2.4　非臨床試験の概括評価の目次

略語一覧 3
2.4.1　非臨床試験計画概略 5
2.4.2　薬理試験 6
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 6
2.4.2.2　副次的薬理試験 7
2.4.2.3　安全性薬理試験 7
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用 8
2.4.3　薬物動態試験 9
2.4.3.1　分析法 9
2.4.3.2　吸収 9
2.4.3.3　分布 9
2.4.3.4　代謝 10
2.4.3.5　排泄 10
2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用（非臨床） 10
2.4.3.7　その他の薬物動態試験 11
2.4.4　毒性試験 12
2.4.4.1　単回投与毒性試験 12
2.4.4.2　反復投与毒性試験 12
2.4.4.3　遺伝毒性 13
2.4.4.4　がん原性 13
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 15
2.4.4.5.1　受胎能及び初期胚発生試験 15
2.4.4.5.2　胚・胎児発生試験 15
2.4.4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 15
2.4.4.5.4　幼若動物毒性試験 16
2.4.4.6　局所刺激性試験 16
2.4.4.7　その他の毒性試験 16
2.4.4.7.1　抗原性 16
2.4.4.7.2　免疫毒性 16
2.4.4.7.3　機序検討 16
2.4.4.7.4　依存性 17
2.4.4.7.5　代謝物 17
2.4.4.7.6　不純物 17
2.4.4.7.7　その他 17

2.4.5　総括及び結論 18
引用文献一覧 23

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
ADP	Adenosine Diphosphate	アデノシン二リン酸
ARB	Angiotensin II Receptor Blocker	アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬
AUC	Area under the (plasma) concentration vs time curve, Area under the (plasma) concentration vs time curve from zero to infinity	（血漿中）濃度－時間曲線下面積、投与 0 時間から無限大時間までの（血漿中）濃度－時間曲線下面積
AUC(0-24)	Area under the (plasma) concentration vs time curve from zero to infinity 24 hours	投与 0 時間から投与 24 時間後までの（血漿中）濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	乳癌耐性タンパク
BDC	Bile Duct-Cannulated	胆管カニュレーション
cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate	環状グアノシン一リン酸
C_{max}	Maximum Drug Concentration (in Plasma)	（血漿中）最高濃度
CNS	Central Nervous System	中枢神経系
CO	Cardiac Output	心拍出量
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	Drug-Drug Interaction	薬物相互作用
ECG	Electrocardiogram	心電図
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GTN	Glycerol Trinitrate	ニトログリセリン
hERG	human Ether-à-go-go Related Gene	－
HPLC	High Pressure (Performance) Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
ICH	International Council on Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
IV	Intravenous	静脈内
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry	高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
LLOQ	Lower Limit of Quantitation	定量下限

略語	英語名称	日本語名称
mAoP	Mean Aortic Blood Pressure	平均大動脈圧
MRHD	Maximum recommended human dose	最高推奨臨床用量
NEP	Neutral Endopeptidase	中性エンドペプチダーゼ
NO	Nitric Oxide	一酸化窒素
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
OATP	Organic Anionic Transporting Polypetide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic Cation Transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAP	Pulmonary Artery Pressure	肺動脈圧
PEG	Polyethylene Glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク
PH-LVD	Secondary pulmonary hypertension due to left ventricular dysfunction	左室機能不全に伴う二次性肺高血圧
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PO	Oral	経口
QD	Once Daily	1日1回
sGC	Soluble Guanylate cyclase	可溶性グアニル酸シクラーゼ
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats	自然発症高血圧ラット
SOP	Standard Operating Procedure	標準操作手順書
SVO_2	Oxygen Saturation in the Coronary Sinus	冠静脈洞血酸素飽和度
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TRAP-6	Thrombin Receptor Activator Peptide 6	トロンビン受容体活性化ペプチド-6
UGT	Uridine-5’-diphospho glucuronosyltransferase	ウリジン 5’ー二リン酸グルクロン酸転移酵素
ULOQ	Upper Limit of Quantitation	定量上限
UV	Ultraviolet	紫外線

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ベルイシグアト（BAY 1021189 又は MK-1242）は、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）刺激薬に属する新規化合物であり、慢性心不全に対する新規の治療薬として開発が進められた。予定している最高推奨臨床用量（MRHD）は 10mg である。MRHD での臨床曝露量に基づき、非臨床リスク評価を行い、安全域を算出した。

ベルイシグアトの薬理学的プロファイルを明らかにするために、*in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験を実施した。効力を裏付ける試験として、*in vitro* 活性測定、作用機序検討及び疾患モデルを用いた *in vivo* 有効性試験を実施した。副次的薬理試験として、*in vitro* でのオフターゲット作用を検討した。安全性薬理試験として、医薬品規制調和国際会議（ICH） S7A（安全性薬理試験ガイドライン）及び S7B〔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〕に従い、生命維持に重要な器官機能〔心電図（ECG）を含む心血管系、呼吸器系及び中枢神経系〕並びに胃腸管機能に対する影響を検討する *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。薬力学的薬物相互作用試験として、cGMP（環状グアノシン一リン酸）増加剤との併用の影響を検討した。非臨床薬理試験の概要は 2.6.2 及び 2.6.3 に示す。

更に、ベルイシグアトの薬物動態（吸収、分布、代謝、排泄）特性を評価する非臨床試験を実施した。主な安全性評価動物種であるラット及びイヌを用いて薬物動態試験を実施した。代謝、排泄、血漿タンパク結合及び血液／血漿分配の種間比較を実施した。更に、ベルイシグアトが各種代謝酵素及びトランスポーターの基質となる可能性、並びに阻害薬又は誘導薬となる可能性を評価した。ベルイシグアトの非臨床薬物動態試験の概要を 2.6.4 及び 2.6.5 に示す。

また、ベルイシグアトの毒性プロファイルを評価し、ヒトにおけるリスク評価を可能にするための非臨床試験を実施した。非臨床安全性試験の主な目的は（a）潜在的な標的臓器毒性を特定し、その可逆性を調べること、（b）標的臓器毒性と関連のある潜在的な有害作用及び／又は過度な薬理作用に起因する毒性に対する無毒性量を確立すること、並びに（c）MRHD での曝露量に対する安全域を求めることであった。

このため、毒性試験として、ラットでは 6 ヵ月間、イヌでは 9 ヵ月間まで反復投与したときの全身毒性及び過度の薬理作用を検討する試験、生殖発生毒性試験（ラット及びウサギにおける胚・胎児発生試験、ラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後の発生に関する試験、並びに幼若ラット毒性試験）、遺伝毒性試験（*in vitro* での細菌を用いた変異原性試験及びマウスリンフォーマ TK 試験及び *in vivo* でのマウス骨髄及びラット末梢血中小核試験）、ラット及びマウス 2 年間がん原性試験、並びに特定の問題に関する試験（光毒性、不純物の毒性、有色ラット毒性試験）を実施した。毒性試験は、ヒトにおけるベルイシグアトの長期使用を支持するためにデザインされた。すべての重要な毒性試験で、臨床投与経路である経口投与を用いた。ベルイシグアトの毒性試験の概要を 2.6.6 及び 2.6.7 に示す。

In vivo 反復投与毒性試験の大部分はラット及びイヌを用いて実施した。ラット及びイヌは、これらの動物種におけるベルイシグアトの薬理作用に対する反応性、並びに許容可能な薬物動態及び代謝プロファイルに基づいて、それぞれげっ歯類及び非げっ歯類として選択した。

重要な非臨床安全性試験はすべて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。すべての試験は Bayer 社（ドイツ）の毒性部門又は [redacted] 社（英国）で実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

