

験の継続について審議する。治験責任医師又は分担医師は当該委員会の審議結果に従う。

### 9.3.2 重篤な有害事象発生時の対応

#### 1) 被験者に対する処置

治験責任医師又は分担医師は、被験者の治験参加中及びその後を通じ、治験に関連した臨床上の問題となる重篤な有害事象に対して、十分な医療措置を行う。また、重篤な有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、被験者の安全確保に留意し、必要に応じ専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。

#### 2) 報告手順

治験責任医師又は分担医師は、一次報告（知り得てから 24 時間以内：遅くとも 1 労働日以内）、二次報告（7 日以内）、詳細調査報告、最終報告を各実施医療機関の長に行う。

なお、最終報告についてはデータモニタリング委員にも報告する。

治験責任医師は報告された上記の重篤な有害事象が以下に示した要件を満たした場合には、以下の期間内に規制当局に報告すると同時に治験薬提供者にも報告する。

規制当局に報告対象となる重篤な有害事象については、データモニタリング委員においても検討し、その後の対応策を決定する。なお、対応策の検討について治験責任医師又はデータモニタリング委員が審議する必要があると判断した場合は、データモニタリング委員会を開催する。治験薬との関連性が否定できない死亡又は死亡につながるおそれのある事象が累積 2 例認められた場合は、治験責任医師又は分担医師は一旦症例登録を中断する。データモニタリング委員会は当該治験の継続について審議する。治験責任医師又は分担医師は当該委員会の審議結果に従う。

治験責任医師又は分担医師は、「安全性情報の取扱いに関する手順書」に従い、適切に報告を行う（図 9-1 重篤な有害事象発現時の報告・対応フローチャート参照）。

#### 【規制当局への緊急報告が必要となる要件および報告期限】

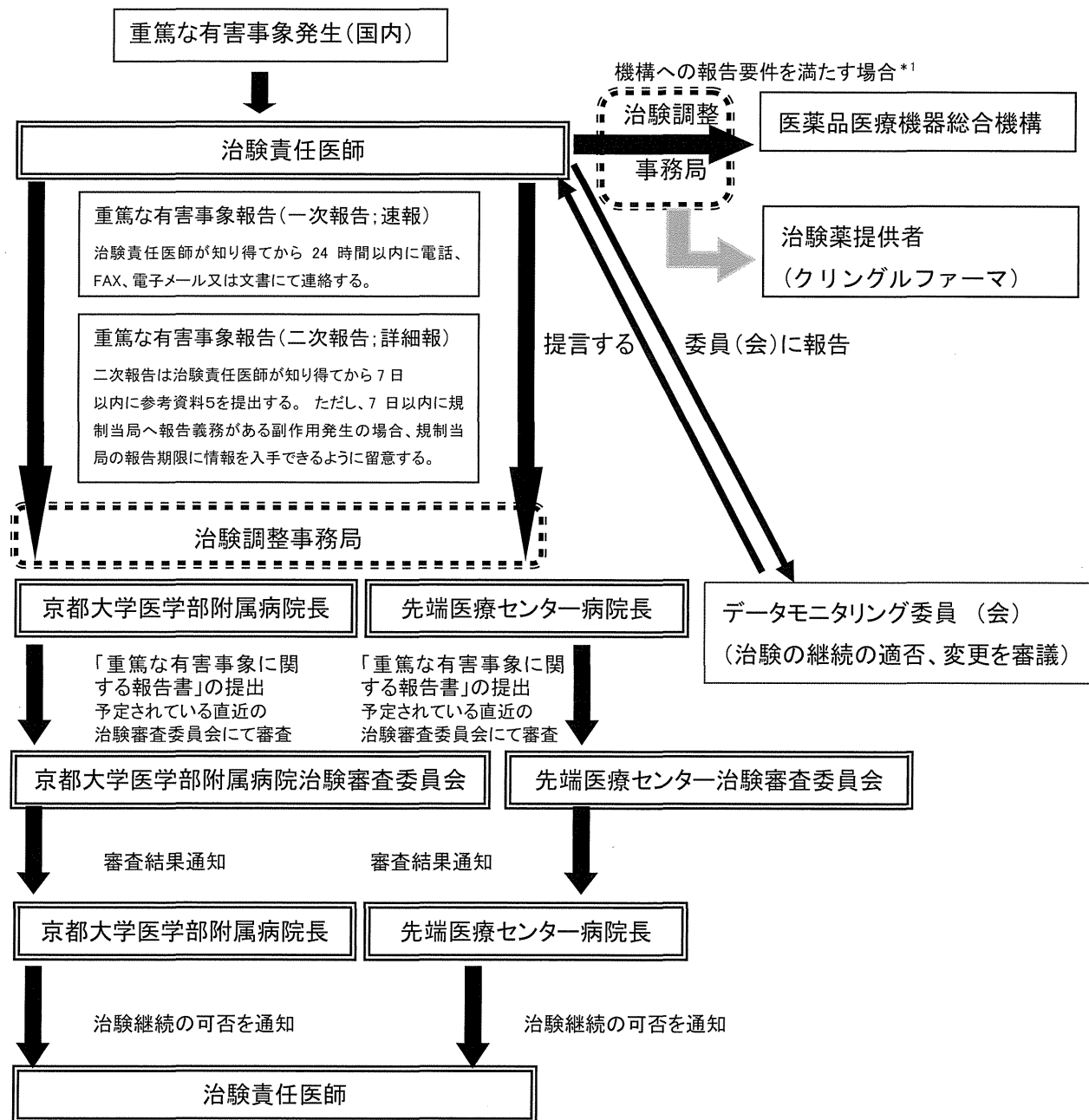
重篤な有害事象発現症例のうち、KP-100LI との因果関係が否定できないもので、以下の 1) -3) に該当するものが緊急報告の対象となる。治験責任医師はその重篤な有害事象を知り得た日から、その内容に応じて以下の期限内に報告する。

- 1) 予測できない重篤な有害事象のうち、「死亡」および「死亡につながるおそれのある症例」は 7 日以内
- 2) 予測できない重篤な有害事象のうち、上記(1)以外は 15 日以内。
- 3) 予測される重篤な有害事象のうち、「死亡」および「死亡につながるおそれのある症例」は 15 日以内

手順の詳細は、「安全性情報の取扱いに関する手順書」に従うものとする。

【緊急時の連絡先】

治験責任医師：平野 滋  
 京都大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師  
 兼 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  
 TEL：075-751-3731 （夜間・休日）TEL：075-751-4399



\* 1: 提出期限、様式等は、薬食発第 0330001 号又は市販の医薬品/医療機器の規定に従う。

図 9-1 重篤な有害事象発現時の報告・対応フローチャート

### 9.3.3 予測される有害事象

- 1) 本試験で施行する麻酔に関する有害事象として、キシロカインショック、キシロカイン中毒が報告されている。
- 2) 本試験の声帯注射においては、注射薬に対するアレルギー反応がおきると喉頭浮腫をきたす可能性が考えられる。
- 3) 以前に実施した声帯再生術の動物実験において、喉頭浮腫や感染などの有害事象の発生は認められなかったが、発生しうる有害事象としては下記について注意が必要と思われる。
  - (1) 喉頭浮腫、発赤
  - (2) 治験薬に対するアレルギー反応・アナフィラキシーショック
  - (3) 感染

### 9.3.4 予測できない有害事象

治験薬投与後に発現した有害事象のうち、治験薬概要書に記載のないもの、あるいは記載されているがその性質、症状の程度又は発生数、発生頻度、発生条件等の傾向が記載内容と一致しないものをいう。

