

201324135A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

重症拡張型心筋症患者の生命予後改善・人工
心臓離脱を目指した新規オキシム誘導体徐放性製剤
による体内誘導型再生治療法の開発と実践

平成25年度 研究報告書

研究代表者 宮川 繁

平成26(2014)年5月

目次

I. 総括研究報告

重症拡張型心筋症患者の生命予後改善・人工心臓離脱を目指した新規オキシム誘導体徐放性製剤による体内誘導型再生治療法の開発と実践..... 1

大阪大学医学系研究科 特任准教授 宮川 繁

II. 分担研究報告

1. イヌ高速ペーシング（拡張型心筋症）モデルにおける ONO-1301MS 製剤の単回心臓貼付投与での薬効薬理試験（最小有効投与量設定試験） 6

大阪大学医学系研究科 助教 福畠 五月

兵庫医科大学医学部 准教授 大門 貴志

2. 自然発症拡張型心筋症 J2N-k ハムスターモデルにおける反復経口投与および間歇皮下投与での薬効薬理試験（最小有効投与量の検索） 13

大阪大学薬学研究科 特任助教 今西 悠基子

兵庫医科大学医学部 准教授 大門 貴志

3. ONO-1301 の新規ナノスフェア製剤の作製と有効性の確認.....19

大阪大学医学部附属病院 講師 齋藤 充弘

兵庫医科大学医学部 准教授 大門 貴志

III. 刊行物一覧（別紙4） 23

IV. 研究成果の別刷

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）

総括研究報告書

重症拡張型心筋症患者の生命予後改善・人工心臓離脱を目指した新規オキシム誘導体
徐放性製剤による体内誘導型再生治療法の開発と実践
(ステップ-1 ; H25-難治等(難) 一般-019)

研究代表者 大阪大学大学院医学系研究科 宮川 繁

本研究は、ONO-1301 類の拡張型心筋症への薬効と安全性の確認から、次世代の体内誘導型再生医療剤としての確立を目指す。初年度は臨床投与製剤と投与方法の選択、評価系の確立と薬効薬理試験(最小有効投与量の設定)、及び新規 DDS 製剤として ONO-1301 ナノスフェア製剤の可能性について検討した。

重症拡張型心筋症患者へ補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として、ONO-1301MS (徐放性マイクロスフェア) 製剤を心臓貼付投与する治療法の開発として、イヌ高速ペーシングモデルを用いて検討を行った。即ち、高速ペーシング 4 週間後に開胸し、ONO-1301MS (4 週間徐放性製剤) を心臓貼付投与し、投与 4 週間後 (ペーシング 8 週間) に心機能 (LVEF 等) 評価した結果、最小有効投与量は 0.3mg/kg であった。

一方、ミニブタ陳旧性 (OMI) 心筋梗塞モデルを用いて、梗塞 4 週後に同様の投与方法にて ONO-1301MS を心臓貼付し、4 週後に心機能を評価した別途試験では、最小有効投与量は 0.3mg/kg と、イヌ高速ペーシングモデルでの有効量とほぼ同等であった。

一方、心臓貼付投与は、重症心不全患者に対する侵襲が大きいため、軽症・中等症拡張型心筋症患者に対しては、より早期から ONO-1301 (原薬) を汎用性、経済性、安全性の高い反復経口投与をすることにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発は重要である。

ONO-1301 は当初経口血小板凝集抑制剤として開発されたが、副作用 (下痢等) と有効性との乖離が少ないとのことで、開発が中止された。しかし、今回の自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルへの反復経口投与試験の結果 (最小有効投与量 ; 1 mg/kg) は、血小板凝集抑制作用の 1/10 以下の投与量で有効性を示しているため、副作用との乖離も大きく、十分開発は可能であると思われる。

また、ONO-1301 の新しい DDS 製剤として ONO-1301 ナノスフェア (ONO-1301NS) 製剤を作製し、重症心不全モデルに対する間歇静脈内投与での効果を検討した結果、ONO-1301 が疾患局所に集積 (DDS) されて効果を示すことが示唆された。ONO-1301NS は汎用性、利便性ある間歇反復静脈内投与が可能で、疾患局所特異的 (DDS) であり、経口投与に比しより少量投与により有効性を発揮する可能性が示唆された。

本年 3Q に「オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア (ONO-1301MS) 製剤の心臓貼付投与における重症心不全への適応) を目的として、FIH 臨床試験計画書に対する PMDA 対面助言を実施する予定である。

研究分担者

大阪大学医学系研究科	助教	福寫	五月
大阪大学医学部附属病院	講師	齋藤	充弘
大阪大学薬学研究科	特任助教	今西	悠基子
兵庫医科大学医学部	准教授	大門	貴志

A. 研究目的

拡張型心筋症の末期心不全にあつては1年死亡率が75%とされる。本疾患に対する根本治療は心臓移植であるが、臓器移植法改定後においてもドナーの絶対的不足状態は変わらない。現在これらの患者には、埋め込み型補助人工心臓 (LVAD) が実施されているが、社会復帰には尚、問題点も多い。LVAD離脱および心臓移植・LVAD装着の回避を目指した心臓再生医療の開発は喫緊の課題である。

従来の人工心臓、心臓移植、および細胞療法に代わり、治療効果が高く、細胞培養を不要とする薬剤開発により、有用性、汎用性、経済性および緊急使用可能な心血管・心筋再生療法剤を開発し、治験の施行、ひいては薬事法にて承認され、新しい心不全治療剤として臨床の現場で汎用されることを究極の目的と見据える。

本研究に使用する低分子合成化合物；オキシム誘導体 (ONO-1301) は、非プロスタグランジン骨格であり、科学的に安定で、トロンボキサン (TX) A₂ 合成酵素阻害作用を併せ持つ、選択的プロスタグランジン IP 受容体作動薬 (Fig 1) として見出され、小野薬品により経口血小板凝集抑制剤として臨床試験が実施されたが、副作用 (下痢等) と有効性の乖離が少ないことにより開発が中止された。

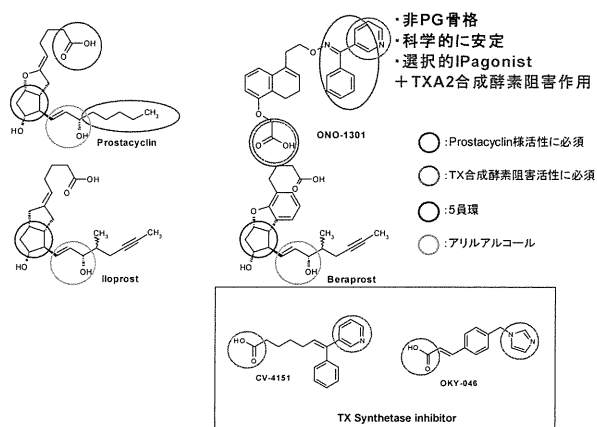


Fig 1 : ONO-1301 の構造的特徴

今回、本化合物が血小板凝集抑制作用より低濃度で線維芽細胞等に作用して、多種の体内再生因子 (HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1 等) を産生誘導することを新しく見出し (Fig 2)、これらの作用から抗アポトーシス作用、血管新生作用、幹細胞分化誘導・組織再生作用、及び抗線維化作用等が期待できる。

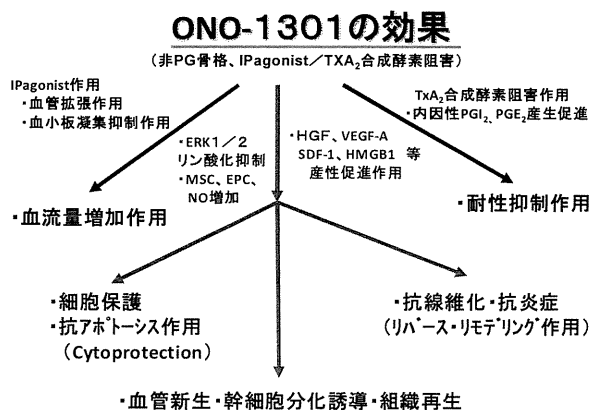


Fig 2 : ONO-1301 の期待される効果

また、疾患局所投与可能な4週間徐放性製の ONO-1301 乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) マイクロスフェア (MS) 製剤 (ONO-1301MS) を作製した (Fig 3)。4週間徐放性製剤である ONO-1301MS をラットに皮下投与すると、点滴静注様の血中動態を示した (Fig 4)。

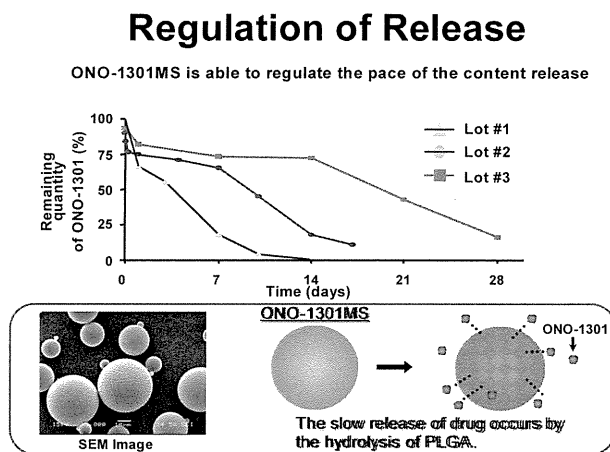


Fig 3 : ONO-1301 の徐放性製剤 (ONO-1301MS)

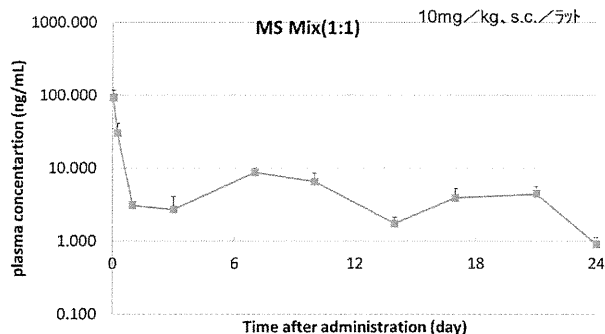


Fig4:ラット皮下に ONO-1301MS 投与における血中動態
イヌ高速ペーシングモデル、ミニブタ陳旧性

(OMI) 心筋梗塞モデル、及び自然発症拡張型心筋症ハムスター (J2N-k) モデルを用いて心臓貼付投与試験を行った結果、(心臓) 臓器組織に ONO-1301MS をゼラチンシートに浸み込ませて貼付することにより貼付された臓器にては、血管新生・組織修復されることが示唆された (Fig5)。

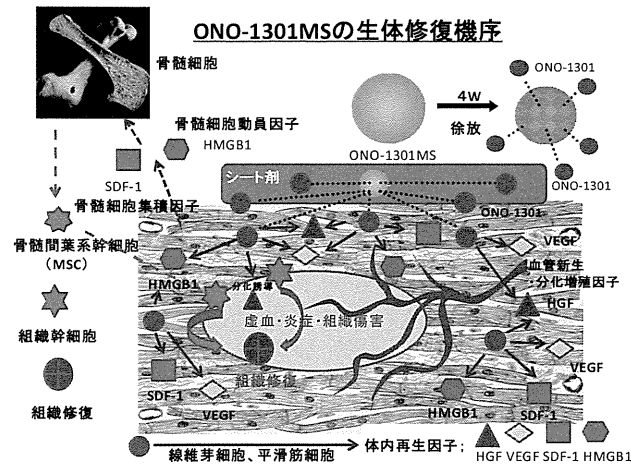


Fig 5 : ONO-1301MS の生体修復機序

B. 研究方法 (詳細は各分担報告書を参照)

1) 重症拡張型心筋症患者へ補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として、ONO-1301MS (徐放性マイクロスフェア) 製剤を心臓貼付投与することを目的とした治療法の開発を検討した。

