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

2.6.4　薬物動態試験の概要文

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.4 薬物動態試験の概要文 4
2.6.4.1 まとめ 4
2.6.4.2 分析方法及びバリデーション試験 5
2.6.4.2.1 分析法 5
2.6.4.2.2 バリデーション試験 5
2.6.4.3 吸収（全身曝露）試験 7
2.6.4.4 分布試験 8
2.6.4.5 代謝試験 8
2.6.4.6 排泄試験 8
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用試験 8
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 8
2.6.4.9 考察及び結論 9
2.6.4.10 参考文献 11

略語・略号一覧

略語・略号	内容
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor）
BLQ	定量下限未満（Below the lower Limit of Quantification）
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF	線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor）
MRD	Minimum Required Dilution
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
QC	Quality Control

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 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、非臨床薬理試験（用量設定試験）の一部として、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吸収性（全身曝露）について、血清中bFGF（塩基性線維芽細胞増殖因子）の濃度推移を評価した。

血清中bFGF濃度は、市販のヒトbFGF測定用ELISAキットQuantikine® HS ELISA Human FGF basic Immunoassay（製造元:R&D Systems Inc.）を購入し、添付の説明書に従って測定した。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ヒトbFGF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）を含浸させたゼラチンスポンジを留置した。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、①鼓膜穿孔のみを実施した群（Sham群）、②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）、③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、④公比3として低用量の30 μg/mL群、⑤高用量の300 μg/mL群の計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。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ず、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。

2.6.4.2 分析方法及びバリデーション試験

（添付資料4.2.2.1）

市販のヒトbFGF測定用ELISAキットQuantikine® HS ELISA Human FGF basic Immunoassay（製造元:R&D Systems Inc.）を購入し、添付の説明書に従って測定した。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、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ヒトbFGF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。

2.6.4.2.1 分析法

(1) キット添付のマイクロプレートにAssay diluent RD1-97を100 μL添加。
(2) 検量線用標準試料溶液、各検討用試料溶液あるいは検量線精度管理用試料溶液を各well に100 μL添加。
(3) 室温で振とう下、2時間インキュベート。
(4) マイクロプレートの各well の液を捨て、マイクロプレートウォッシャーを用いて、キット添付のWash Bufferで洗浄(400 μL ×6回)。
(5) キット添付のFGF basic HS Conjugate溶液を各well に200 μL添加。
(6) 室温で振とう下、2時間インキュベート。
(7) マイクロプレートの各well の液を捨て、マイクロプレートウォッシャーを用いて、Wash Bufferで洗浄(400 μL ×6回)。
(8) キット添付のSubstrate Solutionを各well に50 μL添加。
(9) 室温で振とう下、1時間インキュベート。
(10) キット添付のAmplifier Solutionを各well に50 μL添加。
(11) 室温で振とう下、30分インキュベート。
(12) キット添付のStop solutionを各well に50 μL添加。
(13) マイクロプレートリーダー(測定波長:490 nm、対照波長:650 nm)にて30分以内に測定。
(14) マイクロプレートごとに作成した検量線に各試料の吸光度を内挿して濃度を算出した（解析ソフト：KC4、Ver.3.4、DS ファーマバイオメディカル株式会社)。各試料についてDuplicateで測定した濃度の平均値をn=1として扱った。検量線は4-parameterロジスティックモデルで作成した。

2.6.4.2.2 バリデーション試験

2.6.4.2.2.1 MRD（Minimum Required Dilution）

モルモット血清含量が異なる（0、5、10、20%）標準試料溶液を調製し、作成した4本の検量線を比較した。その結果、血清含量を10%又は20%とした検量線において、定量下限である0.313 pg/mLを含めすべての標準試料溶液の真度及び精度（CV%）が判定基準（±20%以内、ただし定量下限及び定量上限は±25%以内）を満たした。血清含量が少ないほど（MRDが大きいほど)、測定に供するモルモット血清量を少なくできる（採血量を少なくできる）ことも考慮して、血清含量を10%、すなわちMRDを10倍に設定した（2.6.5.2.2)。

2.6.4.2.2.2 選択性

モルモット10個体のブランク血清を個体別に緩衝液で10倍希釈して測定した結果、測定値はすべてのモルモット血清において0.313 pg/mL（定量下限）未満であった。さらに、同じ10個体のモルモットブランク血清にトラフェルミン（遺伝子組換え）を0.625 pg/mL添加した試料を測定したところ、測定値は10個体中9個体で添加濃度の±20%以内であり、判定基準を満たした。これらの結果から、今回採用した測定法はモルモット血清中のヒトbFGFを選択的に測定可能であると判断した（2.6.5.2.3）。

2.6.4.2.2.3 日内再現性

5濃度の試料（20、10、2.5、0.625、0.313 pg/mL）を、n=6で測定したときの真度及び精度（CV%）はともに判定基準（±20%以内、ただし定量下限及び定量上限は±25%以内）を満たし、日内再現性が確認された（2.6.5.2.4）。

2.6.4.2.2.4 日間再現性

5濃度の試料（20、10、2.5、0.625、0.313 pg/mL）を3日間にわたりn=6で測定したときの真度及び精度（CV%）はともに判定基準（±20%以内、ただし定量下限及び定量上限は±25%以内）を満たし、日間再現性が確認された（2.6.5.2.5）。

2.6.4.2.2.5 検量線の相関性

検量線の相関係数は1.000であった。また、各標準試料溶液濃度の逆算値の真度は-10.5%～3.6%で、いずれの濃度においても判定基準（回帰式から逆算した値が±20%以内、ただし定量下限及び上限は±25%以内）を満たし、検量線の相関性が確認された（2.6.5.2.6）。

2.6.4.2.2.6 定量下限及び定量範囲

選択性及び日内再現性の結果から、定量下限は0.313 pg/mLとし、定量範囲は0.313～20 pg/mLとした。なお、今回確立した測定法では、MRDの項に記載したように、測定試料であるモルモット血清を10倍希釈して測定する。そのため、血清中濃度としての定量下限は3.13 pg/mLとなり、定量範囲は、3.13～200 pg/mLとなる（2.6.5.2.7）。

2.6.4.2.2.7 凍結保存安定性

凍結(-80℃)保存で4週間の安定性が確認された（2.6.5.2.8）。

2.6.4.3 吸収（全身曝露）試験

（添付資料 4.2.2.2）

5 週齢の Hartley 系雄性モルモットを 20 匹（留置時の体重範囲:327～379 g)用いて、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）製品濃度(臨床適用濃度)の 100 μg/mL 群を中心に公比 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)、鼓膜穿孔のみを実施した群（Sham 群）を設定した。各群の例数は 4 例とした。血清中 bFGF 濃度の測定は、留置前 7 日、留置後 1、3、6、24 時間、留置後 7、14 日に採血し、ELISA 法により測定した。その結果を表 2.6.4.3-1 及び図 2.6.4.3-1 に示す。

