

201309020A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

食道がん化学放射線療法後局所遺残再発例に対する  
タラポルフィンナトリウム(レザフィン)及び半導体レーザー  
(PDレーザー)を用いた光線力学療法 of 医師主導治験

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武藤 学

平成26(2014)年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

食道がん化学放射線療法後局所遺残再発例に対するタラポルフィリンナトリウム（レザフィリン）及び半導体レーザー（PDレーザ）を用いた光線力学療法の医師主導治験

----- 1

【武藤 学】

## II. 分担研究報告

1. 食道癌に対する新しい光線力学療法の開発に関する研究 ----- 9  
（医師主導治験の統括責任者）

【武藤 学】

2. 医師主導治験のプロジェクトマネジメント/スタディマネジメントに関する研究 ----- 13

【伊藤 達也】 【笠井 宏委】

3. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師 ----- 17  
【矢野 友規】

4. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師 ----- 20  
【片岡 洋望】

5. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師 ----- 23  
【石原 立】

6. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師 ----- 25  
【山本 佳宣】

7. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師 ----- 27  
【角嶋 直美】

8. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師 ----- 29  
【磯本 一】

9. レザフィリンPDTに関する医師主導治験の医学アドバイザーに関する研究 ----- 31

【中村 哲也】

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 別冊

# I. 総括研究報告書

食道がん化学放射線療法後局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウム（レザフィリン）  
及び半導体レーザー（PDレーザー）を用いた光線力学療法の医師主導治験

研究代表者 武藤 学 京都大学大学院医学研究科 腫瘍薬物治療学講座 教授

研究要旨

食道がんに対する化学放射線療法は、臓器および機能温存可能な治療法であるが、局所の遺残・再発率が高く予後の改善には救済治療の開発が急務である。現在、救済治療として外科手術が行われているが、術後合併症の頻度が高く治療関連死が10%を越えるリスクの高い治療である。また、遺残・再発に対する化学療法では根治は期待できない。研究代表者らは、従来の光線力学療法（photodynamic therapy:PDT）による救済治療を開発してきたが、遮光期間が1ヶ月以上と長く、日光過敏症の頻度も高いという課題があった。さらにレーザー装置が製造中止となり、今後わが国でPDTができなくなる危機的状況に陥った。本研究では、これらの課題を克服するため、タラポルフィンナトリウム（ME2906）及び半導体レーザー（PNL6405EPG）を用いた第二世代PDTによる救済治療開発を医師主導治験として実施した。2012年9月に治験届けを提出し、2012年11月には第一例目を登録した。2013年度中に目標症例25例を登録した（最終登録症例は26例）。研究者判定による有効性は、88.5%（23/26）と極めて高く、重篤な有害事象は認めていない。また、本治験では、既承認用法にはない翌日照射を許容しているが、GLP基準で実施した翌日照射の非臨床試験において、安全性と有効性が証明された。

研究分担者 所属機関及び所属機関における職名

武藤 学 京都大学医学研究科・教授  
伊藤 達也 京都大学医学部附属病院・助教  
笠井 宏委 京都大学医学部附属病院・助教  
矢野 友規 国立がん研究センター東病院・医長  
片岡 洋望 名古屋市立大学医学研究科・准教授  
石原 立 大阪府立成人病センター・部長  
山本 佳宣 兵庫県立がんセンター・医長  
角嶋 直美 静岡県立静岡がんセンター・副医長  
磯本 一 長崎大学病院・准教授  
中村 哲也 獨協医科大学・教授

A. 研究目的

本研究の目的は、食道がん化学放射線療法（chemoradiotherapy, CRT）または放射線治療（radiotherapy, RT）後の原発巣遺残再発に対するタラポルフィンナトリウム（ME2906）及び半導体レーザー（PNL6405EPG）を用いた光線力学療法の医師主導治験を多施設共同第II相臨床試験として実施し薬事申請後承認を得ることである。また、承認申請に必要な非臨床試験データ（食道がん細胞に対する有効性と翌日照射の有効性と安全性に関するデータ）も補充する。

B. 研究方法

食道がん放射線療法後局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウム (ME2906) 及び半導体レーザー (PNL6405EPG) を用いた光線力学療法の医師主導治験を多施設共同第II相臨床試験として実施する。対象は、50Gy以上のCRTまたはRT単独治療を施行され、原発巣に遺残再発が認められた症例。遺残再発病変の壁深達度は固有筋層まで。ME2906の投与量は20mg/kg。照射のタイミングは、ME2906投与後4-6時間後でPNL6405EPGの照射エネルギーは、100J/cm<sup>2</sup>とした。主要評価項目は、原発巣のLocal-confirmed complete response (L-cCR)とした。目標症例数は25例。治験調整事務局は、京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターに設置した。

非臨床試験として、翌日照射の有効性と安全性を実施する。

#### (倫理面への配慮)

GCPに従って医師主導治験を実施する。プロトコルの審査委員会 (IRB) 承認が得られた施設からしか患者登録を行わない。全ての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保しプライバシー保護を厳守する。治験審査委員会、効果・安全性評価委員会、監査委員会を組織し、研究開始前および研究実施中の第三者的監視を行う。

### C. 研究結果

#### 1) 医師主導治験

2012年9月に治験届けを提出し、2012年11月には第一例目を登録した。2013年度中に目標症例25例を登録した (最終登録症例は26例)。登録症例数と達成度は以下の通りである。

- 静岡県立静岡がんセンター  
3例 (予定2例、150%)
- 兵庫県立がんセンター

4例 (予定3例、133%)

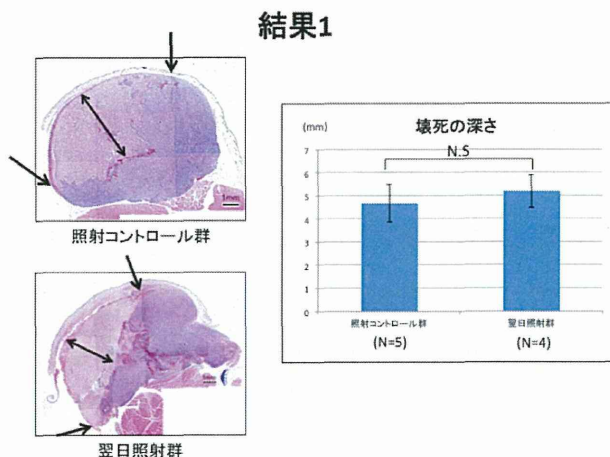
- 京都大学病院  
6例 (予定5例、120%)
- 国立がん研究センター東病院  
7例 (予定7例、100%)
- 名古屋市立大学附属病院  
3例 (予定3例、100%)
- 大阪府立成人病センター  
3例 (予定6例、50%)
- 長崎大学附属病院  
0例 (予定2例、0%)