イヌ高速ペーシングモデルを用いて、高速ペーシング4週間後に開胸し、ONO-1301MS (4週間徐放性製剤) を 0.1mg/kg~3mg/kg にて単回心臓貼付投与した。投与2週間及び4週間後 (ペーシング8週後; 解剖) に心エコーによる心機能 (LVEF 等) 評価を行った。また、心臓病理評価及び RT-PCR 等の解析も実施中である。

尚、ONO-1301MS 心臓貼付投与法は、必要量を媒体に懸濁させ、2枚の滅菌吸収性ゼラチンスポンジ (ゼルフォーム No.12、20×60×7mm) 上に添加した。動物の左胸部を開胸後、心臓を露出し、ONO-1301MS を浸透させたゼラチンスポンジを心臓の左冠状動脈 (前下行枝、後下行枝) 上及び左冠状動脈から離れた左心室上に1枚ずつ2枚貼付した。貼付後、フィブリン製剤 (ベリプラスト P コンビセット組織接着用: 3mL) を噴霧し、ONO-1301MS 含有ゼラチンスポンジを封入した。

Control 群についても、同様に媒体のみを同量ゼルフォーム2枚に浸透させて、同様に心臓貼付を行った。

2) 軽症・中等症拡張型心筋症患者に ONO-1301 (原薬) を反復経口投与することにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発を目的として検討した。

自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルを用いて、20週齢 (病態発症) から28週齢まで1日2回 ONO-1301 を 0.1mg/kg~3mg/kg にて8週間反復経口投与した。投与2、4、6及び8週間後 (解剖) に、心機能 (LVEF 等) 評価を行った。また、心臓病理評価及び RT-PCR 等の解析を実施中である。

3) 疾患特異的な DDS ナノスフェア製剤として、新規 ONO-1301 ナノスフェア製剤 (ONO-1301NS) を作製し、間歇反復静脈内投与により、より汎用性の高い疾患特異的 (DDS) な重症心不全治療剤開発を目的とした治療法の開発を検討した (特許出願準備中)。

代表的な2種の ONO-1301NS 製剤 (A; 内径 122nm、B; 内径 109nm) を作製した。

ラットにモノクロタリン 60mg/kg を単回皮下投与により誘発させた重症心不全モデル (肺高血圧症モデル) を用いて、モデル作製7日後より、ONO-1301; 3mg/kg x 2回/日反復経口投与および ONO-1301 又は ONO-1301NS 製剤 A 及び B の週1回、(ONO-1301 として) 1mg/kg 間歇静脈内投与し、42日までの生存率を比較検討し、NS 剤の DDS 効果を確認した。

(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

1) イヌ高速ペーシングモデルへの ONO-1301MS 心臓貼付投与試験

イヌに高速心臓ペーシング (拍動数: 220~236 beats/min) を行うことにより誘発させた重症拡張型心筋症モデルを用い、病態発症後 (4週後) に ONO-1301MS の単回心臓貼付投与を行い、貼付2週後、及び4週後 (ペーシング8週後; 解剖) に心機能改善効果及びリモデリング抑制効果について検討した。

今回作製した重症拡張型心筋症モデル (Control 群) における心機能検査では、ペーシング4週後で左室内腔の拡大 (左室拡張末期径及び左室収縮

末期径の増大)とともに心室壁の非薄化(心室中隔壁厚及び左室後壁拡張末期厚の減少)が認められた。さらに機能面では左室収縮機能の低下(LVEF及び%FSの低下等)が観察された。以上の結果から今回作製した重症拡張型心筋症モデルは、ペーシング惹起4週後で急激に心機能が悪化し、左室リモデリングが形成される拡張型心筋症の病態モデルであり、さらに8週間に亘る長期のペーシングによってうっ血症状が観察される重症心不全状態を惹起したモデルであると考えられた。

このような病態モデルに対して、ペーシング4週におけるONO-1301MS心臓貼付投与(ONO-1301として3、1、0.3及び0.1mg/kg投与)では、心不全時の左室収縮機能(LVEF)不全に対して0.3mg/kgの投与用量より用量相関的に有意な改善効果が認められた。

以上の結果、ONO-1301MSは左室収縮機能不全に対して改善効果が認められ、最小有効投与量は0.3mg/kgであった。

2) 自然発症拡張型心筋症(J2N-k)ハムスターモデルへのONO-1301反復経口投与試験

ハムスター(自然発症拡張型心筋症J2N-kモデル)に20週齢(病態発症)から28週齢まで、8週間ONO-1301(原薬)を1日2回、反復経口投与して、心機能悪化抑制および改善効果を検討した。

正常(J2N-n)群、病態Control(J2N-k)群、ONO-1301-3.0mg/kg(x2回/日)群、同-1.0mg/kg群、同-0.3mg/kg群、同-0.1mg/kg群の6群を置いて検討した。

正常(J2N-n)群および病態Control(J2N-k)群は媒体を、ONO-1301各群はONO-1301を、それぞれ1日2回56日間反復経口投与を行った。

その結果、心エコーによるLVEF(左室駆出率)値において、ONO-1301投与群では、投与2週目から8週目まで用量相関的に有意に悪化を抑制し、3.0mg/kg投与群では改善作用が認められた。このことからONO-1301には、拡張型心筋症の改善又は心不全への悪化を抑制する作用があり、最小有効投与量は0.3mg/kgと1.0mg/kgの間であった。

3) 疾患特異的なDDSナノスフェアー製剤

3-1) 新規ONO-1301ナノスフェアー製剤(ONO-1301NS)の作製(特許出願準備中)を行った結果、製剤A(平均粒子径;122nm)及び製剤B(平均粒子径;109nm)である2種のONO-1301NS製剤を得た。

3-2) ONO-1301NS製剤間歇静注投与における抗心不全効果の検討

作製したONO-1301NS製剤AおよびBを用いて、ラットモノクローリン(MCT)誘発重症心不全(肺高血圧症)モデルにて評価した結果、媒体投与群(Cont)に比し、ONO-1301反復経口投与群およびONO-1301NS製剤Aの間歇反復静注群は共に50%の有意な生存率の延長を示した。またONO-1301(原薬)およびONO-1301NS製剤Bの間歇反復静注群では効果は認められなかった。このことから、ONO-1301NS製剤Aは経口投与に比し、ONO-1301の総投与量として1/42の投与量にて同等の効果を示し、疾患局所特異的であることが示唆された。

D. 考察

重症拡張型心筋症患者へ補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として検討を行った。即ち、イヌ高速ペーシングモデルを用いて、ペーシング4週間後に開胸し、ONO-1301MS(4週間徐放性製剤)を単回心臓貼付投与し、投与4週間後(ペーシング8週間)に心機能(LVEF)評価した。その結果、最小有効投与量は0.3mg/kgであった。

我々はすでに虚血性心筋症への適応として、冠動脈バイパス手術時にバイパスや経皮的冠動脈インターベンション(PCI)不能な狭窄冠動脈の灌流区域(虚血心筋領域)の心臓にONO-1301MS(4週間徐放性製剤)を単回貼付することを目的としたFIH臨床試験を計画している。

基礎薬効薬理試験としてミニブタ陈旧性(OMI)心筋梗塞モデルを用いて、梗塞4週後に同様の投与方法にてONO-1301MSを心臓貼付し、4週後に心機能を評価した結果、最小有効投与量は0.3mg/kgと、イヌ高速ペーシングモデルでの有効量とほぼ同等であった。

昨年度、PMDA対面助言にて、本臨床試験実施に必要な追加非臨床毒性試験(ラット13週間間歇皮下投与毒性試験及びミニブタ単回心臓貼付投与6週間及び13週間毒性試験)を設定し、現在実施中である。

これらの結果を用いて、2014年3Qに「オキシム誘導体徐放性マイクロスフェアー(ONO-1301MS)製剤の重症心不全への適応」を目的として、FIH臨床試験計画書に対するPMDA対面助言を実施する予定である。

一方、心臓貼付投与は、重症心不全患者に対する侵襲が大きい。よって、軽症・中等症拡張型心筋症患者に対しては、より早期からONO-1301(原薬)を汎用性、経済性、安全性の高い反復経口投与をすることにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発は重要である。

ONO-1301 は当初経口血小板凝集抑制剤として開発されたが、副作用（下痢等）と有効性との乖離が少ないとのことで、開発が中止された。しかし、今回の自然発症拡張型心筋症（J2N-k）ハムスターモデルへの反復経口投与試験の結果は、血小板凝集抑制作用の 1/10 以下の投与量で有効性を示しているため、十分開発は可能であると思われる。

また、ONO-1301 の疾患局所に集積する新しい DDS 製剤として ONO-1301NS を作製し、重症心不全に対する間歇静脈内投与での効果を検討した結果、疾患局所に ONO-1301 が集積（DDS）されることにより、全身投与（経口投与）に比しより少量投与で有効性を発揮する可能性が示唆された。安全性、経済性、汎用性、利便性に勝っている ONO-1301NS 製剤の開発は DDS 製剤として有用である。

E. 結論

2014 年 3Q に「オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア（ONO-1301MS）製剤の心臓貼付投与における重症心不全への適応」を目的として、FIH 臨床試験計画に対する PMDA 対面助言を実施する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 「A slow-releasing form of prostacyclin agonist (ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure.」

Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Nakatani S, Sakai Y, Daimon T, Okita Y, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Aug;146(2):413-21.

2) 「Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.」

Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y.

PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

3) 「Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.」

Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Dec;146(6):1516-25.

4) 「Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.」

Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2014 Mar;147(3):1081-7.

