

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
分担研究者 田畑 泰彦

研究要旨

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について、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とこれまでに先進医療で用いてきた細粒状ゼラチンハイドロゲルとを比較した。その結果、シート状ゼラチンハイドロゲルが、bFGF の徐放性ならびに分解性において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であることがわかった。

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指して、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、*in vitro* における bFGF の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について、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とこれまでに先進医療で用いてきた細粒状ゼラチンハイドロゲルとを比較した。

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。

〈細粒状ゼラチンハイドロゲルの作製〉

上述したシート状ゼラチンハイドロゲルを 8000 rpm で 10 分間粉碎後、凍結乾燥することによって、細粒状ゼラチンハイドロゲルを作製した。

〈*in vitro* における bFGF の徐放性〉

シート状ならびに細粒状のゼラチンハイドロゲルに対して、*in vitro* における bFGF の徐放性について比較するために、ゼラチンハイドロゲルからの bFGF 徐放試験を行った。すなわち、2 mg のゼラチンハイドロゲルに対して、クロラミン T 法により ¹²⁵I 放射ラベル化した bFGF 水溶液を 20 μl 滴下し、室温で 3 時間静置することで、¹²⁵I ラベル化 bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。得られた ¹²⁵I ラベル化 bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、37 °Cで浸漬し、経時的に上清に対する放射活性を測定することによって、bFGF の徐放性を評価した。さらに、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを 10 μg/ml のコラゲナーゼ水溶液中、37 °Cで浸漬することによって、ゼラチンハイドロゲルを分解させ、bFGF の徐放性の変化について評価した。

〈ゼラチンハイドロゲルの分解性〉

シート状ならびに細粒状のゼラチンハイドロゲルに対して、*in vitro*における分解性について比較するために、コラゲナーゼを用いたハイドロゲルの分解試験を行った。すなわち、5 mg のゼラチンハイドロゲルを PBS 中、37 °C で浸漬させ、一晚静置することにより、ゼラチンハイドロゲルを膨潤させた。次に、膨潤させたゼラチンハイドロゲルを 10 µg/ml のコラゲナーゼ水溶液中、37 °C で浸漬させ、上清を経時的に回収した。上清に対して、260 nm の吸光度を測定することによって、ゼラチンハイドロゲルから溶出したゼラチンを定量した。得られたゼラチンの溶出量を用いて、ゼラチンハイドロゲルの分解性を評価した。

C. 研究結果

〈*in vitro*における bFGF の徐放性〉

図 1 にシート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルからの *in vitro*における bFGF の徐放性を示す。図から明らかなように、コラゲナーゼ添加前では、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、30 %程度の bFGF が初期に徐放化されるが、それ以降、徐放化されないことがわかった。一方、ゼラチンハイドロゲルをコラゲナーゼ水溶液に浸漬したところ、いずれのゼラチンハイドロゲルについても、収着した bFGF が徐放化されることがわかった。

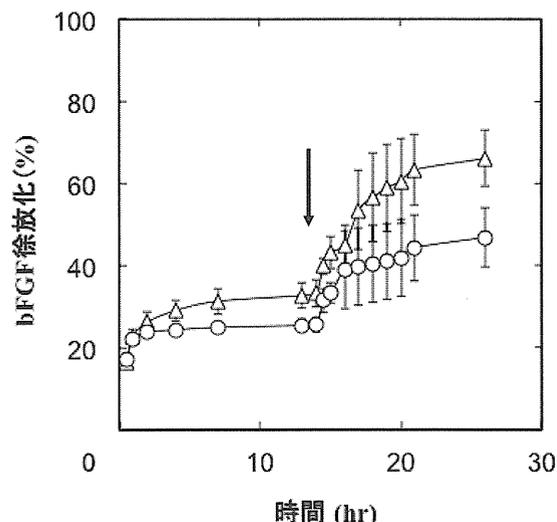


図 1 *in vitro*におけるゼラチンハイドロゲルからの bFGF の徐放性
シート状 (○)、細粒状 (△)
コラゲナーゼ水溶液の添加 (矢印)

〈ゼラチンハイドロゲルの分解性〉

図 2 にコラゲナーゼによるシート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルの分解性を示

す。図から明らかなように、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、コラゲナーゼを添加することによって 2 時間程度でゼラチンハイドロゲルが分解されることがわかった。

