

3-3. 結果と考察

マイクロシリンジで吸引・排出した HGF 溶液の濃度の平均は 0.891 mg/mL であった。

排出液濃度(mg/ml)

No.1	0.852
No.2	0.934
No.3	0.974
No.4	1.094
No.5	0.837
No.6	0.937
No.7	0.878
No.8	0.618
平均±SD	0.891±0.128

4. 実験 2：バックグラウンドの確認

4-1. 目的

今回使用する ELISA キットは内在するラット HGF とは交差反応しないとされているが、本研究では喉頭組織の抽出液を試料としており、組織由来の夾雑物が測定値に影響することが懸念される。そこで、イムニス HGF EIA キットによる測定時の喉頭組織抽出液中のバックグラウンドを確認する。

4-2. 方法

4-2-1. Sprague-Dawley ラット（13 週齢、雄、清水実験材料）を用いた。ジエチルエーテル吸入による鎮静後、ケタミン塩酸塩 45 mg/kg およびキシラジン塩酸塩 4.5 mg/kg を腹腔内投与することで麻酔を行った。その後ラット両側声帯粘膜内にマイクロシリンジを用いて生理食塩水を 5 μ L ずつ局所注射した。生理食塩水投与 7 日後に、ジエチルエーテル吸入による鎮静後にペントバルビタールナトリウム 200 mg/kg を心腔内投与しラットを安楽死させ、喉頭を摘出した(各 n=6)。ヒト HGF 臓器抽出試薬付属の抽出液 500 μ L を 1.5 mL チューブに入れたものをあらかじめ氷冷し、摘出喉頭をこの抽出液内に保存した。その後摘出喉頭および抽出液、1.5 mL チューブ全体の重量を測定し、あらかじめ測定した抽出液、1.5 mL チューブの重量を差し引くことで組織重量を算出した。摘出喉頭を鉗で細切、ポルトロンホモジナイザーおよびマイクロ乳棒を用いてホモジナイズした後、ホモジナイズした組織を含む抽出液を 4 $^{\circ}$ C、15000 rpm、30 分遠心分離し、3 層分離された層の中で中間層から 200 μ L を回収した。これらの喉頭内 HGF 抽出液は -80 $^{\circ}$ C にて一旦凍結保存した。

4-2-2. ELISA 標準液は、1 mg/mL HGF 溶液より検体希釈液（ELISA キット付属）を用いて、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL に調製した。反応は、キット添付の操作方

法に従い、各試料につき 2 重測定した。標準液を用いて作成した検量線より各試料の濃度を算出し、二重測定で得られる測定値の平均を求めた。本測定における定量限界は 0.5ng/mL とした。

4-3. 結果と考察

生理食塩水投与 7 日後に測定したラット喉頭内のヒト HGF の測定値は 6 例中 1 例のみで 2.44 ng/g tissue であったが、他 5 例では定量下限未満 (BLOQ : below the limit of quantification) であった。この試験で使用した ELISA キットはヒト HGF 特異的でありラット HGF とは交差反応しないとされているが、ラット喉頭抽出液では 2.5 ng/g tissue 程度がバックグラウンドとして検出される場合があることが明らかとなった。

結果

個体 No.	喉頭重量 (mg)	喉頭抽出液の ヒト HGF 濃度 (ng/ml)	喉頭内 ヒト HGF 濃度 (ng/g tissue)
No.1	140.9	BLOQ	BLOQ
No.2	130.6	BLOQ	BLOQ
No.3	161.3	BLOQ	BLOQ
No.4	141.6	0.692	2.44
No.5	115.0	BLOQ	BLOQ
No.6	143.5	BLOQ	BLOQ

5. 実験 3 : HGF 局所残留性・血中移行性試験

5-1. 目的

ラット声帯への HGF 投与後の声帯局所残留性および血中移行性を確認する。

5-2. 方法

5-2-1. 声帯局所投与と HGF 抽出液の調製

Sprague-Dawley ラット (13 週齢、雄、清水実験材料) を用いた。ジエチルエーテル吸入による鎮静後、ケタミン塩酸塩 45 mg/kg およびキシラジン塩酸塩 4.5 mg/kg を腹腔内投与し麻酔を行った。ラット両側声帯にマイクロシリンジを用いて 1 mg/mL HGF 溶液を 5 μ L ずつ (両側で 10 μ g) 粘膜内に局注した。HGF 投与 5 分後、12 時間後、24 時間後、3 日後、7 日後で喉頭および血液採取を行った。ジエチルエーテル吸入による鎮静後に心腔内穿刺により血液 2 mL を採取し、氷冷保存した。その後ペントバルビタールナトリウム 200 mg/kg を心腔内投与し、ラットを安楽死させ、喉頭を摘出した (各 n=6)。ヒト HGF 臓器抽

出試葉付属の抽出液 500 μ L を 1.5 mL チューブに入れたものをあらかじめ氷冷し、摘出喉頭をこの抽出液内に保存した。その後摘出喉頭および抽出液、1.5 mL チューブの重量を測定し、あらかじめ測定した抽出液、1.5 mL チューブの重量を差し引くことで組織重量を算出した。摘出喉頭を鋏で細切、ポリトロンホモジナイザーおよびマイクロ乳棒を用いてホモジナイズした後、ホモジナイズした組織を含む抽出液を 4 $^{\circ}$ C、15000 rpm、30 分遠心分離し、3 層分離された層の中で中間層から 200 μ L を回収した。また採取した血液は 4 $^{\circ}$ C で 60 分間静置した後、4 $^{\circ}$ C、3000 rpm 15 分で遠心分離し血清を回収した。これらの喉頭内 HGF 抽出液および血清は -80 $^{\circ}$ C にて ELISA 測定時まで凍結保存した。