2. 学会発表

1) 「A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model」

Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa

AHA2013 (American Heart Association)

2013. 11. 16-20 Dallas, TX, USA

2) 「長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与法の開発・効果に関する実験的検討」

溝口裕規、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、酒井 芳紀、今西悠基子、原田希摩、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田 宏一、澤 芳樹

第 4 4 回日本心臓血管外科学会 熊本 (2014. 2. 19-21)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他(今後の予定)

1) 「新規ナノスフェア製剤」

・出願人：大阪大学 等

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）

分担研究報告書

イヌ高速ペーシング（拡張型心筋症）モデルにおける ONO-1301MS 製剤の単回心臓貼付投与での薬効薬理試験（最小有効投与量設定試験）

研究分担者 大阪大学大学院医学系研究科 助教 福嶋 五月

統計担当：兵庫医科大学医学部 准教授大門 貴志

研究要旨；

イヌ高速ペーシング誘発重症拡張型心筋症モデルを用い、ONO-1301MS の単回心臓貼付投与による心機能改善効果及びリモデリング抑制効果について検討し、最小有効投与量を設定した。

1) 本試験で作製したイヌ高速ペーシング誘発重症拡張型心筋症モデルにおいて、ペーシング惹起 (220～236 beats/min) 4～8 週後に心エコー検査により左室リモデリング (左室内腔の拡大及び壁厚の減少)、左室収縮機能不全 (駆出率及び短縮率の減少) が観察された。さらに心拡大 (心臓重量体重比の増加)、肺うっ血・肺水腫 (肺臓重量体重比の増加)、肝臓腫大 (肝臓重量体重比の増加) 及び腹水貯留が認められ、重度の心不全状態を呈していた。

2) 高速ペーシング 4 週後に ONO-1301MS を心臓貼付投与し、投与 2 週及び 4 週 (ペーシング 8 週；解剖) に心機能 (心エコー) を評価した。その結果、ONO-1301MS 投与群 (3、1、0.3 及び 0.1 mg/kg) では、心不全時の左室収縮機能不全に対して 0.3 mg/kg の投与用量より有意な LVEF 改善効果が認められた。

一方血中濃度においては、最小有効投与量である 0.3mg/kg 貼付における貼付 3 時間後での Cmax は 2.2ng/mL であり用量相関的に持続的な ONO-1301 血中濃度維持が確認された。本 Cmax 値は、ONO-1301 経口投与における第 I 相試験での無影響量である Cmax；15.6ng/mL より低値であった。

以上の結果、ONO-1301MS 心臓貼付投与は左室収縮機能不全に対して改善効果が認められ、最小有効投与量は 0.3 mg/kg であった。

現在、血液生化学検査、心臓組織の線維化面積比、毛細血管数及び心臓 RT-PCR 測定等を実施中である。

A. 研究目的

重症拡張型心筋症患者へ補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として、ONO-1301MS (徐放性マイクロスフェア) 製剤を心臓貼付投与することを目的とした治療法の開発を検討する。即ち、イヌ高速ペーシング誘発重症拡張型心筋症モデルを用い、ONO-1301MS の単回心臓貼付投与による心機能改善効果及びリモデリング抑制効果について検討し、最小有効投与量を設定することを目的とする。

B. 研究方法

1. 試験材料及び方法

1.1 被験物質 (小野薬品より入手)

名称：ONO-1301MS (ONO-AP-500-04)

Lot No. : Lot No. 121009-1 (リリース期間；4 週間)

性状：微粉末 (平均粒子径；38.7 μm、ONO-1301 含有率；18%)

1.2 その他試薬 (投与資材)

1) 名称：ゼルフォーム (No.12、20 × 60 × 7 mm)
(ファイザー (株) より入手)

Lot No. : EU465A

性状：白色、多孔性の無菌製剤

2) 名称：ベリプラス P コンビセット組織接着用
(3 mL) (CSL ベーリング (株) より入手)

Lot No. : 609150A

構成：フィブリン末、アプロチニン液、トロンビン末、塩化カルシウム液

1.3 媒体

名称：0.2 w/v% ポリソルベート 80 含有 5 w/v% マンニトール溶液

試薬：

①D-マンニトール

(Lot No. PDJ0007、和光純薬工業(株))

②ポリソルベート 80 (Lot No. 205359C、日油(株))

性状：①白色の結晶性粉末、②液体

1.4 被験液の調製

名称：ONO-1301MS

媒体：0.2 w/v% ポリソルベート 80 含有 5 w/v% マンニトール溶液

調製方法：ONO-1301MS は所定投与量を媒体 0.5 mL に懸濁させ、ボルテックス処理により十分に攪拌させた。

使用期限：用時調製とし、調製後 (水添加後) 9 分以内にゼルフォーム上に添加浸透後、心臓に貼付投与した。

2. 試験系

2.1 使用動物

種：イヌ
 系統：ビーグル
 微生物学的グレード：コンベンショナル
 性別：雄性
 実験開始時の月齢：8～19 箇月齢
 （ペースメーカー埋め込み時）
 実験開始時の体重範囲：10.05～13.80 kg
 （ペースメーカー埋め込み時）
 供給源：北山ラベス株式会社

2.2 投与

2.2.1 投与群

[ONO-1301 としての投与量]

群	被験物質	投与量	動物数
1	Sham	Sham Ope	5
2	Control	媒体（心臓貼付投与）	6
3	ONO-1301MS	3 mg/kg（心臓貼付投与）	4
4	ONO-1301MS	1 mg/kg（心臓貼付投与）	4
5	ONO-1301MS	0.3 mg/kg（心臓貼付投与）	5
6	ONO-1301MS	0.1 mg/kg（心臓貼付投与）	6

Sham 群については投与時、開胸手術（約 20 分間）のみを行い閉胸した。

2.2.2 投与量設定理由

ミニプタ OMI（陳旧性心筋梗塞）モデルにおける同法での心臓貼付試験での最小有効投与量は 0.3 mg/kg (ONO-1301 として) であった (2013AHA)。また、イヌ高速ペーシング同モデルでの心筋内投与においては、1.5 mg/kg 投与（5 箇所に分割投与の総投与量）で有効性が確認されている (J Thorac Cardiovasc Surg2013;146:413-21)。

2.3 被験物質の投与

2.3.1 投与経路：心臓貼付投与

2.3.2 選択理由：臨床投与経路と同じに設定した。

2.3.4 添加浸透量（ゼラチンスポンジ 2 枚分）：

- ・0.5 mL 懸濁液（0.5 mL の媒体×2 回で洗浄、計 1.5 mL）
- ・ゼラチンスポンジ 1 枚分としてはそれぞれ均等に半量を添加浸透した。

2.3.5 投与時期：高速ペーシング惹起 4 週後

2.3.6 投与頻度：単回投与

2.3.7 投与方法：

1) ONO-1301MS は必要量を媒体 0.5 mL に懸濁させ、2 枚の滅菌吸収性ゼラチンスポンジ（ゼルフォーム No. 12、20 × 60 × 7 mm）上に添加（0.25 mL×2 枚）した。再度媒体 0.5 mL×2 回で洗浄し、全ての ONO-1301MS をゼラチンスポンジ上に添加浸透させた。

2) 動物を麻酔下側臥位に固定し、左胸部を開胸後、心臓を露出した。ONO-1301MS を浸透させたゼラチンスポンジを心臓の左冠状動脈（前下行枝、後下行枝）上及び左冠状動脈から離れた（約 4 cm）左心室上に 1 枚ずつ 2 枚貼付した。貼付後、フィブリン製剤（バリプラスト P コンビセット組

織接着用：3 mL）を噴霧し、ONO-1301MS 含有ゼラチンスポンジを封入した。

3) Control 群についても、同様に媒体のみを同量ゼルフォーム 2 枚に浸透させて、同様に心臓貼付を行い、閉胸した。

2.3.8 観察期間：高速ペーシング惹起 8 週間（投与後 4 週間）

3 試験方法

3.1 ペーシング誘発イヌ心不全モデルの作製方法

1) ペースメーカーの埋め込み手術

麻酔下、動物の右側頸部を切開し、動物用体内式心臓ペースメーカー（以下ペースメーカー、SIP-501、スターメディカル株）を皮下に埋め込み、X 線透視診断装置）で右頸静脈よりリトラクタブルスクリーインリード

（TENDRIL™STS 2088TC、58cm 6Fr：セント・ジュード・メディカル株）を挿入し、先端を右心室壁に留置した。Sham 群については偽手術を行った。ペースメーカーを作動させパルスレートに連動した心臓の拍動が得られることを心電図（第 II 誘導）にて確認後、切開部を縫合した。

2) ペースメーカー作動状態の確認（ペースメーカー作動開始前）

術後 2 日目（ペースメーカー作動日）に、イヌを固定し、心電図用アンプを介して正常心電図（第 II 誘導）を測定した。その後ペースメーカーを作動させ、心電図用アンプを介して心電図（第 II 誘導）波形を 1 分間記録し、ペースメーカーが正常に作動することを確認した。術後 2 日目に 220～236 beats/min でペーシングを開始した。ペースメーカー作動日を作動 1 日目とした。

3) 聴診器の検査：毎日、10 秒間の拍動数を測定した。聴診器の検査で異常があった場合は、心電図を測定し、ペーシングエラーの有無を確認した。

4) 体重測定：ペースメーカー埋め込み日、ペースメーカー作動日及びそれ以降 1 週間毎に行った。

3.2 心エコーの測定

1) 測定ポイント：モデル作製前（Pre）、モデル作製後 4 週（群分け時）、6 週、8 週（解剖前）

2) 測定方法：無麻酔下、超音波画像診断装置を用いて心エコーを測定した。胸部にセクタープローブ（10 MHz）を当て M-mode で左室拡張末期径（LVIDd）及び左室収縮末期径（LVIDs）、心室中隔壁厚（IVSTd）、左室後壁拡張末期厚（LVPWd）を測定した。また駆出率
 $[EF = (LVIDd^3 - LVIDs^3) / LVIDd^3]$ 及び左室内径短縮率
 $[\%FS = (LVIDd - LVIDs) \times 100 / LVIDd]$ を算出した。

3.3 採血（血液生化学検査用及び血中濃度測定用）

1) 血液生化学検査用採血ポイント：モデル作製前（Pre）、モデル作製後 4 週（群分け時）、6 週、8 週（解剖前）に EDTA・2Na 採血を行い、血漿を凍結（-80℃）保存した。

2) ONO-1301 血中濃度測定用採血ポイント：心臓貼付投与後 0.5、1、3 時間、1 日後、1 週、2 週、3 週及び 4 週（解剖前）に EDTA・2Na 採血を行い、血漿を凍結（-80℃）保

存した。

4 解剖

1) 臓器摘出: ペーシング惹起8週後の心エコー測定終了後、体重測定し、ペントバルビタールナトリウム過剰静脈内投与により安楽死させた。直ちに開胸して心臓、肺臓、大動脈及び開腹して肝臓、腎臓を摘出した。血液を拭った後、心臓重量、肺臓重量、肝臓重量及び腎臓重量を測定した。さらに心肥大評価のため心臓重量体重比、肺うっ血の評価のため肺臓重量体重比を算出した。また、肝臓重量体重比及び腎臓重量体重比を算出した。肺臓(右肺上葉)、肝臓(右葉)、腎臓(右腎)の一部及び大動脈は10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬させて固定した。Sham群についても同様の解剖を行った。

2) 標本採取: 心臓は臓器重量測定後、心臓切り出し(輪切り切片)から素早く(1分以内目安)心筋の2箇所〔投与部位直下壁中隔及び反対側の中隔(非投与部位)〕を生検トレパン等により各2g程度×3個(計6個)採取した。なお、投与部位の採取はゼルフォームが残存している場合はその直下とし、ゼルフォームが消失している場合はゼルフォーム貼付部位と考えられる直下部位とした。採取した心筋は、心外膜に付着している被験物質のコンタミの無いように、心外膜から心筋層約1mmを切除廃棄し、内心筋部表面層を採取した。心筋は素早く液体窒素にて凍結保存(-80°C)した。

採取した組織を用いて、①心臓組織内 ONO-1301 濃度測定、②RT-RNA 解析、及び③蛋白定量等を行う予定。

3) 病理標本: 心臓は短軸方向に3分割し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定標本を用いて、線維化面積、毛細血管数等を測定する予定。

5 統計処理方法

1) 体重

Sham群(1群)とControl群(2群)の比較には、F検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を、不等分散であった場合はAspin-Welchのt検定を行った。Control群(2群)とONO-1301MS投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnnettの多重比較検定を行った。

