リティンパ耳科用250μgセット

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2）

2.4　非臨床試験の概括評価

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
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 4
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 4
2.4.2.2 副次的薬理試験 5
2.4.2.3 安全性薬理試験 5
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 6
2.4.3 薬物動態試験 6
2.4.3.1 吸収 6
2.4.3.2 分布 6
2.4.3.3 代謝 6
2.4.3.4 排泄 6
2.4.3.5 薬物相互作用 7
2.4.4 毒性試験 7
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 7
2.4.4.2 トラフェルミン（遺伝子組換え）の局所刺激性試験（聴器毒性試験） 7
2.4.4.3 鼓膜用ゼラチンスポンジの安全性試験 7
2.4.5 総括及び結論 7
2.4.6 参考文献一覧 9

略語・略号一覧

略語・略号	内容
ABR	聴性脳幹反応（Auditory Brain-stem Response）
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor）
dB	デシベル（Decibel）音の大きさの単位
dB SPL	音圧をデシベル（音圧閾値）で表した単位
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
MRD	Minimum Required Dilution
V79	チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞（V79）

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

リティンパ耳科用250μgセット（以下、本剤）を用いた鼓膜再生療法（以下、本療法）は、トラフェルミン（遺伝子組換え）を浸潤させた生体吸収性材料のゼラチンスポンジを鼓膜穿孔の大きさ・形状にあわせて整形し、穿孔縁を新鮮創化した鼓膜穿孔部に留置し、フィブリン糊で接着・閉鎖させることにより、穿孔した鼓膜を再生させる治療法である。

鼓膜穿孔は、中耳炎、鼓膜チューブ挿入術、外傷などが原因で生じる。鼓膜穿孔に対し、現在、さまざまな鼓膜閉鎖療法が試みられている。しかし、大きな穿孔にも適応できる鼓膜形成術は、侵襲性が高いなどの問題があり、一方、侵襲性が低い種々の鼓膜閉鎖療法は、複雑な形状の穿孔や大きな穿孔への適応が困難であるなどの問題がある。これに対し、本療法は、あらゆる形状・大きさの穿孔に対しても適応でき、侵襲性が低い簡便な処置にて鼓膜閉鎖が期待できる新しい治療法である。

本療法で用いるトラフェルミン（遺伝子組換え）は、褥瘡や皮膚潰瘍の創傷治療剤として製造販売承認（2001年4月4日）を取得し、既に国内でフィブラスト®スプレー250/500として販売されている。ゼラチンスポンジは、止血剤として広く用いられている。併せて使用するフィブリン糊は、生理的組織接着剤として、既に国内で販売されている（[redacted]）。

本剤の非臨床試験について、薬理試験での効力を裏付ける試験は、モルモットの鼓膜穿孔モデルにおいてトラフェルミン(遺伝子組換え)の薬効を評価した。なお、モルモットがbFGFの薬理効果を評価する動物モデルのひとつとして適切であると考えた理由は、①ラット及びモルモットとヒトのbFGFアミノ酸配列との相同性は高く、それぞれ96.8%及び91.6%であること、②ヒトbFGFに対して作製されたポリクローナル抗体がモルモットbFGFと結合すること及び③bFGFの生物活性指標として広く用いられているウシ内皮細胞におけるplasminogen activator産生に対し、ヒト及びモルモットbFGFは同程度の効果を示すことなどによる。また、安全性薬理試験は、既承認製剤の初回承認時に評価済みであることから新たな試験は実施していない。薬物動態試験については、鼓膜穿孔を施したモルモットの鼓膜穿孔部位にトラフェルミン(遺伝子組換え)含浸ゼラチンスポンジを局所投与したときの吸収性（全身曝露）について評価した。それ以外の試験は、安全性薬理試験と同様な理由から新たな試験を実施していない。

毒性試験については、トラフェルミン(遺伝子組換え)の鼓膜適用における安全性として、モルモットにおける聴器毒性試験を実施した。また、今回、本療法専用の鼓膜用ゼラチンスポンジを新たに開発したため、「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（平成24年3月1日 薬食機発0301第20号）に準じて、生物学的安全性試験を実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

（添付資料4.2.1.1-1参、4.2.1.1-2～4.2.1.1-3）

モルモット（5匹）鼓膜穿孔モデルを用いた予備試験において、モデルの鼓膜穿孔期間の検証及び100 μg/mLのトラフェルミン(遺伝子組換え)含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間(3～8週間）に対する作用を検討した。トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを留置せず鼓膜穿孔のみを実施したSham群（5例）では、鼓膜穿孔後8週において2/5例にお

