目次

2.4 非臨床試験の概括評価 ---- 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 ---- 4
2.4.2 薬理試験結果 ---- 6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 ---- 6
2.4.2.1.1 歯周組織再生作用 ---- 6
2.4.2.1.2 作用機序 ---- 6
2.4.2.2 副次的薬理試験 ---- 8
2.4.2.3 安全性薬理試験 ---- 8
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 ---- 8
2.4.3 薬物動態試験結果 ---- 9
2.4.3.1 吸収 ---- 9
2.4.3.2 分布 ---- 9
2.4.3.3 代謝 ---- 10
2.4.3.4 排泄 ---- 10
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 ---- 10
2.4.4 毒性試験結果 ---- 11
2.4.4.1 フィブラスト®スプレーの非臨床毒性試験成績の概略 ---- 11
2.4.4.2 KCB-1 HPC 製剤の局所刺激性試験 ---- 14
2.4.5 総括及び結論 ---- 15
2.4.6 参考文献 ---- 17

表 2.4-1 フィブラスト®スプレー承認時及び承認後に実施した試験の概要表 ---- 12

用語及び略語一覧

用語及び略語	内容
ALP	Alkaline phosphatase：アルカリフォスファターゼ
$AUC_{0-\infty}$	投与後無限大時間までの血清中濃度－時間曲線下面積
B-1	測定分子量 17.7 kDa（SDS-PAGE）の KCB-1 の代謝物 （未変化体分子量に相当する画分）
B-2	測定分子量 15.0 kDa（SDS-PAGE）の KCB-1 の代謝物
B-3	測定分子量 7.2 kDa（SDS-PAGE）の KCB-1 の代謝物
B-4	測定分子量 4.2 kDa（SDS-PAGE）の KCB-1 の代謝物
bFGF	basic Fibroblast growth factor：塩基性線維芽細胞成長因子
BMP-2	Bone morphogenetic protein -2：骨形成たん白質 2 傍分泌若しくは自己分泌的に作用し未分化な間葉系細胞を骨芽細胞に分化させる成長因子
C_{max}	最高血清中濃度
DNA	Deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
ELISA 法	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
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に関する省令
GST-P	Glutathione S transferase placental form：胎盤型グルタチオン S トランスフェラーゼ
HPC	Hydroxypropylcellulose：ヒドロキシプロピルセルロース
^{125}I-KCB-1	放射性ヨウ素［^{125}I］標識 KCB-1
^{125}I-KCB-1 HPC 製剤	^{125}I-KCB-1（凍結乾燥品）を[redacted]% HPC 液で溶解した製剤
KCB-1	遺伝子組換えヒト bFGF ［一般的名称：トラフェルミン（遺伝子組換え）］
KCB-1D	KCB-1 の歯周病適用時の治験コード KCB-1 の歯周病適用時の被験薬の総称
KCB-1 HPC 製剤	KCB-1（凍結乾燥品）を[redacted]% HPC 液で溶解した製剤
OC	Osteocalcin：オステオカルシン 骨基質の一種
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen：増殖細胞核抗原
RNA	Ribonucleic acid：リボ核酸
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
Sp7	骨芽細胞の転写因子（別名: Osterix） BMP-2 の刺激で発現する転写因子であり、未熟な骨芽細胞（前骨芽細胞）から成熟した骨芽細胞への分化に関与する
TCA	Trichloroacetic acid：トリクロロ酢酸
アザン染色	膠原線維（コラーゲン）を青染する染色法

用語及び略語	内容
結合組織性付着	結合組織（歯肉及び歯根膜）からセメント質内に埋入しているコラーゲン線維により歯と歯周組織が結合している様式
ケモキネシス	走化因子刺激によるランダムな遊走
ケモタキシス	走化因子の濃度勾配による遊走
骨性癒着	歯根（象牙質）が歯槽骨と直接癒着した状態。癒着した歯根は、骨のリモデリングを受け、徐々に吸収され骨に置き換わり脆弱化する [1)]
歯周基本治療	歯周病の病原因子を排除して歯周組織の病的炎症を改善する基本的な原因除去治療
深行増殖	歯肉内縁上皮が歯根側に増殖すること。治癒過程においては、治癒の結果、歯根面との間に長い上皮性付着が形成される場合にもみられる
対照 HPC 製剤	KCB-1 を含まない HPC 製剤

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

歯周組織は、硬組織である歯槽骨及びセメント質と、軟組織である歯根膜及び歯肉から構成されており、歯の支持組織として重要な役割を果たしている。歯周炎は、主に細菌性バイオフィルム（デンタルプラーク）中の口腔細菌を原因とする炎症性疾患であり、病態が悪化して歯周組織の破壊が進行すると、歯を支持する能力が著しく低下し、罹患歯の保存は困難となる。

現在の歯周炎治療は、デンタルプラークの除去による炎症の消退を目的とした原因除去療法が中心であり、進行した歯周炎に対しては歯肉剥離掻破術（フラップ手術）を代表とする歯周外科手術が施行される。フラップ手術は歯根面及び歯周ポケットの内部に蓄積したデンタルプラークを取り除き、歯肉を歯根面に付着させることを主目的とした手術法である。歯周炎治療後の歯周組織が歯の支持組織としての機能を回復するためには、歯槽骨とセメント質の新生を伴う結合組織性付着の獲得が重要と考えられている[2,3]。しかし、フラップ手術では、歯槽骨が新生し歯と歯槽骨との付着が再構築されることは稀であり、歯周組織の再生量は小さい。通常の歯周基本治療や歯周外科手術によって得られる以上の歯周組織を再生させるために、歯科医療の現場では、歯の支持組織の構成に重要な骨芽細胞、歯根膜細胞及びセメント芽細胞の遊走・分化・増殖並びに細胞外基質の産生などを積極的に促進するような新しい治療法が望まれている[3,4]。

塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）は、生体内の組織に広く分布している成長因子である[5]。*In vitro* で線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞等、多種類の細胞の遊走・増殖の促進作用や細胞外基質産生の制御作用を有するほか、*in vivo* では血管新生及び肉芽形成を促進することが報告されており、様々な細胞機能を誘導し、多彩な生物活性を発現する[6,7,8,9,10]。これらの作用を基に、科研製薬株式会社は 2001 年 4 月 4 日に褥瘡、皮膚潰瘍（熱傷潰瘍・下腿潰瘍）の効能・効果で遺伝子組換えヒト bFGF［KCB-1、一般的名称：トラフェルミン（遺伝子組換え）、販売名：フィブラスト®スプレー］の製造承認を取得した。

bFGF は、強力な血管新生作用及び肉芽形成促進作用に加えて、骨芽細胞や骨髄の未分化間葉系細胞の遊走・増殖の促進作用による骨組織の再生作用を有する[11,12,13]。また、歯根膜細胞の遊走・増殖作用を有することや、イヌ及びサルの歯周組織欠損モデルを用いた検討において歯槽骨、歯根膜及びセメント質の新生をもたらすとの報告から[14,15,16,17]、歯周炎で喪失した歯周組織の再生促進効果が期待された。本剤は、トラフェルミン（遺伝子組換え）を有効成分とし、フラップ手術時に口腔内局所に適用する医薬品（治験コード：KCB-1D）である。本剤の申請に際し、有効性・安全性に係る非臨床的な特徴を明らかにする目的で、以下の各種試験を実施した。

薬理試験では、効力を裏付ける試験として、イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルを用いて本剤の局所単回投与による歯周組織再生促進作用を検討した。作用機序を考察する試験として、*in vitro* でラット骨髄由来間葉系細胞に対する作用（増殖、分化）及びヒト歯根膜細胞に対する作用（遊走・増殖・分化）、*in vivo* でイヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルでの再生初期過程及び局在について検討した。更に、再生組織の遺伝子発現の解析から、KCB-1 が骨形成に及ぼす影響を検討した。副次的薬理試験及びその他の薬理試験（薬力学的薬物相互作用試験）については検討すべき項目はないと判断した。また、安全性薬理試験は一般薬理試験としてフィブラスト®スプレー承認申請時に実施し、既に評価を終了しているため

［フィブラスト®スプレー資料概要書 ホ項（資料番号 1.13.1）］、新たに実施しなかった。

薬物動態試験については、臨床投与経路である歯周組織欠損部に本剤を投与したときの薬物動態について、イヌ（吸収）、ウサギ（分布及び代謝）及びラット（局所分布）を用いて検討した。ラットでは下顎骨が極めて小さく、一定の大きさの歯周組織欠損を作製して薬物動態試験を実施することが困難であった。このため、代替投与経路としてラットの歯肉内に本剤を投与したときの薬物動態（吸収、分布、代謝及び排泄）についても検討した。なお、すべての薬物動態試験は単回投与で実施した。また、臨床試験の結果、KCB-1D を辺縁性歯周炎患者の歯槽骨欠損部に単回投与したときの血清中 KCB-1 濃度は内在性 bFGF 濃度範囲を超えなかった（2.7.2.3 項）。したがって、薬物動態学的薬物相互作用が起こる可能性は非常に低いと考えたため、薬物相互作用試験を実施しなかった。

毒性試験については、本剤の有効成分である KCB-1 の毒性試験（単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、抗原性試験、発熱性試験）は、既承認のフィブラスト®スプレー開発時等に既に実施されている（資料番号 1.13.1）。歯周組織欠損部投与を臨床適用経路とする本剤の開発にあたり必要な毒性試験として、投与部位である口腔内組織に対する局所刺激性を明らかにする目的で、ラットにおける口腔粘膜刺激性試験及びイヌにおける歯肉一次刺激性試験を実施した。これらの毒性試験は、いずれも GLP を遵守して実施した。

2.4.2 薬理試験結果

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 歯周組織再生作用

資料番号 4.2.1.1-1、4.2.1.1-2、4.2.1.1-3、4.2.1.1-4

イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルの欠損部に KCB-1 HPC 製剤（0.03～0.3%）あるいは対照 HPC 製剤を単回投与し、3 ヵ月後に新生骨、新生セメント質及び新生歯根膜への影響を評価した。KCB-1 は欠損部の骨塩量及び新生骨組織面積を用量依存的に増加させ、0.1%以上の濃度で対照 HPC 製剤群に対して有意に新生骨の形成を促進した。KCB-1 で得られた新生歯根膜は、コラーゲン線維束が新生セメント質に埋入し、結合組織性付着を形成していることが観察された。新生セメント質長及び新生歯根膜長は、KCB-1 の用量に依存して増加し、0.1%以上で対照 HPC 製剤群に対して有意な差を示した。

