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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

ノーベルファーマ株式会社

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

ノーベルファーマ株式会社

目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

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、あらゆる大きさ・形状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。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。

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.2.1 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間に関する検討（予備試験） 5
2.6.2.2.2 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生に関する用量の検討（用量設定試験） 7
2.6.2.2.3 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生、ABR及び鼓膜中間層再生度に対する作用 9
2.6.2.3 副次的薬理試験 14
2.6.2.4 安全性薬理試験 14
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 14
2.6.2.6 考察及び結論 14
2.6.2.7 引用文献 16

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
HE	ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin-Eosin）
NPC-18	トラフェルミン（遺伝子組換え）、添付溶解液及びゼラチンスポンジの構成品

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

リティンパ耳科用250μｇセット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。

本項では、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）を含浸させたゼラチンスポンジを留置したときのトラフェルミン（遺伝子組換え）の薬効を評価した。

モルモット（5 例）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）を含浸させた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）群（5 例）ではトラフェルミン（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は上昇し、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［Control群の閉鎖率：33.3%（5/15例）、トラフェルミ

ン（遺伝子組換え）群の閉鎖率：80.0%（12/15例）；P<0.05］と鼓膜穿孔面積の有意な縮小が認められた（Control 群の穿孔面積：9.2±3.7%、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の穿孔面積：1.0±0.5%；P<0.05)。一方、ABR検査では、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の投与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。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間に関する検討（予備試験）

（添付資料4.2.1.1-1参）

5週齢のHartley系モルモット5匹を使用した。動物に三種混合麻酔薬［塩酸メデトミジン（0.25 mg/kg)、ミダゾラム（1.0 mg/kg)、酒石酸ブトルファノール（0.25 mg/kg)］を大腿部筋肉内に投与（投与液量：0.7 mL/kg）した。麻酔後、実体顕微鏡下で電気メスを用いて鼓膜全域を穿孔した（両耳)。鼓膜穿孔後直ちに穿孔部位に100 μg/mL 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)。また、鼓膜穿孔のみを実施した群をSham群とした。群構成は、1匹につき片耳をSham群、反対側の片耳をトラフェルミン（遺伝子組換え）群の2群を設け、各群のデータ取得例数は5例とした。

鼓膜閉鎖の有無及び鼓膜全体の面積に対する穿孔部分の面積の割合（%）は実体顕微鏡下にスケッチした記録より、鼓膜及び穿孔部分の外周をエリアラインメーターでトレースし、鼓膜全体及び穿孔部分の面積を求めることにより算出した。測定時期は鼓膜穿孔手術前2日、手術日及び手術後1週間間隔で1～8週まで鼓膜の閉鎖が確認されるまでとした。

ABR検査については、動物を鼓膜穿孔手術時に用いた三種混合麻酔薬投与によりで麻酔後、腹位に固定し、関電極として刺激側の外耳付近の頭部皮下、不関電極として対極側の外耳付近の頭部皮下、アース電極として頸部皮下にそれぞれ針電極を装着させた。それぞれの針電極をバイオアンプに誘導してデータ収録・解析システムを用いて音刺激により誘発されるABRを記録した（両耳)。音刺激は、coupler type speakerの音出力パイプを片側外耳道に挿入してTDT音響システム（ZBus for system3、Tucker-Davis Technologies,Inc.）より与えた（音刺激条件：10 - 90 dB、音の種類：8 kHz及び20 kHzのTone burst)。音刺激により誘発されるABRはバイオアンプを介してデータ収録・解析システムに誘導して記録した（記録設定：Sampling

time：12.8 msec、Sampling rate：100 kHz、Bandpass filter：1 - 3000 Hz、加算回数 250 回)。最初に 90 dB の音圧を与えて ABR を記録し、その後 10 dB ずつ減少させて、反応の消失する音圧（dB SPL）を求めた。また、聴覚毒性の指標として Wave I～V の潜時（msec）を計測した。測定時期は、手術前（鼓膜穿孔 2 日前)、手術日（鼓膜穿孔直後）及び術後 4、5、6、7、8 週（許容範囲：± 1 日）とした。なお、測定終了後の動物は、麻酔の拮抗薬（アチパメゾール）を大腿部筋肉内に投与した（0.5 mg/body)。

病理組織学的検査による「鼓膜の中間層の再生度合い」の評価に関しては、術後 8 週の ABR 測定の翌日に、動物の大腿部筋肉内に三種混合麻酔薬を投与（投与液量：0.7 mL/kg）し、麻酔後、腹大動脈から放血により安楽死させ、外耳道から中耳を含む標本を摘出し 10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。固定された標本（外耳道から中耳を含む）は、K-CX 脱灰液で脱灰した。その後、常法に従いパラフィン包埋後、鼓膜の切片（約 3 μm）を作成し、HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色組織標本を作製し、デジタルカメラを用いて写真撮影を行い、鼓膜の中間層の再生度合いについて病理組織学的検査を行った。

モルモット鼓膜穿孔モデルにおける鼓膜再生に対するトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジ留置の作用に関し、鼓膜全体の面積に対する穿孔面積の割合（%）を算出して求めた 5 例の平均値の結果を図 2.6.2.2-1 に示した。

鼓膜全体の面積に対する穿孔面積の割合（%）は、Sham 群に比べトラフェルミン（遺伝子組換え）群では、ずっと低く術後 3 週でほとんど閉鎖した。Sham 群では 2/5 例が術後 8 週まで閉鎖が認められなかったのに対し、トラフェルミン（遺伝子組換え）群では術後 3 週で 4/5 例、5 週で全例 5/5 例が閉鎖していた。

