

サーバリックス

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2） CTDの概要（サマリー）

2.4. 非臨床試験の概括評価

グラクソ・スミスクライン株式会社

非臨床試験の概括評価の目次

	頁
2.4. 非臨床試験の概括評価.....	1
2.4.1. 非臨床試験計画の概要	1
2.4.2. 薬理試験	4
2.4.3. 薬物動態試験	6
2.4.4. 毒性試験	7
2.4.5. 総括及び結論	9
2.4.6. 参考文献	11

2.4. 非臨床試験の概括評価

2.4.1. 非臨床試験計画の概要

GlaxoSmithKline Biologicals (GSK Biologicals) 社は、XXXXXXXXXXとの連携の下、癌原性ヒトパピローマウイルス (HPV) による一時的および持続的感染、意義不明異型扁平上皮細胞 (ASC-US)、子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) ならびに前癌病変 (2/3) を含む細胞学的異常を防御することによって、10歳以上の女性における子宮頸癌の予防を適応症とする新規予防癌原性 HPV ワクチンを開発した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン (本ワクチン) はガラス製シリンジ入りの筋肉内接種 1 回量 0.5mL 注射剤で、保存剤を含有しない。申請用法は 0、1 および 6 ヶ月後の 3 回接種である。組成および特性については「2.3.P.1 製剤および処方 (サーバリックス、注射剤)」に示す。

本ワクチン 1 回接種量中には、有効成分としてウイルス様粒子 (VLP) の形態に会合した HPV-16 L1 蛋白 20μg および HPV-18 L1 蛋白 20μg を含有しており、水酸化アルミニウム (Al(OH)₃) 500μg と 3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A (MPL) 50μg からなる AS04 アジュバントが添加されている。

本ワクチンの組成は、以下に記載したように非臨床感染モデルならびに非臨床および臨床自然感染実験より得られたデータに基づき決定した。

種々の動物モデルを用いた非臨床感染試験により、VLP として会合した L1 パピローマウイルス蛋白が高い中和抗体価を誘導し、感染とそれに伴う病変形成に対して防御効果を有する強力な免疫原であることが示された。また、3 種の動物モデル (イヌ口腔パピローマウイルス、ウサギパピローマウイルスおよびウシパピローマウイルス) のすべてにおいて、それぞれの種特異的な L1 VLP ワクチン接種によって、それと対応するパピローマウイルス感染とその後の病変形成に対する短期防御免疫が誘導されることが確認されている [Kirnbauer, 1996; Suzich, 1995; Breitburd, 1995; Christensen, 1996; Jansen, 1995]。また、イヌ口腔パピローマウイルス L1 VLP ワクチンをイヌに皮内接種したところ、粘膜からのパピローマウイルス感染に対する防御効果が発現することが示されている [Suzich, 1995]。また、ワクチン接種後の感染防御を担う抗体の決定的な役割は、数種の動物モデルにおける受身伝達試験により示されている [Kirnbauer, 1996; Suzich, 1995; Breitburd, 1995]。しかし、ウサギにおける遅発性の感染 (ワクチン接種の 6~12 ヶ月後) に対しては、有意な感染防御が認められたものの完全な防御には至らなかったことから [Christensen, 1996]、B 細胞による免疫記憶応答を含む十分なレベルの液性免疫の十分なレベルでの持続性を向上させる必要があると考えられる。このことから、優れた液性免疫誘導作用を有するワクチンでのみ、長期の防御効果が得られると結論付けられる。

パピローマウイルスの自然免疫についての知識は、おもに疫学研究および自然史研究から得られたものであり、HPV の感染制御において獲得性の細胞性および液性免疫応答の両者が重要であることが強く示唆されている [Shiffman, 2003; Ho, 1998; Ho, 2002]。また、細胞性免疫がウイルス感染細胞の除去に不可欠であり、免疫記憶の成立に対しても重要であることも示唆されている。関与するエフェクターの詳細は不明であるものの、HPV による病変の治療において CD4 T リン

パル依存性反応の関与が示されている。これに対し、感染の除去または制御に効果的な細胞性免疫が誘導されないと、持続性感染に至り、癌原性を示す HPV 型ではハイグレードの CIN または浸潤癌に進行するリスクが上昇することが示されている。これらの成績により、抗体を介した免疫も遊離ウイルスの除去および再感染の予防に重要な役割を果たすことが示された。しかし、一部の研究では、自然感染により誘導される HPV カプシドに対する特異抗体が、以後の再感染に対して必ずしも防御効果があるとは限らないことも示されている。セロコンバージョン率が感染マーカーとなる多くのウイルス感染とは異なり、HPV 感染女性のセロコンバージョン率はわずかに 50%であり、血清抗体が陽性であることと、同じ HPV 型の再感染リスクが統計学的に有意に低下することとの間に関連性はない[Viscidi, 2005]。