## 10. 個々の被験者の中止

個々の被験者毎の治験中止規定として、下記に該当する場合は、治験を中止する。

- 1) 同意取得後、被験者より中止の申し入れ（同意撤回等）があった場合
- 2) 同意取得後に有害事象などのため、規定の観察・評価が困難であると判断された場合
- 3) 同意取得後、治験薬投与開始前に症状増悪などのため、治験開始が妥当でないと判断された場合
- 4) 治験開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 5) その他、治験責任医師又は分担医師が治験の中止を判断した場合

[投与中止症例に対する置き換え症例について]

同意撤回または治験薬との因果関係が否定される有害事象等により投与中止した症例に置き換えて、新規症例を組み入れすることが可能となる。なお、新規症例については投与期間中の中止例に対して置き換えすることを規定しており、投与終了後、観察期において中止した症例については、置き換えを行わない。

## 11. 治験の終了または中止

### 11.1 治験の終了

- 1) 治験責任医師は LPO (last patient out) 後、データが固定されたことを確認の上、実施医療機関の長に治験が終了した旨を報告する。

- 2) 実施医療機関の長は、治験の終了の旨を治験審査委員会に対して速やかに文書で通知する。この時点で治験を終了とする。

## 11.2 治験の中止

### 11.2.1 治験の中止基準

以下の場合に治験全体を中止する。

- 1) 本治験において治験薬との関連性が否定できない重度の有害事象あるいは死亡または死亡につながるおそれのある重篤な有害事象が 2 例認められた場合、症例登録を一時中断する。データモニタリング委員会は、原因調査の結果、本治験との関連が否定できない場合には本治験の中止を勧告する。
- 2) 治験責任医師は、以下のいずれかに該当する場合、もしくはデータモニタリング委員会により治験全体の中止または中断の勧告を受けた場合、治験責任医師の判断もしくは実施医療機関の長等と協議の上、治験全体の中止または中断について決定する。治験審査委員会から中止または中断を指示された場合には、速やかに従う。
  - (1) 治験薬の安全性・有効性に問題が生じた場合
  - (2) 本治験の治療において安全性に問題が生じた場合
  - (3) 規制当局からの中止勧告があった場合
  - (4) 治験責任医師が開発中止を決定した場合
  - (5) その他治験の一部または全体を中止または中断する必要があるような状況が発生した場合

### 11.2.2 治験の全体の中止決定の手順

- 1) 治験が何らかの理由により中止または中断された場合、治験責任医師は被験者に速やかにその旨通知し、被験者に対する適切な治療および事後処理を保証する。
- 2) 治験責任医師または分担医師が当該医療機関での治験を中止・中断した場合には、実施医療機関の長に速やかにその旨を文書で報告する。
- 3) 治験責任医師が治験を中止・中断した場合、その旨と理由の詳細を実施医療機関の長および規制当局に速やかに文書で報告する。

## 12. 治療実施計画書の遵守、逸脱または変更ならびに改訂

### 12.1 治験実施計画書の遵守

治験責任医師及び分担医師は、治験実施計画書が治験審査委員会で承認され、実施医療機関の長から実施の許可を得た後に、本治験を開始する。治験の実施にあたっては、実施計画書の内容を遵守しなければならない。

## 12.2 治験実施計画書の逸脱又は変更

治験責任医師及び分担医師は、次の場合を除き治験審査委員会の事前の審査に基づく文書による承認を得ることなく、治験実施計画書からの逸脱又は変更を行ってはならない。

- ①被験者の緊急の危険を回避する等、医療上やむを得ない場合
- ②治験の事務的事項等の軽微な変更である場合

上記①の場合、治験責任医師は、逸脱又は変更の内容及び理由ならびに治験実施計画書の改訂が適切な場合にはその案を可能な限り早急に実施医療機関の長及び治験審査委員会に提出して承認を得るとともに、実施医療機関の長の合意を得なければならない。

治験責任医師は、治験の実施に重大な影響を与え、又は被験者の危険を増大させるような記載内容のあらゆる変更について、実施医療機関の長及び治験審査委員会に速やかに報告書を提出する。

## 12.3 治験実施計画書の改訂

治験開始後に実施計画書の改訂が必要になった場合、治験責任医師は実施計画書作成委員の意見を聴取のうえ改訂を行い、実施医療機関の長に改訂内容及びその理由を報告する。実施医療機関の治験審査委員会の手順書等の規定に準じて、審査を受け承認を得る（実施医療機関において、軽度と判断される変更内容については報告事項として承認される事項もある）。

治験責任医師は実施計画書改訂内容に応じて被験者への説明文書を改訂する。

## 13. 統計学的考察

### 13.1 目標症例数の設定根拠

本治験は本疾患の患者に対して初めて投与する試験であり、安全性の確認を目的とした地検であることが前提である。また、後続の治験における有効性の主要評価項目の候補となる評価項目及び評価時期を探索的に解析・評価するためにデザインされたものであり、症例数算定に関する統計学的検討は行っていない。

### 13.2 主要評価項目と副次的評価項目

#### 13.2.1 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)

#### 13.2.2 副次的評価項目

- ・治療期終了後 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 S2)との比較)
- ・治療期終了後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 S2)との比較)

### 13.3 解析対象集団

#### 13.3.1 安全性解析対象集団

本試験の安全性解析対象集団は、1 回でも治験薬の投与があった症例の集団とする。

#### 13.3.2 有効性解析対象集団

安全性解析対象集団のうち、以下の症例を除いた集団を有効性解析対象集団とする

- 治験薬の投与が 10 日以上延期がある症例
- 両側とも各 4 回の治験薬の投与行われなかった症例
- 登録後に不適格症例であることが判明した症例
- 登録後に有効性に関わるデータがない症例

\* 上述に規定された有効性解析対象集団に加えて、最大の有効性解析対象集団として、安全性解析対象集団から登録後に有効性に関わるデータを有しない症例を除いた症例についても解析を行う。

### 13.4 解析項目・方法

「13.2 主要評価項目と副次的評価項目」で記載された実施項目について、各ステップごとに以下の集計と解析を行う。本実施計画書に記載されていない解析の詳細は、「統計解析計画書」に記載する。

#### 13.4.1 症例構成

登録症例数、治験薬投与の症例数、中止例、完了例のフロー図を作成する。治験薬治療の途中中止例は理由別に集計し表示する。

#### 13.4.2 解析対症例

安全性解析対象集団、有効性解析対象集団ごとにその症例数を表記する。除外例は除外理由別に集計してその症例数を示す。

#### 13.4.3 被験者背景及びベースライン測定値

有効性解析対象集団の患者背景について、定量変数は要約統計量（症例数、平均値、標準偏差、最小値、中央値及び最大値）、定性変数は症例数・割合(%)を求める。

#### 13.4.4 治療情報

治療期の治験薬の休薬、中止状況について、集計する。なお、中止状況に関しては理由別に頻度及び割合 (%) を算出する。

#### 13.4.5 有効性

VHI-10 のスクリーニング時から治療期終了後 4 週目、8 週目、12 週目、24 週目までの繰り返し測定データに対して、患者を変量効果として、混合効果モデルの MMRM (mixed model

repeated measures) 法を用いて各時点の調整平均およびスクリーニング時と治療期終了後の各時点とを比較し差の 95%信頼区間を算出する。これより、24 週時点の VHI-10 の前からの差の調整平均とその 95%信頼区間を得る。また、各時点の調整平均と標準誤差をプロットし経時推移を作図する。