2) 心エコー

解析方法: 実測値及び変化量(差分) < LVEF及び%FSのみ > で表記した。

統計処理: 心エコーの検査項目について、Sham群(1群)とControl群(2群)の比較には、F検定を行い、等分散であったためStudentのt検定を行った。Control群(2群)とONO-1301MS投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnnettの多重比較検定を行った。また、モデル作製後6週(投与後2週)及び8週(投与後4週)のLVEF及び%FSについては、モデル作製後4週(群分け時)に対する変化量(差分)を算出し、Sham群(1群)とControl群(2群)の比較には、F検定を行い、等分散であったためStudentのt検定を行った。Control群(2群)とONO-1301MS投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnnettの多重比較検定を行った。

さらにモデル作製後8週(解剖時)のLVEF比較にて、Control群(2群)とONO-1301MS投与群間で検定を行い、投与群における最小有効投与量を検索した。

3) 臓器重量(臓器重量体重比)

解析方法: 実測値(単位: 臓器重量g、臓器重量体重比g/kg)で表記した。

統計処理: Sham群(1群)とControl群(2群)の比較には、F検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を、不等分散であった場合はAspin-Welchのt検定を行った。Control群(2群)とONO-1301MS投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnnettの多重比較検定を行った。いずれの場合も、平均値±標準偏差(S.D.)で表記し、計算は表計算ソフトExcel 2010 SP1(Microsoft)を使用した。群間の有意差検定にはSAS9.2 for Microsoft Windows Workstation 32-bit(SAS Institute Inc.)及びその連動システム(EXSUS Ver. 7.7.1、樹CACエクシケア)を使用した。検定の有意水準として危険率5%(両側)を採用した。

(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

1. 試験成績

1) 観察: いずれの投与群においてもモデル作製後8週まで瀕死状態にまで陥る個体は認められなかった。解剖時には腹水・胸水の貯留、心のう水の貯留、心拡大、肺うっ血・肺水腫、肝臓腫大(暗褐色)、脾臓の委縮及び気管内に泡沫状の流出の所見を示す個体が観察された。

2) 体重の推移: 結果をFig.1に示した。

体重は、いずれの投与群においても著明な変動は認められなかった。

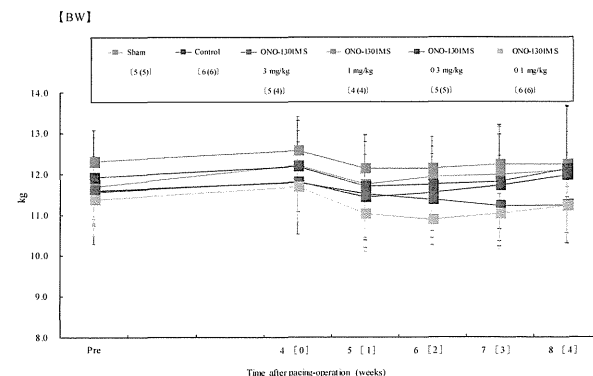


Fig. 1 Effects of ONO-1301MS on body weight (BW) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing) []: time after drug administration (weeks)
Sham: open chest during 20 min
Control: 0.2 wt% polysulfone-80 + 5 wt% mannitol
Each column represents the mean ± S.D.
No significant difference from sham (Student's t-test or Aspin-Welch's t-test).
No significant difference from control (vs. ONO-1301MS, Dunnnett's test).

2. 心エコー

1) 代表的な心エコー測定結果として、LVEFはFig.2-1

～2-3 に、%FS は、Fig. 3-1～3-3 に示した。

1) LVEF (EF) ; 投与後 2 週 (モデル作製後 6 週) 及び投与後 4 週 (モデル作製後 8 週) の EF については、実測値とそれぞれ群分け時 (モデル作製後 4 週) に対する変化量 (差分) を示した。

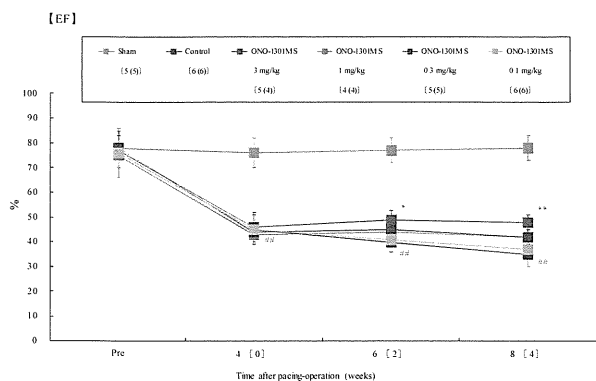


Fig. 2-1 Effects of ONO-1301MS on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing) [] time after drug administration (weeks) Sham: open chest during 30 min Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol Each column represents the mean \pm S.D. * and ** : significant difference from sham P<0.01 (Student's t-test) * and ** : significant difference from control P<0.05 and P<0.01, respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

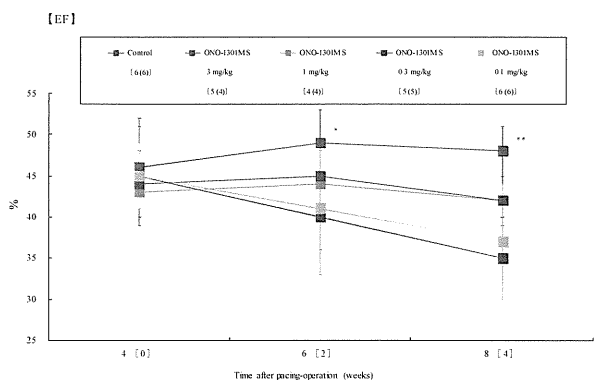


Fig. 2-2 Effects of ONO-1301MS on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing) [] time after drug administration (weeks) Sham: open chest during 30 min Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol Each column represents the mean \pm S.D. * and ** : significant difference from sham P<0.01 (Student's t-test) * and ** : significant difference from control P<0.05 and P<0.01, respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

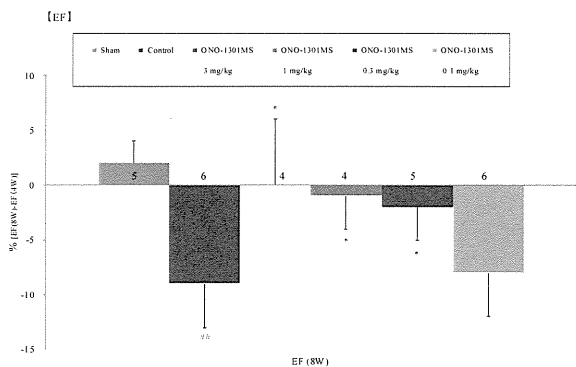


Fig. 2-3 Effects of ONO-1301MS on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing) Sham: open chest during 30 min Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol Each column represents the mean \pm S.D. * and ** : significant difference from sham P<0.01 (Student's t-test) * : significant difference from control P<0.05 (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test)

(1)Pre 時 (モデル作製前) : 各投与群 (1 群～6 群)、EF は 75±9%～78±8%を示した。

(2)群分け時 0W (モデル作製後 4 週) ; Sham 群 (1 群) で 76±6%、Control 群 (2 群) で 45±6%であり、Control 群 (2 群) での病態の進行に伴い EF の有意な低下 (P<0.01 vs. Sham 群、1 群に比べて 41%の低下) が観察された。いずれの被験物質投与群 (3 群～6 群) においても EF は 43±3%～46±6%を示し、Control 群 (2 群) と比較して群間に差は認められなかった。

(3)投与後 2 週 (モデル作製後 6 週) : Sham 群 (1 群) で 77±5%を示したのに対し、Control 群 (2 群) では 40±4% (変化量 -5±4%) であり、Control 群 (2 群) での病態の進行に伴い EF の有意な低下 (実測値 : P<0.01 vs. Sham 群、1 群に比べて 48%の低下/変化量 : P<0.05 vs. Sham 群) が観察された。ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群 (3 群) の EF は 49±4% (変化量 3±3%) を示し、Control 群 (2 群) と比較して EF に有意な増加 (実測値 : P<0.05 vs. Control 群、2 群に比べて 23%の増加/変化量 : P<0.05 vs. Control 群) が認められた。なお、その他の被験物質投与群 (4 群～6 群) において EF は 41±8%～45±4%を示し、Control 群 (2 群) と比較して有意な差は認められなかった (Fig2-2)。

(4)投与後 4 週 (モデル作製後 8 週) : Sham 群 (1 群) で 78±5%を示したのに対し、Control 群 (2 群) では 35±5% (変化量 -9±4%) であり、Control 群 (2 群) での病態の進行に伴い EF の有意な低下 (実測値 : P<0.01 vs. Sham 群、1 群に比べて 55%の低下/変化量 : P<0.01 vs. Sham 群) が観察された。ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群 (3 群) の EF は 48±3% (変化量 0±6%) を示し、Control 群 (2 群) と比較して EF に有意な増加 (実測値 : P<0.01 vs. Control 群、2 群に比べて 37%の増加/変化量 : P<0.05 vs. Control 群) が認められた。また、ONO-1301MS の 1 mg/kg 投与群 (4 群) の EF は 42±3% (変化量 -1±3%) を示し、Control 群 (2 群) と比較して EF に有意な増加 (実測値 : 有意ではないものの 2 群に比べて 20%の増加/変化量 : P<0.05 vs. Control 群) が認められた。さらに低用量である ONO-1301MS の 0.3 mg/kg 投与群 (5 群) においても、EF は 42±3% (変化量 -2±3%) を示し、Control 群 (2 群) と比較して EF に有意な増加 (実測値 : 有意ではないものの 2 群に比べて 20%の増加/変化量 : P<0.05 vs. Control 群) が認められた。一方、ONO-1301MS の 0.1 mg/kg 投与群 (6 群) の EF は 37±7% (変化量 -8±4%) を示し、Control 群 (2 群) と比較して群間に差は認められなかった (Fig2-2)。

一方、投与後 4 週 (解剖前) の EF 変化においては用量相関性が認められ、最小有効投与量は変化量 (差分) で有意差が認められた 0.3 mg/kg 投与群 (5 群) であった (Fig2-3)。

2) %FS

投与後 2 週 (モデル作製後 6 週) 及び投与後 4 週 (モデル作製後 8 週) の %FS については、実測値とそれぞれ群分け時 (モデル作製後 4 週) に対する変化量 (差分) を示した。

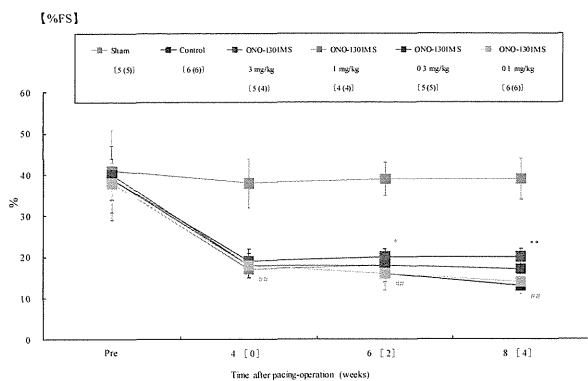


Fig. 3-1 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (%FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
 [] time after drug administration (weeks)
 Sham: open chest during 20 min
 Control: 0.2 w/v% polyborate-30 + 5 w/v% mannitol
 Each column represents the mean±S.D.
 #: significant difference from sham P<0.01 (Student's t-test)
 * and **: significant difference from control P<0.05 and P<0.01, respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