表 2.6.4.3-1 鼓膜を全穿孔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）含侵ゼラチンスポンジを単回投与した時の血清中 bFGF 濃度

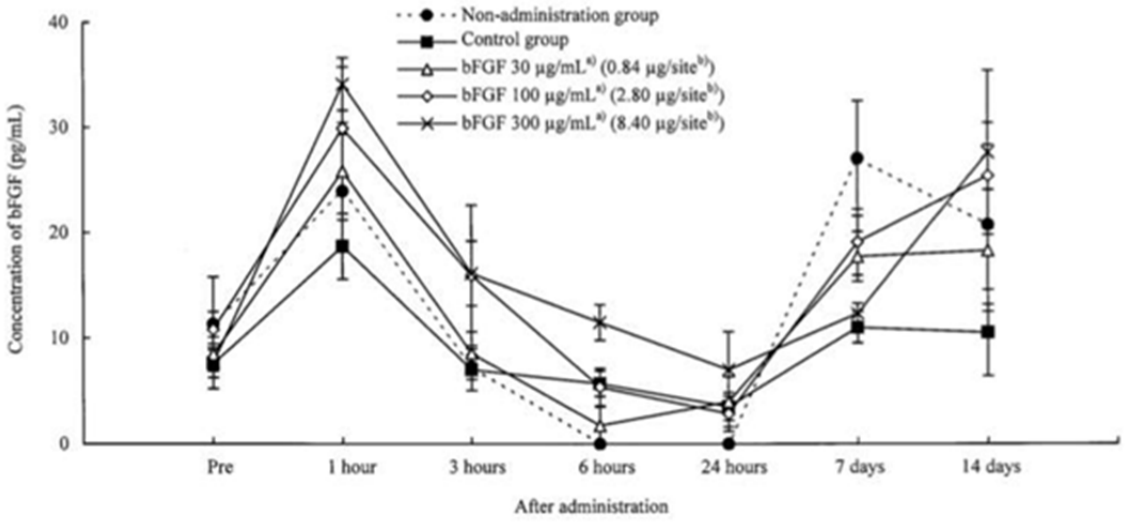
測定時点	血清中 bFGF 濃度（pg/mL 血清）				
	Sham 群	Control 群	30 μg/mL 群 (0.84 μg/site)	100 μg/mL 群 (2.80 μg/site)	300 μg/mL 群 (8.40 μg/site)
留置前 7 日	11.33±4.47	7.55±1.30	8.46±0.98	10.79±1.69	7.64±2.45
留置後 1 時間	23.94±5.39	18.68±3.11	25.83±4.62	29.90±5.87	34.12±2.52
留置後 3 時間	7.25±1.18	6.99±1.97	8.53±2.04	15.94±6.67	16.12±3.06
留置後 6 時間	BLQ	5.67±1.20	1.74±1.74	5.34±1.78	11.47±1.69
留置後 24 時間	BLQ	3.51±1.30	3.97±2.36	2.84±1.65	6.99±3.61
留置後 7 日	27.10±5.47	11.00±1.48	17.74±2.37	19.12±3.14	12.33±0.96
留置後 14 日	20.81±7.60	10.53±4.11	18.34±5.80	25.47±5.04	27.69±7.84

平均値±標準誤差 (n=4)、BLQ：定量下限（3.13 pg/mL 血清）未満

血清中 bFGF の濃度は、留置前 7 日の試料において 7.55～11.33 pg/mL の測定値が得られ（表 2.6.4.3-1、図 2.6.4.3-1)、モルモット内因性 bFGF を検出したものと考えられた。

留置後の血清中 bFGF 濃度は、全群ともに留置後 1 時間に上昇した後 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。このような変動は、Sham 群及び Control 群においてもみられたことから、鼓膜及び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のではないかと考えられた。

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（25.83±4.62～34.12±2.52 pg/mL）は、Sham 群（23.94±5.39 pg/mL）及び Control 群（18.68±3.11 pg/mL）に比べ高値を示したが、公比 3 で設定した用量と相関が言える程の濃度差はなく、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。



平均値±標準誤差　(n=4)

図 2.6.4.3-1 鼓膜を全穿孔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）含侵ゼラチンスポンジを単回投与した時の血清中 bFGF 濃度

2.6.4.4 分布試験

該当試験を実施していない。

2.6.4.5 代謝試験

該当試験を実施していない。

2.6.4.6 排泄試験

該当試験を実施していない。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用試験

該当試験を実施していない。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

該当試験を実施していない。

2.6.4.9 考察及び結論

鼓膜穿孔を施したモルモットの穿孔部位に、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 bFGF の全身曝露を評価することを目的として、血清中 bFGF 濃度を測定した。測定には、市販のヒト bFGF 測定用 ELISA キットを使用することとし、実試料の測定に先立ちバリデーション試験を実施して測定方法の信頼性を確認した。

測定対象はヒト bFGF であるが、モルモット血清中にはモルモットの内因性 bFGF が存在し、測定に影響する可能性が想定される。また、内因性 bFGF 以外にも血清マトリクスが測定に影響を与える可能性も否定できない。従って、それらの影響を回避するために、血清試料の緩衝液による適切な希釈率（Minimum Required Dilution、以下、MRD と略す）を決定した上で標準試料溶液や QC 試料にも実試料と同濃度のモルモット血清を含むように測定方法を設定する必要がある。そこで、モルモット血清含量が異なる（0、5、10、20%）標準試料溶液を調製し、作成した 4 本の検量線を比較した。その結果、定量下限である 0.313 pg/mL 標準試料溶液の真度及び精度(CV%)に血清含量に依存した変化がみられ、標準試料溶液の血清含量を 10%又は 20%とした検量線において、0.313 pg/mL を含めすべての標準試料溶液の真度及び精度（CV%）が判定基準（±20%以内、ただし定量下限及び定量上限は±25%以内）を満たした（2.6.5.2.2）。血清含量が少ないほど(MRD が大きいほど)、測定に供するモルモット血清量を少なくできる(採血量を少なくできる）ことも考慮して、血清含量を 10%、即ち、MRD を 10 倍に設定した。