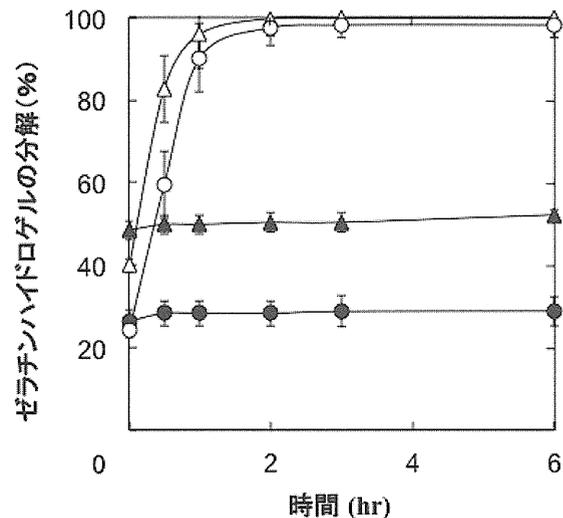


図 2 ゼラチンハイドロゲルの分解性
シート状 (○、●)、細粒状 (△、▲)
コラゲナーゼ水溶液 (白)、PBS (黒)

D. 考察

シート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルに対して、bFGF の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について評価した。その結果、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、bFGF は、ゼラチンハイドロゲルの分解とともに徐放化されることがわかった。これまでに、われわれは、細粒状ゼラチンハイドロゲルから bFGF を徐放化することによって、重傷下肢虚血疾患の再生誘導治療に成功している。本研究結果は、シート状ゼラチンハイドロゲルが、bFGF の徐放性ならびに分解性において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であることを示している。

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して、bFGF の徐放性ならびにその分解性を明らかにすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルから徐放された多血小板血漿の生物活性の評価、第 14 回日本再生医療学会総会 (2015 年 3 月 19 日～21 日、横浜)

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
分担研究者 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（総括報告書作成および論文出版）ならびに治験準備の支援を行った。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結果の取り纏め、論文化、治験における評価基準の策定等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うとともに、虚血性心疾患に応用するための臨床試験について、改訂された医学研究倫理指針に適合した試験計画の策定を支援した。

C. 研究結果

昨年度に完成、提出した、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総括報告書（治験のものに準じて作成された）において記載、解析されたデータをもとにこれを分化する支援を行った。またこの結果を踏まえ、医薬品としての承認を目指す治験について、その予定主要評価項目の妥当性を裏付ける既報論文等の資料収集とその論文化に向けた支援を行った。

難治性下肢虚血に対する臨床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、安全性等必要となる非臨床データの取得ならびに改訂後の医学研究倫理指針に沿った試験計画の立案を支援した。

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とともに、適切な支援活動は必須であることを再認識できた。

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り、本研究によりその実をあげつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumagai, M., Marui, A., Tabata, Y., Takeda, T., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Tanaka, S., Yanagi, S., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Murayama, T., Teramukai, S., Katsura, T., Matsubara, K., Kawakami, K., Yokode, M., Shimizu, A. and Sakata, R. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart and Vessels* **30** 2015 online, doi 10.1007/s00380-015-0677-x.
2. Nakagawa, T., Kumakawa, K., Usami, S., Hato, N., Tabuchi, K., Takahashi, M., Fujiwara, K., Sakaki, A., Komune, S., Sakamoto, T., Hiraumi, H., Yamamoto, N., Tanaka, S., Tada, H., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Shimizu, A., Tabata, Y. and Ito, J. A randomized control clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med.* 2014 **12**, 219.
3. Ohashi, S., Kikuchi, O., Tsurumaki, M., Nakai, Y., Kasai, H., Horimatsu, T., Miyamoto, S., Shimizu, A., Chiba, T. and Muto, M. Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2014 **9** e103126.
4. Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebpb deficiency. *J. Biomed Sci* 2014 **21** 44.
5. Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.,

Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation. *PLoS ONE* 2014 **9** e96938.

6. Ariyasu, H., Iwakura, H., Yukawa, N., Murayama, T., Yokode, M., Tada, H., Yoshimura, K., Teramukai, S., Ito, T., Shimizu, A., Yonezawa, A., Kangawa, K., Mimori, T. and Akamizu, T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocrine J.* 2014 **61** 735-742.
7. Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.* 2014 **289**, 1564-1579.

