

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)）
分担研究報告書(平成 26 年度)

研究分担者 大阪大学医学系研究科 齋藤 充弘、宮川 繁
兵庫医科大学（統計担当） 大門 貴志

課題名：YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における追加非臨床試験の実施
ラット 13 週間皮下投与毒性試験、
ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験

研究要旨

YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における臨床試験開始における追加非臨床（毒性）試験項目とその内容を PMDA 対面助言にて確認し、以下 2 試験を実施した。

（1）ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び（2）ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。その結果、試験（1）での無毒性量は最大投与量である 30mg/kg 以上、試験（2）での無毒性量は投与可能な最大投与量である 10mg/kg 以上であった。

A．研究目的

- ・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験
YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における臨床試験開始における追加非臨床試験項目とその内容を PMDA 対面助言にて確認し、以下 2 試験を実施した。
（1）ラット 13 週間皮下投与毒性試験、
（2）ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。

B．研究方法

- ・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験
（1）ラット 13 週間皮下投与毒性試験 (GLP)
YS-1402/ONO-1301MS（マイクロスフェア製剤）のラット本試験に先立って実施した予備試験において、YS-1402/ONO-1301MS を CrI:CD (SD) 系ラットに 30 mg/kg (ONO-1301 量として) の投与量で 1 週間に 1 回あるいは 2 週間に 1 回の頻度で 4 週間間歇皮下投与したところ、重度な毒性は認められず、被験物質による皮下刺激性も認められなかった。30 mg/kg (1 回/2 週) 投与時の ONO-1301 の血漿中曝露量は、ミニブタ心臓貼付薬効薬理試験で有効性を示した 0.3 mg/kg に比べて C_{max} で約 120 倍、AUC_{672h} で約 30 倍であった。本結果を踏まえて、13 週間間歇投与毒性試験（本試験）を実施した。

ONO-1301MSラット13週間間歇皮下投与毒性試験

【試験デザイン】 本試験

- ▶ 試験系：SDラット(6週齢, 雌雄各10匹/群+TK群雌雄各3匹/群)
- ▶ 群構成：ONO-1301MS 3, 10, 30 mg/kg (ONO-1301量以外表記)
媒体対照群(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)
- ▶ 投与液：ONO-1301 2, 6.67, 20 mg/mL
- ▶ 投与容量: 1.5 mL/kg
- ▶ 投与期間: 13週間(4週間に1回, 計3回)
- ▶ 投与方法: 4週間に1回皮下投与(1回毎に部位を変えて)
- ▶ 評価項目: 一般状態, 体重, 摂餌量, 眼科学的検査, 尿検査, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 剖検, 病理組織学的検査, TK測定

YS-1402/ONO-1301MS を CrI:CD (SD) 系ラット (6 週齢、雌雄各 10 匹 / 群) の背部に、3、10 及び 30 mg/kg (ONO-1301 量として) の投与量で 4 週間に 1 回 (計 3 回) の頻度で 13 週間間歇皮下投与した。対照群には媒体 (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) を投与した。投与容量は 1.5 mL/kg とした。背部の 3 領域を投与部位として設定し、投与日毎に異なる投与部位に投与した。また、本薬による曝露量を評価するために、雌雄各 3 匹 / 群のサテライト群を TK 測定群として設け、血漿中 ONO-1301 濃度を測定した。

（2）ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。

本試験に先立って実施した予備試験において、YS-1402/ONO-1301MS を 10 mg/kg の投与量でミニ

ブタの心臓に単回貼付投与することにより、対照群共に自発運動の減少、摂餌量及び体重の減少が認められたが、重篤な毒性は認められなかった。よって、本試験における最高用量は、心臓貼付投与可能な最大投与量であり、有効投与量(0.3mg/kg)の約30倍である10mg/kgが妥当と考えた。雌での検討については、最高用量である10mg/kgのみを設定した。評価時期については、最も第1/a相試験の最高用量に近い1mg/kgを投与したときに原薬が心臓組織中から認められなくなることが想定される時期として6週間を設定し、長期毒性評価として13週間も設定した。

ONO-1301MSミニブタ単回心臓貼付投与6週間及び13週間毒性試験

【試験デザイン】 本試験

- > 試験系 : ゲッチンゲン系ミニブタ(雌雄各3匹/群)
- > 群構成 : ONO-1301MS 1, 3, 10 mg/kg (ONO-1301量として表記)
媒体対照群(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)
- > 投与液 : ONO-1301 10, 30, 100 mg/mL
- > 投与容量: 0.1 mL/kg
- > 投与期間: 6週間及び13週間(雌は6週間のみ)
- > 投与方法: 単回心臓貼付投与
- > 評価項目: 一般状態, 体重, 摂餌量, 眼科学的検査, 血圧・心電図検査, 尿検査, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 剖検, 病理組織学的検査, TK測定, 心臓組織中濃度測定(別試験にて測定)

