

II. 分担研究報告

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学再生医科学研究所
研究分担者 田畑 泰彦

研究要旨

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の吸着性を、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて評価した。その結果、シート状ゼラチンハイドロゲルに含浸させた bFGF の約 89.4% がハイドロゲルに収着し、これは、これまで重傷下肢虚血疾患の再生治療で使用している細粒状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF 収着率の規格値と同等だった。また、逆相カラムを用いて、bFGF 標品とハイドロゲルから脱着させた bFGF とを分析比較したところ、同じ時間に溶出、ピークの変化も見られなかったことから、ハイドロゲルに吸脱着することで bFGF の立体構造が変化しないことを示している。

A. 研究目的

われわれは、これまでに細粒状のゼラチンハイドロゲルから、細胞増殖因子を徐放化することによって、重傷下肢虚血性疾患に対する血管新生療法の先進医療を行ってきた。本研究の目的は、治験薬 GMP に準じて製剤化したゼラチンハイドロゲル徐放技術の末期虚血性心疾患への応用を目的に、ゼラチンハイドロゲルの品質を評価することである。そこで、本研究では、治験薬 GMP に準じて製剤化したシート状ゼラチンハイドロゲルを用いて、*in vitro* における bFGF の吸着率を評価した。

B. 研究方法

〈シート状ゼラチンハイドロゲルの作製〉

治験薬 GMP に準じた施設において、シート状のゼラチンハイドロゲルを作製した。すなわち、豚皮由来酸性ゼラチン (等電点 5.0) 水溶液へグルタルアルデヒドを加えた後、4°C にて 12 時間静置することによって化学架橋したゼラチンハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルを 100 mM グリシン水溶液で 37°C にて 1 時間処理し、未反応のアルデヒド基を不活化した。蒸留水にて 3 回洗浄後、凍結乾燥することでシート状ゼラチンハイドロゲルを得た。

〈シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着の評価〉

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着を評価するために、ハイドロゲルからの bFGF 脱着試験を行った。すなわち、4.5 mg のシート状ゼラチンハイドロゲルに対して、4 mg/ml の bFGF 水溶液を 0.05 ml 滴下し、室温で 30 分間静置することで bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。得られた bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルに、0.95 ml の脱着溶媒 (10 mM リン酸水素二ナトリウム、10 mM リン酸二水素ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、pH6.0) 加え、転倒混和を 10 分ごとに 6 回繰り返した後、遠心分離した。0.7 ml の上清を回収し、0.7 ml の製剤緩衝液 (4 mM クエン酸、7 mM クエン酸ナトリウム、263 mM 精製白糖) と混和後、ポリプロピレン製サンプルカップに移し替え、逆相カラム (YMC-Pack ODS-A) を用いて bFGF を分離し、ハイドロゲルへの吸着率を算出した。

C. 研究結果

図 1 は、逆相 HPLC のクロマトグラムを示す。bFGF 標品を逆相カラムで分析したところ、bFGF は、25 分で溶出された (図 1A)。一方、ハイドロゲルに脱着させた bFGF を逆相カラムで分析

した場合、標品と同じ 25 分で bFGF が溶出された (図 1B)。さらに、分離された bFGF の濃度から、bFGF のハイドロゲルへの吸着率を算出したところ、約 89.4% の bFGF がハイドロゲルに吸着していることがわかった (図 2)。

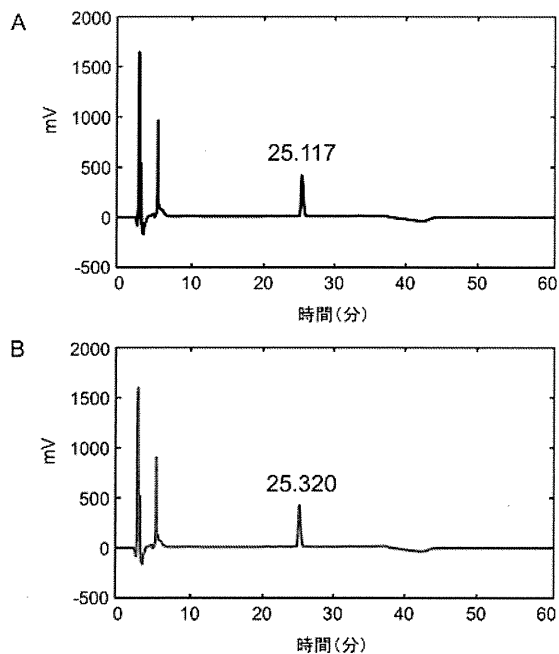


図 1 逆相 HPLC のクロマトグラム

bFGF 標品 (A) とシート状ゼラチンハイドロゲルに吸着させた bFGF (B) とを逆相カラムを用いて分析したクロマトグラム。

試料	ピーク面積値	試料溶液中濃度 (mg/ml)	吸着率		標準偏差 (%)
			%	平均 (%)	
No. 1	1	8070000	0.0868	86.8	2.4
	2	8520000	0.0915	91.5	
	3	8370000	0.0900	90.0	

