4 チャネルを強制発現させた CHO 細胞を用いて，ホールセルパッチクランプ法にて，HCN4 チャネル電流を測定した．HCN4 チャネル電流は，6 秒ごとの過分極パルス（-30 mV から-110 mV で 5 秒間）により誘導した．

HCN4 チャネル電流に対する阻害率を図 2.6.2.2.2.1-1 に示した．イバブラジンは，添加濃度に応じて，HCN4 チャネル電流を阻害し，その IC_{50} は 0.41（0.24 - 0.70：98%信頼区間）μmol/L であった．

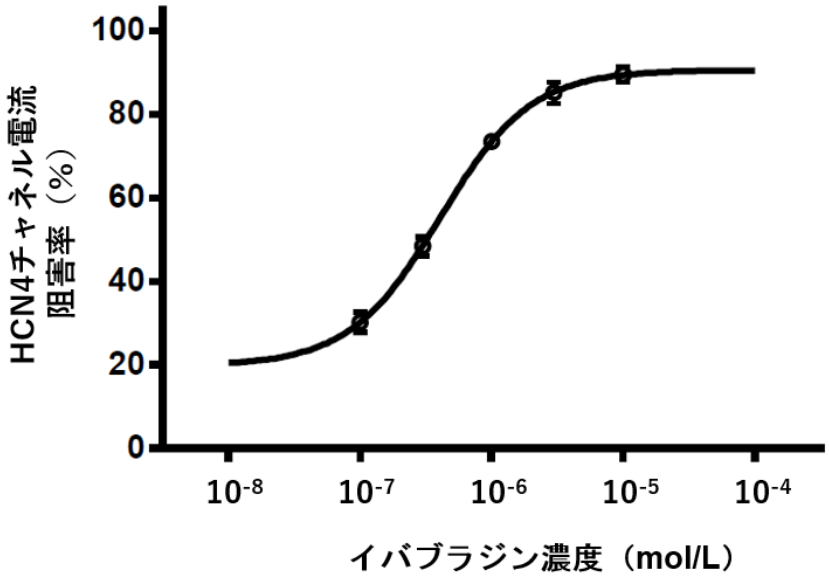


図 2.6.2.2.2.1-1　ヒト HCN4 チャネル電流に対するイバブラジンの阻害作用
データは，平均値±標準誤差（各濃度 5～6 例）で示す．

2.6.2.2.2.2 HCN4 及び HCN1 チャネルの阻害様式

［参考資料：4.2.1.1-12］

HCN4 及び HCN1 チャネル電流に対するイバブラジンの阻害様式を検討した．HCN4 チャネル電流の検討濃度は 0.03，0.3，3，30 及び 300 μmol/L，HCN1 チャネル電流の検討濃度は 0.03，0.3，1，3，30 及び 300 μmol/L とし，媒体はタイロード液を用いた．ヒト HCN4 又はマウス HCN1 チャネルを強制発現させた HEK293 細胞を用いて，ホールセルパッチクランプ法にて，HCN チャネル電流を測定した．HCN チャネル電流は，6 秒ごとの過分極パルス（-35 mV から−100 mV で 1.8 秒間）により誘導した．

HCN4 及び HCN1 チャネル電流に対する阻害反応を図 2.6.2.2.2.2-1 に示した．HCN4 チャネル電流では，過分極パルスを停止し，90 秒後に過分極パルスを再開した直後では，イバブラジンによる阻害作用は認められなかった．一方，HCN1 チャネル電流では，再開直後にイバブラジンによる阻害作用が認められ，イバブラジンは，HCN1 チャネルに対し，チャネルが閉じた状態でも阻害作用を示した．また，イバブラジンは，HCN1 及び HCN4 チャネルのいずれにおいても，過分極パルスを繰り返すと阻害作用の増強が認められ，チャネルの開口頻度に応じた阻害作用を示した．イバブラジンの HCN1 チャネル電流に対する IC_{50} は 0.93 μmol/L であり，本試験条件での HCN4 チャネル電流に対する IC_{50} は 2.0 μmol/L であった．

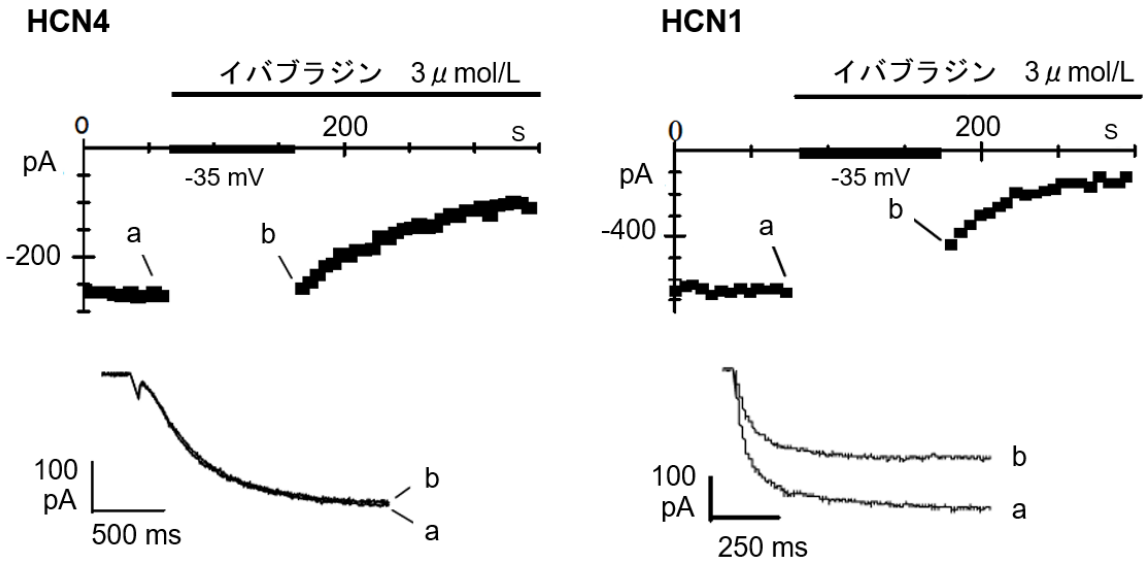


図 2.6.2.2.2.2-1　HCN4 及び HCN1 チャネル電流に対するイバブラジンの阻害作用
データは，典型例を示し，上図は内向き電流の最大値の時間経過を，下図は a 又は b 時点での電流応答を示す．a：イバブラジン処置前，b：イバブラジン処置＋過分極パルス再開直後
上図の-35 mV は 90 秒間の過分極パルスの停止を示す．

2.6.2.2.2.3　ウサギ洞結節細胞における I_f に対する阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-13］

ウサギ洞結節細胞の I_f に対するイバブラジンの阻害作用を検討した．検討濃度は 0.1，0.3，1，3，10 及び 30 μmol/L とし，媒体はタイロード液を用いた．New Zealand White 系ウサギより洞結節細胞を単離し，ホールセルパッチクランプ法によりイバブラジンの I_f に対する阻害作用を検討した．I_f は，-30 mV から-100 mV で 2 秒間の過分極パルスにより誘導した．

I_f に対する阻害率及び時間的変化の結果をそれぞれ図 2.6.2.2.2.3-1 及び図 2.6.2.2.2.3-2 に示した．イバブラジンは，添加濃度に応じて，I_f を阻害し，その IC_{50} は 3.0（1.2 - 8.4：95%信頼区間） μmol/L であった．イバブラジンは，過分極パルスの繰り返しによる阻害作用の増強が認められ，チャネルの開口頻度に応じた阻害作用を示した．

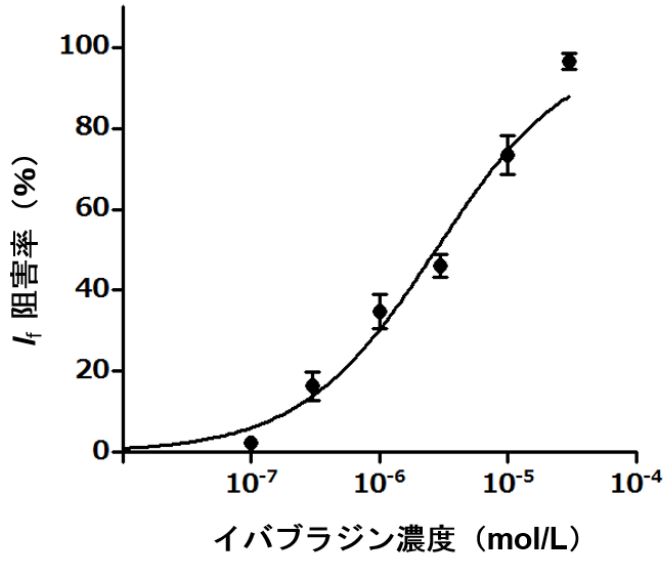


図 2.6.2.2.2.3-1　ウサギ洞結節細胞の I_f に対するイバブラジンの阻害作用
データは，平均値±標準誤差（4～10 例）で示す.

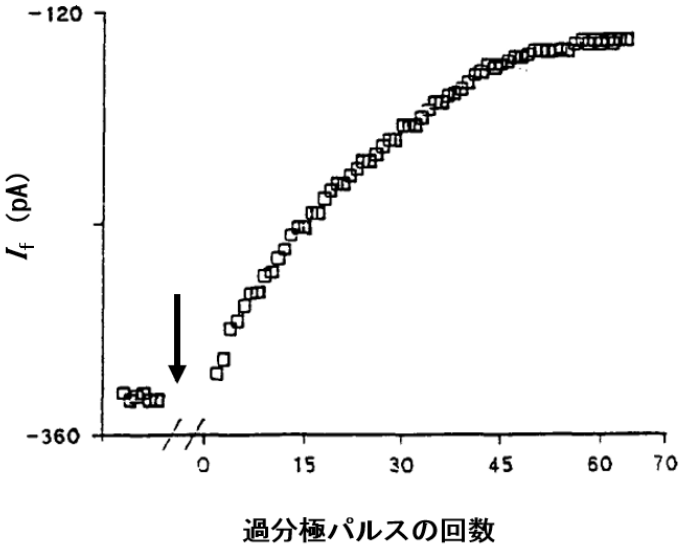


図 2.6.2.2.2.3-2　ウサギ洞結節細胞の I_f の時間的変化に対するイバブラジンの作用
データは，典型例を示し，I_f は最終の電流と最初の電流の差で示す.
矢印は，イバブラジン 3 μ mol/L の添加を表す.

2.6.2.2.2.4　　ウサギ洞結節における I_f に対する選択性

［参考資料：4.2.1.1.14］

ウサギ洞結節細胞を用いて，I_f に対するイバブラジンの選択性を検討した．検討濃度は 1, 3 及び 10 μ mol/L とし，媒体はパッチクランプ用溶液を用いた．アルビノ系ウサギより洞結

節細胞を単離し，I_f，I_K（遅延整流カリウムイオン電流），$I_{Ca,L}$ 及び $I_{Ca,T}$（L 及び T 型カルシウムイオン電流）を測定した．

I_f，$I_{Ca,L}$，$I_{Ca,T}$ 及び I_K に対するイバブラジンの阻害作用の結果を表 2.6.2.2.2.4-1 に示した．イバブラジンは 3 μ mol/L 以上の濃度にて I_f を 50%以上阻害したが，10 μ mol/L の濃度でも $I_{Ca,L}$，$I_{Ca,T}$ 及び I_K を 50%以上阻害しなかった．

表 2.6.2.2.2.4-1　ウサギ洞結節細胞の I_f，$I_{Ca,L}$，$I_{Ca,T}$ 及び I_K に対するイバブラジンの作用

イバブラジン濃度（μ mol/L）	各電流に対する阻害率（%）			
	I_f	$I_{Ca,T}$	$I_{Ca,L}$	I_K
1	31.7±2.7	-	-	-
3	58.7±2.3	-	0	0
10	80.5±1.7	0	18.1±0.7	16.3±1.2

データは，平均値±標準誤差（各群 8～12 例）で示す．
-：測定せず

2.6.2.2.2.5　ウサギ洞結節の活動電位に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-15，4.2.1.1-16，4.2.1.1-17］

ウサギ洞結節の活動電位に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 1，3 及び 10 μ mol/L とし，媒体はタイロード液を用いた．雄 New Zealand White 系ウサギより洞結節を摘出し，イバブラジンの自発活動電位に対するイバブラジンの作用を検討した．対照群にはタイロード液を処置した．

添加 40 分後における活動電位パラメータの結果を表 2.6.2.2.2.5-1 及び表 2.6.2.2.2.5-2 に示した．イバブラジンは，添加濃度に応じて拡張期脱分極速度を低下させた．また，イバブラジンは，最大拡張期電位には影響を及ぼさずに，周期長を延長させた．閾値膜電位に関しては，イバブラジン 3 μ mol/L の添加 25 分後以降の各時点において閾値膜電位に有意な影響が認められたが，添加 40 分後における 3 濃度（1，3 及び 10 μ mol/L）での一元配置分散分析を実施し，有意差は認められなかったことから，イバブラジンは閾値膜電位に影響しないと判断した．図 2.6.2.2.2.5-1 に示すように，イバブラジンは拡張期脱分極速度のみを低下させ，活動電位の閾値には影響せず，周期長を延長させた．

表 2.6.2.2.2.5-1　ウサギ洞結節の拡張期脱分極速度に対するイバブラジンの作用

イバブラジン（μ mol/L）	拡張期脱分極速度（mV/s）	
	添加前	変化量
対照	54.5±8.6	0.3±0.8
1	67.9±9.1	-21.2±3.6**
3	53.8±5.0	-36.1±1.8**
10	83.0±11.0	-42.7±5.1**

文献報告[1]（評価資料［4.2.1.1-16］）の結果を示す．添加前のデータは実測値を，変化量は添加前値からの変化量を平均値±標準誤差（各群 6～12 例）で示す．
** p<0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

表 2.6.2.2.2.5-2　ウサギ洞結節の活動電位パラメータに対するイバブラジンの作用

イバブラジン（μ mol/L）	周期長（%）	最大拡張期電位（%）	閾値膜電位（%）
対照	-2.3±1.4	-0.1±2.2	0.1±2.2
1	16.3±9.0*	-3.0±6.9	0.4±8.5
3	34.5±6.7**	1.6±1.5	11.8±4.0
10	27.1±4.2**	-2.3±2.4	2.8±3.1

評価資料［4.2.1.1-15］より引用．
データは，添加前値からの変化率を平均値±標準誤差（各群 6～12 例）で示す．
* p≦0.05，** p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

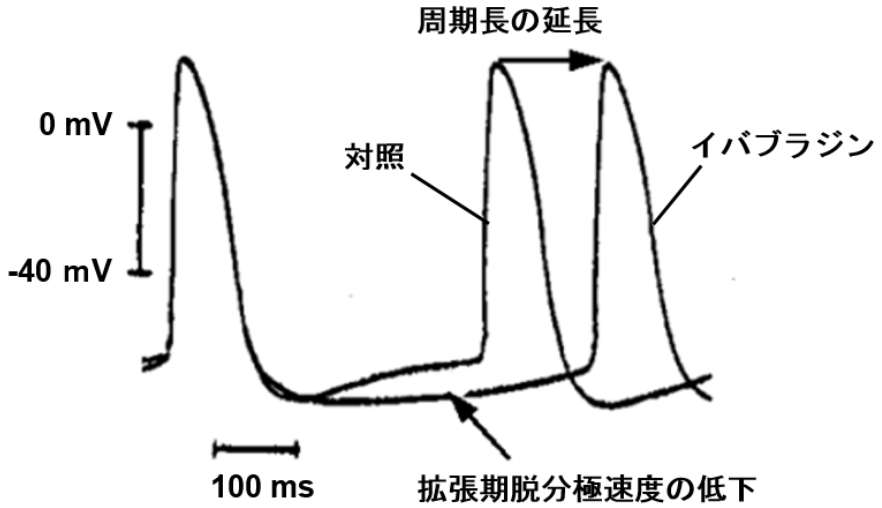


図 2.6.2.2.2.5-1　ウサギ洞結節の自発活動電位に対するイバブラジンの作用
評価資料［4.2.1.1-17］より引用．
データは典型例を示し，対照及びイバブラジン 3 μ mol/L 添加時の活動電位変化で示す[2]．

2.6.2.2.2.6　　ラット心房及び大動脈に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-18］

ラット右心房の自発拍動数に対するイバブラジンの作用を検討した．また，左心房の収縮力及び大動脈弛緩に対する作用も検討した．検討濃度は 0.1，1，10 及び 100 μ mol/L とし，

媒体は蒸留水を用いた．対照群には蒸留水を処置した．雄 Wistar 系ラットから右心房，左心房及び大動脈を摘出し，自動能をもつ右心房は自発拍動数を，左心房はペーシング（180 回／分）時の収縮力を，大動脈は塩化カリウム（80 mmol/L）による収縮時の血管弛緩作用をそれぞれ検討した．

イバブラジンは，添加後 30 分の時点において，1 μmol/L の濃度から添加濃度に応じて右心房の自発拍動数を有意に減少させた．イバブラジンは，拍動数減少作用を示す 1 μmol/L の濃度で，左心房の収縮力に影響を及ぼさず，大動脈の血管弛緩作用も示さなかった．なお，10 μmol/L 以上の濃度では，時間依存的に低下する左心房の収縮力を有意に抑制し，大動脈に対し，有意な血管弛緩作用を示した．

2.6.2.2.2.7　　ラット右心房の自発拍動数に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-19］

ラット右心房の自発拍動数に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 0.056，0.1，0.18，0.3 及び 0.56 μmol/L とし，媒体は蒸留水を用いた．雄 Wistar 系ラットより右心房を摘出し，自発拍動数に対するイバブラジンの作用を添加後 180 分まで検討した．対照群には媒体である蒸留水を処置した．

自発拍動数の結果を図 2.6.2.2.2.7-1 に示した．イバブラジンは，自発拍動数を 0.1 μmol/L 以上で時間及び濃度依存的に減少させ（実測値のデータから，0.1 μmol/L 以上の濃度で対照群と比較して有意差を認め，0.056 μmol/L では有意差を認めなかった．），添加後 3 時間の IC_{30} は 0.19 μmol/L であった．30%の自発拍動数の減少作用が認められるまでの時間は，0.3 μmol/L で約 100 分，0.56 μmol/L で約 55 分であり，減少作用が定常状態に達するまでの時間は，2～3 時間を必要とした．

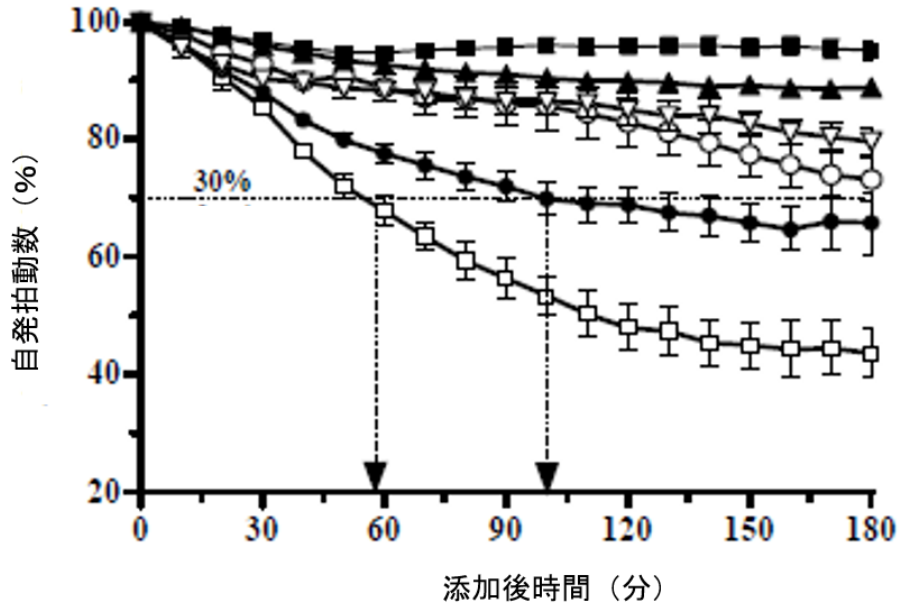


図 2.6.2.2.2.7-1　ラット右心房の自発拍動数に対するイバブラジンの作用
データは，添加前値に対する変化率（%）を平均値±標準誤差（対照群 14 例，イバブラジン群 5 例）で示す．矢印は，イバブラジンを 0.3 及び 0.56 μmol/L で処置したときに自発拍動数が 30%減少するまでの時間を示す．
対照群（■），イバブラジン 0.056 μmol/L 群（▲），0.1 μmol/L 群（▽），
0.18 μmol/L 群（○），0.3 μmol/L 群（●），0.56 μmol/L 群（□）