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

特になし

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
分担研究者 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」の実施経験に基づき、大学間の連携推進がもたらす臨床研究の推進への役割につき検証を行った。

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」の実施経験に基づき、大学間の連携推進の意義につき、京都大学が構築している「開花プロジェクト」参加大学との意見交換を通して検証をおこなうことである。

B. 研究方法

「開花プロジェクト」参加大学（岐阜大学、滋賀医科大学、長崎大学、大阪市立大学、福井大学、和歌山県立医科大学、鳥取大学、京都府立医科大学、山口大学、三重大学、岡山大学、徳島大学、鹿児島大学、熊本大学、奈良県立医科大学）と合同で平成 26 年度に集合形式の情報交換会を 1 回、インターネット回線による遠隔会議を全体会議として 5 回、特定のテーマにつき 3 回開催した。さらに参加大学において、本プロジェクトに関する講演を 10 大学で実施し、その中で多数寄せられた意見、質問を抽出した。さらにその結果として得られた成果につき解析した。

(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

参加大学からは ICH-GCP 準拠の臨床研究を実施する上での情報共有、平成 27 年 4 月 1 日施行予定の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に対する準備に関する情報提供要請、各機関において臨床研究を実施・運営するための経費獲得に関する現状報告と情報交換の必要性などが多く寄せられた。

研究費に関しては、参加大学と京都大学の連携により、日本医師会治験促進センターの A 研究(治験の計画に関する研究)、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)、橋渡しシーズ C、それぞれ各 1 件を本プロジェクトの連携により獲得することができた。

D. 考察

わが国ではこれまで早期探索的臨床試験拠点、臨床研究品質確保体制整備病院などの整備が進んできたが、平成 27 年度に予定されている医療法に基づく臨床研究中核病院制度においては、拠点となる医療機関と他の機関の連携強化をさらに推進することが求められており、今回の「開花プロジェクト」での意見交換、情報共有に加えて、拠点以外の大学の研究費の獲得を含めた臨床研究の展開を促進すると期待される。

E. 結論

「開花プロジェクト」に参加する大学間の連携は意見交換、情報共有を通じた各施設の臨床研究の基盤構築推進と共に、研究費獲得などを通じて更なる研究の発展につながることを期待できると考えられた。

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;71:1181-1186.
- 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;74:64-65.
- 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;49:653-659.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;44:432-433.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin augments the expression of Adenomatous Polyposis Coli protein by suppression of IKK β . *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 446(2):460-464.
- 2) 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.

- 3) Ariyasu H, Iwakura H, Yukawa N, Murayama T, Yokode M, Tada H, Yoshimura K, Teramukai S, Ito T, Shimizu A, Yonezawa A, Kangawa K, Mimori T, Akamizu T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocr J*. 2014;61(7):735-742.
- 4) Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions. *Sci Rep*. 2014;4:5094.
- 5) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci Rep*. 2014;4:5312.
- 6) Tsusaka T, Guo T, Yagura T, Inoue T, Yokode M, Inagaki N, Kondoh H. Deacetylation of phosphoglycerate mutase in its distinct central region by SIRT2 down-regulates its enzymatic activity. *Genes Cells*. 2014;19(10):766-777.
- 7) Mikawa T, LLeonart ME, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci*. 2015.
- 8) Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism. *Circ J*. 2015.

2. 学会発表

国際会議

- 1) Yasui M, Minami M, Yokode M. Role of EP4 signaling in obesity-related inflammation (Poster presentation). The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014), 4.14-17 (4.14), 2014, Kyoto, Japan.

- 2) Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto.
- 3) Yasui M, Minami M, Yokode M. EP4 receptor regulates obesity-related Inflammation and insulin sensitivity (Poster presentation). The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA 2014), 9.12-14 (9.13), 2014, Kyoto, Japan.
- 4) Fujikawa R., Minami M, Higuchi S, Yasui M, Ikedo T, Nagata M, Yokode M. EP4 receptor-associated protein (EPRAP) in microglia promotes inflammation in the brain. (Poster presentation). Neuroscience2014 (Annual Meeting of Society for Neuroscience), 11.15-19 (11.18), 2014, Washington, DC, USA.
- 5) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b Knock-in Mice for an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1 (Srebf1) Exhibit Reduced HDL-C in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois.

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

国内会議

- 1) 安井 美加、南 学、横出 正之. 肥満による脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性におけるEP4受容体の役割 第37回 日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日(11月26日) 横浜.
- 2) 藤川 理沙子、南 学、樋口 聖、横出 正之. EPRAP欠損マウスは行動異常を示す ブレインサイエンス研究会、2014年6月28-29日 沖縄.
- 3) 藤川 理沙子、樋口 聖、南 学、安井 美加、池堂 太一、永田 学、横出 正之. EPRAP exerts anti-inflammatory effects through dephosphorylation by PP2A 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18-20日 愛知.