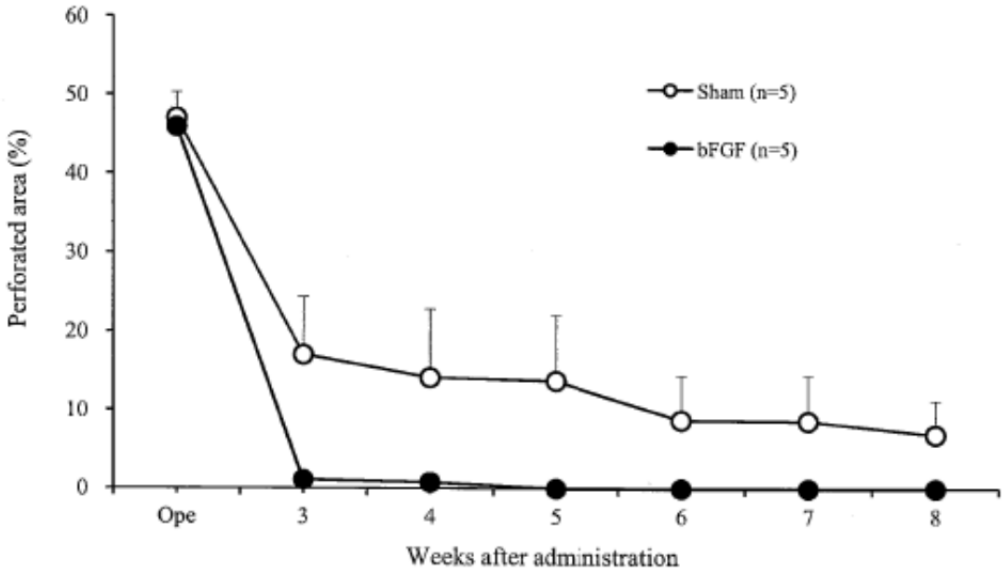


図 2.6.2.2-1 モルモット鼓膜穿孔モデルにおける鼓膜再生に対するトラフェルミン(遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジ留置の作用

mean±SEM、穿孔面積比率（%）：穿孔面積（mm^2）/鼓膜全体の面積（mm^2）

ABR 反応の消失する音圧レベル（dB SPL）を図 2.6.2.2-2 に示した。ABR 反応の消失する音圧レベル（dB SPL）については、両群ともに鼓膜の穿孔に伴い、20 及び 8 kHz の音域ともに閾値はおよそ 30 dB の上昇を示し、閉鎖塞に伴い回復傾向を示した。トラフェルミン（遺伝子組換え）群の閉鎖に伴う閾値の回復は、8 kHz の音域の方が明確であり、特に、術後 4 週では Sham 群に比べて回復傾向を示した。また、Sham 群の術後 8 週まで鼓膜が閉鎖しなかった 2 例については、術後 8 週においても音圧レベルの回復は認められなかった。

聴覚毒性の評価項目である潜時（msec）については、鼓膜の穿孔に伴い、20 及び 8 kHz の音域ともに WaveI～V の潜時は延長を示し、閉鎖に伴い回復を示した。トラフェルミン（遺伝子組換え）含侵ゼラチンスポンジ留置による潜時延長は認められなかった。従って、トラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジは聴覚毒性を誘発しないと推察される。

病理組織学的検査においては、鼓膜の中間層の再生度合いに両群で差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、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は、Sham 群と比較して最も差が認められた留置後 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る。

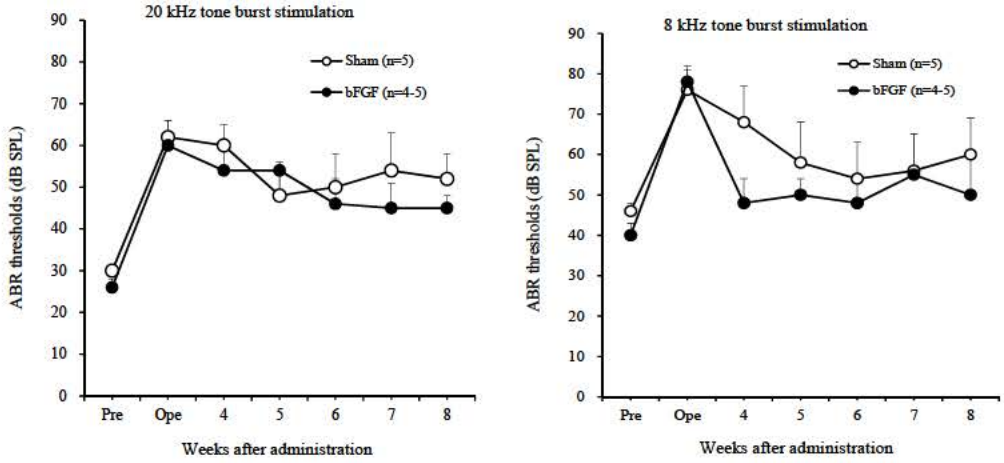


図 2.6.2.2-2 モルモット鼓膜穿孔モデルにおける ABR 反応消失音圧レベル（dB SPL）に対するトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジ留置の作用

左図：高音域側（20 kHz）、右図：低音域側（8 kHz）

2.6.2.2.2 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生に関する用量の検討（用量設定試験）