図 2 bFGF のシート状ゼラチンハイドロゲルへの吸着率

シート状ゼラチンハイドロゲルに吸着した bFGF の割合。

D. 考察

シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着率を逆相 HPLC を用いて評価した。その結果、bFGF 標品とハイドロゲルから吸着し bFGF との間で、逆相カラムからの溶出時間が同じであり、また溶出ピークの形からも変化していないことがわかった。このことは、bFGF がハイドロゲルに吸着することで、bFGF の立体構造は変化しないことを示している。また、シート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着率は、約 89.4% だった。これまでに、われわれは、重傷下肢虚血疾患の再生誘導治療で使用

する細粒状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着率を 80% 以上として規格化している。したがって、シート状ゼラチンハイドロゲルは、bFGF の吸着率において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であると考えられる。

E. 結論

本研究により、末期虚血性心疾患の再生誘導治療に用いるシート状ゼラチンハイドロゲルに対する bFGF の吸着率を明らかにすることができた。さらに、bFGF をハイドロゲルに吸着させることで、bFGF の立体構造が変化しないことを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院
臨床研究総合センター
研究分担者 清水 章

研究要旨

難治性虚血性疾患の新たなオーダーメイド治療法として、生体吸収性の高分子担体であるゼラチンハイドロゲルと細胞増殖因子である塩基性繊維芽細胞増殖因子の組み合わせによる再生医療を開発、実用化するため、難治性下肢虚血に対する先進医療B制度の下での臨床試験（第3項先進医療）の実施、結果の取り纏めの支援を行った。更にこの方法を虚血性心疾患に応用するための臨床試験の実施に向け、試験計画の立案・設計、非臨床データの収集に対する支援を行った。

A. 研究目的

難治性虚血性疾患に対して、生体吸収性の高分子担体と細胞増殖因子を用いた新たな再生医療を開発することにより、同疾患に対する、オーダーメイド医療の実現に向けた検討を行う。このために行う臨床試験の準備、実施、結果の取り纏めなどについて、これを実施する医師・研究者に必要な支援を行い、試験の円滑な実施と結果の取り纏めを目指す。

B. 研究方法

医学部附属病院の研究者などが、難治性下肢虚血患者を対象とし、先進医療B制度の下での臨床試験を実施と結果の取り纏めについて実践的支援を行うとともに、虚血性心疾患を対象とした臨床試験を開始するために必要な支援活動を行う。（倫理面への配慮）

上記の臨床試験（難治性下肢虚血を対象とする第3項先進医療）の申請・実施に必要な倫理審査を受け、承認された。実施ならびに結果についても必要な報告などを行った。

C. 研究結果

難治性下肢虚血に対する先進医療B制度の下での臨床試験の実施にあたり、プロジェクトの全体を見渡すプロジェクトマネジメントを行い、試験が完遂したことを受け、結果取り纏め、総括報告書の作成ならびに厚生労働省へ提出を

支援した。この総括報告書は、第3項先進医療（高度評価ならびにこれを引き継いだ先進医療B制度）として実施・完遂された試験としては初めての詳細かつ正式な報告書であり、治験のものに準じて作成された。この試験の結果を虚血性心疾患にも応用し、新たな臨床試験を開始するため、試験計画の立案ならびに安全性等必要となる非臨床データの取得を支援した。

D. 考察

新規・先端医療の開発・実用化における、試験の立案・遂行・取り纏めとその報告についてノウハウを得ることができ、支援活動の重要性を再認識した。

E. 結論

臨床試験の基盤を形成し、完遂を促進することならびに的確な成果の取り纏めを行うには、十分なノウハウを持ってこれを支援することが不可欠であるが、本研究によりその実をあげることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugie, T. Sawada, T. Tagaya, N. Kinoshita, T. Yamagami, K. Suwa, H. Ikeda, T. Yoshimura, K. Niimi, M. Shimizu, A. Toi, M. Comparison of the

indocyanine green fluorescence and blue dye methods in detection of sentinel lymph nodes in early-stage breast cancer. *Annal. Surg. Oncol.* 2013 **20** 2213-2218. .

2. Asada, R. Shimizu, S. Ono, S. Ito, T. Shimizu, A., Yamaguchi, T. Analysis of new drugs whose clinical development and regulatory approval were hampered during their introduction in Japan. *J. Clin. Pharm. Therapeutics* 2013 **38** 309-313.
3. Hara, E. Makino, A. Kurihara, K. Sugai, M. Shimizu, A., Hara, I. Ozeki, E. Kimura, S. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome. *Biochem. Biophys. Acta-General Sub.* 2013 **1830**, 4046-4052.
4. Morimoto, N. Yoshimura, K. Niimi, M. Ito, T. Aya, R. Fujitaka, J. Tada, H., Teramukai, S. Murayama, T. Toyooka, C. Miura, K. Takemoto, S. Kanda, N. Kawai, K. Yokode, M. Shimizu, A. Suzuki, S. Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers. *Tissue Engineer. Part A* 2013 **19**, 17-18.