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
分担研究者 森田 智視

研究要旨

重症下肢虚血治療に関する治験の主要評価項目として、経皮的酸素分圧(TcO₂)の妥当なカットオフ値の検討をメタアナリシスにより行った。結果として、TcO₂<30mmHgが下肢切断回避率と最も関連があると示唆された。

A. 研究目的

重症下肢虚血治療に関する治験の主要評価項目として、経皮的酸素分圧(TcO₂)を下肢切断回避率の代替指標(サロゲートマーカー)として使用する際に、そのカットオフ値に関する二つの世界的なガイドラインの記述(30 or 35 mmHG)に加えて、統計学的にもカットオフ値の検討を行う事を目的とした。

B. 研究方法

TcO₂に対する3つのカットオフ値(20, 30, 40 mmHg)に関して文献的検索によって収集した複数の論文からデータを収集し、diagnostic odds ratio(DOR)に対するDerSimonian and Laird(1986)法によるメタアナリシスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は文献データに基づく統計学的解析であるために倫理面には問題ない。

C. 研究結果

収集された文献は、カットオフ値=20 に関しては13文献、カットオフ値=30、40 に関しては12文献であった。統合された対数DORは、カットオフ値=20、30、40 それぞれに対し、1.61(95%CI: 0.73-2.49)、2.07(95%CI: 1.17-2.97)、1.67(95%CI: 1.05-2.29)となり、カットオフ値=30 で一番高い値を示した。

D. 考察

統合する指標に関しては複数存在するが、本研究では一元的に評価でき、多くの研究で用いられているDORをした。また、文献数に関しては、TcO₂と下肢切断回避率を同時に評価している文献は少なく、本研究で用いた文献数が限界である。しかし、ガイドラインの補助としてこの解析結果を位置づけているので、本研究の方法によって得られた結果は価値があると考えられる。

E. 結論

重症下肢虚血の評価において、下肢切断回避率の代替指標としてTcO₂<30mmHgを用いる事は妥当であると考えられる。

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
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、治験薬 GMP 管理の適合性について外部評価を受け、適合するとの判定を受けたが、より適切かつ信頼度の高い製造を行うために、外部評価の際に指摘された事項にもとづき、製造施設の改善および手順書の改訂を行った。また、次年度製造予定のゼラチンハイドロゲル製造における教育訓練を行った。

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。

昨年度、治験薬 GMP 管理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」と評価を受けたが、自立化に向けた研究支援基盤の確立のため、外部評価の際に指摘された「軽度の不備事項」について検討・改善し、治験薬 GMP 対応製造施設としてのさらなる充実を図る。また、日本薬局方改訂に伴う手順書を改訂する。さらに次年度の製造に向けて、教育訓練を行う。

B. 研究方法

1. 元 PMDA・GMP エキスパート（査察官）による治験薬 GMP 調査の監査報告書（図 1）において、「軽度の不備事項」として指摘された部分について、修正可能か否か検討を行い、製造施設（ハード）の整備

や手順書（ソフト）の改訂を適宜行った。

また日本薬局方改正に伴い、衛生管理手順書についても改訂した。

2. 次年度、ゼラチンハイドロゲルを使用した新たな臨床試験が予定されているため、ゼラチンハイドロゲル使用量に応じたエンドトキシン規格値の設定や、製造のための教育訓練などを行った。

（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

治験薬 GMP 調査の監査報告書（図 1）において、ハード面で指摘されたのは 4 点であった。それぞれ、図 2 のような対応をすることとし、②に関しては手順書を改訂した。また、ソフト面で指摘された 5 点であり、それぞれ図 2 のような対応をすることとし、②と③に関してはそれぞれ手順書を改訂した。

さらに日本薬局方第 16 改正にもとづき、区別評価方法の記載等を修正し、衛生管理手順書第 5 版を発行した。

また次年度の製造に向けて、ゼラチンハ

イドロゲルの教育訓練を3回行った(プロセスバリデーション含む)。また、ゼラチンハイドロゲル使用量に応じたエンドトキシン規格値や無菌試験についても、日本薬局方第16改正にもとづいて設定し、SOPを作成した。

2014年2月24日

京都大学医学部付属病院薬学部中
元PMDA GMPエキスパート(査察官)
宮本 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学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、半日の検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。

1. 一般事項

1. 目的
貴京都大学医学部付属病院薬学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学部
所在地: 京都市左京区聖護院日原町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 望謙
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たため、以下に示す。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「出荷判定手順書」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。PIC/S GMPを参考してください。

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PIC/S GMP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(ヒポクリンとエタノール、ザルコンとエタノール)を使用しているのはPIC/S GMP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。
4) ハード面・ソフト面で行った改善点があるので、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していただきました梶原望謙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を申し上げます。