MPT、NMWA、GRBAS、jitter についても、VHI-10 スコアと同様な MMRM 法による解析を行い治療期開始時からの差の 95%信頼区間と経時推移を作図する。

治療期終了後 4 週目、8 週目、12 週目、24 週目の時点ごとに VHI-10 スコアが 5 点以上改善患者の割合とその 95%信頼区間を求める。

#### 13.4.6 安全性

KP-100LI 投与後に発現したすべての有害事象は MedDRA 辞書を用いて LLT コードを割り当てる。有害事象のうち、KP-100LI との関連性が否定できないものを副作用とする。

すべての有害事象、副作用および重篤な有害事象別の頻度を集計する。頻度集計は器官別大分類 (SOC: System Organ Class) 及び基本語 (PT: Preferred Term) 別に集計する。有害事象発現例は、報告された有害事象名、SOC、PT、発現までの期間、重篤度、重症度、因果関係、転記を含んだ一覧表を作成する。

臨床検査値および生理学的検査の経時的推移を集計する。

## 14. 症例報告書

### 14.1 症例報告書の作成

本治験における症例報告書のデータ収集は、EDCを用いて実施する。症例データは実施医療機関から直接ウェブブラウザを用いて入力される。EDCにより収集するこれらのデータを症例報告書とする。

治験責任医師又は分担医師は、各被験者の諸検査・観察終了後、速やかに「症例報告書作成及び修正の手引き」に従って症例報告書を作成する。医学的判断を伴わない事項については、治験責任医師の指導・監督下で治験責任医師又は分担医師の業務に協力する治験協力者が入力及び修正することができる。

### 14.2 症例報告書作成上の注意

治験責任医師又は分担医師が症例報告書を訂正する場合、「症例報告書作成及び修正の手引き」に従う。最初に入力されたデータが、サーバーへ保存された以降は、いかなる変更または修正に関しても、全ての修正履歴 (修正日時、修正者、修正前後のデータ、重大な変更又は修正については修正理由、問い合わせ者、問い合わせ内容を監査証跡としてシステムに自動的に保存される。治験責任医師は、症例報告書データの入力が全て終了し、その内容が正確で、完全であることについて監査証跡を含めて確認した後に、電子署名する。入力された症例報告書データのうち、原資料との間に矛盾がある場合にはその理由を説明する記録を作成し保管する。入力されたデータ内容についての問い合わせに際しては速やかに回答し、

修正等が必要な場合には、対応する。

## 15. 原資料

### 15.1 原資料の特定

本治験において規定するデータの根拠となる原資料、ならびに症例報告書に直接記載されることにより症例報告書以外の記録が存在しないデータ（症例報告書が原資料となるデータ）を以下に示す。

#### 1) データの根拠となる原資料

被験者スクリーニング名簿兼登録名簿、診療録、ワークシート（本治験用に作成された診療録に添付する書類）、看護記録、各検査伝票・検査結果記録、フィルム、治験薬管理表（治験薬納品書、治験薬返却書等、廃棄記録等含む）、処方記録、被験者署名済同意文書、データが記載された治験専用の記録用紙（VHI-10 記録用紙(別紙 2)）、診療情報提供書など

#### 2) 症例報告書が原資料となるデータ

併用薬・併用療法の使用理由、有害事象の重篤度・重症度・転帰・治験薬との関連性、中止理由、治験責任医師・分担医師によるコメントなど

### 15.2 原資料などの直接閲覧及びモニタリング

#### 15.2.1 原資料などの直接閲覧

実施医療機関の長及び治験責任医師は、治験責任医師が指名したモニタリング担当者、監査担当者並びに治験審査委員会及び国内外の規制当局による調査を受け入れ、原資料などのすべての治験関連記録を直接閲覧（複写を含む）に供しなければならない。なお、被験者は同意文書に署名することにより、直接閲覧を認めたことになる。

#### 15.2.2 モニタリング

治験責任医師は本治験の実施に倫理的、法的、科学的な責任を負う。治験責任医師はモニタリング担当者を指名し、指名されたモニタリング担当者は当該治験に特有の「モニタリングに関する手順書」に従い、定期的な実施医療機関への訪問又は電話等により、治験に関する最新の情報を提供または入手し、記録を残す。

## 16. 治験の品質管理及び品質保証

### 16.1 症例報告書記載データの品質管理及び品質保証

#### 1) データの品質管理

データマネジメント責任者及び担当者は、治験に関連するすべてのデータの信頼性とその適正な処理を保証するために、標準業務手順書に基づいてデータの取扱いの各段階において品質管理を実施する。



データマネジメント責任者及び担当者は、症例報告書の回収、データの点検・入力・変更・修正などのデータ固定までの手順について、当該治験に係る「データマネジメント計画書」等に基づき実施する。

## 2) データの品質保証

監査担当者は GCP 省令、標準業務手順書、本治験実施計画書等によってデータの品質管理が適切に行われていることを確認する。

## 16.2 治験全体の品質管理および品質保証

### 1) 品質管理

治験責任医師により指名されたモニタリング担当者はモニタリングの実施等により実施医療機関において治験が治験実施計画書および GCP 省令を遵守して適切に行われていることを確認する。また、原資料等の治験関連記録を直接閲覧し、症例報告書等の記載内容が正確であることを確認する。

原資料との不一致、記載内容の整合性および論理的矛盾が存在した場合、治験責任医師は、当該項目の妥当性を検討し、必要に応じて症例報告書の訂正を行う。

### 2) 品質保証

治験責任医師が指名した監査担当者は「監査の実施に関する手順書」に従って監査を実施し、品質管理が適切に行われていることを確認する。

## 17. 記録の保存

### 17.1 実施医療機関

実施医療機関の長は、GCP 省令で定められた実施医療機関にて保存すべき資料を保存する。資料の保存期間は以下の①または②のうちどちらか遅い日までとする。

①当該治験薬にかかわる製造販売承認日（開発中止もしくは治験の成績が承認申請書に添付されない旨の通知を受けた日から 3 年が経過した日）

②治験の中止または終了後 3 年が経過した日

治験責任医師は、当該資料について保存の必要がなくなった場合には、その旨を医療機関の長に通知する。

### 17.2 治験審査委員会

治験審査委員会の設置者は、GCP 省令で定められた治験審査委員会で保存すべき資料を保存する。

資料の保存期間は以下の①または②のうちどちらか遅い日までとする。

①当該治験薬にかかわる製造販売承認日（開発中止もしくは治験の成績が承認申請書に添付されない旨の通知を受けた日から 3 年が経過した日）

②治験の中止または終了後 3 年が経過した日

治験責任医師は、当該資料について保存の必要がなくなった場合には、その旨を治験審査委員会の設置者に通知する。

### 17.3 治験責任医師

治験責任医師は、GCP 省令で定められたもののうち、治験責任医師が保存すべき資料を保存する。資料の保存場所および期間については「記録の保存に関する手順書」に従うものとする。

## 18. 倫理的配慮

### 18.1 人権の保護および遵守すべき諸規則

治験責任医師及び分担医師は、被験者の選定にあたって人権保護の観点から、並びに選択基準及び除外基準に基づき、被験者の健康状態、症状、年齢、性別、同意能力、治験責任医師等との依存関係、他の臨床試験への参加の有無を考慮のうえ、治験に参加を求めることの適否について慎重に検討する。

また、本治験に関与するすべての者は「世界医師会ヘルシンキ宣言」（2008年10月改訂版）及び「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成9年厚生省令第28号）及び関連する通知等に従い、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令のガイダンス」（平成24年薬食審査発1228第7号）を参考とする。