（添付資料 4.2.1.1-2）

5 週齢の Hartley 系雄性モルモット 20 匹を使用した。鼓膜穿孔モデル（片耳のみ）の作製及び鼓膜穿孔の評価方法は 2.6.2.2.1 で示した鼓膜穿孔の閉鎖の有無及び穿孔面積の割合を求めたときと同様に行った。群の構成及び投与量に関しては、各群はモルモット 4 匹とし、鼓膜穿孔のみ実施した群（Sham 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群（Control 群）、トラフェルミン（遺伝子組換え）浸含ゼラチンスポンジ群としてトラフェルミン（遺伝子組換え）の製品濃度（臨床適用濃度）の 100 μg/mL 群を中心に公比 3 で、低用量の 30 μg/mL 群、高用量の 300 μg/mL 群を設けた 3 用量群、以上の計 5 群とした。なお、鼓膜穿孔は各群 4 匹のうち 2 匹は右耳を、残り 2 匹は左耳を処置した。2.6.2.2.1 予備試験の結果から、鼓膜穿孔の観察時期は留置前 7 日（手術前）、手術日（鼓膜穿孔直後）、トラフェルミン（遺伝子組換え）含侵ゼラチンスポンジ留置後 3、4 及び 5 週とした。

鼓膜穿孔の閉鎖の有無の結果を図 2.6.2.2-3 に示した。

Sham 群では鼓膜穿孔後 5 週まで 4 例全例が閉鎖しなかった。Control 群では留置後 3 週で 2/4 例、4 週で 3/4 例が閉鎖した。トラフェルミン（遺伝子組換え）群に関し、30 μg/mL 群では留置後 3 週で 3/4 例が閉鎖し、4 週で全例が閉鎖した。 100 μg/mL 群では、留置後 3 週で全例が閉鎖した。300 μg/mL 群では、留置後 3 週で 2/3 例、5 週で 4 例全例が閉鎖した（300 μg/mL 群の 1 例は 4 週まで外耳炎による視野狭窄のため測定不能）。

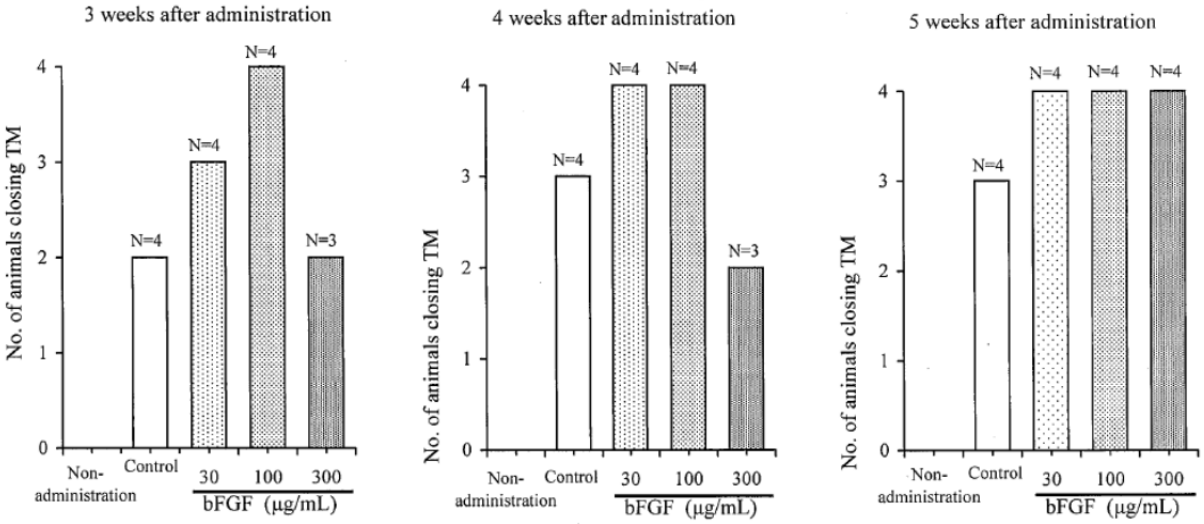


図 2.6.2.2-3 モルモット鼓膜穿孔モデルにおける鼓膜閉鎖に対するトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの用量依存性作用

各群 N=4（ただし、300 μg/mL 群では 4 週まで 4 例中 1 例において外耳炎による視野狭窄のため計測不能であったため 3 例）

鼓膜穿孔面積の割合を表 2.6.2.2-1 に示した。

Sham 群の穿孔時の穿孔面積は 52.3±1.0%で、鼓膜穿孔後 3、4 及び 5 週ではそれぞれ 33.2±6.2、30.3±6.6 及び 18.9±9.7%と経時的に減少推移を示した。Control 群では、穿孔時の穿孔面積は 49.8±0.4%で、留置後 3、4 及び 5 週でそれぞれ 3.4±3.4、1.7±1.7 及び 0.9±0.9%であった（なお、留置後 3 週において、1 例は鼓膜閉鎖の有無は観察できたものの、外耳炎による視野の狭窄により鼓膜全体像が確認できないため、面積測定はできなかった）。トラフェルミン（遺伝子組換え）群に関し、30 μg/mL 群では、穿孔時の穿孔面積は 52.4±1.1%、留置後 3 週で 0.2±0.2%であった。100 μg/mL 群では、穿孔時の穿孔面積は 48.7±1.3%、留置後 3 週では 0%であった。300 μg/mL 群では、穿孔時の穿孔面積は 54.0±1.9%であった。

留置後 3 週で 1.0±1.0%、留置後 4 週で 1.2±1.2%であった（留置後 3 週及び 4 週において、1 例が外耳炎による視野の狭窄により面積測定ができなかった)。

表 2.6.2.2-1 モルモット鼓膜穿孔モデルにおける鼓膜穿孔面積に対するトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの用量依存性作用

Group	Prepard concentration (μg/mL)	Area of perforated TM (%)			
		Weeks after administration			
		Ope	3	4	5
Non-administration	-	52.3 ± 1.0	33.2 ± 6.2	30.3 ± 6.6	18.9 ± 9.7
Control	0	49.8 ± 0.4	3.4 ± 3.4[2)]	1.7 ± 1.7	0.9 ± 0.9
bFGF	30	52.4 ± 1.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	100	48.7 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	300	54.0 ± 1.9	1.0 ± 1.0[2)]	1.2 ± 1.2[2)]	0.0 ± 0.0