ベルイシグアトの *in vitro* 及び *in vivo* での薬理活性を評価する効力を裏付ける試験を実施した（2.6.2.2 及び 2.6.3.1）。*In vitro* 試験では、ベルイシグアトの作用機序及び選択性を評価した。また、ヒト血漿中主要代謝物 M-1（ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体；BAY 1222707）の *in vitro* 活性も検討した。十分に確立された疾患モデルを用いて、ベルイシグアトの有効性の確認を含む複数の *in vivo* 試験、すなわち、マウス、ラット、イヌ及びミニブタの疾患モデルにおいて、ベルイシグアトの有効性を評価した。

単離組換え sGC、sGC 過剰発現細胞株及び血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験において、ベルイシグアトは 0.01～100μM の範囲で濃度依存的に sGC を刺激した。ベルイシグアトは一酸化窒素（NO）非存在下でも sGC を刺激し得るが、NO 供与体の存在下でそれぞれの単独効果の和を上回る効果を示したことから、NO と相乗的に sGC を刺激することが示唆された。このように、ベルイシグアトは直接 sGC を刺激して NO 非依存的に cGMP 濃度を増加させることに加え、sGC の NO 感受性を高め低濃度の NO にも反応させるという二つの作用機序を有している。

ヒト血漿中主要代謝物 M-1 の薬理活性を上述の *in vitro* アッセイで検討した結果、M-1 は 10μM まで関連する薬理活性を示さなかった。

ベルイシグアトは、ウサギ伏在動脈及び大動脈、イヌ大腿静脈、並びにブタ冠動脈を弛緩させ、更に、硝酸耐性のウサギ伏在動脈に対しても弛緩作用を示した。ラットのランゲンドルフ灌流心臓標本において、ベルイシグアトは 10nM～10μM の範囲で、心拍数、左室拡張期圧及び収縮力に直接影響を及ぼすことなく、濃度依存的に冠動脈灌流圧を低下させた。健康人から採取した多血小板血漿及び洗浄血小板を用いて、ベルイシグアトの血小板凝集に及ぼす影響を検討した結果、ベルイシグアトはアデノシン二リン酸（ADP）、トロンビン受容体アゴニストペプチド-6（TRAP-6）及びコラーゲンによって誘発された血小板凝集に対し、臨床的に意義のある影響を及ぼさなかった。

In vivo 試験として、麻酔下のラットにベルイシグアトを単回経口投与（0.3～10mg/kg）又は単回急速静脈内投与（0.03～1mg/kg）すると、用量依存的かつ持続的な血圧低下が認められ、反射性の心拍数増加を伴った。また、覚醒下の正常血圧ラット及び自然発症高血圧ラット（SHR）においても、ベルイシグアトを単回経口投与（0.3～3mg/kg）すると、用量依存的かつ持続的な血圧低下が認められ、同様に反射性の心拍数増加が伴った。高血圧・心不全ラットモデルにおいて、ベルイシグアト（3 及び 10mg/kg）を 1 日 1 回反復経口投与すると、心腎保護作用が認められ、死亡率も低下した。

麻酔下のイヌに、ベルイシグアトを急速静脈内投与（10～300μg/kg）すると、平均大動脈圧（mAoP）及び肺動脈圧（PAP）が用量依存的に低下し、心拍出量（CO）、冠血流量及び冠静脈洞血酸素飽和度（SVO_2）は用量依存的に増加したことから、ベルイシグアトは心筋酸素バランスを改善することが示唆された。また、低酸素下に置いて肺高血圧を誘発させたイヌにおいて、自律神経を遮断し麻酔下でベルイシグアトを急速静脈内投与（10～300μg/kg）すると用量依存的に、mAoP、PAP 及び中心静脈圧が低下し、CO は増加し、全身血管抵抗及び肺血管抵抗は減少し、結果として SVO_2 は増加した。

麻酔下のミニブタに、トロンボキサン A2 アナログ U46619 を連続静脈内投与し、実験的に肺高血圧を誘発した急性肺動脈高血圧モデルにおいて、ベルイシグアトを急速静脈内投与（3～300μg/kg）すると、PAP が用量依存的に低下し、血圧が低下して、心拍数が軽度に増加した。

頻回ペーシングによる左室機能不全に伴う二次性肺高血圧（PH-LVD）を呈する覚醒下のイヌ心不全モデルにおいて、ベルイシグアトを経口投与（0.3～3mg/kg）すると、全身血圧に比べ肺動脈圧の顕著な低下が認められたことから、ベルイシグアトは後負荷をバランスよく減少させることが示唆された。

以上の試験成績より、ベルイシグアトは、NO 非依存的に sGC を直接刺激することに加え、NO に対する sGC の感受性を高めることで相乗的に cGMP の産生を増加させると推定された。このような作用機序により、ベルイシグアトは心血管疾患及び心不全モデルに対して有効性を示したと考えられる。

2.4.2.2　副次的薬理試験

放射性リガンド結合試験及び酵素試験により、ベルイシグアト及び M-1 のオフターゲット作用（標的数：ベルイシグアト；110、M-1；77）を検討し、特異性を評価した（2.6.2.3 及び 2.6.3.1）。ヒトのドパミントランスポーターに対してベルイシグアトが阻害（IC_{50}=2.9μM）を示したことを除き、10μM の濃度まで、検討した標的に対するベルイシグアト及び M-1 の阻害作用は認められなかった。ドパミントランスポーターに対するベルイシグアトの阻害の IC_{50} 値は、最高推奨臨床用量投与時のヒトの非結合型血漿中最高濃度（MRHD 投与時非結合型 C_{max}）である 17.9nM（7.6μg/L）よりも高値であることから、臨床的に問題になることはないと考えられる。

また、ベルイシグアトは *in vitro* でヒト血小板の血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質（VASP） のリン酸化を増加させる（2.6.2.2.1.7）ことから、ベルイシグアトの血小板凝集に及ぼす影響を、健康人から採取した血小板（洗浄ヒト血小板及び多血小板血漿）を用いて検討した。その結果、ADP、TRAP-6 及びコラーゲンによって誘発されたヒト血小板凝集に対し、ベルイシグアトは *in vitro* で臨床的に意義のある抗凝集作用を示さなかった。

以上のように、ベルイシグアト及びその代謝物 M-1 は、*in vitro* において意味のあるオフターゲット作用を示さず、ベルイシグアトは臨床的に意義のある抗血小板凝集作用も示さなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験では、ベルイシグアトの生命維持に重要な器官機能〔中枢神経系、心血管系（ECG 含む）及び呼吸器系〕並びに胃腸管機能に及ぼす影響を検討した。*in vivo* 試験ではベルイシグアトを単回投与した。安全性薬理試験の詳細は 2.6.2.4 及び 2.6.3.4 に示す。

ラットの呼吸機能に対し、ベルイシグアトは影響を及ぼさなかった。

ラットの中枢神経系（CNS）機能に関する試験において、行動及び体温に影響が認められた（体温低下に伴う活動性低下、軽微な歩行／姿勢異常、正向反射の軽微な遅延）。これらの影響は高用量でのみ認められ、この用量での非結合型 C_{max} は MRHD 投与時非結合型 C_{max} の約 37 倍に相当した。体温低下は、オンターゲット作用である動脈圧の低下を伴う末梢／皮膚血管拡張によるものであり、活動性低下や歩行／姿勢異常などの行動に対する影響の原因であるとみなされる。中枢神経系のフォローアップ試験において、同用量で自発運動、協調運動及び化学物質誘発痙攣に対する影響は認められないこと、並びにラットにおけるベルイシグアトの血液脳関門を介した脳移行性は極めて低い（2.6.4.4.1.1）ことからも、ベルイシグアトが CNS 機能に直接影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

ラットの胃腸管運動に関する試験において、ベルイシグアトは MRHD 投与時非結合型 C_{max} の約 6 倍の血漿中濃度で胃腸管運動を抑制した。これはベルイシグアトのオンターゲット作用である平滑筋弛緩作用に基づく胃腸管弛緩によるものと考えられた。