MRD を 10 倍に設定した上で、選択性の評価を行った。モルモット 10 個体のブランク血清を個体別に緩衝液で 10 倍希釈して測定した結果、測定値はすべてのモルモット血清において 0.313 pg/mL（定量下限）未満であった。さらに、同じ 10 個体のモルモットブランク血清にトラフェルミン（遺伝子組換え）を 0.625 pg/mL 添加した試料を測定したところ、測定値は 10 個体中 9 個体で添加濃度の±20%以内であり、判定基準を満たした（2.6.5.2.3）。これらの結果から、今回採用した測定法はモルモット血清中のヒト bFGF を選択的に測定可能であると判断した。さらに、日内再現性(2.6.5.2.4)、日間再現性(2.6.5.2.5)、検量線の相関性(2.6.5.2.6)、定量下限及び定量範囲（2.6.5.2.7）、凍結保存安定性（2.6.5.2.8）について評価を行い、定量範囲を 0.313～20 pg/mL（血清試料を 10 倍希釈して測定するため、血清中濃度としての定量範囲は 3.13～200 pg/mL）とする測定法を確立した。

確立した測定法を用いて、鼓膜穿孔を施したモルモットにトラフェルミン（遺伝子組換え）含浸ゼラチンスポンジを留置した後、採取した血清中の bFGF 濃度を測定した。その結果、留置 7 日前の試料において 7.55～11.33 pg/mL 血清の測定値が得られ(表 2.6.4.3-1、図 2.6.4.3-1)、モルモット内因性 bFGF を検出したものと考えられた。このため、今回使用したヒト bFGF 測定用 ELISA キットとモルモット bFGF との交差反応性について以下のように考察した。

本キットはヒト bFGF 測定用の ELISA キットであり、異種 bFGF との交差反応性に関して、取扱説明書[1)]には、ウシ bFGF（natural）、ウシ bFGF（遺伝子組換え）、マウス bFGF（遺伝子組換え）及びラット bFGF（遺伝子組換え）に対して、それぞれ、26、38、30、79%と記載されているが、モルモット bFGF に関しては記載がなく不明である。そこで、モルモット bFGF との交差

の可能性について考察するために、モルモットbFGFのアミノ酸配列をヒトbFGFと比較した。アミノ酸配列は、スイスバイオインフォマティクス研究所及びヨーロッパバイオインフォマティクス研究所が運用するタンパク質アミノ酸配列の知識ベースであるSwiss-Prot（http://www.uniprot.org/）から抽出し、一文字表記にて以下に示した。なお、モルモットbFGFのアミノ酸のうち、ヒトと同じアミノ酸は「*」で、欠損は「-」で表示した。

P09038-2_HUMAN ヒトbFGFの配列[http://www.uniprot.org/uniprot/P09038]
Q60487-2_CAVPO モルモットbFGFの配列 [http://www.uniprot.org/uniprot/Q60487]

P09038-2_HUMAN MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHI 60
Q60487-2_CAVPO **********G*DG***A*******------**********T**** 54

P09038-2_HUMAN KLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTYRSRKY 120
Q60487-2_CAVPO *******D** 114

P09038-2_HUMAN TSWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS 155
Q60487-2_CAVPO S******************************** 149

モルモットbFGFはヒトbFGFと比較して6アミノ酸が欠損した149アミノ酸残基からなり、さらに7アミノ酸が置換しているが、ヒトbFGFの155アミノ酸のうち、142アミノ酸が一致しておりヒトbFGFとのアミノ酸配列の相同性は相当に高いと言える。さらに、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と結合したとの報告[2)]があり、このことはヒトbFGFとモルモットbFGFが同じエピトープを共有することを示唆している。

以上のことから、今回使用したヒトbFGF測定用ELISAキットがモルモットbFGFを検出することはあり得ると考えられた。

各群の血清中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（表 2.6.4.3-1、図 2.6.4.3-1）。このような変動は、トラフェルミン（遺伝子組換え）群のみならず、Sham群（鼓膜穿孔のみを処置した群）及びControl群（鼓膜穿孔を施した後、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）のいずれ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のではないかと考えられる。事実、鼓膜穿孔を施すと穿孔部位周辺にbFGFが誘導されることがモルモット[3)]及びラット[4)]において報告されている。

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（25.83±4.62～34.12±2.52 pg/mL）は、Sham群（23.94±5.39 pg/mL）及びControl群（18.68±3.11 pg/mL）に比べ高値を示したが、公比3で設定した用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（27.10±5.47 pg/mL）と同程度であった。このように、

留置後1時間の血清中bFGFの濃度レベルは内因性bFGFの変動の範囲程度と考えられ、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。

以上のことから、トラフェルミン（遺伝子組換え）含侵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、留置されたトラフェルミン（遺伝子組換え）の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。

2.6.4.10 参考文献

1) Quantikine® HS ELISA/Human FGF basic Immunoassay. 2013; R&D Systems, Inc.
2) Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Manejias R, Rifkin DB. M_r 25,000 heparin-binding protein from guinea pig brain is a high molecular weight form of basic fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84(16):5778-82
3) Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor are induced in guinea-pig tympanic membrane following traumatic perforation. Acta Otolaryngol 1995;115(1):50-4
4) Ishibashi T, Shinogami M, Ishimoto S, et al. Induction of KGF, Basic FGF, and TGFα mRNA expression during healing of experimental TM perforations. Acta Otolaryngol 1998;118(5):701-4

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

2.6.5　薬物動態試験概要表

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.5 薬物動態試験概要表 4
2.6.5.1 薬物動態試験一覧表 4
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 5
2.6.5.3 吸収（全身曝露）試験 13
2.6.5.4 分布試験 16
2.6.5.5 代謝試験 16
2.6.5.6 排泄試験 16
2.6.5.7 薬物動態学的薬物相互作用試験 16
2.6.5.8 その他の薬物動態試験 16

略語・略号一覧

略語・略号	内容
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor）
BLQ	定量下限未満（Below the lower Limit of Quantification）
BSA	ウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin）
CV%	変動係数（Coefficient of Variation）
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF	線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor）
MRD	Minimum Required Dilution
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
QC	Quality Control
PBS	リン酸緩衝生理食塩液（Phosphate Buffered Saline）

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験一覧表

被験物質：トラフェルミン（遺伝子組換え）

試験の種類	試験目的	動物種/試験系	投与方法	報告年/研究機関/試験番号/信頼性基準	添付資料
分析方法及びバリデーション試験	バリデーション【添付資料4.2.2.2の分析法として使用】	モルモット血清	―	20[redacted]年/[redacted]/適合	4.2.2.1
吸収試験	全身曝露評価	片耳の鼓膜を電気メスにより全穿孔したモルモット	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	20[redacted]年/[redacted]/適合	4.2.2.2
分布試験	該当試験を実施していない				
代謝試験	該当試験を実施していない				
排泄試験	該当試験を実施していない				
薬物動態学的薬物相互作用試験	該当試験を実施していない				
その他の薬物動態試験	該当試験を実施していない				