%=Perforated area (mm^2)/TM area (mm^2)×100、TM: Tympanic membrane
Each value represents the mean±S.E., N=3
2): Unable to measurement because of otitis externa(one out of 3 guinea pigs)

以上結果をまとめると、トラフェルミン（遺伝子組換え）群はいずれの用量においても留置後 5 週で実験に供した動物のすべてにおいて鼓膜の閉鎖が認められた。しかし、100 μg/mL 群ではその効果発現の時期が留置後 3 週でみられ、他の投与量群に比べ早かった。従って、100 μg/mL の投与量は、臨床の至適用量として妥当であると考えられた。

2.6.2.2.3 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生、ABR 及び鼓膜中間層再生度に対する作用

（添付資料 4.2.1.1-3）

5 週齢の Hartley 系雄性モルモット 30 匹を使用した。鼓膜穿孔モデル（片耳）の作製及び鼓膜穿孔の評価方法は 2.6.2.2.1 予備試験と同様に行った。添付資料 4.2.1.1-1 参及び 4.2.1.1-2 の試験結果を基に、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時期は 3、4 及び 5 週とした。使用したモルモット 30 匹のうち、15 匹はトラフェルミン（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する群（Control 群)、残り 15 匹はトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジ（臨床適用濃度：100 μg/mL）を留置する群（トラフェルミン（遺伝子組換え）群）の 2 群に分けた。

鼓膜穿孔モデルにおける主要評価項目は「鼓膜の閉鎖率（鼓膜の閉鎖した動物匹数／使用動物匹数)」とした。また、副次的評価項目は、「穿孔面積（%)」、ABR 検査における「音圧閾値（dB SPL）及び潜時（msec)」及び留置後 5 週の病理組織学的検査における「鼓膜の中間層の再生度合い」とした。

統計学的方法に関しては、群ごとに、鼓膜の閉鎖率を算出し、鼓膜の穿孔面積（%)、音圧閾値（dB SPL）及び潜時（msec）については、平均値及び標準誤差を算出した他、参考データとして、「伝音再建後の術後聴力成績判定基準(2010)」[1)]を参考とした術前聴力から 15 dB 以上の改善を「聴力改善」とした例数を算出した。有意差検定は、観察時点ごとに Control 群とトラ

フェルミン（遺伝子組換え）群で2群間比較を行った。すなわち、主要評価項目である鼓膜の閉鎖率の他、聴力改善例については、Fisher直接検定を行った。また、副次的評価項目の鼓膜の穿孔面積（%）及び潜時（msec）については、F検定による等分散性の検定を行い、等分散の場合にはStudentの両側t検定を、等分散と認められなかった場合は、AspinWelchの両側t検定を行った。音圧閾値（dB SPL）については、Wilcoxon順位和検定を行った。

有意水準は5%とし、5%未満（P<0.05）と1%未満（P<0.01）に分けて表示した。有意差検定には、市販の統計プログラムSAS SYSTEM（SAS Software Release 9.02あるいは9.1.3；SAS Institute Japan Ltd）を使用した。

鼓膜の閉鎖率（鼓膜の閉鎖した動物匹数／使用動物匹数）及び鼓膜の全体の面積に対する穿孔面積の割合（%）に対するトラフェルミン（遺伝子組換え）の作用を図 2.6.2.2-4及び図2.6.2.2-5に示した。

Control群では、留置後3、4及び5週でそれぞれ5/15、12/15、13/15例が閉鎖した。鼓膜の穿孔面積は、穿孔時には50.6±0.9%を示し、留置後3週で9.2±3.7%、4週で2.1±1.5%、5週で0.7±0.5%を示した。

トラフェルミン（遺伝子組換え）群では、留置後3、4及び5週でそれぞれ12/15、14/15、14/15例が閉鎖した。鼓膜の穿孔面積は、穿孔時には52.7±0.6%を示し、留置後3、4及び5週でそれぞれ1.0±0.5、0.9±0.9及び0.5±0.5%を示し、Control群と比較して、留置後3週で有意に高い閉鎖率（P<0.05）を示し、穿孔面積についても有意な縮小（P<0.05）が認められた。

