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

2.6.6　毒性試験の概要文

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.1.1 トラフェルミン（遺伝子組換え）の局所刺激性試験 4
2.6.6.1.2 鼓膜用ゼラチンスポンジ（新添加物）の安全性 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 5
2.6.6.3 反復投与毒性試験 5
2.6.6.4 遺伝毒性試験 6
2.6.6.5 がん原性試験 6
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 6
2.6.6.7 局所刺激性試験 6
2.6.6.7.1 トラフェルミン（遺伝子組換え）のモルモットにおける聴器毒性試験 6
2.6.6.8 その他の毒性試験 7
2.6.6.8.1 鼓膜用ゼラチンスポンジ（新添加物）の安全性 7
2.6.6.9 考察及び結論 9
2.6.6.10 参考文献 11

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）
CHL	チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞（CHL/IU）
C_{max}	最高血中濃度
EGF	上皮成長因子（Epidermal Growth Factor）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（Good Laboratory Practice）
IC_{50}	コロニーの形成を50%阻害する濃度
IGF-1	インスリン様成長因子1（Insulin-like growth factors-1）
S9	肝臓ホモジネートの9,000×g 上清(S9)
TK	トキシコキネティクス（toxicokinetics）
V79	チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞（V79）
ZDBC	ジブチルジチオカルバミン酸亜鉛（zinc dibutyl-dithiocarbamate）
ZDEC	ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛（zinc diethyl-dithiocarbamate）
鼓膜用ゼラチンスポンジ	[redacted]にて、本剤用に製造されたゼラチンスポンジをいう。安全性試験報告書ではゼラチンスポンジ（[redacted]）とした。

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

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。

トラフェルミン（遺伝子組換え）は、既承認医薬品 （フィブラスト®スプレー250/500）であり、その非臨床試験（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。

トラフェルミン(遺伝子組換え)の鼓膜穿孔部に留置する臨床適用経路としていることから、投与部位である聴器に対する局所刺激性及び新添加物である鼓膜用ゼラチンスポンジの生物学的安全性を明らかにする必要があると判断し、モルモットにおける聴器毒性試験及び鼓膜用ゼラチンスポンジの生物学的安全性試験を新たに実施した。毒性試験の一覧を表 2.6.6-1に示す。これらの毒性試験は予備試験を除きGLPを遵守して実施した。

表 2.6.6-1 毒性試験の一覧

被験物質	試験の種類	動物種	投与経路	GLP適用	添付資料
トラフェルミン(遺伝子組換え)	聴器毒性試験	モルモット	中耳腔内	適	4.2.3.6
鼓膜用ゼラチンスポンジ*(新添加物)	細胞毒性試験	V79細胞	in vitro	適	4.2.3.7-1
	皮膚感作性試験（予備）	モルモット	皮内・経皮	非適	4.2.3.7-2参
	皮膚感作性試験	モルモット	皮内・経皮	適	4.2.3.7-3
	皮内反応試験	ウサギ	皮内	適	4.2.3.7-4
	4週間埋植全身毒性試験	ラット	皮下埋植	適	4.2.3.7-5
	復帰突然変異試験	ネズミチフス菌、大腸菌	in vitro	適	4.2.3.7-6
	染色体異常試験	CHL細胞	in vitro	適	4.2.3.7-7

*：安全性試験報告書ではゼラチンスポンジ（[redacted]）とした。

2.6.6.1.1 トラフェルミン（遺伝子組換え）の局所刺激性試験

(1) 聴器毒性試験

トラフェルミン(遺伝子組換え)を鼓膜穿孔部に留置する臨床適用経路としていることから、製剤を用いて聴器に対する影響を検討した。モルモットの中耳腔内(左耳)にトラフェルミン(遺伝子組換え)製剤を1回/週、4回投与（被験物質群）し、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。聴覚脳幹反応（ABR）検査、聴覚器の病理組織学的検査、蝸牛の走査型電子顕微鏡検査を実施した。

