

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 25 年～26 年）

研究分担者 大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センター 今西 悠基子  
大阪大学大学院医学系研究科 宮川 繁  
兵庫医科大学（統計担当） 大門 貴志

課題：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  
YS-1402/ONO-1301MS 間歇皮下投与での薬効薬理試験（最小有効投与量の検索）  
及び、ONO-1301 経口投与におけるラット肝中期発がん性試験（伊東法）

#### 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。

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、YS-1402/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 経口投与には，早期治療介入により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 1 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。

また，ONO-1301 は血管新生効果を有するため，癌細胞に対してプロモーション作用を有することが危惧される。ONO-1301 反復経口投与における発がんに対するプロモーション作用、及びイニシエーション作用を確認するために、ラット肝中期発がん性試験（伊東法）を実施した結果、共に陰性であった。

#### A．研究目的

・ONO-1301 反復経口投与における J2N-k ハムスター心機能への影響（最小有効投与量の設定）

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早期治療介入による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～3 mg/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。

一方、ONO-1301 の治療効果は HGF や VEGF 等の産生誘導による血管新生作用であることが、抗 HGF 中和

抗体の実験から示唆されている。よって、ONO-1301 反復経口投与における発がんに対するプロモーション作用の有無について、ラット肝中期発がん性試験（伊東法）にて検討する。

## 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 (YS-1402/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 (YS-1402/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 (YS-1402/ONO-1301MS)：

本 Lot は，ONO-1301 の含有量が 18% である。

YS-1402/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。用事調製した。

### 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分けを行った。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 (YS-1402/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 (YS-1402/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; 20週齢), 投与4週間後および8週間後(28週齢)の心エコー終了後に 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)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)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)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)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。

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

### 3) 統計解析ソフト

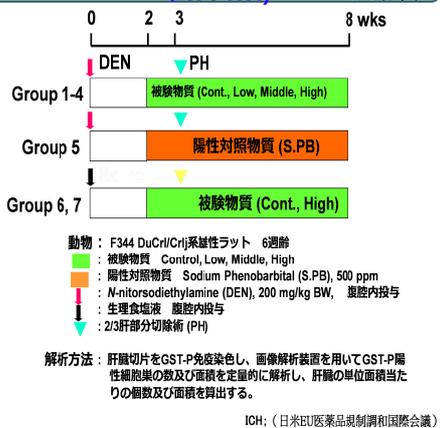
SAS9.1.3 (EXSUS Version 7.7.1), SAS Institute Japan 株式会社(株式会社シーエーシー)を用いて行った。

#### ・ONO-1301 のラット肝中期発がん性試験

ONO-1301 は線維芽細胞等から HGF, VEGF, SDF-1, HMGB1 等を産生促進することにより, 血管新生促進作用を有することが確認されている。よって, ラット肝中期発がん性試験を用いて, 癌に対するプロモーション作用及びイニシエーション作用の有無を検討した。

F344/DuCrI CrIj 雄性ラットに Diethylnitrosamine (DEN)を 200 mg/kg の用量で 1 回腹腔内投与し, その 2 週間後より被験物質である ONO-1301 を 0 (溶媒), 3 及び 10 mg/kg/day の用量で 6 週間, 1 日 1 回強制経口投与した。被験物質投与開始 1 週間には全動物に対し, 2/3 肝部分切除術を実施した。実験開始 8 週後に全生存動物を屠殺剖検し, 肝臓を免疫組織化学的にポリマー法にて胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P)染色を実施し, 画像解析装置を用いて肝臓の単位面積に対する GST-P 陽性細胞巢の発生個数及び面積を定量的に解析した。

**肝中期発がん性試験法**  
**Medium-term Liver Carcinogenesis Bioassay**  
**(Ito's test)** ICHガイドライン



**(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。

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。

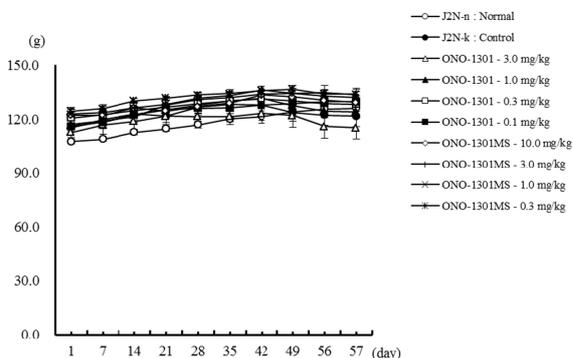


Figure 1 Effect of compound on body weight change in hamster  
 Each value represents the mean ± S.E.  
 No significant difference from J2N-k : Control group