いて鼓膜閉鎖が認められなかった。一方トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを留置したトラフェルミン（遺伝子組換え）群（5例）では、留置後3週で4/5例、5週で全例において鼓膜閉鎖が認められた。ABR（聴性脳幹反応:Auditory Brain-stem Response）検査において、鼓膜穿孔によりABR反応の消失する音圧レベル（dB SPL）は上昇し、鼓膜閉鎖に伴い回復傾向を示した。Sham群で鼓膜閉鎖が認められなかった2例のモルモットでは音圧レベルの回復は認められなかった。病理組織学的検査において、Sham群とトラフェルミン（遺伝子組換え）群とでは鼓膜中間層の再生度合いに差は認められなかった。鼓膜再生効果は穿孔及び／又は留置後3～4週における鼓膜閉鎖を評価するのが妥当と考えられた。

トラフェルミン（遺伝子組換え）の用量依存性効果を検討した試験（用量設定試験）では、鼓膜穿孔後の鼓膜閉鎖を指標とし、Sham群（鼓膜穿孔のみ）、Control群（トラフェルミン（遺伝子組換え）製品の添付溶解液のみを含浸させたゼラチンスポンジ）、トラフェルミン（遺伝子組換え）の3用量群（30、100及び300 μg/mLのトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジ）の鼓膜再生に対する作用を検討した。Sham群は鼓膜穿孔後5週まで鼓膜閉鎖は認められなかった（0/4例）。Control群は留置後3週で2/4例、4及び5週で3/4例で鼓膜閉鎖が認められた。一方、トラフェルミン（遺伝子組換え）群はすべての用量群において全例に鼓膜閉鎖が認められた。100 μg/mL群では留置後3週で、30及び300 μg/mL群ではそれぞれ留置後4及び5週で全例に鼓膜閉鎖が認められた。このことから、次の検証試験では100 μg/mLの用量が妥当であると考えられた。

トラフェルミン（遺伝子組換え）の鼓膜再生効果を検証する目的で、Control 群（トラフェルミン（遺伝子組換え）製品の添付溶解液のみを含浸させたゼラチンスポンジ）とトラフェルミン（遺伝子組換え）群（トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジ）の鼓膜穿孔に対する作用を比較検討した。上記2試験の結果を踏まえ、トラフェルミン（遺伝子組換え）の用量は100 μg/mLとし、留置後の鼓膜閉鎖の観察期間は3、4及び5週とした。その結果、留置後3週において、Control群に比べトラフェルミン（遺伝子組換え）群では有意に高い鼓膜閉鎖率と鼓膜穿孔面積の有意な縮小が認められた（$P<0.05$）。一方、ABR検査では、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の留置後の鼓膜閉鎖に伴う音圧閾値及び潜時の回復程度は、低音域（8 kHz）、高音域（20 kHz）の両刺激条件においてControl群と同程度の推移を示し、Control群との間に有意差は認められなかったものの、留置後3週の低音域（8 kHz）においてトラフェルミン（遺伝子組換え）群の聴力改善例の増加傾向が認められた（Control群の聴力未改善7/15例、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の聴力未改善：2/15例；$P<0.1$）。また、病理組織学的検査による鼓膜の中間層の再生度合いでは、トラフェルミン（遺伝子組換え）群のほぼ全例（14/15例）で中間層が確認できたが、Control群（12/15例）との間に差は認められなかった。

モルモットの鼓膜穿孔モデルを用いてトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジによる鼓膜再生効果を検証した結果、留置後3週において有意に高い閉鎖率を示したことから、トラフェルミン（遺伝子組換え）の鼓膜再生に対する効果が認められた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当試験を実施していない。

2.4.2.3 安全性薬理試験

該当試験を実施していない。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験を実施してしない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

（添付資料4.2.2.1、4.2.2.2）

モルモット鼓膜穿孔モデルを用いて、鼓膜穿孔部位にトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを留置したときの吸収性（全身曝露）について評価した。