軽度の不備事項に対する対応

2014年9月18日

<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。
●対応: 次回のバリデーションから、発行を依頼することとした。
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。
●対応: 「清掃状態の確認」をチェックすることを文書及び機器使用記録書を手順書に加え、分析天びん(3P205DRV)及びBT-P42プリンタ(BT-P42)の取扱い及び保守・点検に関する手順書を改訂した。
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。
●対応: 「いつの、どこの手順書からの抜粋かが不明」というのが意図であり、必ずしも日付とサインをする必要はないと判断した。なお、手順書の出典がわかるよう、手順書名と版数がヘッダーに入ったものに「写」の判子を押して掲示し直した。
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)
●対応: 取り扱い説明書名と「写」の判子を押して掲示し直した。(③と理由は同じ)

<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。
●対応: 次回の製造(教育訓練)から記録者(製造部門)がすることとした。
②「治験薬製造品質試験記録書」の試験成績書(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。
●対応: 次回の治験薬製造で品質試験を行った際に、試験成績書が発行されてから確認者(品質部門)がすることとした。また、治験薬品質管理手順書を改訂し、試験成績書に確認日を記入し署名する手順を加えた。
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「出荷判定手順書」に出荷の可否を判定するという文書を加えること。
●対応: 手順書に出荷の可否を判定する文書を加え、出荷判定手順書を改訂した。
④「逸脱管理手順書」にフローチャート図を添付すること。
●対応: 文書のみで説明可能と判断し、添付しないこととした。
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。PIC/S GMPを参考にしてください。
●対応: 治験薬GMPの範疇ではチェック内容は網羅しており、改訂不要と判断し改訂しないこととした。

図1. 監査報告書

図2. 指摘事項に対する対応

D. 考察

昨年度、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。しかしながら、治験薬GMP管理の製造施設としての更なる充実を図るために、「軽度の不備事項」として指摘された部分についても適宜修正・改善し、手順書も3通改訂した。さらに、日本薬局方第16改正にもとづいた衛生管理手順書も改訂した。これにより、治験薬GMP管理にもとづく院内製造施設としてより充実させることができ、自立化に向けた研究支援基盤を確立できたと考えられる。また、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。

次年度の製造に向けて、ゼラチンハイドロゲルの教育訓練を3回行い、またエンド

トキシン規格値や無菌試験の SOP を作成することで製造の準備も完了しており、次年度はより早期に製造することが可能となったと考えられる。

E. 結論

本施設の治験薬 GMP への適合性がより強固となり、研究成果の信頼性が確保された。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。

F. 研究発表

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧

1. Kumagai M, Marui A, Tabata Y, Takeda T, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Yanagi S, Ito-Ihara T, Ikeda T, Murayama T, Teramukai S, Katsura T, Matsubara K, Kawakami K, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels* in press.
2. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with end-stage renal disease requiring dialysis (5-year outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol*. 2014;114:555-61
3. Minakata K, Bando K, Tanaka S, Takanashi S, Konishi H, Miyamoto Y, Ueshima K, Yasuno S, Ueda Y, Okita Y, Masuda I, Okabayashi H, Yaku H, Okamura Y, Tanemoto K, Arinaga K, Hisashi Y, Sakata R. Preoperative chronic kidney disease as a strong predictor of postoperative infection and mortality after coronary artery bypass grafting. *Circ J*. 2014;78:2225-31
4. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Comparison of five-year outcomes of coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular ejection fractions $\leq 50\%$ versus $>50\%$ (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol*. 2014;114:988-96
5. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Three-year outcomes after percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting in patients with heart failure: from the CREDO-Kyoto percutaneous coronary intervention/coronary artery bypass graft registry cohort-2. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015;47:316-21
6. 丸井 晃, 坂田 隆造. 【低心機能例に対する血行再建(PCI vs CABG)】 低左心機能例に対する血行再建 PCI vs CABG わが国でのレジストリーデータを含むこれまでのエビデンス. *日本冠疾患学会雑誌*. 2014;20:67-74
7. Nakagawa, T., Kumakawa, K., Usami, S., Hato, N., Tabuchi, K., Takahashi, M., Fujiwara, K., Sakaki, A., Komune, S., Sakamoto, T., Hiraumi, H., Yamamoto, N., Tanaka, S., Tada, H., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Shimizu. A., Tabata, Y. and Ito, J. A randomized control clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med*. 2014 **12**, 219.
8. Ohashi, S., Kikuchi, O., Tsurumaki, M., Nakai, Y., Kasai, H., Horimatsu, T., Miyamoto, S., Shimizu. A., Chiba, T. and Muto, M. Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated

- photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2014 **9** e103126.
9. Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in *Cebpb* deficiency. *J. Biomed Sci* 2014 **21** 44.
 10. Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation. *PLoS ONE* 2014 **9** e96938.
 11. Ariyasu, H., Iwakura, H., Yukawa, N., Murayama, T., Yokode, M., Tada, H., Yoshimura, K., Teramukai, S., Ito, T., Shimizu, A., Yonezawa, A., Kangawa, K., Mimori, T. and Akamizu, T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocrine J.* 2014 **61** 735-742.
 12. Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.* 2014 **289**, 1564-1579.
 13. Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin augments the expression of Adenomatous Polyposis Coli protein by suppression of IKK β . *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 446(2):460-464.
 14. 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.
 15. Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M., Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions. *Sci Rep.* 2014;4:5094.
 16. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M., Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (*Srebf1*) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci Rep.* 2014;4:5312.
 17. Tsusaka T, Guo T, Yagura T, Inoue T, Yokode M., Inagaki N, Kondoh H. Deacetylation of phosphoglycerate mutase in its distinct central region by SIRT2 down-regulates its enzymatic activity. *Genes Cells.* 2014;19(10):766-777.
 18. Mikawa T, LLeonart ME, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M., Kondoh H. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci.* 2015.

19. Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T.
MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism. Circ J. 2015.

著書

20. 丸井 晃, 坂田 隆造. 心血管外科 左主幹部・3枝病変の冠血行再建術 PCI vs CABG.
Annual Review 循環器. 2014:270-281
21. 坂田 隆造. 【臨床医学の展望 2014】 心臓血管外科学 複雑冠動脈病変では CABG が標準治療に. 日本医事新報. 2014;4685:32-33

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia

Motoyuki Kumagai¹ · Akira Marui^{2,3} · Yasuhiko Tabata⁴ · Takahide Takeda^{1,3} · Masaya Yamamoto⁴ · Atsushi Yonezawa⁵ · Shiro Tanaka^{6,7} · Shigeki Yanagi⁸ · Toshiko Ito-Ihara⁹ · Takafumi Ikeda³ · Toshinori Murayama⁹ · Satoshi Teramukai¹⁰ · Toshiya Katsura⁵ · Kazuo Matsubara⁵ · Koji Kawakami^{6,7} · Masayuki Yokode⁹ · Akira Shimizu³ · Ryuzo Sakata¹

Received: 4 November 2014 / Accepted: 1 April 2015
© Springer Japan 2015

Abstract As a form of therapeutic angiogenesis, we sought to investigate the safety and efficacy of a sustained-release system of basic fibroblast growth factor (bFGF) using biodegradable gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia (CLI). We conducted a phase I–IIa study that analyzed 10 CLI patients following a 200- μ g intramuscular injection of bFGF-incorporated gelatin hydrogel microspheres into the ischemic limb. Primary endpoints were safety and transcutaneous oxygen pressure (TcO₂) at 4 and 24 weeks after treatment. During the follow-up, there was no death or serious procedure-related adverse event. After 24 weeks, TcO₂ (28.4 \pm 8.4 vs. 46.2 \pm 13.0 mmHg for pretreatment vs after 24 weeks, $p < 0.01$) showed significant improvement. Regarding secondary endpoints, the distance walked in 6 min (255 \pm 105 vs. 318 \pm 127 m, $p = 0.02$), the Rutherford classification (4.4 \pm 0.5 vs. 3.1 \pm 1.4, $p = 0.02$), the rest pain scale (1.7 \pm 1.0 vs. 1.2 \pm 1.3, $p = 0.03$), and the cyanotic scale (2.0 \pm 1.1 vs.

0.9 \pm 0.9, $p < 0.01$) also showed improvement. The blood levels of bFGF were within the normal range in all patients. A subanalysis of patients with arteriosclerosis obliterans ($n = 7$) or thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) ($n = 3$) revealed that TcO₂ had significantly improved in both subgroups. TcO₂ did not differ between patients with or without chronic kidney disease. The sustained release of bFGF from biodegradable gelatin hydrogel may offer a safe and effective form of angiogenesis for patients with CLI.

Keywords Basic fibroblast growth factor · Angiogenesis · Critical limb ischemia · Drug delivery system

Introduction

Peripheral arterial disease (PAD), often caused by atherosclerosis obliterans (ASO) or thromboangiitis obliterans (TAO) (Buerger's disease), is a common circulatory problem in which narrowed arteries reduce blood flow to limbs.

