

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

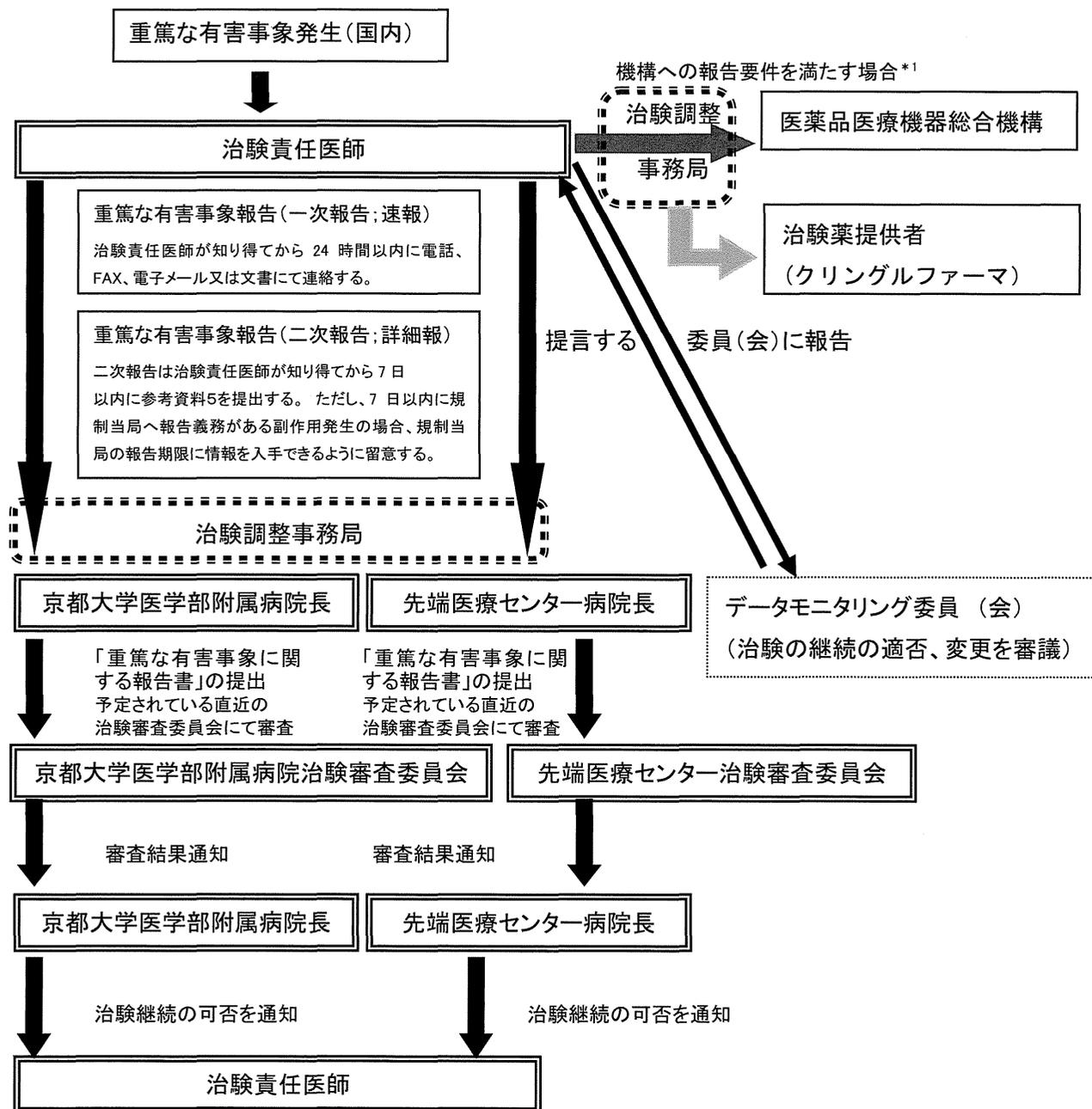
1) -3) に該当するものが緊急報告の対象となる。治験責任医師はその重篤な有害事象を知り得た日から、その内容に応じて以下の期限内に報告する。

- 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：075-751-3348



*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) 同意取得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各ステップにおいて 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治験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 スコアの治療期開始前（スクリーニング期 S2）からの 5 点以上の改善。
- ・治療期開始前（スクリーニング期 S2）から治療期終了後 4 週目、8 週目、12 週目、24 週目までの VHI-10、MPT、NMWA、GRBAS、jitter の推移。