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。

2.6.6.1.2 鼓膜用ゼラチンスポンジ（新添加物）の安全性

鼓膜用ゼラチンスポンジは、以下に示す生物学的安全性試験の結果から、安全性に問題はないものと考えられた。

(1) 細胞毒性試験

V79細胞を用いたコロニー形成法により検討した。鼓膜用ゼラチンスポンジの培地抽出液にコロニー形成率の低下はなく、細胞毒性はなかった。

(2) 皮膚感作性試験

モルモットを用いて、鼓膜用ゼラチンスポンジの生理食塩液抽出液あるいはゴマ油抽出液を感作・惹起し検討した。いずれの抽出液及びその対照液の惹起においても鼓膜用ゼラチンスポンジに起因する皮膚反応は認められず、皮膚感作性はなかった。

(3) 皮内反応試験

ウサギを用いて鼓膜用ゼラチンスポンジの生理食塩液抽出液及びゴマ油抽出液の皮内投与により検討した。いずれの抽出液とも、投与部位における皮内反応は認められなかった。

(4) 埋植亜急性全身毒性試験

ラットの皮下に鼓膜用ゼラチンスポンジを4週間埋植し検討した。全身毒性の発現はなく、埋植後4週までに生体内に吸収され、埋植周囲の組織反応も認められなかった。

(5) 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験（ジメチルスルホキシド抽出）及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（培地抽出）により検討した。いずれの試験においても遺伝毒性を示す所見はみられなかった。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

該当試験を実施していない。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

該当試験を実施していない。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

該当試験を実施していない。

2.6.6.5　がん原性試験

該当試験を実施していない。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

該当試験を実施していない。

2.6.6.7　局所刺激性試験

2.6.6.7.1 トラフェルミン（遺伝子組換え）のモルモットにおける聴器毒性試験

（添付資料4.2.3.6）

トラフェルミン(遺伝子組換え)製剤[フィブラスト®スプレー250]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（左耳）に投与容量0.1 mL/bodyで1回/週、臨床適応の最大投与回数にあわせ4回投与し、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（5例)、蝸牛の走査型電子顕微鏡検査（5例）とした。

その結果、一般状態、体重には異常はみられなかった。ABR閾値は投与前値では対照群、被験物質群とも平均40.0 dBで、投与開始後28日の対照群では平均53.0 dBで1例を除く全例で閾値の上昇がみられた。被験物質群でも平均68.0 dBと1例を除く全例で閾値の上昇がみられ、その程度は対照群と比較して大きかったが統計学的な有意差はなかった。被験物質群で10例のうち2例（動物番号15及び19）においては90 dBの音圧刺激条件下でもABR波形がみられなかった。

病理組織学的検査では、被験物質群で蝸牛管の外有毛細胞の極く軽度の消失が1/5例（動物番号15）に認められたほか、鼓膜の急性炎症、肥厚及びポリープ状の増殖がそれぞれ1/5例に認められた。その他、鼓室粘膜の好中球浸潤が鼓膜の急性炎症例に認められた。対照群では内耳及び中耳の異常は認められなかった。外耳道では対照群及び被験物質群で痂疲がそれぞれ2/5例、対照群で出血及び好中球の浸潤が1/5例、被験物質群で膿瘍が1/5例にみられ、これらは内視鏡を用いた被験薬投与操作時の損傷によるものと考えられた。

蝸牛の走査型電子顕微鏡検査では、被験物質群で蝸牛管の外有毛細胞の不動毛の中等度の消失が1/5例（動物番号19）に認められた。また、対照群及び被験物質群とも灌流固定に起因すると思われる蝸牛管の外有毛細胞及び内有毛細胞の極く軽度/軽度の消失が認められた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 鼓膜用ゼラチンスポンジ（新添加物）の安全性