非臨床の自然感染試験により、L1 カプシド蛋白に対する高い抗体価、B 細胞による免疫記憶応答および T 細胞応答を誘導する能力を有するワクチンが、HPV 感染および関連臨床病変の予防において高い有効性を示す可能性が示唆されている。

L1 VLP を含有することは本ワクチンにとって必須であるが、効果的な B 細胞および T 細胞の免疫記憶応答の誘導と同時に、持続的に高い抗体価を誘導して、強力、持続的および広範囲な感染防御効果を促進させることを目的として、新規で独自のアジュバントを開発した。このようなアジュバントの 1 つである AS04 は、Al(OH)₃ および MPL を含有しており、ヘルパー T 細胞および免疫記憶 B 細胞の誘導活性に基づいて選択され、本ワクチンに添加されている[Garçon, 2006; Giannini, 2006]。

感染を防御する抗 HPV L1 VLP 抗体を誘導させるために VLP として会合した L1 蛋白を添加し、持続的な高い抗体価および特異的細胞性免疫を誘導させるために AS04 アジュバントを添加した配合剤が選択された。

AS04 アジュバントは GSK Biologicals 社において臨床開発中の他のワクチン抗原に配合することにより、すでに 16000 例以上の被験者に接種されており、これらの臨床試験において安全性と良好な忍容性が示されている。また、HPV-16 L1 VLP および HPV-18 L1 VLP と配合した AS04 については 32000 例以上の被験者に接種されており、安全性と良好な忍容性が示されている。

本ワクチンの非臨床における薬理試験、薬物動態試験および毒性試験は、以下に示すように、AS04 アジュバントおよび MPL の試験と並行して実施した。試験は 2 つの FDA ガイダンス

(Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications, Feb. 2006 および Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients, May 2005) に概説された原則に従って実施した。また、EMA ガイダンス (Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95)、ヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン (Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMA/CHMP/VEG/134716/2004) に準拠したほか、EMA の生殖毒性試験法ガイドライン (Note for Guidance on Reproductive Toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products, CPMP/ICH/386/95) にも準拠した。これらのガイドラインに

従い、本ワクチンの副次的薬理試験、薬力学的薬物相互作用試験、薬物動態試験、遺伝毒性試験およびがん原性試験は実施しておらず、MPL の副次的薬理試験、薬力学的薬物相互作用試験およびがん原性試験も実施していない。

HPV は種特異的であるため、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの感染防御モデルを用いた非臨床試験での評価はできなかったが、ガイドラインの推奨に従い、本ワクチンの効力を裏付ける薬理作用を免疫原性試験によって検討した。試験の目的の1つは、本ワクチンの各成分の最適な重量比を評価することである。さらに、本ワクチンの特異的な液性および細胞性免疫応答をアジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンおよび Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと比較した。ほとんどの試験はマウスを用いて実施し、のちにサル試験により確認した。

これと並行して、*in vitro* (ヒトまたはマウス細胞) および *in vivo* (マウス) 試験において AS04 アジュバントおよび MPL の効力を裏付ける試験を実施し、作用機序および免疫賦活性を検討した。

心血管系および呼吸系に対する安全性薬理試験を、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンおよび MPL の両者について実施し、心機能および呼吸機能に及ぼす影響を検討した。

ラットに ¹⁴C-MPL を静脈内および筋肉内投与したときの MPL 関連物質の薬物動態、分布および排泄試験を実施した (2.3.A.3.2.12 参照)。

本ワクチンについて、いくつかの毒性試験を実施した。ウサギの反復投与毒性試験を4試験、ラットの反復投与毒性試験を1試験実施した。■ 1513 (4.2.3.2.1) および ■ 58678 (4.2.3.2.3) 試験では、単回および反復 (4 回まで) 投与後の局所および全身毒性を評価した。■ 58678 試験では、より長期にわたるより詳細な投与後の評価を行った。■ 1513 試験で手技上の問題により血液学的検査値の解析が不完全であったため、■ 1758 試験 (4.2.3.2.2) において血液学的検査を再実施した。また、■ 58678 試験の最終投与 13 週間後に観察された血小板数の低値がウサギに特異的な影響であるか、または投与量によるものなのかを評価するため、ウサギ (■ 62369 試験、4.2.3.2.4) およびラット (4.2.3.2.5) を用いて追加試験を実施した。さらに、本ワクチンは妊娠可能女性に接種するため、ラットの雌受胎能、出生前および出生後の発生に関する試験を実施した (当該プロトコールは、20■ 年 ■ 月 ■ 日に FDA に提出し、20■ 年 ■ 月 ■ 日に電話会議により FDA review team と協議した)。