イヌの心血管系に関する試験において、動脈圧の減少とそれに伴う心拍数の増加が、最低用量から認められたが、その時の血漿中濃度は MRHD 投与時非結合型 C_{max} の約 4 倍に相当した。これらの影響はベルイシグアトの平滑筋弛緩作用による血管拡張に基づくものであると考えられる。

ヒトにおける QT 延長リスクを検討した *in vitro* 及び *in vivo* 心血管系試験（hERG K+チャネルアッセイ及びイヌの ECG 測定における QT/QTc 間隔）において、臨床的に意味のある所見は認められなかった。

要約すると、安全性薬理試験において認められた影響は、ベルイシグアトの sGC 刺激薬としての薬理作用機序に基づく血管拡張及び胃腸管弛緩で説明可能なものであった。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用

ベルイシグアトが、他の cGMP 増加剤〔NO ドナーである ニトログリセリン（GTN）、又は中性エンドペプチダーゼ（NEP）阻害薬であるサクビトリル及びアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（ARB）であるバルサルタンの併用〕による標準治療に及ぼす影響の可能性を検討するため、ラット及びイヌを用いて、GTN 又はサクビトリル及びバルサルタンとベルイシグアトの併用が血行動態に及ぼす影響を検討した（2.6.2.5 及び 2.6.3.1）。

麻酔ラット及び覚醒ラットにおいて、ベルイシグアトを併用投与した結果、血圧の低下及び心拍数の増加に対する相加効果が認められた。覚醒イヌにおける併用投与でも、血圧低下に相加効果が認められたが、心拍数には付加的な影響はみられなかった。相加効果を超える効果は確認できなかった。

以上のように、一連の非臨床薬理試験（効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験）から、ベルイシグアトの薬理学的プロファイルが明らかにされた。これらの試験結果は、ベルイシグアトに推定されていた作用機序と一致しており、意義のあるオフターゲット作用は認められず、慢性心不全の治療薬として期待できることを支持するものであった。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法

トキシコキネティクス（TK）試験では、血漿中ベルイシグアト及び M-1 濃度を、除タンパク後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）-タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて定量した。各試験でベルイシグアト及び M-1 の定量に用いた生体試料分析法を 2.6.5.2-1 に要約する。

GLP 下で実施した試験で用いた生体試料分析法は、米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）の生体試料分析法バリデーションに関するガイダンス／ガイドラインに従いバリデーションを実施した。マウス、ラット、ウサギ及びイヌの血漿中ベルイシグアト濃度測定における定量下限（LLOQ）は 1～5ng/mL の範囲で、定量上限（ULOQ）は 1000ng/mL であった。マウス及びラットの血漿中 M-1 濃度測定における LLOQ はそれぞれ 2 及び 5ng/mL で、ULOQ は 1000ng/mL であった。分析法及びバリデーション報告書を 2.6.5.2-2 に要約する。

薬物動態試験については、社内（標準操作手順書）SOP 及び FDA 及び EMA の生体試料分析法バリデーションに関するガイダンス／ガイドラインに従い分析法のバリデーション及び試験試料の分析を実施した。

2.4.3.2　吸収

Caco-2 細胞において、ベルイシグアトは高い膜透過性を示した（2.6.4.7.4.1）。ラット及びイヌに、投与媒体としてエタノール：ポリエチレングリコール（PEG）400：水〔10：60：30 (v/v/v)〕を用い、ベルイシグアトを溶液として経口投与したとき、吸収は非常に速く、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 0.5～3 時間の範囲であった。ベルイシグアトの経口バイオアベイラビリティは、ラットで中程度（約 40%～50%）、イヌでは高かった（約 70%）（2.6.4.3.1）。ヒトにおけるベルイシグアトの経口バイオアベイラビリティは高い（約 93%）（2.7.2.3.1.1）。

2.4.3.3　分布

ベルイシグアト及び代謝物 M-1（ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体）の血漿タンパク結合は動物種依存的で、血漿中非結合型分率は、ベルイシグアトが 2.2%（ヒト）～10.2%（イヌ）の範囲、M-1 が 1.6%（ヒト）～15.2%（イヌ及びマウス）の範囲であった。ベルイシグアトは、主にヒト血清アルブミンと結合した。ベルイシグアトは、ラット、イヌ及びヒトにおいて、赤血球よりも血漿中に選択的に分布した（2.6.4.4.3、2.6.4.4.4）。

ラット及びイヌにおけるベルイシグアトの分布容積は中程度であった（0.8～1.1L/kg）（2.6.4.3.1）。アルビノ Wistar ラット及び有色 Long Evans ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを投与し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）により臓器・組織分布を評価した。ラットに[^{14}C]ベルイシグアト（3mg/kg）を経口投与したとき、放射能は速やかかつ広範に組織に分布した。放射能曝露量が最も高かったのは副腎皮質、腎皮質、腎髄質、腎髄質外側部、肝臓及びハーダー腺であった。血液脳関門通過性は非常に低かった。有色ラットにおいて、メラニン含有組織の放射能濃度が高かったことから、放射能のメラニン親和性が示唆された（2.6.4.4.1）。しかし、有色 Long Evans ラットの 13 週間反復投与毒性試験において、メラニン結合に起因する毒性はみられなかった（2.6.6.8.3.2）。妊娠ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを投与したとき、放射能は血液胎盤関門を通過した（2.6.4.4.2）。放射能は、大部分の末梢臓器・組織及び胎児組織に速やかにかつ広く分布した。残存放射能は大部分の臓器・組織から速やかに消失したことから、ベルイシグアトを反復投与した場合に、母体及び胎児の組織中における蓄積はほとんどない又はないと考えられる。

2.4.3.4 代謝

マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与したとき、血漿中放射能の大部分はベルイシグアト〔総放射能濃度－時間曲線下面積（AUC）の＞97%〕で、微量代謝物として M-1 が認められた。一方、ヒト血漿中では、代謝物 M-1 が主要な成分として認められ、総放射能 AUC の 72%を占めたのに対し、未変化体は 27%であった（2.6.4.5.1）。M-1 には sGC に対する薬理活性はなく、オフターゲット作用も有していない（2.4.2.1、2.4.2.2）。

ラット、イヌ及びヒトにおいて、ベルイシグアトは、主に代謝及び未変化体の排泄によって消失する。これらの動物種（ヒトを含む）において、代謝物 M-1 を生成するベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合が主要な代謝経路であった。ラットにおいては、酸化的代謝もベルイシグアトの全体的なクリアランスに寄与していたが、イヌではそれほど寄与しておらず、ヒトではわずかであった。胆管カニュレーション（BDC）ラットに静脈内投与したとき、相当量の未変化体（投与量の 30%）が糞中に認められたことから、ラットにおいてベルイシグアトが消化管分泌されることが示唆された。ヒトを含むすべての動物種において、未変化体の腎排泄は副次的な消失経路であった（投与量の＜10%）（2.6.4.5.1）。*In vivo* データと合致して、ラット、イヌ及びヒトの肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合が主要な代謝経路であった。一方、N－脱アルキル体及び複数の水酸化代謝物を生成する酸化的代謝は、ラットにおいて最も顕著で、イヌではそれほど顕著ではなく、ヒト肝細胞ではほとんど認められず、*in vitro* と *in vivo* の結果に良い相関がみられた（2.6.4.5.2）。ヒト特異的な代謝物はみられず、ヒトで認められたすべての代謝物は、非臨床動物種においても認められた。

2.4.3.5 排泄

ラット及びイヌにおいて、ベルイシグアトの血漿クリアランスは低く（0.15～0.21L/h/kg）、血漿中ベルイシグアトの終末相における消失半減期は 3～5 時間であった（2.6.4.3.1）。無処置のラット及びイヌに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、放射能は主に糞／胆汁経路を介して排泄された（ラット：投与量の 81.2%、イヌ：投与量の 89.2%）（2.6.4.6.1、2.6.4.6.2）。ヒトでは、糞中と尿中に同程度排泄された（尿：投与量の 53.1%、糞：投与量の 45.2%）（2.6.4.6.3）。授乳ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを投与したとき、放射能は乳汁中に排泄された（2.6.4.6.4）。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用（非臨床）