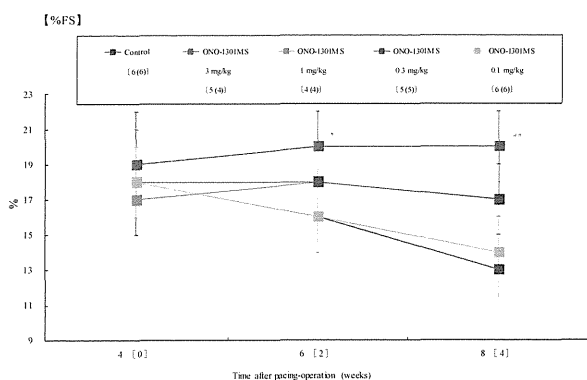


Fig. 3-2 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (%FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
 [] time after drug administration (weeks)
 Control: 0.2 w/v% polyborate-30 + 5 w/v% mannitol
 Each column represents the mean±S.D.
 * and **: significant difference from control P<0.05 and P<0.01, respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

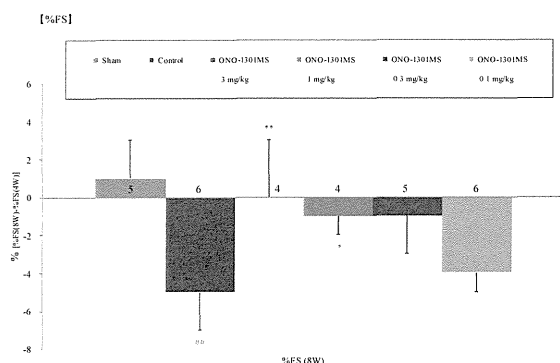


Fig. 3-3 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (%FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
 Sham: open chest during 20 min
 Control: 0.2 w/v% polyborate-30 + 5 w/v% mannitol
 Each column represents the mean±S.D.
 #: significant difference from sham P<0.01 (Student's t-test)
 * and **: significant difference from control P<0.05 and P<0.01, respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

(1)Pre 時 (モデル作製前) : 各投与群 (1 群~6 群)、%FS は $38 \pm 9\% \sim 41 \pm 10\%$ を示した。

(2)群分け時 0W (モデル作製後 4 週) : Sham 群 (1 群) で $38 \pm 6\%$ 、Control 群 (2 群) で $18 \pm 3\%$ であり、Control 群 (2 群) での病態の進行に伴い %FS の有意な低下 ($P < 0.01$ vs. Sham 群、1 群) に比べて 53% の低下) が観察された。いずれ

の被験物質投与群 (3 群~6 群) においても %FS は $17 \pm 1\% \sim 19 \pm 3\%$ を示し、Control 群 (2 群) と比較して群間に差は認められなかった。

(3) 投与後 2 週 (モデル作製後 6 週)

Sham 群 (1 群) で $39 \pm 4\%$ を示したのに対し、Control 群 (2 群) では $16 \pm 2\%$ (変化量 $-2 \pm 2\%$) であり、Control 群 (2 群) での病態の進行に伴い %FS の有意な低下 (実測値: $P < 0.01$ vs. Sham 群、1 群) に比べて 59% の低下/変化量: $P < 0.05$ vs. Sham 群) が観察された。ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群 (3 群) の %FS は $20 \pm 1\%$ (変化量 $1 \pm 1\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して %FS に有意な増加 (実測値: $P < 0.05$ vs. Control 群、2 群) に比べて 25% の増加/変化量: $P < 0.05$ vs. Control 群) が認められた。また、ONO-1301MS の 1 mg/kg 投与群 (4 群) の %FS は $18 \pm 2\%$ (変化量 $1 \pm 1\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して %FS に有意な増加 (実測値: 有意ではないものの 2 群) に比べて 13% の増加/変化量: $P < 0.05$ vs. Control 群) が認められた。さらに低用量である ONO-1301MS の ONO-1301MS の 0.3 mg/kg 投与群 (5 群) においても、%FS は $18 \pm 2\%$ (変化量 $0 \pm 2\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して %FS に有意な増加 (実測値: 有意ではないものの 2 群) に比べて 13% の増加/変化量: $P < 0.05$ vs. Control 群) が認められた。一方、ONO-1301MS の 0.1 mg/kg 投与群 (6 群) の %FS は $16 \pm 4\%$ (変化量 $-2 \pm 2\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して群間に差は認められなかった (Fig3-2)。

(4) 投与後 4 週 (モデル作製後 8 週) : Sham 群 (1 群) で $39 \pm 5\%$ を示したのに対し、Control 群 (2 群) では $13 \pm 2\%$ (変化量 $-5 \pm 2\%$) であり、Control 群 (2 群) での病態の進行に伴い %FS の有意な低下 (実測値: $P < 0.01$ vs. Sham 群、1 群) に比べて 67% の低下/変化量: $P < 0.01$ vs. Sham 群) が観察された。ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群 (3 群) の %FS は $20 \pm 2\%$ (変化量 $0 \pm 3\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して %FS に有意な増加 (実測値: $P < 0.01$ vs. Control 群、2 群) に比べて 54% の増加/変化量: $P < 0.01$ vs. Control 群) が認められた。また、ONO-1301MS の 1 mg/kg 投与群 (4 群) の %FS は $17 \pm 1\%$ (変化量 $-1 \pm 1\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して %FS に有意な増加 (実測値: 有意ではないものの 2 群) に比べて 31% の増加/変化量: $P < 0.05$ vs. Control 群) が認められた。一方、ONO-1301MS の 0.3 mg/kg 投与群 (5 群) 及び 0.1 mg/kg 投与群 (6 群) の %FS はそれぞれ $17 \pm 2\%$ (変化量 $-1 \pm 2\%$) 及び $14 \pm 3\%$ (変化量 $-4 \pm 1\%$) を示し、Control 群 (2 群) と比較して群間に差は認められなかった (Fig3-2)。

一方、投与後 4 週 (解剖前) の %FS 変化においては用量相関性が認められ、最小有効投与量は変化量 (差分) で有意差が認められた 1 mg/kg 投与であった (Fig3-3)。

3) 臓器重量体重比

心臓重量体重比 (HW/BW) は Sham 群 (1 群) で $8.3 \pm 0.5 \text{ g/kg}$ 、Control 群 (2 群) で $10.9 \pm 1.0 \text{ g/kg}$ であり、Control 群 (2 群) での病態に伴う心臓重量体重比の有意な増加 ($P < 0.01$ vs. Sham 群、1 群) に比べて 31% の増加) が観察された。被験物質の各投与群 (3 群~6 群) において心臓重量体重比は $10.0 \pm 0.6 \text{ g/kg} \sim 11.1 \pm 0.6 \text{ g/kg}$ を示し、Control 群 (2 群) と比較して有意な差は認められなかった。

肺臓重量体重比 (LUW/BW) は Sham 群 (1 群) で 9.5 ± 0.7 g/kg、Control 群 (2 群) で 16.0 ± 5.3 g/kg であり、Control 群 (2 群) での病態に伴う肺臓重量体重比の有意な増加 ($P < 0.05$ vs. Sham 群、1 群) に比べて 68% の増加が観察された。被験物質の各投与群 (3 群～6 群) において肺臓重量体重比は 11.4 ± 1.3 g/kg～ 15.5 ± 2.9 g/kg を示し、Control 群 (2 群) と比較して有意な差は認められなかった。

肝臓重量体重比 (LW/BW) は Sham 群 (1 群) で 24.7 ± 2.0 g/kg、Control 群 (2 群) で 37.2 ± 7.2 g/kg であり、Control 群 (2 群) での病態に伴う肝臓重量体重比の有意な増加 ($P < 0.01$ vs. Sham 群、1 群) に比べて 51% の増加が観察された。被験物質の各投与群 (3 群～6 群) において肝臓重量体重比は 34.7 ± 9.5 g/kg～ 39.5 ± 8.5 g/kg を示し、Control 群 (2 群) と比較して有意な差は認められなかった。

一方、腎臓重量体重比 (KW/BW) においては Sham 群 (1 群) で 4.6 ± 0.2 g/kg、Control 群 (2 群) で 4.6 ± 0.6 g/kg であり、Control 群 (2 群) での病態に伴う腎臓重量体重比に変化は認められなかった。被験物質の各投与群 (3 群～6 群) において腎臓重量体重比は 4.3 ± 0.6 g/kg～ 4.9 ± 0.2 g/kg を示し、Control 群 (2 群) と比較してほぼ同様の重量比であった。

4) 血中濃度測定

血中濃度変化を Fig 4 に示した。

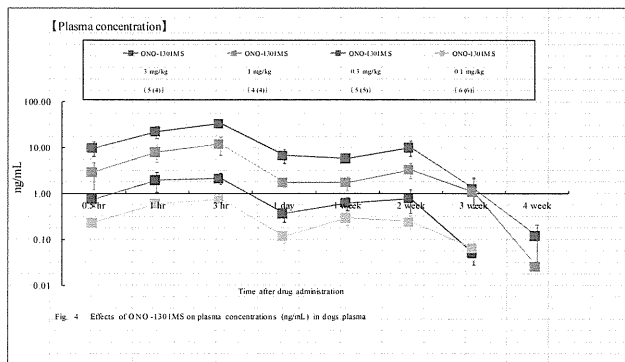


Fig. 4 Effects of ONO-1301MS on plasma concentrations (ng/mL) in drug plasma

ONO-1301MS 剤の単回心臓貼付において、3～4 週間まで用量相関的に持続的な血中動態を示した。3mg/kg 貼付における貼付 3 時間後での C_{max} は 33.4 ng/mL であり、最小有効投与量である 0.3 mg/kg 貼付における C_{max} は 2.2 ng/mL であった。

D. 考察

本試験では、イヌに高速心臓ペースング (拍動数: $220 \sim 236$ beats/min) を行うことにより誘発させた重症拡張型心筋症モデルを用い、病態発症後 (4 週間) における ONO-1301MS の単回心臓貼付投与による心機能改善効果及びリモデリング抑制効果について検討した。

今回作製した重症拡張型心筋症モデル (Control 群) において心エコー検査では、ペースング 4 週後で左室内腔の拡大 (左室拡張末期径及び左室収縮末期径の増大) とともに心室壁の非薄化 (心室中隔壁厚及び左室後壁拡張末期厚の減少) が認められ、心臓形態に関して球状を呈した。さ

らに機能面では左室収縮機能の低下 (EF 及び %FS の低下) が観察された。剖検により腹水・胸水の貯留、心拡大、肺うっ血・肺水腫、肝臓腫大 (暗褐色)、脾臓の委縮及び気管内に泡沫状の流出所見が散見された。以上の結果から今回作製した重症拡張型心筋症モデルは、ペースング惹起 4 週後で急激に心機能が悪化し、左室リモデリングが形成される拡張型心筋症の病態モデルであり、さらに 8 週間に亘る長期のペースングによってうっ血症状が観察される重症心不全状態を惹起したモデルであると考えられた。

このような病態モデルに対して、ONO-1301MS 投与群 (3、1、0.3 及び 0.1 mg/kg) における左室収縮機能 (LVEF) の変化量に対しては、 0.3 mg/kg の投与用量より有意な改善効果が認められた。

一方血中濃度においては、最小有効投与量である 0.3 mg/kg 貼付における貼付 3 時間後での C_{max} は 2.2 ng/mL であった。本 C_{max} 値は、ONO-1301 経口投与における第 I 相試験での無影響量である $C_{max}; 15.6$ ng/mL より低値であった。

以上の結果、ONO-1301MS は左室収縮機能不全に対して改善効果が認められ、最小有効投与量は 0.3 mg/kg であった。

現在、心臓病理評価、心臓組織中被験物質濃度測定及び RT-PCR 等の解析を実施中である。

E. 結論

重症拡張型心筋症患者へ補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として、ONO-1301MS (徐放性マイクロスフェア) 製剤を心臓貼付投与することを目的とした治療法の開発を検討を行った。イヌ高速ペースングモデルを用いて、ペースング 4 週間後に開胸し、ONO-1301MS (4 週間徐放性製剤) を 0.1 mg/kg～ 3 mg/kg にて単回心臓貼付投与した。投与 4 週間後 (ペースング 8 週間) に心機能 (LVEF 等) 評価した結果、最小有効投与量は 0.3 mg/kg であった。

本最小有効投与量は、別途同様の投与方法で実施したミニブタ陳旧性 (OMI) 心筋梗塞モデルにおける最小有効投与量と同じであった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 「A slow-releasing form of prostacyclin agonist (ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure.」

Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Nakatani S, Sakai Y, Daimon T, Okita Y, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Aug;146(2):413-21.

