

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：ONO-1301 の新規ナノスフェア製剤の作製と有効性の確認及び

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

ミニプ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

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、間歇静脈内投与により、より安全で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）。

特性の異なる代表的な 2 種の ONO-1301NS 製剤を作製し、本製剤を重症心不全（肺高血圧症）モデルに間歇静脈内投与し、ONO-1301 と比較した。即ち、ラットにモノクロタリン 60 mg/kg を単回皮下投与により誘発させた重症心不全（肺高血圧症）モデルを用いて、モデル作製 7 日後より、ONO-1301；3 mg/kg × 2 回 / 日反復経口投与、及び ONO-1301 又は特性の異なる 2 種の ONO-1301NS を週 1 回、（ONO-1301 として）1 mg/kg 間歇静脈内投与し、4 2 日までの生存率を比較検討し、ONO-1301NS 製剤の DDS 効果を確認した。

その結果、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）の間歇静注投与群は共に 50% の有意な生存率の延長を示した。このことから、ONO-1301 の総投与量は NS 剤にすることにより 1 / 42 投与量で同等の効果を示すことから、ONO-1301 の NS 製剤化により ONO-1301 が疾患局所に集積（DDS）され、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。ONO-1301NS 製剤は、安全性、汎用性、利便性、経済性に優れた DDS 製剤になることが示唆された。

また、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）ミニプ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）での無毒性量は最大投与量である 10mg/kg 以上であった。

A . 研究目的

・ONO-1301NS 製剤

拡張型心筋症に対する治療法としては、補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として、YS-1402/ONO-1301MS シート製剤を心臓貼付投与することを目的として検討している。

一方、軽症・中等症患者に対しては、早期治療介入として ONO-1301 反復経口投与により、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て検討している。

しかし、心臓貼付における開胸手術は患者への侵襲が大きく、汎用性は少ない。一方、経口投与は全

身投与であるため、心臓特異性は低く、安全性との乖離が危惧される。

今回、間歇反復静脈内投与による疾患局所特異的な製剤

として ONO-1301 ナノスフェア（ONO-1301NS）製剤を作

製し、安全性、汎用性、利便性、経済性を目指した新規 DDS 製剤の作製とその有用性を検証することを目的とした。

・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医師主導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、及び（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。

B. 研究方法

・ONO-1301NS 製剤

疾患特異的なDDS (Drug Delivery System) ナノスフェア (NS) 製剤として、特性の異なる代表的な2種の新規ONO-1301 ナノスフェア製剤 (ONO-1301NS 製剤A及びB) を作製し、間歇反復静脈内投与により、より安全で汎用性の高い疾患局所特異的 (DDS) な重症心不全治療剤開発を目的とした治療法の検討を行った。

代表的な2種のONO-1301NS 製剤ONO-1301NS 製剤 (A); 平均粒子径122nm及びONO-1301NS 製剤 (B); 平均粒子径; 109nm) を作製した (特許出願準備中のため詳細記載略)。

作製したONO-1301NS 製剤をラットモノクロタリン (MCT) 誘発重症心不全 (肺高血圧症) モデルに週1回間歇静脈内投与し、ONO-1301 反復経口投与と比較し、有用性を検証した。

1. 被験物質及び媒体

1) ONO-1301

・Lot No. : H5001 (小野薬品より入手)

2) ONO-1301NS 剤A

・Lot No. : D1441

・平均粒子径: 122nm

3) ONO-1301NS 剤B

・Lot No. : YT140118

・平均粒子径: 109 nm

4) 陽性対照 (ET-1拮抗剤); ボセンタン

・Lot No. : 0701012325b

5) 媒体

(1) 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液 (以下、0.5% CMC-Na水溶液)

・Lot No. WAG1264、和光純薬工業(株)

(2) 注射用水

・Lot No. 3D86N、日本薬局方、(株)大塚製薬

2. 試験系

1) 使用動物

動物種: ラット

系統: Slc:Wistar (雄性)

入荷時週齢: 4週齢

試験開始時週齢: 5週齢

入荷時体重: 66.4~90.8 g

供給源: 日本エスエルシー株式会社

3. 試験方法

1) 重症心不全 (肺高血圧) モデル誘発物質

名称: モノクロタリン (以下、MCT)

Lot No. : SLBG1999V

製造元: Sigma-Aldrich Corporation

2) 重症心不全モデルの作製 (肺高血圧症モデル作製)

MCTを60 mg//kgの用量で単回背部皮下投与し、MCT投与6日後に体重層別割付法で群分けした。

3) 群構成

群	投与物質、投与用量、投与回数	投与経路	例数
1	生理食塩液週	静脈内	20
2	ONO-1301; 3 mg/kg x 2 回/日	経口	10
3	ボセンタン; 50 mg/kg x 2 回/日	経口	10
4	ONO-1301NS 剤A; 1 mg/kg/週	静注	10
5	ONO-1301NS 剤B; 1 mg/kg/週	静脈内	10
6	ONO-1301; 1 mg/kg/週	静脈内	10