2.6.2.2.2.8　ウサギ洞結節の自発活動電位に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-19］

ウサギ洞結節の自発活動電位の発生頻度に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 0.03，0.1，0.3 及び 1 μmol/L とし，媒体は蒸留水を用いた．雄 New Zealand 系ウサギより洞結節を摘出し，自発活動電位に対するイバブラジンの作用を検討した．対照群には媒体である蒸留水を処置した．

自発活動電位の発生頻度の結果を図 2.6.2.2.2.8-1 に示した．イバブラジンは，自発活動電位の発生頻度を 0.1 μmol/L 以上で時間及び濃度依存的に減少させた．最大作用に達する時間は，0.1 μmol/L で 165～180 分，0.3 μmol/L で 115～120 分，1 μmol/L で 75～90 分であり，高濃度ほどより速やかに最大作用に達した．イバブラジン 0.03 μmol/L を追加検討した結果，添加後 4 時間で自発活動電位の発生頻度を 3.3%抑制した（1 例のみ）．

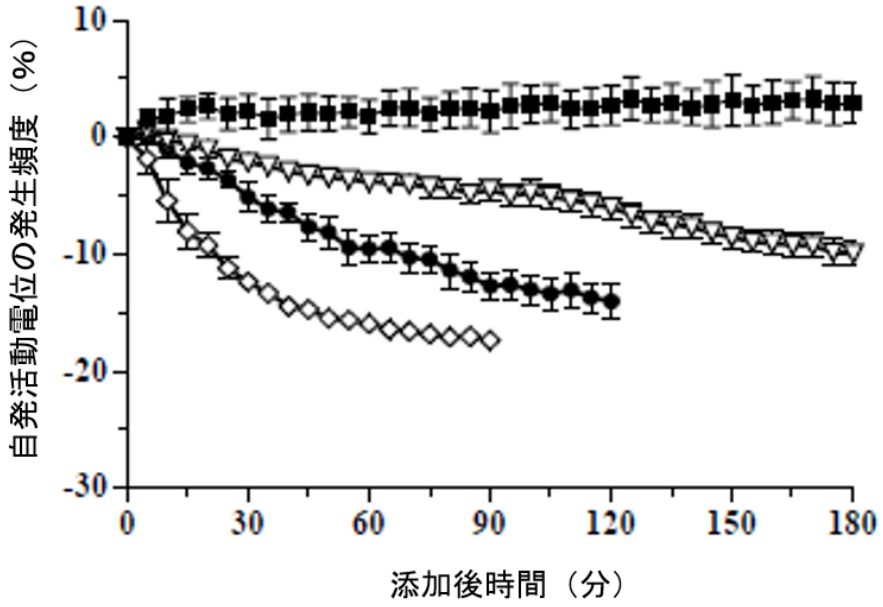


図 2.6.2.2.2.8-1　ウサギ洞結節の自発活動電位の発生頻度に対するイバブラジンの作用
データは，添加前値に対する変化率（%）を平均値±標準誤差（各群 5 例）で示す.
対照群（■），イバブラジン 0.1 μ mol/L 群（▽），0.3 μ mol/L 群（●），1 μ mol/L 群（◇）

2.6.2.2.3　代謝物の薬理試験

2.6.2.2.3.1　ONO-IN-306 の HCN4 チャネル電流及び I_f に対する作用

1）　HCN4 チャネル電流に対する阻害作用

［参考資料：4.2.1.1-20］

ヒト HCN4 チャネルを強制発現させた HEK293 細胞を用いて，イバブラジンの代謝物である ONO-IN-306 の HCN4 チャネル電流に対する阻害作用を検討した．ONO-IN-306 の検討濃度は 0.3，1，3，10 及び 30 μ mol/L，イバブラジンの検討濃度は 1，3，10，30 及び 100 μ mol/L とし，媒体はパッチクランプ用細胞外溶液を用いた．HCN4 チャネル電流は，ホールセルパッチクランプ法により測定した．ONO-IN-306 は，添加濃度に応じて HCN4 チャネル電流を阻害し，その IC_{50} は 2.6±0.4 μ mol/L であった．本試験条件でのイバブラジンの IC_{50} は，3.6±0.4 μ mol/L であり，ONO-IN-306 は，HCN4 チャネル電流に対して，イバブラジンと同程度の阻害作用を示した（各群 7 例）．

2）　I_f に対する阻害作用

［参考資料：4.2.1.1-14］

ウサギ洞結節細胞を用いて，ONO-IN-306 の I_f に対する阻害作用を検討した．検討濃度は 10 μ mol/L とし，媒体はパッチクランプ用溶液を用いた．I_f は，ホールセルパッチクランプ

法により測定した．ONO-IN-306 は I_f を阻害し，10 μ mol/L の阻害率は 82.4±1.6%であった．この阻害率は，イバブラジン 10 μ mol/L（2.6.2.2.2.4）と同程度であった（各群 7 例）．

2.6.2.2.3.2 ONO-IN-306 及びその他の代謝物のラット心拍数に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-21］

正常ラットを用いて，ONO-IN-306 及びその他の代謝物の心拍数に対する作用を検討した．イバブラジン及び ONO-IN-306 の媒体は生理食塩液を用い，M22b，M26b 及び M31 の媒体は，生理食塩液と 0.01N 塩酸を用いた．雄 Wistar 系ラットに，ONO-IN-306，M22b，M26b 又は M31 を単回経口投与（6 mg/kg）又は静脈内投与（2 mg/kg）し，投与後 24 時間の心拍数を測定した．

結果を表 2.6.2.2.3.2-1 に示した．経口投与の結果から，ONO-IN-306 及び M31 の心拍数減少作用はイバブラジンと同程度であった．M22b 及び M26b は，経口投与では効果が認められなかったが，静脈内投与の結果から，イバブラジンと同程度の心拍数減少作用を有することが確認された．

表 2.6.2.2.3.2-1 正常ラットの心拍数に対する ONO-IN-306 及びその他の代謝物の作用

化合物	経口投与（6 mg/kg）			静脈内投与（2 mg/kg）		
	Emax（%）	Tmax（時間）	効果消失（時間）	Emax（%）	Tmax（時間）	効果消失（時間）
イバブラジン	-22	3.0	9.5～12.5	-21	1.00	5.0
ONO-IN-306	-17	3.5	12.5	-40	0.25	5.5
M22b	効果なし			-18	1.75	5.0
M26b	効果なし			-15	1.00	5.5
M31	-11	2.5	10.5～12.5	-21	1.25	5.0

データは，平均値（各群 6 例，M26b 群及び M31 群は各群 5 例）で示す．
Emax：投与前の心拍数に対する最大変化率，Tmax：最大変化率に達する時間

2.6.2.2.3.3 代謝物の心房拍動数に対する作用

［評価資料：4.2.1.1-22，4.2.1.1-23］

正常ラットから摘出した右心房を用いて，イバブラジンの代謝物の自発拍動数に対する作用を検討した．5 種類の開裂型代謝物（M9，M3，Y492，M10 及び M30）と非開裂型代謝物（M28 及び M32）を検討した．開裂型代謝物の検討濃度は 0.1，1 及び 10 μ mol/L とし，対

照及び媒体は蒸留水又は DMSO を用いた．非開裂型代謝物の検討濃度は，0.1，0.3，1，3 及び 10 μ mol/L とし，媒体は蒸留水を用いた．

雄 Wistar 系ラットより右心房を摘出し，自発拍動数に対するイバブラジンの代謝物の作用を検討した．5 種類の開裂型代謝物は，10 μ mol/L の濃度でも自発拍動数を減少させなかった（各群 4～6 例）．一方，非開裂型代謝物である M28 及び M32 は濃度依存的に自発拍動数を減少させ，IC_{30} はそれぞれ 3.6（3.2 - 4.2：95%信頼区間）及び 4.9（3.7 - 7.0：95%信頼区間） μ mol/L であった．このときのイバブラジンの IC_{30} は 2.9（2.3 - 3.5：95%信頼区間） μ mol/L であった（各群 5～7 例）．

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 各分子標的に対する結合阻害作用

［評価資料：4.2.1.2-1］

19 種類の受容体及びチャネルに対するリガンド結合の阻害作用を検討した.

各種受容体及びチャネルに対するリガンド結合の阻害作用の結果を表 2.6.2.3.1-1 に示した. イバブラジンは，$K_{0.5}$ が 10 μ mol/L 以下を示した Na^+チャネル及び L 型 Ca^{2+}チャネル（フェニルアルキルアミン結合部位）以外の分子標的に対して，明確な結合阻害作用を示さず，心拍数調節に関わるアドレナリンβ受容体及びムスカリン性アセチルコリン受容体への阻害作用は認めなかった．Na^+チャネル及び L 型 Ca^{2+}チャネル（フェニルアルキルアミン結合部位）の阻害定数（Ki）は，それぞれ 4.0 及び 0.9 μ mol/L であった．なお，イバブラジンは，I_f を 50%以上阻害する濃度で $I_{Ca,L}$ に大きな影響を及ぼさなかった（2.6.2.2.2.4）.

表 2.6.2.3.1-1 イバブラジンの各種受容体及びチャネルに対するリガンド結合の阻害作用

受容体及びチャネル	イバブラジン $K_{0.5}$，Ki	
セロトニン 5-HT_{1A}受容体	$K_{0.5}$	＞10 μ mol/L
セロトニン 5-HT_{1B}受容体		
セロトニン 5-HT_2受容体		
セロトニン 5-HT_3受容体		
アドレナリンα1受容体		
アドレナリンα2受容体		
アドレナリンβ受容体		
ドパミン D1 受容体		
ドパミン D2 受容体		
ムスカリン性アセチルコリン受容体		
$GABA_A$受容体		
ヒスタミン H_1受容体		
中枢ベンゾジアゼピン受容体		
アデノシン A1 受容体		
オピオイドμ受容体		
Na^+チャネル	$K_{0.5}$	7.0±0.2 μ mol/L
	K_i	4.0±0.3 μ mol/L
L 型 Ca^{2+}チャネル （ジヒドロピリジン結合部位）	$K_{0.5}$	＞10 μ mol/L
L 型 Ca^{2+}チャネル （フェニルアルキルアミン結合部位）	$K_{0.5}$	1.9±0.1 μ mol/L
	K_i	0.9±0.1 μ mol/L
IP_3感受性 Ca^{2+}チャネル	$K_{0.5}$	＞10 μ mol/L

データは，平均値±標準誤差（3 例）で示す.

2.6.2.3.2 ブタの心室細動に対する作用

［参考資料：4.2.1.2-2］

心虚血ブタにおいて，イバブラジンを単回静脈内投与したときの心室細動に対する作用を検討した．

雌雄 Large White 系ブタにイバブラジンを 0.5 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，心室細動閾値を測定した．ブタを麻酔下開胸し，左冠動脈前下行枝の 1 分間の閉塞による心筋虚血を 15 分ごとに誘導し，虚血中に強度を増加させながら心室細動が発現するまで電気刺激を行い，心室細動閾値を決定した．対照群には媒体である生理食塩液を投与した．

心拍数及び心室細動閾値の結果を図 2.6.2.3.2-1 に示した．イバブラジンは，対照群と比較して心拍数を有意に減少させ，心室細動閾値を有意に上昇させた．

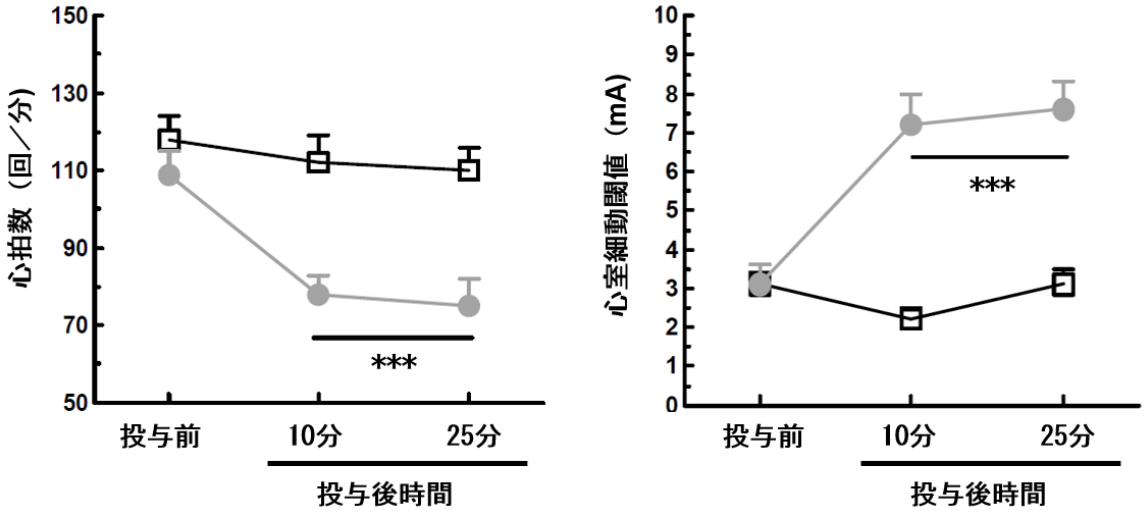


図 2.6.2.3.2-1　心虚血ブタの心拍数及び心室細動閾値に対するイバブラジンの作用
データは，平均値±標準誤差（各群 9 例）で示す．
対照群（□），イバブラジン群（●）
*** p<0.001：対照群とイバブラジン群を因子とする二元配置分散分析

2.6.2.3.3 高コレステロール血症ウサギの拡張不全に対する作用

［参考資料：4.2.1.2-3］

高コレステロール血症より誘導したウサギアテローム性動脈硬化モデルを用いて，拡張不全に対する作用を検討した．

高コレステロール血症の雄 New Zealand White 系ウサギに，イバブラジンを 17 mg/kg/日の用量で 12 週間飲水投与し，超音波検査により左室の収縮機能及び拡張機能を測定した．左室の拡張機能は，超音波検査による左室流入血流速波形及び肺静脈血流速波形，並びに組織

ドプライメージングによる僧帽弁輪運動速度により拡張不全の重症度を正常，軽度，中等度又は重度に分類し評価した．また，組織学的に左房及び左室の間質線維化割合を評価した．

拡張不全の結果を図 2.6.2.3.3-1 に示した．高コレステロール血症により拡張不全の割合が増加したが，収縮機能（LVEF）への影響は認められなかった．イバブラジンは，対照群と比較して拡張不全の重症度を有意に抑制した．また，間質線維化割合の結果を図 2.6.2.3.3-2 に示した．イバブラジンは，左房及び左室の間質線維化割合の増加を対照群と比較して有意に抑制した．

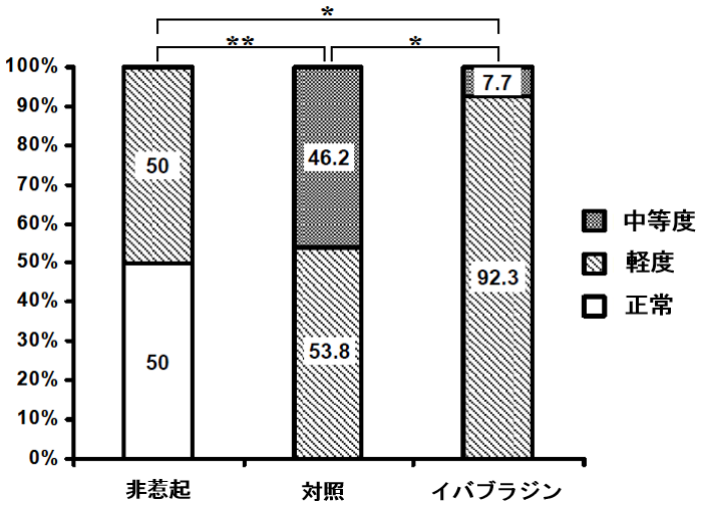


図 2.6.2.3.3-1　高コレステロール血症ウサギの拡張不全に対するイバブラジンの作用
データは，重症度の割合（非惹起群 6 例，対照群及びイバブラジン群 13 例）で示す．
*p≦0.05，**p≦0.01：非惹起群又は対照群との比較（χ^2 検定）

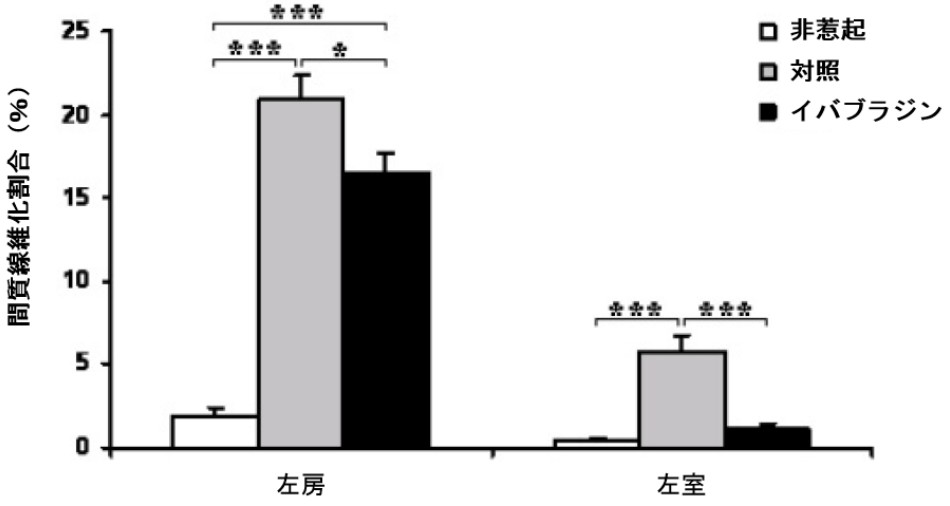


図 2.6.2.3.3-2　高コレステロール血症ウサギの間質線維化割合に対するイバブラジンの作用
データは，平均値±標準誤差（非惹起群 3 例，対照群 9 例，イバブラジン群 7 例）で示す．
*p≦0.05，***p≦0.001：非惹起群又は対照群との比較（t 検定）

2.6.2.3.4 マウス脂質異常症モデルでの血管内皮機能不全に対する作用

［評価資料：4.2.1.2-4］

マウス脂質異常症モデルを用いて，イバブラジンを長期投与したときの血管内皮機能に対する作用を検討した．

雄脂質異常症マウス（C57BL/6 hApoB$^{+/+}$）に，イバブラジンを 10 mg/kg/日の用量で，3 カ月齢から 6 カ月齢まで飲水投与した． 3 カ月間の投与期間終了時に，圧力筋運動記録法を用いて，腎動脈及び中大脳動脈の血管内皮機能を評価した．血管内皮機能は，フェニレフリン（10 μ mol/L）であらかじめ血管を収縮させた後，アセチルコリン誘発の拡張作用で評価した．野生型マウスは，C57BL/6 マウスを用いた．

血管内皮機能の結果を図 2.6.2.3.4-1 に示した．腎動脈及び中大脳動脈におけるアセチルコリン誘発の血管拡張において，対照群（脂質異常症マウス）では，野生型と比較して最大拡張作用が低下した．イバブラジンは，アセチルコリン誘発拡張作用の低下を野生型レベルまで抑制した．