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

［添付資料 4.2.2.1］

2.6.5.2.1 分析方法

<table>
<tr><td>マトリックス</td><td>モルモットブランク血清
選択性検討用には個体別に 10 例、その他の検討にはプール血清（10 例分）を使用した。系統:Kwl:Hartley。雄。採血時週齢:5 週齢。放置条件:室温、30 分。遠心条件:3000 rpm、10 min、4 ℃。[redacted]より購入。</td></tr>
<tr><td>標準物質</td><td>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250、製造元：科研製薬株式会社</td></tr>
<tr><td>測定キット</td><td>Quantikine® HS ELISA Human FGF basic Immunoassay、製造元：R&D Systems Inc.</td></tr>
<tr><td>Binding buffer</td><td>注射用水 400 mL にダルベッコ PBS (-) (4.8 g) 及び BSA (1.25 g) を溶解し、注射用水で 500 mL とした。調製後は冷蔵保存し、使用期限を 1 ヵ月とした。</td></tr>
<tr><td>標準溶液</td><td>一次標準溶液
トラフェルミン（遺伝子組換え）を添付の溶解液で溶解し、原液とした(100 μg/mL)。原液は、「フィブラスト®スプレー250」の添付文書に従い冷蔵保存し、溶解後 2 週間以内に使用した。原液 40μL に Binding buffer 3.96 mL を加え、転倒混和した。さらにこの液 200 μL に Binding buffer 800 μL を加え、転倒混和した(ST:200 ng/mL)。以降、下表に従い Binding buffer にて順次希釈した。
<table>
<tr><th>標準溶液名</th><th>濃度
(ng/mL)</th><th>採取標準溶液</th><th>採取量
(μL)</th><th>Binding buffer 添加量
(μL)</th></tr>
<tr><td>SSt1</td><td>20</td><td>ST</td><td>100</td><td>900</td></tr>
<tr><td>SSt2</td><td>10</td><td>SSt1</td><td>500</td><td>500</td></tr>
<tr><td>SSt3</td><td>5</td><td>SSt2</td><td>500</td><td>500</td></tr>
<tr><td>SSt4</td><td>2.5</td><td>SSt3</td><td>500</td><td>500</td></tr>
<tr><td>SSt5</td><td>1.25</td><td>SSt4</td><td>500</td><td>500</td></tr>
<tr><td>SSt6</td><td>0.625</td><td>SSt5</td><td>500</td><td>500</td></tr>
<tr><td>SSt7</td><td>0.313</td><td>SSt6</td><td>500</td><td>500</td></tr>
</table>
二次標準溶液
一次標準溶液の SSt1～SSt7 の各溶液 40 μL に Binding buffer を 3.96 mL 加え二次標準溶液を調製した(St1～St7:200、100、50、25、12.5、6.25、3.13 pg/mL)。
Buffer 標準試料溶液（0%血清）
各二次標準溶液 50 μL に対し、Binding buffer 450 μL を加えた（20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313 pg/mL)。0 濃度標準試料溶液は、Binding buffer を使用した。
5%血清標準試料溶液
各二次標準溶液 50 μL に対し、Binding buffer 425 μL 及びモルモットプールブランク血清 25 μL を加えた（20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313 pg/mL)。0 濃度の 5%血清標準試料溶液は、Binding buffer 475 μL にモルモットプールブランク血清 25 μL を加えた。
10%血清標準試料溶液（後出の検量線用標準試料溶液として使用した）
各二次標準溶液 50 μL に対し、Binding buffer 400 μL 及びモルモットプールブランク血清 50 μL を加えた（20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313 pg/mL)。0 濃度の 10%血清標準試料溶液は、Binding buffer 450 μL にモルモットプールブランク血清 50 μL を加えた。
20%血清標準試料溶液
各二次標準溶液 50 μL に対し、Binding buffer 350 μL 及びモルモットプールブランク血清 100 μL を加えた（20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313 pg/mL)。0 濃度の 20%血清標準試料溶液は、Binding buffer 400 μL にモルモットプールブランク血清 100 μL を加えた。</td></tr>
</table>

検討試料溶液	選択性検討用試料溶液 10個体のモルモットから採取した血清を個別にBinding bufferで10倍希釈し選択性検討用試料溶液1-1～1-10（bFGF添加濃度:0 pg/mL）とした。また、一次標準溶液のSSt6の40 μLにBinding bufferを3.96 mL加え、6.25 pg/mL溶液を調製した。この液100 μLに、Binding buffer 800 μL及びモルモットブランク血清100 μL（個別に10個体分）を加えて希釈し選択性検討用試料2-1～2-10（bFGF添加濃度:0.625 pg/mL）を調製した。
	再現性検討用試料溶液 二次標準溶液のSt1、St2、St4、St6、St7（200、100、25、6.25、3.13 pg/mL）にBinding buffer及びモルモットブランク血清を加えて希釈し、再現性検討用試料とした（20、10、2.5、0.625、0.313 pg/mL)。モルモットブランク血清はプール血清を使用した。試料は、二次標準溶液50 μLに対してBinding buffer 400 μL及びモルモットブランク血清50 μLを加えた。
	凍結保存安定性検討用試料溶液 トラフェルミン（遺伝子組換え）を添付の溶解液で溶解し、原液とした(100 μg/mL)。原液40 μLにBinding buffer 3.96 mLを加え、転倒混和した。さらにこの液100 μLにBinding buffer 900 μL を加え、転倒混和した（100 ng/mL)。 この液をBinding bufferでさらに希釈した溶液（10 ng/mL及び625 pg/mL）10 μLをモルモットブランク血清990 μLに加えて凍結保存安定性検討用試料（添加濃度:100及び6.25 pg/mL)とした。モルモットブランク血清はプール血清を使用した。
検量線精度管理用試料（QC試料)	二次標準溶液のSt2、St4、St6（100、25、6.25 pg/mL)にBinding buffer及びモルモットブランク血清を加えて希釈し、検量線精度管理用試料とした（高濃度:10 pg/mL、中濃度:2.5 pg/mL、低濃度:0.625 pg/mL)。モルモットブランク血清はプール血清を使用した。試料は、二次標準溶液 50 μL に対して Binding buffer 400 μL及びモルモットブランク血清50 μLを加えた。
測定手順	1. キット添付のマイクロプレートにAssay diluent RD1-97を100 μL添加。 2. 検量線用標準試料溶液、各検討用試料溶液あるいは検量線精度管理用試料溶液を各wellに100 μL添加。 3. 室温で振とう下、2時間インキュベート。 4. マイクロプレートの各well の液を捨て、マイクロプレートウォッシャーを用いて、キット添付のWash Bufferで洗浄(400 μL×6回)。 5. キット添付のFGF basic HS Conjugate溶液を各wellに200 μL添加。 6. 室温で振とう下、2時間インキュベート。 7. マイクロプレートの各well の液を捨て、マイクロプレートウォッシャーを用いて、Wash Bufferで洗浄(400 μL×6回)。 8. キット添付のSubstrate Solutionを各well に50 μL添加。 9. 室温で振とう下、1時間インキュベート。 10. キット添付のAmplifier Solutionを各well に50 μL添加。 11. 室温で振とう下、30分インキュベート。 12. キット添付のStop solutionを各well に50 μL添加。 13. マイクロプレートリーダー(測定波長:490 nm、対照波長:650 nm)にて30分以内に測定。
データ処理	マイクロプレートごとに作成した検量線に各試料の吸光度を内挿して濃度を算出した（解析ソフト：KC4、Ver.3.4、DS ファーマバイオメディカル株式会社)。各試料についてDuplicateで測定した濃度の平均値をn=1として扱った。 検量線は4-parameterロジスティックモデルで作成した。