本ワクチンと並行して、AS04 アジュバントの安全性についても反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験により検討した。

さらに、MPL の安全性プロファイルを、ラットの単回投与毒性試験、ラットおよびイヌの反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する試験、ラットの出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験により検討した (2.3.A.3.2.13 参照)。

なお、安全性薬理試験、薬物動態試験および毒性試験に使用した原薬の純度は、臨床試験で使用する原薬および市販予定の原薬と同等であった。

上述した非臨床試験により、AS04 アジュバントおよび MPL の作用機序が明らかとなり、HPV-16/18 L1 VLP ワクチンに AS04 アジュバントを添加した際の安全性も確認された。また、本ワクチンは動物モデルにおいて安全性を示し、強力かつ持続的な特異的免疫応答を誘導することが示された。したがって、本ワクチン（各 L1 VLP 20 μ g + Al(OH)₃ 500 μ g + MPL 50 μ g）のヒトへの使用に問題がないことが結論づけられた。

2.4.2. 薬理試験

効力を裏付ける試験および安全性薬理試験を MPL、AS04 アジュバントおよび AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンについて実施した。

MPL はグラム陰性菌 *Salmonella minnesota* R595 株の細胞壁から単離したリポ多糖（LPS）由来の lipid A の無毒化誘導体であり、LPS の免疫賦活能を保持している。MPL の効力を裏付ける試験（4.2.1.1.10/ref）において、MPL は自然免疫の活性化に重要な役割を果たすことが示された。自然免疫の活性化は、免疫応答の開始を増強し、細胞性および液性の獲得免疫応答の増強につながると考えられる。一方、マウス（*in vitro* および *in vivo* 試験）およびヒト細胞（*in vitro* 試験）において、MPL は共刺激分子である CD80、CD86 および CD40 の発現を促進し、抗原提示細胞（APC）の成熟の誘導に重要な役割を果たすことも示された。さらに、単球（ヒト、マウス）および樹状細胞（マウス）での *in vitro* 試験において、MPL は炎症性サイトカイン（IL-6、TNF- α ）分泌の促進に関与することも示された。MPL 投与直後のマウス血清中に炎症性サイトカインが検出されることから、この作用は *in vivo* 試験においても確認されており、MPL が自然免疫の活性化に重要な役割を果たすことが裏付けられている。また、ヒト全血を MPL で刺激すると、サイトカイン（IL-12、IFN- γ 、IFN- α 、IL-10）、炎症性サイトカイン（IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-1 β ）およびケモカイン（MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β ）が誘導されることが示された。

興味深いことに、上記の全血細胞を用いた *in vitro* 試験において、MPL 刺激後に検出されたサイトカインのプロファイルは、被験者に MPL を静脈内投与した際に血清中に *in vivo* で検出されるサイトカイン[Lacy, 2005]のプロファイルとよく相関している。

なお、ヒト細胞による MPL の認識には Toll 様受容体 2（TLR2）ではなく TLR4 が関与することが確認されている。マウスおよびヒトにおける LPS の認識および自然免疫応答の活性化に TLR4 が重要であること[Arbour, 2000; Poltorak, 1998]および *Salmonella minnesota* LPS の認識には TLR2 が関与しないことはすでに報告されており[Tapping, 2000]、本成績はこれらの報告と一致するものであった。

MPL の効力を裏付ける試験として実施した 3 つの動物モデル試験において、Al(OH)₃ に吸着させた MPL を含有する AS04 アジュバントは、MPL と同程度の機能的な生物活性を誘導することが示された。

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来の単球およびヒト単球細胞株 U937 を用いた *in vitro* 試験において、AS04 アジュバントは IL-6 および TNF- α の分泌を促進した。AS04 アジュバントの *in vivo*