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター
早期臨床試験部
研究分担者 横出 正之

研究要旨

標記研究の一環として、第3項先進医療(現 先進医療 B)「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施における有害事象の解析を行い、本医療技術の一般化のための課題を整理することができた。

A. 研究目的

本研究の目的は、京都大学医学部附属病院単施設による先進医療 B「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施に際して生じた主要エンドポイントの一つである安全性の検証のため有害事象の解析をおこなうことである。

B. 研究方法

上記目的達成のために、当部（臨床研究総合センター早期臨床試験部医師ならびに臨床研究コーディネーター）において、臨床試験支援部門ならびに安全性情報管理部門として被験者 10 名における有害事象の発現に関する報告から有害事象名、発現日、転帰日、重篤性につき検討を行った。

（倫理面への配慮）

世界医師会ヘルシンキ宣言、薬事法、臨床研究に関する倫理指針、第3項先進医療に関する諸通知等を遵守して、本研究を遂行した。

C. 研究結果

本臨床試験の総被験者 10 名に対し、有害事象の発生を認めたのは 5 例、うち 3 例が因果関係不明とされた。これらはいずれも AST(GOT)上昇、ALT(GST)上昇であったが、因果関係不明

で副作用と判断された。

重篤な有害事象は 1 名にみられ、事象名は左下腿蜂窩織炎および右視床出血で入院を伴ったが試験薬との因果関係は否定された。

以上より副作用と認められた非重篤・軽度の 3 事象以外には因果関係が明らかな有害事象は重篤、非重篤のいずれにおいても認めなかった。

D. 考察

京都大学医学部附属病院単施設による先進医療 B「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施に際して生じた、主要エンドポイントの一つである安全性の検証のため有害事象の解析をおこなった。試験期間中、副作用と認められた非重篤・軽度の 3 事象以外には因果関係が明らかな有害事象は重篤、非重篤のいずれにおいても認めず安全性には重大な問題がないと判断された。

E. 結論

以上の分担研究を通じて、「生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発」に寄与することができた。この成果を、今後、下肢末梢性血管疾患以外を対象とする臨床試験の実施支援に役立てたい。

参考文献

1) Marui et al. A novel approach to therapeutic

angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I-IIa study. *Circ J* 2007;71:1181-6.

- 2) Aronow WS et al. Prevalence of coexistence of coronary artery disease, peripheral arterial disease, and atherothrombotic brain infarction in men and women > or = 62 years of age. *Am J Cardiol.* 1994;74:64-5.
- 3) McDermott et al. Recruiting participants with peripheral arterial disease for clinical trials: experience from the Study to Improve Leg Circulation (SILC). *J Vasc Surg.* 2009;49:653-9.e4.
- 4) Hobbs et al. The Exercise vs Angioplasty in Claudication Trial (EXACT): reasons for recruitment failure and the implications for research into and treatment of intermittent claudication. *J Vasc Surg* 2006;44:432-3.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Absolute risk of cardiovascular disease and lipid management targets. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(9):689-697.
2. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K; Japan Atherosclerosis Society (JAS). Comprehensive risk management for the prevention of cardiovascular disease: executive summary of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan -- 2012. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(7):603-615.
3. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Diagnostic criteria for dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(8):655-660.
4. Morimoto N, Yoshimura K, Niimi M, Ito T, Aya R, Fujitaka J, Tada H, Teramukai S, Murayama T, Toyooka C, Miura K, Takemoto S, Kanda N, Kawai K, Yokode M, Shimizu A, Suzuki S. Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(17-18):1931-1940.
5. Ito-Ihara T, Hong JH, Kim OJ, Sumi E, Kim SY, Tanaka S, Narita K, Hatta T, Choi EK, Choi KJ, Miyagawa T, Minami M, Murayama T, Yokode M. An international survey of physicians regarding clinical trials: a comparison between Kyoto University Hospital and Seoul National University Hospital. *BMC Med Res Methodol.* 2013; 13:130. doi: 10.1186/1471-2288-13-130.
6. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Treatment A) lifestyle modification: executive summary of the Japan Atherosclerosis Society(JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan--2012 version. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(12):835-849.
7. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2883.
8. Sumi E, Teramukai S, Yamamoto K, Satoh M, Yamanaka K, Yokode M. The correlation between the number of eligible patients in routine clinical practice and the low recruitment level in clinical trials: a retrospective study using electronic medical records. *Trials.* 2013;14:426. doi: 10.1186/1745-6215-14-426.
9. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNAs and

Lipoprotein Metabolism. J Atheroscler Thromb. 2014;21(1):17-22.

10. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Diagnosis of Atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 2013.
11. Sumi E, Yamazaki T, Tanaka S, Yamamoto K, Nakayama T, Bessho K, Yokode M. The increase in prescriptions of bisphosphonates and the incidence proportion of osteonecrosis of the jaw after risk communication activities in Japan: a hospital-based cohort study. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2014; 23(4):398-405. doi: 10.1002/pds.3562.
12. Mikawa T, Maruyama T, Okamoto K, Nakagama H, Lleonart ME, Tsusaka T, Hori K, Murakami I, Izumi T, Takaori-Kondo A, Yokode M, Peters G, Beach D, Kondoh H. Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. J Cell Biol. 2014;204(5):729-745. doi: 10.1083/jcb.201306149.