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 の治療期開始前(スクリーニング期 S2)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治療期開始前(スクリーニング期 S2)と治療期終了後の各時点を比較し差の 95%信頼区間を算出する。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 点以上改善した患者の割合とその 95%信頼区間を求める。

また、無治療状態の臨床症状の安定性を評価するために、スクリーニング期 S1 から S2、Visit 1 までの副次的評価項目の推移と一致性を評価する。

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、撮影画像（電子データおよびフィルム等を含む）、治験薬管理表（治験薬納品書、治験薬返却書等、調製に関する記録、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)）、NMWA/GRBAS 測定評価結果報告書、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払う。

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 μ 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 μ 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 μ 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 8 月～2016 年 8 月

症例登録期間：2014 年 8 月～2015 年 12 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・管理を行う。

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等など、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. 瘢痕声帯の治療の現状と可能性. *喉頭* 15:1-10,2003
3. 平野 滋 : 瘢痕声帯と嗄声. *JOHNS* 22:571-575,2006.
4. 平野 滋 : 声帯瘢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 : 声帯瘢痕の治療戦略. *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 β 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

Pharmacokinetics and Safety of Human Recombinant Hepatocyte Growth Factor Administered to Vocal Folds

Masanobu Mizuta, MD; Shigeru Hirano, MD, PhD; Yo Kishimoto, MD, PhD;
Nao Hiwatashi, MD, PhD; Ichiro Tateya, MD, PhD; Shin-ichi Kanemaru, MD, PhD;
Tatsuo Nakamura, MD, PhD; Juichi Ito, MD, PhD

Objectives/Hypothesis: Previous animal studies demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF) has the potential to regenerate scarred vocal folds. In addition, HGF is now produced under a good manufacturing practice (GMP) procedure. Therefore, human clinical trials of HGF are warranted in patients with vocal fold scarring. In the current study, we investigated the pharmacokinetics and the local tissue responses of HGF administered to rat vocal folds.

Study Design: Prospective animal experiment.

Methods: Five μg of recombinant human HGF was administered to the vocal folds of Sprague-Dawley rats ($n = 60$) using a microsyringe. The concentration of HGF in larynges and blood was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. To evaluate the local tissue responses caused by HGF administration, endoscopic and histological examinations were performed.

Results: HGF concentration in the larynges was $50.1 \mu\text{g/g}$ tissue 5 minutes after administration. The concentration decreased rapidly to $1.71 \mu\text{g/g}$ tissue at 12 hours after administration and to 0.29 ng/g tissue at 24 hours after administration. Seven days after administration, HGF concentration was minimal in one-half of the cases and was not detected in the other cases. Transmission of HGF to blood was detected in two of six cases at 5 minutes after administration, but was no longer detected 12 hours later. Endoscopic and histological examinations revealed no edema or erythema of the vocal folds in any of the cases.

Conclusions: The current results contribute to the safety and pharmacokinetic management of future clinical trials using HGF administered to vocal folds.

Key Words: Hepatocyte growth factor, vocal fold, pharmacokinetics, safety.

Level of Evidence: N/A.

Laryngoscope, 124:2131-2135, 2014

INTRODUCTION

Vocal fold scars result from a disruption of the layer structure in the vocal fold mucosa. This is caused by injury and inflammation, including chronic vocal abuse and laser surgery of the vocal folds. Once vocal folds are scarred, the vocal mucosa stiffens, the viscoelasticity of vocal folds is decreased, and permanent dysphonia occurs. Histological studies revealed dense disorganized collagen deposition and a reduction of hyaluronic acid

(HA), elastin and, decorin.¹⁻⁴ To date, no consistent treatment has been developed to treat vocal fold scarring. Voice therapy cannot restore the histological alteration. Augmentation procedures, including fat injection and medialization thyroplasty, can lessen the glottic gap but do not significantly improve mucosal function. Technology to improve mucosal function has been warranted.

Hepatocyte growth factor (HGF) was originally purified from the plasma of the patients with fulminant hepatic failure.⁵ Human HGF has two natural forms: 1) full-length HGF composed of 697 amino acid residues and 2) a five amino acid-deleted type HGF (dHGF), which lacks the F-L-P-S-S amino acid residues in the first kringle domain.^{6,7} HGF plays a significant role in embryogenesis, angiogenesis, organ regeneration, and wound healing—and has been reported to have beneficial effects in several organs including kidney,⁸ liver,⁹ and lung.¹⁰ HGF also has a favorable potential for the treatment of vocal fold scarring. Animal studies demonstrated that local administration of full-length HGF to scarred vocal folds increased HA and reduced collagen deposition in the lamina propria of the vocal folds, leading to an improvement of viscoelasticity of the vocal folds.^{11,12} In vitro studies using fibroblasts derived from vocal folds showed that full-length HGF increased the mRNA expression of hyaluronic acid synthase (HAS)—1 and HAS-2 and increased HA production.^{13,14} A

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

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication March 24, 2014.