研究者判定による有効性 (局所完全奏効 : local complete remission, L-CR) は、88.5% (23/26) と極めて高かった。内視鏡による有効性判定に関し客観性を担保するため、これまで2回 (平成25年9月11日、平成26年2月25日) 中央判定委員会を実施し、最終回は平成26年5月28日を予定している。安全性に関するモニタリングはすでに終了しており、日光過敏を含め重篤な有害事象は認めなかった。

#### 2) 非臨床試験

##### 2-1) マウス腫瘍移植モデルを用いた翌日照射の有効性評価試験

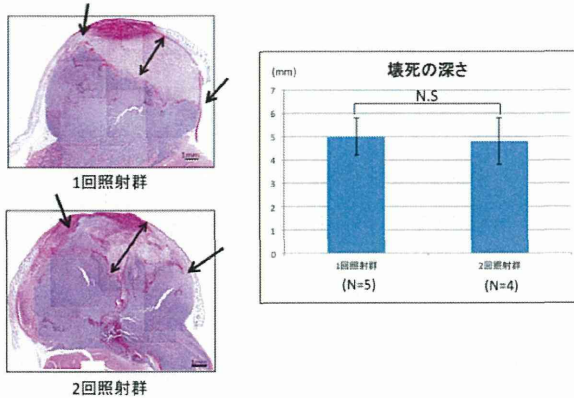
「照射漏れ」と想定した翌日照射群においては、血漿中濃度が半減した時点での照射となるが、コントロール群と比較して、移植腫瘍の壊死組織の深さは両群で差がなかった。



##### 2-2) マウス腫瘍移植モデルを用いた2回照射の安全性評価試験

翌日照射することによって、前日照射部位にも再度レーザー照射がされる可能性があるが、1回照射群と比較して、翌日照射（2回照射されたとする群）における移植腫瘍の壊死組織の深さは両群で差がなかった。

## 結果2



## D. 考察

食道がんは、難治がんのひとつであり進行期（ステージII/III/IV）症例の予後は極めて悪い。化学放射線療法は食道がんに対する臓器および機能温存可能な治療法であるが、局所の遺残・再発率が高く予後の改善には救済治療が必要である。しかし、現在、救済治療として行われている外科手術は、術後合併症の頻度が高く治療関連死が10%を越えるため、リスクの高い治療であることは否めない。本治験により、高い奏効率と安全性が示されれば、平成26年度中に薬事承認を行う予定である。また、本研究の成果で、根治的な化学放射線療法で食道がんが残存・再発した場合でも、臓器温存のまま根治が期待できる救済治療が確立できる可能性がある。さらに厚生労働省の癌医療政策では、癌患者の5年生存率を20%向上させることを掲げているが、本研究成果で根治的な低侵襲治療が開発されれば、患者一人一人に根治の望みを与えるばかりか、癌医療政策に大きく貢献することが期待できる。

## E. 結論

食道がんCRT/RT後の遺残再発に対する救済

治療に関する医師主導治験を実施し、目標症例数を登録した。研究者判定ではあるが、88%と高い完全奏効割合が示された。またモニタリングが終了した安全性評価では、重篤な有害事象は認めなかった。翌日照射に対する有効性と安全性をGLP基準の非臨床試験で示した。

## F. 健康危険情報

現時点では特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoko Mashimo, Yasumasa Ezoe, Kosuke Ueda, Yoshinao Ozaki, Yusuke Amanuma, Ikuo Aoyama, Takahiro Horimatsu, Shuko Morita, Shinichi Miyamoto, Tomonori Yano, Koji Higashino, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Salvage photodynamic therapy is an effective and safe treatment for patients with local failure after definitive chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Therapy (JCT)* 2014 (in press)
- 2) Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Ohi H, Moriwaki K, Akashi H, Taguchi T, Hayashi N, Hamano S, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Joh T. Antitumor effects in gastrointestinal stromal tumors using photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(4):767-775. PMID: 24552777 [PubMed - as supplied by publisher]
- 3) Minami H, Isomoto H, Nakayama T, Hayashi T, Yamaguchi N, Matsushima K, Akazawa Y, Ohnita K, Takeshima F, Inoue H, Nakao K. Background coloration of squamous epithelium in esophago-pharyngeal squamous cell carcinoma: what causes the color change? *PLoS One* 2014;9(1):e85553.
- 4) Minami H, Isomoto H, Inoue H, Akazawa Y, Yamaguchi N, Ohnita K, Takeshima F,

- Hayashi T, Nakayama T, Nakao K. Significance of background coloration in endoscopic detection of early esophageal squamous cell carcinoma. *Digestion* 2014;89(1):6-11.
- 5) Osamu Kikuchi, Yasumasa Ezoe, Shuko Morita, Takahiro Horimatsu, Manabu Muto. Narrow-band Imaging for the Head and Neck Region and the Upper Gastrointestinal Tract. *Jpn J Clin Oncol* 43(5):458-465. 2013
- 6) Manabu Muto. Endoscopic diagnostic strategy of superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Endosc.* 25(Suppl 1):1-6. 2013 (Epub)
- 7) Chikatoshi Katada, Manabu Muto, Satoshi Tanabe, Katsuhiko Higuchi, Tohru Sasaki, Mizutomo Azuma, Kenji Ishido, Takashi Masaki, Meijin Nakayama, Makito Okamoto, Wasaburo Koizumi. Surveillance after endoscopic mucosal resection or endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous cell carcinoma. *Digestive Endosc.* 25(Suppl 1): 39-43. 2013
- 8) Yano T, Yoda Y, Satake H, Kojima T, Yagishita A, Oono Y, Ikematsu H, Kaneko K. Radial incision and cutting method for refractory stricture after nonsurgical treatment of esophageal cancer. *Endoscopy.* 2013;45(4):316-319. Epub 2013/01/25
- 9) Kaneko K, Yano T, Minashi K, Kojima T, Ito M, Satake H, Yajima Y, Yoda Y, Ikematsu H, Oono Y, Hayashi R, Onozawa M, Ohtsu A. Treatment strategy for superficial pharyngeal squamous cell carcinoma synchronously combined with esophageal cancer. *Oncology.* 2013;84(1):57-64. Epub 2012/11/07.
- 10) Yamashina T, Ishihara R, Nagai K, Matsuura N, Matsui F, Ito T, Fujii M, Yamamoto S, Hanaoka N, Takeuchi Y, Higashino K, Uedo N, Iishi H. Long-term outcome and metastatic risk after endoscopic resection of superficial esophageal squamous cell carcinoma. *American Journal of Gastroenterology* 2013;108(4):544-551.
- 11) Kanzaki H, Ishihara R, Ohta T, Nagai K, Matsui F, Yamashina T, Hanafusa M, Yamamoto S, Hanaoka N, Takeuchi Y, Higashino K, Uedo N, Iishi H, Tatsuta M. Randomized study of two endo-knives for endoscopic submucosal dissection of esophageal cancer. *American Journal of Gastroenterology* 2013;108(8):1293-1298.
- 12) Ishihara R, Kanzaki H, Iishi H, Nagai K, Matsui F, Yamashina T, Matsuura N, Ito T, Fujii M, Yamamoto S, Hanaoka N, Takeuchi Y, Higashino K, Uedo N, Tatsuta M, Tomita Y, Ishiguro S. Pink-color sign in esophageal squamous neoplasia, and speculation regarding the underlying mechanism. *World Journal of Gastroenterology* 2013;19(27):4300-4308.
- 13) Imai K, Kakushima N, Tanaka M, Takizawa K, Matsubayashi H, Hotta K, Yamaguchi Y, Ono H. Validation of the application of the Japanese curative criteria for superficial adenocarcinoma at the esophagogastric junction treated by endoscopic submucosal dissection: a long-term analysis. *Surg Endosc.* 2013 Jul;27(7):2436-2445.
- 14) Minami H, Isomoto H, Nakayama T, Hayashi T, Nakao K. Education and imaging. *Gastrointestinal: background coloration in detecting early esophageal squamous cell carcinoma.* *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28(12):1799.
- 15) 矢野友規、武藤学. 食道癌化学放射線療法後のサルベージ治療としての光線力学療