2. 学会発表

国際会議

1. Masayuki Yokode. Geriatrics and Healthy Longevity in Japan. 20th International Association of Gerontology and Geriatrics (IAGG) World Congress of Gerontology and Geriatrics, June 23-27 2013, Seoul Korea.

国内会議

1. 横出 正之. 動脈硬化性疾患の包括的管理考え方と実践. 第 45 回日本動脈硬化学会学術集会 Page176 平成 25 年 7 月 18-19 日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学大学院医学研究科
研究分担者 森田 智視

研究要旨： 再生医療とくにオーダーメイド医療の開発のためにもデータの蓄積が必要であり、データベースの構築と集積したデータの有効活用が重要であると考えられる。そのため最適な統計的方法の一つがベイズ流統計手法である。そこで、本分担研究ではベイズ流統計手法の利用可能性について検討・評価を行った。

A. 研究目的

新治療法開発のためのエビデンスを得るためには前向きの大規模臨床試験を実施するのがもっとも望ましい。しかしながら、多くの理由により大規模臨床試験の実施が困難な領域がある。そのような場合には、観察される一つ一つの情報をデータベース化し、積み上げたデータの分析を通じてエビデンスの充実化を図ることが一つの有効な手段であろう。“ベイズ流”アプローチの特徴は複雑化する様々な臨床的要求に対して柔軟に対応できる点や事前情報を積極的に活用できる点にある。本研究では、データベース情報をを用いた解析手法を検討するための事前準備として、過去に実施された臨床試験の結果を事前情報として積極的に用いるベイズ流統計手法の利用可能性について検討・評価を行う。

B. 研究方法

ベイズ流統計手法の特徴の一つは、事前情報のデータ解析への取り込みにある。その

事前情報のまとめ方について、最近公表された試験デザインに関する論文を取り上げる。対象としたジャーナルは臨床試験デザインを多く取り上げているものに限定した。

C. 研究結果

ベイズ流統計とは、まず、有効性や安全性に関して調べたい興味のあるパラメータ (θ) を考える。 θ は1つの値に決まったものとして考えず、ランダムな変数であると考え。過去の臨床的データをもとにした θ に関する知識あるいは不確からしさを統計的な確率分布を用いて‘事前分布’として表す。新たに実施する研究/試験で観察されたデータを事前情報に加えて θ の推定精度を高めていく。このプロセスのことを観察データで事前分布を‘更新する(update)’と呼ぶ。データで更新された後の θ に関する情報を‘事後分布’として表す。

Ibrahim&Chen[1]は、power 事前分布を提案した。Power 事前分布は、ヒストリカルデータに適切な重み(0~1の間の値をとる power パラメータ)を用いて事前情報として取り込むことを行う。Power パラメータを調整することで、実施している試験のデータと相対的な重みを調整する。Power パラメータ=0のときは、ヒストリカルデータからの情報取り込みは0、その一方で、power パラメータ=1のときは得られたヒストリカルデータ全てを事前分布として取り込む。Neuenschwanderら[2]は Ibrahim &Chen[1]が提案した power 事前分布を評価することでより性能の良いものに改良した。また、Hobbsら[3]は commensurate power 事前分布を提案し、ヒストリカルデータと現試験のデータとの commensurability (類似性)を評価する方法を提案した。その類似性に基づいてヒストリカル情報に重みづけることが可能となる。

D. 考察

事前情報を積極的に活用するベイズ流統計手法を適切に用いるためには、事前情報のもとになるデータの質の高さが鍵となる。質管理をしっかりと行い蓄積したデータに対してベイズ流アプローチの適用することは有用であろう。

E. 結論

今後のテーラーメイド医療開発を目的とした臨床試験デザインを検討するに際し事前情報を活用し、効率的に臨床開発を推進することに貢献できるベイズ流アプローチの適用を考えることは重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
現時点でなし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

[参考文献リスト]

- 1) Ibrahim JG, Chen MH. Power prior distributions for regression models. *Statistical Science* 2000; 15:46–60.
- 2) Neuenschwander B, Branson M, Spiegelhalter DJ. A note on the power prior. *Statistics in Medicine* 2009; 28:3562–3566.
- 3) Hobbs BP, Carlin BP, Mandekar SJ, Sargent DJ. Hierarchical commensurate and power prior models for adaptive incorporation of historical information in clinical trials. *Biometrics* 2011; 67:1047–1056.