2.6.5.2.2 バリデーション試験：MRD (Minimum Required Dilution)

0%血清標準試料溶液(Binding buffer)、5%血清標準試料溶液、10%血清標準試料溶液及び 20%血清標準試料溶液を調製し（0 濃度を含む 8 濃度)、前項に従い測定（各濃度 3well）した。得られた 4 本の検量線の比較から MRD を決定した。

血清濃度	設定濃度 (pg/mL)	逆算値 (pg/mL)	標準偏差 (pg/mL)	精度 (CV%)	真度 (%)	相関係数 (r)
0%血清 (binding buffer)	0	−	−	−	−	0.9999
	0.313	0.178	0.162	91.0	-43.1	
	0.625	0.663	0.000	0.0	6.1	
	1.25	1.280	0.062	4.8	2.4	
	2.5	2.696	0.092	3.4	7.8	
	5	4.896	0.060	1.2	-2.1	
	10	9.943	0.172	1.7	-0.6	
	20	20.045	0.513	2.6	0.2	
5%血清	0	−	−	−	−	0.9999
	0.313	0.213	0.074	34.7	-31.9	
	0.625	0.632	0.084	13.3	1.1	
	1.25	1.247	0.057	4.6	-0.2	
	2.5	2.664	0.103	3.9	6.6	
	5	4.982	0.159	3.2	-0.4	
	10	9.931	0.191	1.9	-0.7	
	20	20.027	0.404	2.0	0.1	
10%血清	0	−	−	−	−	1.000
	0.313	0.249	0.057	22.9	-20.4	
	0.625	0.601	0.066	11.0	-3.8	
	1.25	1.310	0.098	7.5	4.8	
	2.5	2.601	0.160	6.2	4.0	
	5	4.935	0.279	5.7	-1.3	
	10	9.975	0.610	6.1	-0.3	
	20	20.003	0.553	2.8	0.0	
20%血清	0	−	−	−	−	1.000
	0.313	0.280	0.028	10.0	-10.5	
	0.625	0.653	0.050	7.7	4.5	
	1.25	1.236	0.063	5.1	-1.1	
	2.5	2.570	0.083	3.2	2.8	
	5	4.918	0.171	3.5	-1.6	
	10	10.024	0.061	0.6	0.2	
	20	19.987	0.340	1.7	-0.1	

精度(CV%)：試料濃度の標準偏差/試料濃度の平均値×100
真度(%)：([逆算値]－[設定濃度])/[設定濃度]×100
[判定基準] 真度及び精度:±20%以内(ただし定量下限及び定量上限は±25%以内)
[結果]定量下限である 0.313 pg/mL 標準試料溶液の真度及び精度は、0%血清標準試料溶液ではそれぞれ-43.1%及び 91.0%、5%血清標準試料溶液ではそれぞれ-31.9%及び 34.7%、10%血清標準試料溶液ではそれぞれ-20.4%及び 22.9%、20%血清標準試料溶液ではそれぞれ-10.5%及び 10.0%であり、10%及び 20%血清標準試料溶液において、判定基準を満たした。0.625 pg/mL 以上の標準試料溶液では、真度及び精度はすべて±20%以内であり、判定基準を満たした。検量線の相関係数は、いずれの標準試料溶液も 0.9999 以上で良好であった。これらの結果から、使用する血清量も考慮して、10%血清試料となるよう MRD を 10 倍に決定した。

2.6.5.2.3 バリデーション試験:選択性

10 個体のモルモットから採取した血清を個別に Binding buffer で 10 倍希釈し選択性検討用試料溶液 1-1～1-10（bFGF 添加濃度:0 pg/mL）とした。また、これらに標準物質を 0.625 pg/mL となるように添加したものを選択性検討用試料溶液 2-1～2-10 とした。検量線用（10%血清）標準試料溶液(0 濃度を含む 8 濃度、各濃度 2well)、選択性検討用試料溶液 1-1～1-10 及び 2-1～2-10(各試料 2well)を測定し、得られた検量線より各試料の濃度を求め、測定系の選択性を検討した。

試料 No.	添加濃度 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	真度 (%)	試料 No.	添加濃度 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	真度 (%)
1-1	0.0	<0.313	-	2-1	0.625	0.93	48.8
1-2	0.0	<0.313	-	2-2	0.625	0.63	0.8
1-3	0.0	<0.313	-	2-3	0.625	0.69	10.4
1-4	0.0	<0.313	-	2-4	0.625	0.55	-12.0
1-5	0.0	<0.313	-	2-5	0.625	0.55	-12.0
1-6	0.0	<0.313	-	2-6	0.625	0.65	4.0
1-7	0.0	<0.313	-	2-7	0.625	0.61	-2.4
1-8	0.0	<0.313	-	2-8	0.625	0.63	0.8
1-9	0.0	<0.313	-	2-9	0.625	0.59	-5.6
1-10	0.0	<0.313	-	2-10	0.625	0.75	20.0

真度(%)：([実測値]－[添加濃度])/[添加濃度]×100

[判定基準]

選択性検討用試料溶液 1-1～1-10 については、8 個体以上が定量下限（0.313 pg/mL）未満。

選択性検討用試料溶液 2-1～2-10 については、8 個体以上の実測値の真度が±20%以内。

[結果]10 個体のモルモットから得た血清について検討した結果、 選択性検討用試料溶液 1-1～1-10(0 pg/mL 添加)は、すべての個体において 0.313 pg/mL 未満であった。また、選択性検討用試料溶液 2-1～2-10(0.625 pg/mL 添加)では、10 個体中 9 個体の実測値の真度が±20%以内であった。いずれも判定基準を満たした。

2.6.5.2.4 バリデーション試験:日内再現性

検量線用（10%血清）標準試料溶液(0 濃度を含む 8 濃度、各濃度 2we11)及び再現性検討用試料溶液(0.313、0.625、2.5、10、20 pg/mL、各濃度 n=6、各試料 2we11)を測定し、得られた検量線より再現性検討用試料溶液の濃度を求め、真度及び精度を算出した。