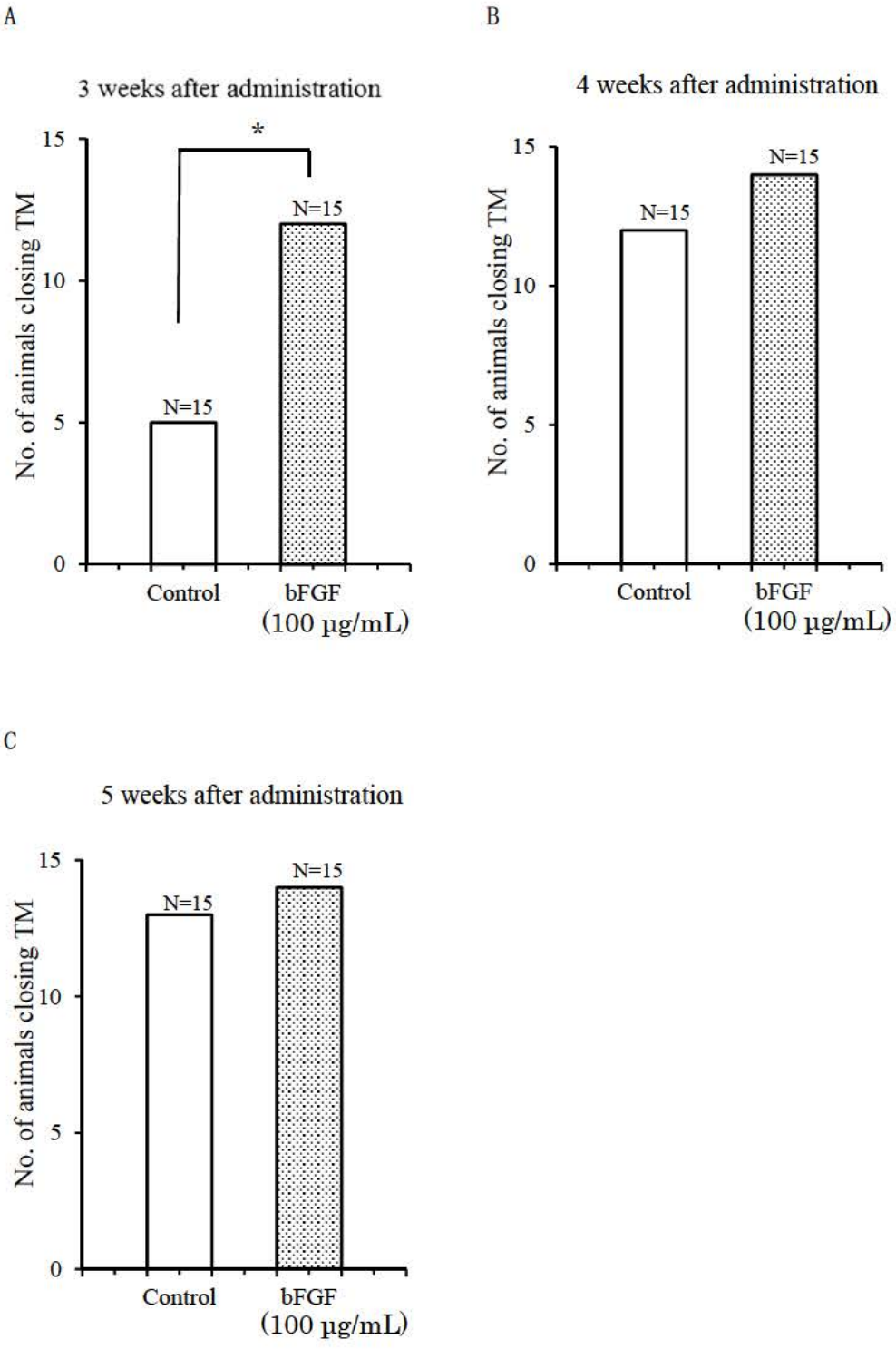


図 2.6.2.2-4 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜閉鎖作用（鼓膜閉鎖した動物数）

*: P<0.05 vs Control (Fischer's exact test)

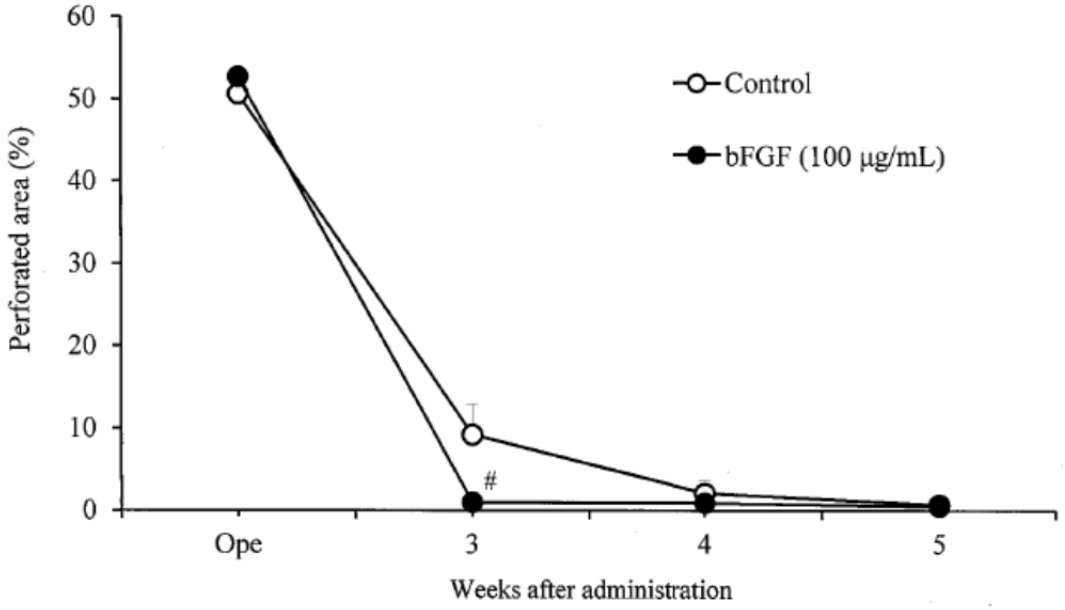


図 2.6.2.2-5 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの鼓膜閉鎖作用（鼓膜穿孔面積の割合）

Ope：鼓膜穿孔術とトラフェルミン（遺伝子組換え）含侵ゼラチンスポンジ留置との間に測定
%：穿孔部面積/鼓膜面積×100、mean±SEM、#:P<0.05 vs Control (Aspin-Welch t-test)

ABR 検査での音圧閾値（dB SPL）の結果を図 2.6.2.2-6 及び図 2.6.2.2-7 に示した。

Control 群では、音圧閾値（dB SPL）は鼓膜の穿孔に伴い閾値は上昇し、8 kHz で 75.3±1.7 dB（留置前：32.7±1.5 dB)、20 kHz で 66.7±2.3 dB（留置前：26.0±1.6 dB）を示した。留置後､鼓膜の閉鎖に伴い閾値は低下し､留置後 3～5 週まで 8 kHz で 50.0±2.4～56.7±2.5 dB、20 kHz で 54.7±2.2～60.7±2.1 dB を推移した。また、Control 群の Wave I～V 潜時は、音圧閾値の上昇に伴い延長し、留置後、音圧閾値の低下に伴い短縮した。