2.6.6.8.1.1　V79 細胞 を用いた細胞毒性試験

（添付資料 4.2.3.7-1）

鼓膜用ゼラチンスポンジの細胞毒性について、V79 細胞を用いたコロニー形成法により検討した。試験液は被験物質を細切後、一定量のイーグル MEM 培地を加え、CO_2インキュベーター内で、37℃、24 時間静置し、その抽出液を用いた。対照材料として、陽性対照材料 A（0.1% ZDEC 含有ポリウレタンフィルム）及び陽性対照材料 B（0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルム）を使用し、同様に試験を行った。ウェル当り 100 個の V79 細胞を静置培養後、試験液を加え 6 日間培養した後、コロニーを計数した。

その結果、鼓膜用ゼラチンスポンジの抽出液にコロニー形成率の低下はみられなかったことから、鼓膜用ゼラチンスポンジは細胞毒性を有しないと判断された。

2.6.6.8.1.2　モルモットを用いた皮膚感作性試験

（添付資料 4.2.3.7-3）

鼓膜用ゼラチンスポンジの皮膚感作性について、モルモット（Hartley 系雌、5～10 匹/群）を用いて、Maximization test で検討した。被験物質の抽出は、生理食塩液あるいはゴマ油を抽出溶媒として 37℃、72 時間の条件下で行い、それぞれの抽出液及び対照液で、感作誘導及び惹起投与した。

Maximization test における惹起は 24 時間の閉塞パッチとし、惹起後の投与部位の観察は、パッチ除去後 24 及び 48 時間に実施した。

その結果、生理食塩液対照液あるいは生理食塩液抽出液で感作誘導した群において、生理食塩液抽出液及び生理食塩液対照液の惹起では、いずれの観察時点においても皮膚反応は認められなかった。

ゴマ油対照液あるいはゴマ油抽出液で感作誘導した群におけるゴマ油抽出液及びゴマ油対照液の惹起では、パッチ除去後 48 時間にいずれも「非常に軽度な紅斑（評点 1）」が認められた。これらの皮膚反応は、ゴマ油対照液及びゴマ油抽出液ともに認められたことから、ゴマ油に起因した変化と考えられた。このため、オリブ油抽出液及びオリブ油対照液を用いて再惹起した結果、ゴマ油対照群及びゴマ油抽出群ともに皮膚反応がないことが確認されたことから、鼓膜用ゼラチンスポンジは、モルモットに対して皮膚感作性を有しないものと判断された。

2.6.6.8.1.3　ウサギを用いた皮内反応試験

（添付資料 4.2.3.7-4）

鼓膜用ゼラチンスポンジの皮内投与における影響について、ウサギ（日本白色種、雄 3 匹/群）を用いて検討した。被験物質の抽出は、生理食塩液あるいはゴマ油を抽出溶媒として、37℃、

72時間の条件で振盪抽出を行い、それぞれの抽出液及び対照液を剪毛及び剃毛したウサギの背部に皮内投与した。投与部位の観察は、投与後24、48及び72時間に実施した。

その結果、生理食塩液抽出液、ゴマ油抽出液及びそれぞれの対照液とも、いずれの投与部位においても皮膚反応は認められなかったことから、鼓膜用ゼラチンスポンジの抽出液は、ウサギの皮内に対して影響はないものと判断された。

2.6.6.8.1.4　ラットを用いた4週間埋植亜急性全身毒性試験

（添付資料4.2.3.7-5）

鼓膜用ゼラチンスポンジをラット（SD系雌雄各6匹/群）の皮下に埋植し、埋植周囲組織の組織反応及び4週間（28日間）の亜急性全身毒性について検討した。対照群には、高密度ポリエチレンシートを同様に埋植した。

その結果、被験物質群ではいずれの動物においても、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液化学的検査、器官重量及び病理組織学的検査において、被験物質の埋植に関連すると考えられる変化は認められなかった。また、埋植後4週間において、埋植部位に被験物質は確認できず、生体に吸収されたものと考えられた。鼓膜用ゼラチンスポンジは埋植後4週間で生体内に吸収されるが、全身毒性の発現はなく、埋植周囲の組織反応も認められなかった。