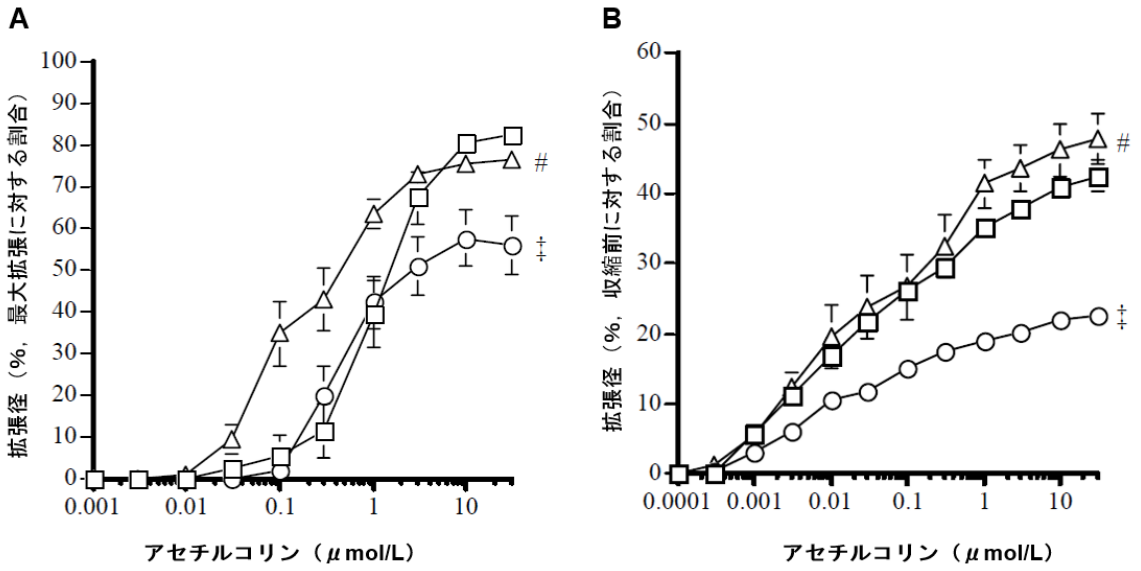


図 2.6.2.3.4-1 脂質異常症マウスの腎動脈及び中大脳動脈におけるアセチルコリン誘発の拡張作用に対するイバブラジンの作用

データは，平均値±標準誤差で示す．
A：腎動脈（野生型 13 例，対照群 13 例，イバブラジン群 15 例）
B：中大脳動脈（野生型 12 例，対照群 8 例，イバブラジン群 8 例）
□：野生型，○：対照群，△：イバブラジン群
‡$p<0.05$：野生型との比較（t 検定），# $p<0.05$：対照群と比較（t 検定）

2.6.2.4 安全性薬理試験

イバブラジンの安全性薬理試験は，細胞，マウス，ラット又はイヌを用いて，中枢神経系，心血管系，呼吸系，視覚器系，胃腸管系及び腎臓系に対する作用を評価した．これらの安全性薬理試験の一部は「安全性薬理試験ガイドライン（医薬審発第 902 号 平成 13 年 6 月 21 日）」及び「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価（薬食審査発 1023 第 4 号 平成 21 年 10 月 23 日）」の発出以前に開始しており，一部のコアバッテリー試験については GLP 非適用で実施した．コアバッテリー試験を表 2.6.2.4-1，その他の安全性薬理試験を表 2.6.2.4-2 に示した．

表 2.6.2.4-1 コアバッテリー試験一覧

試験の種類	試験系	GLP
中枢神経系		
自発運動に対する作用	ラット／Wistar	適用
痛覚に対する作用	ラット／Wistar	適用
一般症状及び行動に対する作用（Irwin 試験）	ラット／Wistar	非適用
心血管系		
プルキンエ線維の活動電位に対する作用	イヌ摘出プルキンエ線維	適用
乳頭筋の活動電位に対する作用	モルモット摘出乳頭筋	非適用
プルキンエ線維の活動電位に対する作用	ウサギ摘出プルキンエ線維	非適用
ヒト遅延整流カリウムイオン電流に対する作用	hERG 又は KvLQT1/minK 遺伝子導入 COS7 細胞	非適用
心血管系に対する作用	ビーグル犬	適用
呼吸系		
呼吸系に対する作用	ラット／Wistar	適用

表 2.6.2.4-2　コアバッテリー試験以外の安全性薬理試験一覧

試験の種類	試験系	GLP
中枢神経系		
ヘキソバルビタール誘発睡眠に対する作用	ラット／Wistar	適用
ペンチレンテトラゾール誘発痙攣に対する作用	ラット／Wistar	適用
心血管系		
洞不全症候群モデルの心血管系に対する作用	マウス／$Ca_v1.3^{-/-}$，C57BL	非適用
ドブタミン誘発頻脈に対する作用	ビーグル犬	適用
イバブラジン過量投与に対する陽性変時作用薬の作用	雑種犬	適用
視覚器系		
視細胞の I_h 及び視神経伝達に対する作用	マウス視細胞及び網膜標本	非適用
網膜における HCN チャネルの発現分布	マウス網膜標本	非適用
有色及びアルビノラットの視覚に対する作用	ラット／Long-Evans, Wistar	非適用
網膜色素変性症モデルの網膜に対する作用	マウス／Rd10，C57BL	非適用
網膜色素上皮の機能及び生存に対する作用	ラット網膜色素上皮細胞	非適用
網膜細胞の生存及びアポトーシスに対する作用	ラット／Wistar	非適用
光情報伝達カスケードに対する作用	ラット／Wistar	非適用
胃腸管系		
消化管輸送能に対する作用	ラット／Wistar	適用
胃液分泌に対する作用	ラット／Wistar	適用
胃潰瘍誘発作用	ラット／Wistar，SD	適用
腎臓系		
腎臓系に対する作用	ラット／Wistar	適用

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 ラットにおける自発運動に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，20 及び 80 mg/kg の用量で単回経口投与し，自発運動に対する作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．評価時点は投与後 1 時間とし，自発運動に加え探索行動（立ち上がり）及び常同行動（毛づくろい）の回数も評価した．

その結果，イバブラジンは 80 mg/kg まで自発運動，探索行動又は常同行動に対して影響を及ぼさず，無影響量は 80 mg/kg であった．

2.6.2.4.1.2 ラットにおける痛覚に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，20 及び 80 mg/kg の用量で単回経口投与し，痛覚に対する作用をホットプレート法により検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．評価時点は投与後 1 時間とし，ホットプレート上での疼痛反応（前足及び後足をなめる）までの潜時を測定した．

その結果，イバブラジンは 80 mg/kg まで疼痛反応潜時に対して影響を及ぼさず，無影響量は 80 mg/kg であった．

2.6.2.4.1.3 ラットにおけるヘキソバルビタール誘発睡眠に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-1］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，20 及び 80 mg/kg の用量で単回経口投与し，ヘキソバルビタールによる睡眠に対する作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与後 1 時間にヘキソバルビタールを腹腔内投与し，睡眠開始までの時間及び睡眠時間を測定した．

その結果，イバブラジンは 80 mg/kg まで睡眠開始までの時間又は睡眠時間に対して影響を及ぼさず，無影響量は 80 mg/kg であった．

2.6.2.4.1.4 ラットにおけるペンチレンテトラゾール誘発痙攣に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-1］

Wistar 系ラット（雄 10 例／群）にイバブラジンを 5，20 及び 80 mg/kg の用量で単回経口投与し，ペンチレンテトラゾールによる痙攣誘発作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg と

し，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与後 1 時間にペンチレンテトラゾールを腹腔内投与し，各群における間代性発作及び強直性発作の発現例数を測定した．

その結果，イバブラジンは 80 mg/kg まで痙攣誘発作用を示さず，無影響量は 80 mg/kg であった．

2.6.2.4.1.5 ラットにおける一般症状及び行動に対する作用（Irwin 試験）

［参考資料：4.2.1.3-3］

Wistar 系ラット（雄 3 例／群）にイバブラジンを 15，30，59，119 及び 238 mg/kg の用量で単回経口投与し，行動及び一般症状変化について Irwin 法により検討した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である蒸留水を投与した．評価時点は，投与後 15，30，60，120，180 分及び 24 時間とした．

その結果，イバブラジンは 59 mg/kg まで一般症状又は行動パラメータに対して影響を及ぼさなかったが，119 mg/kg 以上で鎮静（119 mg/kg で投与後 15 分，238 mg/kg で投与後 15～120 分）及び体温低下（119 mg/kg で-1.1℃，238 mg/kg で-1.5℃）が認められ，無影響量は 59 mg/kg であった．

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 心血管系に対する作用（*In vitro* 試験）

1） イヌプルキンエ線維の活動電位に対する作用（1）

［評価資料：4.2.1.3-4］

イヌ摘出プルキンエ線維（6 標本）を用いて，再分極過程に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 0.1，1 及び 10 μmol/L とし，媒体であるタイロード液を処置後，漸増処置した．評価項目は，2 段階の刺激頻度（60 及び 12 回／分）における活動電位振幅，静止膜電位，脱分極最大速度，APD30，APD50，APD70 及び APD90 とした．

その結果，12 回／分の刺激頻度では，0.1 μmol/L 以上で APD70，1 μmol/L 以上で APD50 及び APD90 を延長させた．一方，60 回／分の刺激頻度では活動電位持続時間に対して影響を及ぼさなかった．また，いずれの刺激頻度においても活動電位振幅，静止膜電位又は脱分極最大速度に対して影響を及ぼさなかった．

2） イヌプルキンエ線維の活動電位に対する作用（2）

［評価資料：4.2.1.3-5］

イヌプルキンエ線維の活動電位に対する作用（1）では，12 回／分の刺激頻度においてイバブラジンは 0.1 μmol/L 以上で活動電位持続時間を延長させたが，60 回／分の頻度刺激で

は影響を及ぼさなかった．本試験では，活動電位持続時間に対する影響をより詳細に検討する目的で，イヌ摘出プルキンエ線維（6 標本）を用いて，再分極過程に対するイバブラジン及び ONO-IN-306 の作用を検討した．検討濃度はいずれも 0.1，0.3，1，3 及び 10 μmol/L とし，媒体であるタイロード液を処置後，それぞれ漸増処置した．評価項目は，4 段階の刺激頻度（60，40，20 及び 12 回／分）における活動電位振幅，静止膜電位，脱分極最大速度，APD50，APD70 及び APD90 とした．

その結果，12 回／分の刺激頻度では，イバブラジンの 1 μmol/L 以上及び ONO-IN-306 の 0.3 μmol/L 以上で，また，20 回／分の刺激頻度では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の 3 μmol/L 以上で APD70 又は APD90 を延長させた．一方，40 回／分の刺激頻度では，イバブラジン及び ONO-IN-306 ともに活動電位持続時間に対して影響を及ぼさず，60 回／分の刺激頻度では，ONO-IN-306 の 10 μmol/L で APD50 を短縮させた．その他，いずれの刺激頻度においても活動電位振幅，静止膜電位又は脱分極最大速度に対して影響を及ぼさなかった．

3） モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-15］

モルモット摘出乳頭筋（11 又は 16 標本／群）を用いて，再分極過程に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 0.1，0.3，1，3 及び 10 μmol/L とし，媒体であるタイロード液を処置後，漸増処置した．評価項目は活動電位振幅，静止膜電位，脱分極最大速度，APD50，APD75 及び APD90 とした．

その結果，0.3 μmol/L 以上で APD50，APD75 及び APD90 を延長させた．一方，活動電位振幅，静止膜電位及び脱分極最大速度に対しては 10 μmol/L まで影響を及ぼさなかった．

4） ウサギプルキンエ線維の活動電位に対する作用

［参考資料：4.2.1.1-15］

ウサギ摘出プルキンエ線維（5 標本）を用いて，再分極過程に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 3 及び 10 μmol/L とし，媒体であるタイロード液を処置後，漸増処置した．評価項目は APD50 及び APD90 とした．また，ウォッシュアウトによる回復性を確認した．

その結果，3 μmol/L 以上で APD50 及び APD90 を延長させた．また，これらの作用は，30 分間のウォッシュアウトにより回復する傾向を示した．

5） ヒト遅延整流カリウムイオン電流（I_K）に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-6］

hERG 又は KvLQT1/minK 遺伝子を導入した COS7 細胞（6 又は 7 標本）を用いて，心室再分極過程に対するイバブラジン及び ONO-IN-306 の作用を検討した．検討濃度は，hERG チャネル電流（I_{Kr}）に対する作用では 0.3，1，3 及び 10 μmol/L（漸増処置），KvLQT1/minK 電流（I_{Ks}）に対する作用では 3 μmol/L とした．

その結果，イバブラジン及び ONO-IN-306 は，いずれも 3 μmol/L 以上で I_{Kr} を阻害し，IC_{50} はイバブラジンでは 4.85 μmol/L（2.3 μg/mL），ONO-IN-306 では 15.8 μmol/L（7.8 μg/mL）であった．I_{Ks} に対しては，いずれも 3 μmol/L で影響を及ぼさなかった．

2.6.2.4.2.2 心血管系に対する作用（*In vivo* 試験）

1） イヌにおける心血管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-7］

ビーグル犬（雌雄各 3 例）にイバブラジンを 0.5，1.5，5 及び 15 mg/kg の用量にて 1 日 2 回投与（投与間隔は約 8 時間）で 5 日間反復経口投与し，心拍数，血圧及び心電図に対する作用をテレメトリー法により無麻酔・非拘束下にて評価した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．各用量の投与間に 48 時間以上の休薬期間を設けた．評価時点は投与 1 及び 4 日目とし，血圧（収縮期，拡張期及び平均血圧），心拍数及び心電図（PR 間隔，QRS 幅及び QT 間隔含む）を評価した．なお，QT 間隔は心拍数に対する Fridericia 補正式（QTcF）及び動物個体別の QT/RR を比較する Sarma の解析（QT-Sarma）[3)] を用いて解析した．また，投与 5 日目の投与前と 1 回目投与後 3 時間に 6 誘導の心電図を測定した．更に，5 日間反復投与後のイバブラジン及び ONO-IN-306 の血漿中濃度を測定した．

心拍数及び心電図に対する作用を図 2.6.2.4.2.2-1，血漿中薬物濃度測定の結果を表 2.6.2.4.2.2-1 に示した．投与 4 日目の 1.5 mg/kg 以上で対照群と比べて明らかな心拍数の減少が認められた．1.5 mg/kg では，投与後 2 時間で対照群と比べて 12%の心拍数の減少を示したが，持続的な減少は認められなかった．一方，5 及び 15 mg/kg では持続的な心拍数減少が認められたが，1 日平均心拍数は対照群に比べてそれぞれ 17 及び 16%の減少であり，5 mg/kg 以上で心拍数に対する作用の頭打ちが認められた．投与 1 日目に心拍数の明らかな変動は認められなかった．また，投与 1 又は 4 日目の 5 mg/kg 以上で洞房ブロック及び洞停止を誘発したが，QTcF 及び QT-Sarma に対しては 15 mg/kg まで影響を及ぼさなかった．その他，投与 1 又は 4 日目の 5 mg/kg 以上で収縮期血圧の軽度な上昇又は上昇傾向（対照群と比べて最大 24%）が認められたが，平均血圧及び拡張期血圧に対しては 15 mg/kg まで影響を及ぼさなかった．

以上の結果，覚醒下イヌにおける心血管系に対する無影響量は 0.5 mg/kg（1 mg/kg/日）であった．

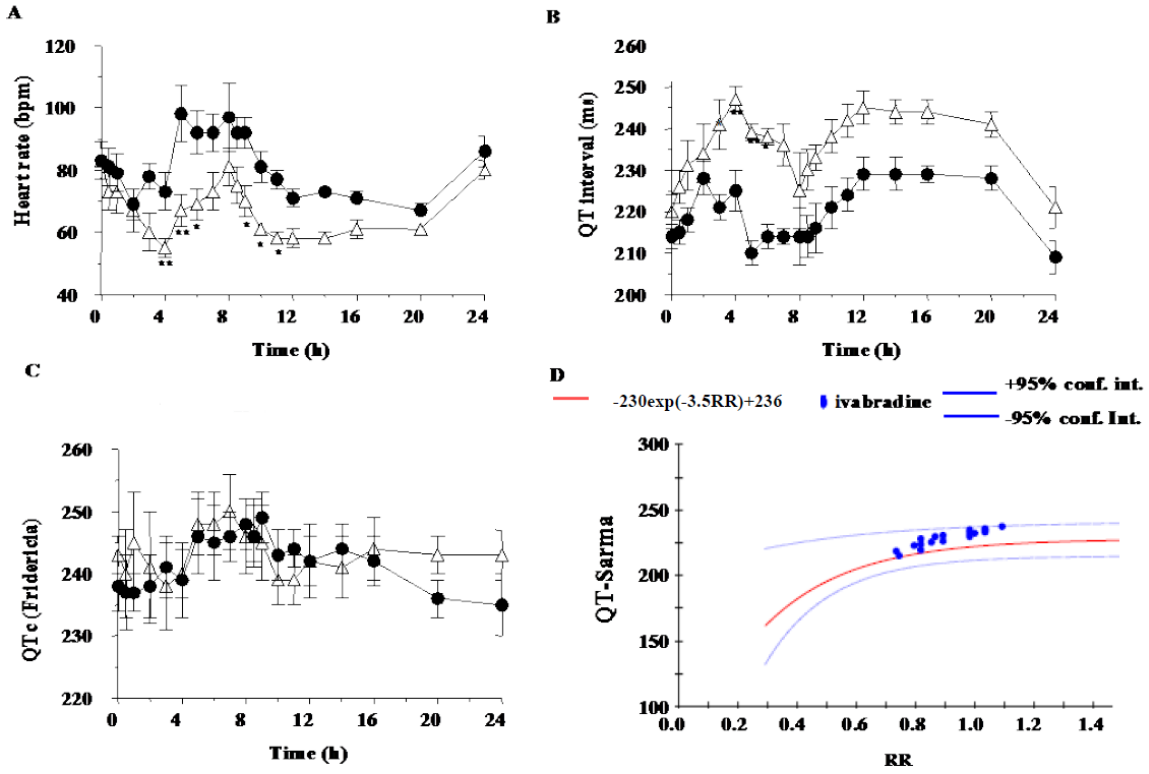


図 2.6.2.4.2.2-1　心拍数，QT 間隔，QTcF 及び QT-Sarma に対するイバブラジン 10 mg/kg/日，4 日間投与の作用

A：心拍数，B：QT 間隔，C：QTcF，D：QT-Sarma.
データは，平均値±標準誤差（各群 n=6）で示す（A～C）．
対照群（●），イバブラジン 10 mg/kg/日（△）
* p≦0.05，** p≦0.01：対照群との比較（Newman–Keuls 検定）

表 2.6.2.4.2.2-1　投与 5 日目のイバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax（ng/mL）

用量（mg/kg/日）	Cmax（ng/mL）			
	イバブラジン		ONO-IN-306	
	雄	雌	雄	雌
1	62	24	2.5	blq
3	391	198	13	6.1
10	1572	935	158	56
30	4141	2911	446	252

データは，平均値（各群 n=3）で示す．
blq：定量下限（1 ng/mL）未満

2） 洞不全症候群モデルマウスにおける心血管系に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-8］

$I_{Ca,L}$ は I_f と同様に心臓の自動能及び心拍数に関連しており，L 型カルシウムチャネルのサブユニット $Ca_v1.3$ を欠損したマウスは徐脈及び房室ブロックを呈する洞不全症候群モデルとして知られている[4)]．本試験では，洞不全症候群モデルマウスに対するイバブラジンの影響を検討する目的で，$Ca_v1.3$ 遺伝子欠損（$Ca_v1.3^{-/-}$）マウス（雄 10～11 例／群）及び野生型（WT）マウス（雄 6～7 例／群）にイバブラジンを 0.1，0.3，1，3 及び 6 mg/kg の用量で単回腹腔内投与し，心電図に対する作用をテレメトリー法により無麻酔・非拘束下にて評価した．投与容量は 0.5 mL とし，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．投与はクロスオーバー法とし，各投与間に4日間の休薬期間を設けた．心電図の測定は投与前，投与後0.5，1，2，4，6 及び 8 時間とし，心拍数，PR 間隔，QRS 幅，QT 間隔，QTcB 及び心電図を評価した．

その結果，3 mg/kg 以上で WT マウス及び $Ca_v1.3^{-/-}$マウスの平均心拍数の明らかな減少（最大21%及び31%）が認められた．また，6 mg/kg で$Ca_v1.3^{-/-}$マウスで生じる房室機能不全（房室ブロック）の抑制が認められた．その他，$Ca_v1.3^{-/-}$マウスで QT 間隔の延長が認められたが，QTcB に対する明らかな変動は認められなかった（表 2.6.2.4.2.2-2）．

以上より，イバブラジンの心拍数減少作用は WT マウス及び $Ca_v1.3^{-/-}$マウスのいずれにおいても同用量からほぼ同程度に認められ，$Ca_v1.3^{-/-}$マウスにおいて房室ブロックの増悪や新たな心電図異常は認められなかったことから，イバブラジンは洞結節機能不全を増悪しないと考えられた．