### 18.2 治験審査委員会

本治験は、治験を実施することの適否について、倫理的、科学的小および医学的妥当性の観点から治験審査委員会の審査を受ける。

### 18.3 個人情報の保護

被験者の登録および症例報告書における被験者の特定は、被験者識別コードで行うとともに、治験の実施に係る原データ類および被験者の同意書等の直接閲覧、並びに治験成績の公表においては、被験者の氏名、疾患等のプライバシーおよび個人情報保護に十分配慮する。治験に携わる関係者は被験者の個人情報保護に最大限の努力をほらう。

治験責任医師及び分担医師は、症例登録票及び症例報告書等を当該医療機関外に提供する際には、連結可能匿名化を行うために新たに被験者識別コードを付し、それを用いる。医療機関外の者が、被験者を特定できる情報（氏名・住所・電話番号など）は記載しない。

データセンターが医療機関へ照会する際の被験者の特定は、治験責任医師及び分担医師が管理する被験者識別コード又はデータセンターが発行した登録番号を用いて行う。

治験責任医師等は治験成績の公表においては、被験者の氏名、疾患等のプライバシー及び個人情報保護に十分配慮する。

## 19. 治験の費用負担及び補償

### 19.1 利益相反及び資金源

治験責任医師等は、本治験において使用する医薬品の製造販売企業等との雇用関係や、親

族・師弟関係等の個人的関係を有さない。これら本治験の利害関係については、治験責任医師が所属する実施医療機関における施設内治験審査委員会の審査と承認を得る。

本治験は公益財団法人先端医療振興財団の研究費および国立大学法人 京都大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の研究費により実施される。治験薬については、クリングルファーマ社より無償提供されるが、それにより本治験の成績を歪曲することは一切行わない。治験責任医師等は、本治験の実施や報告の際に、金銭的な利益やそれ以外の個人的な利益のためにその専門的な判断を歪曲するようなことは一切行わない。治験は公正に行われ、治験で使用する製品や薬剤などの会社との利害関係を、「京都大学大学院医学研究科利益相反マネジメントポリシー」ならびに「先端医療振興財団利益相反ガイドライン」に従って適切に管理される。

## 19.2 治験に関する費用

今回の治験に係る費用のうち、先端医療センター病院における KP-100LI 声帯粘膜内投与に係る処置費用（治験薬調製に係る費用、治療期中のファイバースコープ検査費用-ただし、最終投与日のファイバースコープ検査費用は除く）は先端医療センターが負担することとする。これ以外の費用（京都大学医学部附属病院および先端医療センター病院における全検査費、併用薬剤費等）については通常診療時と同様に被験者の健康保険を適用する。

## 19.3 健康被害に対する補償

- 1) 実施医療機関の長は、本治験に関連して被験者に生じた健康被害（副作用等）の治療に関する医療の提供、その他必要な処置を講ずる。
- 2) 本治験に起因して被験者に何らかの健康被害が発生した場合には、実施医療機関は治療その他必要な措置を講ずるものとする。
- 3) 補償の対象となる死亡・後遺障害に対しては契約する治験保険の規定に従い、補償金を支払う。
- 4) 本項に示した健康被害であっても、本治験との関連性を否定された場合、被験者の故意もしくは 重過失により生じた場合、又は効能不発揮（治験薬が効かなかった）の場合には補償は行わない。

## 20. 試験の登録、成果の帰属と公表

### 20.1 臨床試験登録

本治験は UMIN、Japic CTI 社団法人日本医師会治験促進センターの臨床試験登録システム、Clinical Trial gov.等のデータベースへ臨床試験登録を行う。

### 20.2 成果の帰属と結果の公表に関する取り決め

本治験によって得られた成果は、先端医療振興財団、京都大学医学部附属病院およびクリングルファーマ株式会社に帰属する。

また、本治験に関わる学会発表や論文発表などを行う場合には、事前に治験責任医師より

実施医療機関および治験薬提供者に連絡・協議の上、しかるべき国際・国内学会、peer reviewed journal を選んで発表する。

## 21. 目標登録症例数と治験実施予定期間

### 21.1 目標登録症例数

総症例数：18 例（有効性解析対象例数として）

ステップⅠ KP-100LI 1  $\mu$  g/片側声帯/回、両側反復 4 回投与群 6 例

ステップⅡ KP-100LI 3  $\mu$  g/片側声帯/回、両側反復 4 回投与群 6 例

ステップⅢ KP-100LI 10  $\mu$  g/片側声帯/回、両側反復 4 回投与群 6 例

### 21.2 治験実施予定期間

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～観察期終了時（治験薬最終投与後 24 週目）

## 22. 治験実施体制

### 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

#### 22.1.1 京都大学医学部附属病院

京都大学医学部附属病院にて、被験者の選定、同意取得、スクリーニング検査、症例登録、観察期の検査・観察等を実施する。

#### 22.1.2 先端医療センター病院

先端医療センター病院にて、治療期における KP-100LI の投薬、検査・観察等を実施する。また、治験薬の保管・管理行う。

#### 22.1.3 実施医療機関の連携体制

先端医療センター病院および京都大学医学部附属病院で実施される治験および医療の質を確保するため、「共同治験に係る契約書」を締結する。この契約により、本治験の実施における両実施医療機関の役割分担および診療体制等について合意している。

先端医療センター病院で緊急事態が発生した場合は、緊急処置のみを先端医療センター病院で行い、神戸市立医療センター中央市民病院へ直ちに搬送する。

#### 22.1.4 治験薬提供者

治験薬提供者であるクリングルファーマ株式会社は、治験責任医師に治験薬並びに治験薬に係る安全性情報など、治験実施に必要な情報の提供を行う。また、本治験において治験薬との因果関係が否定できない死亡またはその他の重篤な有害事象が認められた場合、治験薬提供者は治験責任医師より当該報告を受け、必要に応じて、さらなる情報の提供を求めることがで

きるものとする。

## 22.2 治験実施体制

治験実施計画書別冊を参照

## 23. 文献

1. Hirano S. Current treatment of vocal fold scarring. *Cur Opinion Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:143-7.
2. 平野 滋、平野 実. 癬痕声帯の治療の現状と可能性. *喉頭* 15:1-10,2003
3. 平野 滋 : 癬痕声帯と嗄声. *JOHNS* 22:571-575,2006.
4. 平野 滋 : 声帯癬痕治療の現状と可能性－再生医学的アプローチの可能性－*喉頭* 16:96-101,2004.
5. 平野 滋 : 声帯癬痕の治療戦略. *日気食* 58:161-162,2007.
6. Tsunoda K, Kondou K, Kaga K, Niimi S, Baer T, Nishiyama K, Hirose H. Autologous transplantation of fascia into the vocal fold: Long-term result of type-1 transplantation and the future. *Laryngoscope* 2005;115(Part 2) Suppl:1-10.
7. Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, Bless DM. Characterization of Vocal Fold Scarring in a Canine Model. *Laryngoscope* 2003;113:620-627.
8. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, Bless DM. Characterization of Chronic Vocal Fold Scarring in a Rabbit Model. *J Voice* 2004;18:116-24.
9. Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope* 2004;114:760-764.
10. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope*. 2003;113:966-972.
11. Hirano S, Minamiguchi S, Yamashita M, Ohno T, Kanemaru S, Kitamura M. Histologic characterization of human scarred vocal folds. *J Voice* 2009;23(4):399-407.
12. Hirano S, Thibeault S, Bless DM, Ford CN, Kanemaru S. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in rat and rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:661-666.
13. Hirano S, Bless D, Heisey D, Ford C. Roles of Hepatocyte Growth Factor and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Production of Extracellular Matrix by Canine Vocal Fold Fibroblasts. *Laryngoscope* 2003; 113:144-148.
14. Hirano S, Bless DM, Heisey D, Ford CN. Effect of growth factors on hyaluronan production by canine vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:617-624.
15. Hirano S, Bless DM, Massey RJ, Hartig GK, Ford CN. Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:1026-1033.
16. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, Ford CN. Prevention of Vocal Fold Scarring by Topical Injection of Hepatocyte Growth Factor in a Rabbit Model.