血清中bFGF濃度は、市販のヒトbFGF測定用ELISAキットを使用して測定した。ただし、標準物質はトラフェルミン（遺伝子組換え）を使用した。測定に先立ち、バリデーション試験を実施した。評価項目は、Minimum Required Dilution（MRD）の設定、選択性、日内再現性、日間再現性、検量線の相関性、定量下限及び定量範囲、凍結保存安定性とした。その結果、いずれの項目も判定基準を満たし､採用した測定方法はモルモット血清中のヒトbFGFの濃度測定法として信頼できるものであることを確認した。

モルモットの片耳の鼓膜を電気メスにより全穿孔し、穿孔した鼓膜にトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを留置した。群構成は、トラフェルミン（遺伝子組換え）100μg/mL群（臨床適用濃度)を中心に公比3として低用量の30 μg/mL群、高用量の300 μg/mL群を設け、さらに、トラフェルミン（遺伝子組換え）製品の添付溶解液のみを含浸させたゼラチンスポンジを留置した群（Control群）及び鼓膜穿孔のみを処置した群（Sham群）の5群を設定した。血清中bFGFの濃度は、Control群及びSham群を含め全群ともに留置後1時間に上昇した。その後24時間以内に留置前値まで低下し、再び留置後7日以降で全群ともに上昇がみられた。このようなbFGF濃度の変動は、モルモット内因性bFGFによるものと推察された。

トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを鼓膜穿孔部位に留置したとき、モルモット内因性と考えられるbFGFの変動が認められたが､留置されたトラフェルミン（遺伝子組換え）に由来する血清中bFGFは明確には検出されなかった。

以上の結果から、トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを鼓膜穿孔部位へ留置したときの血清中bFGF濃度の変動はモルモット内因性bFGFを検出したものであり、留置部位から全身循環への移行はほとんどないか、あっても極めてわずかであろうと推察された。

2.4.3.2 分布

該当試験を実施していない。

2.4.3.3 代謝

該当試験を実施していない。

2.4.3.4 排泄

該当試験を実施していない。

2.4.3.5 薬物相互作用

該当試験を実施していない。

2.4.4 毒性試験

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

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250/500 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）に審査されている。

2.4.4.2 トラフェルミン（遺伝子組換え）の局所刺激性試験（聴器毒性試験）

（添付資料 4.2.3.6）

トラフェルミン(遺伝子組換え)製剤[■■■■■■■■■■■■■■■■]100 μg/mL（臨床適用濃度）をモルモット（Slc:Hartley、雄 10 匹/群）の中耳腔内（片耳）に投与容量 0.1 mL/body で 1 回/週、4 回投与し、本剤の聴覚器に対する影響を検討した。対照群にはトラフェルミン(遺伝子組換え)製剤の添付溶解液を同様に投与した。評価項目は一般状態、体重、聴覚脳幹反応（ABR）検査、聴覚器の病理組織学的検査、蝸牛（有毛細胞）の走査型電子顕微鏡検査とした。

その結果、ABR 閾値は対照群、被験物質群とも投与前値より上昇がみられたが、両者に統計学的な有意差はなかった。しかし、被験物質群の 2/10 例では 90 dB の音圧刺激条件下でも ABR 波形がみられなかった。2 例のうち 1 例は病理組織学的検査が実施され蝸牛管の外有毛細胞の極く軽度の消失が、他の 1 例では電子顕微鏡検査が実施され外有毛細胞の不動毛の中等度の消失が認められた。被験物質群の残り 8/10 例については ABR 検査及び聴覚器の病理組織学的検査において特記すべき異常は認められなかった。

これらの変化は投与条件が動物にとって過酷であったことから被験物質の高濃度曝露の可能性が推察される。ヒトへの適用法及び bFGF の聴覚器への影響に関する文献情報を考え合わせると、本剤の臨床適用経路において聴器毒性が懸念される可能性は低いと考えられた。

2.4.4.3 鼓膜用ゼラチンスポンジの安全性試験

（添付資料 4.2.3.7-1～7）

鼓膜用ゼラチンスポンジは、本療法専用のゼラチンスポンジである。このため、「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（平成 24 年 3 月 1 日 薬食機発 0301 第 20 号）に準じて、鼓膜用ゼラチンスポンジの生物学的安全性試験（細胞毒性試験、皮膚感作性試験、皮内反応試験、4 週間埋植全身毒性試験、遺伝毒性試験）を実施した。いずれの試験においても異常は認められず、鼓膜用ゼラチンスポンジの安全性に問題はないものと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