- 法. 日本レーザー医学会誌. 第34巻第2号: 102-106 (2013)
- 16) 片岡 洋望, 林 則之, 田中守, 矢野 重信, 城 卓志. 糖鎖連結光感受性物質を用いた新規光線力学治療法, 診断法の開発. 日本レーザー医学会誌. 32(2): 113-117, 2013
  - 17) 片岡 洋望. 消化器癌に対する光線力学療法の現状と展望. 明日の臨床. 25(1) 1-7, 2013
  - 18) 山本佳宣. 微小癌の診断限界 -食道癌- 月刊「臨床と研究」平成26年2月発行、第91巻第2号、19-26、2014年
  - 19) 田中雅樹、小野裕之、滝沢耕平、角嶋直美、今井健一郎、堀田欣一、松林宏行。食道表在癌に対するESDの治療成績。胃と腸 48(9):1253-1261. 2013.
  - 20) 中村哲也, 生沼健司, 寺野彰: 光線力学診断(PDD)の可能性. 内科 111(3):504-508, 2013.
  - 21) 中村哲也, 下山克, 山尾純一, 柳田修, 小寺泰弘: -日本消化器病学会専門医カリキュラムの改訂を終えて- 消化器病専門医研修カリキュラム改訂: 上部消化管. 日消誌 110(5): 801-807, 2013.
  - 22) 生沼健司, 増山仁徳, 中村哲也: 内視鏡的粘膜下層剥離術が困難な早期胃がんに対する治療-Porfimer Sodium(Photofrin®)を用いた2日連続照射法による光線力学治療-. 日レ医誌 134(2): 118-123, 2013.
  - 23) 中村哲也, 生沼健司: 超高齢者胃がんに対する光線力学的診断・治療-Talaporfin Sodium(Laserphyrin®)の有用性-. 日レ医誌 134(2): 124-131, 2013.
- ## 2. 学会発表
- 1) Shinya Ohashi, Osamu Kikuchi, Yusuke Amanuma, Manabu Muto. Potent cytotoxicity of novel photodynamic therapy with talaporfin sodium for fluorouracil-resistant esophageal squamous cell carcinoma in vitro. National Taiwan University and Kyoto University Symposium 2013, National Taiwan University, Taiwan (R. O. C.), Dec 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> 2013
  - 2) Shinya Ohashi, Mihoko Tsurumaki, Osamu Kikuchi, Daisuke Kuriyama, Yukie Nakai, Takeshi Setoyama, Shinichi Miyamoto, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Photodynamic therapy induces apoptosis via reactive oxygen species in fluorouracil-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. Digestive Disease Week and the 114<sup>th</sup> annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, FL, May 18-21, 2013.
  - 3) Yusuke Amanuma, Shinya Ohashi, Manabu Muto. Aldehyde dehydrogenase-2 regulates esophageal epithelial cell senescence checkpoint functions activated by an alcohol metabolite. May 18th 2013 Digestive Disease Week 2013 (AGA)
  - 4) Shinya Ohashi, Mihoko Tsurumaki, Osamu Kikuchi, Daisuke Kuriyama, Yusuke Amanuma, Yukie Nakai, Takeshi Setoyama, Shinichi Miyamoto, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Pivotal anti-tumor effects by photodynamic therapy in an in vitro model of human esophageal squamous cell carcinoma. Conference on Laser Surgery and Medicine (CLSM)2013, Yokohama, Japan, Apr 23-26, 2013
  - 5) Osamu Kikuchi, Shinya Ohashi, Yasumasa Ezoe, Manabu Muto. "Establishment of a novel 5-fluorouracil-resistant tumorigenic esophageal squamous cell carcinoma cell line and its biological characterization. Poster Session. April 2013 MD Anderson cancer Center / GAP conference in Houston, TX USA
  - 6) Hatogai K, Yano T, et al. Long-term results of salvage endoscopic treatment for patients with local failure after chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. 2014 Gastrointestinal