This study was supported by a Grand-in-Aid of Ministry of Health and Welfare in Japan, and 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, PhD, Department of Otolaryngology–Head & 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.24690

comparison study of dHGF with full-length HGF showed that dHGF had a similar potential for regenerative effects on vocal fold scars as full-length HGF.¹⁵ Recently, dHGF has begun to be produced under good manufacturing practice (GMP) procedures. Therefore, human clinical trials of dHGF in patients with vocal fold scarring are warranted.

Pharmacokinetic and safety tests using animals are essential before human clinical trials can commence. Previous pharmacokinetic studies using rats indicated that liver is the major clearance organ for HGF.¹⁶ Sugiura et al. investigated the pharmacokinetics of dHGF administered intravenously, which demonstrated that the kidneys have a minimal contribution to clearance of dHGF.¹⁷ In addition, a pharmaceutical company has performed various pharmacokinetic and safety tests of dHGF administered intravenously (unpublished data). However, there are no pharmacokinetic and safety tests on dHGF administered to vocal fold mucosa.

In the current study, we investigated the concentration of dHGF in vocal folds and transmission to blood after administration of dHGF to rat vocal folds. In addition, we specifically address concerns regarding the administration of HGF to the vocal fold center and whether administration to vocal folds causes swelling of vocal folds or narrowing of the airway. Endoscopic and histological examinations were performed to evaluate local tissue responses caused by administration of dHGF.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Drug Treatment

Recombinant human hepatocyte growth factor, which is the five amino acid-deleted type, was supplied by Kringle Pharma Inc. (Osaka, Japan) and diluted to 1 mg/mL in 2 mM citrate buffer (pH 6.0) containing 0.002% polysorbate 80, 0.15 M NaCl, 0.16 mg/mL glycine, and 3 mg/mL lactose.

Sixty 13-week-old male Sprague-Dawley rats were used in this study. All experimental protocols were approved by the animal research committee of Kyoto University Graduate School of Medicine. Animal care was provided by the Institute of Laboratory Animals of Kyoto University.

Evaluation of HGF Concentration of the Solution Discharged Through the Microsyringe

A low concentration of dHGF may be absorbed within the microsyringe (22-gauge needle; Hamilton Co., Reno, NV) used in the following experiments. To evaluate the loss of dHGF in the microsyringe, the concentration of the HGF solution discharged through the microsyringe was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). One mg/mL dHGF was drawn into and discharged through the microsyringe. After the microsyringe was washed with more than five repeated procedures of suction and discharge of normal saline (NS), the same procedure was repeated (n = 8).

Injection of HGF or Saline to Vocal Folds

The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (45 mg/kg) and xylazine hydrochloride (4.5 mg/kg) after inhalative sedation with diethyl ether. Atropine sulfate (0.005 mg/kg) was also injected intraperitoneally to reduce the secretion of saliva and sputum in the laryn-

geal lumen. Rats were positioned on a custom-made operation platform. Visualization of the larynx was achieved with a transoral endoscope connected to video equipment. Topical anesthesia (5% lidocaine) was applied to the vocal folds to reduce their movement. Five μ L per vocal fold of 1 mg/mL dHGF or NS was injected into the vocal folds with the microsyringe. To evaluate the concentration of dHGF and transmission to blood, dHGF was injected to the bilateral vocal folds. To evaluate the nonspecific background of the ELISA kit, NS was injected to the bilateral folds (n = 6). In addition, for endoscopic and histological examinations, dHGF was injected into one side of the vocal folds and NS was injected into the other side.

Extraction of HGF in Larynges

At each time point (n = 6), blood was sampled through intracardiac injection after rats were anesthetized, as described above. After placing on ice for 2 hours, the blood was centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes to obtain serum. After sampling the blood, the rats were humanely euthanized with an intracardiac injection of pentobarbital sodium (200 mg/kg), and whole larynges were harvested from each animal. HGF in larynges was extracted using HGF extraction reagent (Institute of Immunology Co., LTD., Tokyo, Japan) following the manufacturer's protocol. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) was prepared by dissolving 17.4 mg of PMSF in 1 mL of isopropyl alcohol, and 100 mM PMSF was added to the extraction buffer to obtain a final concentration of 1 mM PMSF. After measuring the weight of the tissue, the larynges were cut into small pieces and added to 500 μ L of extraction buffer prepared as above. After homogenizing the mixture of larynges and extraction buffer with a Polytron homogenizer (Central Scientific Commerce, Inc., Osaka, Japan) and a manual homogenizer (As One Inc., Osaka Japan), the mixture was centrifuged at 15,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The intermediate layer (300 μ L) was then sampled.