**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  $88.2 \pm 2.2$ ,  $83.9 \pm 1.8$ ,  $84.4 \pm 1.6$ ,  $88.4 \pm 0.9$  および  $85.1 \pm 1.0$  % 病態 Control (J2N-k) 群では  $42.3 \pm 2.0$ ,  $32.5 \pm 1.3$ ,  $28.7 \pm 1.6$ ,  $25.3 \pm 1.6$  および  $26.3 \pm 2.7$  %, ONO-1301-3.0mg/kg 群では  $40.9 \pm 2.3$ ,  $48.5 \pm 2.3$ ,  $46.4 \pm 2.0$ ,  $45.6 \pm 1.6$  および  $45.7 \pm 2.9$  %, ONO-1301-1.0mg/kg 群では  $42.8 \pm 2.3$ ,  $45.5 \pm 4.1$ ,  $44.6 \pm 1.7$ ,  $42.2 \pm 2.9$  および  $42.0 \pm 2.6$  %, ONO-1301-0.3mg/kg 群では  $43.1 \pm 2.2$ ,  $39.2 \pm 2.4$ ,  $38.3 \pm 2.2$ ,  $35.6 \pm 2.3$  および  $32.3 \pm 1.0$  %, ONO-1301-0.1mg/kg 群では  $42.8 \pm 2.2$ ,  $36.1 \pm 2.7$ ,  $34.8 \pm 1.9$ ,  $32.0 \pm 2.2$  および  $30.3 \pm 2.5$  %, 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週の値は病態 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) での経口投与と群間での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。

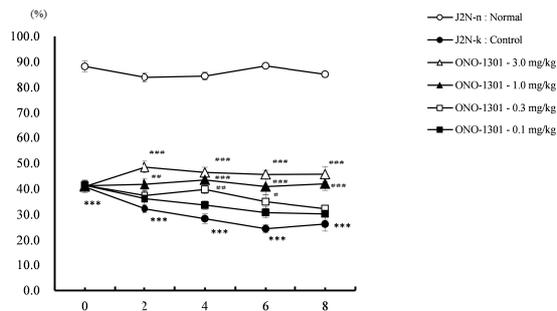


Fig 2 : 経口投与におけるLVEFの経時変化 (正常群を含む各群比較)

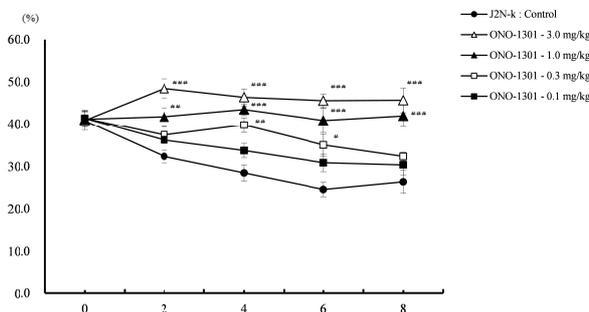


Fig 3 : 経口投与における LVEF の経時変化 ( 被験物質 1 投与群と対照群比較 )