ONO-1301MSミニブタ単回心臓貼付投与6週間及び13週間毒性試験

【群構成の詳細】

群	投与量	解剖時期 ¹⁾	雄	雌
1	0 mg/kg(媒体対照)	6週	3例	3例
2	1 mg/kg	6週	3例	—
3	3 mg/kg	6週	3例	—
4 ²⁾	10 mg/kg	6週	3例	3例
5 ³⁾	10 mg/kg	13週	3例	—

1) 原薬(1 mg/kg)が心臓組織から検出されなくなるまで(6週間) 消失するまで(13週間)
2) 長期毒性の検証
3) 長期毒性の検証

【検査スケジュール】

項目	検査日	投与後(日)																
		1	3	7	11	21	28	35	41	42	49	56	63	70	77	84	90	91
一般状態	Rs, 12.4, 9h																	
体重	Rs	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
摂餌量	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血圧・心電図	Rs, 12.4, 9h	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	Rs	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液生化学的検査	Rs	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
TK測定	Rs, 12.4, 9h	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
心臓組織中濃度測定(別試験)	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

イソフルラン麻酔を施したGöttingen系ミニブタ(9~10カ月齢、各3匹/群)を開胸後、心嚢膜を切開して心臓を露出させ、左心室壁にゼラチンスポンジ(ゼルフォーム®、ファイザ―株式会社)を貼付した。そこにYS-1402/ONO-1301MSを1, 3, 10 mg/kg(ONO-1301量として)の投与量で染み込ませるように投与した。対照群には媒体(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)を投与した。投与容量は0.1 mL/kgとした。投与後、ゼラチンスポンジ及びその周辺部位に生理的組織接着剤(ペリプラスト®P コンピセット接着剤、CSLベ-リング株式会社)を噴霧し、閉胸した。6週間観察群として対照群

(雌雄)、1及び3 mg/kg群(雄)、10 mg/kg群(雌雄)を設定し、13週間観察群として10 mg/kg群(雄)を設定した。また、本薬による曝露量を評価するために、血漿中ONO-1301濃度を測定した。加えて、各動物の器官重量測定後に心筋の一部を3カ所(左心室壁の投与部位、右心室壁、中隔)から採取し、心臓組織中ONO-1301濃度も測定した。

(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

・YS-1402/ONO-1301MS心臓貼付投与追加非臨床試験(1)ラット13週間皮下投与毒性試験

一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、いずれの投与群でも被験物質投与に起因した変化は認められず、死亡例も認められなかった。

剖検では、30 mg/kgの雌雄で投与後5週間経過した投与部位(3回目投与)に被験物質と推定される白色残留物が認められた。

病理組織学的検査では、3 mg/kg以上の雌雄の投与後5週間経過した投与部位(3回目投与)に肉芽組織が認められた。また、リンパ球細胞浸潤が3 mg/kg以上の雄及び10 mg/kg以上の雌で、線維化が30 mg/kgの雌雄で認められた。これらの変化は異物(投与物)に対する除去反応と考えられ、被験物質の刺激性を示唆する所見は認められなかった。投与後9週間経過した投与部位(2回目投与)では線維化は認められず、他の変化も軽減していた。また、投与後13週間経過した投与部位(初回投与)では変化は認められなかった。その他の毒性変化は認められなかった。

ONO-1301MSラット13週間皮下投与毒性試験

【試験結果】

項目	結果
死亡/処置例	雌雄共になし
一般状態	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
体重	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
摂餌量	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
眼科学的検査	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
血液学的検査	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
血液生化学的検査	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
器官重量	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
剖検	雌雄共に30 mg/kgで投与部位に白色残留物(被験物質と推定)
病理組織学的検査	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する毒性変化なし。 (投与部位における異物と反応のみ)
TK測定	3 mg/kg ^{a)} 10 mg/kg ^{a)} 30 mg/kg ^{a)} 3 mg/kg ^{b)} 10 mg/kg ^{b)} 30 mg/kg ^{b)}
C _{max} (ng/mL)	29.7±6.2 122±13 314±81 16.8±3.9 732±11.8 196±6
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	6670±2170 28500±3200 123000±20000 3030±380 14000±3800 65700±6300

血漿中 ONO-1301 濃度の各群における薬物動態パラメータを表に示した。

表ラットに ONO-1301MS を 13 週間反復経口投与した時の薬物動態パラメータ

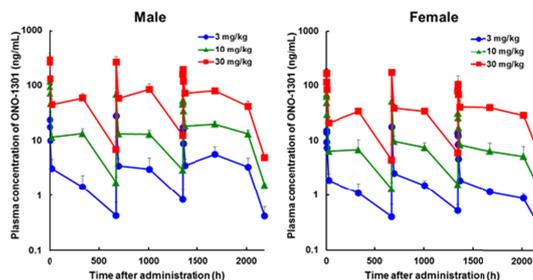
投与量 (mg/kg/回)	雄			雌		
	AUC _{2184h} (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC _{24h} (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)
3	6670	29.7	450	3090	18.8	675
10	28500	122	1.67	14000	73.2	1.67
30	123000	314	225	65700	196	226