また、再生組織の長期経過後の状態を検討するため、同モデルの欠損部に 0.3% KCB-1 HPC 製剤あるいは対照 HPC 製剤を単回投与した後に、欠損部の骨塩量を経時的に測定し、投与 13 ヵ月後に新生骨、新生セメント質及び新生歯根膜への影響を評価した。対照 HPC 製剤群の欠損部の骨塩量は投与 2 ヵ月後に最大に達し、その後は変動なく推移した。0.3% KCB-1 HPC 製剤群の骨塩量は、投与 2 ヵ月後から対照 HPC 製剤群に対して有意な増加を示し、その差は投与 13 ヵ月後まで維持された。また、投与 13 ヵ月後の皮質骨体積や新生骨組織面積も、0.3% KCB-1 HPC 製剤群は対照 HPC 製剤群に対して有意に高値を示した。新生骨内部の海綿骨の構造は、0.3% KCB-1 HPC 製剤群と対照 HPC 製剤群間に差がなく、KCB-1 により形成された新生骨は自然治癒で形成された新生骨と同質であった。また、対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群とも、セメント質及び歯根膜が形成され結合組織性付着が観察された。新生セメント質及び新生歯根膜の長さは、いずれも 0.3% KCB-1 HPC 製剤群で対照 HPC 製剤群に対して有意に増加しており、KCB-1 による結合組織性付着の獲得促進が認められた。新生骨の高さについては、0.3% KCB-1 HPC 製剤群は対照 HPC 製剤群に対して有意に高値を示した。なお、骨性癒着はいずれの群にも認められなかった。

2.4.2.1.2 作用機序

歯周組織の再生には、骨髄及び歯根膜由来の細胞が関与することが明らかにされている[18,19,20,21]。骨髄には未分化間葉系細胞が存在し、骨芽細胞の前駆細胞として歯槽骨の再生を担う[18]。また、歯根膜組織は、セメント芽細胞、骨芽細胞、それらの前駆細胞及び未分化間葉系細胞などから構成され、セメント質及び歯根膜の再生に中心的な役割を担う[19,20,21]。更に、組織再生には、酸素や栄養を供給するための血管新生が必須である[22,23]。これらの報告に基づき、KCB-1 の作用をラット骨髄由来間葉系細胞及びヒト歯根膜細胞を用いて検討した。KCB-1 の作用部位を推察するため、イヌ歯周組織欠損モデルを用いて歯周組織欠損部での分布を観察した。また、再生初期過程における欠損部の細胞や組織の動態及び血管新生への影響を評価した。更に、再生組織の遺伝子発現の解析から、KCB-1 が新生骨形成に及ぼす影響を検討し、作用機序を考察した。

(1) 骨髄由来間葉系細胞に対する作用

資料番号 4.2.1.1-5

ラット骨髄由来間葉系細胞に対して、KCB-1（0.5～12.5 ng/mL）は添加濃度に依存した増殖促進作用を示した。KCB-1 の除去後に骨芽細胞への分化を誘導することにより、

細胞数（DNA 量）に依存して分化の指標である ALP 活性が上昇した。また、石灰化の指標であるカルシウム沈着量は、すべての濃度で時間の経過とともに増加した。

(2) 歯根膜細胞に対する作用

資料番号 4.2.1.1-6、4.2.1.1-7、4.2.1.1-8

ヒト歯根膜細胞に対して、KCB-1 は増殖促進作用（0.3～30 ng/mL）及び遊走促進作用［ケモタキシス（1 及び 10 ng/mL）、ケモキネシス（10 及び 100 ng/mL）］を示した。KCB-1（最終濃度 10 ng/mL）の添加によって増殖したヒト歯根膜細胞は、KCB-1 の除去後に硬組織形成細胞への分化を誘導することにより、ALP 活性及びカルシウム沈着量が上昇した。

(3) 歯周組織欠損部における KCB-1 の分布

資料番号 4.2.1.1-9

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、欠損部に投与した KCB-1 の分布を免疫組織学的に観察した。投与 6 時間後及び 1 日後では、欠損部に面する既存歯槽骨、象牙質、既存歯根膜及び歯肉結合組織に抗ヒト bFGF 抗体陽性部位を認めた。投与 3 日後では、象牙質の陽性部位は投与 1 日後と同様に分布したが、既存歯槽骨及び歯肉結合組織では縮小して限局的となり、既存歯根膜では消失した。なお、対照 HPC 製剤群では、いずれの時点でも陽性部位を認めなかった。

(4) 歯周組織欠損部の再生初期過程における作用

資料番号 4.2.1.1-4、4.2.1.1-10

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、再生に関わる細胞や組織の動態及び血管新生に対する KCB-1 の作用を組織学的に評価した。

1) 歯槽骨欠損部

対照 HPC 製剤群では、既報 [24)] と同様に、骨髄に由来する線維芽細胞が既存骨辺縁から増殖することにより、肉芽組織の形成が投与 7 日後から観察された。肉芽組織は増加するとともに、線維性結合組織に置換されながら、投与 14 日後に欠損部全体に拡大した。これらの組織は投与 7 日後から順次、新生骨に置換されたが、投与 28 日後でも骨欠損部全体を新生骨が占めるには至らなかった。

一方、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では、対照 HPC 製剤群で観察された一連の再生反応が、より早期かつ広範囲に観察された。骨髄に由来する線維芽細胞の増殖及び肉芽組織の形成は投与 3 日後から認められた。また、線維性結合組織及び新生骨の形成は、対照 HPC 製剤群と同様に投与 7 日後から観察されたが、より広範囲に認められた。投与 28 日後には、骨欠損部は新生骨で占められ、対照 HPC 製剤群に対して明らかな新生骨組織面積の増加を認めた。

2) 歯根面

対照 HPC 製剤群では、投与 7 日後から歯根膜に由来する線維芽細胞が歯冠側方向に増殖・遊走し、投与 14 日後に歯根面を覆った。しかし、投与 28 日後でも、4 例中 1 例でセメント質が再生されたのみであった。

一方、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では、対照 HPC 製剤群と比較して早期に歯根膜から線維芽細胞が増殖し、投与 7 日後に歯根面を覆った。投与 14 日後には 4 例中 1 例で、投与 28 日後では 4 例中 3 例でコラーゲン線維束の埋入した新生セメント質が観察され、対照 HPC 製剤群に対して、早期に結合組織性付着の再生が認められた。