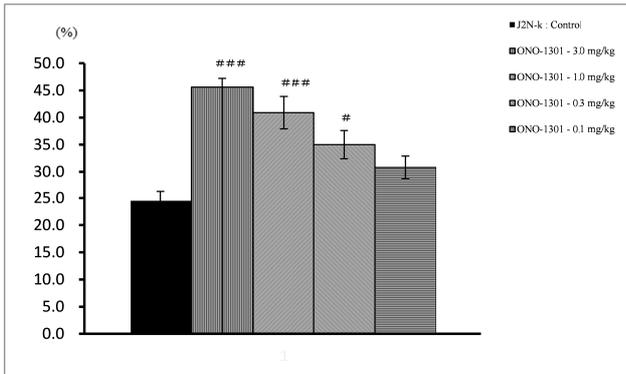


Fig 4 : 投与 6 週後における経口投与群間での LVEF 比較

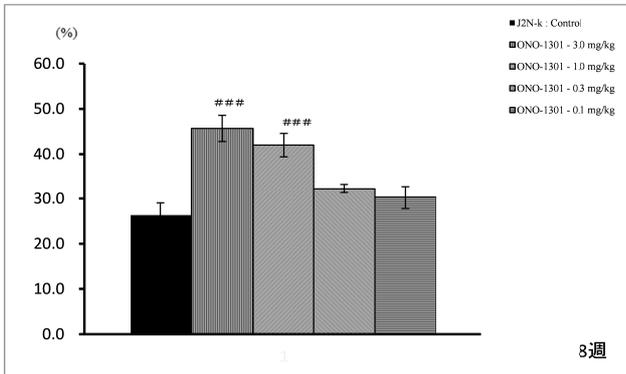


Fig 5 : 投与 8 週後における経口投与群間での LVEF 比較

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  $52.2 \pm 2.6, 46.0 \pm 2.0, 47.0 \pm 2.0, 51.9 \pm 1.2$  および  $47.2 \pm 1.3\%$ , 病態 Control (J2N-k) 群では  $16.8 \pm 1.0, 12.3 \pm 0.6, 10.7 \pm 0.7, 9.3 \pm 0.6$  および  $9.8 \pm 1.1\%$ , ONO-1301-3.0mg/kg 群では  $16.2 \pm 1.1, 19.9 \pm 1.2, 18.8 \pm 1.0, 18.4 \pm 0.8$  および  $18.6 \pm 1.5\%$ , ONO-1301-1.0mg/kg 群では  $17.0 \pm 1.1, 18.7 \pm 2.3, 17.9 \pm 0.8, 16.9 \pm 1.4$  および  $16.7 \pm 1.2\%$ , ONO-1301-0.3mg/kg 群では  $17.2 \pm 1.1, 15.3 \pm 1.1, 15.0 \pm 1.0, 13.7 \pm 1.0$  および  $12.2 \pm 0.4\%$ , ONO-1301-0.1mg/kg 群では  $17.1 \pm 1.1, 14.0 \pm 1.2, 13.3 \pm 0.8, 12.1 \pm 0.9$  および  $11.4 \pm 1.1\%$ , 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.

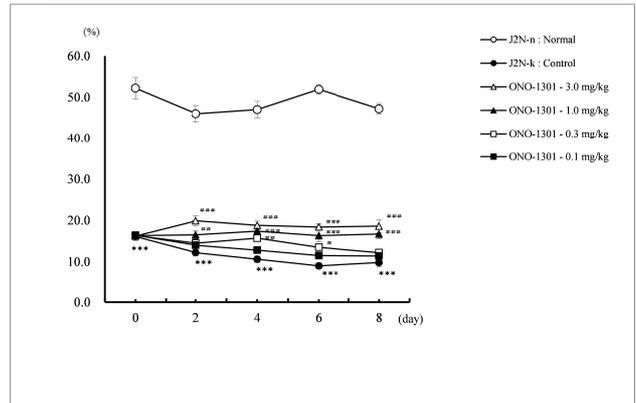


Fig 6 : 経口投与における LVFS の経時変化 ( 正常群を含む各群比較 )

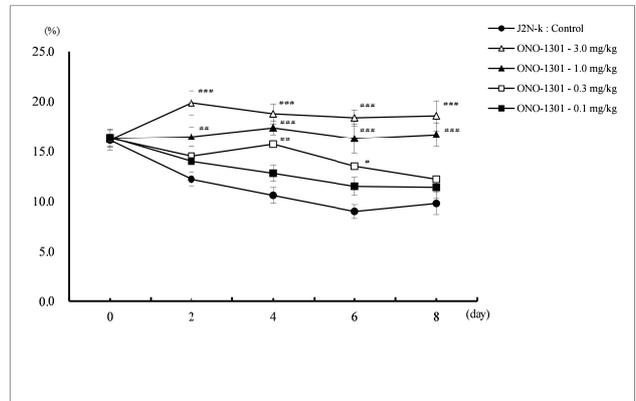


Fig 7 : 経口投与における LVFS の経時変化 ( 被験物質 1 投与群と対照群比較 )