Measurement of HGF Concentration

ELISA was performed using the Immunis HGF EIA (Institute of Immunology Co., Ltd.), which is reported to specifically detect human HGF and not rat HGF. Because the recommended measurement range was under 3 ng/mL, the extracted samples were diluted to an adequate concentration with sample diluent in the Immunis HGF EIA kit. Standard solution was prepared by diluting 1 mg/mL dHGF with sample diluent. The following procedures were performed according to the manufacturer's protocol. After 50 μ L of sample diluent was pipetted into the wells of a microplate coated with anti-HGF monoclonal antibody, 50 μ L of standard solution, or samples were dispensed into each well. The microplate was then shaken at 500 rpm for 1 hour at room temperature (primary reaction). After washing the wells with the washing solution, 100 μ L of enzyme-labeled monoclonal antibody was pipetted into each well, and the microplate was shaken at 500 rpm for 1 hour at room temperature. After washing wells with the washing solution, 100 μ L of the enzyme substrate solution containing the color developer was pipetted into each well, and the microplate was left at room temperature in the dark for 30 minutes. Fifty μ L of stop solution was then added to all wells. The absorbance of each well at 485 nm was measured using a microplate reader (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenburg, Germany). Standard curves were used to determine HGF concentration in each sample. Because the minimum concentration of standard solution was 0.5 ng/mL, the limit of quantification was designated as 0.5 ng/mL. When HGF concentration was below the limit of quantification (BLOQ), the concentration was regarded as zero. The average and standard deviation were calculated.

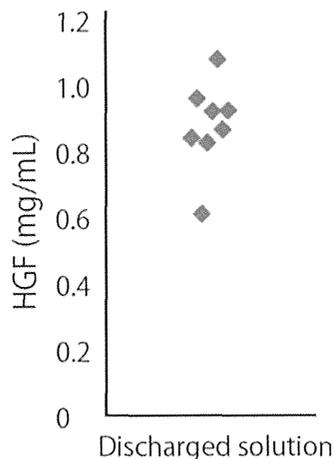


Fig. 1. Hepatocyte growth factor (HGF) concentration of the solution discharged from the microsyringe. When 1 mg/mL HGF was drawn into and discharged from the microsyringe used in the current study, HGF concentration of the discharged solution was an average of 0.891 mg/mL (standard deviation 0.128 mg/mL).

Endoscopic Examination

Vocal folds were observed by endoscopy at each of the following time points (n = 6): 5 minutes, 1 hour, 3 hours, 12 hours, 24 hours, 3 days, and 7 days after administration of dHGF to the vocal folds. Before endoscopic examination, the rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (45 mg/kg) and xylazine hydrochloride (4.5 mg/kg) after inhalative sedation with diethyl ether. After the images were recorded and randomized, the presence of swelling or redness was evaluated.

Histological Examination

Histological examinations were performed 24 hours, 3 days, and 7 days after administration of dHGF (n = 6). Whole larynges were harvested from each animal after humane euthanasia with an intracardiac injection of pentobarbital sodium (200 mg/kg). The harvested whole larynges were immersed in 4% paraformaldehyde for 24 hours and then in 30% sucrose for 24 hours. Tissues were then soaked in embedding medium (Optimum Cutting Temperature Compound; Tissue-Tek Inc., Kyoto, Japan) and frozen quickly with liquid nitrogen. Ten μ m-thick cryostat sections (Leica, CM 1850 Kryostat; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) of whole larynges were made vertical to the glottis (coronal sections), air-dried, and stored at -80°C until use. For histological examination, hematoxylin and eosin staining was performed. Images were captured at $10\times$ magnification with a Biorevo BZ-9000 microscope (Keyence Corp., Osaka, Japan). After the images were randomized, the presence of swelling of the vocal folds or infiltration of inflammatory cells into the vocal folds was evaluated.