- Cancers Symposium ASCO-GI
- 7) M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, T. Joh. Photodynamic therapy with glucose conjugated chlorine for GIST. The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International , 2014/3/23, Kyoto, Japan.
  - 8) M. Tanaka, H. Kataoka, E. Kubota, T. Joh. Immunogenic death of cells treated with new photodynamic therapy (PDT) with glucose conjugated chlorin (G-chlorin). 12th International Congress On Targeted Anticancer Therapies (TAT 2014). 2014 2014/3/5, Washington DC, USA.
  - 9) M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, T. Joh. Antitumor effects of novel photodynamic therapy with glucose conjugated chlorin for gist. 21st United European Gastroenterology Week, 2013/10/15, Berlin, Germany.
  - 10) N. Hayashi , H. Kataoka , M. Tanaka , S. Yano , E. Kubota , T. Joh. Novel photodynamic therapy using mannose conjugated chlorin for gastric cancer. 10<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress 2013, 2012/6/19-22, Verona, Italy.
  - 11) Kataoka H, Tanaka M, Yano S, Kubota E, Joh T. New photodynamic therapy using glucose conjugated chlorin for gastrointestinal cancer. 10<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress 2013, 2012/6/19-22, Verona, Italy.
  - 12) Yoshinobu Yamamoto. An early phase II study of salvage photodynamic therapy (PDT) using talaporfin sodium and a diode laser for local failure of esophageal cancer (EC) after chemoradiotherapy (CRT) 第38回 ESMO (European Society for Medical Oncology)
  - 13) Tetsuya Nakamura, Takeshi Oinuma, Akira Terano: Efficacy of photofrin PDT using high-resolution magnifying endoscopy in early gastric cancer. The 14th World Congress of the International Photodynamic Association (Symposium Clinical GI, Invited Speaker), Seoul Korea, 2013.
  - 14) 矢野友規、武藤学. 食道癌化学放射線療法後遺残再発例に対するタラポルフィナトリウムとPDT半導体レーザを用いた光線力学療法の適応拡大. 第34回日本レーザー医学会総会. シンポジウムV S5-3 (2013年11月10日) 第1会場 国立がん研究センター築地キャンパス
  - 15) 伊藤達也 日本薬学会 平成26年3月30日、熊本、S56「アカデミア主導で展開する医薬品・医療機器開発の最前線～京都大学における取り組みについて～」
  - 16) 笠井宏委 日本臨床薬理学会 平成25年12月5日、東京、シンポジウム「スタディマネジメントの役割と展望」 臨床試験実施体制の構築と課題
  - 17) 笠井宏委 日本臨床薬理学会 平成25年12月5日、東京、シンポジウム「我が国に求められる医師主導治験とは」 治験における臨床検査等精度管理の考え方
  - 18) 鳩貝健、矢野友規、他. 食道癌の根治的放射線療法後の局所遺残・再発病変に対する救済内視鏡治療の長期成績 第85回日本消化器内視鏡学会総会
  - 19) 林 則之、片岡洋望、田中 守、矢野重信、城 卓志. ワークショップ7 消化管疾患に対する超低侵襲性治療. WS7-12癌間質腫瘍関連マクロファージを標的とした新規光線力学的治療の検討. 第10回日本消化管学会総会学術集会. 平成26年2月15日、コラッセふくしま、福島.
  - 20) 林則之、片岡洋望、田中守、林香月、矢野重信、城卓志. 総会賞選奨セッション: 癌間質腫瘍関連マクロファージを標的とした新規光線力学的治療の基礎的検討. 第34回日本レーザー医学会総会 2013年11月9日 東京
  - 21) 田中 守、片岡洋望、濱野 真吾、溝下 勤、森 義徳、久保田英嗣、城 卓志. GISTに対する糖鎖結光感受性物質を用いた新規

- 光線力学的治療効果の基礎的検討. 第24回日本消化器癌発生学会, 2013年9月5日 金沢
- 22) 田中 守, 片岡洋望, 濱野真吾, 海老正秀, 溝下 勤, 森 義徳, 久保田英嗣, 矢野重信, 城 卓志. (大腸がん研究の新展開)糖鎖連結クロリンによる新規光線力学的治療の腫瘍免疫増強効果. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月4日, Pacifico Yokohama, 横浜, 神奈川.
- 23) 田中雅樹、角嶋直美、小野裕之。食道表在癌に対するESD+ $\alpha$ 療法の治療成績 第99回日本消化器病学会総会 2013年3月
- 24) 川田登、田中雅樹、萩原朋子、澤井寛明、角嶋直美、滝沢耕平、今井健一郎、鷹尾俊達、堀田欣一、松林宏行、山口裕一郎、小野裕之、食道ESD後の発熱症例の検討、JDDW2013、東京
- 25) 南ひとみ、磯本一、中尾一彦。咽頭・食道領域扁平上皮癌における上皮色調変化” Background coloration:BC” の成因に関する検討. 第86回日本消化器内視鏡学会総会
- 26) 田中守, 片岡洋望, 海老正秀, 溝下勤, 森義徳, 谷田諭史, 上谷武, 中村哲也, 城卓志: タラポルフィンPDTを施行した肺小細胞癌合併食道扁平上皮癌の一例. 第9回日本消化管学会総会学術集会. 東京, 2013.
- 27) 中村哲也, 生沼健司: 消化管癌の診断・治療におけるレーザーの応用. レーザ学会学術講演会第33回年次大会(招待講演). 姫路, 2013.

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- 1) 発明者: 片岡洋望、林則之、城卓志、矢野重信  
出願人: 名古屋市立大学  
特願: 2013-161518  
出願日: 2013年8月2日  
発明の名称: 光線力学療法のための新規糖鎖連結光感受性物質

## II. 分担研究報告書

食道癌に対する新しい光線力学療法の開発に関する研究  
（医師主導治験の統括責任者）

研究代表者 武藤 学 京都大学大学院医学研究科 腫瘍薬物治療学講座 教授

研究要旨

本研究においては、食道がんCRT/RT後の局所遺残・再発に対してタラポルフィンナトリウム（ME2906）及び半導体レーザー（PNL6405EPG）を用いた光線力学療法（photodynamic therapy:PDT）を用いた救済治療を医師主導治験として実施している。食道がんCRT/RT後の遺残・再発病変の再増殖速度は極めて速いため、早期に発見し、できるだけ根治性の高い治療をすることが求められている。本治験では、レーザー照射漏れがあれば、翌日照射を行い、根治性を担保することになっているが、これまでの承認用法では無いため、PMDAからその化学的根拠を示すことが求められた。「照射漏れ」部位に対する翌日照射において、ME2906血漿中濃度が半減するため、有効性の低下が懸念されたが、非臨床試験で同等の組織障害を示すことが示された。一方、レーザーが散乱することより、照射された部位への再照射の可能性も懸念されるが、非臨床試験において、2回照射された場合でも組織障害の増強は見られたかった。これらの結果より、翌日照射は安全に実施可能で、かつ有効性も担保しうることが示された。

A. 研究目的

本研究の目的は、医師主導治験として実施している「食道がん化学放射線療法（chemoradiotherapy, CRT）または放射線治療（radiotherapy, RT）後の原発巣遺残再発に対するタラポルフィンナトリウム（ME2906）及び半導体レーザー（PNL6405EPG）を用いた光線力学療法」における非臨床データを充足することである。