2.6.6.8.1.5　復帰突然変異試験

（添付資料4.2.3.7-6）

鼓膜用ゼラチンスポンジの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537及びEscherichia coli WP2uvrAを用いて検討した。被験物質の抽出にはジメチルスルホキシドを抽出溶媒として、37℃、48時間かけて振盪抽出した。試験はプレインキュベーション法により、代謝活性化系の非存在下及び存在下で、37℃、49時間培養後、コロニー数を計数した。

その結果、各菌株の直接法及び代謝活性化法のいずれの試験系列においても、抽出液処理群の復帰変異コロニー数は陰性対照群の平均値の2倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。生育阻害及び抽出液の析出は、いずれの菌株においても観察されなかったことから、鼓膜用ゼラチンスポンジは遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断された。

2.6.6.8.1.6　CHL細胞を用いた染色体異常試験

（添付資料4.2.3.7-7）

チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて、鼓膜用ゼラチンスポンジのin vitroにおける染色体異常誘発性の有無を検討した。被験物質の抽出にはイーグルMEM培地を加えて、5%CO_2、37℃のCO_2インキュベーター内で48時間抽出した。試験は直接法では短時間処理法

（6-18h）及び連続処理法（24-0h）を、代謝活性化法では短時間処理法（6-18h）により実施した。

その結果、いずれの試験系列においても、抽出液処理群の染色体の構造異常及び数的異常の出現率に有意な増加はみられなかったことから、鼓膜用ゼラチンスポンジはほ乳類培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断された。

2.6.6.8.1.7 生殖発生毒性試験

該当試験を実施していない。

鼓膜用ゼラチンスポンジを用いたラット4週間埋植亜急性全身毒性試験では、埋植部位にゼラチンスポンジの残留及び組織反応は認められず、雌雄の生殖器を含めた全身毒性も認められなかった（添付資料 4.2.3.7-5）。

鼓膜用ゼラチンスポンジの成分であるゼラチンは生体成分であり、生体内で加水分解を受け低分子ペプチドになると考えられる[1)]。また、鼓膜穿孔部へ留置した本剤の多くは中耳腔を経て耳管から排泄されることを考え合わせると、鼓膜用ゼラチンスポンジが吸収・排泄の過程で生殖毒性を生じる可能性はないか極めて少ないものと考えられる。

2.6.6.9 考察及び結論

(1) トラフェルミン（遺伝子組換え）のモルモットにおける聴器毒性について

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例では、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。

bFGFの聴覚器への影響に関しては､Kaseら[2)]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(2,000 μg/mL)のbFGFを注入（1回/2日×4回）したが、蝸牛内直流電位及び有毛細胞の形態・生存率に異常はなかった。bFGFは聴器障害に対し保護作用を有するとの報告もあり、bFGFをモルモットに筋注すると、音響外傷によるABR閾値の上昇を抑制するほか、内有毛細胞の消失を抑制した[3)]。また、ラット新生児のコルチ器を培養しbFGFを曝露すると、ネオマイシンによる外有毛細胞及び不動毛の障害を抑制した[4)]。同様の手法を用いて、IGF-1、bFGF、EGFを様々に組み合わせて曝露すると、ネオマイシンによる有毛細胞の損傷を保護するが、bFGF単独の曝露では作用がなかった[5)]。一方、bFGFのモルモット正円窓膜への局所適用では、シスプラチンによる歪成分耳音響放射の傷害に対し保護作用はなかった[6)]。なお、聴覚器におけるbFGFの分布は、ラットを用いてbFGF抗体の免疫反応性により検討され、コルチ器の内・外有毛細胞、蝸牛神経節、ラセン板縁、血管条において観察されて