- Laryngoscope 2004;114:548-556.
17. Hirano S, Bless DM, Nagai H, Rousseau B, Welham NV, Montequin D, Ford CN. Growth Factor Therapy for Vocal Fold Scarring in a Canine Model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:777-785.
  18. 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.
  19. 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 hydrogel. *Laryngoscope* 2010;120:108-113.
  20. Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Restoration of scarred vocal folds using 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor. *Laryngoscope* in press
  21. Hirano S, Tateya I, Kishimoto Y, Kanemaru S, Ito J. Clinical Trial of Regeneration of Aged Vocal Folds With Growth Factor Therapy *Laryngoscope* 2012;122:327-331.
  22. 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.
  23. Suehiro A, Wright H, Rousseau B. Optimal concentration of hepatocyte growth factor for treatment of the aged rat vocal fold. *Laryngoscope*. 2011 ;121(8):1726-34.
  24. Hirano S, Mizuta M, Kaneko M, Tateya I, Kanemaru SI, Ito J. Regenerative phonosurgical treatments for vocal fold scar and sulcus with basic fibroblast growth factor. *Laryngoscope*. 2013 :123:2749-2755

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J.	Restoration of Scarred Vocal Folds Using 5 Amino Acid-Deleted Type Hepatocyte Growth Factor.	Laryngoscope		in press.	2014
Graupp M, Kiesler K, Friedrich G, Ainödhofer H, Gruber HJ, Kieslinger P, Saxena A, Hirano S, Gugatschka M.	Vocal Fold Fibroblast Response to Growth Factor Treatment is Age Dependent: Results From an In Vitro Study.	J Voice.		E-pub	2014
Gugatschka M, Ainodhofer H, Gruber H, Graupp M, Kieslinger P, Kiester K, Saxena A, Hirano S, Friedrich G.	Age effects on extracellular matrix production of vocal fold scar fibroblasts in rats.	Eur Arch Otorhinolaryngol		in press	2014
Hirano S, Mizuta M, Kaneko M, Tateya I, Kanemaru SI, Ito J.	Regenerative phonosurgical treatments for vocal fold scar and sulcus with basic fibroblast growth factor.	Laryngoscope	123	2749-2755.	2013

## Restoration of Scarred Vocal Folds Using 5 Amino Acid-Deleted Type Hepatocyte Growth Factor

Masanobu Mizuta, MD; Shigeru Hirano, MD, PhD; Satoshi Ohno, MD, PhD;  
Shin-ichi Kanemaru, MD, PhD; Tatsuo Nakamura, MD, PhD; Juichi Ito, MD, PhD

**Objectives/Hypothesis:** Our previous studies demonstrated a regenerative effect of recombinant human hepatocyte growth factor (HGF) on vocal fold scarring using full-length HGF. However, clinical application has not yet been achieved because of the lack of a good manufacturing practice (GMP) for full-length HGF. Another natural form of human HGF, 5 amino acid-deleted type HGF (dHGF), has been newly produced under a GMP procedure. In the current study, we investigated the effect of dHGF in comparison with full-length HGF for the treatment of vocal fold scars using a canine model.

**Study Design:** Prospective animal experiment.

**Methods:** The vocal folds of nine beagles were unilaterally injured. Four weeks after injury, the vocal folds were treated with an intracordal injection of full-length HGF (full HGF group), dHGF (dHGF group), or phosphate-buffered saline (sham group). Vibratory and histological examinations were performed for each group 6 months after injury.

**Results:** Vibratory examinations demonstrated significantly lower phonation threshold pressure and a higher ratio of normalized mucosal wave amplitude in both the full HGF and dHGF groups as compared to the sham group. Histological examination showed restoration of hyaluronic acid in both the full HGF and dHGF groups as compared to the sham group. No significant differences were observed for each parameter between the full HGF group and the dHGF group.

**Conclusions:** dHGF showed the same potential for regenerative effects on vocal fold scars as full-length HGF. dHGF should be applicable for human clinical trials in patients with vocal fold scars.

**Key Words:** Vocal fold scarring, 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor.

**Level of Evidence:** NA

*Laryngoscope*, 124:E81–E86, 2014

### INTRODUCTION

The vocal fold has an ideal viscoelasticity that enables rapid mucosal vibration to produce sounds. Vocal fold scars develop as a consequence of injury and inflammation of the mucosa, which causes the folds to stiffen and difficulties in vibration.<sup>1</sup> Once the vocal fold is scarred, severe dysphonia or aphonia occurs. Previous histological studies using animals and humans revealed increased deposition of disorganized collagen, a reduction of hyaluronic acid, elastin, decorin, and fibromodu-

lin, and an increase of fibronectin.<sup>2–6</sup> Thick collagen deposition and loss of hyaluronic acid (HA) are regarded as particularly detrimental and need to be addressed in the treatment of vocal fold scars.

Hepatocyte growth factor (HGF) was originally identified and cloned as a potent mitogen for mature hepatocytes.<sup>7,8</sup> It is multipotent and is able to regenerate several organs and tissues due to its strong angiogenic, antifibrotic, and antiapoptosis activities.<sup>7,8</sup> Human HGF has two natural forms: one is full-length HGF composed of 697 amino acid residues and the other is a 5 amino acid-deleted type HGF (dHGF), which lacks the F-L-P-S-S amino acid residues in the first kringle domain.<sup>7,9,10</sup> We have demonstrated that full-length HGF stimulates protein production and gene expression of extracellular matrix molecules in the vocal fold mucosa.<sup>11–16</sup> Specifically, full-length HGF stimulates HA and matrix metalloproteinase-1 synthesis by fibroblasts in the vocal folds. This function is regarded as having a therapeutic potential for treatment of vocal fold scars. In addition, our previous animal experiments demonstrated that locally applied full-length HGF improves the vibratory properties of scarred vocal folds. There was restoration of histology including digestion of collagen and deposition of HA.<sup>17,18</sup> We also confirmed that delivery of full-length HGF with a gelatin hydrogel strengthened the regenerative effects, even for chronic scars of the vocal fold.<sup>19, 20</sup> Together, these findings demonstrate the

From the Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery (M.M., S.H., S.-I.K., J.I.), Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; Department of Otolaryngology (S.O.), Wakayama Red Cross Hospital, Wakayama, Japan; Department of Regenerative Treatment for Tympanic Membrane (S.-I.K.), The Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan; Department of Otolaryngology (S.-I.K.), Kitano Hospital, Tazuke Kofukai Medical Research Institute, Osaka, Japan; Department of Bioartificial Organs (T.N.), Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication August 26, 2013.

This study was supported by the Advanced Research for Medical Products Mining Program of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

The authors have no other funding, financial relationships, or conflicts of interest to disclose.