表 2.6.2.4.2.2-2 WT マウス及び $Ca_v1.3^{-/-}$マウスの心電図パラメータに対するイバブラジン（6 mg/kg）腹腔内投与後 1 時間の作用

	WT マウス		$Ca_v1.3^{-/-}$マウス	
用量（mg/kg）	0	6	0	6
PR 間隔（ms）	37±1	41±2	62±3	54±3
QRS 幅（ms）	11±1	11±1	12±1	12±1
QT 間隔（ms）	47±1	55±5	50±5	73±8*
QTcB	41±1	43±5	34±4	43±3
第 2 度房室ブロック（回）	-	-	11±2	0±0*

-：データなし．
データは，平均値±標準誤差（各群 n=7～11）で示す．
* $p<0.05$：対照群との比較（Tukey 検定）

3)　イヌにおけるドブタミン誘発頻拍に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-9］

陽性変力作用薬であるドブタミンは，心原性ショックなどの左室収縮不全に対して用いられるが，心拍数増加により心筋酸素消費量を増加させる．本試験では，イバブラジンがドブタミンの陽性変力作用に影響せずに，ドブタミンにより変動した心拍数を回復させることが可能か検討する目的で，麻酔下のビーグル犬（雄 5 例／群）を用いて，ドブタミン投与後の心臓機能に対するイバブラジンの作用を評価した．ドブタミンの静脈内持続投与によりイヌ心拍数を投与前値から約 40%増加させる頻脈を誘発し，1 時間維持させた．続いて，イバブラジンを 0.5 mg/kg の用量で静脈内急速投与した後，0.5 mg/kg/h の投与速度で静脈内持続投与を 1 時間実施した．対照群には媒体である生理食塩液を投与した．評価時点はベースライン時，ドブタミン静脈内持続投与時，イバブラジン又は媒体の投与前，投与開始後 2，5，10，15，30，45 及び 60 分とし，心拍数，血圧，心拍出量，冠血流量，左室収縮能，心電図及び血液ガスを評価した．

心血行動態及び収縮パラメータに対する作用を図 2.6.2.4.2.2-2 に示した．ドブタミンは心拍数，血圧及び冠血流量を増加させ，一回拍出量を減少させた．イバブラジンはドブタミンにより変動した平均血圧及び冠血流量に対して影響を及ぼさなかったが，心拍数及び一回拍出量を回復させた．ドブタミンにより認められた陽性変力作用（$LVdP/dt_{max}$，左室仕事量及び左室収縮期圧の増加）に対し，イバブラジンは影響を及ぼさなかった．また，血液ガス測定において，ドブタミンは二酸化炭素分圧を軽度に上昇（+17%）させ，動脈血 pH を低下させた．イバブラジンはドブタミンにより変動した二酸化炭素分圧及び動脈血 pH を回復させた．

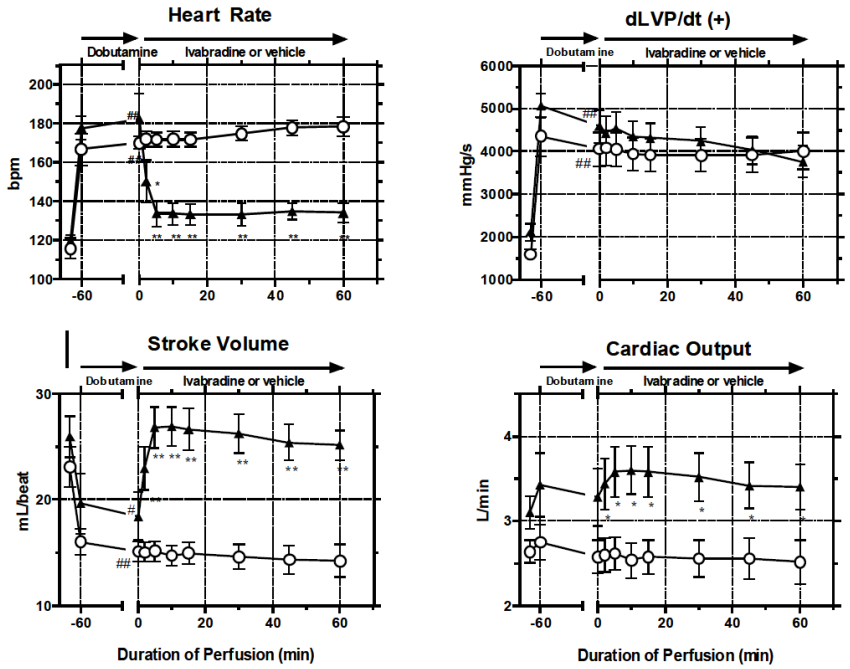


図 2.6.2.4.2.2-2　ドブタミン静脈内持続投与イヌの心血行動態及び収縮パラメータに対するイバブラジンの作用

データは，平均値±標準誤差（各群 n=5）で示す.
* p≦0.05，** p≦0.01：対照群との比較（Newman–Keuls 検定）
# p≦0.05，## p≦0.01：ベースラインとの比較（Dunnett 検定）
対照群（○），イバブラジン（▲）

4）　イヌにおけるイバブラジン過量投与に対する陽性変時作用薬の作用

［参考資料：4.2.1.3-10］

本試験では，イバブラジン過量投与時の心臓機能に対する影響，及び陽性変時作用薬による回復性を検討する目的で，覚醒下の雑種犬（雄 6 例）を用いて，イバブラジン過量投与後の心臓機能に対する陽性変時作用薬の作用を，テレメトリー法により評価した．イバブラジンを 0.5，5 又は 10 mg/kg の用量で 5 分間静脈内持続投与し，その 15 分後からドブタミン，イソプレナリン又はアトロピンを 20 分間静脈内持続投与した．対照群には媒体である生理食塩液を投与した．各陽性変時作用薬の投与間に 48 時間以上の休薬期間を設けた．評価時点は各陽性変時作用薬投与前，投与開始後 5，10，15 及び 20 分とし，心拍数，血圧，左室収縮能及びPR 間隔を評価した．また，0.5 及び 5 mg/kg 投与群のイバブラジン投与開始後 5，20 及び 120 分におけるイバブラジン及び ONO-IN-306 の血漿中濃度を測定した.

血漿中薬物濃度測定の結果を表 2.6.2.4.2.2-3 に示した．イバブラジン 5 mg/kg 投与時のイバブラジン及び ONO-IN-306 の血漿中濃度は，各陽性変時作用薬投与開始時点において臨床最大用量における Cmax（イバブラジン：35 ng/mL，ONO-IN-306：7.5 ng/mL）の 158 倍及び 19 倍に達したことから，5 mg/kg 以上は評価するのに十分な量であると考えられた.

イバブラジン 5 mg/kg 投与により心拍数の減少，収縮期血圧，左室収縮期圧，左室拡張末期圧及び LVdP/dt_{min} の上昇が認められ，PR 間隔に影響は認められなかった．ドブタミン（200 μg/kg）はイバブラジンにより減少した心拍数を回復させ，収縮期血圧，左室収縮期圧，左室拡張末期圧及び LVdP/dt_{min} の上昇を増強するとともに平均血圧及び LVdP/dt_{max} を上昇させ，PR 間隔を短縮させた．イソプレナリン（0.5 μg/kg）は心拍数を回復させ，左室収縮期圧及び左室拡張末期圧の上昇を増強するとともに LVdP/dt_{max} を上昇させ，拡張期血圧及び平均血圧を低下させ，PR 間隔を短縮させた．アトロピン（82 μg/kg）は心拍数には作用しなかったが，LVdP/dt_{min} 及び左室拡張末期圧の上昇を増強するとともに LVdP/dt_{max} を上昇させ，PR 間隔を短縮させた．

以上より，イバブラジンの過量投与で誘導された心拍数減少作用は，ドブタミン又はイソプレナリンにより抑制可能であることが示された．

表 2.6.2.4.2.2-3　イバブラジン 5 mg/kg 静脈内持続投与後の血漿中濃度（Cp）及びヒトの Cmax との比較

投与開始後（min）	Cp（ng/mL）		濃度比（イヌ Cp／ヒト Cmax[c]）	
	イバブラジン	ONO-IN-306	イバブラジン	ONO-IN-306
5[a]	16198	56	463	7.5
20[b]	5527	143	158	19
120	1444	89	41	12

データは，平均値（各群 n=6）で示す．
a：イバブラジン投与終了時点
b：各陽性変時作用薬投与開始時点
c：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における Cmax（イバブラジン：35 ng/mL，ONO-IN-306：7.5 ng/mL）

2.6.2.4.3　呼吸系

2.6.2.4.3.1　ラットの呼吸系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-11］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，20 及び 80 mg/kg の用量で単回経口投与し，呼吸機能に対する作用をプレチスモグラフ法により検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．評価時点は投与前，投与後 30，60，90，120，180 及び 240 分とし，呼吸数，最大吸気流量，最大呼気流量，吸気時間，呼気時間，気道抵抗及び一回換気量を評価した．

その結果，イバブラジンは 5 mg/kg では呼吸系の各パラメータに影響を及ぼさなかったが，20 及び 80 mg/kg の投与後 30 分に一過性の呼吸数の増加（投与前値と比べてそれぞれ 17 及び 18%）が認められ，無影響量は 5 mg/kg であった（表 2.6.2.4.3-1）．

表 2.6.2.4.3-1　ラットの呼吸数（回／分）に対するイバブラジンの作用

用量（mg/kg）	投与前	投与後					
		30 分	60 分	90 分	120 分	180 分	240 分
0	90	91	94	88	88	89	92
5	96	101	99	98	101	102	99
20	92	108*	99	98	97	96	100
80	99	117**	106	103	104*	102	99

データは，平均値±標準誤差（各群 n=8）で示す.
* p≦0.05，** p≦0.01：対照群との比較（Newman-Keuls 検定）

2.6.2.4.4　視覚器系

臨床試験において視覚障害（光視）が報告されたことから，マウス視細胞，網膜標本及びラット網膜色素上皮細胞を用いた *in vitro* 試験，マウス及びラットを用いた *in vivo* 試験において，イバブラジンの視覚器系に対する作用を評価した.

2.6.2.4.4.1　マウス網膜における HCN チャネルの発現分布

［参考資料：4.2.1.3-12］

C57BL 系マウスから採取した網膜標本を用いて，HCN チャネルの網膜内での発現を免疫組織染色法により検討した.

その結果，視細胞（杆体）に HCN1 チャネル，双極細胞に HCN1 及び HCN2 チャネルの分布が認められたが，水平細胞には HCN1 及び HCN2 チャネルの分布は認められなかった.

2.6.2.4.4.2　マウス視細胞の I_h 及び視神経伝達に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-12］

C57BL 系マウスから採取した視細胞及び網膜標本（各 3 又は 4 標本）を用いて，網膜電流 I_h 及び I_{Kx} 並びに光受容体から二次視覚神経への神経伝達に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 0.3，3 及び 30 μmol/L とし，マウス視細胞（杆体）における I_h 及び I_{Kx} を穿孔パッチクランプ法により測定した．また，同濃度にて，5 Hz の正弦波光（フリッカー）刺激に対するマウス網膜水平細胞の電気応答を細胞内微小電極法により測定した.

その結果，イバブラジンは視細胞（杆体）における I_h を阻害し，IC_{50} は 2.7 μmol/L（1.3 μg/mL）であった．一方，I_{Kx} には 30 μmol/L まで影響を及ぼさなかった．また，イバブラジンは 5 Hz のフリッカー刺激で生じる網膜標本の電位の振幅を 30 μmol/L（14 μg/mL）で約 50%抑制したことから，点滅光を識別する能力である時間分解能を低下させると考えられた.

2.6.2.4.4.3 有色及びアルビノラットの視覚に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-13］

Long-Evans 系（有色）ラット及び Wistar 系（アルビノ）ラット（雄 6 例／群）を用いて，網膜機能に対するイバブラジンの作用を検討した．短期的な影響の評価では，イバブラジンを Long-Evans 系ラットに 3，6 及び 12 mg/kg，Wistar 系ラットに 12 mg/kg の用量で単回静脈内投与した．持続的な影響の評価では，両系統に対して浸透圧ポンプを用いてイバブラジンを平均 11 mg/kg/日の用量で 3 週間皮下持続投与するとともに，1 週間の休薬期間を設定し，網膜機能の回復性を検討した．対照群には媒体である生理食塩液を投与した．投与又は休薬期間終了後，心拍数測定及び暗順応下での ERG 検査を実施した．また，3 週間皮下持続投与群については，HCN チャネルの網膜内発現分布，並びに光情報伝達の初期反応である 11-cis クロモフォアのオプシンへの結合能も評価した．さらに，3 週間皮下持続投与後のイバブラジン及び ONO-IN-306 の血漿中濃度を測定した．

ERG 検査の結果を図 2.6.2.4.4.3-1 に示した．イバブラジンは単回投与において，Long-Evans 系ラットの心拍数を 3 mg/kg より減少させ，ERG において時間分解能の低下を示唆する変化として 3 Hz 刺激時と 0.3 Hz 刺激時の応答振幅比（R3Hz/R0.3Hz）あるいは 2 Hz のフリッカー刺激に対する応答を 3 あるいは 6 mg/kg より減少させたが，閃光刺激に対する a 波及び b 波に対し影響を及ぼさなかった．これらの影響は，イバブラジンの 3 週間皮下持続投与においても認められたが，その程度は単回静脈内投与時と同様であり，1 週間の休薬により回復した．また，イバブラジンは Long-Evans 系ラットのオプシンに対する 11-cis クロモフォアの結合能，網膜形態及び HCN チャネル分布のいずれに対しても影響を及ぼさなかった．これら Long-Evans 系ラットで認められた網膜機能に対する作用は Wistar 系ラットにも同様に認められ明らかな系統差は認められなかった．持続投与終了時のイバブラジン及び ONO-IN-306 の血中濃度は，Long-Evans 系ラットでそれぞれ 86 及び 3.1 ng/mL，Wistar 系ラットでそれぞれ 153 及び 3.5 ng/mL であった．

以上の結果，イバブラジンは Long-Evans 系ラット，Wistar 系ラットとともに網膜機能において時間分解能を低下させが，オプシンに対する 11-cis クロモフォアの結合能，HCN チャネルの網膜内発現分布に影響を及ぼさなかった．また，イバブラジンの網膜への影響に明らかな系統差は認められなかった．

2.6.2 薬理試験の概要文
イバブラジン塩酸塩

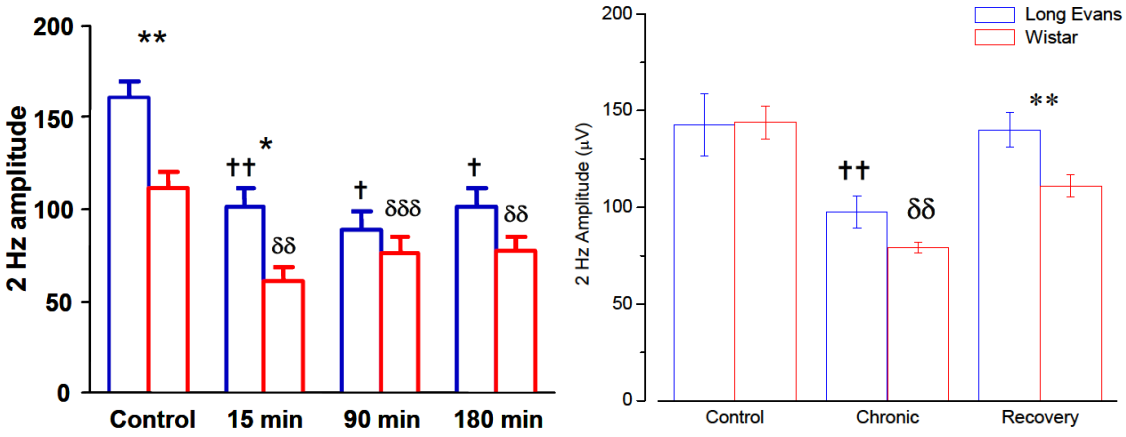


図 2.6.2.4.4.3-1　有色及びアルビノラットの ERG に対するイバブラジンの作用
左図：イバブラジン（12 mg/kg）単回投与後の経時的変化
右図：イバブラジン（11 mg/kg/日）3 週間皮下持続投与後及び 1 週間休薬後の変化
データは，平均値±標準誤差（各群 n=5～12）で示す.
* p≦0.05，** p≦0.01：同時間における系統差の比較（t 検定）
† p<0.05，†† p<0.01：Long-Evans 系ラットにおける対照群との比較（Tukey 検定）
δδ p<0.01，δδδ p<0.001：Wistar 系ラットにおける対照群との比較（Tukey 検定）

2.6.2.4.4.4　網膜色素変性症モデルマウスの網膜に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-14］

網膜色素変性症モデルである Rd10 マウス及び野生型（WT）マウス（雌雄計 4～17 例／群）にイバブラジンを 12 mg/kg の用量で 1 日 1 回，10 日間反復皮下投与し，網膜の変性及びリモデリング過程に対するイバブラジンの及ぼす影響を評価した．対照群には媒体である生理食塩液を投与した．Rd10 マウスの網膜変性はおよそ 20～25 日齢から認められることから，12 日齢の WT 及び Rd10 マウスを用いた．最終投与後 60 分の心拍数測定の後，網膜を摘出し，TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出，免疫細胞染色（PKC，HCN1，HCN2 及び GFAP）及びウエスタンブロッティング（オプシン及び GFAP）によるタンパク発現解析を実施した.

その結果，イバブラジンは Rd10 マウス及び WT マウスともに心拍数を減少させたが，網膜のアポトーシスや関連タンパクの発現などいずれも影響しなかった．このことから，イバブラジンは網膜の変性及びリモデリング過程に影響を与えないと考えられた.