RESULTS

Loss of HGF During Suction Into and Discharge Through the Microsyringe

When 1 mg/mL dHGF was drawn into and discharged from the microsyringe used in the current study, HGF concentration of the discharged solution was an average of 0.891 mg/mL (standard deviation [SD]; 0.128 mg/mL) (Fig. 1).

Nonspecific Background of ELISA

HGF concentration was detected at 2.44 ng/g tissue in one of six NS-injected control rats, whereas HGF was not detected in the other cases.

Concentration of HGF in Larynges After Local Administration

HGF concentration was 50061.07 (SD, 7556.66) ng/g tissue 5 minutes after the administration of dHGF to the vocal folds. HGF remaining after 12 hours and 24 hours was 1709.76 (SD, 1411.19) ng/g tissue and 290.69 (SD, 170.2) ng/g tissue. Three days after administration, HGF concentration was below the BLOQ in one of six cases, and the other cases showed concentrations ranging from 2.06 to 29.17 ng/g tissue (Fig. 2). Seven days after administration, HGF concentration was BLOQ in three of six cases, whereas a maximum concentration of 2.49 ng/g tissue HGF was detected in the other cases (Table I).

Transmission of HGF to Blood After Administration to the Vocal Folds

Five minutes after the administration of dHGF to the vocal folds, two of six cases showed 0.736 and 0.767 ng/g tissue HGF in serum, whereas HGF concentration was BLOQ in the other cases. Twelve hours and 24 hours after administration, HGF concentration was BLOQ in all cases (Table II).

Endoscopic and Histological Examinations

Endoscopic examinations revealed that vocal folds were swollen immediately after administration on both the dHGF-injected and the NS-injected sides (Fig. 3). However, no swelling of the vocal folds was observed in any cases at any of the subsequent time points. There were no cases where redness of the vocal folds was

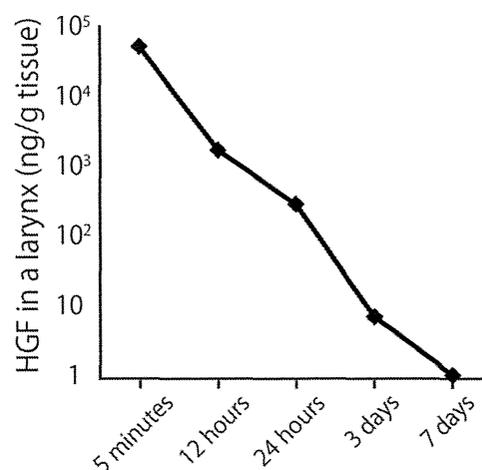


Fig. 2. Hepatocyte growth factor (HGF) concentration in rat larynges after administration of HGF to the vocal folds. HGF concentration was 50061.07 (standard deviation [SD] 7556.66) ng/g tissue 5 minutes after administration. HGF concentration after 12 hours and after 24 hours was 1709.76 (SD 1411.19) ng/g tissue and 290.69 (SD 170.2) ng/g tissue, respectively.

TABLE I.
Concentration of Human Hepatocyte Growth Factor
in a Rat Larynx (ng/g tissue).

Three Days After Administration					
Rat A	Rat B	Rat C	Rat D	Rat E	Rat F
BLOQ	2.66	2.06	4.14	6.94	29.17
Seven Days After Administration					
Rat A	Rat B	Rat C	Rat D	Rat E	Rat F
BLOQ	BLOQ	BLOQ	1.98	2.49	2.20

BLOQ = below the limit of quantification.

observed. Swelling of the vocal folds or infiltration of inflammatory cells into the vocal folds was not detected in any of the cases upon histological examination (Fig. 4).

DISCUSSION

The current study investigated HGF concentration in the solution discharged through a microsyringe to be used in the experiments. A low concentration of dHGF has the possibility to be adsorbed especially to glass and to be discharged at a concentration less than we assume. We found that the HGF concentration of the discharged solution was 0.891 mg/mL (89.1%) when 1 mg/mL dHGF was drawn into and discharged through a microsyringe. This demonstrated that 1 mg/mL dHGF was discharged with an acceptable loss through the microsyringe used in the current study.

Next, we investigated the nonspecific background response of the ELISA using the Immunis HGF EIA kit. One of six NS-administered control larynges had 2.44 ng/g tissue of human HGF. This revealed that the background nonspecific measurement of human HGF in rat larynges was approximately 2.5 ng/g tissue.