3) 血管新生

投与 7 日後に新生血管を観察した。歯周組織欠損部全体では、対照 HPC 製剤群では血管新生が限局的に観察されたのに対して、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では全域に認められた。また、歯根面から近心側 1 mm 幅では、血管径 10 μm 以下、10 μm 超～30 μm 以下及び 30 μm 超のいずれの血管でも、0.3% KCB-1HPC 製剤群の血管数は対照 HPC 製剤群に比べて高値を示した。

(5) 歯周組織欠損部の再生組織における骨関連たん白質の遺伝子発現

資料番号 4.2.1.1-11

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、KCB-1 により新生骨形成が促進する作用機序を考察するため、欠損部の再生組織における骨関連たん白質の遺伝子発現を検討した。

0.3% KCB-1 HPC 製剤は、投与 7 日後に対照 HPC 製剤に対して細胞数の指標である総 RNA 量を増加させるとともに、投与 7 日後では BMP-2、投与 14 日後には Sp7、ALP 及び OC の遺伝子発現を増加させた。したがって、KCB-1 により増殖した細胞が BMP-2 の産生上昇を介して骨芽細胞へ分化が進行したことにより、新生骨形成が促進したと考えられた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

本申請における本項に該当する資料はない。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験は一般薬理試験として実施し、臨床上特に留意すべき作用は認められなかった。試験成績の詳細はフィブラスト®スプレー資料概要書 ホ項（資料番号 1.13.1）に記載されている。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

本申請における本項に該当する資料はない。

2.4.3 薬物動態試験結果

2.4.3.1 吸収

資料番号 4.2.2.2-1、4.2.2.2-2、4.2.2.2-3、4.2.2.2-4、4.2.2.2-5、4.2.2.2-6

雄イヌに 2 ヵ所の歯周組織欠損を作製した後、0.8% KCB-1 HPC 製剤を欠損部に 500 μg/62.5 μL/site（総投与量 1 mg/125 μL/匹）で投与した。また、雄イヌの歯肉内に 0.1% KCB-1 HPC 製剤を 200 μg/200 μL/匹で投与した。血清中 KCB-1 濃度を ELISA 法で測定した結果、歯周組織欠損部に投与したときの血中移行率は 0.1%、歯肉内に投与したときの血中移行率は 3.3%であった。よって、臨床投与経路である歯周組織欠損部に投与された KCB-1 の全身への移行量は僅かであると推定された。

雄ラットの歯肉内に 0.1%、0.2%及び 0.4% KCB-1 HPC 製剤をそれぞれ 100、200、400 μg/100 μL/kg で投与した。また、雌ラットの歯肉内に 0.2% KCB-1 HPC 製剤を 200 μg/100 μL/kg で投与した。血清中 KCB-1 濃度を ELISA 法にて測定した結果、雄ラットの C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$は 100～400 μg/kg の範囲でほぼ線形性を示し、血中移行率は 8.5～10.0%であった。雌雄ラットの C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$が同程度であったことから、歯肉内に投与したときの血清中濃度推移に性差は認められなかった。

雄ラットに 0.4% KCB-1 HPC 製剤又は 0.4% KCB-1 水溶液を 2 mg/500 μL/匹で経口投与し、血清中 KCB-1 濃度を ELISA 法にて測定した結果、いずれも血清中 KCB-1 濃度はすべての時点で定量下限（0.1 ng/mL）未満であり、消化管吸収による全身移行は認められなかった。

2.4.3.2 分布

資料番号 4.2.2.3-1、4.2.2.3-2、4.2.2.3-3、4.2.2.3-4、4.2.2.3-5、4.2.2.3-6

雄ウサギに歯周組織欠損を作製した後、0.3% ^{125}I-KCB-1 HPC 製剤を 30 μg/10 μL/site で投与し、組織中放射能を測定した。その結果、投与部位の放射能残存率は投与後 30 分で 97.7%、投与後 6 時間で 83.1%、投与後 24 時間で 73.4%、投与後 3 日で 44.3%、投与後 7 日で 21.2%と減少した。更に投与後 21 日では放射能残存率は 0.2%に減少し、放射能の大部分が投与部位から消失した。投与部位及び甲状腺を除く組織のうち、口腔への分布率は投与後 6 時間の 0.6%が最大であり、24 時間以降は 0.1%以下に減少した。その他の組織への分布率は投与後 3 日の肝臓及び胃の 0.6%が最大であり、以後は時間の経過とともに減少した。したがって、歯周組織欠損部から主要組織への KCB-1 の移行性は低く、残留性もないと考えられた。

雄ラットの歯周組織欠損部に 0.3% ^{125}I-KCB-1 HPC 製剤を 30 μg/10 μL/site で投与し、投与部位のミクロオートラジオグラムを作製した。その結果、歯根膜、歯槽骨、象牙質及び歯肉結合組織に放射能が分布していた。各組織に分布した放射能の化学的存在形態を推定するために、雄ラットの歯周組織欠損部に 0.3% KCB-1 HPC 製剤を 30 μg/10 μL/site で投与し、経時的に摘出した投与部位の免疫染色性を抗ヒト bFGF 抗体を用いて検討した。投与後 6 時間及び 24 時間で、歯根膜、歯槽骨、象牙質及び歯肉結合組織に抗ヒト bFGF 抗体陽性反応が認められた。投与後 3 日では歯槽骨、象牙質及び歯肉結合組織に陽性反応が認められた。投与後 7 日では歯槽骨にのみ陽性反応が認められたが、投与後 14 日にはその陽性反応は消失した。したがって、歯根膜、歯槽骨、象牙質及び歯肉結合組織には投与された KCB-1 が免疫活性体として存在し、その分布は経時的に減少すると考えられた。