試験におけるマウス APC の成熟の誘導活性は、共刺激分子である CD40 の発現促進作用により確認されている。

以上の成績より、AS04 アジュバントが抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な自然免疫を活性化することが示された。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの効力を裏付ける試験として 2 系列の試験を実施した。BALB/c マウスを用いた免疫原性試験を 3 試験実施し、Al(OH)₃、MPL、HPV-16/18 L1 VLP 抗原の用量を設定した。HPV-16/18 L1 VLP に特異的な液性および細胞性免疫応答を測定することにより、抗原、Al(OH)₃ および MPL の重量比は 1 : 25 : 2.5 が適切であることが示された。

一方、特異的な液性および細胞性免疫応答に対する AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの特性を、アジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンおよび Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと免疫原性を比較することにより評価した。BALB/c マウスで実施した 4 つの免疫原性試験では、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも強力かつ持続的（ワクチン接種後 3 ヶ月まで）に抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体を誘導し、その作用に再現性が認められた。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、抗ウイルス活性を有するサイトカインである IFN- γ および TNF- α の産生をより強く誘導した。Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、IL-5 産生を再現性よく誘導したが、抗ウイルス活性への関与は不明である。AS04 アジュバントが、血清抗体をより強力に誘導したのみならず、抗体の保持に有用と考えられる免疫記憶 B 細胞の出現頻度も上昇させたことは特記すべきである。

臨床用量の AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンを接種したアカゲザルにおいて、高い抗体価の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体が誘導されたことから、このワクチンの優れた免疫原性が裏付けられた。また、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも高い抗体価の抗 HPV-16 VLP 抗体、抗 HPV-18 L1 VLP 抗体および中和抗体を誘導することが示された。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、主要な中和エピトープである HPV-16 L1 VLP (V5) および HPV-18 L1 VLP (J4) エピトープに対する高い抗体価を誘導した。

安全性薬理試験を 2 試験実施した結果、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンおよび MPL は、心血管系および呼吸系に対して影響を示さなかった。ビーグル犬に MPL を 100 μ g/kg (AS04 アジュバントに含まれる MPL の 100 倍超) までの用量で静脈内投与しても、心血管系および呼吸系の機能（心拍数、大腿動脈抵抗、血圧、左室圧、LV dP/dt、心電図、呼吸流量、1 回換気量、呼吸数、分時換気量）に対してほとんど影響を示さなかった。また、麻酔下の雄 Wistar ラットに AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンを臨床用量の約 24~56 倍（ヒト体重：30~70kg、ラット体重：0.25kg で換算）に相当する 0.1mL（臨床用量の 1/5）を筋肉内投与しても、心血管系および呼吸系パラメータ（血圧、心拍数および心電図（第 II 誘導）、ならびに 1 回換気量、分時換気量および呼吸数）に投与に関連した影響は認められなかった。

以上をまとめると、免疫賦活剤である MPL の薬理試験において、自然免疫の誘導における MPL の役割が明らかになるとともに、MPL が動物の呼吸・循環器系機能に対して好ましくない薬理作用を誘発しないことが示された。また、AS04 アジュバントによる自然免疫の活性化は、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによる強力かつ持続的な特異的免疫応答の誘導に随伴することが示された。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは動物の呼吸・循環器系機能に対して好ましくない薬理作用を誘発しなかった。

2.4.3. 薬物動態試験

EMA ガイダンス (Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95) および WHO ガイドライン (WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines) によると、ワクチン類の承認申請で薬物動態試験は要求されていない。アジュバントに関する薬物動態試験の有用性は不明であるが、ヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン (Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMA/CHMP/VEG/134716/2004) には「アジュバントを添加したワクチンではアジュバントの作用機序の解明に分布試験が役立つ場合がある。」と記載されている。また、FendrixTM (MPL を含有する GSK Biologicals 社の B 型肝炎ワクチン) の欧州での承認申請に際して、ラットに ¹⁴C-MPL を静脈内および筋肉内投与したときの放射能 (MPL 関連物質) の薬物動態、分布および排泄試験を実施した (2.3.A.3.2.12 参照)。これらの試験結果を以下に示す。投与経路としては臨床投与経路である筋肉内投与と、MPL の体循環での動態を検討するために静脈内投与を選択した。なお、試験は GLP 下で実施した。

MPL は 2 種類のグルコサミンが結合した二糖類であり、脂肪酸アシル基の数が異なる同族体の混合物である。¹⁴C-MPL は [1-¹⁴C]-N-アセチルグルコサミンを用いて生合成し、MPL の放射化学的純度は 94.4% であった。

MPL の臨床用量は 1 回接種あたり 50μg であり、体重 30~70kg のヒトで約 1.7~0.7μg/kg に相当する。本ワクチンの用法は 0、1 および 6 ヶ月後の 3 回筋肉内投与である。