2.6.2.4.4.5　ラット網膜色素上皮の機能及び生存に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-15］

PVG 系ラット網膜色素上皮細胞（各濃度 3～7 標本）を用いて，網膜色素上皮細胞の機能に対するイバブラジンの作用を検討した．検討濃度は 0.1，1 及び 10 μmol/L とし，24，48 又

は 72 時間培養後に経上皮電気抵抗を測定した．また，72 時間培養後に ZO-1 及び F-アクチンを免疫組織染色することで，網膜色素上皮細胞のタイトジャンクション構造を観察した．

その結果，イバブラジンは 10 μmol/L まで網膜色素上皮細胞の経上皮電気抵抗及びタイトジャンクション構造に対して影響を及ぼさなかった．

2.6.2.4.4.6　　ラット網膜細胞の生存及びアポトーシスに対する作用

［参考資料：4.2.1.3-15］

Wistar 系ラット（雄 2 又は 5 例／群）にイバブラジンを 6 及び 60 mg/kg の用量で 1 日 1 回，4 週間反復経口投与し，網膜細胞の生存及び超微細構造に対する影響を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である純水を投与した．投与期間終了後，摘出した眼球の TUNEL 染色及び電子顕微鏡観察を行い，網膜のアポトーシス及び網膜内層及び網膜色素上皮の構造変化を評価した．

その結果，イバブラジンは 60 mg/kg まで網膜のアポトーシス及び網膜の構造に対して影響を及ぼさなかった．

2.6.2.4.4.7　　ラットにおける光情報伝達カスケードに対する作用

［参考資料：4.2.1.3-16］

Wistar 系ラット（雄，評価 1 時点につき 5 例／群）にイバブラジンを 5.6 mg/kg の用量で 1 日 1 回，5 又は 7 日間反復経口投与し，光情報伝達過程に関連する主要タンパク質（ロドプシン，アレスチン及びトランスデューシン）の発現量及び局在化に対する影響を検討した．投与容量は 2 mL/body とし，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．標準照明下の検討では，標準条件下（12 時間毎の暗明周期）で 7 日間投与し，翌日安楽死させた．明順応下の検討では，標準条件下で 5 日間投与し，暗所にて 24 時間飼育後，明所に戻して 0，1，2，5，10，20，40 及び 60 分後に剖検した．暗順応下の検討では，標準条件下で 5 日間投与し，暗所にて 24 時間及び明所にて 1 時間飼育後，暗所に戻して 0，1，2，5，20，40，60 及び 120 分後に剖検した．剖検後，眼球を摘出し，網膜のロドプシン，アレスチン及びトランスデューシンの免疫染色，並びに脈絡膜，網膜，毛様体及び虹彩の病理組織学的検査を実施した．

その結果，イバブラジンは標準照明下，明順応条件下及び暗順応条件下のいずれにおいても，網膜のロドプシン，アレスチン及びトランスデューシンの発現量及び分布に影響を及ぼさず，脈絡膜，網膜，毛様体及び虹彩への病理組織学的変化も示さなかった．

2.6.2.4.5 胃腸管系

2.6.2.4.5.1 ラットにおける消化管輸送能に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-17］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，15 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与し，消化管輸送能に対する作用を検討した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与後 45 分にフクシン（色素マーカー）を経口投与し，15 分間のフクシンの移動距離を計測した．

その結果，イバブラジンは 5 mg/kg 以上で消化管輸送を抑制し，5，15 及び 30 mg/kg における抑制率はそれぞれ 7%，17%及び 20%であった．

2.6.2.4.5.2 ラットにおける胃液分泌に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-18］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，15 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与し，胃液分泌に対する作用を検討した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与後 30 分に麻酔下で幽門を結紮し，その 4 時間後に胃液を採取した．胃液量，pH，緩衝能，胃液の遊離酸度及び総酸度を測定した．

その結果，イバブラジンは 5 mg/kg において遊離酸度及び総酸度を有意に低下（それぞれ 60%及び 47%の低下）させたが，15 及び 30 mg/kg では変化は認められなかったことから，偶発的な変化と判断した．また，胃液量，pH 及び緩衝能に影響を及ぼさず，胃液分泌に対する無影響量は 30 mg/kg であった．

2.6.2.4.5.3 胃潰瘍誘発作用

1） 単回経口投与後の胃潰瘍誘発作用

［評価資料：4.2.1.3-19］

Wistar 系ラット（雄 8 例／群）にイバブラジンを 5，15 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与し，胃潰瘍の誘発作用を検討した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与前後 24 時間に絶水し，投与後 24 時間に摘出した胃を実体顕微鏡で観察した．潰瘍スコアは，0（病変なし）～8（長さ 3 mm を超える線形潰瘍が 10 個を超える）で評価した．

その結果，イバブラジンは 30 mg/kg において胃潰瘍を誘発し（胃潰瘍スコア中央値：3），胃潰瘍誘発作用に対する無影響量は 15 mg/kg であった．

2） 14 日間静脈内投与後の胃潰瘍誘発作用

［評価資料：4.2.1.3-20］

単回経口投与による検討において，イバブラジンは30 mg/kg で胃潰瘍を誘発した．本試験では，イバブラジンの胃潰瘍誘発作用が全身曝露を介した変化であるか検討する目的で，SD 系ラット（雄 13 例／群）にイバブラジンを 28 mg/kg の用量で 1 日 1 回，3 時間，14 日間反復静脈内持続投与した．投与容量は 12 mL/kg とし，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．また，イバブラジン投与群に 6 例のサテライト動物を設け，イバブラジンの血漿中濃度を測定した．

その結果，イバブラジンの 28 mg/kg/日において胃に病理組織学的変化は認められなかった．その他，一般状態の変化として，鎮静や立毛，眼瞼下垂などが認められ，体重，体重増加量及び摂餌量の低値が認められたが，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量及び病理組織学的検査において変化は認められなかった．14 日間反復投与後のイバブラジンの血漿中 AUC24h 及び Cmax はそれぞれ 7414 ng･h/mL 及び 2200 ng/mL であった．胃潰瘍が認められた 30 mg/kg 経口投与時の血漿中薬物濃度は測定していないが，ラットに 58 mg/kg を経口投与した際の血漿中イバブラジンの AUC24h 及び Cmax（Wistar 系ラット，雄，初回投与時）は 3501 ng･h/mL 及び 1231 ng/mL であった［2.6.6.3.1.1］．

以上より，イバブラジンを 14 日間反復静脈内投与したが，胃に病理組織学的変化は認められなかった．本試験におけるイバブラジンの血漿中 AUC24h 及び Cmax は，胃潰瘍が認められた 30 mg/kg 単回経口投与時よりも高いと考えられることから，経口投与時に認められた胃潰瘍は全身曝露を介した変化ではなく，胃粘膜への直接的な刺激によると考えられた．

2.6.2.4.6 腎臓系

2.6.2.4.6.1 ラットの腎臓系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-21］

Wistar 系ラット（雄 10 例／群）にイバブラジンを 5，15 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与し，腎機能に対する作用を検討した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与前 48 時間に絶水し，投与直後に生理食塩液 50 mL/kg を強制負荷投与した．蓄尿を 4 時間実施し，尿量，尿 pH，尿中 Na 及び K 排泄量を測定した．

その結果，イバブラジンは 5 mg/kg 以上で尿量を最大 58%増加させ，15 mg/kg 以上で尿中 Na 排泄量を最大 37%増加させた．その他，15 mg/kg 以上で尿 pH の高値が認められたが，ごく軽度な変動であった（対照群：pH5.9，イバブラジン 15 mg/kg 以上：pH6.1）．

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1 ペリンドプリルとの併用効果

［参考資料：4.2.1.4-1］

ラット慢性心不全モデルを用いて，ACE 阻害剤であるペリンドプリルと併用したときのイバブラジンの効果について検討した．

雄 Wistar 系ラットの左冠動脈を結紮し，心筋梗塞により心不全を誘発した．ペリンドプリルを 0.4 mg/kg/日の用量で，イバブラジン及びペリンドプリルの併用では，イバブラジンを 10 mg/kg/日の用量で，結紮後 7 日から 90 日間混餌投与した．対照群及び偽手術群には，通常餌を与えた．ミラーカテーテルを用いて，心機能を 90 日間の投与終了時に評価した．

左室収縮末期圧容積関係（LVESPVR）及び左室拡張末期圧容積関係（LVEDPVR）の結果を図 2.6.2.5.1-1 に示した．ペリンドプリルは，収縮期血圧を低下させるとともに，LVESPVR の増加及び LVEDPVR の減少作用を示し，収縮期及び拡張期の心機能を改善させた．併用群では，ペリンドプリル単剤群と比較して，イバブラジンによる心拍数減少が認められたが，収縮期血圧への影響は認められなかった．また，併用群では，ペリンドプリル単剤群と比較して，LVEDPVR の減少により左室の伸展性が更に改善することが示され，左室の拡張機能に対する上乗せ効果が認められた．LVESPVR に関しては，ペリンドプリル単剤群と併用群の増加は同程度であった．

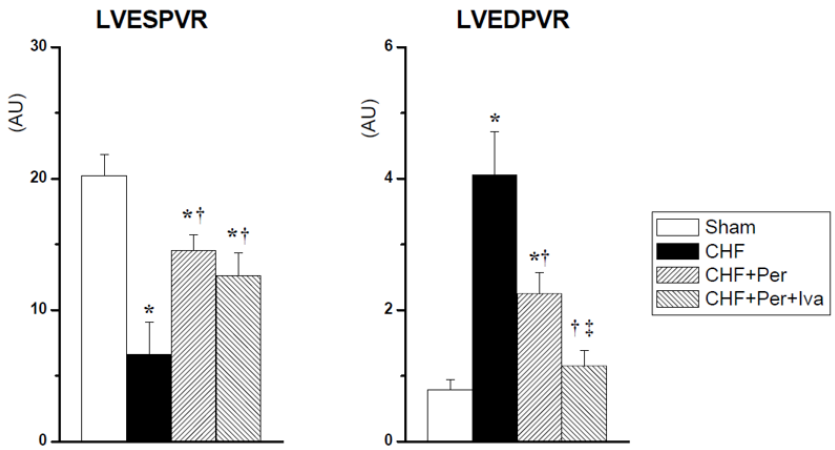


図 2.6.2.5.1-1 慢性心不全ラットにおけるペリンドプリルとイバブラジンとの併用効果
データは，平均値±標準誤差（各群 5～9 例）で示す．
Sham：偽手術群，CHF：対照群，CHF＋Per：ペリンドプリル単剤群
CHF＋Per＋Iva：ペリンドプリルとイバブラジンの併用群
LVESPVR：左室収縮末期圧容積関係，LVEDPVR：左室拡張末期圧容積関係
*p<0.05：偽手術群との比較（t 検定），†p<0.05：対照群との比較（t 検定）
‡p<0.05：ペリンドプリル単剤群との比較（LSD 検定）

2.6.2.5.2 ドブタミンの強心作用

［参考資料：4.2.1.4-2］

ラット急性心不全モデルを用いて，ドブタミンの強心作用に対するイバブラジンの併用作用を検討した．

雄 Wistar 系ラットに，虚血再灌流（左冠動脈閉塞 10 分間，再灌流 5 分間）を 2 回行い，虚血再灌流後 30 分から，ドブタミンを 2.5 μg/kg/分の用量で 90 分間静脈内持続投与し，ドブタミン投与開始後 30 分にイバブラジンを 2 mg/kg の用量で単回静脈内投与した．イバブラジンの溶媒は，生理食塩液を用いた．虚血再灌流後に心拍数を連続測定し，虚血再灌流後 30, 60，90 及び 120 分に心臓の超音波検査を実施した．

心拍数，左室内径短縮率及び前壁肥厚率の結果をそれぞれ図 2.6.2.5.2-1，図 2.6.2.5.2-2 及び図 2.6.2.5.2-3 に示した．ドブタミンは，心拍数の増加に加え，虚血再灌流により低下した左室内径短縮率及び前壁肥厚率を有意に増加させ，強心作用を示した．イバブラジンは，ドブタミンによる心拍数増加を有意に抑制したが，左室内径短縮率及び前壁肥厚率を変化させず，ドブタミンによる強心作用に影響を及ぼさなかった．

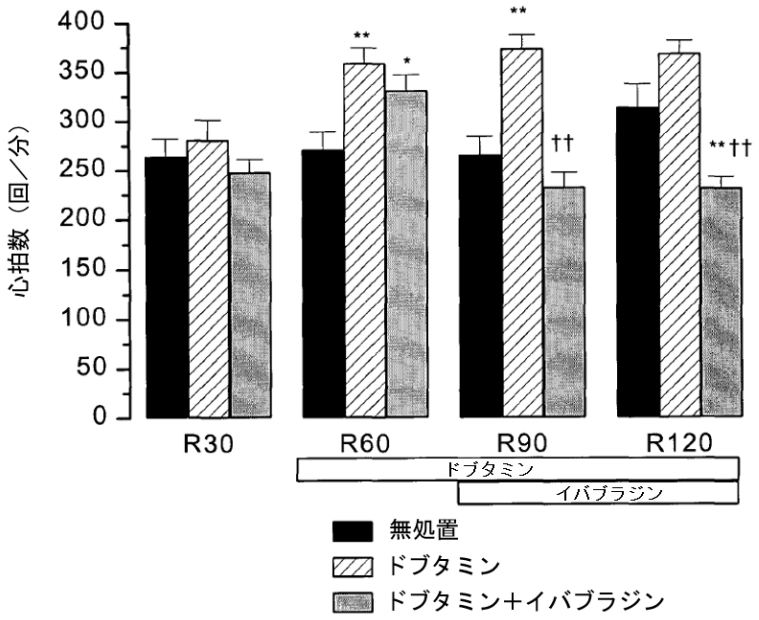


図 2.6.2.5.2-1 ラット急性心不全モデルの心拍数に対するドブタミンとイバブラジンとの併用作用

データは，平均値±標準誤差（各群 8～9 例）で示す．
R30～120 は，虚血再灌流後の時間（分）を示す．
*p<0.05，**p<0.01：無処置群との比較（Tukey 検定）
††p<0.01：ドブタミン群とドブタミン＋イバブラジン群との比較（Tukey 検定）

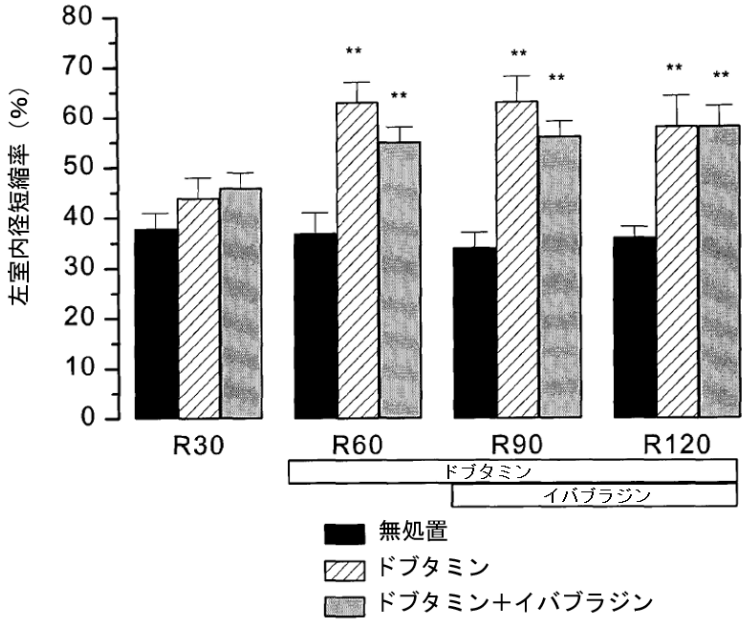


図 2.6.2.5.2-2　ラット急性心不全モデルの左室内径短縮率に対するドブタミンとイバブラジンとの併用作用

データは，平均値±標準誤差（各群 8～9 例）で示す.
R30～120 は，虚血再灌流後の時間（分）を示す.
**p<0.01：無処置群との比較（Tukey 検定）

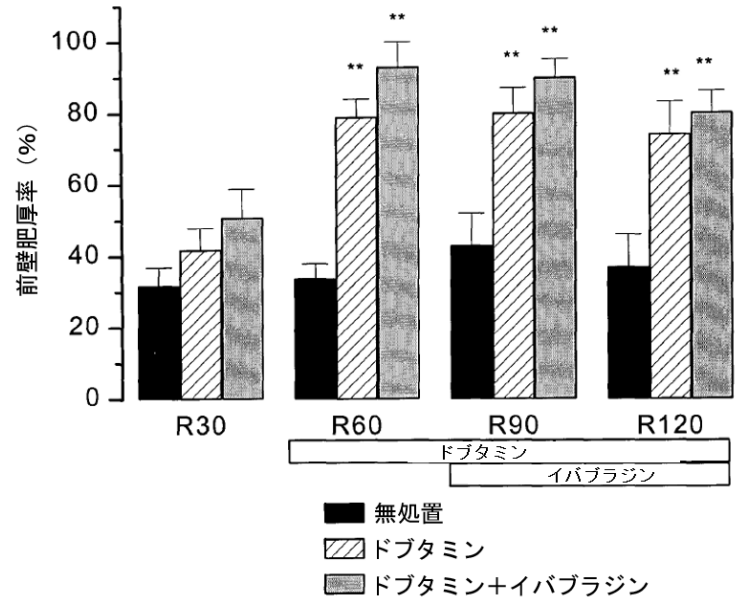


図 2.6.2.5.2-3　ラット急性心不全モデルの前壁肥厚率に対するドブタミンとイバブラジンとの併用作用

データは，平均値±標準誤差（各群 8～9 例）で示す.
R30～120 は，虚血再灌流後の時間（分）を示す.
**p<0.01：無処置群との比較（Tukey 検定）

2.6.2.5.3 アスピリンの抗血小板凝集作用

［評価資料：4.2.1.4-3］

アスピリンの抗血小板凝集作用に対するイバブラジンの併用作用を検討した．

雄 Wistar 系ラット（各群 10 例）にイバブラジンは 5 mg/kg の用量で単回経口投与した．アスピリンは25 mg/kg の用量でイバブラジンの投与直後に単回経口投与し，両薬剤を併用投与した．投与後 1 時間に，1 mmol/L のアラキドン酸による血小板凝集の誘導を評価した．アスピリン単剤群には，イバブラジンの代わりに蒸留水を投与した．

イバブラジンは，単剤で血小板凝集作用を示さなかった．また，イバブラジンを併用したときのアスピリンの抗血小板凝集作用は，アスピリン単剤群と差を認めず，イバブラジンは，アスピリンの抗血小板凝集作用に影響を及ぼさなかった．

2.6.2.5.4 アスピリンの胃潰瘍誘発作用

［評価資料：4.2.1.4-4］

アスピリンの胃潰瘍誘発作用に対するイバブラジンの併用作用を検討した．

雄 Wistar 系ラット（各群 10 例）にイバブラジンを 5 mg/kg の用量で単回経口投与した．アスピリンは50 mg/kg の用量でイバブラジンの投与直後に単回経口投与し，両薬剤を併用投与した．投与後 5 時間にラットの胃を摘出し，実体顕微鏡で潰瘍の程度をスコア化して評価した．アスピリン単剤群には，イバブラジンの代わりに蒸留水を投与した．

イバブラジンは，単剤で胃潰瘍誘発作用を示さなかった．また，イバブラジンを併用したときのアスピリンの潰瘍スコアは，アスピリン単剤群と差を認めず，イバブラジンは，アスピリンの胃潰瘍誘発作用に影響を及ぼさなかった．

2.6.2.5.5 ワルファリンの抗凝固作用

［評価資料：4.2.1.4-5］

ワルファリンの抗凝固作用に対するイバブラジンの併用作用を検討した．

雄 Wistar 系ラット（各群 10 例）にイバブラジンを 80 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 4 日間反復経口投与した．ワルファリンは，イバブラジン投与直後のタイミングで 1 日目に 0.6 mg/kg，2～4 日目に 0.3 mg/kg/日の用量で 4 日間反復経口投与した．ワルファリン単剤群には，イバブラジンの代わりに蒸留水を投与し，陽性対照としてフェニルブタゾン（150 mg/kg/日，4 日間反復経口投与）を用いた． 4 日目の投与後 2 時間に，プロトロンビン時間を測定し，抗凝固作用を評価した．

ワルファリンは，プロトロンビン時間を有意に延長させ，抗凝固作用を示した．イバブラジンは，ワルファリンによる抗凝固作用に影響を及ぼさなかった．一方，フェニルブタゾンはワルファリンの抗凝固作用を有意に阻害した．

2.6.2.5.6 ベラパミル，ジルチアゼム，ジゴキシン及び硝酸イソソルビドとの相互作用

［評価資料：4.2.1.4-6］

ベラパミル，ジルチアゼム，ジゴキシン及び硝酸イソソルビドに対するイバブラジンの併用作用について検討した．

雌雄ビーグル系イヌ（各群 6 例）に，ベラパミルは 10 mg/kg の用量で，ジルチアゼムは 2.5 mg/kg の用量で，ジゴキシンは 10 μg/kg の用量でそれぞれ 1 日 2 回 7 日間反復経口投与した．硝酸イソソルビドは 100 mg/kg の用量で単回経口投与した．ベラパミル，ジルチアゼム，ジゴキシンに関しては，投与開始後から 6 又は 7 日に，硝酸イソソルビドに関しては，単回投与時に，イバブラジンを 0.5 mg/kg の用量で静脈内単回投与し，血行動態（血圧，心拍数）及び心電図（PR 間隔，QRS 幅，QT 間隔）をテレメトリーシステムを用いて評価した．対照である各単剤投与群には，イバブラジンの代わりに媒体である生理食塩液を投与した．

ベラパミルは，心拍数を増加させ，PR 間隔及び QTcB を延長させた．イバブラジンは，ベラパミルによる心拍数増加を抑制し，PR 間隔及び QTcB の延長を抑制した．イバブラジンは，ベラパミル投与時のその他の血行動態及び心電図に関して，影響を及ぼさなかった．

ジルチアゼムは，わずかに心拍数を減少させ，PR 間隔を延長させた．イバブラジンは，ジルチアゼム投与時のその他の血行動態，心電図に影響を及ぼさなかった．

ジゴキシンは単剤で心拍数を減少させた．イバブラジンは，ジゴキシン投与時の血行動態，心電図に影響を及ぼさなかった．

硝酸イソソルビドは，平均血圧を低下させ，心拍数を増加させた．イバブラジンは硝酸イソソルビドによる心拍数増加を抑制し，QT 間隔を延長させたが，QTcB は延長させなかった．イバブラジンは，硝酸イソソルビド投与時のその他の血行動態及び心電図に関して，影響を及ぼさなかった．