2) 「Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.」

Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y.
PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

3) 「Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.」

Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Dec;146(6):1516-25.

4) 「Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.」

Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2014 Mar;147(3):1081-7.

2. 学会発表

1) 「A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model」

Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa

AHA2013 (American Heart Association)
2013. 11. 16-20 Dallas, TX, USA

2) 「長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与方法の開発・効果に関する実験的検討」

溝口裕規、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、酒井 芳紀、今西悠基子、原田希摩、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田 宏一、澤 芳樹

第44回日本心臓血管外科学会 熊本 (2014. 2. 19-21)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他 該当なし

自然発症拡張型心筋症 J2N-k ハムスターモデルにおける反復経口投与および間歇皮下投与での薬効薬理試験（最小有効投与量の検索）

研究分担者 大阪大学大学院薬学研究科 特任助教 今西 悠基子
統計担当：兵庫医科大学医学部 准教授 大門 貴志

研究要旨

自然発症拡張型心筋症ハムスター（J2N-k）モデルに、20 週齢（病態発症後）から 28 週齢まで、8 週間被験物質を投与して、心機能悪化抑制および改善効果を検討した。

反復経口投与群として、正常（J2N-n）群、病態 Control（J2N-k）群、ONO-1301-3.0mg/kg 群、同-1.0mg/kg 群、同-0.3mg/kg 群、同-0.1mg/kg 群を設定した。また、ONO-1301MS の間歇皮下投与群（ONO-1301 として 10.0mg/kg～0.3mg/kg/4 週）を設定した。その結果、心エコーによる左室機能測定では、心不全の指標とされる LVEF（左室駆出率）値において、ONO-1301 経口投与群では、投与 2 週目から有意に悪化を抑制し、3.0mg/kg 投与群では改善効果が認められた。このことから ONO-1301 には、拡張型心筋症から心不全への悪化を抑制する作用があり、最低有効用量は 0.3mg/kg と 1.0mg/kg の間であることが示唆された。一方、間歇皮下投与である ONO-1301MS では、いずれも効果を見出すことはできなかった。

今回の自然発症拡張型心筋症（J2N-k）ハムスターモデルへの反復経口投与試験の結果は、すでに実施された血小板凝集抑制作用の 1/10 以下の投与量で有効性を示しているため、開発の可能性が示唆された。

最小有効投与量である 0.3 及び 1mg/kg 経口投与後の Cmax 濃度はいずれも 8.1 及び 30.1ng/ml 以下を示した。ONO-1301 経口投与第 I 相試験における血中濃度結果（軽度な副作用（下痢等）発現 Cmax 血中濃度；108.4ng/mL）から、本最小有効投与量は安全量であることが示唆された。

今後、心臓組織線維化面積や毛細血管数等の測定等を行い、評価を行う予定である。

A. 研究目的

心臓貼付投与は、重症心不全患者に対する侵襲が大きい
ため、軽症・中等症拡張型心筋症患者に対しては、より
早期から ONO-1301（原薬）を汎用性、経済性、安全性の
高い反復経口投与を行うことにより、心臓移植や人工心
臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命
予後改善治療法の開発は重要である。

今回、ONO-1301（原薬）を反復経口投与することにより、
心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避すること
を目的とした生命予後改善治療法の開発を目的として
検討を行った。

即ち、自然発症拡張型心筋症（J2N-k）ハムスターモデル
を用いて、20 週齢（病態発症）から 28 週齢まで 1 日 2
回 ONO-1301 を 0.1mg/kg～3mg/kg にて 8 週間反復経口
投与し、心機能（LVEF 等）改善における最小有効投与
量を設定することを目的として検討した。また、ONO-1301MS（徐
放性マイクロスフェア製剤）の間歇皮下投与についても
併せ検討した。

B. 研究方法

1. 試験材料及び方法

1.1 被験物質および媒体

1) 被験物質 1（ONO-1301）（小野薬品より入手）

・ロット番号：H5001

- ・性状：白色～微黄色の結晶性の粉末
- 2) 被験物質 2（ONO-1301MS）（小野薬品より入手）
 - ・ロット番号：Lot No. 121009-1（被験物質 1 の含有量；18%（重量比），平均粒子径；38.7 μm）
 - ・性状：白色の凍結乾燥微粒子（平均粒子径；38.7 μm）

3) 媒体

- ・被験物質 1（ONO-1301）：0.5 w/v %カルボシキルメチルセルロースナトリウム溶液（以下、CMC-Na）
原末名：カルボシキルメチルセルロースナトリウム（以下、CMC-Na）
- ・被験物質 2（ONO-1301MS）：0.2 w/v%ポリソルベート 80 含有 5 w/v%マンニトール溶液
原末名：ポリソルベート 80
マンニトール
- ・ロット番号：
CMC-Na : PEE2852
ポリソルベート 80 : 205359C
マンニトール : M759903

・供給源：

CMC-Na：和光純薬工業株式会社
ポリソルベート 80：日油株式会社
マンニトール：Merck Millipore(Merck KGaA)
注射用水：株式会社大塚製薬工場

1.2 投与液の調整方法

1) 被験物質 1（ONO-1301）：

ONO-1301 は必要量を採取し、メノウ乳鉢にて 0.5 w/v%CMC-Na を少量ずつ加えて懸濁・粉碎し、メスシリンダーを用いてメスアップし、0.6mg/mL 懸濁液を調製した。攪拌しながらその一部を分取して 0.2, 0.06 および 0.02mg/mL 懸濁液を調製した。調製後の混合液は、調製後遮光下冷蔵保存にて 48 時間使用可能とした。

2) 被験物質 2 (ONO-1301MS) :

本 Lot は、ONO-1301 の含有量が 18% である。ONO-1301MS は ONO-1301 を含量換算して必要量を秤取し、0.2 w/v%ポリソルベート 80 含有 5 w/v%マンニトール溶液を用いて、ボルテックス処理により十分に懸濁させ ONO-1301 として 2.0mg/mL 溶液を調製した

1.3 動物種

1) 系統; 雄性ハムスター

(1) 自然発症拡張型心筋症 J2N-k ハムスター

(2) 正常 J2N-n ハムスター

2) 供給源; 日本エスエルシー株式会社

3) 週齢及び体重範囲

(1) 入荷時: 18 週齢

(2) 入荷時体重範囲: 88.0~124.5 g

(3) 検疫馴化期間:

検疫: 7 日、馴化: 7 日以上

2. 実験方法

2.1 群構成

試験群	投与	動物数 (匹)
1 正常 (J2N-n)	被験物質 1 の媒体 (p.o.)	8
2 病態 Control (J2N-k)	被験物質 1 の媒体 (p.o.)	7
3 被験物質 1-3.0mg/kg	被験物質 1-0.6mg/mL×2 回/日 (p.o.)	6
4 被験物質 1-1.0mg/kg	被験物質 1-0.2mg/mL×2 回/日 (p.o.)	7
5 被験物質 1-0.3mg/kg	被験物質 1-0.06mg/mL×2 回/日 (p.o.)	7
6 被験物質 1-0.1mg/kg	被験物質 1-0.02mg/mL×2 回/日 (p.o.)	7
7 被験物質 2-10.0mg/kg	被験物質 2-2.0mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6
8 被験物質 2-3.0mg/kg	被験物質 2-0.6mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6
9 被験物質 2-1.0mg/kg	被験物質 2-0.2mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6
10 被験物質 2-0.3mg/kg	被験物質 2-0.06mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6

1) 群分け

入荷時に状態が悪い動物は認められなかったため、入荷ごとの動物を、検疫・馴化終了後に測定した心エコーデータ (LVEF) および最新体重値を基準として、できるだけ均等になるように群に振り分けた。その際に、LVEF が 55 以上の 2 例は試験から除外した。1 群 6 匹を各群に振り分け余剰動物は経口投与群に振り分けた。また 1 群 (正常: J2N-n) においては、異常動物はみられず、8 匹全例を使用した。

2) 投与経路

被験物質 1 (ONO-1301): 経口投与

被験物質 2 (ONO-1301MS): 皮下投与

3) 投与回数, 投与期間および選択理由

被験物質 1 (ONO-1301): 1 日 2 回, 56 日間反復経口投与した。1 日の投与間隔は 8~12 時間とした。剖検日 (57 日) についても 1 回のみ投与を実施した。

被験物質 2 (ONO-1301MS): 4 週間に 1 回 (合計 2 回) 皮下投与した。

2.2 心エコー検査

1) 測定時期

投与前 (群分け値), 投与 2, 4, 6 および 8 週後に実施した。

2) 左室機能の測定

超音波画像診断装置を用いて心エコーを測定した。麻酔下、胸部にリニアプローブ (12MHz) を当て M-mode で左室拡張末期径 (LVIDd), 左室収縮末期径 (LVIDs), 拡張末期左室前壁厚 (LVAWd=IVSTd), 拡張末期左室後壁厚 (LVPWd), 収縮末期左室後壁厚 (LVPWs) を測定し, 左室拡張末期容積 (LVEDV), 左室収縮末期容積 (LVESV), 左室内径短縮率 [LVFS= (LVIDd-LVIDs) × 100/LVIDd] および左室駆出率 [LVEF= (LVIDd3-LVIDs3) /LVIDd3] を算出した。

2.3 採血、剖検、臓器採取

1) 採血

群分け時 (被験物質投与前), 投与 4 週間後および 8 週後の心エコー終了後 (8 週後は解剖時) に EDTA-2Na 処理したシリンジを用いて 0.5mL 採血 (解剖時は全採血) し, 血漿を 0.2mL 以上採取した。得られた血漿は, 分注し, 測定まで超低温フリーザー (-80°C) で冷凍保存した。