Because 89.1% of dHGF was discharged through the microsyringe and the average weight of the rat larynges was 141 mg, 8.91 μ g (63.19 μ g/g tissue) of dHGF was calculated to be administered to the rat larynges. The concentration of dHGF 5 minutes, 12 hours, and 24 hours after administration was 50.06 μ g /g tissue, 1.71

TABLE II.
Serum Concentration of HGF After Administration of HGF into
Vocal Folds (ng/mL).

	5 minutes	12 hours	24 hours
Rat A	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Rat B	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Rat C	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Rat D	0.736	BLOQ	BLOQ
Rat E	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Rat F	0.767	BLOQ	BLOQ

BLOQ = below the limit of quantification; HGF = hepatocyte growth factor.

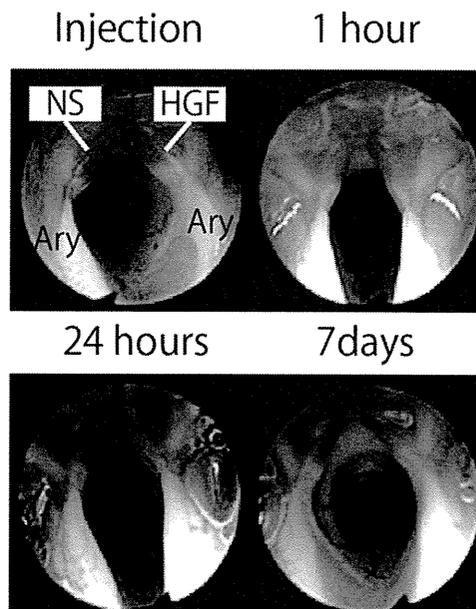


Fig. 3. Endoscopic examinations were performed at each of the following time points: immediately, 1 hour, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 3 days, and 7 days after administration of Hepatocyte growth factor (HGF) to the vocal folds. HGF was administered to the right side of the vocal folds. Normal saline (NS) was administered to the left side. Although both sides of the vocal folds were swollen immediately after administration, no swelling of the vocal folds was observed in any case at any of the other time points. There were no cases where redness of the vocal folds was observed. Ary = arytenoid cartilage.

μ g/g tissue, and 0.29 μ g/g tissue, which were calculated to be 79.22%, 2.71%, and 0.46% of the administered dHGF. Considering that the ELISA showed approximately 2.5 ng/g tissue as a nonspecific background, the larynges where the concentration of dHGF was approximately 2.5 ng/g tissue were considered to have no dHGF. This suggests that three of six larynges had no dHGF 3 days after administration, and no larynges had any HGF 7 days after administration.

Regarding transmission of dHGF administered to a larynx to the blood, the serum concentration of HGF was 0.73 to 0.76 ng/mL in two of six cases and BLOQ in the other cases 5 minutes after local administration to the vocal folds. Twelve and 24 hours after administration, there were no cases where HGF was detected in the serum. In phase I/II clinical trials of patients with fulminant hepatitis in Japan, 0.6 mg/m² of HGF was

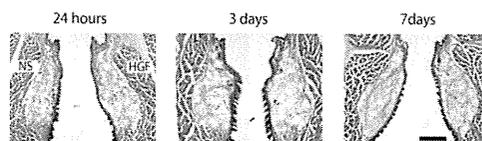


Fig. 4. Histological examinations were performed 24 hours, 3 days, and 7 days after administration of hepatocyte growth factor (HGF) to the vocal folds. HGF was administered to the right side of the vocal folds. Normal saline (NS) was administered to the left side. There were no cases where the swelling of the vocal folds or infiltration of inflammatory cells into the vocal folds was detected. Scale bar = 200 μ m.

TABLE III.
Size of Vocal Folds (n = 3) (average SD).

	Length (L), mm	Width (W), mm	Depth (D), mm	L × W × D
Human	14.7 (0.6)	5.7 (0.6)	5.0 (1.0)	418.0 (105.7)
Beagle	11.7 (0.6)	4.3 (1.2)	4.0 (0.0)	204.0 (62.4)
Rat	2.6 (0.4)	1.1 (0.1)	1.2 (0.1)	3.2 (0.3)

Depth = distance from the upper surface to the lower surface; length = distance from the anterior commissure to the vocal process; width = distance from the free edge of vocal fold to the laryngeal ventricle; SD = standard deviation.

administered intravenously and revealed a maximum drug concentration (Cmax) of 22.3 ng/mL.¹⁸ Nevertheless, no severe adverse reactions were observed. This suggests that the concentration of dHGF transmitting to the blood after administration to the vocal folds was too little to cause any adverse problems.