一方、トラフェルミン（遺伝子組換え）群では、鼓膜の穿孔に伴い閾値は上昇し、8 kHz で 75.3±1.7 dB（留置前：31.3±1.9 dB)、20 kHz で 65.3±2.6 dB（留置前：26.7±1.6 dB）を示した。留置後、鼓膜の閉鎖に伴い閾値は低下し、留置後 3～5 週まで 8 kHz で 52.7±2.1～54.0±2.4 dB、20 kHz で 57.3±2.1～60.7±2.1 dB を推移した。また、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の Wave I～V 潜時は、音圧閾値の上昇に伴い延長し、留置後、音圧閾値の低下に伴い短縮した。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、鼓膜の閉鎖率で有意な差が認められた留置後 3 週においても差はみられなかった。

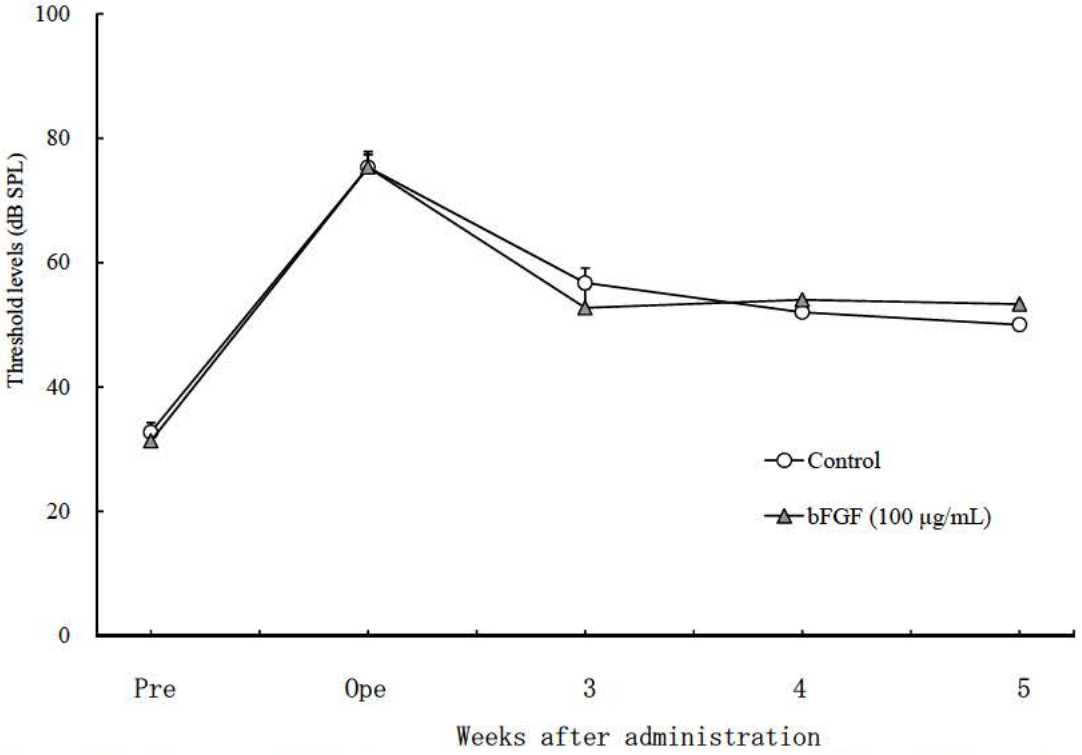


図 2.6.2.2-6 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの ABR（8 kHz）に対する作用

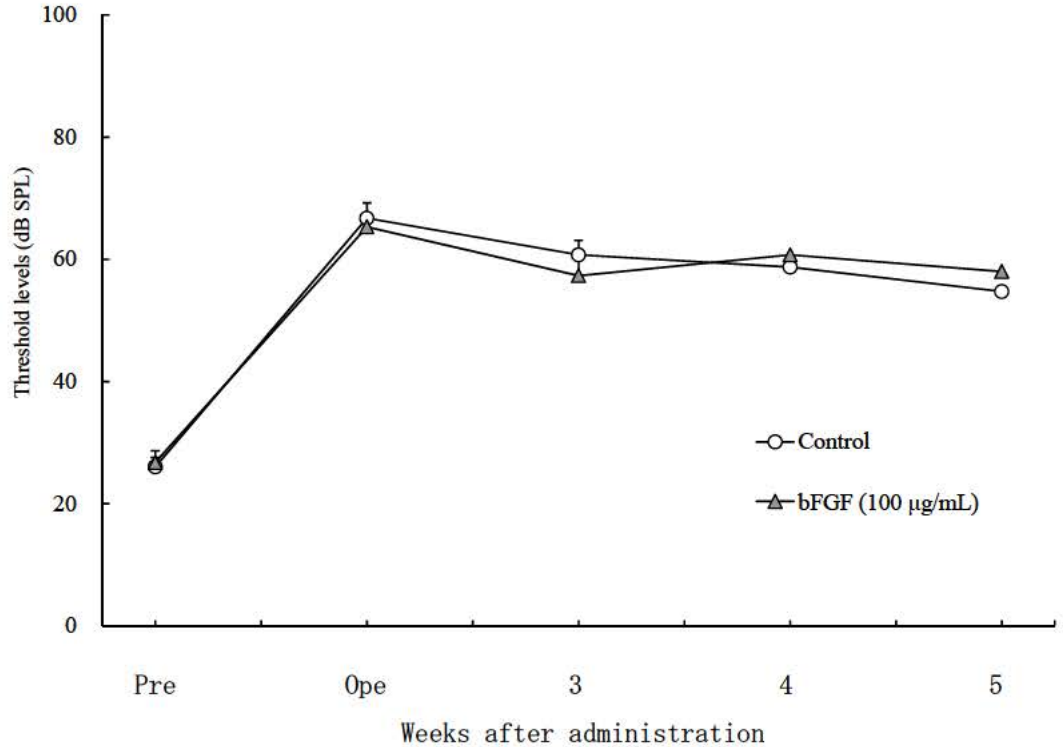


図 2.6.2.2-7 モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジの ABR（20 kHz）に対する作用