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  $39.1 \pm 3.5, 77.1 \pm 5.9, 61.8 \pm 6.5, 69.1 \pm 4.2$  および  $81.4 \pm 3.5 \mu\text{L}$ , 病態 Control (J2N-k) 群では  $221.0 \pm 21.1, 231.0 \pm 21.2, 281.9 \pm 29.2, 316.5 \pm 29.7$  および  $317.3 \pm 21.0 \mu\text{L}$ , ONO-1301-3.0mg/kg 群では  $227.5 \pm 32.2, 139.0 \pm 19.9, 182.8 \pm 17.8, 183.0 \pm 23.4$  および  $233.4 \pm 37.1 \mu\text{L}$ , ONO-1301-1.0mg/kg 群では  $162.9 \pm 15.2, 166.7 \pm 21.7, 154.9 \pm 22.0, 235.7 \pm 26.6$  および  $223.5 \pm 43.9 \mu\text{L}$ , ONO-1301-0.3mg/kg 群では  $205.4 \pm 27.0, 179.4 \pm 22.3, 199.1 \pm 14.1, 242.1 \pm 24.6$  および  $285.4 \pm 21.6 \mu\text{L}$ , ONO-1301-0.1mg/kg 群では  $175.6 \pm 18.4, 191.9 \pm 23.3, 199.0 \pm 20.3, 277.4 \pm 22.5$  および  $301.0 \pm 30.3\%$  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  $5.1 \pm 1.6$ ,  $12.6 \pm 1.8$ ,  $10.3 \pm 2.3$ ,  $8.0 \pm 0.8$  および  $12.0 \pm 0.8$   $\mu\text{L}$ , 病態 Control (J2N-k) 群では  $128.0 \pm 12.8$ ,  $157.0 \pm 16.4$ ,  $201.3 \pm 22.9$ ,  $237.3 \pm 24.7$  および  $236.0 \pm 22.6$   $\mu\text{L}$ , ONO-1301-3.0mg/kg 群では  $136.8 \pm 23.8$ ,  $73.5 \pm 13.1$ ,  $98.5 \pm 11.6$ ,  $100.5 \pm 14.5$  および  $129.0 \pm 24.8$   $\mu\text{L}$ , ONO-1301-1.0mg/kg 群では  $93.0 \pm 9.4$ ,  $95.0 \pm 17.5$ ,  $86.6 \pm 13.0$ ,  $136.6 \pm 16.7$  および  $132.0 \pm 27.2$   $\mu\text{L}$ , ONO-1301-0.3mg/kg 群では  $119.4 \pm 18.5$ ,  $109.9 \pm 15.0$ ,  $123.9 \pm 12.1$ ,  $158.4 \pm 20.0$  および  $193.6 \pm 16.2$   $\mu\text{L}$ , ONO-1301-0.1mg/kg 群では  $102.4 \pm 13.6$ ,  $124.7 \pm 17.9$ ,  $130.3 \pm 15.4$ ,  $190.6 \pm 19.1$  および  $211.3 \pm 22.7$  % 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  $3.37 \pm 0.09$ ,  $4.24 \pm 0.10$ ,  $3.93 \pm 0.12$ ,  $4.09 \pm 0.09$  および  $4.32 \pm 0.06$  mm, 病態 Control (J2N-k) 群では  $6.01 \pm 0.19$ ,  $6.10 \pm 0.19$ ,  $6.51 \pm 0.22$ ,  $6.78 \pm 0.22$  および  $6.81 \pm 0.15$  mm, ONO-1301-3.0mg/kg 群では  $6.04 \pm 0.28$ ,  $5.12 \pm 0.25$ ,  $5.64 \pm 0.20$ ,  $5.62 \pm 0.25$  および  $6.08 \pm 0.34$  mm, ONO-1301-1.0mg/kg 群では  $5.43 \pm 0.17$ ,  $5.44 \pm 0.24$ ,  $5.30 \pm 0.24$ ,  $6.11 \pm 0.26$  および  $5.94 \pm 0.39$  mm, ONO-1301-0.3mg/kg 群では  $5.83 \pm 0.26$ ,  $5.59 \pm 0.22$ ,  $5.82 \pm 0.14$ ,  $6.18 \pm 0.23$  および  $6.56 \pm 0.17$  mm, ONO-1301-0.1mg/kg 群では  $5.55 \pm 0.21$ ,  $5.71 \pm 0.23$ ,  $5.80 \pm 0.20$ ,  $6.49 \pm 0.19$  および  $6.64 \pm 0.27$  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  $1.63 \pm 0.14$ ,  $2.30 \pm 0.11$ ,  $2.10 \pm 0.14$ ,  $1.97 \pm 0.07$  および  $2.28 \pm 0.05$  mm, 病態 Control (J2N-k) 群では  $5.00 \pm 0.18$ ,  $5.36 \pm 0.19$ ,  $5.82 \pm 0.20$ ,  $6.15 \pm 0.22$  および  $6.15 \pm 0.20$  mm, ONO-1301-3.0mg/kg 群では  $5.07 \pm 0.28$ ,  $4.12 \pm 0.25$ ,  $4.59 \pm 0.18$ ,  $4.60 \pm 0.23$  および  $4.96 \pm 0.33$  mm, ONO-1301-1.0mg/kg 群では  $4.50 \pm 0.15$ ,  $4.45 \pm 0.29$ ,