雄ラットの歯肉内に 0.2% ^{125}I-KCB-1 HPC 製剤を 200 μg/100 μL/kg で投与し、組織中放射能を測定した。投与部位における放射能残存率は投与後 15 分で 88.3%であり、投与後 6 時

間で 72.1%、投与後 24 時間で 45.2%、投与後 3 日で 16.9%、投与後 7 日で 7.7%に減少した。組織の放射能分布率は肝臓で高く、投与後 6 時間及び 24 時間においてそれぞれ 9.4%及び 4.8%であったが、投与後 3 日には 1.0%に減少した。投与部位及び甲状腺を除く他の組織において、組織中放射能濃度は投与後 6 時間あるいは 24 時間に最高となり、投与後 3 日以降は減少したことから、組織への残留性は認められなかった。

2.4.3.3 代謝

資料番号 4.2.2.3-1、4.2.2.3-5

雄ウサギに歯周組織欠損を作製した後、0.3% ^{125}I-KCB-1 HPC 製剤を 30 µg/10 µL/site で投与した。投与部位の軟組織から抽出した放射能を SDS-PAGE で分析し、代謝物の分布率を算出した。未変化体の分子量に相当する放射性たん白質（B-1）の他に低分子化された 3 種のヘパリン結合性の放射性たん白質（B-2、B-3 及び B-4）が検出された。それらの割合は、B-1 がすべての時点において最も高く、低分子化された代謝物は、投与後 24 時間及び 3 日に検出された。生物活性体［B-1 及び B-2 の和、フィブラスト®スプレー資料概要書 へ項（資料番号 1.13.1）］の分布率は、投与後 30 分で 66.7%、投与後 6 時間で 57.2%、投与後 24 時間で 37.9%、投与後 3 日で 16.8%及び投与後 7 日で 6.9%であった。

雄ラットの歯肉内に 0.2% ^{125}I-KCB-1 HPC 製剤を 200 µg/100 µL/kg で投与した。投与部位から抽出した放射能を SDS-PAGE で分析し、代謝物の分布率を算出した。その結果、B-1 の他に代謝されて低分子化された B-2、B-3 及び B-4 が認められた。これら放射性たん白質のうち B-1 の占める割合は投与後 24 時間まで高かった。生物活性体（B-1 及び B-2 の和）の分布率は、投与後 15 分で 58.6%、投与後 6 時間で 42.7%、投与後 24 時間で 21.4%、投与後 3 日で 7.2%及び投与後 7 日で 3.6%であった。

これらの結果より、KCB-1 は投与部位において低分子化されることが確認された。

2.4.3.4 排泄

資料番号 4.2.2.5-1

雄ラットの歯肉内に 0.2% ^{125}I-KCB-1 HPC 製剤を 200 µg/100 µL/kg で投与し、尿及び糞中放射能並びに投与部位放射能を測定した。投与後 7 日までの尿及び糞中排泄率はそれぞれ 78.8%及び 6.1%であり、投与後 7 日の投与部位残存率は 6.2%であった。また、投与後 7 日までの尿中の高分子体（TCA 沈降性放射能）の排泄率は 0.1%と僅かであった。このことから、尿には低分子化を受けた ^{125}I-KCB-1 が排泄されると考えられた。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

臨床試験の結果、KCB-1D を辺縁性歯周炎患者の歯槽骨欠損部に単回投与したときの血清中 KCB-1 濃度は内在性 bFGF 濃度範囲を超えなかった（2.7.2.3 項）。したがって、薬物相互作用が起こる可能性は非常に低いと考えたため、薬物相互作用試験を実施しなかった。

2.4.4 毒性試験結果

2.4.4.1 フィブラスト®スプレーの非臨床毒性試験成績の概略

資料番号 1.13.1

本剤の有効成分であるトラフェルミン（遺伝子組換え）の毒性試験（単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、抗原性試験、発熱性試験）は、フィブラスト®スプレーの開発時等に実施され、それらの試験成績は承認時（2001 年 4 月 4 日承認）及び再審査時（2010 年 6 月 29 日再審査結果通知）に審査されている（資料番号 1.13.1）。フィブラスト®スプレーの非臨床毒性試験成績の概略を表 2.4-1 に示す。

KCB-1 は細胞成長因子の一種であり、細胞増殖促進作用及び血管新生作用を有することから、がんの発生、増殖及び転移に及ぼす影響も評価した。ただし、KCB-1 はヒト型のたん白質であり、動物を用いた長期のがん原性試験は抗体産生により実施できなかったため、それに代わる動物試験として中期発がん性試験及びヌードマウスを用いた 15 ヵ月間反復皮下投与試験を実施した。また、KCB-1 の腫瘍細胞の増殖及び転移促進に対する作用を評価した。

皮膚発がんプロモーション試験において KCB-1 は、正常及び損傷皮膚に対して発がんプロモーション作用及び既知の発がんプロモーターの作用の増強を示さなかった。肝二段階発がんに対する KCB-1 の影響を検討したところ、KCB-1 は肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巣の数と面積を増加させたが、投与中止によって消失したことから、肝発がんプロモーション作用との関連性は低いと推察された。ヌードマウスを用いた 15 ヵ月間反復皮下投与毒性試験で、対照群及び KCB-1 投与群に悪性リンパ腫を認めたが、KCB-1 投与との関連は認められなかった。しかし、KCB-1 は *in vitro* でヒト腫瘍細胞 24 種類中 6 種類（上皮系 4 種、間葉系 2 種）に対して増殖作用を示した。また、B16-BL6 マウスメラノーマ細胞の増殖と転移に対する KCB-1 の作用を検討したところ、KCB-1 はメラノーマ移植部位に投与することにより腫瘍の体積、リンパ節及び肺転移数を増加させた [25)]。この時、KCB-1 は腫瘍内及び腫瘍周囲の血管密度も増加させたことから、増殖及び転移に対する作用は血管新生が大きく関与していると推定された。メラノーマ移植部の遠隔部位への KCB-1 投与では腫瘍体積及び肺転移数は対照群と差が認められず、KCB-1 の上記作用は、細胞増殖作用を有する本剤を腫瘍内に直接投与した場合のみに出現する限定的なものであると推定された。