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

イバブラジンは，単回経口投与で正常ラットの心拍数を用量に応じて減少させた．また，10 日間反復経口投与時においても，初回投与と同程度に心拍数を減少させたことから，イバブラジンの心拍数減少作用は反復投与後により減弱しないと考えられた．また，イバブラジンは，心拍数の減少に応じて，一回拍出係数を増加させ，心係数は維持あるいはわずかな低下に留まった．心拍数がヒトに近いブタでも，心拍数を用量に応じて減少させた．運動負荷時のブタでは，一回拍出量の増加傾向を示し，心拍出量の低下はプロプラノロールよりも小さかった．また，イバブラジンは，運動負荷イヌにおいて，心拍数減少に応じて左室拡張時間を延長させ，心筋酸素消費量を低下させた．心筋酸素消費量の低下は，心房ペーシング条件下で完全に消失したことから，その作用は心拍数減少作用に基づくものと考えられた．以上より，イバブラジンは，心拍数を減少させることで，左室拡張時間を延長させ，一回あたりの心臓からの拍出量を増加させることで，時間当たりの心拍出量を維持しつつ，心筋酸素消費量を低下させることが可能と考えられた．

また，イバブラジンは，イヌ及びブタの検討から，平均血圧，冠動脈の血流及び血管抵抗，左室収縮能，心室の再分極及び房室伝導時間に影響を及ぼさず，心拍数以外の血行動態に大きな影響を及ぼさなかった．一方，アテノロール，プロプラノロールなどのβ遮断薬は，イバブラジンと同程度の心拍数減少作用を示す条件下で，左室拡張時間を増加させ，心筋酸素消費量を低下させたが，左室収縮能も低下させ，陰性変力作用を示した．心房ペーシング条件下においても，左室収縮能及び心筋酸素消費量の低下作用が残存し，左室拡張時間は短縮したことから，β遮断薬による陰性変力作用は心拍数減少に伴う左室拡張時間の増加を制限していると考えられた．冠動脈を狭窄したブタにおいても，イバブラジンは心拍数を減少させ，房室伝導時間，左室収縮能及び血圧に影響することなく虚血領域の局所収縮性を増加させた．一方，β遮断薬のプロプラノロールはイバブラジンと同程度に心拍数を減少させたが，房室伝導時間を延長させ，左室収縮能を低下させた．また，プロプラノロールは虚血領域の局所収縮性を増加させたが，その増加作用はイバブラジンよりも弱かった．以上より，イバブラジンは，心室の伝導性，収縮性，再分極及び血圧に影響することなく心拍数のみを減少させた．したがって，イバブラジンは，β遮断薬が有する陰性変力作用及び陰性変伝導作用を有しておらず，β遮断薬よりも心機能への影響を懸念することなく心拍数を特異的に調節することが可能な薬剤になり得ると考えられた．

ラット慢性心不全モデルにおいて，イバブラジンは，冠動脈結紮後 1 週から 12 週間の投与により，心臓のポンプ機能の指標である LVEF を増加させた．本試験では，イバブラジンを投与した半数以上の個体で LVEF の改善が示された．また，イバブラジンは，正常動物と

同様に，心拍数を減少させるとともに，一回拍出量を増加させ，心拍出量を保持した．また，ラットに冠動脈結紮後 2 カ月から投与を開始した重症心不全モデル及びイヌの慢性心不全モデルにおいても，LVEF をはじめとする心機能パラメータを改善させた．また，心室拡張末期容積の増大及び心室の線維化を抑制し，組織学的な心室リモデリングを抑制することが示された．これらの結果は，文献報告においても，一貫して同様の効果が報告されている[5)6)]．また，カルシウムハンドリング関連の発現異常に加え，心臓のエネルギー代謝異常，心室の K^+チャネル，HCN チャネル発現異常などの電気生理学的リモデリングも抑制することが報告されている[7) 8)]．更に，心室の血管新生を増加させることも報告されており[9)]，RAAS 及び交感神経系因子の賦活化を抑制し，心臓への負荷を軽減していると考えられた．イヌにおいては，予後マーカーである NT-proBNP が低下したことから，予後の改善効果も説明可能と考えられる．以上より，イバブラジンは，心拍数減少作用により心機能を保持しつつ心臓の仕事量を減らし，心負荷の軽減により心室リモデリングを抑制して，心不全における心機能を改善すると考えられた．

イバブラジンの心拍数を減少させる作用機序については，主に HCN4 チャネルで構成される I_fを阻害することによると考えられる．HCN チャネルには 4 つのサブタイプ（HCN1～4）が知られており[10) 11)]，洞結節では主に HCN4 チャネルが発現し[12)～14)]，ペースメーカー電流 I_f を発生させている．I_f は洞結節の自発活動の発生に重要な役割を果たしており，心拍数の自律的制御を調節する[15) 16)]．I_f は細胞膜が過分極したときに活性化され，内向き電流を供給することで，ペースメーカー電流 I_f を発生させ，それが拡張期脱分極相の形成に重要な役割を果たすことが報告されている[16) 17)]．

イバブラジンは，HCN4 チャネルの強制発現細胞を用いた検討から，HCN4 チャネル電流を添加濃度に応じて阻害した．イバブラジンは，HCN チャネルの 4 つのサブタイプいずれも同程度の阻害作用を示すが[18)]，HCN1 チャネルと HCN4 チャネルに対する阻害様式は異なり，イバブラジンは，チャネルが閉じた状態でも HCN1 チャネル電流を阻害するが，HCN4 チャネル電流に対しては開口時のみ阻害作用を示した．また，ウサギ単離洞結節細胞において，$I_{Ca,L}$，$I_{Ca,T}$ 及び I_K を阻害せず，I_f に対して選択的な阻害作用を示した．ウサギ洞結節の活動電位では，活動電位の閾値には影響せず，拡張期脱分極速度を選択的に低下させ，周期長を延長させた．イバブラジンは，ラット単離右心房の自発拍動数及びウサギ単離洞結節の自発活動電位の発生頻度に対し，0.1 μ mol/L 以上で濃度依存的な抑制作用を示し，時間とともに抑制作用が増強する特徴が認められた．以上より，イバブラジンは，洞結節において，主に HCN4 チャネルを遮断し，I_f を阻害することで，自発活動電位の拡張期脱分極速度を低下させると考えられた．更に，この脱分極速度の低下は自発活動電位の発生頻度を減少させ，最終的に心拍数が減少すると考えられた．

イバブラジンの代謝物である ONO-IN-306 は，ヒト HCN4 チャネル電流及び I_f に対して，イバブラジンと同程度の阻害作用を示した．また，ONO-IN-306 は，ラットの単回経口投与でイバブラジンと同程度の心拍数減少作用を示した．イバブラジンをラット及びイヌに経口投与したときのイバブラジンの AUC24h に対する ONO-IN-306 のモル比は，それぞれ 0.0573 以下及び 0.103 以下であった．一方，ヒトにイバブラジンを経口投与したときのイバブラジンの AUC24h に対する ONO-IN-306 のモル比は，0.381～0.413 であることから，ヒトにおける心拍数減少作用に ONO-IN-306 が寄与しているものと考えられた．

ラットにイバブラジン 3 mg/kg を経口投与したときの血漿中イバブラジンの Cmax は 151 ng/mL（0.3 μmol/L）であった．イバブラジンは 1.5 mg/kg 以上でラットの心拍数を減少させ，0.1 μmol/L 以上でラット単離右心房の自発拍動数を減少させたことから，有効血漿中濃度は 50 ng/mL （0.1 μmol/L）付近と推察された．一方，慢性心不全患者を対象とした海外第Ⅲ相試験（SHIFT 試験）における血漿中イバブラジンの Cmax は，2.5，5 及び 7.5 mg の 1 日 2 回投与で，14～35 ng/mL（0.03～0.07 μmol/L）であった．活性代謝物である ONO-IN-306 の心拍数減少作用への寄与を考慮に入れると，ヒトの有効血中濃度は非臨床試験結果から予測される有効血中濃度に近似していると考えられた．

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験において，イバブラジンは，心拍数調節に関わるβ受容体及びムスカリン受容体への結合阻害作用を示さなかった．イバブラジンは，Na^+チャネル及び L 型 Ca^{2+}チャネル（フェニルアルキルアミン結合部位）に対する結合阻害作用を示したが，I_f を 50%以上阻害する濃度において $I_{Ca,L}$ に大きな影響を及ぼさないこと，及び心室筋の活動電位に影響を及ぼさなかったことから，これらチャネルに対する阻害作用はないと考えられた．したがって，イバブラジンは，HCN チャネル及び本チャネルで構成される I_f を選択的に阻害すると考えられた．

ブタ心筋虚血モデル及び高コレステロール血症ウサギを用いた検討結果から，イバブラジンは，心室細動に対する効果及び収縮機能が保たれた拡張不全型心不全に対する効果が示されている．更に，心拍数の増加は，動脈壁に慢性ストレスを与え，血管内皮細胞の障害により動脈硬化を促進することが報告されており[19) 20)]，実際，イバブラジンは，心拍数を減少させることで，血管内皮機能やアテローム性動脈硬化に対して有効であることが確認されている[21) 22)]．

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

2.6.2.6.3.1 中枢神経系

中枢神経系に及ぼす影響として，ラットに 80 mg/kg まで経口投与したが，自発運動及びヘキソバルビタール誘発睡眠への影響は認められず，ペンチレンテトラゾール誘発痙攣，疼痛誘発性又は鎮痛作用も示さなかった．一方，ラットの一般症状及び行動に対する作用（Irwin 試験）の評価において 119 mg/kg 以上で鎮静及び体温低下を示し，無影響量は 59 mg/kg であった．また，イヌの反復投与毒性試験においては 10 mg/kg/日以上で振戦などの中枢神経症状を示し，無影響量は 3.5 mg/kg（7 mg/kg/日）であった［2.6.6.9.2.4］．

イバブラジンの標的受容体である HCN チャネルは中枢神経系にも発現しており，膜電位を制御することで神経伝達に関与することが知られている [23) 24)]．また，HCN チャネルが発現低下又は欠損したラット又はマウスにおいて運動失調又は癲癇などの症状が報告されている [23) 25)]．以上のことから，高用量投与時に認められた中枢神経症状は，イバブラジンの薬理作用である HCN チャネル阻害作用により発現した可能性が考えられた．

ラット 59 mg/kg 経口投与時の血漿中薬物濃度は測定していないが，ラットに 58 mg/kg を経口投与した際の血漿中イバブラジンの Cmax（Wistar 系，雄，初回投与時）は 1231 ng/mL［2.6.6.3.1.1］，イヌに無影響量である 3.5 mg/kg を経口投与した際の血漿中イバブラジンの Cmax は 1174～1250 ng/mL であり［2.6.6.3.2.4］，臨床最大用量における Cmax との間には 34 倍の安全域が認められている（2.6.2.6.3.7）．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において，中枢神経系への影響を示唆する成績は得られていない［2.5.5］．以上のことから，イバブラジンが臨床において中枢神経系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

2.6.2.6.3.2 心血管系

心血管系に及ぼす影響として，イバブラジン及び ONO-IN-306 はそれぞれ 0.1（0.047 μg/mL）及び 0.3 μmol/L（0.15 μg/mL）以上でイヌ摘出プルキンエ線維の活動電位持続時間（APD70 又は APD90）を延長させた．この変化は 12 又は 20 回／分の低頻度刺激時のみに認められ，心拍数の変動範囲と考えられる 40 又は 60 回／分の刺激頻度ではイバブラジン及び ONO-IN-306 のいずれも 10 μmol/L（4.7 及び 4.9 μg/mL）まで活動電位持続時間の延長作用は認められなかった．また，イバブラジン及び ONO-IN-306 はいずれも 3 μmol/L（1.4 及び 1.5 μg/mL）以上で hERG チャネル電流（I_{Kr}）を阻害した．I_{Kr} に対するイバブラジン及び ONO-IN-306 の IC_{50} はそれぞれ 4.85 及び 15.8 μmol/L（2.3 及び 7.8 μg/mL）であり，臨床最大用量における Cmax（10.5 及び 2.25 ng/mL，蛋白非結合体）との間にはそれぞれ 219 及び 3467 倍の乖離が認められている．イヌを用いたテレメトリー試験では，イバブラジンは最大用量の 15 mg/kg（30 mg/kg/日）まで QTcF 延長作用を示さなかった．イヌテレメトリー試験

でのQTcFに対する無影響量15 mg/kgにおける血漿中イバブラジン及びONO-IN-306のCmaxはそれぞれ2911～4141 ng/mL及び252～446 ng/mLであり，臨床最大用量におけるCmaxとの間にはそれぞれ83倍及び34倍の安全域が認められている（2.6.2.6.3.7）．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において，QTc 延長作用を示唆する成績は得られていない［2.5.5］．以上のことから，イバブラジンが臨床においてQTc延長作用を示す可能性は低いと考えられた．

一方，イヌテレメトリー試験において，1.5 mg/kg（3 mg/kg/日）以上で心拍数の減少，5 mg/kg（10 mg/kg/日）以上で収縮期血圧の上昇，洞房ブロック及び洞停止が認められた．心拍数及び心電図に対する変化はイヌを用いた反復投与毒性試験でも認められており，53週間反復投与毒性試験の 24 mg/kg/日では高度な徐脈の継続により死亡した例も認められた．これら心臓に対する影響は，イバブラジンの薬理作用である心拍数減少作用及びその延長にある変化と考えられた．なお，イバブラジンを過量投与したイヌに認められた心拍数の減少は，ドブタミン又はイソプレナリンなどの陽性変時作用薬により回復したことから，臨床において過度の徐脈が認められた場合は陽性変時作用薬による処置が有用であると考えられた．

2.6.2.6.3.3 呼吸系

呼吸系に及ぼす影響として，ラットにおいて 20 mg/kg 以上で呼吸数の増加が投与後 30 分において一過性に認められた．しかし，ラットで認められた呼吸数の増加の程度は投与前値と比べ20%未満の軽度な変化であり，その他，最大吸気及び呼気流量，吸気時間，呼気時間，気道抵抗及び一回換気量への影響は最大用量である80 mg/kgまで認められなかった．また，ラットにおいて59 mg/kgまで中枢神経系に対する影響が認められなかったことから，ラットで認められた呼吸数の増加は中枢神経系に対する作用を介したものではないと考えられた．一方，ラットにおいて，イバブラジンは 7 及び 35 mg/kg の単回投与後 30 分間よりそれぞれ 12 及び 25%の心拍数減少作用を示していることから［2.6.6.8.2.1］，呼吸数の一過性の増加は，薬理作用による心拍数の変動によって生じた二次的影響の可能性が考えられた．呼吸系に対する無影響量である 5 mg/kg 経口投与時の血漿中薬物濃度は測定していないが，ラットに 3 mg/kg を単回経口投与した際の血漿中イバブラジンの Cmax（Wistar 系ラット，雄）は54 ng/mL［2.6.5.3］であり，臨床最大用量におけるCmaxとの間の安全域は1.5倍の安全域が認められている（2.6.2.6.3.7）．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において呼吸系への影響を示唆する成績は得られていない［2.5.5］．以上のことから，イバブラジンが臨床において呼吸系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

2.6.2.6.3.4 視覚器系

イバブラジンの標的受容体である HCN チャネルは網膜にも存在しており[10]，マウスの網膜を用いた検討において，視細胞に HCN1 チャネル，双極細胞に HCN1 及び HCN2 チャネルの発現が認められた．このうち，HCN1 チャネルは網膜電流 I_h を介して視細胞における光刺激後の脱分極過程に関与しており[26][27]，HCN1 遺伝子欠損マウスでは視細胞における光刺激後の脱分極が抑制されることで光刺激が飽和し，点滅光の識別能力（フリッカー融合頻度）が低下するとされ[28][29]，視機能に対する HCN1 チャネルの関与が考えられる．

イバブラジンはマウスの視細胞における網膜電流 I_h を阻害し，IC_{50} は 2.7 μmol/L（1.3 μg/mL）であった．一方，イバブラジンはウサギにおいて洞結節の I_f を阻害し，その IC_{50} は 1.5 μmol/L（0.7 μg/mL）であったことから，イバブラジンは心臓 I_f と網膜の I_h に対して同様の濃度域で阻害作用を発揮すると考えられた．また，イバブラジンは，30 μmol/L（14 μg/mL）で網膜標本における点滅光に対する電気応答を抑制したことから，HCN1 遺伝子欠損マウス同様に時間分解能を低下させると考えられた．ラットを用いた 3 週間の反復投与の検討において，イバブラジンは最低用量の 3 mg/kg/日の単回投与より ERG において時間分解能の低下を示唆する変化として 3 Hz 刺激時と 0.3 Hz 刺激時の応答振幅比（R3Hz/R0.3Hz）あるいは 2 Hz のフリッカー刺激に対する振幅を減少させた．しかし，ERG の影響は投与期間の延長により増悪せず，1 週間の休薬により回復し，HCN チャネルの網膜内分布及び光情報伝達の初期反応である 11-cis クロモフォアのオプシンへの結合能には影響しなかった．さらに，イバブラジンは，ラットの網膜細胞のアポトーシスや網膜微細構造に影響を及ぼさず，ラット網膜の光伝達関連タンパク（ロドプシン，アレスチン及びトランスデューシン）の発現量や分布，または網膜色素変性モデルマウスの網膜の変性過程にも影響を与えなかった．

また，イバブラジンはメラニンと可逆的に結合することが知られており，メラニン含有眼組織における本薬の分布はアルビノラットと比べ有色ラットの方が高かった［2.6.4.4.4］．しかし，網膜機能に及ぼす影響は有色及びアルビノラットとの間に差は認められなかった．また，イヌを用いた 53 週間反復投与毒性試験において，網膜を含む硝子体後部のイバブラジン及び ONO-IN-306 濃度は投与終了後 12 週間の休薬時でも残存していたが，ERG の影響は 1 週間の休薬により回復性を示した［2.6.6.3.2.4］．これらのことから，イバブラジンはメラニン含有組織への蓄積によって視機能に対する影響が増強される可能性は低いと考えられた．

以上のことから，イバブラジンで認められた視覚器系に対する影響は，網膜の器質的変化を伴うものではなく，心臓のペースメーカー電流 I_f と共通の特性を有する網膜 I_h に対する薬理作用（I_h 阻害により光刺激の減衰が弱まるため，光に対する感受性が亢進し，時間分解能が低下する）に関連した可逆的な変化と考えられた．視覚器系への影響は，ラット及びイヌ

ともに最低用量とした 3 及び 2 mg/kg/日より認められ，その血中の濃度 Cmax は 54 ng/mL［2.6.5.3］及び 88～95 ng/mL［2.6.7.7H］と，イバブラジンの臨床最大用量における Cmax と概ね同程度であった．イバブラジンの視覚器系への影響に関連した変化として臨床試験において光視が認められているが，その多くは軽度であり，日常生活に影響を及ぼす可能性は低いと考えられている［2.5.5］．

2.6.2.6.3.5 腎臓系

腎臓系に及ぼす影響として，最低用量である 5 mg/kg 以上でラット尿量の高値，15 mg/kg 以上で尿中 Na 排泄量の高値が認められた．同様の作用は，ラットの反復投与毒性試験においても 6.5 mg/kg/日以上で認められた［2.6.6.3.1.1］．ラットでは循環器系への影響として，1 mg/kg で心拍数の減少及びその代償反応と考えられる一回拍出量の増加が認められている．一回拍出量の増加は心房の伸展刺激により Na 利尿作用を有する ANP の分泌を増加させる[30]．このことから，ラットの利尿作用と ANP との関連性について検討するため，ラット 26 週間反復投与毒性試験にて血清中 ANP 濃度を測定した［2.6.6.3.1.3］．その結果，雌雄の 180 mg/kg/日で ANP は有意な高値が認められ，同用量で尿 Na 排泄量の高値が認められた．また，有意な変化ではなかったが，雌の 6 mg/kg/日より ANP の高値傾向が認められた．このことから，ラットで認められた尿量及び尿中 Na 排泄量の高値は，イバブラジンの薬理作用に関連して増加した ANP が関与したものと考えられた．ラットで認められた尿量又は尿電解質の変動はイヌで認められなかったが，この理由は基礎心拍数の高いラットで心拍数減少が発現した結果，心臓への負荷が過度に生じたためと推察された［2.6.6.9.2.2］．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において腎機能への影響を示唆する成績は得られていない［2.5.5］．以上のことから，臨床においてイバブラジンが腎機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