設定濃度 (pg/mL)	実測値 (pg/mL)	平均値 (pg/mL)	標準偏差 (pg/mL)	精度 (CV%)	真度 (%)
0.313	0.41 0.37 0.34 0.32 0.35 0.35	0.36	0.03	8.3	15.0
0.625	0.76 0.64 0.72 0.68 0.66 0.72	0.70	0.04	5.7	12.0
2.5	2.74 2.55 2.79 2.66 2.47 2.64	2.64	0.12	4.5	5.6
10	10.61 9.74 10.53 10.01 10.04 10.33	10.21	0.34	3.3	2.1
20	21.04 20.27 22.38 21.00 19.97 20.79	20.91	0.84	4.0	4.6

精度(CV%)：試料濃度の標準偏差/試料濃度の平均値×100
真度(%)：([実測値]－[設定濃度])/[設定濃度]×100
[判定基準] 真度及び精度:±20%以内(ただし定量下限及び定量上限は±25%以内)
[結果] 0.313、0.625、2.5、10、20 pg/mL 試料の真度及び精度（CV%）とも判定基準を満たした。

2.6.5.2.5 バリデーション試験:日間再現性

検量線用（10%血清）標準試料溶液(0濃度を含む8濃度、各濃度2well)及び再現性検討用試料溶液(0.313、0.625、2.5、10、20 pg/mL、各濃度n=6、各試料2well)を3日間測定し、得られた検量線より再現性検討用試料溶液の濃度を求め、真度及び精度を算出した。日内再現性の結果を1日目とした。

設定濃度 (pg/mL)		実測値（pg/mL） 1日目	2日目	3日目	平均値 (pg/mL)	標準偏差 (pg/mL)	精度 (CV%)	真度 (%)
0.313		0.41	0.32	0.34	0.34	0.05	14.7	8.6
		0.37	0.42	0.41				
		0.34	0.35	0.33				
		0.32	0.25	0.28				
		0.35	0.32	0.30				
		0.35	0.30	0.28				
	平均値	0.36	0.33	0.32				
	標準偏差	0.03	0.06	0.05				
	精度	8.3	18.2	15.6				
	真度	15.0	5.4	2.2				
0.625		0.76	0.66	0.64	0.68	0.06	8.8	8.8
		0.64	0.71	0.64				
		0.72	0.69	0.62				
		0.68	0.64	0.72				
		0.66	0.81	0.57				
		0.72	0.67	0.64				
	平均値	0.70	0.70	0.64				
	標準偏差	0.04	0.06	0.05				
	精度	5.7	8.6	7.8				
	真度	12.0	12.0	2.4				
2.5		2.74	2.77	2.75	2.60	0.13	5.0	4.0
		2.55	2.51	2.48				
		2.79	2.64	2.53				
		2.66	2.64	2.61				
		2.47	2.57	2.32				
		2.64	2.62	2.44				
	平均値	2.64	2.63	2.52				
	標準偏差	0.12	0.09	0.15				
	精度	4.5	3.4	6.0				
	真度	5.6	5.2	0.8				
10		10.61	10.80	10.81	10.20	0.38	3.7	2.0
		9.74	10.19	9.92				
		10.53	10.13	10.06				
		10.01	10.72	10.22				
		10.04	9.98	9.43				
		10.33	10.15	9.84				
	平均値	10.21	10.33	10.05				
	標準偏差	0.34	0.34	0.46				
	精度	3.3	3.3	4.6				
	真度	2.1	3.3	0.5				

次ページに続く

前ページから続く

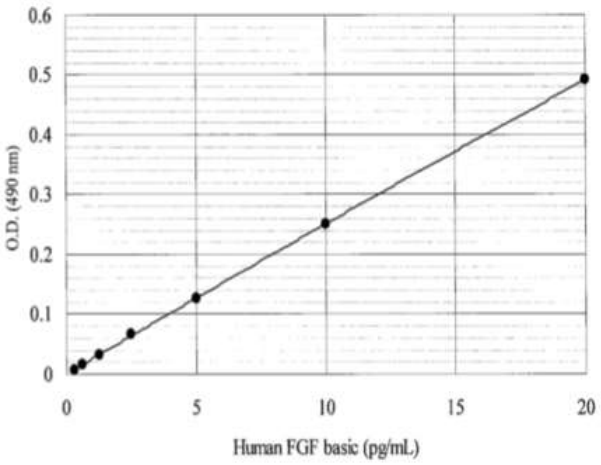
設定濃度 (pg/mL)		実測値 (pg/mL) 1日目	2日目	3日目	平均値 (pg/mL)	標準偏差 (pg/mL)	精度 (CV%)	真度 (%)
20		21.04	21.54	21.40	20.58	0.82	4.0	2.9
		20.27	19.89	19.86				
		22.38	21.58	21.00				
		21.00	20.46	20.17				
		19.97	20.26	19.16				
		20.79	19.97	19.62				
	平均値	20.91	20.62	20.20				
	標準偏差	0.84	0.76	0.85				
	精度	4.0	3.7	4.2				
	真度	4.6	3.1	1.0				

精度(CV%)：試料濃度の標準偏差/試料濃度の平均値×100
真度(%)：([実測値]－[設定濃度])/[設定濃度]×100
[判定基準]真度及び精度:±20%以内(定量下限及び定量上限は±25%以内)
[結果]0.313、0.625、2.5、10、20 pg/mL 試料の真度及び精度とも判定基準を満たした。

2.6.5.2.6 バリデーション試験:検量線の相関性

検量線用 (10%血清) 標準試料溶液(0 濃度を含む 8 濃度、各濃度 2well)を測定して検量線を作成し、回帰式から各標準試料溶液濃度の逆算値を求めた。検量線は選択性検討時の検量線の結果を用いた。

濃度 (pg/mL) 設定値	逆算値	真度 (%)
0	-	-
0.313	0.28	-10.5
0.625	0.61	-2.4
1.25	1.26	0.8
2.5	2.59	3.6
5	4.94	-1.2
10	10.00	0.0
20	20.00	0.0



a	0.0009017
b	0.9986
c	580.5
d	14.66
相関係数 (r)	1.000

検量線は 4-parameter ロジスティックモデル [Y=(a-d)/(1+(x/c)^b)+d]に当てはめて作成した。

真度(%)：([逆算値]－[設定濃度])/[設定濃度]×100
[判定基準]回帰式から逆算した値が±20%以内(ただし定量下限及び定量上限は±25%以内)
[結果]検量線の相関係数は 1.000 であった。
また、各標準溶液濃度の逆算値の真度は-10.5～3.6%で、いずれの濃度においても判定基準を満たした。