* 投与量はONO-1301としての用量を示す。

1群: MCT投与7、14、21、28および35日後 (計5回) に1週間間隔で生理食塩液を静脈内投与した。

2群: MCT投与後7~41日後まで、投与の間隔を8時間以上空けて、ONO-1301の3 mg/kgを2回/日、経口投与した。

3群: MCT投与7~41日後まで、投与の間隔を8時間以上空けて、ボセンタンの50 mg/kgを2回/日、経口投与した。

4群: MCT投与7、14、21、28および35日後 (計5回) に1週間間隔でONO-1301NS 剤Aの1 mg/kgを静脈内投与した。

5群: MCT投与7、14、21、28および35日後 (計5回) に1週間間隔でONO-1301NS 剤Bの1 mg/kgを静脈内投与した。

6群: MCT投与7、14、21、28および35日後 (計5回) に1週間間隔でONO-1301の1 mg/kgを静脈内投与した。

4) 評価

(1) 一般状態観察

MCT投与7~41日後までは8時間以上間隔を空けて2回/日、動物の瀕死状態を確認した。尚、飼育期間中に瀕死状態 (耳介反射、聴覚反射、痛覚反射の検査において1項目でも反応しない場合) をもって死亡と判断した。

(2) 体重測定

MCT投与日の投与前、MCT投与3および6 (群分け日) 日後に測定した。MCT投与7、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36および39日後は1回目の被験物質投与前に測定した。MCT投与42日後は午前中に測定した。

・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/NO-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、ミニプ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 Cmax で約 120 倍、AUC_{672h} で約 30 倍であった。本結果を踏まえて、13 週間間歇投与と毒性試験を実施した。

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 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) ミニプ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 を投与可能な最大投与量である 10 mg/kg の投与量でミニプタの心臓に単回貼付投与することにより、媒体群を含めて自発運動の減少、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 10 mg/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 10 mg/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 1 mg/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ミニプ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 : ゲッチェンゲン系ミニプタ(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(別項試験にて測定)

ONO-1301MSミニプ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 ²⁾	10 mg/kg	13週	3例	—

¹⁾ 高量(10 mg/kg)から臓器組織から原薬を消失すると想定される期間:6週間 消失すると想定される期間:13週間
²⁾ 全群での検定
³⁾ 長期毒性の検定

【検査スケジュール】

項目	検出日	投与後(日)																
		1	3	7	14	21	28	35	41	42	49	56	63	70	77	84	91	
一般状態	投与12.4日																	
摂餌量	投与12.4日																	
眼科学的検査	投与12.4日																	
血圧・心電図	投与12.4日																	
尿検査	投与12.4日																	
血液学的検査	投与12.4日																	
血液生化学的検査	投与12.4日																	
TK測定	投与12.4日																	
心臓組織中濃度測定(別項試験)	投与12.4日																	
剖検	投与12.4日																	

イソフルラン麻酔を施したGöttingen系ミニプタ(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(ゼルフフォーム®、ファザ-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 コンビセット接着用、CSL ベーリング株式会社)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

・ONO-1301NS 製剤

1. 生存率

重症心不全モデル作製42日後までの生存率の推移を Figure. 1、および Table 1 に示す。

対照群（1群）は、MCT の 60 mg/kg 皮下投与により重症心不全モデル作製15日後に1例の死亡が観察された。その後、42日までに17例の死亡が観察され、最終生存率は10%（生存数：2/20例）であった。

ONO-1301 の 3 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群（2群）は、重症心不全モデル作製14日後に1例の死亡が観察された。その後、42日までに4例の死亡が観察され、最終生存率は50%（生存数：5/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な延命効果が認められた（ $p < 0.05$ ）。

ボセンタンの 50 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群（3群）は、重症心不全モデル作製20日後に1例の死亡が観察された。その後、42日までに6例の死亡が観察され、最終生存率は30%（生存数：3/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な延命効果は認められなかった。

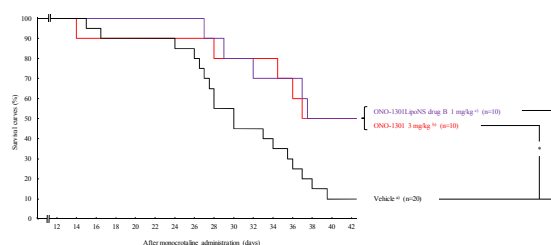
陽性対照として用いた ET-1 拮抗剤であるボセンタンは肺高血圧治療剤として臨床的に使用されており、同ラット MCT 誘発心不全モデルにおいて有効性を確認している（Circ J 2013）が、これらは MCT 投与直後からの反復経口投与である。今回、（3群）MCT 投与7日後からの投与においては、有意な延命効果は確認出来なかった。