Possible unfavorable responses of administration of HGF to the larynx include swelling of the vocal folds and the surrounding tissues, which leads to narrowing or closure of the airway. In endoscopic examinations, although swelling of the vocal folds was observed immediately after injection in all cases, this occurred similarly on both the HGF-injected side and the NS-injected side. Therefore, this was considered to be caused by the injection of fluid. At all time points after 1 hour, no swelling or redness suggesting local tissue responses was observed. In addition, histological examinations showed no significant swelling of the vocal folds or infiltration of inflammatory cells into the vocal folds. These endoscopic and histological examinations suggested that administration of HGF into the vocal folds does not cause any local tissue responses.

When human clinical trials are planned in the future, the dosage to be used is determined by previous animal studies. The optimal dosage of HGF for regenerative effects in rat vocal folds was reported to be 100 ng HGF per vocal fold.¹⁹ In a canine model, 0.5 µg HGF per vocal fold showed regenerative effects for scarred vocal folds.¹¹ Table III shows the sizes of larynges in humans, dogs, and rats. The size of human larynges was measured in cadavers. This demonstrates that the size of human vocal folds is approximately 2 and 100 times larger than that of dogs and rats, respectively. Due to the differences in size, 100 ng dosage in rats or 0.5 µg dosage in dogs corresponds to 10 µg or 1 µg HGF in humans. Therefore, a dosage of HGF from 1 µg to 10 µg per vocal fold was calculated to be an effective dose for human vocal folds. In the current study, 5 µg HGF per vocal fold was administered to rat vocal folds. Five µg in rats corresponds to 500 to 1,000 µg in humans, which is 50 times greater than the maximum dosage suggested to be used in future clinical trials. The current results suggest that as much as 5 µg HGF per rat vocal fold disappeared 7 days after administration, resulted in minimal transmission to the blood 5 minutes after administration, and caused no local tissue responses. Therefore, a maximum dosage of 10 µg per human vocal fold is considered to be safe and acceptable.

CONCLUSION

The current study demonstrated that dHGF administered to rat vocal folds disappeared after 7 days, with minimal transmission to the blood. Endoscopic and histological examinations revealed no edema or erythema of the vocal folds in any case. The current findings are expected to contribute to the safe and pharmacokinetic management of future clinical trials when dHGF is administered into human vocal folds.

Acknowledgment

This study was supported by a Grand-in-Aid of Ministry of Health and Welfare in Japan, and the Advanced Research for Medical Products Mining Program of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

BIBLIOGRAPHY

- 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.
- Rousseau B, Hirano S, Chan RW, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice* 2004;18:116–124.
- Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. *Laryngoscope* 2003;113:620–627.
- Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histologic characterization of rat vocal fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:183–191.
- Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, et al. Human hepatocyte growth factor in plasma from patients with fulminant hepatic failure. *Exp Cell Res* 1986;166:139–150.
- 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.
- 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.
- Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2001;59:1304–1314.
- Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 1999;30:151–159.
- Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, et al. Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with hepatocyte growth factor in rats. *Circulation* 2005;111:1407–1414.
- Hirano S, Bless DM, Nagai H, et al. Growth factor therapy for vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:777–785.
- Kishimoto Y, Hirano S, Kitani Y, et al. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. *Laryngoscope* 2010;120:108–113.
- 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.
- Kishimoto Y, Hirano S, Suehiro A, et al. Effect of exogenous hepatocyte growth factor on vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:606–611.
- Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J. Restoration of scarred vocal folds using 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor. *Laryngoscope* 2014;124:E81–86. doi:10.1002/lary.24413. Epub 2013.
- Liu KX, Kato Y, Narukawa M, et al. Importance of the liver in plasma clearance of hepatocyte growth factors in rats. *Am J Physiol* 1992;263:G642–G649.
- Sugiura T, Takahashi S, Sano K, et al. Pharmacokinetic modeling of hepatocyte growth factor in experimental animals and humans. *J Pharm Sci* 2013;102:237–249.
- Ido A, Moriuchi A, Numata M, et al. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med* 2011;9:55. doi:10.1186/1479-5876-9-55.
- Suehiro A, Wright H, Rousseau B. Optimal concentration of hepatocyte growth factor for treatment of the aged rat vocal fold. *Laryngoscope* 2011;121:1726–1734.