M. Kumagai and A. Marui have equally contributed to the study.

✉ Ryuzo Sakata
sakatar@kuhp.kyoto-u.ac.jp

¹ Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

² Division of Cardiovascular Surgery, Tenri Hospital, Nara, Japan

³ Department of Experimental Therapeutics, Institute for Advancement of Clinical and Translational Science, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

⁴ Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

⁵ Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

⁶ Department of Pharmacoepidemiology, Graduate School of Medicine and Public Health, Kyoto University, Kyoto, Japan

⁷ Department of Data Science, Institute for Advancement of Clinical and Translational Science, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

⁸ Department of Cardiovascular Surgery, Kumamoto Central Hospital, Kumamoto, Japan

⁹ Department of Clinical Innovative Medicine, Institute for Advancement of Clinical and Translational Science, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

¹⁰ Department of Biostatistics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

PAD can progress into critical limb ischemia (CLI), the most severe form. Among patients with CLI who are unreconstructible or in whom attempts at reconstruction fail, approximately 40 % will lose their leg within 6 months, and up to 20 % will die [1]. Although medications and surgical or endovascular revascularization help to alleviate CLI [2, 3], they have not become well-established treatment protocols for CLI patients.

Therapeutic angiogenesis (i.e., the administration of growth factor, gene therapy and cell transplantation) is a new treatment strategy designed to improve the perfusion of new blood flow to ischemic vascular beds that also attempts to reduce the damage and necrosis experienced by ischemic tissues. However, there are issues that still need to be resolved: the short half-life period of the angiogenic factors, the long-term safety [4], and the invasiveness involved in collecting the implanted cells [5]. For these reasons, no form of therapeutic angiogenesis has become a standard treatment option. Therefore, to overcome these issues, we developed a new drug delivery system (DDS) for basic fibroblast growth factor using a biodegradable acidic gelatin hydrogel.

Basic fibroblast growth factor (bFGF), first reported by Gospodarowicz [6, 7], is known to proliferate mesenchymal cells and induce neovascularization. Recombinant human bFGF has already been used clinically for the treatment of bedsores and ulcers in Japan. However, as the biological half-life of bFGF in the body is very short [3] because of rapid diffusion and enzymolysis, repeated administration is required for clinical use.

We developed a DDS for potent growth factors, such as bFGF, using biodegradable acidic gelatin hydrogel. Gelatin is a biopolymer used in many medical applications because of its nontoxic nature, as it is a water-soluble, denatured protein originating from collagen, which is the main protein component of connective tissues such as bone and skin. Because of these characteristics, our DDS is significant in terms of its simplicity and biosafety [8, 9]. We have also demonstrated the effectiveness of bFGF released from gelatin hydrogel in various animal models [10–18]. In addition, we reported the clinical application of this DDS for cases involving CLI [19].

In this study, unlike in the previous study [19], our gelatin hydrogel microspheres were made in accordance with standards of good manufacturing practice (GMP) in consideration of a future clinical trial, and this study was certified by the high-level medical care standards of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. Additionally, we previously reported the effectiveness of bFGF-incorporated gelatin hydrogel mainly in patients with TAO [19]. Unfortunately, most CLI patients suffer from severe or end-stage ASO. Thus, in the present study, we sought to investigate the safety and efficacy of bFGF-incorporated

gelatin hydrogel, mainly in patients with CLI brought on by ASO, and we evaluated the efficacy for patients with ASO or TAO separately. Since renal dysfunction is a major cause of atherosclerosis, we also investigated the respective outcomes in patients with or without renal dysfunction.

Materials and methods

Study population

We included patients with CLI (ASO or TAO), defined by symptoms of rest pain and/or ischemic foot ulcers. The patients were not candidates for catheter-based angioplasty or surgical revascularization (“no options” patients). Patients were excluded if they had any of the following characteristics: history of cell transplantation or gene therapy for CLI, malignancy, proliferative diabetic retinopathy, hemodialysis, or severe infection. The study protocol was approved by The Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine, Ethics Committee in November 2009 as C-336. This study was registered in the University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry (UMIN 000002671).