2.6.2.6.3.6 胃腸管系

胃腸管系に及ぼす影響として，最低用量である 5 mg/kg 以上でラットの消化管輸送能を低下させ，その程度は，最高用量の 30 mg/kg において 20%程度の抑制であった．ラット 52 週間反復投与毒性試験では，32 mg/kg/日まで摂餌量又は体重増加量に変化は認められず，栄養状態の指標とされる総蛋白質，アルブミン及び脂質系への影響は認められなかった［2.6.6.3.1.4］．このことから，イバブラジンで認められた消化管の影響は重篤な作用を示すものではないと考えられた．なお，ANP は消化管運動抑制作用を有することが報告されており[31]，消化管輸送能の低下が認められた 5 mg/kg 以上では ANP の作用と考えられる尿量及び Na 排泄量の高値が認められることから，ラットで認められた消化管輸送能の低下は，

ANP 濃度の上昇による二次的変化の可能性も考えられた．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において胃腸管系への影響を示唆する成績は得られていない［2.5.5］．

30 mg/kg を単回経口投与したラットで軽度な胃潰瘍が認められ，類似した変化として，ラットの反復経口投与毒性試験では 32 mg/kg/日以上で腺胃のびらんが認められた．しかし，血漿中イバブラジン濃度がより高かった 2 週間反復静脈内投与試験ではこれらの所見が認められなかったことから，胃への作用は全身曝露を介した変化ではなく胃粘膜への直接的な刺激によると考えられた．類似した変化として，イヌの反復経口投与毒性試験では 10 mg/kg/日以上の投与直後に嘔吐が認められた［2.6.6.3］．ラットで胃に病理組織学的変化が認められなかった用量 15 mg/kg 及びイヌで嘔吐が認められなかった 1 回用量 6.25 mg/kg と臨床最大用量（体重 60 kg として 0.125 mg/kg/日）との間には 120 及び 50 倍の用量差が存在する．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において消化管への影響を示唆する成績は得られていない［2.5.5］．以上のことから，臨床においてイバブラジンが消化管に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

2.6.2.6.3.7　　安全性薬理試験における曝露量及びヒトとの曝露量比

安全性薬理試験の無影響量における血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び臨床最大用量におけるヒト Cmax との比を表 2.6.2.6.3.7-1 に示した．

表 2.6.2.6.3.7-1　安全性薬理試験の無影響量におけるイバブラジンの Cmax 及びヒトの Cmax との比較

試験項目	種	無影響量（mg/kg）		性別	Cmax（ng/mL）	Cmax 比（動物／ヒト[a]）
中枢神経系	ラット	58		雄	1231[b]	35
	イヌ	3.5		雄 雌	1250[c] 1174[c]	36 34
心血管系	イヌ	心拍数[d]	0.5	雄 雌	62 24	1.8 0.7
		血圧，心電図[e]	1.5	雄 雌	391 198	11 5.7
		心電図（QTc）[f]	15	雄 雌	4141 2911	118 83
呼吸系	ラット	5		雄	54[g]	1.5

a：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における Cmax（35 ng/mL）
b：ラット 4 週間反復経口投与毒性試験（1 日 1 回投与）［2.6.6.3.1.1］における初回投与時の値
c：イヌ 53 週間反復経口投与毒性試験（1 日 2 回投与）［2.6.6.3.2.4］における投与 53 週目の値
d：ONO-IN-306 の Cmax（2.46 ng/mL）とヒト Cmax（7.5 ng/mL）との比は 0.3 倍
e：ONO-IN-306 の Cmax（6.14～12.9 ng/mL）とヒト Cmax（7.5 ng/mL）との比は 0.8～1.7 倍
f：ONO-IN-306 の Cmax（252～446 ng/mL）とヒト Cmax（7.5 ng/mL）との比は 34～59 倍
g：ラット薬物動態試験［2.6.5.3］（3 mg/kg）における単回経口投与時の値

2.6.2.6.4 薬力学的薬物相互作用試験

イバブラジンは，ラット慢性心不全モデルにおいて，ACE 阻害剤であるペリンドプリルとの併用により，血圧に影響を及ぼさず，心拍数を減少させた．また，ペリンドプリル単剤投与と比較して，心機能が更に改善する効果が示され，ACE 阻害剤との併用投与による心不全の心機能に対する上乗せ効果があると考えられた．ラット急性心不全モデルを用いて，強心剤であるドブタミンとの併用効果を検討した結果，イバブラジンは，ドブタミンによる心拍数増加を有意に抑制したが，ドブタミンによる強心作用に影響を及ぼさなかった．ドブタミンは，心不全の増悪による急性心不全時に心収縮力の増強を目的に用いられており [32)]，イバブラジンは，ドブタミンの有効性を保持しつつ，心拍数を調節することが可能であると考えられた．

イバブラジンは，アスピリンの抗血小板凝集作用及び胃潰瘍誘発作用，ワルファリンの抗凝固作用に影響を及ぼさなかった．また，ベラパミル，ジルチアゼム，ジゴキシン及び硝酸イソソルビド投与時の血行動態，心電図に対して，イバブラジンは特筆すべき影響を及ぼさなかった．

2.6.2.6.5 結論

イバブラジンは，洞結節の HCN4 チャネルを遮断し，I_f を阻害することにより，心室の伝導性，収縮性，再分極及び血圧に影響することなく心拍数のみを特異的に減少させた．イバブラジンは，心拍数を減少させることで，心拍出量を維持しつつ，心筋酸素消費量を低下させた．更に，イバブラジンによる心筋酸素消費量の低下は，心不全時の心負荷を軽減し，心室リモデリングを抑制することで，心不全における心機能低下を改善すると考えられた．また，心拍数減少及びそれに関連した心電図に対する変化以外に，*in vitro* 試験において hERG チャネル電流（I_{Kr}）阻害作用及び活動電位持続時間延長作用が認められたが，*in vivo* 試験において QTc の延長作用は認められなかった．視覚器系に及ぼす影響として，光感受性の亢進に伴う ERG への影響が認められたが，イバブラジンの薬理作用に関連した可逆的な変化であり，器質的変化を伴う重篤な視覚異常に至る可能性は低いと考えられた．その他，中枢神経症状や一過性の呼吸数の増加，尿量及び尿電解質の高値，消化管輸送能の低下，腺胃のびらんが認められた．しかし，これらが認められない用量と臨床用量との間に安全域が認められること，あるいはヒトへの外挿性がない変化と考えられること加え，これまでに実施した国内外の臨床試験において，中枢神経系，呼吸系，腎臓系又は胃腸管系への影響を示唆する成績は得られていない．このことから，イバブラジンの臨床において中枢神経系，呼吸系，腎臓系及び胃腸管系に重篤な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．また，薬力学的薬物

相互作用では，ACE 阻害剤との上乗せ効果を示し，ドブタミンによる強心作用に影響を及ぼさなかった.

以上の成績から，イバブラジンは新たな慢性心不全の治療薬として有用であると考えられた.

2.6.2.7 参考文献

1） Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vilaine JP. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. Br J Pharmacol 1994;112:37-42.

2） Thollon C, Bidouard JP, Cambarrat C, Lesage L, Reure H, Delescluse I, et al. Stereospecific in vitro and in vivo effects of the new sinus node inhibitor (+)-S 16257. Eur J Pharmacol 1997;339:43-51.

3） Champeroux P, Martel E, Vannier C, Blanc V, Leguennec JY, Fowler J, et al. The preclinical assessment of the risk for QT interval prolongation. Therapie. 2000;55:101-9.

4） Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, et al. Functional role of L-type Cav1.3 Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:5543-8.

5） Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F et al. Long-term heart rate reduction induced by the selective I_f current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. Circulation 2004;109:1674-9.

6） Fang Y, Debunne M, Vercauteren M, Brakenhielm E, Richard V, Lallemand F et al. Heart rate reduction induced by the if current inhibitor ivabradine improves diastolic function and attenuates cardiac tissue hypoxia. J Cardiovasc Pharmacol 2012;59:260-7.

7） Ceconi C, Comini L, Suffredini S, Stillitano F, Bouly M, Cerbai E et al. Heart rate reduction with ivabradine prevents the global phenotype of left ventricular remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;300:H366-73.

8） Suffredini S, Stillitano F, Comini L, Bouly M, Brogioni S, Ceconi C et al. Long-term treatment with ivabradine in post-myocardial infarcted rats counteracts f-channel overexpression. Br J Pharmacol 2012;165:1457-66.

9） Ulu N, Henning RH, Goris M, Schoemaker RG, van Gilst WH. Effects of ivabradine and metoprolol on cardiac angiogenesis and endothelial dysfunction in rats with heart failure. J Cardiovasc Pharmacol 2009;53:9-17.

10） Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. Annu Rev Physiol 2001;63:235-57.

11） Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. Trends Cardiovasc Med 2002;12:206-13.

12） Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. Circ Res 1999;85:e1-6.

13） Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. Eur J Biochem. 2001;268:1646-52.

14） Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, Cogé F, Piffard L, Guillaumin JP, et al. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. Br J Pharmacol 2007;150:37-46.

15） DiFrancesco D. The contribution of the 'pacemaker' current (i_f) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. J Physiol 1991;434:23-40.

16） DiFrancesco D. The pacemaker current (I_f) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. Cardiovasc Res 1995;30:307-8.

17） DiFrancesco D. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. Nature 1986;324:470-3.

18） Stieber J, Wieland K, Stöckl G, Ludwig A, Hofmann F. Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. Mol Pharmacol. 2006;69:1328-37.

19） Palatini P. Elevated heart rate in cardiovascular diseases: a target for treatment?. Prog Cardiovasc Dis. 2009;52:46-60.

20） Heidland UE, Strauer BE. Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption. Circulation. 2001;104:1477-82.

21） Albaladejo P, Carusi A, Apartian A, Lacolley P, Safar ME, Benetos A. Effect of chronic heart rate reduction with ivabradine on carotid and aortic structure and function in normotensive and hypertensive rats. J Vasc Res 2003;40:320-8.

22） Baumhakel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Bohm M. Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. Atherosclerosis 2010;212:55-62.

23） Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. Pflugers Arch. 2007;454:517-22.

24） Benarroch EE. HCN channels: function and clinical implications. Neurology. 2013;80:304-10.

25） Brennan GP, Baram TZ, Poolos NP. Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels in Epilepsy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6.

26） Barrow AJ, Wu SM. Low-conductance HCN1 ion channels augment the frequency response of rod and cone photoreceptors. J Neurosci. 2009;29:5841-53.

27） Cervetto L, Demontis GC, Gargini C. Cellular mechanisms underlying the pharmacological induction of phosphenes. Br J Pharmacol. 2007;150:383-90.

28） Knop GC, Seeliger MW, Thiel F, Mataruga A, Kaupp UB, Friedburg C, et al. Light responses in the mouse retina are prolonged upon targeted deletion of the HCN1 channel gene. Eur J Neurosci. 2008;28:2221-30.

29） Seeliger MW, Brombas A, Weiler R, Humphries P, Knop G, Tanimoto N, et al. Modulation of rod photoreceptor output by HCN1 channels is essential for regular mesopic cone vision. Nat Commun. 2011;2:532.

30） 佐久間 康夫. 24.腎臓，心臓および松果体の内分泌機能. In: 村田誠四郎, editors. ギャノング生理学. 原書 22 版. 丸善株式会社; 2006.477-489.

31） Guo HS, Cui X, Cui YG, Kim SZ, Cho KW, Li ZL, et al. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide on spontaneous contraction in gastric antral circular smooth muscle of rat. Acta Pharmacol Sin. 2003;24:1021-6.

32） ドブトレックス注射液 100 mg. 医薬品添付文書. 第 11 版（2018 年 4 月改訂）

2.6.3 薬理試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験の概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 10
2.6.3.3 副次的薬理試験 14
2.6.3.4 安全性薬理試験 15
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 20

略号一覧

略号	略さない表現又は説明
AP	Action potential
APD	Action potential duration
CHF	Chronic heart failure
CHO cell	Chinese hamster ovary cell
CO	Cardiac output
ECG	Electrocardiogram/-graphy/-graphic
F	Female
GLP	Good Laboratory Practice
HCN	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel
HF	Heart failure
HEK293 cell	Human embryonic kidney cells 293
HERG	Human ether-a-go-go related gene
HR	Heart rate
HRR	Heart rate reduction
IC_{50}	Concentration required for 50% inhibition
$I_{Ca,L}$	L-type calcium ion current
$I_{Ca,T}$	T-type calcium ion current
I_f　I_h	Hyperpolarization-activated cation current
I_K	Delayed rectifier potassium ion current
I_{Kr}	Rapid delayed rectifier potassium ion current
I_{Ks}	Slow delayed rectifier potassium ion current
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenous
Ki	Inhibition constant
$K_{0.5}$	Half-maximal inhibitory concentration
LV	Left ventricle
LVEDPVR	Left ventricular end-diastolic pressure-volume relations
M	Male
MBP	Mean blood pressure
MTD	Maximum tolerated dose
n	Sample size
NT-proBNP	N-Terminal pro Brain Natriuretic Peptide
po	per os
PR-interval	PR-interval of electrocardiogram
QTc	QT interval corrected for heart rate
RPE	Retinal pigment epithelium
SAN	Sinoatrial node
sc	Subcutaneously
SBP	Systolic blood pressure
ST	ST segment of electrocardiogram
SV	Stroke volume
TEM	Transmission electron microscopy
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamic					
***In vivo* studies**					
Heart rate reducing effect					
Single dose	Wistar rat	po	Institut de Recherches Servier, France	NP07237	4.2.1.1-1
Repeat dose	Wistar rat	po	Institut de Recherches Servier, France	NP06822	4.2.1.1-2
Hemodynamic effects					
Consious rats	Long Evans rat	sc	[redacted], UK	NP05189	4.2.1.1-3 (参考資料)
Anesthetized pigs	Large White pig	iv	Institut de Recherches Servier, France	NP05585	4.2.1.1-4
Pigs during exercise	Yucatan micropig	po	Institut de Recherches Servier, France	NP06824	4.2.1.1-5
Dogs during exercise	Mongrel dog	iv	[redacted] France	NP15062	4.2.1.1-6 (参考資料)
Exercise-induced myocardial ischemia	Yucatan micropig	po	Institut de Recherches Servier, France	NP07580	4.2.1.1-7
Effects in CHF models					
CHF rats	Wistar rat with CHF	In diet	Institut de Recherches Servier, France	NP38371	4.2.1.1-8
Severe CHF rats	Wistar rat with severe CHF	Drinking water	[redacted], France	NP28361	4.2.1.1-9 (参考資料)
CHF dogs	Mongrel dog with CHF	po	[redacted], USA	NP29503	4.2.1.1-10 (参考資料)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
***In vitro* studies**					
Inhibition of HCN4 channel current	CHO cells transfected with human HCN4 channels	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP35418	4.2.1.1-11
Mechanism of action on HCN4 and HCN1 channels	HEK293 cells transfected with human HCN4 and mouse HCN1 channels	*In vitro*	[redacted], Italy	NP16268	4.2.1.1-12 (参考資料)
Effect on I_f	Rabbit isolated sinoatrial node cells	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP06823	4.2.1.1-13
Selectivity of I_f	Rabbit isolated sinoatrial node cells	*In vitro*	[redacted], France	NP05648	4.2.1.1-14 (参考資料)
Effects on action potential	Rabbit isolated sinoatrial node	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP07238	4.2.1.1-15
				Thollon, et al.1994	4.2.1.1-16
				Thollon, et al.1997	4.2.1.1-17
Contractility on atria and vasorelaxant effect on aorta	Rat isolated atria and aorta	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP07239	4.2.1.1-18
Atrial spontaneous rate	Rat isolated atria Rabbit isolated sinoatrial node	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP15295	4.2.1.1-19
Pharmacodynamics of metabolites					
Effect of metabolite on HCN4 channel current	HEK293 cells transfected with human HCN4 channels	*In vitro*	[redacted], Germany	NP07905	4.2.1.1-20 (参考資料)
Effect of metabolites on I_f	Rabbit isolated sinoatrial node cells	*In vitro*	[redacted], France	NP05648	4.2.1.1-14 (参考資料)
Effect of metabolites on HRR	Wistar rat	po, iv	[redacted], France	NP06262	4.2.1.1-21
Effect of cleaved metabolites on spontaneous atrial beating rate	Rat isolated right atria	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP08114	4.2.1.1-22
Effect of non-cleaved metabolites on spontaneous atrial beating rate	Rat isolated right atria	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP15080	4.2.1.1-23

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Receptors binding profile	Cell membrane	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP07025	4.2.1.2-1
Ventricular fibrillation	Pig model of myocardial ischemia	iv	[redacted] France	NP26861	4.2.1.2-2 (参考資料)
Diastolic dysfunction	Hypercholesterolemic New Zealand White rabbit	Drinking water	[redacted] Canada	NP29883	4.2.1.2-3 (参考資料)
Endothelial dysfunction	Dyslipidemic hApoB$^{+/+}$ mouse	Drinking water	[redacted] Canada	NP23868	4.2.1.2-4 (参考資料)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Safety Pharmacology					
Central Nervous System					
Locomotor activity - Hexobarbital induced sleep - Proconvulsant effect	Wistar rat	po	[redacted] France	NP07027[a]	4.2.1.3-1
Analgesic effect - Hot plate test	Wistar rat	po	[redacted] France	NP07032[a]	4.2.1.3-2
Irwin test	Wistar rat	po	[redacted], France	NP08101	4.2.1.3-3 (参考資料)
Cardiovascular System					
Action potential duration assays	Dog Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted], France	NP07045[a]	4.2.1.3-4
	Dog Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted], France	NP15229[a]	4.2.1.3-5
	Guinea pig papillary muscle Rabbit Purkinje fibers	*In vitro*	Institut de Recherches Servier, France	NP07238	4.2.1.1-15 (参考資料)
Delayed-rectifier K^+ current assay	COS7 cells transfected with hERG, KvLQT1/minK	*In vitro*	[redacted], France	NP07984	4.2.1.3-6 (参考資料)
ECG recordings	Beagle dog	po	[redacted], France	NP15258[a]	4.2.1.3-7
ECG recordings	Wild type and $Ca_v1.3^{-/-}$ mouse	ip	[redacted], France	NP32589	4.2.1.3-8 (参考資料)
Dobutamine-induced tachycardia	Beagle dog	iv	[redacted], France	NP15814[a]	4.2.1.3-9 (参考資料)
Overdose: reversal of cardiac effects by positive chronotropic agents	Mongrel dog	iv	[redacted], France	NP15299[a]	4.2.1.3-10 (参考資料)
Respiratory System					
Effects on respiration	Wistar rat	po	[redacted], France	NP07028[a]	4.2.1.3-11

a: Report contains a GLP compliance statement

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Safety Pharmacology (cont'd)					
Ophthalmology/Visual System					
Effect on native I_h, Immunohistochemistry	Isolated mouse retina - Isolated mouse rods & bipolar neurons	*In vitro*	[redacted], Italy	NP15864	4.2.1.3-12 (参考資料)
Impact on the electroretinographic sinusoidal response	Long Evans and Wistar rat	iv, sc	[redacted], Italy	NP23620	4.2.1.3-13 (参考資料)
Effect on the rate of retinal degeneration	Wild type and Rd10 mouse	sc	[redacted], Italy	NP25528	4.2.1.3-14 (参考資料)
Function and viability of retinal pigment epithelium	Rat retinal pigment epithelium cells	*In vitro*	[redacted], France	NP08129	4.2.1.3-15 (参考資料)
Retinal cells viability and apoptosis	Wistar rat	po	[redacted], France	NP08129	4.2.1.3-15 (参考資料)
Phototransduction cascade	Wistar rat	po	[redacted], France	NP08493	4.2.1.3-16 (参考資料)
Gastrointestinal System					
Gastrointestinal transit	Wistar rat	po	[redacted], France	NP03145[a]	4.2.1.3-17
Gastric secretion	Wistar rat	po	[redacted], France	NP03147[a]	4.2.1.3-18
Gastric ulcerogenic effect	Wistar rat	po	[redacted], France	NP03148[a]	4.2.1.3-19
Gastric ulcerogenic effect	Sprague-Dawley rat	iv infusion	[redacted] - Netherlands	NP03160[a]	4.2.1.3-20
Renal System					
Diuresis and urinary electrolytes	Wistar rat	po	[redacted], France	NP03146[a]	4.2.1.3-21