病理組織学的検査による鼓膜の中間層の再生度合いについて、トラフェルミン（遺伝子組換え）群でほぼ全例（14/15 例）で、Control 群では 12/15 例に中間層が確認（グレード；3+以上）されたが、両群での差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、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、主要評価項目の鼓膜閉鎖率に関しては留置後 3 週において有意に高い閉鎖率（Control 群の閉鎖率：33.3%：5/15 例、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の閉鎖率：80.0%：12/15 例；P<0.05）を示した。また、副次的評価項目においても留置後 3 週の鼓膜の穿孔面積で有意な縮小がみられた（Control 群の穿孔面積：9.2±3.7%、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の穿孔面積：1.0±0.5%；P<0.05）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。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 週において低音域（8 kHz）におけるトラフェルミン（遺伝子組換え）群の聴力改善例がやや多かった（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。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当試験を実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

該当試験を実施していない。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験を実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

トラフェルミン（遺伝子組換え）の用量設定試験の結果から、モルモット鼓膜穿孔モデルにおけるトラフェルミン（遺伝子組換え）の最適投与量は臨床適応濃度に相当する 100 μg/mL が妥当であると考えられた。そこで、トラフェルミン（遺伝子組換え）の 100 μg/mL 用量を用いて、モルモットの鼓膜穿孔モデルに対するトラフェルミン（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 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を留置）と比較した。主要評価項目は、留置後 3、4 及び 5 週の鼓膜の実体顕微鏡観察における「鼓膜の閉鎖率(鼓膜の閉鎖した動物匹数／使用動物匹数)」

とした。また、副次的評価項目は、「穿孔面積（%）」、ABR 検査における「音圧閾値（dB SPL）及び潜時（msec）」、留置後 5 週の病理組織学的検査における「鼓膜の中間層の再生度合い」とした。

その結果、主要評価項目の「鼓膜の閉鎖率（鼓膜の閉鎖した動物匹数／使用動物匹数）」において、トラフェルミン（遺伝子組換え）群は Control 群と比較して留置後 3 週で有意に高い閉鎖率を示した［Control 群の閉鎖率：33.3%（5/15 例）、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の閉鎖率：80.0%（12/15 例）；P<0.05］。さらに副次的評価項目である穿孔面積についても留置後 3 週における鼓膜の穿孔面積で有意な縮小が認められた（Control 群の穿孔面積:9.2±3.7%、トラフェルミン（遺伝子組換え）群の穿孔面積：1.0±0.5%；P<0.05）。Hakuba ら [2)]のモルモット鼓膜穿孔モデルでの結果では、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲル群は、鼓膜穿孔施術のみ実施した群に比べ有意な鼓膜閉鎖効果が認められた。しかし、bFGF を含まないゼラチンハイドロゲルのみの群に関しては、ある程度鼓膜閉鎖が認められたため、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲル群との間には有意な差を見出すことはできなかった。Hakuba らの試験では各群 8 匹のモルモットを用いた結果であったことから、今回の試験では、各群 15 匹のモルモットを使用した。その結果、Control 群と比較したとき、トラフェルミン（遺伝子組換え）群で有意な鼓膜閉鎖効果が認められた。これは、外因性 bFGF により鼓膜閉鎖効果が発揮されたことを示していると推察された。今回の試験結果は、モルモット、ラット及びチンチラの鼓膜穿孔モデルを用いて bFGF による鼓膜閉鎖効果を示した他の研究者によって報告された試験結果と一致していた [2)~7)]。

一方、聴力機能評価の指標として用いた ABR 検査では、鼓膜の穿孔に伴い ABR の消失する音圧レベル（音圧閾値：dB SPL）の上昇が認められた。この鼓膜の穿孔による dB SPL の上昇に対し、低音域（8 kHz）、高音域（20 kHz）の両刺激条件いずれにおいてもトラフェルミン（遺伝子組換え）含侵ゼラチンスポンジ留置後の鼓膜閉鎖に伴い、上昇した dB SPL は減少に転じた。しかし、このトラフェルミン（遺伝子組換え）群の効果は Control 群でも同程度の変化を示した。臨床のガイドライン（「伝音再建後の術後聴力成績判定基準（2010）」）[1)]では「術前聴力から 15 dB 以上の改善を聴力改善例」と定義している。この定義を参考にモルモット鼓膜穿孔モデルに応用したとき、留置後 3 週の Control 群では未閉鎖 10/15 例、聴力未改善 7 例（8 kHz）、トラフェルミン（遺伝子組換え）群では未閉鎖 3/15 例、聴力未改善 2 例となり、ABR 検査の低音域（8 kHz）におけるトラフェルミン（遺伝子組換え）群の聴力の改善傾向が認められ（P<0.1）、未閉鎖率の低下と対応する結果となった（添付資料 4.2.1.1-3、Attachment 1 及び 2 参照）。

また、病理組織学的検査による留置後 5 週における鼓膜の中間層の再生度合いについては、トラフェルミン（遺伝子組換え）群で、鼓膜閉鎖に伴いほぼ全例（14/15 例）で中間層が確認されたが、Control 群（12/15 例）との間では差が認められなかった。これは病理組織学的検査での検体採取時期が、観察終了後の留置後 5 週であり、この時期はトラフェルミン（遺伝子組換え）群と Control 群との間に鼓膜閉鎖率で差が認められなかったからと推察される。