5-2-2. ELISA

喉頭内 HGF 抽出液は解凍後、原液あるいはイムニス HGF EIA キット付属の検体希釈液を用いて希釈した希釈液の濃度を ELISA にて測定した。7 日後採取の試料は原液の濃度を測定し、3 日後採取試料は、原液または 10 倍希釈し濃度測定した。また 24 時間後試料、12 時間後試料、5 分後試料は各々 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍に希釈しこの希釈液の濃度を測定した。血清に関しては投与 5 分後、12 時間後、24 時間後の血清のみを解凍後、その原液の濃度を測定した。標準液は、1 mg/mL HGF 溶液より検体希釈液を用いて、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL に調製した。反応は、キット添付の操作方法に従い、各試料につき 2 重測定した。標準液を用いて作成した検量線より各試料の濃度を算出し、二重測定で得られる測定値の平均を求めた。(各 n=6) 本測定における定量限界は 0.5 ng/mL とした。

5-3. 結果と考察

5-3-1. 声帯局所残留試験

声帯粘膜内へ 10 μ g の HGF を投与後、5 分後では平均 50.06 μ g/g tissue が検出されたが、12 時間後では平均 1.71 μ g/g tissue、24 時間後で平均 0.29 μ g/g tissue (5 分後濃度の 1% 以下) にまで減少した。3 日後には 6 例中 1 例 (No.1) で定量限界未満、他 5 例では 2.06 ~ 29.17 ng/g tissue であった。前述の実験 2 の結果から、2.5 ng/g tissue 程度がラット喉頭組織中のバックグラウンド値として検出され得ることから、定量限界未満となった No.1 の個体に加えて 2.5 ng/g tissue 未満の値を示した No.2, 3 の 2 例においても声帯に投与したヒト HGF は 3 日後には消失したと考えられる。また、7 日後には 6 例中 3 例で定量限界未満、他 3 例では 1.98 ~ 2.49 ng/g tissue まで低下しており、声帯に投与したヒト HGF は 7 日後には全例で消失したと考えられた。

ヒトの臨床試験で計画している投与量は最大 20 μ g/両側声帯であり、ヒト喉頭の重量は両側で約 70 g (ラット喉頭の約 100 倍以上) であることから、ヒト声帯局所での最大 HGF 濃度は約 285 ng/g-tissue 程度と想定される。今回のラット声帯内投与において投与 5 分後に観察された HGF 濃度は 50 μ g/g-tissue 程度であり、ヒト声帯内において想定される最大局

所濃度の 175 倍程度となっているが、それでも 7 日後には消失することが確認されたことから、ヒト声帯内に投与した HGF が 1 週間を越えて声帯内に残留する可能性はほとんどないと考えられる。

喉頭重量(mg)

個体 No.	投与 5 分後	12 時間後	24 時間後	3 日後	7 日後
No.1	125.7	132.2	148.1	142	151.8
No.2	142.5	149.8	155.1	135.3	149.5
No.3	138.8	134.7	139.6	156.1	133.2
No.4	152.6	138	138.8	142.4	138.7
No.5	136.2	129.9	144.7	137.9	134.8
No.6	133.2	136.3	148.2	136.4	158.8
平均 ± SD	138.2 ± 9.1	136.9 ± 7.0	145.8 ± 6.1	141.7 ± 7.6	144.5 ± 10.4
CV (%)	6.6	5.1	4.2	5.4	7.2

記録表への
修正。
平野 滋
2014年11月9日

喉頭抽出液中ヒト HGF 濃度(ng/ml)

個体 No.	投与 5 分後	12 時間後	24 時間後	3 日後	7 日後
No.1	15794.19	236.91	63.09	BLOQ	BLOQ
No.2	12223.96	590.77	184.32	0.72	BLOQ
No.3	14590.22	1151.46	102.53	0.64	BLOQ
No.4	15026.48	62.57	70.87	1.18	0.55
No.5	11461.63	477.76	58.38	1.91	0.67
No.6	13527.96	286.47	33.42	7.96	0.70
平均 ± SD	13770.74 ± 1680.85	467.66 ± 382.89	85.43 ± 53.32	2.48 ± 3.10	0.64 ± 0.08
CV (%)	12.21	81.87	62.42	124.93	12.44

喉頭内ヒト HGF 残留量(ng/g tissue)

個体 No.	投与 5 分後	12 時間後	24 時間後	3 日後	7 日後
No.1	62824.93	896.02	213.00	BLOQ	BLOQ
No.2	42891.10	1971.85	594.19	2.66	BLOQ
No.3	52558.42	4274.17	367.21	2.06	BLOQ
No.4	49234.86	226.71	255.29	4.14	1.98
No.5	42076.45	1838.95	201.73	6.94	2.49

No.6	50780.65	1050.88	112.74	29.17	2.20
平均 ±SD	50061.07 ±7556.66	1709.76± 1411.19	290.69± 170.20	7.79± 10.65	1.71 ± 0.63
CV (%)	15.09	82.54	58.55	136.74	36.66

誤記載の
修正。
平野 滋
2014年11月9日

5-3-2. 血中移行性試験

ヒト HGF をラット声帯に投与後の血中における HGF 濃度は、投与 5 分後で 6 例中 4 例では定量限界 0.5 ng/mL 未満 (BLOQ)、2 例で 0.73-0.76 ng/mL であった。12 時間後および 24 時間後には全例において定量限界 0.5 ng/mL 未満 (BLOQ) であった。

以上の結果から、投与 5 分後では血中への移行の可能性があるが、12 時間後では殆ど存在しないといえる。また、5 分後における血中検出濃度も微量であるため、声帯以外の組織に持続的な作用を示すことは考えにくい。なお、ラットおよびカニクイザルの静脈内 4 週間反復投与の毒性試験では、最大 30 mg/kg の HGF を静脈内投与し、10,000 ng/mL を超える Cmax が確認されているが、ヒト HGF を異種動物に投与することによる免疫反応性に起因すると考えられる病変を除き、明らかな毒性は観察されていない。

個体 No.	投与 5 分後	12 時間後	24 時間後
No.1	BLOQ	BLOQ	BLOQ
No.2	BLOQ	BLOQ	BLOQ
No.3	BLOQ	BLOQ	BLOQ
No.4	0.736	BLOQ	BLOQ
No.5	BLOQ	BLOQ	BLOQ
No.6	0.767	BLOQ	BLOQ