Preparation of bFGF-incorporated gelatin hydrogel microspheres

Human recombinant bFGF with an isoelectric point of 9.6 was purchased from Kaken Pharmaceutical Co (Tokyo, Japan). A gelatin sample with an isoelectric point of 5.0 was isolated from the porcine skin through the alkaline process (Nitta Gelatin Co, Osaka, Japan). Gelatin hydrogel microspheres were prepared in an aseptic room as previously described [20, 21]. Briefly, gelatin hydrogels were prepared through the glutaraldehyde cross-linking of gelatin in an aqueous solution. The resulting hydrogels were soaked in an aqueous solution of glycine for 3 h to block free aldehyde groups in the hydrogels; they were then washed with double distilled water. The aqueous solutions used here were sterilized by filtration through membrane filters with a pore size of 0.22 μm . Gelatin hydrogels were pulverized using a homogenizer. The homogenates were passed through sieves with different mesh sizes. The microspheres, with diameters ranging from 50 to 100 μm , were collected and freeze dried. After packing the microspheres in sterile glass vials, we confirmed that they were free of both residual glutaraldehyde and bacterial contamination. To incorporate bFGF into the gelatin microspheres, an aqueous solution of bFGF (200 μg) was applied to the freeze-dried microspheres (100 mg); they were then stored at an ambient temperature for 1 h. The microspheres slowly released bFGF for approximately 3 weeks. Gelatin

hydrogel microspheres were made in accordance with the GMP standards established by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

Study design

This study used an open-label, single dose injection of bFGF-incorporated biodegradable gelatin hydrogel. The bFGF-incorporated gelatin hydrogel microspheres were injected into the gastrocnemius of the unilateral ischemic limb (single administration), and both the safety and feasibility of this method were evaluated (via the phase I–IIa study). We used a 200- μ g dose of bFGF based on the safety standards adhered to in our previous animal studies [11–16] and the findings of other clinical reports [19]. We did not use a control group because the main purpose of the present study was to develop proof of concept for this particular DDS, and more importantly, the patients were not candidates for conventional treatments. Oral medications such as vasodilators or antiplatelet drugs remained unchanged during the study period. According to the protocol, intravenous administration of prostaglandin E1 and antithrombin was not given during the study period. Patients were followed up to 24 weeks after the treatment.

Endpoints

The primary endpoints were the safety and the efficacy of the treatment, as defined by the evaluation of adverse events, laboratory data, the blood level of bFGF, vital signs, physical findings, and the improvements in transcutaneous oxygen pressure [TcO₂ (mmHg)]. The improvements were evaluated by the changes from baseline to week 4 and 24. We checked for adverse events every day for 30 days, and at 8, 12, and 24 weeks after treatment on an outpatients basis, and blood tests were performed at 1, 2, and 3 days and 1, 2, 4, 8, 12, and 24 weeks after treatment. The blood concentrations of bFGF were measured 1, 3, 7, and 14 days after treatment.

The secondary endpoint was the efficacy of the treatment, as defined by the improvements in the ankle-brachial pressure index (ABI), the toe-brachial pressure index (TBI), the distance walked in 6 min [22], Rutherford classification [23], rest pain in the supine position, and the status of cyanosis and ulcer healing.

Transcutaneous oxygen pressure measurement

We measured the TcO₂ as previously described [19]. Briefly, after cleansing the measurement site with ethanol, we applied the probe to the toe web. When a steady-state temperature was achieved, a value expressed in mmHg was recorded. The measurements were performed in a room set at 28 °C and recorded after 30 min of continuous

monitoring. TcO₂ has been shown to accurately predict the presence of significant vascular disease, to verify an appropriate correction by means of revascularization, and to confirm the success of major or minor amputations with or without revascularization [24].

Pressure measurements

The ABI and TBI were obtained at baseline and at 4 and 24 weeks after treatment. These data were each measured twice over a period of 24 h and an average value was used.

The distance walked in six minutes measurement

The six-minute walk test was performed at baseline and at 4 and 24 weeks after treatment. The walking distance was measured twice over a period of 24 h and an average value we used. In our protocol, patients were not allowed to sit on a chair during the six-minute walk test, but patients were permitted to walk with a cane or to rest.

Pain assessment

Pain assessment was evaluated by the rest pain scale: 0, no pain; +1, very slight pain which did not require non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); +2, slight pain which disappeared with NSAIDs; +3, moderate pain with NSAIDs; +4, severe pain unresolved with NSAIDs.

Cyanosis assessment

Cyanosis was assessed by the cyanotic scale: 0, no cyanosis; +1, localized on toes; +2, extensively on toes; +3, extended to dorsum of foot; +4, extended to ankle joint.

Ulcer healing

The status of all patients' ulcers was evaluated in terms of location and size and depth at pretreatment and at 4 and 24 weeks after treatment.

Treatment

The bFGF-incorporated gelatin hydrogel microspheres were dissolved into 40 ml of saline and intramuscularly injected into each injection site of the lower thigh (40 sites), in a 3 × 3-cm grid using a 22-gauge needle under spinal anesthesia. The average procedure time was approximately 15 min.

Statistical considerations

A sample size of 10 patients was determined to provide 90 % power to detect a minimum clinically