いる[7]。このようにbFGFは全身投与及びin vitroでは聴覚器障害に対する保護作用が認められるが、中耳への局所適用ではその作用は弱いと考えられた。

今回の聴器毒性試験における被験物質群の2/10例に認められた内耳の外有毛細胞の消失をトラフェルミン（遺伝子組換え）の影響とみると、被験物質の蝸牛内リンパへの高濃度曝露の可能性が疑われる。しかし、先にも述べたKaseら[(2)]による臨床適用濃度の20倍のbFGFをゼラチンスポンに含浸させてモルモットの中耳に留置した場合では異常を認めていない。両者は投与条件が異なることから、今回の試験の投与条件(中耳腔への直接投与、過剰な投与容量)が一部の動物では過酷であった可能性がある。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中耳腔内投与の技術的問題などが関与した可能性が推察されるが、外有毛細胞の消失の原因は明らかではなかった。

本療法の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)。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への投与容量0.1 mL（10 μg/animal/500 g）はヒトでの投与量の約20倍量（20 μg/kg）に相当する。ヒトでの用法・用量及びbFGFの聴覚器への作用に関する文献情報を考え合わせると、本剤の臨床適用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。

(2) 鼓膜用ゼラチンスポンジの安全性について

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。

(3) 全身曝露に基づく毒性について

モルモットの鼓膜（片耳）を全穿孔し、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血清中bFGF濃度を測定した（添付資料4.2.2.2)。トラフェルミン（遺伝子組換え）群には、0.84、2.80（臨床適用濃度)、8.40 μg/siteの3用量を用い、他に溶媒をゼラチンスポンジに含浸させた対照群及び鼓膜穿孔のみを実施したSham群を用いた。その結果、血清中bFGFの濃度は、3群（対照群、Sham群及び被験物質）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。この上昇は対照群及びSham群においてもみられることから内因性bFGFによるものと考えられた。3群間の変動には大きな差のないことから、留置部位から全身循環への移行はほとんどないか、極めて少ないものと推察された。一方、弓削ら[8)]により実施されたラットの皮膚切除創内投与では、鼓膜穿孔内留置に比べbFGFの高い血中移行が認められた(表2.6.6-2)。

TRIENT1328 試験における鼓膜穿孔内留置のトラフェルミン（遺伝子組換え）用量は、12.10±14.28 μｇで、鼓膜閉鎖が確認できなかった場合には最大 4 回まで適用される（添付資料 5.3.5.2-1)。これに対し潰瘍皮膚へのフィブラスト®スプレーの投与では 1 回量 30 μｇ（潰瘍直径 6 cm 以内）が連日投与（1～2 週間）されるが、血清中 bFGF 濃度の変動（上昇）はほとんどなく、連日投与による蓄積性も確認されていない[9)]。

鼓膜穿孔内留置では、1 回の用量及び治療期間中のトラフェルミン（遺伝子組換え）総用量ともに皮膚切除創内投与に比べ少ないことから、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毒性が生じる可能性は低いと考えられた。

表 2.6.6-2　トラフェルミン（遺伝子組換え）の鼓膜穿孔内留置と皮膚切除創内投与における血清中 bFGF 濃度の比較

投与部位	動物（投与法）	投与量（μg/site)	濃度・投与容量	血清中 bFGF 濃度（pg/mL）	
				留置 1 時間[a]、C_{max}[b]	留置 7 日
鼓膜穿孔内留置	モルモット（鼓膜用ゼラチンスポンジに含浸）	0.84[c]	0.003%×28 μL	25.8±4.6	17.7±2.4
		2.80[d]	0.01%×28 μL	29.9±5.9	19.1±3.1
		8.40[e]	0.03%×28 μL	34.1±2.5	12.3±1.0
		対照群	0%×28 μL	18.7±3.1	11.0±1.5
		Sham 群	－	23.9±5.4	27.1±5.5
皮膚切除創内投与	ラット（スプレー）	20	0.02%×100 μL	0.50±0.20（ng/mL）	－
		50	0.05%×100 μL	1.84±1.27（ng/mL）	－
		100	0.1%×100 μL	6.99±1.94（ng/mL）	－