Vocal Fold Fibroblast Response to Growth Factor Treatment is Age Dependent: Results From an *In Vitro* Study

*Matthias Graupp, *Karl Kiesler, *Gerhard Friedrich, †Herwig Ainödhofer, ‡Hans-Jürgen Gruber, ‡Petra Kieslinger, †Amulya Saxena, §Shigeru Hirano, and *Markus Gugatschka, *†‡Graz, Austria and §Kyoto, Japan

Summary: Introduction. Vocal fold (VF) fibroblasts (VFFs) are the central target in developing new strategies for treatment of VF injury and scarring. Nevertheless, only little is known about the basic biological characteristics of these cells. The aim of this study was to explore the impact of age of VFFs on the response to external growth factor stimulation.

Study Design. *In vitro* cell study using a rat model.

Methods. VFFs were extracted from young and aged rat VF 3 months after establishing unilateral injury. Resulting scar fibroblasts (SFs) and normal fibroblasts (NFs) were subsequently cultured separately with or without the addition of hepatocyte growth factor (HGF). After 24 and 72 hours, the production of hyaluronic acid (HA) was examined in the supernatant culture media using enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. Only cultured SF and NF from young animals could be stimulated significantly in the production of HA by HGF. Within these, average percentage increase was higher in NF compared with SF.

Conclusion. The response of VFFs in cell culture to growth factors stimulation is highly depending on the age of the animals. This is another step in a nearer characterization of scar VFF and could furthermore be an important point when estimating the success of an intervention. Age-depending effects must be considered as an important factor in developing possible therapeutic agents for VF scarring.

Key Words: Vocal fold scarring–Vocal fold fibroblasts–Age depending effects–Hyaluronic acid–Hepatocyte growth factor.

INTRODUCTION

Vocal fold (VF) scarring remains an unresolved problem and a major challenge in modern laryngology. Reasons for VF scarring are numerous and comprise chronic inflammation caused by smoking or radiation therapy, external or internal trauma, chronic voice abuse, and so forth.¹ Therapeutic options are unsatisfying and limited, with conservative speech therapy and various surgical procedures being the most commonly used treatment strategies.² Underlying pathology is a deterioration of the microarchitecture of the highly complex trilayered VF lamina propria with a subsequent alternation of the vibration characteristics leading to dysphonia.

Vocal fold fibroblasts (VFFs) play a pivotal role in the aforementioned structural and functional changes. They represent the main cell type of the VF and have unique characteristics not shared by other types of fibroblasts. Under normal circumstances, relatively few VFF can be found in the vibrational mid-part of the VF, where they maintain structural and vibra-

tional properties of the VF by producing extracellular matrix (ECM) components such as hyaluronic acid (HA).

After injury some VFF transform into myofibroblasts (aka. scar fibroblasts [SFs]) with altered protein expression patterns. This leads to significant changes in the production of important proteins of the ECM, such as the aforementioned HA, but also of different types of collagen and fibronectin.³ This results in increased stiffness and viscosity of the VF, with glottic incompetence and dysphonia.⁴

VFF not only produce structural proteins and glycos-amino-glycans but also various kinds of growth factors such as hepatocyte growth factor (HGF). This is triggered by several mechanisms that are still under investigation. Local stem cells are assumed to play a central role in mediating the inflammatory responses after VF injury.⁵

A complete regeneration of the changes of the lamina propria is the subject of numerous studies⁶ but could not be achieved so far. Laryngeal tissue engineering aims to change pathologic tissue characteristics also at the cellular level by various attempts including injection of somatic⁷ and stem cells⁸ or by injection of various cytokines and growth factors.⁶ Most experiments so far showed beneficial results in terms of improved tissue viscosity and collagen reduction.

Despite many trials and experiments in this field, only little is known about the basic characteristics of the cell type that most of these studies target, the VFF. A better characterization and a better understanding of the behavior of VFF should give new insights in cellular mechanisms and inflammatory pathways.

The aim of this study was to investigate the impact of age on the cellular responses of VFF after external growth factor stimulation with HGF. This not only has effects on planning and

Accepted for publication November 11, 2013.

This project was supported by the Styrian government.

From the *Department of Phoniatics, ENT University Hospital Graz, Medical University Graz, Graz, Austria; †Department of Pediatric and Adolescent Surgery, Medical University Graz, Graz, Austria; ‡Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University Graz, Graz, Austria; and the §Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Address correspondence and reprint requests to Markus Gugatschka, Department of Phoniatics, ENT University Hospital Graz, Medical University Graz, Auenbruggerplatz 26, A-8036 Graz, Austria. E-mail: markus.gugatschka@klinikum-graz.at

Journal of Voice, Vol. 28, No. 4, pp. 420-423

0892-1997/\$36.00

© 2014 The Voice Foundation

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jvoice.2013.11.005>