ONO-1301NS 剤 A の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内投与群（4群）は、重症心不全モデル作製27日後に1例の死亡が観察された。その後、42日までに4例の死亡が観察され、最終生存率は50%（生存数：5/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な延命効果が認められた（ $p < 0.05$ ）。

ONO-1301NS 剤 B の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内投与群（5群）は、重症心不全モデル作製18日後に1例の死亡が観察された。その後、42日までに8例の死亡が観察され、最終生存率は10%（生存数：1/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な延命効果は認められなかった。

ONO-1301 の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内投与群（6群）は、重症心不全モデル作製28日後の投与約30分後に2例の死亡が観察された。その後、42日までに6例の死亡が観察され、最終生存率は20%（生存数：2/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な延命効果は認められなかった。

Figure 1
Effects of ONO-1301 and ONO-1301NS drug B on survival curves in Monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats



a) Saline (5 mL/kg, i.v.) was administered once a week from 7 days after monocrotaline administration
 b) ONO-1301 (3mg/kg) was administered twice a day for 21 days from 7 days after monocrotaline administration (3 mg/kg × twice/day × 21 days = 210 mg/kg/animal)
 c) ONO-1301NS drug B (1 mg/kg) was administered once a week from 7 days after monocrotaline administration (1 mg/kg/week × 5 times = 5 mg/kg/animal)
 Monocrotaline: 60 mg/kg, s.c. (0 day)
 Animals were grouped 6 days after monocrotaline administration

* significant difference from pulmonary hypertension vehicle at $p < 0.05$ (Log-rank test)

・投与量は ONO-1301 としての用量を示す。* : $P < 0.05$ vs 1群

Fig 1 : ONO-1301 反復経口投与群と ONO-1301NS 製剤 (A) の間歇静脈内投与における 42 日間の生存曲線

群	投与物質、投与量、投与回数	投与経路	例数	生存率 (%)
1	生理食塩水	静注	20	10
2	ONO-1301; 3mg/kg × 2 回/日	経口	10	50*
3	ボセンタン; 50mg/kg × 2 回/日	経口	10	30
4	ONO-1301NS 剤 A; 1 mg/kg/週	静注	10	50*
5	ONO-1301NS 剤 B; 1 mg/kg/週	静注	10	10
6	ONO-1301; 1mg/kg/週	静注	10	20

Table 1 : 各群 42 日後の生存率

2) 体重

MCT の 60 mg/kg 投与時の各群の平均体重は 115.5 ~ 119.1 g を示し、被験物質投与開始時（MCT 投与7日後）の各群の平均体重は 137.4 ~ 139.6 g であった。

対照群（1群）は MCT 投与後、平均体重は増加して 21 日後は 188.2 g（18/20 例）であった。その後、体重が減少し 16 例の死亡が認められ 42 日後の平均体重は 146.7 g（2/20 例）であった。

ONO-1301 の 3 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群（2群）は MCT 投与後、平均体重は増加して 21 日後は 187.6 g（9/10 例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ 42 日後の平均体重は 165.1 g（5/10 例）であり、対照群（1群）と比較して有意な差は認められなかった。

ボセンタンの 50 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群（3群）は MCT 投与後、体重は増加して 21 日後の平均体重は 192.9 g（9/10 例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ 42 日後の平均体重は 167.2 g（3/10 例）であり、対照群（1群）と比較して有意な差は認められなかった。

ONO-1301NS 剤 A の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内

投与群（4群）はMCT投与後、体重は増加して21日後の平均体重は186.7g（10/10例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ42日後の平均体重は145.4g（5/10例）であり、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

ONO-1301NS 剤Bの1mg/kgの1回/週、間歇静脈内投与群（5群）はMCT投与後、体重は増加して18日後の平均体重は176.5g（9/10例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ42日後の平均体重は113.3g（1/10例）であった。重症心不全モデル作製27および30日後において対照群（1群）と比較して有意な体重減少を示した（ $p < 0.05$ ）。

ONO-1301の1mg/kgの1回/週、間歇静脈内投与群（6群）はMCT投与後、体重は増加して21日後の平均体重は190.0g（10/10例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ42日後の平均体重は192.2g（2/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な差は認められなかった。

3) 総投与量

MCT投与7日後から41日までの35日間に投与された動物あたりの総被験物質量を求めた。

その結果、2群は210 mg/kg/animal（3 mg/kg × 2回/日 × 35日）、3群は3500 mg/kg/animal（50 mg/kg × 2回/日 × 35日）、4群～6群は5 mg/kg/animal（1 mg/kg/週 × 5回）であった。4群は2群と比較し、5/210（1/42）投与量にて同等の効果を示した。