ベルイシグアトは、肝臓及び腎臓でのウリジン 5'－二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）1A1 及び UGT1A9 を介したグルクロン酸抱合、未変化体の尿中排泄、並びに未変化体の胆汁中排泄及び／又は消化管分泌を含む複数の経路によって消失する。阻害薬を用いた *in vitro* 試験の結果に基づくと、UGT1A9 は、M-1 生成において、UGT1A1 よりも重要である（2.6.4.7.1.2）。メフェナム酸を用いた臨床薬物相互作用試験の結果から、UGT1A9 阻害薬と併用した場合に、ベルイシグアトの薬物動態は臨床的に意味のある影響を受けないと考えられる（2.7.2.2.4.1.2.2）。このことは、ベルイシグアトが複数のクリアランス機序によって消失することと合致する。ベルイシグアトの総クリアランスに対する酸化的代謝の寄与はわずか（投与量の＜4%）であることから、ベルイシグアトの薬物動態はチトクローム P450（CYP）阻害薬によって影響を受けないと考えられる。ベルイシグアトは高膜透過性の化合物で、P-糖タンパク（P-gp）及び乳癌耐性タンパク（BCRP）の基質である。ベルイシグアトは取込みトランスポーターの有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3 及び有機カチオントランスポーター（OCT）1 の基質ではない。代謝物 M-1 は排出トランスポーター（P-gp、BCRP）及び取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3）の基質ではない（2.6.4.7.4）。ヒトにおける高い経口バイオアベイラビリティ（93%）（2.7.2.3.1.1）を考慮すると、P-gp 及び BCRP がベルイシグアトの吸収過程に寄与している可能性は低い。したがって、ベルイシグアトは、P-gp 及び BCRP の阻害薬と併用したとき、吸収過

程の薬物相互作用に関して、被相互作用薬とならないと考えられる。一方、ヒトにおいて、P-gp 及び BCRP がベルイシグアトの胆汁中排泄／消化管分泌に関与している場合には、P-gp 及び BCRP の阻害薬又は誘導薬と併用したとき、ベルイシグアトは薬物相互作用を受ける可能性がある。しかし、ケトコナゾール（CYP3A4 阻害薬及び広範なトランスポーター阻害薬）を用いた臨床薬物相互作用試験において、薬物相互作用はみられなかった（2.7.2.2.4.1.2.1）。また、リファンピシン（UGT、CYP 及びトランスポーターの誘導薬）を用いた臨床薬物相互作用試験において、ベルイシグアトの AUC に対する誘導作用の影響は弱かった（AUC は 29％減少）（2.7.2.2.4.1.2.3）。

In vitro 試験の結果から、ベルイシグアト及び M-1 は、相互作用薬となる可能性は低いことが示唆された（2.6.4.7.2、2.6.4.7.3、2.6.4.7.5）。臨床有効濃度（ベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したとき）において、ベルイシグアト及び M-1 は、主要な薬物代謝酵素の阻害薬及び誘導薬ではなく、主要な薬物トランスポーターの阻害薬でもない。したがって、主要な代謝酵素及びトランスポーターの基質と併用したときに、ベルイシグアトが臨床的に意味のある薬物相互作用を起こす可能性は低い。このことは、CYP3A4、CYP2C9 及び P-gp の典型基質（それぞれミダゾラム、ワルファリン、ジゴキシン）を用いた臨床薬物相互作用試験において確認された（2.7.2.2.4）。

以上を総合すると、ベルイシグアトの全般的な薬物相互作用の可能性は低い。

2.4.3.7　その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

2.4.4　毒性試験

マウス、ラット及びイヌ（それぞれ最長 3、6 及び 9 ヵ月間）における一連の反復投与毒性試験において、ベルイシグアトの毒性を評価した。ラット及びウサギを用いて生殖発生毒性を、*in vitro* の細菌及び哺乳類細胞試験及び *in vivo* のラット及びマウス小核試験で遺伝毒性を評価した。ラット及びマウスの 2 年がん原性試験でがん原性を評価した。ベルイシグアトの毒性試験の一覧を表 2.6.6.1- 1 及び 2.6.7.1 に示す。詳細は毒性試験の概要文（2.6.6）及び概要表（2.6.7）に示す。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、単回経口投与後の毒性は、ラット 2 週間反復投与毒性試験（10～100mg/kg/日）及びイヌ 4 週間反復投与毒性試験（2.5～25mg/kg/日）成績（投与初期の影響）から評価した（2.6.6.2.1 及び 2.6.6.2.2）。

ラット 2 週試験では、高用量 100mg/kg/日の 1 例が 4 日目に死亡したが、投与初期にみられた変化は同群の 2 日目からみられた立毛のみであった。投与 3 日目まで死亡動物がみられなかったことから、概略の致死量は 100mg/kg より大きいと考えられた。

イヌ 4 週試験では、投与初期に死亡はなく、1 週目にみられた一般状態変化は、強い脈拍、嘔吐、流涎及び振戦であり、概略の致死量は、25mg/kg より大きいと考えられた。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

反復投与毒性試験において、ラットでは最長 6 ヵ月間、イヌでは最長 9 ヵ月間、ベルイシグアトを投与した（2.6.6.3.2 及び 2.6.6.3.3）。更に、がん原性試験の用量選択のため、マウスにおいて、ベルイシグアトを最長 13 週間投与した用量設定試験を実施した（2.6.6.3.1）。

げっ歯類及び非げっ歯類において、反復投与後のベルイシグアトの忍容性は良好で、作用機序に関連しない毒性及びオフターゲット毒性は認められなかった。ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験において、それぞれ 3～100mg/kg/日及び 0.5～25mg/kg/日を投与した。効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験では、持続的な血圧低下が、麻酔ラットに 0.3mg/kg 以上（3 及び 10mg/kg でそれぞれ最大-12mmHg 及び-45mmHg）、覚醒ラットに 1 及び 3mg/kg（約 15%）（2.6.2.2.2）、並びに覚醒イヌに 0.6～6mg/kg（それぞれ最大 11%～23%の収縮期血圧低下）（2.6.2.4.2.3）の単回経口投与でみられたことから、 毒性試験で評価した用量は明らかにベルイシグアトの薬理作用発現用量を上回っていた。薬理作用に基づく血圧低下は、ラットでは約 20 時間後に回復し、イヌでは完全には回復しなかったが、検査した 16 時間以内にベースライン方向への上昇がみられた。また、薬理作用から予想されるとおり、ベルイシグアトはラットにおいて 5mg/kg 以上の用量で平滑筋弛緩により消化管運動を抑制した（2.6.2.4.2.4）。過度な薬理作用によって、マウス、ラット及びイヌにおける心血管及び消化管への影響、並びに成長期のラットのみに認められる骨の所見が認められた（作用機序に関連した sGC 刺激及び細胞内 cGMP 濃度の増加の二次的な機序に起因）。これらの影響は臨床用量では生じないと予想される。更に、認められた全ての影響は、ラットにおける 4 週間試験の 2 週間の回復期間内に少なくとも部分的に回復した。

心血管系では、血管平滑筋弛緩により、血管拡張、血圧低下、全身血管抵抗低下、反射性頻脈（イヌ）が認められた。血管拡張及び心筋灌流の変化による二次的な変化として、心臓及び血管系の形態的変化（心筋動脈肥大、心筋線維化及び腸間膜血管の叢状変化）が認められ、ラットよりもイヌで顕著であった。これらは、他の血管拡張薬でもみられており、ヒトでは発現しないと考えられ、ベルイシグアト固有の変化ではないと考えられる。他の血管拡張薬で報告されている