雄 Han Wistar ラットに ¹⁴C-MPL の 100μg/kg を単回筋肉内または静脈内投与したときの放射能の薬物動態、吸収、分布および排泄について検討した。なお、いずれの試験でも被験物質は水溶液とし、静脈内投与試験では ¹⁴C-MPL を約 30 秒かけて投与した。

血液中の放射能は筋肉内投与では投与 4 時間後 (14.9ng eq./g) に最高濃度に達した。投与 4 時間以降の血液中放射能は 8.21~14.3ng eq./g とほぼ一定であり、投与 168 時間後では 11.4ng eq./g であった。また、静脈内投与したときの放射能の消失半減期は 76.5 時間であった。

放射能は投与 56 日後に検討した組織 (脂肪、肺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎および死体) でいずれも定量可能であった。筋肉内投与したときの放射能は脂肪および死体でそれぞれ 2.96 および 1.02ng eq./g であり、以下、脾臓、肝臓、腎臓の順であった。肺および副腎での放射能は 0.2ng eq./g 未満であり、投与部位では 0.661ng eq./g であった。

筋肉内投与したときの投与 168 時間後までの放射能の糞中排泄率は投与量の 12.6%、尿中排泄率は 2.5% であった。放射能は呼気捕集液 (2 個) 中に投与量のそれぞれ 0.5 および 0.6% が回収さ

れ、ケージ洗浄液および残屑を含む総回収率は 16.5%であった。いずれの投与経路においても、投与 56 日後までの放射能の糞中排泄率は投与量の約 24%、尿中排泄率は約 4%、呼気捕集液中の回収率は約 2%と推定され、本試験では呼気捕集液の捕集効率が低かったと考えられる。また、組織および死体中の放射能の合計は投与量の約 6%であった。これらのことから、放射能はおもに呼気を介して体外に排泄されたと考えられる。

以上のことから、ラットの薬物動態試験において、MPL 関連物質は全身の特に脂肪と脾臓に分布し、おもに呼気を介して体外に排泄され、体内に残留した MPL 関連物質は低濃度であると考えられる。

2.4.4. 毒性試験

本ワクチン、AS04 アジュバントおよび MPL に関する毒性試験として、下表に示した試験を実施した。

被験物質	試験種 ¹⁾	動物種	試験番号	記載箇所
AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	反復投与毒性	ウサギ	■ 1513	2.6.6.3.1、2.6.7.7.A、4.2.3.2.1
		ウサギ	■ 1758	2.6.6.3.2、2.6.7.7.B、4.2.3.2.2
AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンおよび AS04 アジュバント	反復投与毒性	ウサギ	■ 58678	2.6.6.3.3、2.6.7.7.C、4.2.3.2.3
		ウサギ	■ 62369	2.6.6.3.4、2.6.7.7.D、4.2.3.2.4
		ラット	■ 62370	2.6.6.3.5、2.6.7.7.E、4.2.3.2.5
	生殖発生毒性	ラット	BVR249/033160	2.6.6.6.1、2.6.7.13、4.2.3.5.1.1
	単回投与毒性	ラット	■ 127	2.3.A.3.2.13.1、3.2.A.6
MPL	反復投与毒性	ラット	■ 3262.4	2.3.A.3.2.13.2.1、3.2.A.7
		ラット	■ 3262.2	2.3.A.3.2.13.2.2、3.2.A.8
		イヌ	■ 3262.1	2.3.A.3.2.13.2.3、3.2.A.9
		イヌ	■ 3262.1	2.3.A.3.2.13.2.3、3.2.A.9
	遺伝毒性	ネズミチフス菌、大腸菌	■ 1729/3	2.3.A.3.2.13.3.1、3.2.A.10
		CHO 細胞	■ 1729/4	2.3.A.3.2.13.3.2、3.2.A.11
		ラット	BVR730/052198	2.3.A.3.2.13.3.3、3.2.A.12
	生殖発生毒性	ラット	■ 1729/7	2.3.A.3.2.13.4.1.1、3.2.A.13
		ウサギ	■ 1729/8	2.3.A.3.2.13.4.1.2、3.2.A.14
		ラット	■ 1729/17	2.3.A.3.2.13.4.2、3.2.A.15