a：鼓膜穿孔内留置、b ：皮膚切除創内投与、c ：30 μg/mL、d：100 μg/mL(臨床適用濃度)、e：300 μg/mL、

2.6.6.10 参考文献

1) 隅田卓.ゼラチンの塩酸加水分解による分子量分布の変化と分解機構.日化.1991;8:1127-30.
2) Kase K,et al. Influence of topical application of basic fibroblast growth factor upon inner ear. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008 ;138:523-7
3) Zhai SQ,et al. Basic fibroblast growth factor protects auditory neurons and hair cells from glutamate neurotoxicity and noise exposure. Acta Otolaryngol. 2004 ;124:124-9.
4) Low W,et al. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. J Cell Physiol. 1996 ;167:443-50.
5) Lou X,et al. Growth factors have a protective effect on neomycin-induced hair cell loss. Cell Biol Int. 2015 ;39:65-73.
6) Wimmer C,et al. Round window application of D-methionine, sodium thiosulfate, brain-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2 in cisplatin-induced ototoxicity. Otol Neurotol. 2004;25:33-40.
7) Silva VA, et al. Fibroblast growth factor-2 immunoreactivity is present in the central and peripheral auditory pathways of adult rats. J Morphol. 2005;265:141-51.
8) 新バルク [redacted] のラットにおける血清中濃度推移（静脈内投与、皮下投与、創傷内滴下）ならびに旧バルクとの比較.[redacted]:19[redacted].[redacted] 社内資料
9) 石橋康正、古江増隆、菊池かな子、他. 皮膚潰瘍患者における bFGF（KCB-1）の血清中濃度測定試験. 臨床医薬. 1996;12:2143-58.

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

2.6.7　毒性試験概要表

ノーベルファーマ株式会社

目次

2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 4
2.6.7.4 毒性試験：被験物質の一覧 4
2.6.7.5 単回投与毒性試験 5
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 5
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 5
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 5
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 5
2.6.7.10 がん原性試験 5
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 5
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 6
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 6
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 6
2.6.7.15 新生児を用いた試験 6
2.6.7.16 局所刺激性試験 6
2.6.7.17 その他の試験 7

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

被験物質	試験の種類	動物種	投与方法	投与回数	投与量	GLP 適用	添付資料
トラフェルミン（遺伝子組換え）	聴器毒性試験	モルモット	中耳腔内	1/週×4 回	0.1 mL/body(製剤)	適	4.2.3.6
鼓膜用ゼラチンスポンジ*（新添加剤）	細胞毒性試験	V79 細胞	in vitro	1 回	3.13-100%培地抽出液	適	4.2.3.7-1
	皮膚感作性試験（予備）	モルモット	皮内・経皮	1 回/投与	25、50,100%抽出液/投与	非適	4.2.3.7-2 参
	皮膚感作性試験	モルモット	皮内・経皮	感作：2 回、惹起：1 回	100%/抽出液投与	適	4.2.3.7-3
	皮内反応試験	ウサギ	皮内	1 回	0.2 mL 抽出液/site	適	4.2.3.7-4
	4 週間埋植全身毒性試験	ラット	皮下埋植	1 回	1×1×0.5 cmゼラチンスポンジ×2 個	適	4.2.3.7-5
	復帰突然変異試験	ネズミチフス菌、大腸菌	in vitro	1 回	3.13-100%DMSO 抽出液	適	4.2.3.7-6
	染色体異常試験	CHL 細胞	in vitro	1 回	25-100%培地抽出液	適	4.2.3.7-7
	生殖発生毒性試験	実施せず					