ように、マウス及びラットにおいて、ベルイシグアトの薬理作用による血管拡張及び血圧低下の二次的な所見として、摂水量の増加が認められた。更に、ラット及びイヌでは、レニン･アンジオテンシン･アルドステロン系及び／又はアドレナリン作動系の代償性活性化によって、副腎に病理組織学的所見（球状帯及び束状帯の肥大、並びにクロム親和性細胞の活性化を示唆する髄質の変化）が認められた。

消化管では、平滑筋弛緩により、消化管運動が低下し、消化管内容物の硬さの変化（軟化）、流涎及び／又は嘔吐、並びに腸の延長及び拡張及び小腸のパネート細胞の肥大（ラット）及び直腸脱（イヌ）が認められた。

血行動態及び／又は消化管への作用の二次的な影響として、体重及び摂餌量の減少が認められたが、おそらく適応により長期投与期間中に回復した。より高い用量のベルイシグアトを投与すると、二次的な病理組織学的変化を伴う一般状態の悪化が認められた。

急速に成長する成長期のラットでは、成長板肥大及び骨化過剰、並びに骨幹端及び骨幹骨のリモデリングからなるベルイシグアトの sGC 刺激作用に関連した骨への影響が認められた。細胞内 cGMP 濃度が骨の恒常性の調節に関与していることから、これらは薬理作用による二次的な変化と考えられる。成体ラットへの長期投与（6 ヵ月）では、全身曝露が同等であったにも関わらず、病理組織学的な骨の変化及び骨バイオマーカーの変化は認められなかった。また、イヌでは最長 9 ヵ月間反復投与しても、骨の変化は認められなかった。これらのデータから、骨所見は主に、骨リモデリングが活発で骨の代謝回転が速く急速に成長しているラットに生じるため、成人患者集団では問題にならないと考えられる。また、ベルイシグアトを投与した時の骨変化の形態は、全体的な骨量の増加を示唆している。このような変化は、主に海綿（骨幹端）骨の骨量及び骨密度減少を示す各種ラット骨粗しょう症モデルで認められる病変とは異なるものである。

マウス、ラット及びイヌでは十分な安全域が確認された（表 2.4.5- 1）。全体として、マウスに 13 週間反復混餌投与したときの無毒性量（NOAEL）は 50mg/kg/日であり、MRHD である 10mg のベルイシグアトをヒトに投与したときの曝露量に対する曝露比は、総 AUC では雄が 19 倍、雌が 13 倍、非結合型 AUC では雄が 70 倍、雌が 49 倍であった。ラットに 6 ヵ月間投与した試験の NOAEL は 30mg/kg/日であり、MRHD の曝露量に対する曝露比は、総 AUC では雄が 22 倍、雌が 25 倍、非結合型 AUC では雄が 47 倍、雌が 52 倍であった。イヌに 9 ヵ月間投与した試験の NOAEL は 5mg/kg/日であり、MRHD でのヒト曝露量に対する曝露比は、総 AUC では 2 倍、非結合型 AUC では 8 倍であった。

以上、マウス、ラット及びイヌに反復経口投与したときの毒性プロファイルは、過度の薬理作用による心血管系、消化器系及び骨（成長期のラット）への影響を特徴とし、十分な安全域が確保されており、患者における ベルイシグアトの安全性リスクはなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性

In vitro のサルモネラ菌／ミクロソーム試験及びマウスリンフォーマ TK 試験、並びに *in vivo* で骨髄（マウス）及び末梢血（ラット）を調べる小核試験において、ベルイシグアトに遺伝毒性はないことが示された（2.6.6.4）。

2.4.4.4 がん原性

マウス及びラットを用いてベルイシグアトを約 2 年間経口投与するがん原性試験を実施した（2.6.6.5）。マウスでは、ベルイシグアトを 150mg/kg/日（雄）又は 250mg/kg/日（雌）まで混餌投与した。これらの用量は、MRHD でのヒト曝露量と比較して、総 AUC は最大 41 倍（雄）及び 78 倍（雌）、非結合型 AUC は最大 149 倍（雄）及び 286 倍（雌）であった。ラットでは、最大

20mg/kg/日を強制経口投与し、MRHD でのヒト曝露量と比較して、総 AUC は最大 20 倍、非結合型 AUC は最大 41 倍であった。

用量は、マウスにおける 2 週間及び 13 週間反復投与用量設定試験、並びにラットにおける 4 週間及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験の結果に基づいて選択した。マウスでは、最高用量は、ヒトの総 AUC の 25 倍を超えるように設定した。ラットでは、4 週間反復投与毒性試験の高用量で、ベルイシグアトの強い血行動態及び消化管に対する作用に起因する全身状態の悪化及びそれに伴う変化が認められたことに基づいて用量を選択した。

マウスでは、投与した最高用量までがん原性は認められなかった。最高用量での曝露量は、MRHD でのヒトの曝露量と比較して、非結合型 AUC は雄で最大 149 倍、雌で最大 286 倍、総 AUC は雄で 41 倍、雌で 78 倍であった。ベルイシグアトはマウスの生存性に影響しなかったが、対照群の雌の死亡率が上昇したことから、93～94 週に雌の対照群を含む全群を剖検した。そのため、投薬群の雌では屠殺時に週齢の高い動物の割合が比較的多くなり、加齢に関連する一般的な所見の発生頻度が上昇した。平滑筋の弛緩、血管拡張及び消化管運動障害をもたらすベルイシグアトの薬理作用により、摂水量が増加し、病理組織学的検査で腸間膜リンパ節における形質細胞の発生頻度がわずかに増加したが、いずれも適応性の変化で、有害ではないと考えられる。さらに、臨床推奨用量（曝露量）を大きく上回る高用量では、薬理作用に起因する変化として、乳腺の拡張、胆のうにおける胆石及びヒアリン沈着の発生頻度又は程度の軽度な増加、並びにヒトには存在しないハーダー腺の分泌性上皮変性又は炎症を含む、筋上皮細胞の弛緩に続発する所見が認められた。筋上皮細胞は、平滑筋細胞と構造的に類似しており、外分泌腺の収縮に関与することが知られている。さらに、マウス及びラットにおける他の反復投与毒性試験と同様に、肝臓での酵素誘導を示唆する肝細胞肥大及び肝臓重量の増加が認められた。

ラットでも生存性にベルイシグアト投与の影響はなかった。ベルイシグアトの血管拡張作用に続発して、6mg/kg/日以上の群の雌雄で有害ではない摂水量の増加がみられ、高用量 20mg/kg/日群の雄では尿量が増加した。さらに、平滑筋の弛緩により、軽度な消化管への影響（盲腸の膨張及び拡張）が認められた。

ラットでは雌雄とも、ベルイシグアト投与に関連する統計学的に有意な腫瘍の増加は認められなかった。良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫の統計学的に有意ではない増加が 20mg/kg/日の雄でみられ、同群の雌雄で副腎の限局性の髄質過形成の増加が、雄で限局性のライディッヒ細胞過形成の増加が認められた。さらに、20mg/kg/日の雄で、副腎髄質の変化が認められ、エピネフリン及びノルエピネフリン貯蔵細胞の分布の違いが示唆された。同様の変化がラット 6 ヵ月反復投与毒性試験でもみられ、クロム親和性細胞の活性化を示すと考えられた。これらの影響がみられた 20mg/kg/日の全身曝露量は、MRHD の曝露量に対して総 AUC は 20 倍、非結合型 AUC は 41 倍であった。中用量 6mg/kg/日において被験物質に関連する腫瘍及び過形成は認められず、その時の曝露量は MRHD での曝露量に対して総 AUC は 6 倍、非結合型 AUC は 12 倍であった。