1) いずれの試験も GLP 適合試験、CHO 細胞：チャイニーズハムスター卵巣細胞

本ワクチンおよび AS04 アジュバントの毒性は単回または反復（4 回）投与した反復投与毒性試験により検討し、本ワクチンの接種対象が妊娠可能女性であることから、生殖発生毒性試験を実施して雌受胎能、生殖能および胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。また、本ワクチンおよび AS04 アジュバントの単回投与および 4 回まで反復投与したときの全身および局所毒性を評価し、4～13 週間の休薬による回復性を評価した。臨床用量の最大 3 倍量の本ワクチンを、予定臨床接種回数（3 回）を上回る 4 回まで 2 週間隔で投与した。

本ワクチンの最初の 3 つの反復筋肉内投与毒性試験では、一般状態観察、血液学・血液生化学的検査、器官重量および剖検において、再現性のある投与に関連する所見または用量依存的な所

見は認められなかった。投与部位の検査で、対照群を含む全投与群に紅斑や浮腫がみられたが、ウサギのワクチン群の一部でより重度であった。ワクチン投与後数日の投与部位の病理組織学的検査では、筋線維の軽度～中等度の限局性変性、壊死または再生を伴う亜急性炎症が認められた。 $\text{Al}(\text{OH})_3$ またはAS04 アジュバントのみを投与した動物においても投与部位の軽度～中等度の炎症がみられたが、ワクチン群よりも早期に消失し、範囲も狭かった。回復期間（4または13週間）後の病理組織学的検査では、回復過程にあることを示唆する筋線維の再生像が認められた。ラットおよびウサギの他の2つの反復筋肉内投与毒性試験においても、同様の所見が認められた。

AS04 アジュバントまたはワクチン群の血液学的検査において、好中球数およびフィブリノーゲンの高値が認められたが、投与後の炎症細胞動員の結果と考えられる。

ウサギ（ 58678 試験）では、ワクチン4回投与の13週間後に血小板数の低値（対照群値の36%）が観察された。しかしながら、骨髓（中枢機構）および網内系（末梢機構）に血小板数の低値に関連する所見は認められず、ワクチン群では血小板数以外の血液学的検査項目および一般状態は正常であったため、この所見の生物学的意義は不明である。この血小板数の低値の再現性および種特異性を検討するため、ウサギ（ 62369 試験）およびラットを用いて追加試験を実施した。その結果、ウサギの追加試験では、本ワクチンの臨床用量（1HD）またはその1/10量（1/10HD）を4回筋肉内投与しても血小板数の低値はみられず、再現性は確認されなかった。また、ラットに本ワクチン0.1mL（臨床用量の1/5量に相当）を4回筋肉内投与しても、全身毒性はみられず、血小板数に対する影響も認められなかった。以上のことから、ウサギにおいて臨床用量でみられた血小板数の低値が投与に関連した影響ではないと完全に否定することはできないが、この影響に毒性学的意義はないと結論付けられる。なお、本ワクチンをヒトに接種しても、血小板数に同様の影響は認められていない。さらに、臨床開発中に評価した他の生化学的および血液学的検査項目で、このような所見を示唆する変化は認められなかった（2.5.5.9 参照）。

本ワクチンおよびAS04 アジュバントのラットの雌受胎能、出生前および出生後の発生および生存性に対する影響を評価した。本試験で用いたワクチン量（臨床用量の1/5）により誘導される免疫応答を評価したところ、妊娠前および妊娠中の雌動物におけるワクチン曝露および善感が確認され、ワクチン投与母動物から胎児および出生児に抗体が移行することも確認された。

本ワクチンまたはAS04 アジュバントを交配前に投与しても、雌受胎能に悪影響はみられなかった。ワクチンの初回抗原刺激を受けた雌動物の全例が交尾し、妊娠した。ラットの性周期および生殖能にワクチンおよびアジュバントの影響はみられず、雌親動物の一般状態、体重および摂餌量にも悪影響は認められなかった。胚・胎児発生に対してもワクチン投与の影響はみられず、ワクチン群のおもな内臓および骨格検査所見の種類およびその発生数は対照群と同様であった。すべての妊娠雌が出生児を有し、離乳時までの出生児の生存性、発育および発達に障害は認められなかった。

本ワクチンはHPVの感染性ウイルス粒子とは異なり、VLPとして会合したL1蛋白のみからなるワクチンであり、HPV腫瘍性蛋白を含有せず腫瘍原性を有していないことから[Scheurer, 2005; Schiller, 2004]、がん原性試験を実施しなかった。

上述のように、HPV の非臨床安全性試験の主要な対象を本ワクチンと AS04 アジュバントとした。さらに、一般に使用されている $\text{Al}(\text{OH})_3$ アジュバントと AS04 アジュバントを区別する免疫賦活剤分子である MPL について、以下の試験を実施した (2.3.A.3.2.13 参照)。