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院
研究分担者 松原 和夫

研究要旨

治験薬 GMP に準拠してゼラチンハイドロゲルの製造方法を確立してきた。昨年度までに制定した製造手順書に基づき、本年度はイヌにおける薬効試験のための製造を行った。また、治験薬 GMP 管理の適合性について外部評価を受け「医療機関での治験薬（試験薬）製造という特殊性を考慮して、PMDAによる治験薬GMP基準では今回の判定は適合に相当する」と評価を受けた。

A. 研究目的

これまでに研究代表者及び分担者のグループでは、下肢虚血性疾患に対して、生体吸収性高分子担体（細粒）を用いた高度医療を実施してきた。虚血性心疾患へ生体吸収性高分子担体を用いた臨床研究を実施するにあたり、生体吸収性高分子担体（シート）の製造方法を確立し、安全性を担保することが必要である。

本年度は、イヌにおける薬効試験のための凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造を行う。さらに、治験薬 GMP 管理について外部評価を実施する。

B. 研究方法

1. 製造指図・記録書に基づき凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを作製し、品質試験を実施した。製造は臨床試験用試験薬と同様に治験薬GMP管理を行う特殊無菌製剤室で製造部門担当者ならびに品質部門担当者によって行った。

2. 元PMDA GMPエキスパート（査察官）宮木晃氏に治験薬 GMP 調査を依頼した。手順書ならびに施設の整備状況について監査を受けた。

（倫理面への配慮）

分担者松原の実施した研究において、倫理面で問題となる内容は含まれていない。

C. 研究結果

以前の臨床試験時に制定した治験薬に関する文書に従い、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを3ロット作製した（図1）。無菌試験、エンドトキシン試験等の安全性

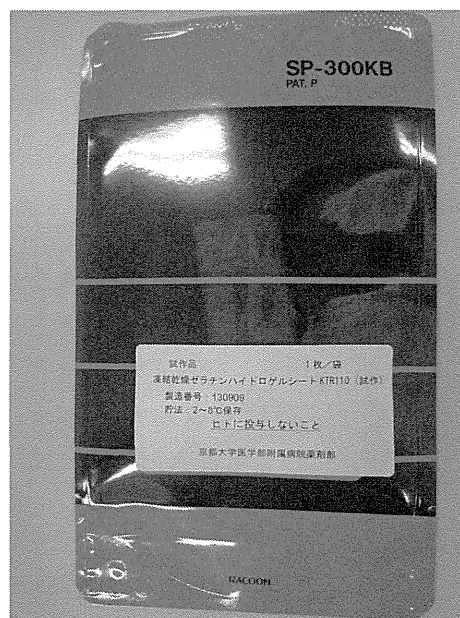


図 1. 凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート

試験を実施し、陰性が確認された。また、分担研究者田畑らによって品質試験が、分担研究者丸井によりイヌを用いた本製剤の非臨床有効性試験を実施された。以上より、GMP 基準で製造したゼラチンハイドロゲルシートを用い非臨床試験が完了した。

治験薬 GMP への適格性について外部監査を実施した(図2)。「重度の不備事項」「中程度の不備事項」に該当する箇所はなかった。試験結果の導出に「軽度の不備事項」についての指摘を受けたが、「校正証明のシールがない」「サインがない」など修正が可能なものだけであった。

D. 考察

今年度の結果より凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造方法が確定した。これに基づき、来年度は計画の臨床試験用試験薬に関する「治験薬に関する文書(臨床試験用)」を作成する。プロトコルの作成を平行して行い、臨床試験実施へ準備を進める。

本 GMP 特殊無菌製剤室は平成 21 年 2 月より GMP 運用を開始してきた。治験薬 GMP では治験の監査等以外では当局によるチェック機構は存在しない。今年度は GMP に関する専門家に調査を依頼し、GMP 体制の監査を受けた。不備事項は認められなかったことから本手順書ならびに本施設での運用が妥当であると判断された。また、「製薬会社の試験検査区域(QC)と同等である」とコメントを受けたことから、本研究成果を今後起業等へ導出する際に、試験結果だけでなく製造方法のノウハウを含めた契約締結も可能であると考えられる。

E. 結論

本製造の凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの安全性・有効性が非臨床試験で証明された。今後、臨床試験用試験薬の製造方法を確定し、臨床試験を実施していく。さらに、本施設の治験薬 GMP への適合性が認められ、研究成果の信頼性が確保された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 米澤淳 トランスレーショナルリサーチへの薬剤師の新たなかわり 治験薬 GMP 基準の特殊無菌製剤室の設置 *ファルマシア* 49(2): 103-105, 2013

2014年2月24日

京都大学医学部付属病院薬剤部御中

元PMDA GMPエキスパート(査察官)
宮木 晃

治験薬GMP調査の確認結果報告書

さて先般、実施しました貴京都大学医学部付属病院薬剤部における試験薬製造施設のハード及びソフト面の確認につきまして、下記の通り報告申し上げます。
なお、半日の監査の中でいくつか気がついた点を講評事項として報告させていただきますので、対応等の検討をお願い申し上げます。