良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫、並びに関連する過形成は、2 年間にわたる顕著で継続的な血圧低下によるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、並びにアドレナリン系の代償性及び反復性の活性化に続発したものと考えられる。特に、いくつかの血管拡張薬や降圧薬を含む多くの医薬品や化学物質（レセルピン、チモロール、ミノキシジル、ヒドララジンなど）は、ラットにおいて褐色細胞腫及び／又はライディッヒ細胞腫瘍の発生頻度を増加させることが知られている。褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腫瘍のヒトでの自然発生は極めてまれであるが、高齢の雄ラットではよく発生する。ラットはこれら両タイプの腫瘍発生に対して感受性が高いことが知られているが、これらの腫瘍をラットで誘発する薬剤が、ヒトでも腫瘍を引き起こすという報告はない。褐色細胞腫については、神経性及びホルモン性の長期間にわたる副腎髄質の刺激を含む多くの非遺伝毒性メカニズムが知られており、長期間でラットの髄質過形成及び良性褐色細胞腫を生ずるが、ヒトへの関連性は報告されていない。ライディッヒ細胞腫瘍については、

ラットとヒトで大きな違いがあり、ラットではライディッヒ細胞の過形成及び腫瘍形成に対する感受性が高いことが知られている。

全体として、ラット及びマウスの 2 年がん原性試験結果から、ヒトでは臨床用量での発がんリスクがないと結論される。雄ラットの良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腫瘍の統計学的に有意でない増加は、これらの腫瘍を誘発するラットの高い感受性及び薬理作用に起因したメカニズム（他の降圧薬でも見られる）に基づいており、臨床用量を大きく超えた用量でみられ、十分な安全域があることから、ヒトとの関連性はないと考えられる。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

ベルイシグアトの生殖発生毒性に関しては、ラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギ胚・胎児発生毒性試験、並びにラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験で評価した（2.6.6.6）。

ベルイシグアトの生殖発生毒性試験では、検討した最高用量まで受胎能及び初期胚発生に対する影響はなく、催奇形性は認められなかった。母体忍容性、並びに胚・胎児及び出生前後の発生には、ベルイシグアトの薬理作用の影響がみられた。ウサギでは、流産の増加が認められた。

ベルイシグアトは、ラットにおいて胎盤を通過し（2.6.4.4.2.1）、乳汁中に分泌される（2.6.4.6.4）。

2.4.4.5.1　受胎能及び初期胚発生試験

ラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験では、ベルイシグアトを 50mg/kg/日まで投与した。最高用量まで雌雄の受胎能及び初期胚発生に対する影響は認められず、MRHD でのヒト曝露量に対する最高用量での曝露比は、総 AUC が約 32 倍、非結合型 AUC が 66 倍であった（2.6.6.6.1）。

2.4.4.5.2　胚・胎児発生試験

ラット及びウサギにおける胚・胎児発生毒性試験では、毒性プロファイルは主にベルイシグアトの血行動態及び／又は消化管作用の二次的影響によるものであった（2.6.6.6.2）。

ラットでは 15mg/kg/日以上（MRHD でのヒト曝露量に対する曝露比は総 AUC は 10 倍、非結合型 AUC は 21 倍）で、ベルイシグアトの血行動態作用に起因したと考えられる母体毒性が認められた。最高用量の 50mg/kg/日（MRHD でのヒト曝露量に対する曝露比は、総 AUC は 36 倍、非結合型 AUC は 75 倍）まで、胚・胎児発生への影響は認められなかった。

ウサギでは、明らかな母体毒性用量である 2.5mg/kg 以上（MRHD でのヒト曝露量に対する曝露比は、総 AUC は 4 倍以上、非結合型 AUC は 6 倍以上）で、ベルイシグアトの強い血行動態及び又は消化管作用に起因する妊娠後期の流産の増加とそれに伴う妊娠率の低下及び着床後死亡の増加が認められた。奇形の増加はみられなかった。ウサギの胚・胎児発生に対する NOAEL は 0.75mg/kg/日であった。この用量での曝露量における MRHD でのヒト曝露量に対する曝露比は、総 AUC 及び非結合型 AUC がいずれも 1 倍であった。

2.4.4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験（2.6.6.6.3.2）では、全用量で体重及び摂餌量に対する影響が認められた。これは、血行動態及び消化管へのベルイシグアトの薬理作用に関連している可能性が高いと考えられた。高用量 30mg/kg/日を投与すると、強力な血行動

態作用により、死産及び出生児の死亡率が増加し、1 母動物で全児死亡が認められ、出生児の生存率が低下した。ベルイシグアトの血行動態作用による、出生児の体重低下に関連した発達指標の発現の遅延及び性成熟の遅延が認められた。

いずれの用量でも、ベルイシグアトを投与した母動物及びその児動物の交尾行動、受胎能及び剖検所見に影響は認められなかった。

2.4.4.5.4　幼若動物毒性試験

ベルイシグアトはラット乳汁中に移行するため（2.4.3.5）、幼若ラットはラット出生前及び出生後の発生毒性試験の授乳中、間接的にベルイシグアトに曝露された。

また、今後の小児患者集団における臨床開発を支持するため、予備試験を含む幼若動物を用いた反復投与毒性試験を実施した。幼若ラットへのベルイシグアトの反復投与によって、成長期のラット及び成体ラットにおける試験と比べて新たな標的臓器は認められなかった。毒性プロファイルは、作用機序に関連する平滑筋弛緩による消化管への影響を主な特徴としていた（2.6.6.6.4）。

2.4.4.6　局所刺激性試験

ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験（それぞれ最長 6 ヵ月間及び 9 ヵ月間投与）において、局所刺激性を評価した。被験物質及び投与媒体の局所的な影響を評価するため、消化管を形態学的に詳細に検査した。いずれの動物種でも、薬理作用による変化を除き、剖検及び病理組織学的検査で投薬に関連した消化管への影響は認められなかった。以上より、ベルイシグアトに局所的なオフターゲットの毒性は認められないと判断した。

2.4.4.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　抗原性

抗原性試験は実施しなかった。

2.4.4.7.2　免疫毒性

反復投与試験においてベルイシグアトは免疫毒性を示さなかったことから、ICH S8（医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン）に従い、追加の免疫毒性試験は実施しなかった。動物を用いた反復投与試験の結果から、免疫抑制及び炎症性の有害作用やリンパ組織に対する有害作用は認められなかった。これらの試験における血液学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的評価から、ベルイシグアトが免疫毒性には関連しないことが示された。

2.4.4.7.3　機序検討

ベルイシグアトはメラニン含有組織と結合するため（2.6.4.4.1.2）、有色 Long Evans ラットを用いて 13 週間反復投与毒性試験を実施した（2.6.6.8.3.2）。ベルイシグアト投与に関連する影響は、用量依存的な摂水量の増加のみであった。これは、ラットを用いた他の反復投与毒性試験でも認められ、薬理作用に関連する血管拡張の二次的な影響と考えられる。脳（黒質を含む 7 レベル）、有色血管条を有する内耳及び有色上皮を有する網膜の病理組織学的検査で、投薬に関連した所見は認められなかった。以上より、ベルイシグアトは最高用量 30mg/kg/日まで、神経メラニンを含む神経組織に影響を及ぼさなかった。

2.4.4.7.4　依存性

ベルイシグアトは、臨床有効濃度（MRHD 投与時の非結合型 C_{max}）では神経伝達物質受容体及びトランスポーターに結合しないことが示され（2.6.2.3.1）、ラットの定量的全身オートラジオグラフィーで、ベルイシグアトが血液脳関門を容易に通過しないことが示されている（2.6.4.4.1.1）。更に、ベルイシグアトは P-gp の基質として（2.6.4.7.4.2）脳から能動的に排出される。ラットの安全性薬理試験（2.6.2.4.2.1）、並びにラット及びイヌの反復投与毒性試験（2.6.6.3）において、ベルイシグアトの中枢神経系への直接的な影響はみられなかった。高曝露下のラットで散発的に観察された行動の変化（歩行／姿勢の軽微な異常、活動性低下及び正向反射の軽微な遅延を含む）は、直接的な中枢神経系への影響ではなく、血管平滑筋の弛緩、血管拡張、並びに血圧及び体温低下に続発した変化と考えられた。このような薬理学的プロファイルは、薬物乱用リスクに関連しないと考えられる。以上より、中枢神経系への曝露が低く、安全性薬理試験及び反復投与毒性試験において直接的な中枢神経系への影響がみられなかったことから、ベルイシグアトの依存性試験は実施しなかった。