2.6.5.2.7 バリデーション試験:定量下限及び定量範囲

選択性及び日内再現性の検討結果から、 定量下限及び定量範囲を決定した。

[結果]定量下限は 0.313 pg/mL とし、定量範囲は 0.313～20 pg/mL とした。
なお、今回確立した測定法では、「MRD」の項に記載したように、測定試料であるモルモット血清を 10 倍希釈して測定する。そのため、血清中濃度としての定量下限は 3.13 pg/mL となり、定量範囲は、3.13～200 pg/mL となる。

2.6.5.2.8 バリデーション試験:凍結保存安定性（-80 ℃、4 週間）

調製直後の試料及び調製後冷凍(-80 ℃、実測値:-80～-77 ℃)で 4 週間保存した凍結保存安定性検討用試料(高濃度及び低濃度:各濃度 n=3、各試料 2well)を検量線用（10%血清）標準試料溶液(0 濃度を含む 8 濃度:各濃度 2well)及び検量線精度管理用試料（QC 試料）と共に測定し、得られた検量線より凍結保存安定性検討用試料の濃度を求めた。安定性は、調製直後の測定値を 100%として残存率を算出して評価した。なお、同時に測定した QC 試料の真度が判定基準を満たさない場合は、測定結果を不採用とし再測定することとした。

設定濃度 (pg/mL)	保存期間	実測値（pg/mL）		残存率（%）
		個別値	平均値	
100	調製直後	103.40	105.33	-
		107.70		
		104.90		
	4 週後	111.10	106.70	101.3
		106.10		
		102.90		
6.25	調製直後	6.00	6.50	-
		7.00		
		6.50		
	4 週後	7.30	6.70	103.1
		6.00		
		6.80		

残存率(%)：凍結保存後の平均値/調製直後の平均値×100
[判定基準]残存率が 100±20%以内であること。
[結果]4 週間の凍結保存は安定性の判定基準を満たした。

QC 試料の測定結果

試料名	設定濃度 (pg/mL)	調製直後		4 週後	
		実測値 (pg/mL)	真度 (%)	実測値 (pg/mL)	真度 (%)
QC 高濃度	10	10.55 10.12	5.5 1.2	10.59 10.67	5.9 6.7
QC 中濃度	2.5	2.46 2.41	-1.6 -3.6	2.86 2.79	14.4 11.6
QC 低濃度	0.625	0.60 0.65	-4.0 4.0	0.63 0.68	0.8 8.8

真度(%)：([実測値]－[設定濃度])/[設定濃度]×100
[判定基準]全 6 検体中 4 検体以上、かつ各濃度の 1 検体以上につき真度が±20%以内であること。
[結果]調整直後及び 4 週後のいずれの測定においても、全 6 検体の真度が±20%以内であり判定基準を満たしたため、再測定は実施しなかった。

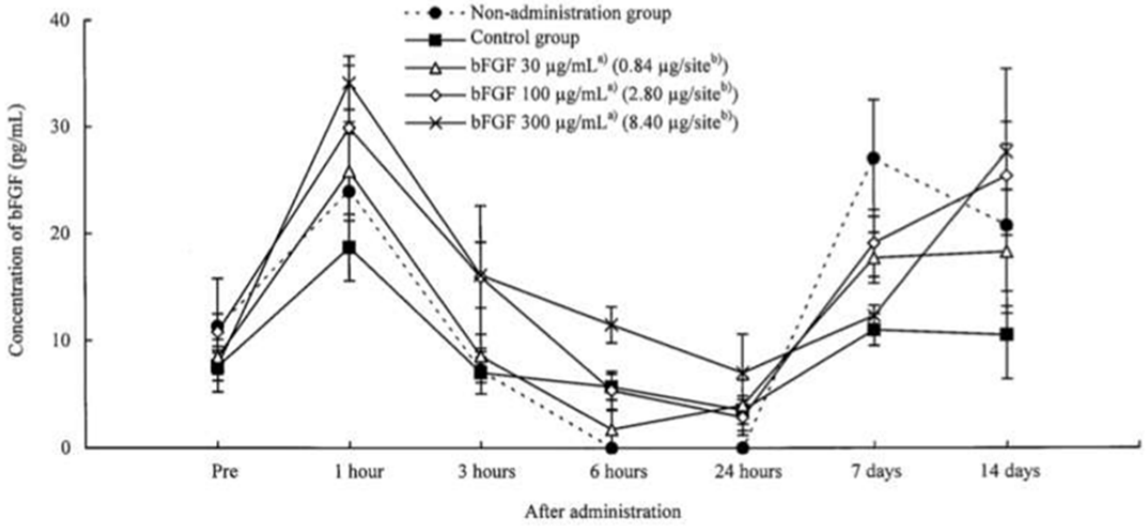
2.6.5.3 吸収（全身曝露）試験

［添付資料 4.2.2.2］

<table>
<tr><th colspan="6">試験方法</th></tr>
<tr><td>動物種/系統</td><td colspan="5">モルモット/Kwl:Hartley（SPF）</td></tr>
<tr><td>供給源</td><td colspan="5">[redacted]</td></tr>
<tr><td>性別/体重/週齢</td><td colspan="5">雄/327～379 g（実施時）/5 週齢（実施時）</td></tr>
<tr><td>給餌</td><td colspan="5">飼料及び水は自由摂取</td></tr>
<tr><td>被験物質</td><td colspan="5">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250、製造元：科研製薬株式会社）</td></tr>
<tr><td>媒体</td><td colspan="5">媒体 1：フィブラスト®スプレー250 に添付された溶解液
媒体 2：ゼラチンスポンジ([redacted])</td></tr>
<tr><td>投与検体</td><td colspan="5">トラフェルミン（遺伝子組換え）1 バイアルに必要量の添付溶解液を加え、300 μg/mL となるように溶解し、添付溶解液を用いて 100 及び 30 μg/mL となるように段階希釈した。</td></tr>
<tr><td>投与経路</td><td colspan="5">穿孔された鼓膜</td></tr>
<tr><td>鼓膜穿孔方法</td><td colspan="5">動物に三種混合麻酔薬[塩酸メデトミジン（0.35 mg/kg）、ミダゾラム（1.4 mg/kg）、酒石酸ブトルファノール（0.35 mg/kg）]を、25G 注射針（テルモ株式会社）を取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて、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（M220F12、ライカマイクロシステムズ株式会社）下で電気メス（VETROSON® V-10、SUMMIT HILL LABORATORIES）を用いて鼓膜全域を穿孔した（動物番号の若い順 2 匹は、右耳を処置し、残りは左耳を処置した）。</td></tr>
<tr><td>投与方法</td><td colspan="5">留置前に部位の大きさに切り分けた[redacted]にマイクロピペットを用いて検体を 28 μL（部位の大きさに切り分けた[redacted]がほぼ最大膨潤に達する量）を含浸させた後、穿孔された鼓膜に留置した。その後、留置部位にフィブリン糊を適量添加し被覆処置を施した。</td></tr>
<tr><td rowspan="6">群構成/投与量</td><td colspan="2">試験群</td><td>調製濃度
（μg/mL）</td><td>投与量
（μg/site）</td><td>動物数</td></tr>
<tr><td>1</td><td>Sham 群（鼓膜穿孔のみ）</td><td>-</td><td>-</td><td>4</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Control 群（添付溶解液）</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td></tr>
<tr><td>3</td><td>bFGF 30 μg/mL 群</td><td>30</td><td>0.84</td><td>4</td></tr>
<tr><td>4</td><td>bFGF 100 μg/mL 群</td><td>100</td><td>2.80</td><td>4</td></tr>
<tr><td>5</td><td>bFGF 300 μg/mL 群</td><td>300</td><td>8.40</td><td>4</td></tr>
<tr><td>採血</td><td colspan="5">留置前 7 日、留置後 1、3、6、24 時間、留置後 7、14 日に、無麻酔下で四肢の静脈から約 200 μL を採血した。</td></tr>
<tr><td>血清の分離</td><td colspan="5">採取した血液は、室温で 45～60 分放置後、遠心機（5417R、エッペンドルフ株式会社）を用いて遠心分離（4 ℃、2200×g、15 分間）し、分取した血清を濃度測定時まで凍結保存（設定温度:-80 ℃、許容範囲:-90～-70 ℃、実測値:-83～-75 ℃）した。</td></tr>
<tr><td>測定試料</td><td colspan="5">血清を Binding buffer で 10 倍希釈して測定に供した。</td></tr>
<tr><td>測定キット</td><td colspan="5">Quantikine® HS ELISA Human FGF basic Immunoassay、製造元：R&D Systems Inc.</td></tr>
<tr><td>測定方法</td><td colspan="5">「2.6.5.2.1 分析方法」に従い測定した。</td></tr>
</table>