6. 実験 4：局所刺激試験

6-1. 目的

HGF 溶液の声帯粘膜内投与における声帯粘膜への局所刺激性を確認する。

6-2. 方法

Sprague-Dawley ラット (13 週齢、雄、清水実験材料) を用いた。マイクロシリンジを用いてラット片側声帯粘膜内に 1 mg/mL HGF 溶液 5 μ L、反対側声帯粘膜内に生理食塩水を 5 μ L ずつ局所投与した。HGF 投与直後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後、3 日後、7 日後にラット声帯を内視鏡下に観察し、声帯腫脹、発赤の有無について評価した。(n=6)

また、投与 24 時間後、3 日後、7 日後で喉頭を摘出し、定法に従って声帯組織標本を作製

(HE 染色)、声帯粘膜組織の腫脹および炎症細胞浸潤の程度を評価した。(各 n=6)

6-3. 結果と考察

6-3-1. 観察所見

生理食塩水投与、HGF 溶液投与共に、投与直後に粘膜の腫脹が生理食塩水投与側と KP-100 投与側に同様に観察された以外は、全ての観測点において腫脹や発赤は観察されなかった。

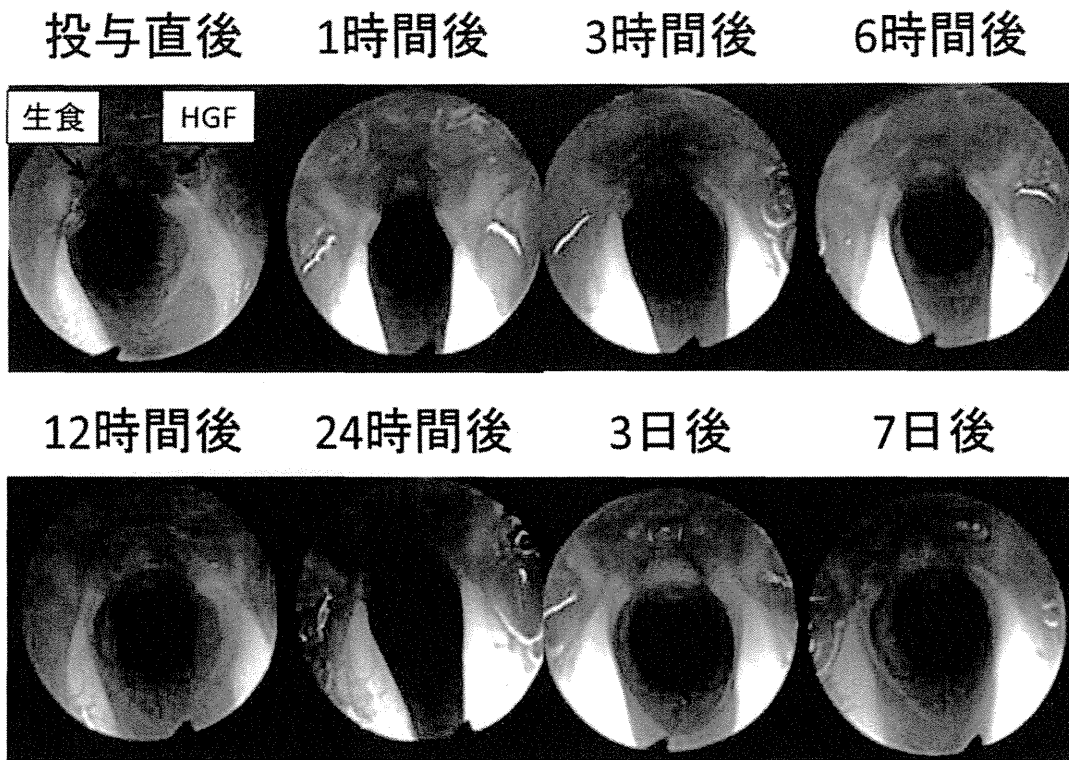
声帯腫脹の有無 (HGF 投与声帯/生理食塩水投与声帯) +:有 -:無

ラット	投与直後	1 時間後	3 時間後	6 時間後	12 時間後	24 時間後	3 日後	7 日後
A	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
B	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
C	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
D	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
E	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
F	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

声帯発赤の有無 (HGF 投与声帯/生理食塩水投与声帯) +:有 -:無

ラット	投与直後	1 時間後	3 時間後	6 時間後	12 時間後	24 時間後	3 日後	7 日後
A	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
B	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
C	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
D	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
E	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
F	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

内視鏡所見



6-3-2. 組織所見

生理食塩水投与側および、HGF 溶液投与側ともに、粘膜の腫脹、炎症細胞浸潤は、全ての観測点において観察されなかった。

声帯腫脹の有無

(HGF 投与声帯/生理食塩水投与声帯)

+:有 -:無

ラット	24 時間 後	3 日後	7 日後
A	-/-	-/-	-/-
B	-/-	-/-	-/-
C	-/-	-/-	-/-
D	-/-	-/-	-/-
E	-/-	-/-	-/-
F	-/-	-/-	-/-