2.4.4.7.5　代謝物

代謝物を用いた毒性試験は実施しなかった。

ヒトにおける主要な代謝物 M-1 はマウス、ラット及びイヌの血漿中に微量に検出された（2.6.4.5.1）。M-1 はベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体であるため、文献情報及び ICH M3(R2)（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス）から、毒性学的に重要ではないと考えられる。M-1 は、sCG に対する薬理作用及びオフターゲット作用を示さなかった（2.4.2.1 及び 2.4.2.2）。更に、M-1 は化学的転位を受けにくいことも示された。

なお、マウス及びラットがん原性試験において血漿中 M-1 濃度を測定したところ（2.6.6.5）、MRHD でのヒト M-1 曝露量はマウスでは雌の総 AUC（MRHD の 1 倍）及び雌雄の非結合型 AUC〔MRHD の 2 倍（雄）及び 6 倍（雌）〕で担保されていた。ラットでは非結合型 AUC〔MRHD の 0.43 倍（雌雄平均）〕で、担保の下限付近ではあるが、担保されていた。マウス及びラットの反復投与毒性試験、並びにラットの生殖発生毒性試験では、がん原性試験と同等以上の用量が用いられたことから、ヒト M-1 曝露量は、これらの試験においても担保されていたと考えられる。

2.4.4.7.6　不純物

ICH Q3A ガイダンスにおける毒性評価が必要な基準を上回る不純物はなかった（2.3.S.4.1）。

2.4.4.7.7　その他

ベルイシグアトは波長範囲 290～700nm で紫外線（UV）光の吸収を示すため、*in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験を実施したところ、光毒性は認められなかった（2.6.6.8.7）。

2.4.5 総括及び結論

心血管疾患及び心不全の病態では、NO 産生が障害されることで NO 利用能の低下及び組織中 cGMP 濃度の低下をもたらす内皮細胞機能不全が認められる。この NO 利用能低下及び不十分な sGC 刺激によって、全身、冠動脈、肺及び腎臓の血管緊張調節障害、灌流障害による臓器の損傷及び機能不全、有害なリモデリング及び心腎症候群などが発現する。このようなことから、cGMP シグナル伝達を回復させる目的で薬理学的に直接 sGC を刺激するアプローチは、心血管疾患及び様々なタイプの心不全に対する新規の治療法となる可能性がある。

ベルイシグアトは、sGC 刺激薬に属する新規の化合物である。ベルイシグアトは、選択的かつ特異的に sGC と結合し、濃度依存的に cGMP の産生を増加させるとともに、sGC の内因性 NO に対する感受性を高め、NO/sGC シグナル伝達の機能不全を回復させることができる。この新規の薬理学的作用機序に基づき、ベルイシグアトの薬理学的プロファイルが、*in vitro* 試験並びに各種動物における血行動態試験及び心不全などの実験的心血管疾患モデル試験（*in vivo* 試験）で検討され、sGC 刺激薬であるベルイシグアトが慢性心不全に対する新たな治療手段となる可能性が示された。

In vitro において、ベルイシグアトは組換え sGC を刺激し、sGC を過剰発現している細胞及び血管内皮細胞においても細胞中の sGC を刺激した。これらの試験結果から、ベルイシグアトは NO 非依存的に直接 sGC を刺激するとともに、低濃度の NO に対する sGC の感受性を高め cGMP 濃度を増加させる二つの作用機序を有していることが示された。ベルイシグアトは各種動物の血管を弛緩させ、ラットランゲンドルフ心臓標本において、冠動脈灌流圧を低下させた。

ベルイシグアトの血行動態への影響及び疾患モデルにおける有効性を評価するため、複数の *in vivo* 試験を実施した。ベルイシグアトはラット及びイヌにおいて、*in vivo* で血圧を用量依存的に低下させ、これは反射性の心拍数増加を伴った。高血圧、心臓・腎損傷、心不全及び高死亡率を呈するレニントランスジェニックラット心不全モデルにおいて、ベルイシグアトを反復投与すると、心腎保護作用が認められ、死亡率が低下した。頻回ペーシングによる PH-LVD を呈するイヌ心不全モデルにおいて、ベルイシグアトを反復投与すると、全身血圧より肺動脈圧に顕著な降圧作用が認められ、後負荷をバランスよく減少させることが示唆された。

以上のように、ベルイシグアトの薬理学的プロファイルが一連の効力を裏付ける試験において明らかにされた。これらの試験結果は、ベルイシグアトの推定作用機序と合致するものであり、慢性心不全の治療薬としてのベルイシグアトの有効性を支持している。

安全性薬理試験では、*in vitro* 及び *in vivo* で生命維持に重要な器官機能（ECG を含む心血管系、呼吸器系及び中枢神経系）に対する影響、並びに補足的安全性薬理試験として胃腸管機能に対する影響を検討した。ベルイシグアトの安全性薬理試験の結果として、ベルイシグアトの薬力学的作用機序から予想されるように、イヌにおいて血行動態作用（心拍数増加など反射性調節応答を伴う血管拡張）が認められた。更に、ラットにおいて、体温低下、活動性低下、歩行／姿勢異常及び胃腸管運動の阻害などの影響が認められた。体温低下は、オンターゲット作用による末梢／皮膚血管拡張の二次的な影響とみなされる[1)]。正常血圧の覚醒下のラットを用いた効力を裏付ける試験において、血圧低下を伴う血管拡張は、低用量のベルイシグアトの単回経口投与で認められている。血管拡張及びそれに続発する体温低下の結果として、安全性薬理試験において活動低下又は歩行／姿勢異常などの行動に対する影響が認められ、また、ラット 4 週間反復投与毒性試験においても歩行異常が認められている〔15～60mg/kg（MRHD 投与時非結合型 C_{max} の 48～145 倍）、2.6.6.3.2.2、表 2.6.6.9-2〕。安全性薬理試験及び 4 週間反復投与毒性試験で歩行異常が認められた用量である 15mg/kg（MRHD 投与時非結合型 C_{max} の約 37 倍）で、協調運動及び化学物質誘発痙攣に対する影響は認められなかった。また、ベルイシグアトは P-gp の基質であり、

ラットにおいて脳移行性は低いことが示されている（2.6.4.4.1.1）。したがって、高曝露下で散発的に認められた可逆性の歩行異常所見は、CNS に対するベルイシグアトの直接的な影響によるものではなく、過度の薬理作用に基づく血管拡張並びに血圧低下及び／又は体温低下による二次的な影響であると考えられる。更に、心不全患者の臨床試験において、有効用量で歩行に関する有害事象は認められていない（2.7.4.2.1）ことから、歩行の所見は正常血圧ラットにおいて過度の薬理作用が生じる高曝露でみられたものであり、臨床での曝露量を考慮すると、本所見は臨床では発現しないと考えられる。ベルイシグアトヒトにおける QT 延長のリスクを評価した安全性薬理試験（*in vitro* での hERG 試験、イヌにおける QT/QTc 間隔）結果から、ベルイシグアトは心臓の再分極に対して臨床的に問題となるような影響を及ぼさないと考えられた。