データは 3 例の平均値として表した。

雌雄共に投与量の増加に伴って Cmax 及び AUC_{2184h} は増加した。初回投与後の血漿中濃度は、投与後 1~4 時間をピークに減少したが、投与後 672 時間(28 日)でも持続的な暴露が確認された。また、2 回目及び 3 回目投与後においても同様の血漿中濃度推移を示し、明らかな性差や反復投与による蓄積性は認められなかった。

ONO-1301MSラット13週間間歇皮下投与毒性試験

【血漿中濃度推移】



(2) ミニプタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。

死亡及び切迫剖検例は認められなかった。一般状態観察において、対照群を含む雌雄すべての群で投与日に鎮静及び自発運動減少が認められ、自発運動減少は投与後 3 日まで認められたが、その後これらの所見は回復した。体重測定及び摂餌量測定において、対照群を含む雌雄すべての群で投与後に一過性に減少が認められたが、投与後 7 日には回復した。

眼科学的検査、尿検査、血圧・心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、いずれの投与群でも被験物質投与に起因した変化は認められなかった。剖検では、対照群を含む雌雄すべての 6 週間観察群で、心嚢と心臓壁あるいは胸壁の癒着が認められ、心臓壁と胸壁の癒着、投与検体様物質あるいは心嚢の心臓壁への付着が認められた例もあった。13 週間観察群でも 6 週間観察群と同様の癒着が認められたが、投与検体様物質あるいは心嚢の心臓壁への付着は認められなかった。

病理組織学的検査では、対照群を含む雌雄すべての 6 週間観察群で心臓の心膜にごく軽度から軽度の肉芽組織あるいは異物性肉芽腫が認められたが、これらはゼラチンスポンジや生理的組織接着剤あるいは心臓貼付投与のために切開した心嚢膜が心臓と癒着する過程で異物に対する除去反応として形成されたものと考えられた。また、被験物質の刺激性を示唆する所見は認められず、ONO-1301MS の影響は認められなかった。

血漿中 ONO-1301 濃度測定の結果における薬物動態パラメータを表に示した。

表ミニプタに ONO-1301MS を単回心臓貼付投与した時の薬物動態パラメータ

観察群	性別	投与量 (mg/kg)	AUC _{1008h}	AUC _{2184h}	Cmax	Tmax
			(ng·h/mL)	(ng·h/mL)	(ng/mL)	(h)
6 週間	雄	1	2580 ± 300	N.A.	9.02 ± 2.51	115 ± 92
		3	6660 ± 1330	N.A.	21.1 ± 7.0	5.33 ± 2.31
		10	27500 ± 3500	N.A.	95.8 ± 22.7	115 ± 192
13 週間	雄	10	24500 ± 11200	N.A.	89.5 ± 78.8	224 ± 97
		10	19900 ± 9600	20300 ± 9700	61.8 ± 18.5	113 ± 95

データは 3 例の平均値 ± 標準偏差として表した。N.A.: 適用なし

雄において投与量の増加に伴って Cmax 及び AUC_{1008h} は増加した。いずれの投与群においても、概ね投与後 336 時間(14 日)まで持続的な暴露が認められ、その後減少し、投与後 1008 時間(42 日)にはわずかに検出された程度であった。全身曝露量及び血漿中濃度推移に明らかな雌雄差は認められなかった。また、13 週間観察群の AUC_{1008h} 及び AUC_{2184h} は同様の値を示していたことから、ONO-1301 の放出は 6 週間までに概ね完了しているものと推察された。

心臓組織中 ONO-1301 濃度測定の結果は、6 週間観察群の 1 mg/kg では、すべての例で定量限界(0.0600 ng/g tissue)未満であった。3 mg/kg では、1 例で定量限界未満であり、他の 2 例でも中隔及び右心室にわずかに検出された程度であった。10 mg/kg では、比較的高い濃度(7.23 ~ 89.5 ng/g tissue)が検出された雄 1 例を除き、雌雄各 2 例で定量限界未満であり、他の雌 1 例もわずかに検出された程度であった。13 週間観察群の 10 mg/kg では、2 例で定量限界未満であり、他の 1 例も左心室にわずかに検出された程度であった。

D. 考察

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験

(1) ラット 13 週間間歇皮下投与毒性試験では、無毒性量は雌雄とも最大投与量である 30 mg/kg 以上であった。

また、(2) ミニプタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験では、無毒性量は雌雄とも投与可能な最大量である 10 mg/kg 以上であり、被験物質

(ONO-1301)に伴う局所刺激性及び全身での副作用(降圧作用等)は認められなかった。

E. 結論

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験
(1)ラット 13 週間皮下投与毒性試験では、無毒性量は雌雄とも最大投与量である 30 mg/kg 以上であり、(2)ミニプタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験では、無毒性量は雌雄とも投与可能な最大量である 10 mg/kg 以上であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)「A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart」

Satsuki Fukushima · Shigeru Miyagawa · Yoshiki

Sakai · Yoshiki Sawa. Heart Fail Rev

DOI:10.1007/s10741-015-9477-8(2015)

2. 学会発表

該当なし

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