声帯内への炎症細胞浸潤の有無

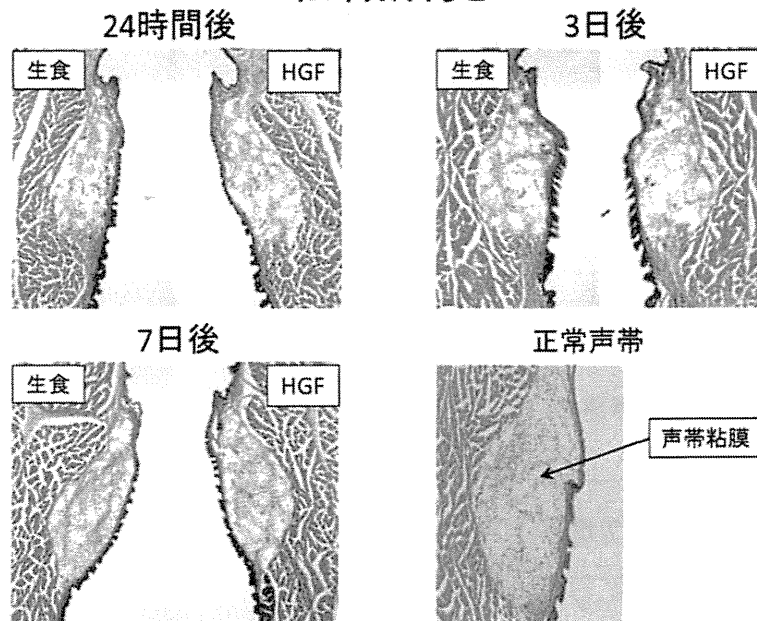
(HGF 投与声帯/生理食塩水投与声帯)

+:有 -:無

ラット	24 時間後	3 日後	7 日後
A	-/-	-/-	-/-
B	-/-	-/-	-/-
C	-/-	-/-	-/-
D	-/-	-/-	-/-
E	-/-	-/-	-/-
F	-/-	-/-	-/-

* 代表的組織所見

組織所見



7. 総括

本試験の結果、ラットの声帯粘膜内に投与された HGF 溶液 (KP-100) は、12 時間後には約 3% までに減少し、7 日後には殆ど消失した。血中では、投与 5 分後では微量検出された例があったが、12 時間後では検出限界以下であったことから、血中に移行したとしても微量で速やかに消失することが明らかとなった。

ラットの声帯粘膜内への HGF 溶液 (KP-100) 投与後の内視鏡検査では、投与直後には声帯で腫脹が認められた (生食投与でも同様) が、投与 1 時間後には回復し、その後 7 日までの間、浮腫や発赤を認めず、また組織検査においても投与後 1 日から 7 日まで浮腫性変化や炎症所見を認めなかった。従って、HGF 溶液 (KP-100) の声帯粘膜内投与において明らかな局所刺激性は認められないことが確認された。

8. 文献

- 1) Hirano S, Bless DM, Nagai H, Rousseau B, Welham NV, Montequin D, Ford CN. Growth Factor Therapy for Vocal Fold Scarring in Canine Model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:777-85.
- 2) Ohno T, Hirano S, Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Suehiro A, Tamura Y, Nakamura T, Ito J, Tabata Y. Drug delivery system of hepatocyte growth factor for the treatment of vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:762-769.
- 3) Kishimoto Y, Hirano S, Kitani Y, Suehiro A, Umeda H, Tateya I, Kanemaru S, Tabata Y, Ito J. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor. *Laryngoscope* 2010;120:108-113.
- 4) Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Rousseau B, Nakamura T, Ito J. Treatment of acute vocal fold scar with local injection of basic fibroblast growth factor: A canine study. *Acta Otolaryngol.* 2010;130(7):844-50.
- 5) Ohno T, Yoo MJ, Swanson E, Hirano S, Ossoff R. Regeneration of Aged Rat Vocal Folds using Hepatocyte Growth Factor Therapy. *Laryngoscope* 119;1424-1430,2009.
- 6) Ohno T, French LC, Hirano S, Ossoff RH, Rousseau B. Effect of Hepatocyte Growth Factor on Gene Expression of Extracellular Matrix During Wound Healing of the Injured Rat Vocal Fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117(9):696-702.

治験実施計画書(案)

声帯瘢痕患者に対する KP-100LI の 声帯内投与に関する第 I/II 相試験-医師主導治験-

自ら治験を実施する者

治験責任医師：平野 滋

国立大学法人 京都大学医学部附属病院

耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師 兼

公益財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター病院

診療部 再生治療ユニット 耳鼻いんこう科 声帯再生担当部長

治験調整医師：川本 篤彦

公益財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター病院

診療部 再生治療ユニット長 兼 血管再生科部長

Ver. D4.0 : 2014 年 3 月 10 日作成
(治験実施計画書番号：KP-100LI-2012-12)

秘密保持に関する供述：

本治験実施計画書に含まれる情報は本治験関係者に限定して提供される機密情報であり、本治験に参加いただく医療機関の関係者、治験薬提供者に限定して提供されます。被験者に説明する場合を除き、第三者に開示することはできません。また、本治験で得られた結果の一部または全部を学会、雑誌等外部に発表する場合には、事前に治験責任医師ならびに治験薬提供者の承認が必要となります。

略語一覧

ALP	Alkaline Phosphatase (アルカリフォスファターゼ)
ALT	Alanine Aminotransferase (アラニンアミノトランスフェラーゼ) =GPT(グルタミン酸・ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ)
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time(活性化部分トロンボプラスチン時間)
AST	Aspartate Aminotransferase (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ) =GOT(グルタミン酸・オキサロ酢酸アミノトランスフェラーゼ)
BUN	Blood Urea Nitrogen(尿素窒素)
CPK (CK)	Creatinine phosphokinase (クレアチンフォスフォキナーゼ)
CRP	C-reactive Protein(C 反応性蛋白)
EDC	Electronic Data Capture (電子データ収集システム)
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (塩基性線維芽細胞増殖因子)
GRBAS 尺度	Grade Rough Breathly Asthenic Strained (聴覚印象をスコア化した尺度)
γ-GTP	γ-glutamyl transpeptidase (ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ)
Hb	Hemoglobin(ヘモグロビン)
HBs	Hepatitis B surface antigen (B型肝炎ウイルス抗原)
HCV	Hepatitis C Virus (C型肝炎ウイルス)
HGF	Heptocyte Growth Factor (肝細胞増殖因子)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (ヒト免疫不全ウイルス)
Ht	Hematocrit(ヘマトクリット)
LDH	Lactate Dehydrogenase(乳酸脱水素酵素)
MedDRA	Medical Dictionary of Regulatory Activities Terminology (医薬品規制用語集)
MPT	Maximun Phonation Time (最長発声持続時間)
NMWA	Normalized Mucosal Wave Amplitude (声帯振動の振幅)
PT	Prothrobin Time (プロトロンビン時間)
SAE	Serious Adverse Event (重篤な有害事象)
VHI-10	Voice Handicap Index-10 (音声ハンディキャップ指数)