Send correspondence to Shigeru Hirano, MD, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.  
E-mail: hirano@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

DOI: 10.1002/lary.24413



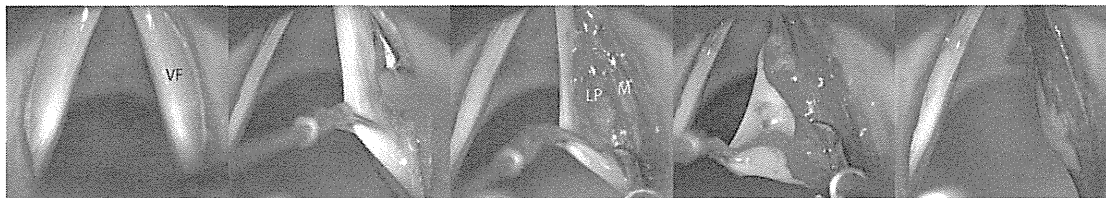


Fig. 1. Surgical procedure. The vocal folds were unilaterally scarred by stripping the entire layer of the lamina propria down to the muscle under a direct laryngoscope. LP = lamina propria; M = muscle; VF = vocal fold. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

regenerative effects of full-length HGF on vocal fold scars. However, clinical application has not yet been achieved because of a lack of a good manufacturing practice (GMP) for full-length HGF.

Recently, recombinant human dHGF has been produced by a GMP procedure. It was confirmed that dHGF has the same biological activities as full-length HGF, and it was slightly more potent under specific conditions.<sup>10</sup> However, it is unclear whether dHGF has the same effects on vocal fold scars as full-length HGF. In the current study, we examined the regenerative effects of dHGF on scarred vocal folds using a canine model and compared it with full-length HGF.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Nine beagles weighing 8 to 13 kg were used in this study. All experimental protocols were approved by the Animal Committee of the Graduate School of Medicine, Kyoto University. Animal care was provided under the supervision of the Institute of Laboratory Animals of the Graduate School of Medicine, Kyoto University.

### Preparation of HGF Injection

Full-length recombinant human HGF (full HGF) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). dHGF was supplied by Kringle Pharma, Inc. (Osaka, Japan). Both full HGF and dHGF were diluted with phosphate-buffered saline containing 0.5 % human serum albumin to avoid adsorption loss.

### Surgical Procedure

The surgical procedures that were used for generating vocal fold injuries have been established in previous studies.<sup>17,19,20</sup> All animals were sedated under general anesthesia with an intramuscular injection of ketamine hydrochloride (15 mg/kg) and xylazine hydrochloride (6 mg/kg). The glottis was visualized using a direct laryngoscope and the vocal folds were unilaterally scarred by stripping the entire layer of the lamina propria down to the muscle with microscissors and microforceps (Fig. 1). The contralateral vocal folds were kept intact as normal controls. The sides for scarring were randomly selected.

### Injection Procedure

At 4 weeks after the initial injury, the scarred vocal folds were treated with a transcordal injection of one of three different materials: 1) full HGF (full HGF group, 0.5 mL, 1  $\mu$ g/mL), 2) dHGF (dHGF group, 0.5 mL, 1  $\mu$ g/mL), or 3) phosphate-buffered saline (sham group, 0.5 mL). The same injection was

repeated twice with an interval of 1 week between injections for each group.

Experimental animals were euthanized 6 months after the initial injury. They were sedated as described above and euthanized with an intracardiac injection of pentobarbital sodium (25 mg/kg). Larynges were harvested immediately and used for vibratory examinations and were subsequently subjected to histological examination.

### Vibratory Examination of Excised Larynges

Vocal fold vibrations were examined using an excised larynx setup described in previous studies.<sup>20</sup> For better visualization of the vocal fold, supraglottic structures such as the epiglottis, false vocal folds, and aryepiglottic folds were removed after resection of the superior portion of the thyroid cartilage. The arytenoid cartilages were sutured together, and an arytenoid adduction procedure was performed bilaterally using 3-0 Prolene to close the glottis. Once the larynx was mounted, an endotracheal tube was inserted and clamped to prevent air leaks. Air was pumped through the tube to generate vocal fold vibrations. Larynges were irrigated with saline throughout the experiment to keep the vocal folds moist. A high-speed digital imaging system (Memrecam Ci; NAC Image Technology, Osaka, Japan) was used to record vocal fold vibrations from the superior view. The camera was mounted 50 cm above the larynx, and the image was displayed on a monitor. The images were recorded at a frame rate of 2,000 to 4,000 frames per second, and the images were then scanned into a computer (Fig. 2).

Phonation threshold pressure (PTP) was used as one of the functional parameters of the mucosal vibration. PTP, which is regulated by factors such as vocal fold thickness, property, and glottal width, was defined as the minimum amount of subglottal pressure required to initiate vocal fold oscillation. Further, the amplitude of the mucosal wave was measured to evaluate the mucosal vibration and elasticity of the vocal fold structures, namely the lamina propria, using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (Fig. 3). The distance (d1) from the midline of the glottis to the edge of the vocal fold was measured at the anteroposterior middle portion of the vocal fold during the closed phase. The closed phase was determined based on the motion of the upper and lower lips of the vocal folds. The same distance (d2) was measured at the maximum open phase. The mucosal wave amplitude was defined by subtracting d1 from d2 and was normalized by dividing the subtracted digit by the anteroposterior length of the glottis (L), which was measured from the anterior commissure to the vocal process. The following formula was used: normalized mucosal wave amplitude (NMWA) = (d2 - d1)/L.

To compare the NMWA of the treated side with the normal side, we calculated the ratio of the NMWA. The following formula was used: the ratio of NMWA = (NMWA of the treated vocal fold)/(NMWA of the control vocal fold, contralateral side).

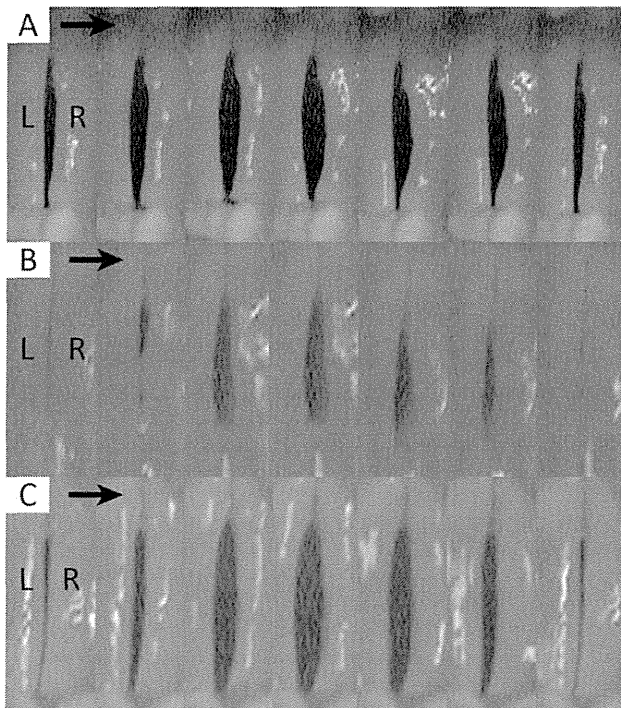


Fig. 2. Digital high-speed images of vocal fold vibratory patterns during vibratory examination of the excised larynx. (A) Sham group. (B) Full-length hepatocyte growth factor (full HGF) group. (C) 5 amino acid-deleted type HGF (dHGF) group. The full HGF-treated vocal folds and dHGF-treated vocal folds showed better mucosal vibration and a smaller glottal gap during the closed phase than the sham-treated vocal folds. L = normal side; R = treated side.