薬理試験では、モルモット鼓膜穿孔モデルを用いて、3 試験（予備試験、用量設定試験及びトラフェルミン（遺伝子組換え）の薬効を評価した試験）を実施した。

予備試験での鼓膜穿孔後 3～8 週の観察期間において、Sham 群では、鼓膜穿孔後 8 週におい

ても鼓膜閉鎖がみられなかった動物が観察されたのに対し、トラフェルミン（遺伝子組換え）群では鼓膜穿孔後3週でほとんどの、5週ですべての動物で鼓膜閉鎖が認められた。ABR検査では、鼓膜穿孔によりABR反応の消失する音圧レベルは上昇し、鼓膜閉鎖に伴い回復傾向を示したが、Sham群で鼓膜閉鎖が認められなかった動物では音圧レベルの回復も認められなかった。

用量設定試験では、トラフェルミン（遺伝子組換え）30、100及び300 μg/mL含浸ゼラチンスポンジ群の鼓膜再生に対する作用を検討した。Sham群は鼓膜穿孔後5週まで鼓膜閉鎖は認められなかった。Control群は留置後3週で2/4例、4及び5週で3/4例で鼓膜閉鎖が認められた。一方、トラフェルミン（遺伝子組換え）群はすべての投与群において全例に鼓膜閉鎖が認められ、100 μg/mL群では留置後3週で、30及び300 μg/mL群ではそれぞれ留置後4及び5週で全例に鼓膜閉鎖が認められた。

予備試験及び用量設定試験の結果から、モルモットの例数を増やしControl群及び100 μg/mL群の鼓膜閉鎖率、ABR及び病理検査に対する作用を検討した。留置後3週において、Control群に比べトラフェルミン（遺伝子組換え）群では高い鼓膜閉鎖率と鼓膜穿孔面積の縮小が認められた。一方、ABR検査では、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の留置後の鼓膜閉鎖に伴う音圧閾値及び潜時の回復程度は、低音域(8 kHz)、高音域(20 kHz)の両刺激条件においてControl群と同程度の推移を示し、Control群との間に有意差は認められなかったものの、留置後3週の低音域においてトラフェルミン（遺伝子組換え）群の聴力改善例の増加傾向が認められた。また、病理組織学的検査による鼓膜の中間層の再生度合いでは、トラフェルミン（遺伝子組換え）群のほぼ全例で中間層が確認できたが、Control群との間に差は認められなかった。

鼓膜穿孔に対するbFGFの鼓膜閉鎖に関する作用機序については、bFGFは主に上皮層に存在しているbFGF受容体に作用して[1)]、内皮細胞、線維芽細胞及びケラチノサイトの増殖や分化を刺激し、上皮下結合組織の迅速な増殖を促すことで穿孔した鼓膜を修復すると考えられている[2),3),4)]。また、bFGFは血管新生作用も有しており[5)]、この作用が鼓膜への血流量を増加することから、障害を受けた鼓膜の修復をさらに促進すると推測される。

以上より、モルモットの鼓膜穿孔モデルを用いてトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジによる鼓膜の再生の効果を検証した結果、臨床投与量に相当するトラフェルミン（遺伝子組換え）量（100 μg/mL）の留置後3週から鼓膜閉鎖率及び鼓膜穿孔面積の縮小が認められ、鼓膜閉鎖が認められたほとんどの動物においては聴力機能の改善も認められたことから、本療法を用いることにより鼓膜穿孔患者に対して自然な鼓膜再生効果が期待される。

薬物動態試験ではモルモットの穿孔した鼓膜部位への局所投与試験において、トラフェルミン（遺伝子組換え）群のみならず、Sham群及びControl群の血清中bFGF濃度は、留置後1時間にピーク値を示した後低下し、その後再び上昇するという変動を示した。これらの変動は、いずれの群においても認められたことから、鼓膜及び／又は採血部位の治癒過程におけるモルモット内因性bFGFの変動を検出しているものと考えられた。トラフェルミン（遺伝子組換え）群の留置後1時間の血清中bFGF濃度は、Sham群及びControl群に比べ高値を示したが、公比3で設定した投与量と相関が言える程の濃度差は認められず、また、留置後7日のSham群の血清中bFGF濃度と同程度であった。このように、留置後1時間の血清中bFGFの濃度レベルはモルモット内因性bFGFの変動の範囲程度と考えられ、トラフェルミン（遺伝子組換え）投与に由来する血清中bFGFは明確には検出されなかった。