I. 一般事項

1. 目的
貴京都大学医学部付属病院薬剤部が進めている治験薬 GMP 基準に即した試験薬製造が治験薬 GMP 基準のハード・ソフト面を満たしているかどうかを調査した第三者監査である。
2. 調査対象施設
名称&施設: 京都大学医学部付属病院薬剤部
所在地: 京都市左京区聖護院川原町 5 4
3. 調査実施日
2014年2月3日(月) 12:40~17:30
4. 主たる対応者等(敬称略)
対応者: 米澤 淳
大村 友博
主な対応者: 梶原 望渡
南 いく子
5. 調査日程
2月3日(月)
12:40~13:00 自己紹介と出席者の紹介
治験薬 GMP 体制の整備・試験薬製造等の概要説明
13:00~15:00 ツアー・ハード(無菌試験室)
15:00~17:10 書面(ソフト)調査
17:10~17:30 ラップアップと Q&A

II. 確認結果

治験薬 GMP に関するハード・ソフト状況を確認した結果、いくつかの軽度の不備事項が認められましたので、以下に示します。
不備事項につきましてはできるだけ速やかに改善されることを希望致します。

1. 重度の不備事項(Critical)
なし
2. 中程度の不備事項(Major)
なし
3. 軽度の不備事項(Minor)
<ハード>
①無菌試験室内の天秤(メトラー製)に貼付する校正シールを業者より発行してもらうこと。
②天秤の日常点検を行っているチェックリストに「清掃状態の確認」を付け加えること。
③掲示している着換え手順には責任者の日付とサインをすること。
④製造用水区域には用水のフロー図を作成して貼付しておくこと。(日付とサインをする)
<ソフト>
①「治験薬製造指図・記録書」の滅菌チャートと秤量記録紙に記録者の日付とサインをすること。
②「治験薬製造品質試験記録書」の COA(無菌試験、エンドトキシン)に確認者の日付とサインをすること。
③「出荷許可書」を「出荷可否判定書」に変更して様式を作成すること。
なお「出荷可否判定書」に出荷の可否を判定するという文書を加えること。
④「逸脱管理手順書」にフローチャート図を添付すること。
⑤「自己点検手順書」のチェックリストを逐次改訂すること。
P I C / S G M P を参考にしてください。
4. 推奨事項(Recommend)
①自己点検のチェックリストは将来的には P I C / S G M P を参考にすることをお勧めする。
②全ての手順書(SOP)を一覧にして、常にアップデートしておくことをお勧めする。
5. **※非常に良かった点**
<ハード>
1) 無菌室の維持・管理を定期的かつ日常的に適切に実施していた。
製薬会社の試験検査区域(QC)と同等である。
2) 消毒剤を2種類以上(ヒビデンとエタノール、ザルコニンとエタノール)を使用しているのは P I C / S G M P 基準(耐性菌の防止の観点から)に合っている。

<ソフト>
1) 前もってお送りした「GMP事前査察スケジュール(案)」と「GMP事前査察に必要とする事前資料」の各項目に赤字で現況及び手順書名を記載していたので監査が速やかに進めることができた。

III. 総評

- 1) 医療機関での治験薬(試験薬)製造という特殊性を考慮して、PMDAによる治験薬 GMP 基準では今回の判定は適合に相当する。
今後は講評事項の細かい点を着実に改善されることを望むものである。
- 2) ソフト面は予想以上に充実していた。今後さらなる向上を期待する。
- 3) 治験薬 GMP の観点から大きな問題となる点は見られなかった。
- 3) ハード面・ソフト面でいくつかの改善点があるので、できるだけ早く完了することが望ましい。

IV. 終わりに

今回の治験薬 GMP の監査で主に立会いと説明をいただきました梶原望渡様と南いく子様そしてその他の皆様のご協力に対して深く感謝申し上げます。

図 2. 監査報告書

2. 学会発表

1. 米澤淳、梶原望渡、南いく子、大村友博、中川俊作、松原和夫；一般シンポジウム 31「薬物治療を支援する院内製剤—現状と課題—」 治験薬 GMP 基準の院内製剤製造によるトランスレーショナルリサーチへの貢献、日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 29 日 熊本