表 2.4-1 フィブラスト®スプレー承認時及び承認後に実施した試験の概要表

試験項目		動物種	投与経路	結果	GLP 適用
単回投与毒性試験		ラット	皮下	概略の致死量：雌雄 ＞73 mg/kg	適
			経口	概略の致死量：雌雄 ＞73 mg/kg	適
			経皮	概略の致死量：雌雄 ＞7.3 mg/head	適
			筋肉内	概略の致死量：雌雄 ＞40 mg/kg	適
			静脈内	概略の致死量：雌 40 mg/kg 雄 ＞40 mg/kg	適
		イヌ	皮下	概略の致死量：雌雄 ＞5 mg/kg	適
			筋肉内	概略の致死量：雌雄 ＞5 mg/kg	適
			経皮	概略の致死量：雌雄 ＞3.36 mg/kg	適
		ラット[a)]	皮下	概略の致死量：雌雄 ＞80 mg/kg	適
反復投与毒性試験	1ヵ月	ラット	皮下	無毒性量：雌雄 40 μg/kg/day	適
			経皮	無毒性量：雌雄 2000 μg/kg/day	適
		イヌ	皮下	無毒性量：雌雄 30 μg/kg/day	適
	3ヵ月	ラット	皮下	無毒性量：雌雄 20 μg/kg/day	適
		サル	皮下	無毒性量：雌雄 15 μg/kg/day	適
	6ヵ月	ラット	経皮	無毒性量：雌雄 2000 μg/kg/day	適
		サル	皮下	無毒性量：雌雄 15 μg/kg/day	適
遺伝毒性試験		復帰突然変異試験		陰性	適
		染色体異常試験		直接法の最高用量処理群である 440 μg/mL に染色体異常細胞の増加が認められたが、この原因はKCB-1溶液に含まれる高濃度のNaClに起因すると考えられた	適
		小核試験		陰性	適
がん原性試験	皮膚発がんイニシエーション試験	マウス	皮下	KCB-1 は皮膚発がんイニシエーション作用を示さなかった	非適
	皮膚発がんプロモーション試験	マウス	皮下	KCB-1 は正常及び損傷皮膚において皮膚発がんプロモーション作用を示さず、また既知プロモーター作用増強も認められなかった	適
		ヌードマウス	皮下	抗 KCB-1 抗体が産生されない条件下においても KCB-1 は皮膚発がんプロモーション作用を示さなかった	非適
	In vitro ヒト腫瘍細胞への作用に関する試験	ヒト腫瘍細胞		24 種中 6 種（軟骨肉腫、胆管細胞がん、平滑筋肉腫、口腔類表皮がん、扁平上皮がん、乳がん）で細胞増殖促進作用が認められた	非適
	In vitro トランスフォーム試験	BALB/c 3T3 細胞		KCB-1 には形質転換作用は認められなかった	非適

a) 原薬［トラフェルミン（遺伝子組換え）］の熱及び光劣化品での評価

表 2.4-1 フィブラスト®スプレー承認時及び承認後に実施した試験の概要表（続き）

試験項目		動物種	投与経路	結果	GLP適用
がん原性試験	ヌードマウス長期反復皮下投与毒性試験	ヌードマウス	皮下	KCB-1 に起因する腫瘍発生は認められなかった 無毒性量：雌雄 0.4 μg/head	適
	マウスメラノーマ細胞の増殖及び転移に関する試験	マウス	移植部位 移植部の遠隔部位	腫瘍移植部位に直接投与した場合、B16-BL6 マウスメラノーマ細胞の増殖及び転移を促進したが、移植部位から遠位部に投与した場合には腫瘍細胞の増殖に影響を与えなかった	非適
	肝二段階発がんモデルを用いた試験	ラット	皮下	フェノバルビタールとは異なり、長期休薬後は腫瘍発生数を増加させなかった	非適
生殖発生毒性試験	Seg. I	ラット	皮下	無影響量：親動物雄 25 μg/kg/day 親動物雌 100 μg/kg/day 生殖機能 100 μg/kg/day 胎児 400 μg/kg/day	適
	Seg. II	ラット	皮下	無影響量：母動物 480 μg/kg/day 胎児・産児 480 μg/kg/day	適
		ウサギ	皮下	無影響量：母動物 25 μg/kg/day 胎児 25 μg/kg/day	適
	Seg. III	ラット	皮下	無影響量：母動物 30 μg/kg/day 産児 120 μg/kg/day	適
局所刺激性試験	局所刺激性	ウサギ	皮膚 眼粘膜	皮膚一次刺激性、皮膚累積刺激性及び眼粘膜一次刺激性は認められなかった	適
		ウサギ a)	皮膚 眼粘膜	フィブラスト®スプレー添付溶解液中の防腐剤に起因する軽度な皮膚刺激性が認められたのみであった。眼粘膜一次刺激性は認められなかった	適
	感作性（光毒性及び光感作性）	モルモット	皮膚	遅延型アレルギー性皮膚反応（紅斑、浮腫）は認められなかった（光毒性及び光感作性は認められなかった）	適
抗原性試験		モルモット	皮内 静脈内	KCB-1 で感作した動物に対して、KCB-1 は明らかな免疫原性を示したが、陽性対照物質のヒトアルブミンと比較すると明らかに弱かった。また、熱及び光劣化品による新たな抗原性と宿主たん白との交差反応性は認められなかった	適
		ヒツジ赤血球	*In vitro* 添加		適
発熱性試験		リムラステスト		製剤中の凝固促進物質（白糖）による偽陽性反応が認められた	適
		ウサギ	静脈内	1000 μg/kg 以下で陰性であった	適