目次

1. 目的	1
2. 背景と根拠	1
3. 治験計画	2
3.1 治験のデザイン	2
3.2 治験実施のスケジュール	2
4. 対象症例	4
4.1 診断基準	4
4.2 適格基準	4
5. 治験薬	6
5.1 治験薬 (KP-100LI)	6
5.2 包装及び表示	6
5.3 調製	6
5.4 治験薬の用法・用量・投与期間	6
5.5 保管・管理	8
6. 併用治療	8
6.1 併用禁止薬・併用禁止療法	8
6.2 併用可能薬・併用可能療法	8
7. 説明と同意	8
7.1 同意文書及び説明文書の作成	8
7.2 再同意の取得および説明文書・同意書（様式）の改訂	9
7.3 文書同意の取得時期と方法	9
7.4 同意の撤回	9
8. 検査・観察スケジュール及び治験の実施手順・実施項目	10
8.1 検査・観察スケジュール	10
8.2 治験の実施手順・実施項目	1
8.3 観察・検査・調査項目に関連する基準の定義	9
9. 有害事象に関する定義、調査及び対応	10
9.1 定義	10
9.2 有害事象の評価と報告	11
9.3 有害事象への対応	12
10. 個々の被験者の中止	15
11. 治験の終了または中止	15
11.1 治験の終了	15

11.2 治験の中止.....	16
12. 治療実施計画書の遵守、逸脱または変更ならびに改訂	16
12.1 治験実施計画書の遵守	16
12.2 治験実施計画書の逸脱又は変更.....	17
12.3 治験実施計画書の改訂	17
13. 統計学的考察.....	17
13.1 目標症例数の設定根拠	17
13.2 主要評価項目と副次的評価項目.....	17
13.3 解析対象集団.....	18
13.4 解析項目・方法	18
14. 症例報告書.....	19
14.1 症例報告書の作成	19
14.2 症例報告書作成上の注意.....	19
15. 原資料	20
15.1 原資料の特定.....	20
15.2 原資料などの直接閲覧及びモニタリング	20
16. 治験の品質管理及び品質保証.....	20
16.1 症例報告書記載データの品質管理及び品質保証.....	20
16.2 治験全体の品質管理および品質保証	21
17. 記録の保存.....	21
17.1 実施医療機関.....	21
17.2 治験審査委員会	21
17.3 治験責任医師.....	22
18. 倫理的配慮.....	22
18.1 人権の保護および遵守すべき諸規則	22
18.2 治験審査委員会	22
18.3 個人情報の保護	22
19. 治験の費用負担及び補償.....	22
19.1 利益相反及び資金源.....	22
19.2 治験に関する費用	23
19.3 健康被害に対する補償	23
20. 試験の登録、成果の帰属と公表	23
20.1 臨床試験登録.....	23
20.2 成果の帰属と結果の公表に関する取り決め	23
21. 目標登録症例数と治験実施予定期間	24
21.1 目標登録症例数	24

21.2 治験実施予定期間	24
22. 治験実施体制.....	24
22.1 実施医療機関・実施医療機関の連携体制・治験薬提供者	24
22.2 治験実施体制.....	25
23. 文献	25