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧

論文

1. Marui A, Okabayashi H, Komiya T, Tanaka S, Furukawa Y, Kita T, Kimura T, Sakata R. Impact of occult renal impairment on early and late outcomes following coronary artery bypass grafting. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;17:638-43.
2. Masumoto H, Yamashita JK. Strategies in cell therapy for cardiac regeneration. *Inflammation and Regeneration*. 2013;33:114-20. Review.
3. Minakata K, Sakata R. Perioperative control of blood glucose level in cardiac surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;61:61-6.
4. Minakata K, Yamazaki K, Miwa S, Funamoto M, Kumagai M, Marui A, Sakata R. Ventricular Approach for Functional Mitral Regurgitation in Cardiomyopathy. *World Journal of Cardiovascular Surgery*. 2013;3:8-14.
5. Nakano J, Marui A, Muranaka H, Masumoto H, Noma H, Tabata Y, Ido A, Tsubouchi H, Ikeda T, Sakata R. Effects of hepatocyte growth factor in myocarditis rats induced by immunization with porcine cardiac myosin. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2014;18:300-7.
6. Nakano J, Okabayashi H, Noma H, Sato T, Sakata R. Early angiographic evaluation after off - pump coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;146:1119-25.
7. Toyota T, Furukawa Y, Ehara N, Funakoshi S, Morimoto T, Kaji S, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shiomi H, Yamamuro A, Kinoshita M, Kitai T, Kim K, Tani T, Kobori A, Kita T, Sakata R, Kimura T, on behalf of the CREDO-Kyoto Investigators. Sex-Based Differences in Clinical Practice and Outcomes for Japanese Patients With Acute Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Circ J*. 2013;77:1508-17.
8. Uehara K, Minakata K, Funamoto M, Yamazaki K, Marui A, Sakata R. Alternative redo sternotomy in a patient with tracheostoma and patent grafts. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*. Published online 9 October 2013.
9. Yamazaki K, Tanaka S, Sakata R, Miwa S, Oriyanhan W, Takaba K, Minakata K, Marui A, Ikeda T, Toyokuni S, Komeda M, Ueda K. Protective effect of cardioplegia with poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vitro study of isolated rat heart model. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2013;28:143-7.
10. 丸井晃, 岡林均, 小宮達彦, 坂田隆造. エビデンスに基づく至適冠血行再建 CREDO-Kyoto からの検証. *日本心臓血管外科学会雑誌*. 2013;42:16-22.

11. 丸井晃, 坂田隆造. 【血管炎-基礎と臨床のクロストーク-】 血管炎の血管新生療法と免疫療法 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた血管新生療法. 日本臨床. 2013;71(増刊 1 血管炎):464-9.
12. 南方謙二, 坂田隆造. 【胸部外科領域における再手術-最近の動向】 心臓血管領域 弁手術後冠状動脈バイパス術. 胸部外科. 2013;66:618-24.
13. 船本成輝, 南方謙二, 山崎和裕, 川東正英, 瀬戸崎修司, 武田崇秀, 恒吉裕史, 丸井晃, 坂田隆造. 【重症心不全に対する外科治療】 機能性僧帽弁閉鎖不全症に対する左室形成術の適応と限界. 胸部外科. 2013;66:17-23.
14. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Absolute risk of cardiovascular disease and lipid management targets. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:689-97.
15. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K; Japan Atherosclerosis Society (JAS). Comprehensive risk management for the prevention of cardiovascular disease: executive summary of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan -- 2012. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:603-15.
16. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Diagnostic criteria for dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:655-60.
17. Morimoto N, Yoshimura K, Niimi M, Ito T, Aya R, Fujitaka J, Tada H, Teramukai S, Murayama T, Toyooka C, Miura K, Takemoto S, Kanda N, Kawai K, Yokode M, Shimizu A, Suzuki S. Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers. *Tissue Eng Part A*. 2013;19:1931-40.
18. Ito Ihara T, Hong JH, Kim OJ, Sumi E, Kim SY, Tanaka S, Narita K, Hatta T, Choi EK, Choi KJ, Miyagawa T, Minami M, Murayama T, Yokode M. An international survey of physicians regarding clinical trials: a comparison between Kyoto University Hospital and Seoul National University Hospital. *BMC Med Res Methodol*. 2013; 13:130.

19. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Treatment A) lifestyle modification: executive summary of the Japan Atherosclerosis Society(JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan--2012 version. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20:835-49.
20. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2883.
21. Sumi E, Teramukai S, Yamamoto K, Satoh M, Yamanaka K, Yokode M. The correlation between the number of eligible patients in routine clinical practice and the low recruitment level in clinical trials: a retrospective study using electronic medical records. *Trials.* 2013;14:426.
22. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:17-22.
23. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Diagnosis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* Published online 10 December 2013.
24. Sumi E, Yamazaki T, Tanaka S, Yamamoto K, Nakayama T, Bessho K, Yokode M. The increase in prescriptions of bisphosphonates and the incidence proportion of osteonecrosis of the jaw after risk communication activities in Japan: a hospital-based cohort study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2014; 23:398-405.
25. Mikawa T, Maruyama T, Okamoto K, Nakagama H, Lleonart ME, Tsusaka T, Hori K, Murakami I, Izumi T, Takaori-Kondo A, Yokode M, Peters G, Beach D, Kondoh H. Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. *J Cell Biol.* 2014;204:729-45.
26. Sugie T, Sawada T, Tagaya N, Kinoshita T, Yamagami K, Suwa H, Ikeda T, Yoshimura K, Niimi M, Shimizu A, Toi M. Comparison of the indocyanine green fluorescence and blue dye methods in detection of sentinel lymph nodes in early-stage breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2013;20:2213-18.