$4.36 \pm 0.22$ ,  $5.08 \pm 0.24$  および  $4.96 \pm 0.36$  mm, ONO-1301-0.3mg/kg 群では  $4.84 \pm 0.26$ ,  $4.73 \pm 0.21$ ,  $4.95 \pm 0.16$ ,  $5.34 \pm 0.25$  および  $5.76 \pm 0.16$  mm, ONO-1301-0.1mg/kg 群では  $4.61 \pm 0.23$ ,  $4.92 \pm 0.25$ ,  $5.02 \pm 0.19$ ,  $5.71 \pm 0.21$  および  $5.89 \pm 0.26$  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  $C_{\text{max}}$  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、ONO-1301 経口投与第 1 相試験における血中濃度結果 (軽度な副作用 (下痢等) 発現時の  $C_{\text{max}}$  血中濃度; 108.4ng/ml、及び無毒性量での  $C_{\text{max}}$  血中濃度; 23.7ng/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。

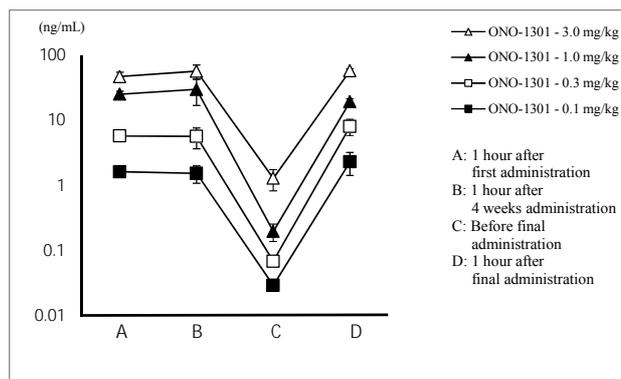


Fig 8 : 経口投与における ONO-1301 血中動態

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。

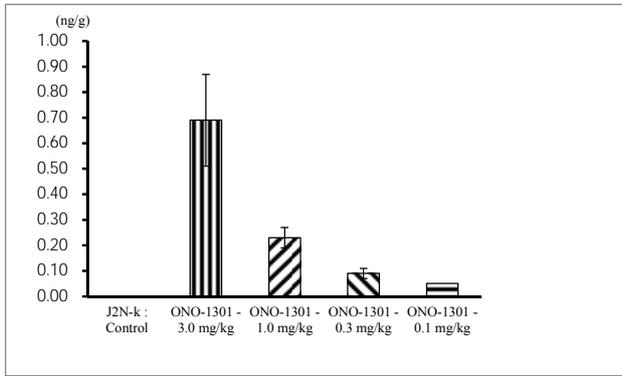


Fig 9 : 経口投与における心臓組織中 ONO-1301 濃度

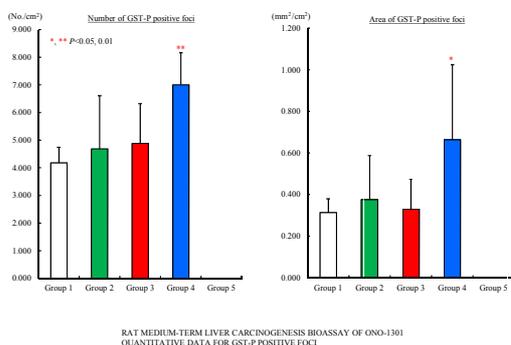
・ ONO-1301 のラット肝中期発がん性試験

F344/DuCrIj 雄性ラットに Diethylnitrosamine (DEN) を 200 mg/kg の用量で 1 回腹腔内投与し、その 2 週間後より被験物質である ONO-1301 を 0 (溶媒)、3 及び 10 mg/kg/day の用量で 6 週間、1 日 1 回強制経口投与した。被験物質投与開始 1 週間には全動物に対し、2/3 肝部分切除術を実施した。実験開始 8 週後に全生存動物を屠殺剖検し、肝臓を免疫組織化学的にポリマー法にて胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 染色を実施し、画像解析装置を用いて肝臓の単位面積に対する GST-P 陽性細胞巢の発生個数及び面積を定量的に解析した。

その結果、DEN 無処置の 10 mg/kg 群では、GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。

また、ONO-1301 の 10mg/kg、及び 3 mg/kg 投与群においても、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積共に有意な増加は認められなかった。

陽性対照の S . PB 群では、肝臓重量の有意な高値及び GST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの個数及び面積の有意な高値がみられ、本試験の妥当性が示された。



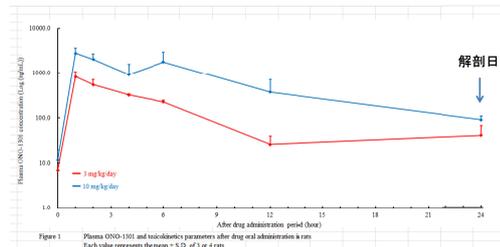
RAT MEDIUM-TERM LIVER CARCINOGENESIS BIOASSAY OF ONO-1301  