本PDTでは、すでに早期肺がんで承認されている用法であるタラポルフィンナトリウム投与後4～6時間後にレーザー照射を行うが、食道では接線方向の照射を余儀なくされることに加え、蠕動が強いため、レーザー照射が不十分となる可能性、すなわち照射されない部位が存在する可能性がある。また、PDTの特徴として、レ

ーザ照射中には光化学反応が可視できないため、この「照射漏れ」を確認することができない。食道がんCRT/RT後の遺残・再発病変の再増殖速度は極めて速いことが知られており、照射漏れがあれば、急速に増悪し、「根治」の最大のチャンスを逃すことに繋がる。したがって、本治験では、レーザー照射翌日に「照射漏れ」があるか否かを確認し、照射漏れがあれば、追加照射することになっている。医薬品医療機器審査機構（PMDA）の対面助言では、追加照射することの安全性と有効性に関してデータをそろえることが承認申請へのひとつの条件とされたため、本年度はこの課題に取り組む。

B. 研究方法

【条件】

使用マウス：BALB/c マウス、♂、各群n=5  
 使用細胞：皮下移植腫瘍細胞：Meth-A（マウス線維肉腫）

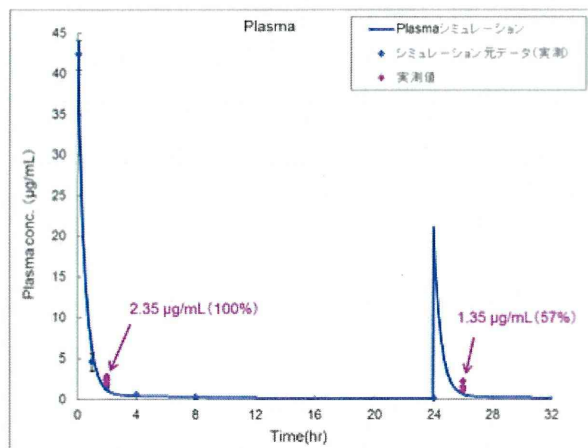
レーザー照射条件：100 J/cm<sup>2</sup>

【実験方法】

- 1) マウス皮下に移植した腫瘍に対し、ヒトにおける「翌日照射」と同等の条件下でレーザー照射し抗腫瘍効果を確認した。
- 2) マウス皮下に移植した腫瘍に対し、タラポルフィンナトリウム投与後、2時間と26時間後にレーザーを計2回照射し、2時間後のみに照射した群との腫瘍壊死の程度を比較検討した。

上記条件設定の根拠：ヒトにおけるタラポルフィンナトリウム静注後の血漿中濃度推移は、24±2時間の時点では、4～6時間後の濃度の約50%に減少することが、すでに早期肺癌の国内第I相試験で判明している（早期肺癌：2003年承認取得時データ）。一方、マウスにおいては、タラポルフィンナトリウム静注後の血漿中濃度は速やかに減少し、2時間後にはヒトと同じ濃度で、4時間後には消失してしまう。したがって、本非臨床試験では、ヒトと同じ条件になるように、投与後2時間後にはじめの照射を行い、翌日照射に相当する24時間後に、再度タラポルフィンナトリウムを投与し50%濃度相当になるような条件を設定し再度レーザーを照射することにした（図1）。

図：マウスにおける、ヒトの追加照射と同等の照射条件の設定



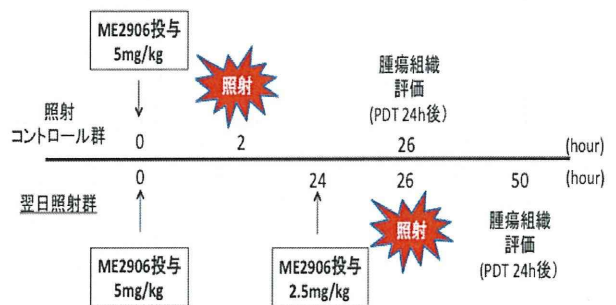
(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、外部委託としてGLP基準に従って実施した。

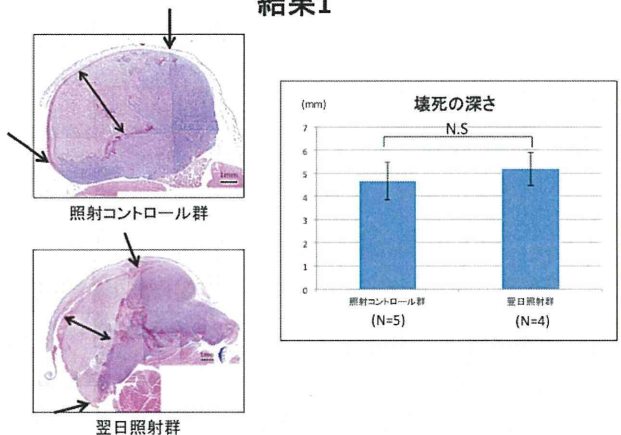
C. 研究結果

- 1) マウス腫瘍移植モデルを用いた翌日照射の有効性評価試験

「照射漏れ」と想定した翌日照射群においては、血漿中濃度が半減した時点での照射となるが、コントロール群と比較して、移植腫瘍の壊死組織の深さは両群で差がなかった。

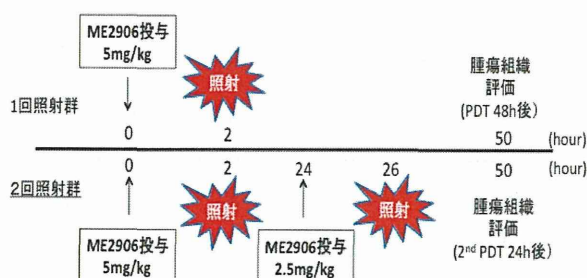


結果1

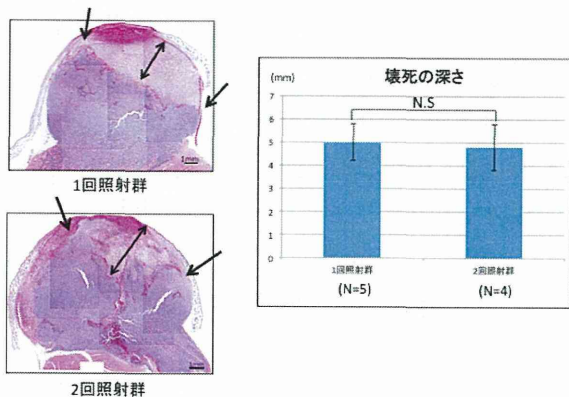


- 2) マウス腫瘍移植モデルを用いた2回照射の安全性評価試験

翌日照射することによって、前日照射部位にも再度レーザー照射がされる可能性があるが、1回照射群と比較して、翌日照射（2回照射されたとする群）における移植腫瘍の壊死組織の深さは両群で差がなかった。