また、血中濃度用として、以下を採血した。

(1) 経口投与群

初回投与 1 時間後, 投与 4 週後の 1 回目投与 1 時間後, 最終投与前並びに剖検時 (最終投与 1 時間) に EDTA-2Na 処理したシリンジを用いて採血し, 血漿を採取した。得られた血漿は, 分注し測定まで超低温フリーザー (-80°C) で冷凍保存した。

(2) 皮下投与群

初回投与 1 時間後, 投与 4 週後の投与 1 時間後; , 並びに解剖時に EDTA-2Na 処理したシリンジを用いて採血し, 血漿を採取した。得られた血漿は, 分注し測定まで超低温フリーザー (-80°C) で冷凍保存した

2) 剖検および臓器採取

(1) 8 週間の投与終了後の動物は, 体重測定後剖検した。心臓, 肺, 肝臓, 大動脈および腎臓を採取し重量を測定した。

(2) 臓器の処理

・心臓

写真撮影後, 横軸方向に, 心尖部から約 1/3 のところで切断した。切断面より上側は病理検査用として 10%中性緩衝ホルマリンに浸漬保存した。心尖側は, 縦に 3 分割し, 1 片は RT-PCR 測定用として保存した。即ち, RNALater (2mL) に浸漬させ冷蔵で一晩静置して, 翌日, RNALater を除去した後, 直ちに液体窒素で凍結させ超低温フリーザー (-80°C) に保存した。さらに 1 片は蛋白質測定用にハサミで細切した後, 液体窒素で凍結させ同様に凍結保存した。残りの 1 片は, ONO-1301 含有量測定用として, 直ちに液体窒素で凍結させ同様に凍結保存した。

・肺, 肝臓, 大動脈, 腎臓

肺の一葉, 肝臓の一葉, 大動脈および右腎臓を 10%中性緩衝ホルマリンに浸漬固定した。

3. 統計学的処理

1) 処理項目

血圧および心拍数. 心エコー (LVEF, LVFS, LVEDV, LVESV, LVIDd および LVIDs). 体重. 臓器重量. 生存率.

2) 処理方法

各試験群の代表値は, 平均値±標準誤差 (mean ±S.E.)

で表示した。正常群と病態 Control 群の比較には、F 検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定を、不等分散であった場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。病態 Control 群と各投与群の比較には、分散性の検定で等分散であった場合は、Dunnett の多重比較検定を行い、不等分散であった場合は、Steel の多重比較検定を行った。検定は両側検定とし、有意水準は5%とした。

解剖時の LVEF 比較にて、2 群（病態 Control）と経口投与群で検定を行い、各投与群における最小有効投与量を検索した。

3) 統計解析ソフト

SAS9.1.3 (EXSUS Version 7.7.1), SAS Institute Japan 株式会社 (株式会社シーエーシー) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

1. 一般状態

試験期間中に下表の動物が突然死した。前日までの一般状態に異常はみられなかった。

動物番号	103	202	301	903
死亡時期	投与 42 日	投与 53 日	投与 43 日	投与 56 日

投与開始日を 1 日として起算

各群に 1 匹のみ死亡しており、用量相関性もないため、被験物質の影響ではないと判断した。

2. 体重

体重の推移をエラー! 参照元が見つかりません。に示した。各群間に有意な差はみられなかった。

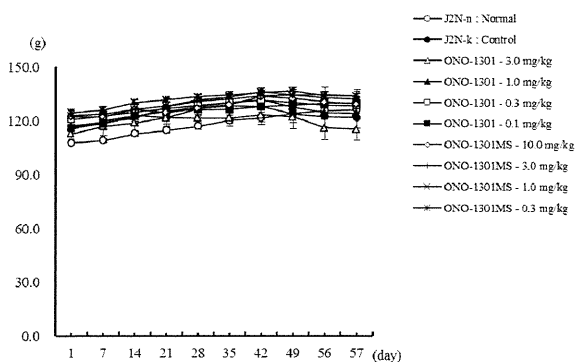


Figure 1 Effect of compound on body weight change in hamster
Each value represents the mean ± S.E.
No significant difference from J2N-k : Control group

3. 心機能検査 (心エコー)

1) LVEF (左室駆出率)

投与開始前、投与 2, 4, 6 および 8 週の LVEF 値は、正常 (J2N-n) 群では 88.2 ± 2.2 , 83.9 ± 1.8 , 84.4 ± 1.6 , 88.4 ± 0.9 および 85.1 ± 1.0 %, 病態 Control (J2N-k) 群では 42.3 ± 2.0 , 32.5 ± 1.3 , 28.7 ± 1.6 , 25.3 ± 1.6 および 26.3 ± 2.7 %, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 40.9 ± 2.3 , 48.5 ± 2.3 , 46.4 ± 2.0 , 45.6 ± 1.6 および 45.7 ± 2.9 %, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 42.8 ± 2.3 , 45.5 ± 4.1 , 44.6 ± 1.7 , 42.2 ± 2.9 および 42.0 ± 2.6 %, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 43.1 ± 2.2 , 39.2 ± 2.4 , 38.3 ± 2.2 , 35.6 ± 2.3 および 32.3 ± 1.0 %, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 42.8 ± 2.2 , 36.1 ± 2.7 , 34.8 ± 1.9 , 32.0 ± 2.2 および 30.3 ± 2.5 %, であり、病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な低値を示し、投与期間を通じて悪化していった。ONO-1301-3.0mg/kg 群の 2, 4, 6 および 8 週, 1.0mg/kg 群の 2, 4, 6 および 8 週ならびに 0.3mg/kg 群の 4 および 6 週は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な高値を示した (Fig 2、3)。

また、6 週後 (Fig 4) および 8 週後 (Fig 5) での経口投与群間での LVEF 比較を図示した。一方、ONO-1301MS は各群で変化は示さなかった。

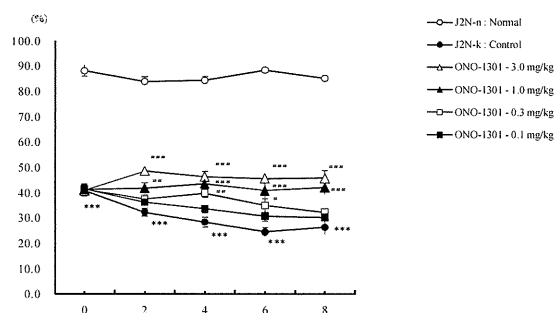


Fig 2 : 経口投与における LVEF の経時変化 (正常群を含む各群比較)

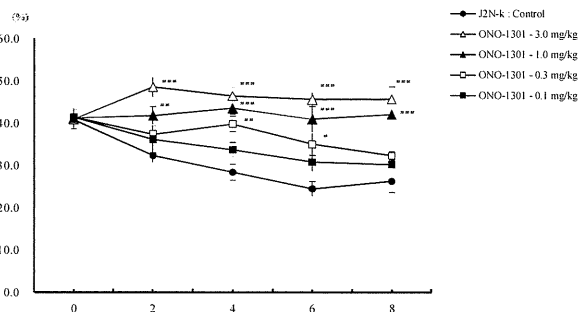


Fig 3 : 経口投与における LVEF の経時変化 (被験物質 1 投与群と対照群比較)

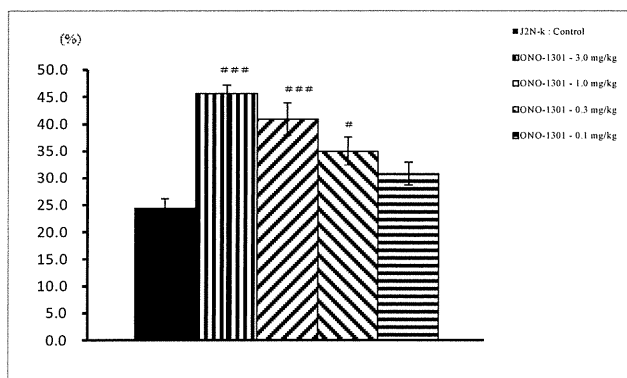


Fig 4 : 投与6週後における経口投与群間でのLVEF比較

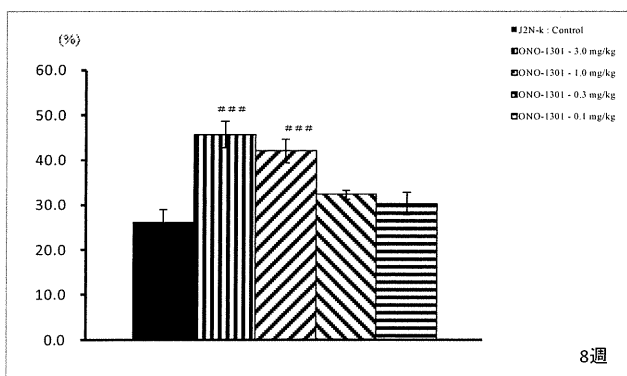


Fig 5 : 投与8週後における経口投与群間でのLVEF比較

2) FS (左室内径短縮率)

投与開始前, 投与2, 4, 6および8週のLVFS値は, 正常 (J2N-n) 群では 52.2 ± 2.6 , 46.0 ± 2.0 , 47.0 ± 2.0 , 51.9 ± 1.2 および 47.2 ± 1.3 %, 病態 Control (J2N-k) 群では 16.8 ± 1.0 , 12.3 ± 0.6 , 10.7 ± 0.7 , 9.3 ± 0.6 および 9.8 ± 1.1 %, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 16.2 ± 1.1 , 19.9 ± 1.2 , 18.8 ± 1.0 , 18.4 ± 0.8 および 18.6 ± 1.5 %, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 17.0 ± 1.1 , 18.7 ± 2.3 , 17.9 ± 0.8 , 16.9 ± 1.4 および 16.7 ± 1.2 %, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 17.2 ± 1.1 , 15.3 ± 1.1 , 15.0 ± 1.0 , 13.7 ± 1.0 および 12.2 ± 0.4 %, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 17.1 ± 1.1 , 14.0 ± 1.2 , 13.3 ± 0.8 , 12.1 ± 0.9 および 11.4 ± 1.1 %, であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な低値を示し, 投与期間を通じて悪化していった. ONO-1301-3.0mg/kg 群の2, 4, 6 および 8 週, 1.0mg/kg 群の2, 4, 6 および 8 週ならびに 0.3mg/kg 群の4 および 6 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な高値を示した (Fig 6, 7). 一方, ONO-1301MS は各群で変化は示さなかった。

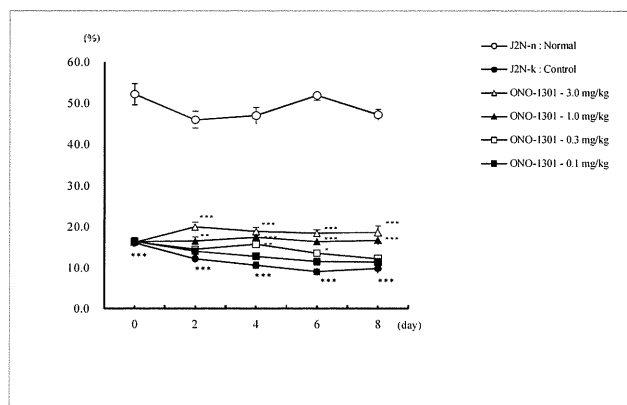


Fig 6 : 経口投与におけるLVFSの経時変化 (正常群を含む各群比較)