・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

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週間間歇皮下投与毒性試験

【試験結果】

項目	結果					
死亡・切迫例	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（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処理反応のみ）					
TK測定	3 mg/kg♀	10 mg/kg♀	30 mg/kg♀	3 mg/kg♂	10 mg/kg♂	30 mg/kg♂
C _{max} (ng/mL)	23.7±6.2	122±13	314±91	18.8±3.9	732±11.8	196±6
AUC _{2184h} (ng·h/mL)	6670±2170	28500±5200	123000±20000	3090±380	14000±3800	65700±5300

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

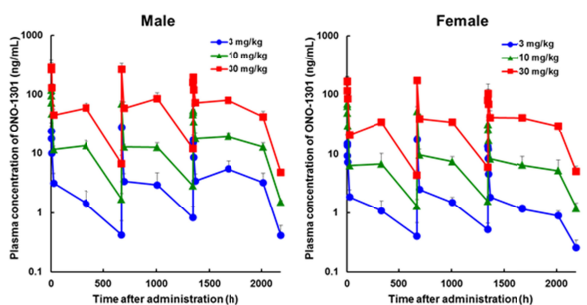
投与量 (mg/kg/回)	雄			雌		
	AUC _{2184h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{24h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)
3	6670	29.7	450	3090	18.8	675
10	28500	122	1.67	14000	73.2	1.67
30	123000	314	225	65700	196	226

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 C_{max} 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) ミニブ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濃度測定の各群における薬物動態パラメータを表に示した。

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

	投与量 (mg/kg)	AUC _{1008h} (ng·h/mL)	AUC _{2184h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	
6週間 観察群	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 観察群	雌	10	24500 ± 11200	N.A.	89.5 ± 78.8	224 ± 97
	雄	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 C_{max} 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) まで持続的な曝露が認められ、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 濃度測定の各群の測定結果は、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

・ONO-1301NS 製剤

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。

2 種の特性の異なる ONO-1301NS 製剤を作製し、間歇静脈内投与により MCT 誘発重症心不全モデルでの生存率を比較検討することにより、各種製剤の DDS 効果を確認した。

陽性対照物質として用いた ET-1 拮抗剤であるボセンタンは肺高血圧治療剤として臨床的に使用されており、MCT 誘発心不全モデルにおいて有効性を確認しているが、これらは MCT 投与直後からの反復経口投与である。今回、MCT 投与 7 日後からの治療投与においては、有意な延命効果が確認出来なかった。一方、ONO-1301 の 3 mg/kg (2 群) の 1 日 2 回反復投与での最終生存率は 50 % であり、対照群 (1 群) と比較して有意な延命効果が確認された。また、ONO-1301NS 剤 A の 1 mg/kg (4 群) も週 1 回の間歇静脈内投与においても、最終生存率は 50 % であり、ONO-1301 と同等の延命効果を示した。

ONO-1301NS 剤 (A) の 1 mg/kg/週間歇静脈内投与 (4 群) は ONO-1301 の 3 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与 (2 群) と比較し、総投与量として 1/42 投与量において、同等な延命効果を示すことにより、NS 製剤での DDS 効果が確認された。

一方、ONO-1301 原薬 (6 群) 及び ONO-1301NS 剤 (B) の 1 mg/kg/週間歇静脈内投与群 (5 群) は効果を示さなかった (Table 1)。

以上の結果より、重症心不全モデルに対して心不全発症後 (MCT 投与 7 日後) からの投与において ONO-1301 反復経口投与および ONO-1301NS 剤 A 間歇静脈内投与は治療的な投与により有意な延命効果を示し、重症心不全 (肺高血圧症) に対する治療効果を有する可能性が示唆された。

・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 以上であった。

また、(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

・ ONO-1301NS 製剤

重症心不全モデルに対して、ONO-1301NS 製剤 (A) の週 1 回間歇静脈内投与は、ONO-1301 の 1 日 2 回反復経口投与と同等の治療効果を示した。ONO-1301 の総投与量は NS 剤にすることにより 1 / 42 投与量で同等の効果を示すことから、ONO-1301NS 製剤の間歇静脈内投与により ONO-1301 が疾患局所に集積 (DDS) されるため、少量投与により有効性を発揮する可能性が示唆された。

ONO-1301NS 製剤の間歇静脈内投与は、疾患局所特異的 (DDS) であり、安全性、汎用性、経済性、利便性に優れた重症心不全治療剤に成り得ることが示唆された。

・ YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験 (1) ラット 13 週間経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) ミニブ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。

これらの結果を用いて、心臓貼付投与における治験概要書、治験実施計画書、および同意説明文書を作成し、PMDA 対面助言にて確認を行った。

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) 「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.

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) 「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.

5) 「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 4 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（今後の予定）

1) 「新規ナノスフェア製剤」

・ 出願人：大阪大学 等