## 結果2



## D. 考察

食道がんCRT/RT後の遺残・再発病変の再増殖速度は極めて速く、約1ヶ月ほどで元の状態に戻ってしまうことをしばしば経験する。すなわち、食道がんCRT/RT後の遺残・再発病変は、早期に発見し、できるだけ根治性の高い治療をすることが求められている。我々は、原発巣のみの遺残の場合、局所治療であるPDTでも根治が期待できることをこれまで報告してきた。したがって、本治験でも、照射漏れがあれば、翌日照射を行い、根治性を担保することになっているが、これまでの承認用法では無いため、PMDAからその化学的根拠を示すことが求められた。

本研究では、「照射漏れ」部位に対する翌日照射において、タラポルフィンナトリウム血漿中濃度が半減した条件になるため、有効性の低下が懸念されたが、同等の組織障害を示すことが示された。一方、レーザーが散乱することより、「照射された部位への再照射の可能性も懸念されるが、本研究において、2回照射された場合でも、組織障害の増強は見られたかった。

これらの結果より、翌日照射は安全に実施可能で、かつ有効性も担保しうることを示された。

## E. 結論

食道がんCRTまたはRT後の原発巣遺残再発に対するタラポルフィンナトリウム (ME2906) 及び半導体レーザー (PNL6405EPG) を用いた光線力学療法において、根治性を担保するために「レーザー照射漏れ」部位に対し、翌日照射を行うことの安全性と有効性が非臨床試験において証明された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoko Mashimo, Yasumasa Ezoe, Kosuke Ueda, Yoshinao Ozaki, Yusuke Amanuma, Ikuo Aoyama, Takahiro Horimatsu, Shuko Morita, Shinichi Miyamoto, Tomonori Yano, Koji Higashino, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Salvage photodynamic therapy is an effective and safe treatment for patients with local failure after definitive chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Therapy (JCT)* 2014 (in press)
- 2) Osamu Kikuchi, Yasumasa Ezoe, Shuko Morita, Takahiro Horimatsu, Manabu Muto. Narrow-band Imaging for the Head and Neck Region and the Upper Gastrointestinal Tract. *Jpn J Clin Oncol* 43(5):458-465. 2013
- 3) Manabu Muto. Endoscopic diagnostic strategy of superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Endosc.* 25(Suppl 1):1-6. 2013 (Epub)
- 4) Chikatoshi Katada, Manabu Muto, Satoshi Tanabe, Katsuhiko Higuchi, Tohru Sasaki, Mizutomo Azuma, Kenji Ishido, Takashi Masaki, Meijin Nakayama, Makito Okamoto, Wasaburo Koizumi. Surveillance after endoscopic mucosal resection or endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous cell carcinoma.



- Digestive Endosc. 25(Suppl 1): 39-43. 2013
- 5) 矢野友規、武藤学. 食道癌化学放射線療法後のサルベージ治療としての光線力学療法. 日本レーザー医学会誌. 第34巻第2号: 102-106 (2013)
2. 学会発表
- 1) Shinya Ohashi, Osamu Kikuchi, Yusuke Amanuma, Manabu Muto. Potent cytotoxicity of novel photodynamic therapy with talaporfin sodium for fluorouracil-resistant esophageal squamous cell carcinoma in vitro. National Taiwan University and Kyoto University Symposium 2013, National Taiwan University, Taiwan (R. O. C.), Dec 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> 2013
- 2) Shinya Ohashi, Mihoko Tsurumaki, Osamu Kikuchi, Daisuke Kuriyama, Yukie Nakai, Takeshi Setoyama, Shinichi Miyamoto, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Photodynamic therapy induces apoptosis via reactive oxygen species in fluorouracil-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. Digestive Disease Week and the 114<sup>th</sup> annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, FL, May 18-21, 2013.
- 3) Yusuke Amanuma, Shinya Ohashi, Manabu Muto. Aldehyde dehydrogenase-2 regulates esophageal epithelial cell senescence checkpoint functions activated by an alcohol metabolite. May 18th 2013 Digestive Disease Week 2013 (AGA)
- 4) Shinya Ohashi, Mihoko Tsurumaki, Osamu Kikuchi, Daisuke Kuriyama, Yusuke Amanuma, Yukie Nakai, Takeshi Setoyama, Shinichi Miyamoto, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Pivotal anti-tumor effects by photodynamic therapy in an in vitro model of human esophageal squamous cell carcinoma. Conference on Laser Surgery and Medicine (CLSM) 2013, Yokohama, Japan, Apr 23-26, 2013
- 5) Osamu Kikuchi, Shinya Ohashi, Yasumasa Ezoe, Manabu Muto. "Establishment of a novel 5-fluorouracil-resistant tumorigenic esophageal squamous cell carcinoma cell line and its biological characterization. Poster Session. April 2013 MD Anderson cancer Center / GAP conference in Houston, TX USA
- 6) 矢野友規、武藤学. 食道癌化学放射線療法後遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムとPDT半導体レーザーを用いた光線力学療法の適応拡大. 第34回日本レーザー医学会総会. シンポジウムV S5-3 (2013年11月10日) 第1会場 国立がん研究センター築地キャンパス
- G. 知的財産の出願・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



医師主導治験のプロジェクトマネジメント/スタディマネジメントに関する研究

研究分担者 伊藤 達也 京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター 開発企画部 助教

研究分担者 笠井 宏委 京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター 開発企画部 助教

研究要旨

目的：平成24年11月から症例登録を開始した多施設共同医師主導治験において、治験が適正に行われるためのスタディマネジメント、及び次のステップである治験終了後の製造販売承認申請に向けたストラテジーの構築を目的とした。

方法：本研究では、GCPを準拠して実施した医師主導治験の結果をもとに、早期の治験終了および製造販売承認申請の時期につき、研究代表者及び治験薬/治験機器提供者と調整を行い、最終ゴールである承認取得に向けたストラテジーを検討した。また、医薬品医療機器総合機構（以下、PMDA）と事前面談を2回行った。