*：安全性試験報告書ではゼラチンスポンジ（[redacted]）とした。

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

該当資料なし。

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

該当資料なし。

2.6.7.4 毒性試験：被験物質の一覧

被験物質	申請規格 / Lot No.	トラフェルミンたん白質量 [redacted]	類縁物質（電気泳動法）[redacted]	試験番号	試験の種類
トラフェルミン（遺伝子組換え）製剤	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	モルモット聴器刺激性試験

被験物質	申請規格 / Lot No.	性状 白色～淡黄褐色の多孔性	試験番号	試験の種類
鼓膜用ゼラチンスポンジ* （新添加剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	V79 細胞毒性試験 モルモット皮膚感作性試験（予備） モルモット皮膚感作性試験 ウサギ皮内反応試験 ラット 4 週間埋植全身毒性試験 復帰突然変異試験 CHL 細胞染色体異常試験

*：安全性試験報告書ではゼラチンスポンジ（[redacted]）とした。

2.6.7.5 単回投与毒性試験

該当資料なし。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当資料なし。

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

該当資料なし。

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

該当資料なし。

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

該当資料なし。

2.6.7.10 がん原性試験

該当資料なし。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当資料なし。

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当資料なし。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当資料なし。

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

該当資料なし。

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当資料なし。

2.6.7.16 局所刺激性試験

聴器毒性試験　　被験物質：トラフェルミン（遺伝子組換え）

動物種/系統	投与方法	投与量(mg/部位)	動物数/群	特記すべき所見	試験番号	GLP適用	添付資料
モルモット/Hartley	中耳腔内投与	トラフェルミン（遺伝子組換え）製剤 100 μg/mL を 0.1 mL/body	雄 10 匹/群	被験物質群の 2/10 例に 90 dB の音圧刺激条件で ABR 波形がみられなかった。上記のうち 1 例で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、他の 1 例では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。その他、鼓膜の急性炎症・肥厚（鼓室粘膜の好中球浸潤を伴う)及びポリープ状の増殖が 1/5 例に、外耳道の痂疲（対照群を含む）がそれぞれ 2/5 例、膿瘍が 1/5 例みられた。	[redacted]	適	4.2.3.6

2.6.7.17 その他の試験

鼓膜用ゼラチンスポンジ（新添加剤）の安全性

被験物質：鼓膜用ゼラチンスポンジ

試験	動物種	投与方法	投与量（濃度）	動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号 添付資料
細胞毒性試験	V79 細胞	6 日間静置培養	3.13～100% 培地抽出液	100 細胞/ウェル	細胞毒性はなかった。	適	4.2.3.7-1
皮膚感作性試験	モルモット	皮内及び経皮投与で感作後、経皮投与で惹起	感作及び惹起の各投与とも100%生理食塩液抽出液及び100%ゴマ油抽出液	雌 10 匹/群	生理食塩液抽出液及びゴマ油抽出液群とも皮膚反応はなかった。	適	4.2.3.7-3
皮内反応試験	ウサギ	皮内投与	100%生理食塩液抽出液及び100%ゴマ油抽出液	5 site/匹×雄 3 匹/群	生理食塩液抽出液及びゴマ油抽出液群とも皮膚反応はなかった。	適	4.2.3.7-4
4 週間埋植全身毒性試験	ラット	皮下埋植	鼓膜用ゼラチンスポンジ 1×1×0.5 cm 切片×2 個	雌雄各 6 匹/群	埋植 4 週間で埋植部位に被験物質は確認されず、全身毒性は認められなかった。	適	4.2.3.7-5
復帰突然変異試験	ネズミチフス菌、大腸菌	in vitro	3.13～100% DMSO 抽出液	3 プレート/群	直接法、代謝活性化法とも復帰突然変異コロニーの増加はなかった。	適	4.2.3.7-6
染色体異常試験	CHL 細胞	in vitro	25～100% 培地抽出液	2 プレート/群	直接法、代謝活性化法ともに染色体異常はなかった。	適	4.2.3.7-7