- ラット単回投与毒性試験において MPL を腹腔内投与したところ、4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで忍容性は良好であった。
- ビーグル犬の反復静脈内投与毒性試験における無毒性量は 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ と推定された。ラットの反復静脈内投与毒性試験では、低用量 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) においてもわずかな影響がみられたが、MPL の免疫賦活作用と一致する変化であった。
- ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する試験、ラットの出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 (いずれの試験も皮下投与) において、無毒性量は最高用量の 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ と推定された。
- 細菌を用いる復帰突然変異試験および CHO 細胞を用いる染色体異常試験ならびに *in vivo* 小核試験において、MPL は遺伝毒性を示さなかった。

2.4.5. 総括及び結論

本ワクチン、AS04 アジュバントおよび MPL の薬理試験および毒性試験を実施した。さらに、MPL については薬物動態試験を 2 試験実施した。

効力を裏付ける試験では、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ に吸着させた MPL を含有する AS04 アジュバントが自然および獲得免疫応答の誘導において重要な役割を果たすことが示された。また、本ワクチンに含まれる AS04 アジュバントは、抗 L1 VLP 抗体および特異的な細胞性免疫応答の誘導を促進するとともにその持続性を高め、子宮頸部病変および子宮頸癌の進行に関連すると考えられる HPV の感染予防に重要であると考えられる

MPL の免疫賦活活性は、マウスでの *in vitro* および *in vivo* 試験ならびにヒトでの *in vitro* 試験において確認された。MPL による APC の成熟の誘導は、マウスでの *in vitro* および *in vivo* 試験の両方で確認された。これらの知見は、ヒトの PBMC または全血を用いた *in vitro* 試験においても確認された。また、ヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験において、MPL がヒト TLR4 受容体を介して末梢血単球を活性化し、ヒト TLR2 受容体はその作用に関与しないことが示された。

さらに、上述の 3 つの動物モデル試験において、AS04 アジュバントは MPL と同様の生物学的活性を同程度に誘導することが確認された。以上の試験成績より、AS04 アジュバントは、MPL と同様に抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な自然免疫の活性化において重要な役割を果たすことが結論付けられた。

本ワクチンによる液性および細胞性免疫の誘導活性は、アジュバント非添加または $\text{Al}(\text{OH})_3$ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンに比べて優れていることが、マウスおよびサルを用いた試験において確認された。マウスでの免疫原性試験では、抗 HPV-16 L1VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の強力かつ持続的な誘導あるいは抗ウイルス作用を有するサイトカインである $\text{IFN-}\gamma$ および

TNF- α の産生能を上昇が再現性よく確認された。重要な点として、本ワクチンは高い血清抗体価を誘導するだけでなく、抗体の保持に有用と考えられる免疫記憶B細胞の出現頻度も上昇させた。サルを用いた試験では誘導された抗体の機能を検討することが可能であり、本ワクチンはアジュバント非添加または Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと比較して、HPV-16 L1 VLP および HPV-18 L1 VLP の主要な中和エпитープに対する抗体価あるいは中和抗体価をより強く上昇させることが確認された。また、本ワクチン接種後に誘導される液性免疫応答および免疫記憶 B 細胞の出現頻度が、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと比較して高いことがヒトでも再現性よく確認されている[Giannini, 2006]。さらに、マウスでの免疫原性試験において、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの重量比は 1 : 25 : 2.5 (抗原 : Al(OH)₃ : MPL) が適切であることが示された。

安全性薬理試験は、本ワクチンおよび MPL について実施した。麻酔下の雄 Wistar ラットに、本ワクチンを臨床用量の 1/5 (0.1mL/匹) の容量で筋肉内投与しても、心血管系および呼吸系パラメータに対して投与に関連した影響は認められなかった。また、麻酔下の雄雌ビーグル犬に、MPL を 100 μ g/kg (臨床用量の AS04 アジュバントに含有される MPL の 50~100 倍に相当) までの用量で静脈内投与しても、心血管系および呼吸系パラメータに対して投与に関連した影響は認められなかった。

ラットに [¹⁴C]-MPL の 100 μ g/kg を静脈内および筋肉内投与したときの MPL 関連物質の薬物動態、分布および排泄試験を 2 試験実施した。MPL 関連物質は全身の特に脂肪と脾臓に分布し、おもに呼気を介して体外に排泄され、体内に残留した MPL 関連物質は低濃度であると考えられる。