付録一覧

別冊 治験実施体制

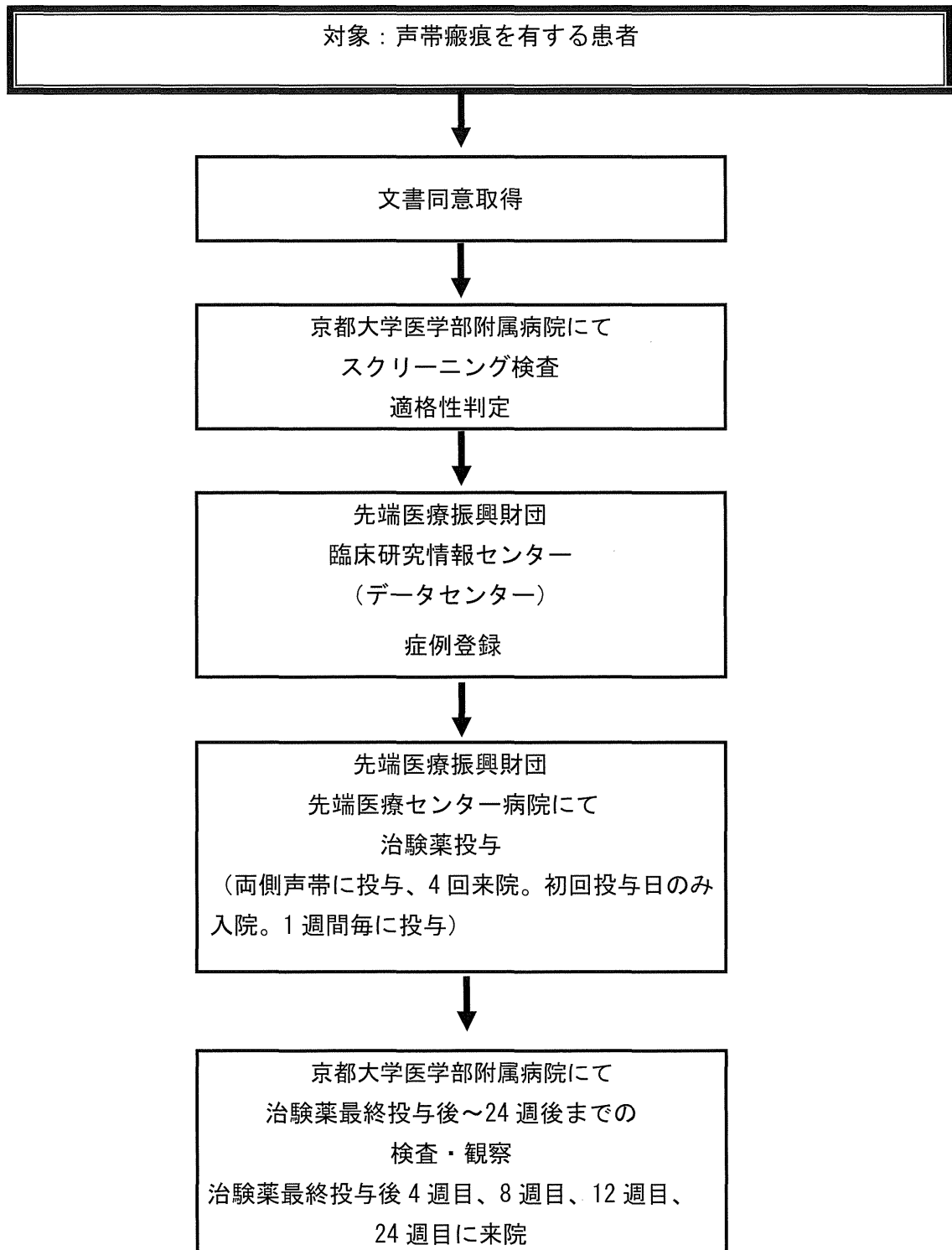
別紙 1 異常変動確認基準

別紙 2 VHI-10 記録用紙

参考資料 1 薬安第 80 号「医薬品等の副作用の重篤度分類基準」

概要

【シェーマ】



【臨床試験の目的】

声帯癬痕(溝症を含む)を有する患者を対象として、KP-100LI (dHGF ; ヒト 5 残基欠損型肝細胞増殖因子 KP-100 の局所投与製剤) の声帯粘膜内投与による声帯再生治療に関する安全性を確認するとともに、有効性評価指標および評価時期を探索する。

【対象】

選択基準：下記の基準を全て満たした患者を対象とする。

- (1) 本治験への参加について本人から文書同意が得られている患者。
- (2) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 65 歳以下の患者。
- (3) 喉頭ストロボスコープ検査で声帯の硬化性所見及び声帯振動の減弱と声門閉鎖不全を認め、両側の声帯癬痕と診断された患者。
- (4) 喉頭内視鏡検査で他の声帯病変（声帯ポリープ、結節、のう胞、浮腫、腫瘍性病変、白板症、肉芽腫）および声帯の開閉運動障害（声帯麻痺）がない患者。
- (5) VHI-10 スコアが 11 点以上の患者。
- (6) 同意取得前 6 ヶ月以内に喉頭形成術、コラーゲンや脂肪の声帯注入術、癬痕除去術、筋膜移植術、ステロイド投与、ヒアルロン酸投与が行われていない患者。

除外基準：下記の基準に一つでも当てはまる患者は対象としない。

- (1) 熱傷、火傷などによる気道損傷を有する患者。
- (2) 悪性腫瘍の既往又は合併している患者。
- (3) キシロカイン等の局所麻酔薬に対してアレルギーの既往を有する患者。
- (4) 薬物・アルコール依存症を合併している患者。
- (5) 重篤な合併症を有する患者（重篤は薬安第 80 号「医薬品等の副作用の重篤度分類基準について」（参考資料 1）を参考とする）。
- (6) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、梅毒血清反応が陽性の患者。
- (7) 妊娠中あるいはその疑い、授乳中、本治験中に妊娠を希望する女性、または治験期間中に避妊を守れない患者。
- (8) 同意取得前 3 ヶ月以内に他の治験または臨床研究に参加していた患者。
- (9) その他、治験責任医師又は治験分担医師が不相当と判断した患者。