a: Report contains a GLP compliance statement

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Combination with perindopril	Wistar rat with CHF	In diet	[redacted], France	NP28465	4.2.1.4-1 (参考資料)
Combination with dobutamine	Wistar rat with acute HF	iv	[redacted], France	NP08201	4.2.1.4-2 (参考資料)
Anti-aggregant effect of aspirin	Wistar rat	po	[redacted], France	NP05059[a]	4.2.1.4-3
Gastric ulcerogenic effect of aspirin	Wistar rat	po	[redacted], France	NP05065[a]	4.2.1.4-4
Anticoagulant effect of warfarin	Wistar rat	po	[redacted], France	NP07033[a]	4.2.1.4-5
Interaction with verapamil, diltiazem, digoxin and isosorbide dinitrate	Beagle dog	iv	[redacted], France	NP05204 [a]	4.2.1.4-6

a: Report contains a GLP compliance statement

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Type of Study	Animals/Samples (No. per groups)	Method of Administration	Doses (mg/kg[a])	Noteworthy Findings	Report Number	Location in CTD
***In vivo* studies**						
Heart rate reducing effect						
Single dose	Wistar rat (n=6)	po	0, 1.5, 3, 6	Ivabradine induced dose-dependent HRR without modifying MBP.	NP07237	4.2.1.1-1
Repeat dose	Wistar rat (n=12)	po	0, 3 (Day 1-9), 0, 3 (twice daily, Day 10)	Ivabradine showed similar HRR from Day 1 through Day 10 without affecting MBP.	NP06822	4.2.1.1-2
Hemodynamic effects						
Consious rats	Long Evans rat (n=9)	sc	0, 1 4 days	Ivabradine induced reproducible HRR with the increase in stroke index and slight reduction of cardiac index.	NP05189	4.2.1.1-3
Anesthetized pigs	Large White pig (n=8-10)	iv	0, 0.03, 0.1, 0.3, 1	Ivabradine induced dose-dependent HRR without affecting MBP, coronary blood flow, coronary vascular resistance, LV contractility, QTc and PR-interval.	NP05585	4.2.1.1-4
Pigs during exercise	Yucatan micropig (n=4-5)	po	0, 5 propranolol; 5	Ivabradine induced dose-dependent HRR without affecting LV contractility and vascular resistance.	NP06824	4.2.1.1-5
Dogs during exercise	Mongrel dog (n=8)	iv	0, 1 atenolol; 1	Ivabradine induced HRR with the prolongation of diastolic time and reduction of myocardial oxygen consumption.	NP15062	4.2.1.1-6
Exercise-induced myocardial ischemia	Yucatan micropig (n=4-5)	po	0, 5 propranolol; 5	Ivabradine , unlike propranolol, induced specific HRR without affecting LV contractility and PR-interval. Ivabradine reduced excecise induced ST segment shift and increased systolic segment shortning in ishemic area.	NP07580	4.2.1.1-7

a: Single dosing unless otherwise indicated

Type of Study	Animals/Samples (No. per groups)	Method of Administration	Doses (mg/kg[a])	Noteworthy Findings	Report Number	Location in CTD
Effects in CHF models						
CHF rats	Wistar rat (n=10-15)	In diet	0, 12 12 weeks	Ivabradine induced long-term HRR followed by improvement of the LV function in CHF rats.	NP38371	4.2.1.1-8
Severe CHF rats	Wistar rat (n=6-11)	Drinking water	0, 10 3 months	Ivabradine improved LV functions and prevented progressive LV remodeling in severe CHF rats.	NP28361	4.2.1.1-9
CHF dogs	Mongrel dog (n=6-8)	po	0, 15, 30 mg twice daily, 3 months	Ivabradine improved LV functions and prevented progressive LV remodeling in dogs with heart failure. Ivabradine reduced plasma level of NT-proBNP.	NP29503	4.2.1.1-10

a: Unless otherwise indicated

Type of Study	Animals/Samples (No. per groups)	Method of Administration	Concentrations (μmol/L)	Noteworthy Findings	Report Number	Location in CTD
***In vitro* studies**						
Inhibition of HCN4 channel current	CHO cells transfected with human HCN4 channel (n=5-6)	*In vitro*	0.1 to 10	Ivabradine inhibited HCN4 channel current in a concentration-dependent manner. The values of IC_{50} was 0.41 μmol/L	NP35418	4.2.1.1-11
Mechanism of action on HCN4 and HCN1 channels	HEK293 cells transfected with human HCN4 and mouse HCN1 channels (n=3-25)	*In vitro*	0.03 to 300	Ivabradine inhibited HCN4 and HCN1 channel current. The inhibition pattern was different between HCN4 and HCN1 channels. HCN4 channels were blocked only when HCN4 channels were open while HCN1 channel were blocked when HCN1 channels were close.	NP16268	4.2.1.1-12
Effect on I_f	Rabbit isolated sinoatrial node cell (n=4-10)	*In vitro*	0.1 to 30	Ivabradine inhibited the I_f in a concentration-dependent manner. The values of IC_{50} was 3.0 μmol/L.	NP06823	4.2.1.1-13
Selectivity of I_f	Rabbit isolated sinoatrial node cell (n=8-12)	*In vitro*	1 to 10	Up to 3 μmol/L, ivabradine selectively inhibited I_f without affecting other currents ($I_{Ca,L}$, $I_{Ca,T}$ and I_K).	NP05648	4.2.1.1-14
Effects on action potential	Rabbit isolated sinoatrial node (n=6-12)	*In vitro*	1 to 10	Ivabradine increased cycle length by decreasing diastolic depolarzation rate without any effect on maximal distolic potential and threshold potential.	NP07238	4.2.1.1-15
					Thollon, et al.1994	4.2.1.1-16
					Thollon, et al.1997	4.2.1.1-17
Contractility on atria and vasorelaxant effect on aorta	Rat isolated atria and aorta (n=8-11)	*In vitro*	0.1 to 100	Ivabradine reduced the atrial spontaneous rate on right atria without affecting contractility on left atria and vasorelaxant effect on aorta.	NP07239	4.2.1.1-18
Atrial spontaneous rate	Rat isolated atria (n=5-14) Rabbit isolated sinoatrial node (n=5) (0.03 μmol/L; n=1)	*In vitro*	Rat; 0.056 to 0.56 Rabbit; 0.03 to 1	More than 0.1 μmol/L Ivabradine decreased the atrial spontaneous rate in a concentration- and time-dependent manner.	NP15295	4.2.1.1-19

Type of Study	Animals/Samples (No. per groups)	Method of Administration	Doses (mg/kg) or Concentrations (μmol/L)	Noteworthy Findings	Report Number	Location in CTD
Pharmacodynamics of metabolites						
Effect of ONO-IN-306 on HCN4 channel current	HEK293 cells transfected with human HCN4 channels (n=7)	*In vitro*	0.3 to 30	Similar to ivabradine, ONO-IN-306 (main metabolite) inhibited the HCN4 channel current.	NP07905	4.2.1.1-20
Effect of ONO-IN-306 on I_f	Rabbit isolated sinoatrial node cells (n=7)	*In vitro*	10	In rabbit SAN cells, ONO-IN-306 inhibited I_f at 10 μmol/L with a similar potency as ivabradine.	NP05648	4.2.1.1-14
Effect of metabolites on HRR	Wistar rat (n=5-6)	iv, po	0, 2 (iv), 6 (po)	After oral administration, HRR effect of ONO-IN-306 and M31 was similar to that of ivabradine. After single iv dose, M22b and M26b had a similar HRR effect to ivabradine.	NP06262	4.2.1.1-21
Effect of cleaved metabolites on spontaneous atrial beating rate	Rat isolated right atria (n=4-6)	*In vitro*	0.1 to 10	The five cleaved metabolites, M9, M3, Y 492, M10 and M30 did not affect atrial spontaneous rate.	NP08114	4.2.1.1-22
Effect of non-cleaved metabolites on spontaneous atrial beating rate	Rat isolated right atria (n=5-7)	*In vitro*	0.1 to 10	Both non-cleaved metabolites, M28 and M32, reduced atrial beating rate with a similar effect to ivabradine.	NP15080	4.2.1.1-23

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Type of Study	Animals/Samples (No. per groups)	Method of Administration	Doses (mg/kg) or Concentrations (µmol/L)	Noteworthy Findings	Report Number	Location in CTD
Receptors binding profile	19 different receptors (n=3)	*In vitro*	0.001 to 100	Ivabradine had no binding activity on the tested receptors ($K_{0.5}$>10 µmol/L) except phenylalkylamine site of type L calcium channel (Ki=0.9 µmol/L) and sodium channel (Ki =4.0 µmol/L).	NP07025	4.2.1.2-1
Ventricular fibrillation	Pig model of myocardial ischemia (n=9)	iv	0, 0.5	Ivabradine induced HRR followed by increasing the ventricular fibrillation threshold.	NP26861	4.2.1.2-2
Diastolic dysfunction	Hypercholesterolemic New Zealand White rabbit (n=3-13)	Drinking water	0, 17 12 weeks	Ivabradine prevented diastolic dysfunction in hypercholesterolemic rabbits.	NP029883	4.2.1.2-3
Endothelial dysfunction	Dyslipidemic $hApoB^{+/+}$ mouse (n=8-15)	Drinking water	0, 10 3 months	Ivabradine prevented endothelial dysfunction associated with dyslipidemia.	NP23868	4.2.1.2-4

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.[a]	Doses (mg/kg[b])	Gender and No. per Groups	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number	Location in CTD
Central nervous	Rat / Wistar	po	0, 5, 20, 80	8M	No effect on the spontaneous locomotor activity, exploratory behavior (rearing) and stereotypies (grooming) (open-field study; positive control: chlorpromazine).	Yes	NP07027	4.2.1.3-1
	Rat / Wistar	po	0, 5, 20, 80	8M	No effect on the hexobarbital-induced sleep (positive control: clonidine).			
	Rat / Wistar	po	0, 5, 20, 80	10M	No effect on the pentylenetetrazole-induced convulsions (positive control: caffeine).			
	Rat / Wistar	po	0, 5, 20, 80	8M	No pro-algesic or analgesic effect (hot-plate test; positive control: buprenorphine).	Yes	NP07032	4.2.1.3-2
	Rat / Wistar	po	0, 15, 30, 59, 119, 238	3M	Irwin test: moderate sedation and slight hypothermia observed at 119 and 238 mg/kg (-1.1°C and -1.5°C, respectively).	No	NP08101	4.2.1.3-3

a: Single dosing unless otherwise indicated, b: Unless otherwise indicated

Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Admin.	Concentrations (µmol/L)	No. of Replicates	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number	Location in CTD
Cardio vascular	Dog Purkinje fibres	*In vitro* (pacing from 0.2 to 1 Hz)	0.1 to 10	n=6	Moderate increase in APD50, APD70 and APD90 at 0.33 Hz (from 3 µmol/L) and at 0.2 Hz (from 0.1 µmol/L). No effect on other AP parameters (amplitude, resting potential and maximal rate of depolarization). Similar profile for ONO-IN-306.	Yes	NP07045 NP15229	4.2.1.3-4 4.2.1.3-5
	Guinea-pig papillary muscle	*In vitro* (pacing at 1 Hz)	0.1 to 10	n=11, 16	Slight increase in APD50, APD75 and APD90 from 0.3 µmol/L (up to 9.1% for APD75 at 3 µmol/L). No effect on other AP parameters (amplitude, resting potential and maximal rate of depolarization).	No	NP07238	4.2.1.1-15
	Rabbit Purkinje fibres	*In vitro* (pacing at 0.25 Hz)	3 and 10	n=5	Slight and reversible increases in APD50 and APD90 at 3 µmol/L (14 and 15%) and at 10 µmol/L (46 and 40%).			
	COS7 cells transfected with hERG	*In vitro*	0.3 to 10	n=6	From 3 µmol/L, ivabradine and ONO-IN-306 inhibit I_{Kr} (IC_{50} = 4.85 µmol/L and 15.8 µmol/L, respectively) (100-fold less potent than control substance, E 4031).	No	NP07984	4.2.1.3-6
	COS7 cells transfected with KvLQT1/ minK	*In vitro*	3	n=7	No effect on I_{Ks}.			

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.[a] (duration)	Doses (mg/kg[b])	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number	Location in CTD
Cardio vascular (cont'd)	Dog / beagle	po (5 days)	0, 0.5, 1.5, 5, 15 twice daily	3M, 3F	Mean daily HRR from 2 x 1.5 mg/kg (-7%) to 2 x 5 mg/kg (-17%) without affecting MBP or ECG parameters (PR interval, QRS complex duration, QTc Fridericia and QT-Sarma). No further HRR at 2 x 15 mg/kg (-16%), indicative of a plateau effect. SA block, sinus arrest and slight increase in SBP from 2 x 5 mg/kg.	Yes	NP15258	4.2.1.3-7
	Mice / C57BL (WT), $Ca_v1.3^{-/-}$	ip	0, 0.1, 0.3, 1, 3, 6	WT: 7M $Cav1.3^{-/-}$: 11M	In WT, dose-dependent HRR, plateau-effect of -21% from 3 mg/kg without any other effect on ECG parameters. In $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, HRR maintained. Similar plateau effect on HRR (-31%) from 3 mg/kg; normalization of AV dysfunction linked to second degree AV block, QT prolongation in the absence of other adverse ECG effects including QTc Bazett up to 6 mg/kg.	No	NP32589	4.2.1.3-8
	Dog / beagle	Dobutamine: iv one hour before treatment	0.9±0.2	5M	Dobutamine: increased HR (+49%), decreased SV (-32%) with no effect on CO Ivabradine: rapid reversed dobutamine-induced tachycardia, without impairing the positive inotropic effect of the beta-adrenergic stimulation, no effect on PR and QT intervals other than that related to changes in HR.	Yes	NP15814	4.2.1.3-9
		-iv bolus then iv infusion for 1 hour	0, 0.5					
	Dog / mongrel	iv infusion	0, 0.5, 5 10	6M	HRR induced by an overdose (5 mg/kg) of ivabradine easily reversed by isoprenaline (0.5 µg/kg, iv) or dobutamine (200 µg/kg, iv). Isoprenaline (0.46 µg/kg, iv): effective after 10 mg/kg (MTD) of ivabradine. Efficacy of atropine (up to 82 µg/kg, iv): less reproducible than the other two agents.	Yes	NP15299	4.2.1.3-10

a: Single dosing unless otherwise indicated, b: Unless otherwise indicated

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain or Test System	Method of Admin.[a] (duration)	Doses (mg/kg[b]) or Concentrations	No. of Replicates or Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number	Location in CTD
Respiratory	Rat / Wistar	po	0, 5, 20, 80	8M	Transient increase (for 30 min post-dose) in the respiratory rate observed at 20 and 80 mg/kg (Emax = +17% and +18%, respectively). No significant effect on other respiratory parameters.	Yes	NP07028	4.2.1.3-11
Visual	Isolated mouse rods and retina	*In vitro*	0, 0.3 to 30 µmol/L	n=3 or 4	Expression of HCN1 channel isoforms in rods, HCN1 and HCN2 in bipolar neurons and no I_h channels in horizontal cells. Suppression of I_h in mouse rods with IC_{50} of 2.7 µmol/L. No effect on I_{Kx}. Suppression of response to 5 Hz flicker in horizontal cells with IC_{50} of 30 µmol/L.	No	NP15864	4.2.1.3-12
	Rat / Long Evans and Wistar	iv (single), sc (3 weeks)	0, 3, 6, 12 (iv) 0, 11 (sc)	6M	Reversible decrease in temporal resolution in ERG in pigmented and albino rats. No effect on retinal morphology, HCN channels distribution and rhodopsin/opsin content in retina.	No	NP23620	4.2.1.3-13
	Mouse / C57BL (WT), Rd10	sc (10 days)	0, 12	4 to 17 (M or F)	No effect on morphology or retinal specific protein expression in both WT and Rd10 mutant mice and presumably no influence on the retinal degenerative processes.	No	NP25528	4.2.1.3-14
	Rat RPE cells	*In vitro*	0, 0.1 to 10 µmol/L	n=3 to 7	Up to 10 µmol/L, no alteration of the permeability barrier function of RPE cell monolayers (transepithelial resistance) and the structural integrity of RPE (cell tight junctions).	No	NP08129	4.2.1.3-15
	Rat / Wistar	po (4 weeks)	0, 6, 60	2 or 5, M	TUNEL assay: no apoptosis or cell damage in the neuronal, retinal, glial cells or RPE. TEM: no ultrastructural alteration of the retinal cell layers.			
	Rat / Wistar	po (1 to 5 or 7 days)	0, 5.6	5M	No effect on the expression and localisation of the main effectors in phototransduction (rhodopsin, arrestin and transducin) and on their regulation during adaptation to light or dark. No effect on histological ocular structures.	No	NP08493	4.2.1.3-16

a: Single dosing unless otherwise indicated, b: Unless otherwise indicated

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.[a] (duration)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number	Location in CTD
Gastro intestinal	Rat / Wistar	po	0, 5, 15, 30	8M	Slight and dose-dependent delay in the gastrointestinal transit (-7%, -17% and -20% at 5, 15 and 30 mg/kg, respectively) (positive control: atropine).	Yes	NP03145	4.2.1.3-17
	Rat / Wistar	po	0, 5, 15, 30	8M	Reduction in acidity of gastric secretions after single oral dose at 5 mg/kg, but not at higher doses (pylorus-ligated rat; positive control: atropine). No effect on other parameters (volume, buffer strength and pH).	Yes	NP03147	4.2.1.3-18
	Rat / Wistar	po	0, 5, 15, 30	8M	Slight ulcerogenic effect at 30 mg/kg (positive control: indomethacin).	Yes	NP03148	4.2.1.3-19
	Rat / Sprague-Dawley	iv infusion (14 days)	0, 28	13M	No ulcerogenic effect.	Yes	NP03160	4.2.1.3-20
Renal	Rat / Wistar	po	0, 5, 15, 30	10M	Dose-related increase in diuresis (by 35% at 5 mg/kg up to 58% at 30 mg/kg). Minimal increase in urinary pH at 15 and 30 mg/kg (+0.2 pH unit). Increased natriuresis at 15 mg/kg (+37%) and 30 mg/kg (+34%) (saline overload; positive control: frusemide). No effect on the sodium/potassium ratio .	Yes	NP03146	4.2.1.3-21

a: Single dosing unless otherwise indicated

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Type of Study	Animals/Samples (No. per groups)	Method of administration	Doses (mg/kg[a])	Noteworthy Findings	Report number	Location in CTD
Combination with perindopril	Wistar rat (n=5-9)	In diet	0, 10 perindopril; 0.4 90 days	In CHF rats, the combination of ivabradine with perindopril induced HRR without modifying MBP. Improvement of diastolic dysfunction (LVEDPVR) by perindopril-ivabradine was more marked than perindopril.	NP28465	4.2.1.4-1
Combination with dobutamine	Wistar rat model of myocardial ischemia (n=8-9)	iv	0, 2 dobutamine; 2.5 µg/kg/min	Ivabradine did not affect the positive inotropic effects of dobutamine.	NP08201	4.2.1.4-2
Anti-aggregant effect of aspirin	Wistar rat (n=10)	po	0, 5 aspirin; 25	Ivabradine did not produce any anti-aggregant effect nor interaction with the anti-aggregant effect of acetylsalicylic acid.	NP05059[b]	4.2.1.4-3
Gastric ulcerogenic effect of aspirin	Wistar rat (n=10)	po	0, 5 aspirin; 50	Ivabradine did not produce any gastric ulcerogenic effect nor interaction with the gastric lesions induced by aspirin.	NP05065[b]	4.2.1.4-4
Anticoagulant effect of warfarin	Wistar rat (n=10)	po	0, 80 4 days warfarin; 0.6 (Day1), 0.3 (Day2-Day4)	Ivabradine did not interact with the anticoagulant effect of warfarin.	NP07033[b]	4.2.1.4-5
Interaction with verapamil, diltiazem, digoxin and isosorbide dinitrate	Beagle dog (n=6)	iv	0, 0.5 verapamil; 10 (po), diltiazem; 2.5 (po), digoxin; 10 µg/kg (po), twice daily, 6-7 days isosorbide dinitrate; 100 (po)	After oral administration of pharmacologically active doses of verapamil, diltiazem, digoxin and isosorbide dinitrate, there was no noteworthy pharmacodynamic interaction of a single iv dose of ivabradine on hemodynamic and ECG conduction parameters.	NP05204[b]	4.2.1.4-6

a: Unless otherwise indicated, b: Report contains a GLP compliance statement