以上の結果から、トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを鼓膜穿孔部位へ留置したときの血清中bFGF濃度の変動は内因性bFGFを検出したものであり、留置部位から全身循環への移行はほとんどないか、極めてわずかなものであろうと推察された。

上記薬物動態試験結果からトラフェルミン（遺伝子組換え）のモルモットの鼓膜穿孔内留置時の曝露量は極めて少ないものと考えられることから、トラフェルミン（遺伝子組換え）を鼓

膜穿孔患者に適用しても全身曝露に基づく新たな毒性が生じる可能性は低いものと考えられる。

毒性試験では、局所適用における安全性試験として、モルモットにおける聴器毒性試験を実施した。

本療法では、患者の鼓膜穿孔部にトラフェルミン(遺伝子組換え)製剤を含浸させた鼓膜用ゼラチンスポンジを留置するが、聴器毒性の評価には中耳腔への曝露条件を一定にするため、トラフェルミン（遺伝子組換え）製剤を直接中耳腔内に投与する方法を用いて検討した。その結果、聴覚脳幹反応（ABR）検査の被験物質群の2/10例で90 dBの音圧刺激条件でもABR波形がみられなかった。2例のうち1例は病理組織学的検査で蝸牛管の外有毛細胞の極く軽度の消失が、残り1例は走査型電子顕微鏡検査で外有毛細胞の不動毛の中等度の消失が認められた。被験物質群の残り8/10例についてはABR検査及び聴覚器の病理組織学的検査において特記すべき異常は認められなかった。

本療法のTRIENT1328試験における最大投与量は1 μg/kg（約60 μg/man/60 kg）であった（2.7.4.1.2)。今回の聴器毒性試験におけるモルモットの投与量と体重換算して比較すると、モルモットへの投与容量0.1 mL（10 μg/body/500 g）ではヒトでの投与量の20倍量（20 μg/kg）を投与したことになる。内耳の外有毛細胞の消失が本剤の影響と考えると蝸牛内リンパ液への被験物質の高濃度曝露の可能性が推察される。この原因は明らかではないが、被験物質の中耳腔内貯留時間の個体差、正円窓膜の透過性の変化あるいは、被験薬投与の技術的問題などが原因として推察される。Kase[6]らがモルモットにゼラチンスポンジを鼓膜切開した中耳に留置し、臨床適用濃度の20倍のbFGFを注入し（1回/2日×4回)、異常を認めなかったことを考えると、今回の試験の投与条件(中耳への直接投与、過剰な投与容量等)が動物にとって過酷であった可能性がある。

TRIENT1328試験では全例(20例)に純音聴力検査が実施されたが、観察期4週目及び16週目の聴力改善の割合はいずれも100%（20/20例）で、全例に聴力改善を認めた（2.7.3.2)。ヒトへの適用法及びbFGFの聴覚器への影響に関する文献情報を考え合わせると、本剤の臨床適用経路において聴器毒性が懸念される可能性は低いと考えられる。

鼓膜用ゼラチンスポンジの毒性試験では、細胞毒性、皮膚感作性、皮内反応、埋植亜急性全身毒性及び遺伝毒性試験を実施した結果から安全性に問題はないものと考えられる。

2.4.6 参考文献一覧

1) Kakigi A, Uchida A, Nishimura M, Takeda T, Takeda S and Nakatani H, Expression of fibroblast growth factor receptors 1-4 in human chronic tympanic membrane perforation, J Otorhinolaryngol Relat Spec 2010;71(Suppl 1):67-70.
2) Mondain M and Ryan A, Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application, Laryngoscope 1993; 103:312-8.
3) DeLapp NW and Dieckman DK, Effect of basic fibloblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factors type I (IGF-I) and type II (IFG-II) on adult human keratinocyte growth and fibronectin secretion, J Invest Dermatol 1990;94:777-80.
4) Ledoux D, Gannoun-Zaki L and Barritault D, Interactions of FGFs with target cells, Prog Growth Factor Res 1992;4:107-20.
5) Mondain M and Ryan A, Effect of basic fibroblast growth factor on normal tympanic membrane, Am J Otolaryngol 1994;15:344-50.
6) Kase K,et al. Influence of topical application of basic fibroblast growth factor upon inner ear. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008 ;138:523-7