Normalized glottal gap (NGG) was calculated to evaluate glottis closure during the closed phase. The glottal gap area ( $a$ ) was measured using ImageJ software and was normalized by dividing it by  $L^2$ . The following formula was used:  $NGG = a/L^2 \times 100$ .

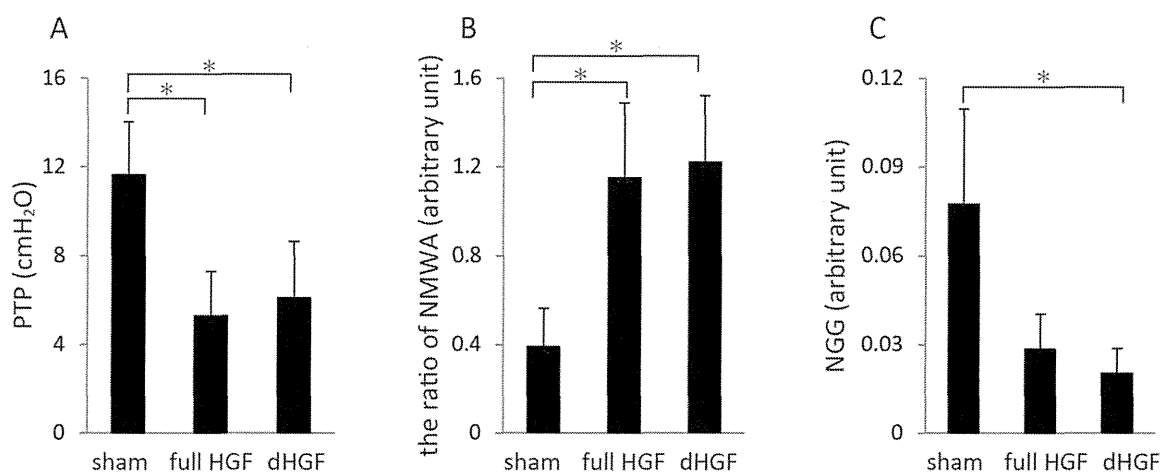


Fig. 3. Results of the vibratory examinations. The full hepatocyte growth factor (HGF) group and the 5 amino acid-deleted type HGF (dHGF) group showed significantly lower phonation threshold pressure (PTP) (A) and a higher ratio of normalized mucosal wave amplitude (NMWA) (B) than the sham group. The dHGF group showed a smaller normalized glottal gap (NGG) (C) than the sham group. No significant differences were observed for each parameter between the full HGF group and the dHGF-treated group. \*Significant difference ( $P < .05$ ) compared to the sham-treated group (one-way factorial analysis of variance, post hoc Scheffé test).

### Histological Examination

After vibratory examination, the larynges were fixed in 10% formaldehyde for tissue examination. Larynges were subsequently embedded in paraffin, and 5- $\mu$ m-thick serial sections were prepared in the coronal plane from the anteroposterior middle portion of the vocal folds. Elastica van Gieson staining was performed to identify collagen and elastin. Alcian blue staining was performed on serial sections with or without hyaluronidase digestion to identify HA. Images were captured with a Biorevo BZ-9000 microscope (Keyence Corp., Osaka, Japan). The sections were examined at 4 $\times$  to 40 $\times$  magnification. On Alcian blue-stained sections, the blue-stained areas of the lamina propria were measured using software that automatically measures an area with a designated color threshold (Biorevo BZ-H1C and BZ-H1M; Keyence Corp.). The color threshold was designated by the examiner. The ratio of the stained area to the total area of the lamina propria was then calculated for each section. The amount of HA in the lamina propria was determined by subtracting the ratio of the blue-stained area of the section with hyaluronidase digestion from that of an adjacent section without digestion.<sup>21</sup> These assessments were performed in a blinded fashion, in which the examiners were not informed of the group to which each slide belonged.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using one-way factorial analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Scheffé test. Statistical significance was defined as  $P < .05$ .

## RESULTS

### Vibratory Examination of Excised Larynges

In digital high-speed images of vocal fold vibratory patterns during vibratory examination, the injured vocal folds in the full HGF group and the dHGF group showed better vibration than the sham-treated vocal folds, which had limited vibratory movement (Fig. 2). The vocal folds of the full HGF and dHGF groups resembled the normal vocal folds on the contralateral side.