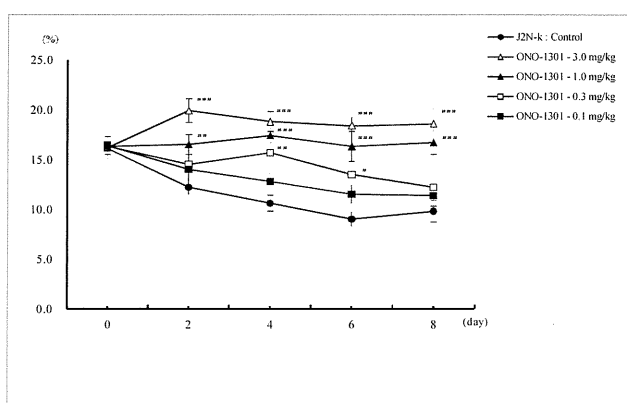


Fig 7 : 経口投与におけるLVFSの経時変化 (被験物質1投与群と対照群比較)

3) LVEDV (左室拡張末期容積)

投与開始前, 投与2, 4, 6 および 8 週の LVEDV 値は, 正常 (J2N-n) 群では 39.1 ± 3.5 , 77.1 ± 5.9 , 61.8 ± 6.5 , 69.1 ± 4.2 および 81.4 ± 3.5 μ L, 病態 Control (J2N-k) 群では 221.0 ± 21.1 , 231.0 ± 21.2 , 281.9 ± 29.2 , 316.5 ± 29.7 および 317.3 ± 21.0 μ L, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 227.5 ± 32.2 , 139.0 ± 19.9 , 182.8 ± 17.8 , 183.0 ± 23.4 および 233.4 ± 37.1 μ L, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 162.9 ± 15.2 , 166.7 ± 21.7 , 154.9 ± 22.0 , 235.7 ± 26.6 および 223.5 ± 43.9 μ L, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 205.4 ± 27.0 , 179.4 ± 22.3 , 199.1 ± 14.1 , 242.1 ± 24.6 および 285.4 ± 21.6 μ L, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 175.6 ± 18.4 , 191.9 ± 23.3 , 199.0 ± 20.3 , 277.4 ± 22.5 および 301.0 ± 30.3 % であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった. ONO-1301-3.0mg/kg 群の6 週および 1.0mg/kg 群の4 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した。

4) LVESV (左室収縮末期容積)

投与開始前, 投与2, 4, 6 および 8 週の LVESV 値は, 正常 (J2N-n) 群では 5.1 ± 1.6 , 12.6 ± 1.8 , 10.3 ± 2.3 , 8.0 ± 0.8 および 12.0 ± 0.8 μ L, 病態 Control (J2N-k) 群では 128.0 ± 12.8 , 157.0 ± 16.4 , 201.3 ± 22.9 ,

237.3±24.7および236.0±22.6 μL, ONO-1301-3.0mg/kg 群では136.8±23.8, 73.5±13.1, 98.5±11.6, 100.5±14.5および129.0±24.8 μL, ONO-1301-1.0mg/kg 群では93.0±9.4, 95.0±17.5, 86.6±13.0, 136.6±16.7 および132.0±27.2 μL, ONO-1301-0.3mg/kg 群では119.4±18.5, 109.9±15.0, 123.9±12.1, 158.4±20.0 および193.6±16.2 μL, ONO-1301-0.1mg/kg 群では102.4±13.6, 124.7±17.9, 130.3±15.4, 190.6±19.1 および211.3±22.7%であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった. ONO-1301-3.0mg/kg 群の2, 4, 6 および8週, 1.0mg/kg 群の4, 6 および8週ならびに0.3mg/kg 群の4 および6週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した.

5) LVIDd (左室拡張末期径)

投与開始前, 投与2, 4, 6 および8週のLVIDd値は, 正常 (J2N-n) 群では3.37±0.09, 4.24±0.10, 3.93±0.12, 4.09±0.09 および4.32±0.06 mm, 病態 Control (J2N-k) 群では6.01±0.19, 6.10±0.19, 6.51±0.22, 6.78±0.22 および6.81±0.15 mm, ONO-1301-3.0mg/kg 群では6.04±0.28, 5.12±0.25, 5.64±0.20, 5.62±0.25 および6.08±0.34 mm, ONO-1301-1.0mg/kg 群では5.43±0.17, 5.44±0.24, 5.30±0.24, 6.11±0.26 および5.94±0.39 mm, ONO-1301-0.3mg/kg 群では5.83±0.26, 5.59±0.22, 5.82±0.14, 6.18±0.23 および6.56±0.17 mm, ONO-1301-0.1mg/kg 群では5.55±0.21, 5.71±0.23, 5.80±0.20, 6.49±0.19 および6.64±0.27 mmであり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった. ONO-1301-3.0mg/kg 群の6週および1.0mg/kg 群の4週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した.

6) LVIDs (左室収縮末期径)

投与開始前, 投与2, 4, 6 および8週のLVIDs値は, 正常 (J2N-n) 群では1.63±0.14, 2.30±0.11, 2.10±0.14, 1.97±0.07 および2.28±0.05 mm, 病態 Control (J2N-k) 群では5.00±0.18, 5.36±0.19, 5.82±0.20, 6.15±0.22 および6.15±0.20 mm, ONO-1301-3.0mg/kg 群では5.07±0.28, 4.12±0.25, 4.59±0.18, 4.60±0.23 および4.96±0.33 mm, ONO-1301-1.0mg/kg 群では4.50±0.15, 4.45±0.29, 4.36±0.22, 5.08±0.24 および4.96±0.36 mm, ONO-1301-0.3mg/kg 群では4.84±0.26, 4.73±0.21, 4.95±0.16, 5.34±0.25 および5.76±0.16 mm, ONO-1301-0.1mg/kg 群では4.61±0.23, 4.92±0.25, 5.02±0.19, 5.71±0.21 および5.89±0.26 mm, であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった. ONO-1301-3.0mg/kg 群の2, 4, 6 および8週の値, 1.0mg/kg 群の4, 6 および8週の値ならびに0.3mg/kg 群の4週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した.

これらはいずれも ONO-1301 経口投与群 (3~6群) で効果を示したが, ONO-1301MS 皮下投与群 (7~10群) では効果を示さなかった.

4. 血中濃度および心臓組織濃度

ONO-1301 経口投与における血中動態を Fig 8 に示した.

これらはいずれも用量相関的な変化を示し, 最小有効投与量である0.3及び1mg/kg 経口投与1時間後のCmax濃度はいずれも8.1及び30.1ng/ml以下を示した. また, 最終投与前の血中濃度は0.07及び0.2ng/mlであり, 蓄積効果は認められなかった.

尚, NO-1301 経口投与第I相試験における血中濃度結果 (軽度な副作用 (下痢等) 発現Cmax血中濃度; 108.4ng/ml) から, 本最小有効投与量は安全量であることが示唆された.

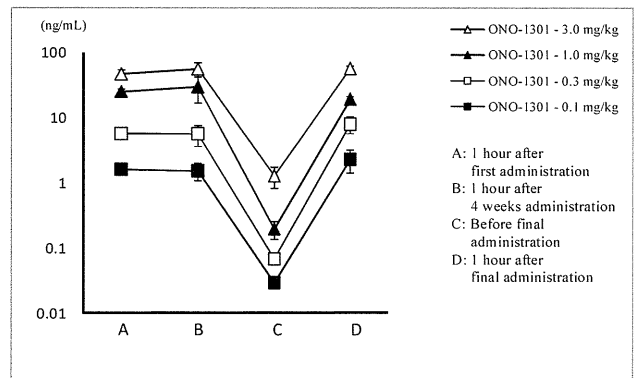


Fig 8 : 経口投与における ONO-1301 血中動態

経口投与群の解剖時における心臓組織中濃度を測定した (Fig 9). その結果, 血中濃度と同様に用量相関的に心臓組織中濃度を認めたが, いずれも1ng/ml以下であり, 組織蓄積性は認められなかった.

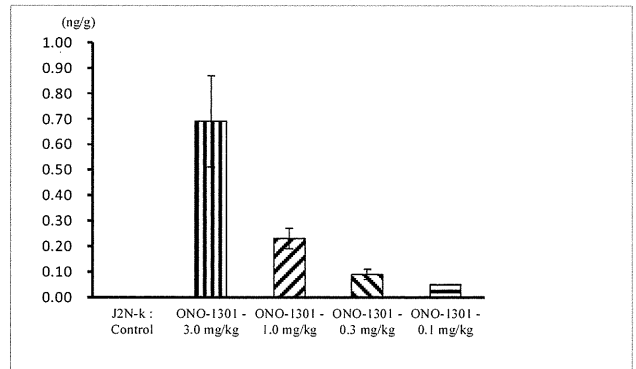


Fig 9 : 経口投与における心臓組織中 ONO-1301 濃度

D. 考察

ハムスター (自然発症拡張型心筋症 J2N-k モデル) に20週齢から28週齢まで, 8週間被験物質を投与して, 心機能悪化抑制および改善効果を検討した.

正常 (J2N-n) 群, 病態 Control (J2N-k) 群, ONO-1301-3.0mg/kg 群, 同-1.0mg/kg 群, 同-0.3mg/kg 群, 同-0.1mg/kg 群, 及び ONO-1301MS-10.0mg/kg 群, 同-3.0mg/kg 群, 同-1.0mg/kg 群および同-0.3mg/kg 群の10群を置いて検討した.

正常 (J2N-n) 群および病態 Control (J2N-k) 群は媒体を, ONO-1301 群はそれぞれ1日2回56日間連続経口投与した. また, ONO-1301MS 各群は ONO-1301MS を4週間に1回 (合計2回) 皮下投与を行った.

その結果, 心エコーによる左室機能測定では, 心不全の

指標とされる LVEF (左室駆出率) 値において, ONO-1301 投与群では, 投与 2 週目から有意に悪化を抑制し, 3.0mg/kg 投与群では改善作用が認められた. このことから ONO-1301 には, 拡張型心筋症から心不全への悪化を抑制する作用があり, 最低有効用量は 0.3mg/kg と 1.0mg/kg の間であることが示唆された.

尚, ONO-1301MS 間歇皮下投与では, 効果を見出すことはできなかった.

E. 結論

軽症・中等症拡張型心筋症患者に ONO-1301 (原薬) を反復経口投与することにより, 心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり, 回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発を目的として検討を行った.

自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルを用いて, 20 週齢 (病態発症) から 28 週齢まで 1 日 2 回 ONO-1301 を 0.1mg/kg ~ 3 mg/kg にて 8 週間反復経口投与した結果, 心機能 (LVEF 等) 改善における最小有効投与量は 0.3~1mg/kg であった.

ONO-1301 経口投与第 I 相試験結果における血中濃度測定結果から, 本最小有効投与量は安全量であることが示唆された.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 「Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.」

Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y.

PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

2. 学会発表

1) 「A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model」

Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa

AHA2013 (American Heart Association)

2013. 11. 16-20 Dallas, TX, USA

2) 「長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与法の開発・効果に関する実験的検討」

溝口裕規、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、酒井 芳紀、今西悠基子、原田希摩、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田 宏一、澤 芳樹

第 4 4 回日本心臓血管外科学会 熊本 (2014. 2. 19-21)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
該当なし