【症例数と期間】

目標症例数：18 例各ステップ 6 例（有効性解析対象例数として）

ステップ I：1µg/片側声帯/回（投与日の総投与量 2µg）

ステップ II：3µg/片側声帯/回（投与日の総投与量 6µg）

ステップ III：10µg/片側声帯/回（投与日の総投与量 20µg）

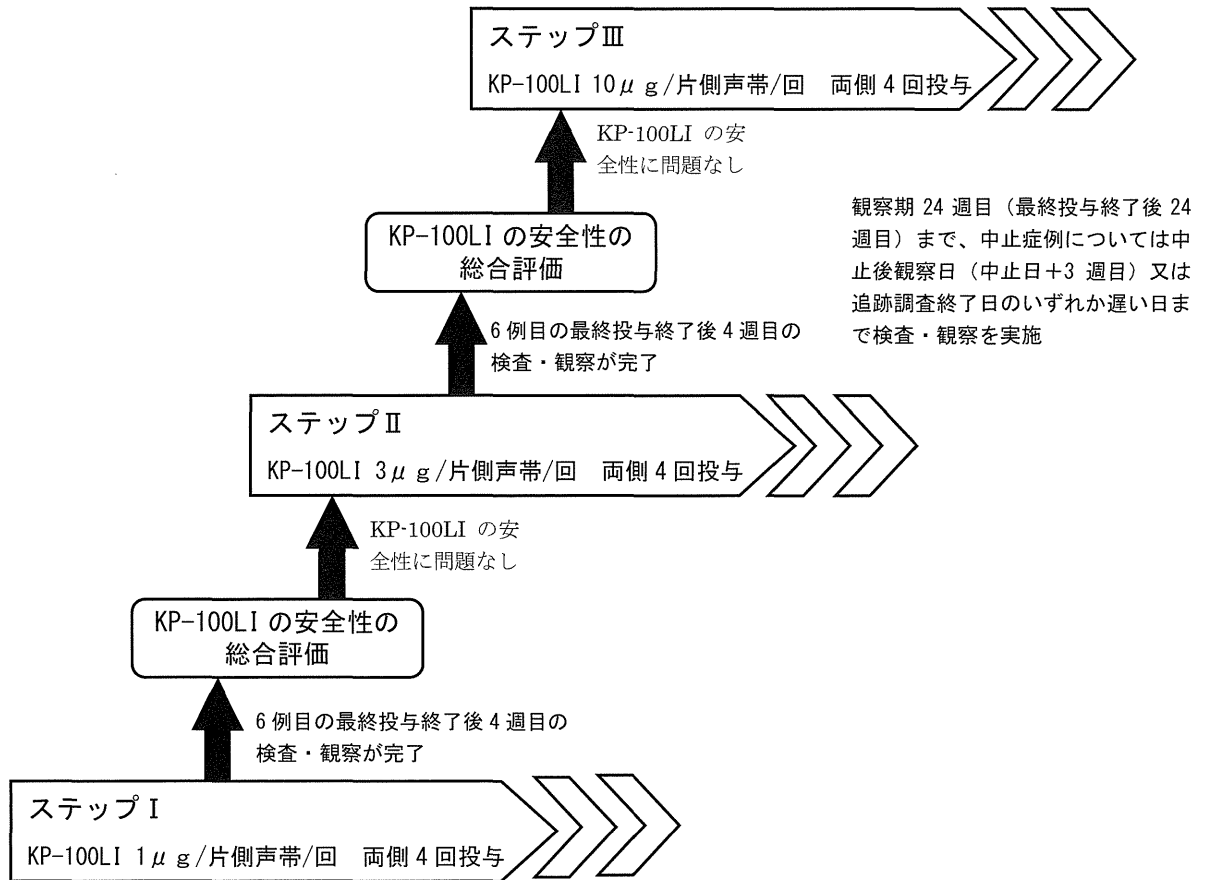
治験実施期間：2014 年 7 月～2016 年 5 月

症例登録期間：2014 年 7 月～2015 年 9 月

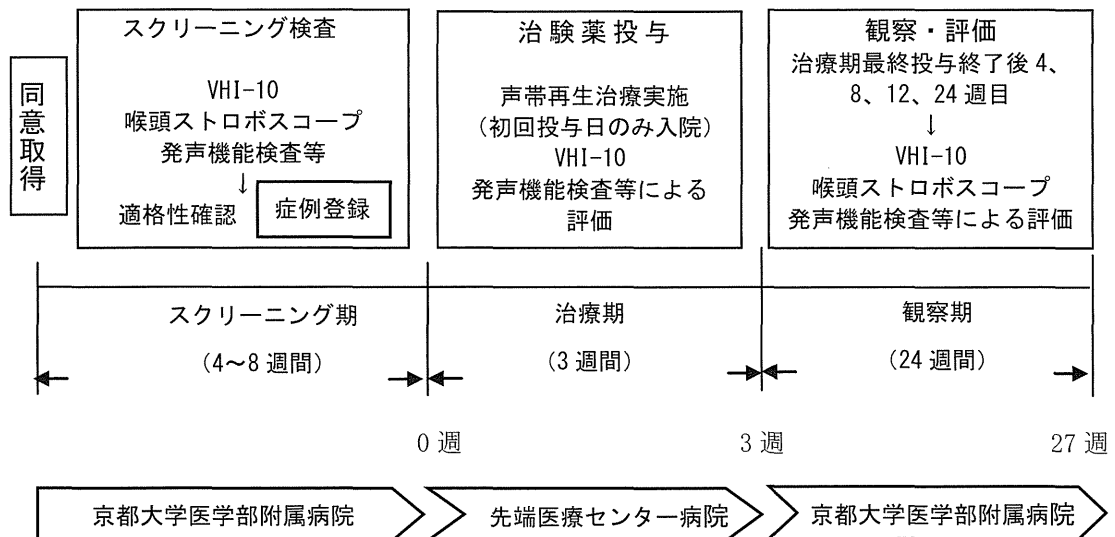
症例ごとの実施期間：同意取得日から観察終了日（治療期終了後 24 週目まで）

【臨床試験のデザイン】

試験デザイン：反復投与、オープン、多施設共同、用量漸増
 ステップの構成と移行：



治験実施スケジュール：



【各ステップにおける治験薬の用法・用量】

- (1) 4%キシロカイン噴霧により咽頭・喉頭の表面麻酔を行う。
- (2) 経鼻喉頭内視鏡のモニター下に喉頭注射針を用いて KP-100LI を各声帯粘膜内に局所投与する[ステップ I : 1 μ g/片側声帯/回 (投与日の総投与量 2 μ g)、ステップ II 3 μ g/片側声帯/回 (投与日の総投与量 6 μ g)、ステップ III : 10 μ g/片側声帯/回 (投与日の総投与量 20 μ g)]。
- (3) 各声帯につき 1 週間間隔で計 4 回投与する。

【治験薬】

治験薬 (KP-100LI)

- 1 バイアル中に dHGF 2.5mg を含有する凍結乾燥製剤。投与時は溶解し、調製を行う。

【評価項目】

- 1) 主要評価項目
 - ・KP-100LI 投与に対する安全性 (有害事象、臨床検査値、生理学的検査)
- 2) 副次的評価項目
 - ・治療期最終投与終了後 4 週目、8 週目、12 週目、24 週目における VHI-10、MPT、NMWA、GRBAS、jitter の改善の有無 (治療期開始前(スクリーニング期)との比較)
 - ・治療期最終投与終了後 24 週目における VHI-10 スコアが 5 点以上の改善の有無 (治療期開始前(スクリーニング期)との比較)

1. 目的

声帯癒痕(溝症を含む)を有する患者を対象として、KP-100LI (dHGF ; ヒト 5 残基欠損型肝細胞増殖因子 KP-100 の局所投与製剤) の声帯粘膜内投与による声帯再生治療に関する安全性を確認するとともに有効性評価指標および評価時期を探索する。

2. 背景と根拠

声帯は長さ 15-20mm 程度の一对の粘膜で、この粘膜が振動することにより声が生じられる。声帯粘膜は他の部位には認められない特徴的な層構造を呈し、3 層からなる粘膜固有層を有する。うち、浅層はヒアルロン酸や間質性蛋白からなり、声帯振動のおこる最も重要な部分である。中間層・深層にはそれぞれエラスチン、コラーゲンといった線維成分が密で、声帯靭帯を形成する。この層構造が理想的な声帯振動の維持に必要不可欠である。