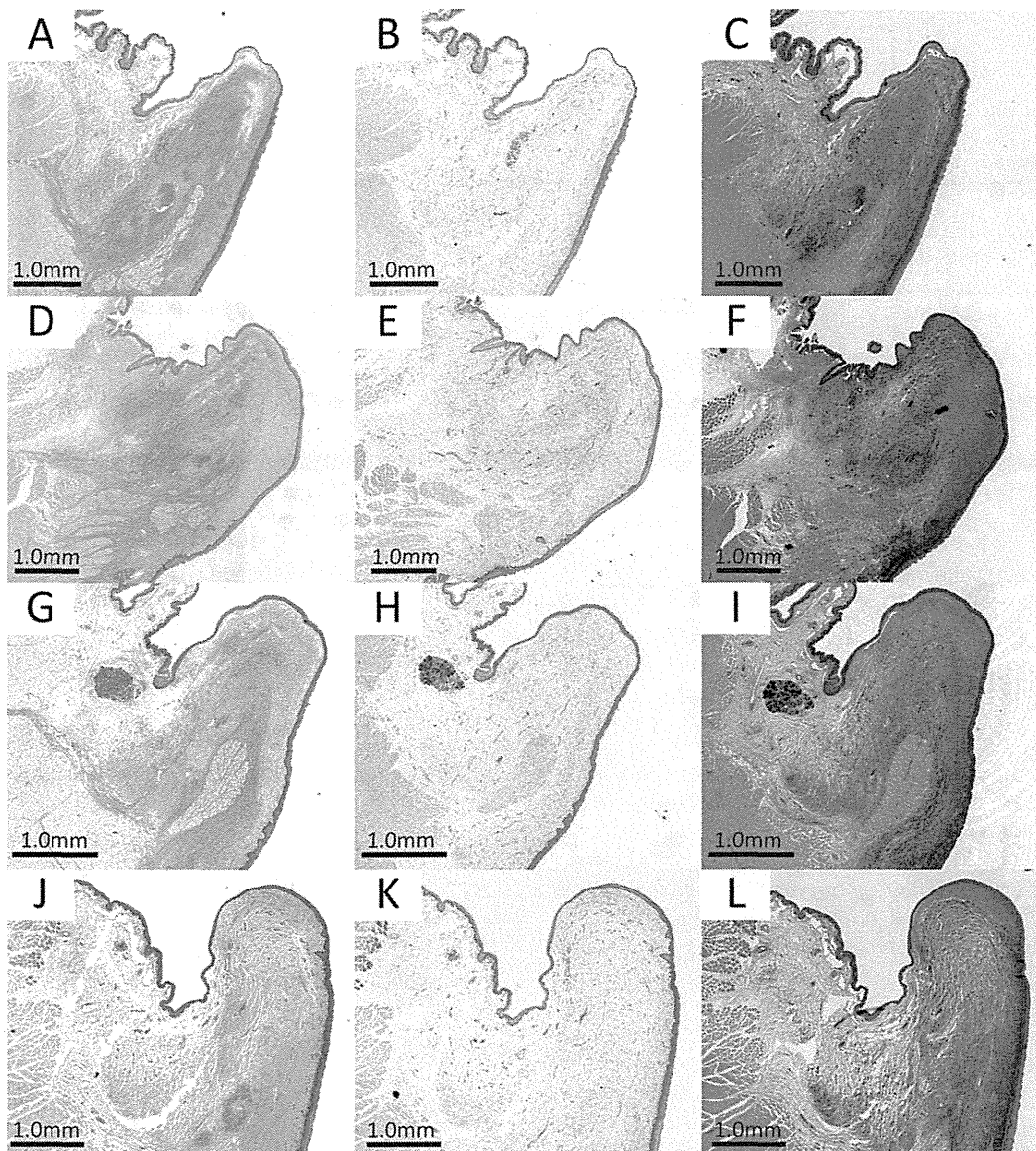


Fig. 4. Histological findings (coronal sections of vocal folds). Alcian blue staining without hyaluronidase digestion (A, D, G, J) and with hyaluronidase digestion (B, E, H, K), and Elastica van Gieson staining (C, F, I, L) of the normal group (A, B, C), the sham-treated group (D, E, F), the full hepatocyte growth factor (HGF)-treated group (G, H, I), and the 5 amino acid-deleted type HGF (dHGF)-treated group (J, K, L). The full HGF-treated group and the dHGF-treated group showed restoration of hyaluronic acid compared to the sham-treated group. Collagen deposition (purple in Elastica van Gieson staining) of the full HGF-treated group and the dHGF-treated group was minimal compared to the sham-treated group. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

Both the full HGF group and the dHGF group showed significantly lower PTP (Fig. 3A) and a higher ratio of NMWA (Fig. 3B) than the sham group. The full HGF group showed significantly smaller NGG (Fig. 3C) than the sham group. No significant differences were observed for each parameter between the full HGF group and the dHGF group.

### Histological Examination

Alcian blue staining and the hyaluronidase digestion technique (Fig. 4) showed that deposition of HA in sham-treated vocal folds was reduced compared to the normal folds. Both the full HGF group and the dHGF group showed better restoration of HA, which resembled

normal folds, than the sham-treated folds, although no significant difference was observed for the ratio of HA among the three groups (Fig. 5). The results also indicated better recovery of HA in the dHGF group than the full HGF group, although the difference did not reach statistical significance.

Elastica van Gieson staining showed that collagen deposition in both the full HGF group and the dHGF group was minimal compared to the sham group.

### DISCUSSION

Human HGF has two natural forms: full-length HGF and dHGF. Nucleotide sequence analysis of cDNA clones for human HGF has demonstrated that HGF

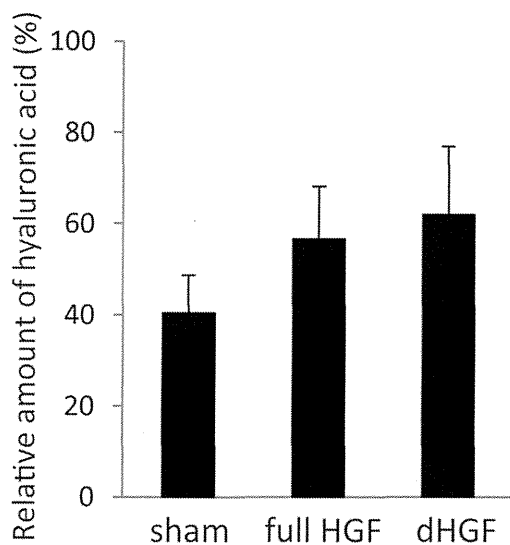


Fig. 5. The relative amount of hyaluronic acid. No significant difference was observed in the relative amount of hyaluronic acid among the three groups, although there was a tendency that the 5 amino acid-deleted type HGF (dHGF)-treated group showed a higher amount of HA compared to the sham-treated group and the full hepatocyte growth factor (HGF)-treated group.

consists of six major domains including a hairpin region and four kringle domains in the alpha chain, and a serine protease-like domain in the beta chain. dHGF lacks 5 amino acids in the first kringle domain compared to full-length HGF.<sup>7,9,10</sup> We have confirmed the regenerative effects of HGF on vocal fold mucosa in several animal studies including rats, rabbits, and canines using full-length HGF. These findings demonstrate the regenerative effects of full-length HGF on vocal fold scars and suggest that clinical trials are warranted, but this has been hampered by the lack of GMP-compatible full-length HGF.

Recently, recombinant human dHGF was produced by Chinese hamster ovary cells transfected with human dHGF cDNA under a GMP procedure. It has been suggested that the deletion of five amino acids in the first kringle domain might affect the biological activity of HGF.<sup>10</sup> However, it was reported that dHGF had higher mitogenic activity than full HGF for rat hepatocytes.<sup>10,22</sup> Furthermore, Shima et al.<sup>10</sup> investigated the differences between the biological activities of full HGF and dHGF in an in vitro study and reported that dHGF was more potent than full HGF for the stimulation of DNA synthesis in epithelial cells, whereas full HGF was more potent than dHGF in the stimulation of DNA in mesenchymal cells. However, it is widely recognized that both full HGF and dHGF have similar biological activities. Most experimental animal studies that examine the therapeutic effects of HGF in various diseases have been conducted using recombinant human dHGF. Moreover, clinical trials of recombinant HGF for the treatment of kidney disease and amyotrophic lateral sclerosis are currently in process using recombinant dHGF. Considering the advantage of the existence of a GMP-compatible product, we anticipate the clinical application of dHGF for the treatment of vocal fold scars.

The current study indicates a comparable activity of dHGF as full HGF. A dHGF injection to scarred vocal folds resulted in improvement of PTP, mucosal wave, and glottis competence. PTP is a marker that indicates the viscoelasticity of the tissues, because stiffer tissues require more pressure to be vibrated. Reduction of PTP means restoration of pliability of the mucosa. Consequently, the mucosal wave amplitude tended to become larger with complete glottic closure, which is similar to normal vocal fold vibrations. Only the dHGF group showed a statistically significant difference in glottic closure (NGG) as compared to the sham group.

The histological examinations demonstrated restoration of HA and reduction of collagen deposition in both the dHGF and full HGF groups. Because HA is regarded as a critical molecule to maintain ideal viscoelasticity of the vocal folds, restoration of HA is thought to be important to recover mucosal vibratory potency. There was a trend that dHGF induced more HA deposition as compared to full HGF, although there was no significant difference between the two HGFs, probably because of the small number of animals used in this study.

The current results are encouraging because dHGF generated at least the same power of regeneration of vocal fold scars as full HGF. dHGF shows promise for use in human clinical trials in patients with vocal fold scars using the GMP product currently used in other clinical trials.

## CONCLUSION

dHGF showed a comparable potential for regenerative effects on vocal fold scarring as full HGF in terms of improvement of phonation threshold pressure, mucosal wave amplitude, glottis competency, as well as at the histological level. It is highly desirable to confirm the efficacy of dHGF as a GMP product in human clinical trials for patients with vocal fold scars.

## BIBLIOGRAPHY

- Hirano S. Current treatment of vocal fold scarring. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:143-147.
- Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope* 2003;113:620-627.
- Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope* 2003;113:966-972.
- Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope* 2004;114:760-764.
- Rousseau B, Hirano S, Chan RW, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice* 2004;18:116-124.
- Hirano S, Minamiguchi S, Yamashita M, Ohno T, Kanemaru S, Kitamura M. Histologic characterization of human scarred vocal folds. *J Voice* 2009;23:399-407.
- Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:639-644.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 1987;224:311-316.
- Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 1998; 101:1827-1834.
- Shima N, Tsuda E, Goto M, et al. Hepatocyte growth factor and its variant with a deletion of five amino acids are distinguishable in their biological activity and tertiary structure. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200: 808-815.