結果：本治験の対象は、被験者リクルートが難しい症例であったが、その一方で開始当初より良好な試験成績が得られていた。そのため、プロトコルで有効と判断する規定をクリアした時点で、治験の早期終了などにつき検討し、2013年7月にPMDAと事前面談を行った。PMDAは、症例数が約半数の時点では、結果が過大評価される可能性があり、有効であると結論づけることは時期尚早との意見であった。また、審査に耐えうる臨床的効果を示すためにも、症例集積の促進のための方策を検討するようにとの助言を得、以降の治験の進捗については情報共有を行っていくことになった。研究代表者及び治験薬/治験機器提供者との相談の結果、PMDAからの助言に従い、被験者リクルートの促進を図ることとなり、2013年12月に目標症例数に到達した。次に、症例登録終了の目途が付いてきた時点で、治験終了後の製造販売承認申請の時期につき検討した。本治験で用いる光線力学療法（以下、PDT）では、施行後、局所治療効果の判定までに3か月以上を要する。得られている治験成績が予想以上に好成績であったため、PMDAとの情報共有を兼ねて、少しでも早い製造販売承認申請が可能かを検討し、2013年12月にPMDAとの2回目の事前面談を行った。その際、PMDAは、途中成績による製造販売承認申請の可否については明確な回答は避け、申請前相談の実施を検討するようにとの意見であった。研究代表者及び治験薬/治験機器提供者との相談の結果、全症例の最終結果判定で申請資料とすることとなった。

結論：本治験は、治験終了を見据え、研究代表者や企業とともに事前にストラテジーを検討した。結果的に早期製造販売承認申請にはつながらなかったものの、治験実施期間中におけるPMDAとの情報共有により、治験終了後の製造販売承認申請に関するPMDAの意見を引き出し、円滑な審査につながる可能性が示された。

## A. 研究目的

京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターは、研究代表者である武藤らの研究グループを支援し、医師主導治験の治験調整事務局としてスタディマネジメントを行った。2012年11月より症例登録を開始し、症例登録予定数は25例、症例登録期間は2013年9月までと予定していた。限られた研究期間内で治験結果をまとめ、製造販売承認申請にスムーズ移行するためにも、治験終了後のストラテジーを治験実施中から考案していくことが重要であった。そこで、本年度は研究代表者と治験薬/治験機器提供者とともに早期の製造販売承認申請の可能性について検討した。

京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター（以下、当センター）は、探索医療センター、治験管理センター、医学研究科EBM研究センターの3センターが統合し、2013年4月より新しい組織として改組された。当センターはトランスレーショナルリサーチや製造販売後大規模臨床研究の促進、並びに企業治験をサポートする総合的な臨床開発支援組織となった。また当センターでは現在、平成24年度より文部科学省「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」および厚生労働省「臨床研究中核病院整備事業」に採択され、更なる臨床支援のハード面での基盤整備を推進している。

## B. 研究方法

本研究方法は、GCPを準拠して実施した医師主導治験の結果をもとに、治験の早期終了及び製造販売承認申請の時期などにつき、研究代表者及び治験薬/治験機器提供者と調整を行い、最終的な承認取得までのストラテジーを検討した。また、ストラテジーの確認のため、PMDAと事前面談を行った。

### （倫理面への配慮）

本研究では、医師主導治験におけるデータに基づいた製造販売承認に向けたストラテジー

の構築の研究であることから、倫理的問題はほとんど発生しない。治験データには、患者個人を特定するような個人情報含まれず、医師主導治験実施上、信頼性確保のために行われたモニタリングにあたっては、モニターに個人情報に対する守秘義務を課し、プライバシー保護に十分配慮した。

## C. 研究結果

2012年11月、治験調整事務局を中心に実施医療機関と綿密に連携し、治験開始当初は順調に被験者が登録されたが、2013年2月以降、プロトコル上の選択基準に合致する被験者が少なくなり、試験進捗は難航した。本治験は、先行治療の遺残・再発例を対象とした治験のため、先行治療の選択およびその治療効果に左右されることから、症例登録の進捗が影響されたためと考える。本医師主導治験は、厚生労働科学研究費補助金を資金源としているため、研究期間が研究費支給期間に限定される。症例登録期間の延長を検討しつつ、同時に治験の早期終了の可能性を検討した。

プロトコル上は、解析対象症例数を25例として、主要評価項目である局所治療効果（L-CR）の症例数が8例以上であれば、ベイズ統計によって閾値L-CR率（15%）を超える確率が97.5%以上となり、本治療を有効と判断すると定義している。10例の局所治療効果判定が終了した時点で、主要評価項目L-CRは80%と予想を上回る良好な結果が得られていた。研究代表者、治験薬/治験機器提供者、及び生物統計担当者と協議し、残りの15症例の治療成績がL-CRにならなくとも規定した治療成績の下限閾値15%を超え、本治験における有効性の検証目的を達成でき得ると考えた。そこで、早期の治験終了の可能性及び製造販売承認申請データとしての充足性について、2013年7月30日にPMDAと事前面談を行った。

PMDAは、早期の有効中止基準が設定されておらず、また症例数が半数の時点で結果が過大評

価になる可能性があり、有効性および安全性などを結論づけることは時期尚早との意見であった。また、有用性を説明するのに、15%の局所奏効では臨床的効果としてエビデンスが弱く、審査に耐えられないのではないかとの懸念より、症例集積の促進のための方策を検討するようにとの助言を得、以降の治験の進捗については情報共有を行っていくことになった。研究代表者及び治験薬/治験機器提供者との相談の結果、PMDAからの助言に従い、被験者リクルートの促進を図ることとなり、目標症例数に2013年12月に到達した。

次に、症例登録終了の目途が付いてきた時点で、治験終了後の製造販売承認申請の時期について検討した。PDT施行後の局所有効性判定までの期間はおおよそ3か月以上要する。さらに、局所治療効果判定における客観性を重視し、内視鏡写真を用いた第三者による判定を行うため、中央判定委員会にて、最終的な結果判定が行われることになっている。本治験の結果のとりまとめを円滑に推進するため、中央判定委員会は3回にわけて行った。第1回中央判定委員会の結果と、実施医療機関の局所有効性判定に大きな齟齬はなく、第2回中央判定委員会対象症例の治験成績が予想以上に好成績であったため、PMDAとの情報共有を兼ねて、少しでも早く製造販売承認申請が可能かを探ることとなった。申請のタイミングは、できる限り早期に実現することを想定し、第1及び2回の中央判定委員会までの成績（対象症例：20例）にて製造販売承認申請し、残りの5例の成績は審査開始後の追加提出という案とした。しかし、2013年12月9日に行ったPMDAとの事前面談において、PMDAは途中成績での製造販売承認申請の可否について明確な回答は避け、申請前相談の実施を検討するようにとの意見であった。治験薬/治験機器提供者は申請前相談を行っても審査期間が短縮できる効果があるわけではないことから、相談を行う意向はなく、研究代表者及び治験薬/治験機器提供者との相談の結果、全症例