a) 凍結乾燥品（フィブラスト®スプレー）の熱及び光劣化品での評価

2.4.4.2 KCB-1 HPC 製剤の局所刺激性試験

資料番号 4.2.3.6-1、4.2.3.6-2

歯周組織欠損部投与を臨床適用経路とする本剤を開発するにあたり、投与部位である口腔内組織に対する局所刺激性を明らかにする必要があると判断し、ラットにおける口腔粘膜刺激性試験及びイヌにおける歯肉一次刺激性試験を実施した。KCB-1 HPC 製剤をラットに 2 週間反復口腔内投与したところ、口腔粘膜、舌、喉頭部、食道に毒性を示唆する変化は認められなかった。また、KCB-1 HPC 製剤の臨床適用局所に対する一次刺激性を調べるために、KCB-1 HPC 製剤をイヌの歯槽粘膜下あるいは歯槽骨欠損部に単回投与した。歯槽粘膜下投与では骨膜の骨芽細胞様細胞の増生、粘膜固有層の血管新生、線維芽細胞様細胞の遊走及び小円形細胞浸潤が認められた。また、歯槽骨欠損部投与では歯槽骨の線維芽細胞様細胞の増生、間葉系細胞増生、海綿状骨形成及び骨芽細胞様細胞の増生が認められた。これらの病理組織学的変化は KCB-1 の薬理作用に起因した変化と考えられた。

2.4.5 総括及び結論

歯周炎により破壊された歯周組織を再生するためには、歯槽骨の再生と結合組織性付着の獲得が必要であり、歯周組織欠損部位で未分化間葉系細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞及びそれらの前駆細胞の遊走・増殖・分化、細胞外基質産生の促進並びに新生血管形成を促進させることが重要と考えられている。KCB-1 は種々の細胞の遊走・増殖を促進するほか、強力な血管新生作用を持つことが報告されており、歯周組織の再生治療において有用な薬剤になり得ると考え、各種非臨床試験を実施した。

効力を裏付ける試験として、イヌ歯周組織欠損モデルを用いて歯周組織再生作用を検討した。KCB-1 HPC 製剤は新生骨の形成を 0.1%以上の濃度で有意に促進した。また、0.3% KCB-1 HPC 製剤の投与により、骨塩量は対照 HPC 製剤群に対して投与 2 ヵ月後から有意に増加し、13 ヵ月後までこの差が維持された。これらの結果から、KCB-1 は歯槽骨の再生促進作用を有するとともに、再生した歯槽骨は長期間維持されることが明らかとなった。投与 13 ヵ月後の新生骨の海綿骨の骨梁微細構造は、対照 HPC 製剤群の自然治癒で形成された新生骨と同等であった。この結果から KCB-1 により増加した新生骨は、最終的に既存骨と一体化すると考えられた。組織学的な評価から、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では結合組織性付着が形成され、新生セメント質長及び新生歯根膜長は、対照 HPC 製剤群に対していずれも有意に増加した。また、投与 13 ヵ月後では再生した歯根膜は新生骨の高さと同等であり、KCB-1 により歯根膜と歯槽骨がともに再生したことが示された。欠損窩底から内縁上皮までの距離は、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では有意に増加しており、歯肉内縁上皮は歯冠側に保たれていた。これにより、KCB-1 は結合組織性付着の形成量を増加させることによって、フラップ手術後に頻出する歯肉内縁上皮の深行増殖や歯肉の退縮を抑制することが期待された。なお、KCB-1 の投与により骨性癒着はみられなかった。これらの結果から、KCB-1 は、歯周組織欠損部への投与により新生骨、セメント質及び歯根膜の形成を促進させ、歯槽骨と結合組織性付着をともに再生させることが明らかとなった。再生した組織は、自然治癒によるものと同質であると考えられた。

歯周組織の再生を促進する機序に関する検討から、歯周組織欠損部に投与した KCB-1 は、歯槽骨、歯根膜及び象牙質に分布して、分化能を維持した状態で骨髄及び歯根膜由来の細胞の増殖や遊走を促進するとともに血管を新生させ、欠損部を細胞で満たし再生を促進すると推察された。増殖した細胞は、KCB-1 消失後に BMP-2 を介して分化・成熟して新生骨を形成するとともに、セメント質及び歯根膜を形成して、結合組織性付着を伴う歯周組織を再生すると考えられた。

KCB-1 HPC 製剤をイヌの歯周組織欠損部に投与したときの KCB-1 の血中移行率は 0.1%であり、KCB-1 の全身への移行量は僅かであると推定された。また、ラットに KCB-1 HPC 製剤を経口投与したときの血清中 KCB-1 濃度は定量下限未満であり、消化管吸収による全身移行は認められなかった。^{125}I-KCB-1 HPC 製剤をウサギの歯周組織欠損部に投与したときの投与部位における放射能残存率は、投与後 30 分で 97.7%、投与後 6 時間で 83.1%、投与後 24 時間で 73.4%、投与後 3 日で 44.3%、投与後 7 日で 21.2%であった。更に投与後 21 日では 0.2%に減少し、放射能の大部分が投与部位から消失した。口腔への分布率は投与後 6 時間の 0.6%が最大であり、24 時間以降は 0.1%以下に減少したことから、KCB-1 が口腔に漏出する量は少ないと考えられた。投与局所の分布を明らかにするためにラット歯周組織欠損部におけるミクロオートラジオグラム及び免疫染色を検討した結果、KCB-1 は投与部位の歯根膜、歯槽骨、象牙質及び歯肉結合組織に分布することが確認された。^{125}I-KCB-1