本ワクチン、AS04 アジュバントおよび MPL の毒性試験を実施した。

本ワクチンの反復投与毒性試験をウサギで 4 試験、ラットで 1 試験実施した。これらの試験の結果、本ワクチンと AS04 アジュバントの忍容性は良好であり、再現性のある全身毒性の徴候は認められなかった。投与部位の炎症は限局的であり、可逆的であった。これらの試験では臨床用量の最高 3 倍の用量を投与したことから、局所反応の増強によると考えられた。

本ワクチンおよび AS04 アジュバントには、ウサギ反復投与試験の 1 試験(██████ 58678 試験、2.6.6.3.3 参照)において 4 回投与の 13 週間後に血小板数の低値が認められたことを除き、悪影響は認められなかった。この血小板数の低値と関連する他の所見は観察されておらず、ウサギ(██████ 62369 試験、2.6.6.3.4 参照)およびラット (2.6.6.3.5 参照) を用いて再現性および種特異性を検討した結果、ウサギでは再現性がみられず、ラットにおいて同様の変化が観察されなかったことから、血小板数の低値は毒性学的意義のない変化と結論付けられた。なお、臨床試験においても血小板数の低値は観察されていない。

試験に使用した用量は臨床用量を大きく超える量 (体重あたりでは最高 50 倍以上) であり、投与スケジュールも同様であったが、他に本ワクチンおよびアジュバントに関連する有害な全身

作用は認められなかった。さらに、本ワクチンおよびアジュバントは受胎能、出生前・後の発生に悪影響を及ぼさなかった。

本ワクチンおよびアジュバントに関するデータに加えて、一般に使用される $\text{Al}(\text{OH})_3$ アジュバントと AS04 アジュバントを区別する免疫賦活剤分子である MPL についても試験を実施し、MPL が臨床使用に際して安全であることを確認している。MPL に関する試験成績および結論は、MPL に関する試験を網羅的に再検討して、MPL がヒト用ワクチンの免疫賦活剤として適していると結論付けている Baldrick らの報告[Baldrick, 2002]と一致するものであった。さらに、Baldrick らは MPL による免疫応答刺激に関連した予想された毒性所見のみが認められたことを強調しており、これらの毒性所見により臨床用量に対する安全域が設定された[Baldrick, 2002]。

結論として、マウス、サル、ウサギおよびラットを用いて実施した薬理、薬物動態および毒性試験成績より、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンが動物モデルにおいて強力かつ持続的な特異的免疫応答を誘導することおよび安全性が高いことが示された。本ワクチンは全身毒性を示さなかった。炎症細胞の動員を誘導する製剤に予想された限局的で一過性の影響が認められたが、回復性を示した。投与部位の反応は、ワクチン抗原に対して免疫応答が起り、アジュバントによって増強されたことを示すものであった。これらの試験により、HPV 感染およびその臨床的な転帰に対する予防ワクチンとして、本ワクチンのヒトへの使用が支持される。

2.4.6. 参考文献

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000;25:187-91.

Baldrick P, Richardson D, Elliott G, et al. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002;35:398-413.

Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 1995;69:3959-63.

Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, et al. Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol.* 1996;70:960-5.

Coleman N, Birley HDL, Renton AM, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994;102:768-74.

Garçon N, Van Mechelen M, Wettendorff M. Chapter 10, Development and evaluation of AS04, a novel and improved adjuvant system containing MPL and aluminium salt. In: Schijns VEJC, O'Hagan DT, editor. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. London:Elsevier Academic Press, 2006:161-78.

Giannini SL, Hanon E, Moris P, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24:5937-49.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Eng J Med*. 1998;338:423-8.

Ho GYF, Studentsov Y, Hall CB, et al. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis*. 2002;186:737-42.

Jansen KU, Rosolowsky M, Schultz LD, et al. Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus-like particles protects rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine*. 1995;13:1509-14.

Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, et al. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology*. 1996;219:37-44.

Lacy MJ. Review of Cytokines and Chemokines Induced by MPL[®]. *In house report (RIBI Immunochem Research, Inc.)*. 2005;13-Oct:.

Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282:2085-8.

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection : biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15:727-46.

Schiller JT, Davies P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:343-7.

Shiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:14-9.

Suzich JA, Ghim S-J, Palmer-Hill FJ, et al. Systemic immunization with papillomavirux L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11553-7.

Tapping RI, Akashi S, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J Immunol*. 2000;165:5780-7.

Viscidi RP, Snyder B, Cu-Uvin S, et al. Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:283-8.