の最終結果判定までまとめた申請資料として承認申請を行うこととなった。

#### D. 考察

治験プロセスは、大きく3つの行程（準備、実施、終了）が存在する。昨年度は医師主導治験の体制構築および必要文書の作成・整備など開始前の準備を行い、2012年11月に症例登録を開始することができた。本年度は治験実施段階において、被験者リクルート状況と治験成績などから、治験の早期終了及び早期承認申請などの可能性を検討し、本治験の最終ゴールである製造販売承認取得に向けたストラテジーを検討した。

被験者リクルートは予想以上に難航したが、治験成績は治験開始当初より予想以上に良好であった。限られた研究期間のなかで、良好な成績が得られたことを勘案すれば、治験の早期終了の検討、それに引き続く、少しでも早期の製造販売承認申請を行うことが臨床現場に本治療を届けるための効率的な手段と考えられた。しかし、PMDAとの事前面談の結果から、早期終了による結果の過大評価になること、また、有用性を説明するのに審査に耐えうるより強固なエビデンスとなるよう、症例登録の推進について助言を得た。この治験の後に検証試験を行う場合であったなら、治験を早期終了することについて異なる見解を得たかもしれないが、今回の治験データがピボタルデータとなるため、PMDAにおける審査のプロセスも勘案した助言を得た結果となった。

またPDT施行後の局所治療判定に3か月以上を要すること、中央判定委員会を開催するなど最終判定結果を得るには、最終症例が登録されてから約半年を要することから、第2回中央判定委員会までの対象症例20症例のデータで申請し、残りの結果は追加提出することの可能性、つまり、FDAにて実施されているRolling Submissionの考え方や申請時期の可能性についてもPMDAと相談した。しかし、PMDAはその場

で可否を決定することを避け、申請前相談を利用することを提案した。一方、PMDAは、最終判定結果の前に、PMDA申請前相談にてデータパッケージの充足性は議論可能との意見もあり、フレキシブルな対応がとれることがわかった。第1回中央判定委員会の判定結果と実施医療機関の判定結果が大きな齟齬が無かったことにより、PMDA申請前相談は実施医療機関の局所治療効果の判定結果を、ある程度の承認申請データパッケージと想定して議論することも可との意見を得た。また、今回の治療方法は医薬品と医療機器の併用療法のため、医薬品と医療機器のPMDA両審査部による審査が必要であり、審査過程も複雑となることが予想されるため、今後は両審査部へのアプローチを行い情報共有していくことが重要との助言もあった。

以上のように、治験の実施段階より終了戦略につき関係者間で検討し、またPMDA事前面談などを利用してPMDAの考えを確認できた。結果的には、早期の製造販売承認申請にはつながらなかったものの、治験実施中からPMDAと情報共有することにより、承認申請の際のPMDAからのアドバイスを得ることができた。また、PMDAの複数審査部が関与する治験であることから、非公式であるとはいえ関与する審査部間の情報共有が行われたことが窺え、両審査部への承認申請後の審査を円滑に進めることに有用であったと考える。本研究結果は、今後の医師主導治験の製造販売承認申請に向けたストラテジーの構築に有用な情報となると考えている。

## E. 結論

本研究では、治験終了を見据え、研究代表者や治験薬/治験機器提供者とともにストラテジーを検討した。PMDAとの治験実施期間中における情報共有により、治験終了後の製造販売承認申請および審査を円滑に進めることにつながる可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 伊藤達也 日本薬学会 平成26年3月30日、熊本、S56「アカデミア主導で展開する医薬品・医療機器開発の最前線～京都大学における取り組みについて～」
- 2) 笠井宏委 日本臨床薬理学会 平成25年12月5日、東京、シンポジウム「スタディマネジメントの役割と展望」 臨床試験実施体制の構築と課題
- 3) 笠井宏委 日本臨床薬理学会 平成25年12月5日、東京、シンポジウム「我が国に求められる医師主導治験とは」 治験における臨床検査等精度管理の考え方

## G. 知的財産の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

レザフィリンPDTに関する医師主導治験の責任医師

研究分担者 矢野 友規 国立がん研究センター東病院 消化管内視鏡科 医長

研究要旨

食道癌化学放射線療法後の遺残再発病変に対して、タラポルフィンナトリウム（レザフィリン）と半導体レーザー（PDレーザー）を用いた新しい光線力学療法（PDT）の安全性と有効性を評価する目的で、医師主導治験が開始された。主な患者選択基準は、食道癌に対して50Gy以上の放射線療法または化学放射線療法後の局所遺残再発病変を有し、サルベージ外科手術を希望しないか不可能な患者で、病変は組織学的に癌が証明された、深達度が固有筋層までで、長径3cm以下、1/2周以下、2カ所以内であること。治療方法はタラポルフィンナトリウム40mg/m<sup>2</sup>静注4～6時間後にPDレーザーを局所遺残再発病変に照射する。照射パワー密度は150mW/cm<sup>2</sup>、照射エネルギー密度は100J/cm<sup>2</sup>。主要評価項目は局所完全奏効。目標症例数は25例。

当院の目標症例数は7例。平成25年12月に目標症例を達成し、登録が終了した。当院からは7例登録したが、特に問題なく登録終了した。現在、最終解析中である。

A. 研究目的

食道癌に対する化学放射線療法（CRT）または放射線療法（RT）後の局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウム（レザフィリン）およびPDT半導体レーザー（PDレーザー）を用いた光線力学的療法（Photodynamic therapy: PDT）の有効性と安全性を検討する。

タラポルフィンナトリウム（レザフィリン）およびPDT半導体レーザー（PDレーザー）を用いたPDTは現在早期肺癌及び悪性脳腫瘍に対して承認・保険適応が得られている治療であり、本治験の結果を用いて適応拡大を目指す。

B. 研究方法

- 治験デザイン: 多施設共同非対象非盲検試験
- 主な患者選択基準

1) 食道癌に対して、RT 単独または CRT が過去

に行われている（いずれも放射線総照射量 50Gy 以上）。

- 2) 食道癌に対する前治療の最終日から1週間以上が経過している。
- 3) 組織学的に「癌」が証明された遺残再発病変を認め、サルベージ治療としての外科手術を希望しないか外科手術が不可能である。
- 4) 遺残再発病変は、サルベージ内視鏡的粘膜切除術（EMR）・内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）で治癒切除できないと判断される。
- 5) 遺残再発病変が頸部食道（Ce）に及んでいない。
- 6) 遺残再発病変の壁深達度が、固有筋層まで（T2）と判断されている。
- 7) 遺残再発病変の長径が3cm以下および周在性が1/2周以下である。
- 8) 遺残再発病変が2カ所以内である。