27. Asada R, Shimizu S, Ono S, Ito T, Shimizu A, Yamaguchi T. Analysis of new drugs whose clinical development and regulatory approval were hampered during their introduction in Japan. J. Clin. Pharm. Therapeutics 2013;38:309-13.
28. Hara E, Makino A, Kurihara K, Sugai M, Shimizu A, Hara I, Ozeki E, Kimura S. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome. Biochem. Biophys. Acta-General Sub. 2013;1830: 4046-52.
29. 米澤淳 トランスレーショナルリサーチへの薬剤師の新たななかかわり 治験薬GMP 基準の特殊無菌製剤室の設置 ファルマシア 2013;49:103-5.

著書

30. 熊谷基之, 丸井晃, 坂田隆造. 体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件: 技術情報協会; 2013/10/31.
31. 坂田隆造. 心臓外科 Knack & Pitfalls
冠動脈外科の要点と盲点 第2版: 文光堂; 2012/10/1.
32. 丸井晃, 坂田隆造. 【ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線-古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)-】(第2章)徐放技術の医療応用 再生治療 血管. 遺伝子医学 MOOK. 2013;別冊(ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線):143-7.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Impact of occult renal impairment on early and late outcomes following coronary artery bypass grafting

Akira Marui^{a,b,*}, Hitoshi Okabayashi^c, Tatsuhiko Komiya^d, Shiro Tanaka^b, Yutaka Furukawa^e,
Toru Kita^e, Takeshi Kimura^f, Ryuzo Sakata^a and the CREDO-Kyoto Investigators

^a Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

^b Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

^c Department of Cardiovascular Surgery, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Japan

^d Department of Cardiovascular Surgery, Kurashiki Central Hospital, Kurashiki, Japan

^e Kobe City Medical Center General Hospital, Kobe, Japan

^f Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

* Corresponding author. Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin-Kawahara, Sakyo, Kyoto 606-8507, Japan. Tel: +81-75-7513784; fax: +81-75-7514960; e-mail: marui@kuhp.kyoto-u.ac.jp (A. Marui).

Received 31 January 2013; received in revised form 3 May 2013; accepted 16 May 2013

Abstract

OBJECTIVES: High serum creatinine is considered an independent risk factor for poor outcomes following coronary artery bypass grafting (CABG). However, the impact of occult renal impairment (ORI), defined as an impaired glomerular filtration rate (GFR) with a normal serum creatinine (SCr) level, remains unclear. Thus, we sought to investigate the impact of ORI on outcomes after CABG.

METHODS: Among patients undergoing their first percutaneous coronary intervention (PCI) or CABG enrolled in the CREDO-Kyoto Registry (a registry of first-time PCI and CABG patients in Japan), 1842 patients with normal SCr levels undergoing CABG were enrolled in the study. Patients were divided into two groups based on preoperative estimated GFR calculated by the Cockcroft–Gault equation: 1339 patients with estimated GFR of ≥ 60 ml/min/1.73 m² (normal group) and 503 with estimated GFR of < 60 ml/min/1.73 m² (ORI group).

RESULTS: Preoperative estimated GFR differed between the groups (51.3 ± 6.6 vs 85.8 ± 23.0 ml/min/1.73 m², $P < 0.01$). ORI was associated with high in-hospital mortality (3.2 vs 1.0%, $P < 0.01$) and need for dialysis (2.0 vs 0.2%, $P < 0.01$). In terms of long-term outcomes, ORI was associated with high mortality compared with the normal (hazard ratio [95% confidence interval]: 1.72 [1.16–2.54], $P < 0.01$) and high incidence of composite cardiovascular events (death, stroke or myocardial infarction: 1.53 [1.16–2.02], $P < 0.01$).

CONCLUSIONS: ORI was an independent risk factor for early and late death as well as cardiovascular events in patients undergoing CABG with normal SCr levels. A more accurate evaluation of renal function through a combination of SCr and estimated GFR is needed in patients with normal SCr levels.

Keywords: CABG • Renal insufficiency • Long-term outcomes • High-risk populations

INTRODUCTION

Preoperative renal dysfunction is considered an independent risk factor for mortality and morbidity after coronary artery bypass grafting (CABG) [1–4]. SCr is the most popular test for renal failure. However, SCr does not usually rise until the glomerular filtration rate (GFR) has fallen by 75% or more, and it can remain within the normal range even when renal function is significantly impaired [5–7]. SCr level depends on muscle mass, age, gender and metabolism, and it thus has a limited ability to identify patients with preoperative renal failure [7, 8].

Some populations with normal SCr but impaired renal function have been reported. Occult renal impairment (ORI) is defined as an impaired GFR with a normal SCr level [9]. Because GFR has been reported to estimate poor outcomes more accurately than SCr after cardiac surgery [10, 11], patients with ORI may be more

strongly associated with poor outcomes compared with those with normal SCr levels and GFRs. However, the impact of ORI on outcomes after CABG, particularly on long-term outcomes, remains poorly understood. Thus, in the present study, we sought to investigate the impact of ORI on early and late outcomes after CABG using a large Japanese multicentre registry of myocardial revascularization.

PATIENTS AND METHODS

Study population

The Coronary REvascularization Demonstrating Outcome Study in Kyoto (CREDO-Kyoto) is a multicentre registry in Japan that includes 9877 consecutive patients undergoing their first percutaneous