QUANTITATIVE DATA FOR GST-P POSITIVE FOCI

本試験で用いた被験物質である ONO-1301 はプロスタグランジン I<sub>2</sub> 受容体作動活性を持ち、さらに線維芽細胞等に作用して肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A) 及びストロマ細胞由来

因子(SDF-1)などを産生することが報告されている。類似のプロスタサイクリンを主成分とする、Epoprostenol Sodium (PGI<sub>2</sub>・Na 塩) は、本試験と同様に肝中期発がん性試験において肝臓に対して発がん修飾作用がなく、また変異原性試験、毒性試験等においても発がん性を示唆する結果は得られていない。また、プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>) 誘導体である Beraprost sodium も同様にマウス癌原性試験、ラット癌原性試験、及び本試験と類似の中期発がん性試験においても、全て発がん性がないことが報告されている。

以上の結果から、ONO-1301 は最大耐量である 10 mg/kg 反復経口投与における本試験条件下において肝臓の前がん病変発生に対する明らかな修飾作用(プロモーション作用)は示さなかった。また、本試験で肝臓に対するイニシエーション作用は認められず、遺伝毒性試験の結果は陰性であること、また類似薬での発がん性の報告もないことから、ONO-1301 についても発がん性は示さないものと推察された。また、血中濃度測定結果から、ONO-1301 は用量相関的に経口吸収されていることが確認された。

ONO-1301 経口投与における血中動態



最終投与日(解剖前日)に採血

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。一方、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。自然発症拡張型心筋症(TO-2)ハムスターモデルに24週齢～32週齢まで3週間に1回、YS-1402/ONO-1301MS を皮下投与した場合、28週齢から有意に心機能(LVEF)の悪化を抑制したが(Biomedicine & Pharmacotherapy 63:781(2009)) J2N-k ハムスターは病態が異なるのかも知れない。また、ONO-1301 反復経口投与における発がんプロモーション作用及びイニシエーション作用について、ラット肝中期発がん性試験にて検討した結果、共に陰性を示した。

#### 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～3mg/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 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。また、ONO-1301 反復経口投与における発がんプロモーション作用及びイニシエーション作用をラット肝中期発がん性試験にて検討した結果、共に陰性を示した。

#### 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) 「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44回日本心臓血管外科学会 熊本(201402)

2) 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) Dallas

#### 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 該当なし