ラット及びイヌにおいて、ベルイシグアトと cGMP を増加させる他の薬剤の併用投与の影響を検討した。ベルイシグアトを NO ドナーである GTN 又は NEP 阻害薬サクビトリル及び ARB 遮断薬バルサルタンと併用投与した結果、麻酔ラット及び覚醒ラットで併用投与により、血圧低下及び心拍数増加に対する相加効果が認められた。覚醒イヌでの併用投与では、血圧低下に対する相加効果のみがみられ、心拍数には付加的な影響はみられなかった。血圧及び心拍数に対し相加効果を超える効果は認められなかった。

ベルイシグアトの薬物動態（吸収・分布・代謝・排泄）特性を一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験において評価した。非臨床動物種において、ベルイシグアトは、クリアランスが低く、分布容積は中程度、消失半減期は中程度であった。非臨床動物種及びヒトにおいて、ベルイシグアトは、主に代謝及び未変化体の排泄によって消失する。ヒト特異的な代謝物は認められなかった。代謝物 M-1（ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体）は、ヒト血漿中において主要な成分であったが、非臨床動物種の血漿中では微量成分であった。M-1 には sGC に対する薬理活性はなく、オフターゲット作用も有していない。MRHD におけるヒトの M-1 曝露量は、マウスのがん原性試験において、雌の総 AUC（MRHD の 1 倍）及び雌雄の非結合型 AUC〔MRHD の 2 倍（雄）及び 6 倍（雌）〕で担保されていた。加えて、ラットのがん原性試験においても、非結合型 AUC〔MRHD の 0.43 倍（雌雄平均）〕で、担保の下限付近ではあるが、担保されていた。これらのデータに基づくと、マウス及びラットの反復投与毒性試験、並びにラットの生殖発生毒性試験では、がん原性試験と同等以上の用量（マウスは同程度の用量、ラットはより高い用量）が用いられたことから、ヒトの M-1 曝露量は、これらの試験の動物の曝露量によっても担保されていたと考えられる。薬理学的関連性、十分な薬物動態及び許容可能な *in vitro* 及び *in vivo* 代謝プロファイルに基づいて、ラット及びイヌをそれぞれ非臨床安全性評価用のげっ歯類及び非げっ歯類として選択した。

ベルイシグアトの毒性プロファイルを調べ、患者における長期的な使用時の安全性リスクを検討するため、一連の毒性試験を実施した。マウスに最長 13 週間、ラットに最長 6 ヵ月間及びイヌに最長 9 ヵ月間投与した反復投与毒性試験並びにラット及びマウスにおける 2 年間がん原性試験でのベルイシグアトの曝露量は、総 AUC 及び非結合型 AUC のいずれにおいても、MRHD でのヒト曝露量と比べて十分に高かった（表 2.4.5- 1）。

表 2.4.5- 1 反復投与毒性試験（マウス、ラット、イヌ）及びがん原性試験（マウス、ラット）におけるベルイシグアトの曝露量（総 AUC 及び非結合型 AUC、定常状態）、並びに MRHD 投与時のヒトにおけるベルイシグアトの曝露量（定常状態）との比

Species	Study Duration	Dose Levels (mg/kg/day)	Sex	Total $AUC_{(0-24)}$ (μg•h/L)	Exposure Multiple Total [a]	Unbound $AUC_{(0-24)}$ (μg•h/L)	Exposure Multiple Unbound[b]
Mouse	3 months	5	m	10800	2	863	6
		15	m	36100	5	2884	20
		50 (NOAEL)	m	128000	19	10227	70
		5	f	7340	1	586	4
		15	f	19500	3	1558	11
		50 (NOAEL)	f	89400	13	7143	49
	2 years	5	m	10800	2	863	6
		15	m	31400	5	2509	17
		50	m	117000	18	9348	64
		150 (NOAEL[d])	m	271000	41	21653	149
		6	f	17600	3	1406	10
		20	f	59700	9	4770	33
		60	f	180000	27	14382	99
		250 (NOAEL[d])	f	522000	78	41708	286
Rat	1 month[c]	15	m	74600	11	3394	23
		30	m	152000	23	6916	47
		60	m	240000	36	10920	75
		15	f	86400	13	3931	27
		30	f	158000	24	7189	49
		60	f	253000	38	11512	79
	3 months	3	m	16200	2	737	5
		10 (NOAEL)	m	52600	8	2393	16
		30	m	146000	22	6643	46
		3	f	23500	4	1069	7
		10 (NOAEL)	f	72900	11	3317	23
		30	f	212000	32	9646	66
	6 months	3	m	13800	2	628	4
		10	m	45000	7	2048	14
		30 (NOAEL)	m	150000	22	6825	47
		3	f	16800	3	764	5
		10	f	62600	9	2848	20
		30 (NOAEL)	f	167000	25	7599	52
	2 years	2	m/f	13500	2	614	4

Species	Study Duration	Dose Levels (mg/kg/day)	Sex	Total $AUC_{(0-24)}$ (μg•h/L)	Exposure Multiple Total [a]	Unbound $AUC_{(0-24)}$ (μg•h/L)	Exposure Multiple Unbound[b]
		6 (NOAEL[d])	m/f	38600	6	1756	12
		20	m/f	131000	20	5961	41
Dog	1 month	2.5 (NOAEL)	m/f	6390	1	652	4
		7.5	m/f	14100	2	1438	10
		25/15	m/f	17600	3	1795	12
	3 months	1.25	m/f	5820	1	594	4
		2.5	m/f	10600	2	1081	7
		5 (NOAEL)	m/f	21800	3	2224	15
	9 months	0.5	m/f	2380	0.4	243	2
		1.5	m/f	7200	1	734	5
		5 (NOAEL)	m/f	12000	2	1224	8

a Exposure multiples compared to human total AUC based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)

b Exposure multiples compared to human unbound AUC based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)

c no NOAEL defined

d highest dose with no test article-related neoplastic findings

NOAEL = No-observed-adverse-effect level.

m = male; f = female; m/f = pooled

f_u mouse = 7.99%, f_u rat = 4.55%, f_u dog = 10.2%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

ベルイシグアトの毒性プロファイルは、sGC 刺激とそれに続く細胞内 cGMP 濃度の増加という薬理作用機序の二次的な影響を特徴としていた。心血管系及び消化管系並びに成長期のラットの骨が最も感受性が高かった。検討した最高用量まで作用機序に関連しない影響及びオフターゲット作用による臓器毒性は認められなかった。

生殖発生毒性試験では、雌雄生殖能に対する有害作用は認められなかった。母体忍容性、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生には、ベルイシグアトの薬理作用の影響が認められ、ウサギにおいて妊娠後期の流産が増加した。ベルイシグアトに催奇形性は認められなかった。

ベルイシグアトは遺伝毒性及び光毒性を示さなかった。

ラット及びマウスを用いた 2 年間がん原性試験で臨床用量におけるベルイシグアトのヒトに対する発がんリスクは認められなかった。

以上の非臨床試験より、sGC 刺激薬としてのベルイシグアトの薬理学的プロファイルが明らかになった。ベルイシグアトの薬物動態特性は非臨床安全評価用のげっ歯類としてラットを、非げっ歯類としてイヌを用いることを支持している。これらの動物種における単回及び反復投与毒性試験によって、ベルイシグアトに直接的な臓器毒性がないことが明らかになった。ベルイシグアトの非臨床安全性プロファイルは、薬理作用による二次的な影響を特徴としている。ラット、マウス及びイヌの心血管系及び消化管系並びに成長期のラットの骨が最も感受性が高かった。遺伝毒性、がん原性、幼若動物における毒性及び光毒性試験において、ベルイシグアトの治療適用に関するリスクは認められなかった。ベルイシグアトは催奇形性を示さなかったが、過度な薬理

作用の二次的影響により、ウサギの妊娠後期に流産が増加した。ラットでは、ベルイシグアトは胎盤を通過し、乳汁中に分泌される。

全体として、非臨床プロファイルは慢性心不全の治療におけるベルイシグアトの安全な使用を支持している。

引用文献一覧

1) Redfern WS et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2005:52:77-82　(4.3.4)