声帯の癒痕(溝を含む)は外傷や炎症、声帯の手術後などにおこり、声帯粘膜固有層の層構造が破綻し、声帯の物性が硬く変化し、深刻な音声障害をきたす。職業的音声使用者や喉頭癌に対するレーザー手術後に発生しやすいが、声帯ポリープなどの声帯良性病変の術後にも発生することがある(文献 1-3)。声帯癒痕は声帯の粘膜固有層にコラーゲン線維が密に蓄積し、粘弾性を損なった状態をいう。溝症は声帯粘膜に溝ができるもので、見た目からの病名であるが、実態は、溝の部分で密なコラーゲン線維が増勢し粘弾性を損なうもので、癒痕の一部として位置づけられる。

いったん声帯が硬く変質するとこれを元に戻すことは不可能であり、現時点で確立された治療法は存在しない。音声外科的治療として喉頭形成術、コラーゲンや脂肪の声帯注入術、癒痕除去術などが試みられてきたが、声帯を再生するものでなく効果は極めて限られていた(文献 1-5)。最近、筋膜移植が有効との報告があるが、コンセンサスは得られておらず普及していない(文献 6)。

本疾患の患者数の推計は困難であり、正確な患者数は把握されていない。京都大学医学部附属病院耳鼻咽喉科において 2006 年から 2011 年における声帯癒痕と診断された新規患者数は 38 例(うち溝症 16 例)で、年間平均 7-8 例であった。声帯溝症については、平成 21 年厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服事業)「声帯溝症の診断治療の確立と、標準化に向けたガイドラインの作成に関する研究」(研究代表者:角田晃一)を利用した疫学調査がなされ、中学・高校時代における患者推計が年間 250-1000 名程度であった。これが 60 歳代まで持ち越されるとした場合、6 倍の 1500-6000 人程度の患者が推定される。従って、癒痕患者を溝症の患者数の 2 倍と仮定した場合、国内における全癒痕患者数およそ 3000-12000 人程度の患者数と推定され、本疾患は希少疾病に該当する。

本疾患による音声障害は著明で、失職や社会からの隔絶など QOL の著しい低下をきたすものであり、革新的治療の開発が急務と考えられる。

我々のこれまでの研究において、以下のことが明らかとなっている。まず、声帯癒痕の組織変化を動物およびヒトにおいて検討した結果(文献 7-11)、声帯癒痕の粘膜固有層では多くの場合コラーゲンの過剰蓄積、ヒアルロン酸・エラスチンの減少・消失などが観察された。声帯癒痕の再生を行う場合、これら細胞外マトリックスの回復を行う必要がある。声帯粘膜内において細胞外マトリックスの産生・調節は主に粘膜固有層内にある線維芽細胞によってなされている。上記の声帯癒痕の組織変化

の結果を踏まえると、まず線維芽細胞からのコラーゲン産生を抑え、ヒアルロン酸を増加させることが重要と考えられた。HGF は強力な抗線維化作用を有することが知られており、*in vitro* の実験において、声帯由来の線維芽細胞からのヒアルロン酸産生を促進すると同時にコラーゲン産生を抑制した（文献 12-15）。当該結果を基に、*in vivo*（ウサギ、イヌ）の実験を実施し、声帯瘢痕に HGF を局所注射することで組織学的、機能的に声帯の再生が認められるとことを確認した。（文献 16-19）。

今回、国内において声帯再生の適応に帯する KP-100LI の製造販売承認取得を目指し、本治験薬の安全性を確認するとともに、有効性の評価指標および評価時期を探索する目的で本治験を計画した。

KP-100 LI の有効成分である dHGF は、遺伝子組換え技術により産生する 5-アミノ酸欠損型ヒト HGF(dHGF)であり、クリングルファーマ（株）より提供される。dHGF は、投与経路によって異なる製剤が使用されており、米国において慢性腎不全（静脈内注射用製剤 KP-100）、国内においては筋萎縮性側索硬化症（ALS）を対象とした治験が実施終了又は実施中であり、ヒトでの安全性データが集積しつつある。また、脊髄損傷急性期（脊髄腔内注射用製剤 KP-100IT）を対象として治験が計画されている。

3. 治験計画

3.1 治験のデザイン

反復投与、オープン、多施設共同、用量 漸増

3.2 治験実施のスケジュール

本治験はステップ I、II および III と異なる投与量の 3 期の試験により構成されている。図 3-1 にステップの構成とステップ移行について示した。ステップ I においては、6 名の被験者に対して、1 μ g/片側声帯/回の用量を両側の声帯粘膜内に反復投与（2 μ g を週 1 回、計 4 回）する。治験責任医師はステップ I の 6 例目の観察期 4 週目（最終投与終了後 4 週目）の検査・観察が完了次第、速やかに、当時点までに収集されたデータより、ステップ I における KP-100LI の安全性を総合的に評価し、安全性に問題がないことを確認した上で、ステップ II の同意取得を開始できる（ステップ移行）。ステップ II においては、ステップ I と異なる 6 名の被験者に対して、3 μ g/片側声帯/回の用量を両側の声帯粘膜内に反復投与（6 μ g を週 1 回、計 4 回）する。治験責任医師はステップ II の 6 例目の観察期 4 週目（最終投与終了後 4 週目）の検査・観察が完了次第、速やかに、当時点までに収集されたデータより、ステップ II における KP-100LI の安全性を総合的に評価し、安全性に問題がないことを確認した上で、ステップ III の同意取得を開始できる（ステップ移行）。ただし、いずれのステップ移行においても、KP-100LI との因果関係が否定できない重度な有害事象または重篤な有害事象が各ステップにおいて 2 例以上発生した場合、データモニタリング委員会を開催し、その審議結果によりステップ移行を決定する。