試験結果					
測定時点	血清中 bFGF 濃度（pg/mL 血清）				
	Sham 群	Control 群	30 μg/mL 群 (0.84 μg/site)	100 μg/mL 群 (2.80 μg/site)	300 μg/mL 群 (8.40 μg/site)
留置前 7 日	11.33±4.47	7.55±1.30	8.46±0.98	10.79±1.69	7.64±2.45
留置後 1 時間	23.94±5.39	18.68±3.11	25.83±4.62	29.90±5.87	34.12±2.52
留置後 3 時間	7.25±1.18	6.99±1.97	8.53±2.04	15.94±6.67	16.12±3.06
留置後 6 時間	BLQ	5.67±1.20	1.74±1.74	5.34±1.78	11.47±1.69
留置後 24 時間	BLQ	3.51±1.30	3.97±2.36	2.84±1.65	6.99±3.61
留置後 7 日	27.10±5.47	11.00±1.48	17.74±2.37	19.12±3.14	12.33±0.96
留置後 14 日	20.81±7.60	10.53±4.11	18.34±5.80	25.47±5.04	27.69±7.84

Sham 群：鼓膜穿孔のみを処置した群
Control 群：鼓膜穿孔を施した後、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
平均値±標準誤差（n=4）
BLQ：定量下限（3.13 pg/mL 血清）未満
概要文 表 2.6.4.3-1 に転載



概要文 図 2.6.4.3-1 に転載

個別値								
試験群	動物番号	血清中 bFGF 濃度（pg/mL 血清）						
		留置前	留置後					
		7 日	1 時間	3 時間	6 時間	24 時間	7 日	14 日
Sham 群	M01101	5.34	37.15	9.63	BLQ	BLQ	19.95	25.87
	M01102	24.44	12.53	6.57	BLQ	BLQ	26.65	39.02
	M01103	5.89	27.64	8.52	BLQ	BLQ	42.70	14.85
	M01104	9.63	18.44	4.26	BLQ	BLQ	19.08	3.49
	平均値	11.33	23.94	7.25	BLQ	BLQ	27.10	20.81
	標準誤差	4.47	5.39	1.18	-	-	5.47	7.60
Control 群	M02201	6.30	13.36	5.87	4.09	4.38	7.24	18.57
	M02202	6.44	25.17	12.67	4.26	3.45	10.04	8.30
	M02203	6.03	22.83	5.87	9.19	6.21	13.67	15.24
	M02204	11.44	13.36	3.55	5.12	BLQ	13.06	BLQ
	平均値	7.55	18.68	6.99	5.67	3.51	11.00	10.53
	標準誤差	1.30	3.11	1.97	1.20	1.30	1.48	4.11
30 μg/mL 群 (0.84 μg /site)	M03301	5.89	19.54	10.18	6.95	BLQ	16.27	16.77
	M03302	10.54	29.70	12.95	BLQ	6.59	11.79	33.20
	M03303	9.24	37.01	3.37	BLQ	9.28	20.36	18.44
	M03304	8.18	17.07	7.60	BLQ	BLQ	22.53	4.93
	平均値	8.46	25.83	8.53	1.74	3.97	17.74	18.34
	標準誤差	0.98	4.62	2.04	1.74	2.36	2.37	5.80
100 μg/mL 群 (2.80 μg /site)	M04401	7.25	31.35	15.42	7.44	BLQ	19.58	35.66
	M04402	9.24	45.32	34.93	7.11	5.16	11.54	25.35
	M04403	11.56	25.44	7.76	6.79	6.20	26.90	29.08
	M04404	15.11	17.48	5.63	BLQ	BLQ	18.44	11.78
	平均値	10.79	29.90	15.94	5.34	2.84	19.12	25.47
	標準誤差	1.69	5.87	6.67	1.78	1.65	3.14	5.04
300 μg/mL 群 (8.40 μg /site)	M05501	14.74	28.74	15.69	6.62	16.63	13.67	12.55
	M05502	6.84	37.14	13.08	11.83	3.31	14.29	15.88
	M05503	3.78	31.08	10.91	14.24	8.00	10.62	42.79
	M05504	5.20	39.50	24.81	13.19	BLQ	10.75	39.54
	平均値	7.64	34.12	16.12	11.47	6.99	12.33	27.69
	標準誤差	2.45	2.52	3.06	1.69	3.61	0.96	7.84

Sham 群：鼓膜穿孔のみを処置した群
Control 群：鼓膜穿孔を施した後、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
BLQ：定量下限（3.13 pg/mL 血清）未満

2.6.5.4 分布試験

該当試験を実施していない。

2.6.5.5 代謝試験

該当試験を実施していない。

2.6.5.6 排泄試験

該当試験を実施していない。

2.6.5.7 薬物動態学的薬物相互作用試験

該当試験を実施していない。

2.6.5.8 その他の薬物動態試験

該当試験を実施していない。