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 [8)]、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

[6),9),10)]。また、bFGF は鼓膜の血管新生作用も有しており[11)]、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､臨床用量に相当するトラフェルミン(遺伝子組換え)(100 μg/mL)含浸ゼラチンスポンジを留置後 3 週から鼓膜閉鎖率及び穿孔面積の縮小が認められ、聴力機能の改善傾向も認められたことから、本治療法の鼓膜穿孔患者に対する鼓膜再生効果が期待される。

2.6.2.7 引用文献

1) 東野哲也、青柳 優、伊藤 吏、奥野妙子、小島博巳、他. 伝音再建後の術後聴力成績判定基準 (2010). Otol Jpn 2010;20:751-3.
2) Hakuba N, Tabata Y, Hato N, Fujiwara T and Gyo K, Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration. Otology & Neurotology 2014;35:540-4.
3) Fina M, Bresnick S, Baird A and Ryan A, Improved healing of tympanic membrane perforations with basic fibroblast growth factor. Growth Factors 1991;5:265-72.
4) Ozkaptan Y, Gerek M, Simsek S and Deveci S, Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model. Eur Arch Otorhinolaryngol 1997;254(Suppl 1):2-5.
5) Vrabec JT, Schwaber MK, Davidson JM and Clymer MA, Evaluation of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane repair. Laryngoscope 1994;104:1059-64.
6) 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.
7) Kato M and Jackler RK, Repair of chronic tympanic membrane perforations with basic fibroblast growth factor, Otolaryngol Head Neck Surg 1996;115:538-47.
8) 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.
9) 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.
10) Ledoux D, Gannoun-Zaki L and Barritault D, Interactions of FGFs with target cells, Prog Growth Factor Res 1992;4:107-20.
11) Mondain M and Ryan A, Effect of basic fibroblast growth factor on normal tympanic membrane, Am J Otolaryngol 1994;15:344-50.

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 7
2.6.3.4 安全性薬理試験 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 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)
NPC-18	トラフェルミン（遺伝子組換え)、添付溶解液及びゼラチンスポンジの構成品

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：bFGF 含侵ゼラチンスポンジ

	試験の種類	動物種/組織	投与方法	報告書発行年及び実施施設	添付資料
効力を裏付ける試験	bFGF 浸含ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間の検討（Pilot 試験-2）	モルモット	局所投与	20[redacted] 年 [redacted]	4.2.1.1-1 参考資料
	bFGF 浸含ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間の検討（用量設定及び血清中 bFGF 濃度測定試験）	モルモット	局所投与	20[redacted] 年 [redacted]	4.2.1.1-2
	bFGF 浸含ゼラチンスポンジの鼓膜再生効果	モルモット	局所投与	20[redacted] 年 [redacted]	4.2.1.1-3

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

筆頭著者・ 雑誌名	表題	試験目的	動物種／ 被験物質	試験結果	添付資料
[redacted] ノーベルファーマ株式会社 社内資料 20[redacted]	モルモットを用いたbFGF浸含ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間の検討（Pilot試験-2）	bFGF含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生効果の検証に関し、モルモット鼓膜穿孔モデルにおける鼓膜閉鎖期間及びbFGF含浸ゼラチンスポンジによる鼓膜再生期間の検討	モルモット／ bFGF含浸ゼラチンスポンジ	モルモット（5匹使用）鼓膜穿孔モデルにおいて、本モデルの鼓膜穿孔期間の検証及びbFGF含浸ゼラチンスポンジ（100μg/mL）の鼓膜再生期間（3～8週間）に対する作用を検討した。bFGF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、bFGF群では鼓膜穿孔後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は上昇し、鼓膜閉鎖に伴い音圧レベルの回復傾向を示したが、Sham群の鼓膜閉鎖が認められなかった2例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は、Sham群とbFGF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。	4.2.1.1-1 参考資料
[redacted] ノーベルファーマ株式会社 社内資料 20[redacted]	モルモットを用いたbFGF浸含ゼラチンスポンジの鼓膜再生期間の検討（用量設定及び血清中bFGF濃度測定試験）	bFGF含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生効果の検証に関し、bFGF含浸ゼラチンスポンジの投与量の設定	モルモット／ bFGF含浸ゼラチンスポンジ	bFGFの用量と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（bFGFを含まない添付溶解液のみ）、bFGF 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（0/4例）。Control群は投与後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、bFGF投与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た。100 μg/mL bFGF投与群では投与後3週で、30及び300μg/mL bFGF投与群ではそれぞれ投与後4及び5週で全例に鼓膜閉鎖が認められた。	4.2.1.1-2
[redacted] ノーベルファーマ株式会社 社内資料 20[redacted]	モルモットを用いたbFGF浸含ゼラチンスポンジの鼓膜再生効果	bFGF含浸ゼラチンスポンジの鼓膜再生効果を鼓膜の閉鎖率を指標に検証	モルモット／ bFGF含浸ゼラチンスポンジ	上記2試験の結果から、bFGFそれ自身の鼓膜再生効果を検証する目的で、1群15例でbFGF非含浸ゼラチンスポンジ（Control）群とbFGF含浸ゼラチンスポンジ群の鼓膜穿孔に対する作用を検討したとき、投与後3週において、bFGF非浸含群に比べbFGF浸含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、bFGF群の投与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	4.2.1.1-3

筆頭著者・ 雑誌名	表題	試験目的	動物種／ 被験物質	試験結果	添付資料
				られなかったものの、投与後3週においてbFGF群の聴力改善例の増加傾向が認められた（低音域（8 kHz）：Control群の聴力未改善7/15例、bFGF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、bFGF群のほぼ全例（14/15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。	

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当試験を実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

該当試験を実施していない。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験を実施していない。