HPC 製剤をウサギ歯周組織欠損部又はラットの歯肉内に投与したとき、投与部位では未変化体の分子量に相当する放射性たん白質と低分子化された 3 種のヘパリン結合性の放射性たん白質が検出された。これらのうち生物活性体の占める割合は高かった。したがって、歯根膜、歯槽骨、象牙質及び歯肉結合組織には投与された KCB-1 が生物活性を保持した形で分布すると推定された。更に低分子化されたヘパリン結合性代謝物が確認されたことから、KCB-1 は投与部位で代謝され、ヘパリン結合性を失った KCB-1 代謝物は血中へ移行すると考えられた。^{125}I-KCB-1 HPC 製剤をラットの歯肉内に投与したとき、放射能の大部分は尿中へ排泄され、尿中の高分子体は 0.1%と僅かであったことから、血中へ移行した KCB-1 代謝物は低分子化を受けて尿へ排泄されると考えられた。

本剤は口腔内局所に適用する薬剤であることから、局所刺激性試験としてラットにおける口腔粘膜刺激性試験及びイヌにおける歯肉一次刺激性試験を実施し、本剤の口腔に対する安全性を評価した。KCB-1 HPC 製剤が投与部位から漏出した場合の口腔及び食道粘膜に対する影響を調べるため、0.3% KCB-1 HPC 製剤をラットに 2 週間反復口腔内投与した結果、口腔粘膜、舌、喉頭部、食道において肉眼的及び組織学的に局所障害性を示唆する所見は認められなかった。また臨床適用局所に対する一次刺激性を調べるために、イヌの歯槽粘膜下あるいは歯槽骨欠損部位に 0.1%及び 0.8% KCB-1 HPC 製剤をそれぞれ単回投与した。いずれの投与量及び投与部位でも投与後の肉眼観察では投与局所の腫張が、病理組織学的検査では KCB-1 の薬理作用に起因したと考えられる変化が認められたのみで、KCB-1 HPC 製剤の一次刺激性を示唆する所見は認められなかった。

これらの結果から､本剤を口腔内局所に適用した場合の毒性の発現は低いと推察された。なお、KCB-1 は腫瘍細胞の増殖及び転移に対して促進作用を有しており、臨床使用においては注意を要するとフィブラスト®スプレーの審査時に判断されている。本剤についても、血中移行性は低いが、腫瘍細胞に対する促進作用を考慮して同様な使用上の注意が必要と考える。

以上の非臨床試験成績より、KCB-1 は歯周組織の未分化間葉系細胞に対する増殖促進作用及び血管新生作用に基づく歯周組織再生促進効果を持つことを明らかにした。また、KCB-1 の口腔への漏出が少なく、口腔内投与部位での一次刺激性もみられないこと、更に全身移行性は極めて低いことから、歯周組織再生療法で安全に使用し得る有用な薬剤となることが期待される。

2.4.6 参考文献

1. Gault P. Idiopathic ankylosis-resorption: diagnosis and treatment. Int Orthod. 2013; 11(3): 262-77.
2. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000. 2006; 40: 11-28.
3. Ishikawa I, Iwata T, Washio K, Okano T, Nagasawa T, Iwasaki K, et al. Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. Periodontol 2000. 2009; 51: 220-38.
4. Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. Periodontol 2000. 2009; 50: 127-53.
5. Baird A, Esch F, Mormède P, Ueno N, Ling N, Böhlen P, et al. Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. Recent Prog Horm Res. 1986; 42: 143-205.
6. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocr Rev. 1987; 8: 95-114.
7. O'Keefe EJ, Chiu ML, Payne RE Jr. Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor. J Invest Dermatol. 1988; 90: 767-9.
8. Baird A and Böhlen P. Fibroblast growth factor. In Sporn MB and Roberts AB (eds), Peptide Growth Factors and Their Receptors. Vol. 1. Springer-Verlag, New York, 369-418, 1991
9. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science. 1987 Jan 23; 235(4787): 442-7.
10. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83: 7297-301.
11. Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S, Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. J Bone Miner Res. 1993; 8: 919-29.
12. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res. 1997; 12: 1606-14.
13. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. Endocrinology. 1994; 135: 774-81.
14. Nishimura, F. and Terranova, V.P. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. J Dent Res, 1996; 75: 986-92.
15. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 1997; 32: 667-75.
16. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. J Periodontal Res. 2003; 38: 97-103.
17. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by

FGF-2 (bFGF) in primate models. J Dent Res. 2001; 80: 2075-9.
18. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Koch G. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J Periodontal Res. 1988; 23: 107-17.
19. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol. 1982; 9(3): 257-65.
20. Aukhil I, Iglhaut J. Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures. J Clin Periodontol. 1988; 15: 374-82.
21. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. J Periodontol. 2001; 72(3): 314-23.
22. Fang TD, Salim A, Xia W, Nacamuli RP, Guccione S, Song HM, Carano RA, Filvaroff EH, Bednarski MD, Giaccia AJ, Longaker MT. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res. 2005; 20: 1114-24.
23. Tweden KS, Spadone DP, Terranova VP. Neovascularization of surface demineralized dentin. J Periodontol. 1989; 60(8): 460-6.
24. Caton JG, DeFuria EL, Polson AM, Nyman S. Periodontal regeneration via selective cell repopulation. J Periodontol. 1987; 58(8): 546-52.
25. Tsunoda S, Nakamura T, Sakurai H, Saiki I. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. Cancer Sci. 2007; 98; 541-548.