

ガーダシル水性懸濁筋注・同水性懸濁筋注シリンジ に関する資料

第2部(モジュール2) CTDの概要(サマリー)

2.4 非臨床試験に関する概括評価

MSD株式会社

目次

	頁
表一覧.....	2
1 非臨床試験計画概略.....	3
2 薬理試験.....	4
2.1 効力を裏付ける試験.....	4
3 薬物動態試験.....	6
4 毒性試験.....	7
4.1 緒言.....	7
4.2 単回投与毒性試験.....	8
4.3 反復投与毒性試験.....	8
4.4 遺伝毒性試験.....	9
4.5 がん原性.....	9
4.6 生殖発生毒性試験.....	9
4.7 局所刺激性試験.....	10
4.8 その他の毒性試験.....	11
5 総括及び結論.....	11
6 参考文献.....	12

表一覧

頁

表2.4: 1	アルミニウムアジュバント（非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩）を含有するメルク社製ワクチン一覧表	7
---------	--	---

1 非臨床試験計画概略

本非臨床試験概括は、V501（試験報告書では L-000931225 又は L-931225）ワクチン接種の承認申請の裏づけとなるものである。V501は、ヒトパピローマウイルス（HPV）6、11、16及び18型の遺伝子組換え主要カプシド（L1）タンパクの高度精製ウイルス様粒子（VLP）を基に作製された4価ワクチンである。各 L1タンパクは、それぞれの遺伝子組換え酵母を培養して作製され、自己集合して VLP 粒子を形成する。各型の VLP 粒子は精製後、独自に開発された非晶質のアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩（Merck アルミニウムアジュバント、MAA：以降、アルミニウムアジュバントと記載）へ吸着させた。吸着後、各型の VLP を混合し、4価の HPV VLP ワクチンとした。

V501は、HPV 6、11、16及び18型に起因する癌、前癌性又は異形成病変、生殖器の疣贅及び感染症の予防のための免疫感作を適用とする。V501は筋肉内に3回接種するが、2回目及び3回目の接種は初回接種のそれぞれ2ヵ月後及び6ヵ月後である。各回とも0.5 mLの溶液中に、6型、11型、16型及び18型のHPV L1 VLPが、それぞれ約20 µg、40 µg、40 µg及び20 µg含まれており、さらにアルミニウムアジュバント225 µgが含まれる。

V501は予想される免疫応答の他に特に影響を及ぼさなかったため、V501の薬理学的評価は、効力を裏付ける試験（免疫原性）に焦点を絞って行った。このことは、欧州医薬品審査庁（EMA）の「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」（Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines, CPMP/SWP/465/95）[\[資料4.3: 1\]](#) 及び世界保健機構（WHO）の「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」（Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines）[\[資料4.3: 2\]](#) の要件にも沿ったものである。V501の効力の裏づけは、3種の霊長類（アフリカミドリザル、チンパンジー及びアカゲザル）を用いた5件の非 GLP 試験により評価した。これらの試験の目的は、ワクチンによって HPV VLP 特異的な免疫応答が誘発されるか否かを判定し、免疫応答の持続性を検討すること、並びにワクチンが最適な免疫原性を得るのにアルミニウムアジュバントが必要か否かを判定することであった。これらの試験はまた、V501に含まれる4種の VLP の抗原性が同程度かどうか、また4価の製剤として混合した場合に、各型の VLP に対する免疫応答が、1価 VLP 製剤のワクチン接種の場合と同様であるかを判定するべくデザインされた。

V501の非臨床毒性は、ワクチンの非臨床及び臨床開発の異なる段階で実施された5試験により評価した。それらの試験は、マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験、マウスを用いた反復投与毒性試験、ラットを用いた生殖発生毒性試験及びウサギを用いた局所刺激性試験である。これらの5試験は GLP 適合条件下で実施し、また試験内容は EMA の「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」[\[資料4.3: 1\]](#)、並びに WHO の「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」[\[資料4.3: 2\]](#) に準拠した。

2 薬理試験

V501は予想される免疫応答の他には影響を及ぼさなかったため、V501の薬理的評価は、効力を裏付ける試験（免疫原性）に焦点を絞って行った。このことは EMEA の「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」 [資料4.3: 1] 及び WHO の「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」 [資料4.3: 2] にも沿っている。

2.1 効力を裏付ける試験

V501の個々の VLP 成分とこれらをすべて含む V501の免疫原性を、アフリカミドリザル、チンパンジー及びアカゲザルを用いた5件の非 GLP 試験で評価した。これらの試験は、ワクチンの免疫原性評価、並びに免疫原性の増強に関するアルミニウムアジュバントの必要性の判定を目的に計画された。これは、非臨床免疫原性試験において、アジュバントの免疫原性に対する効果の証明を推奨する、WHO の「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」 [資料4.3: 2] に合致したものである。免疫原性は、競合的ラジオイムノアッセイ法（cRIA 法） [資料4.3: 3]、競合的 Luminex™ イムノアッセイ法（cLIA 法） [資料4.3: 4] 又は競合的 ELISA 法（cEIA 法）により検討した。これらの試験では、各 HPV VLP 型を認識し、構造特異的なエピトープに結合することにより感染中和活性を示すモノクローナル抗体を用いた。感染防御効果については HPV 6、16及び18型に関する病態動物モデルがないため、非臨床試験ではこれらの HPV 型についての防御効果を示せなかった。一方 HPV 11型については異種移植動物の中和能試験モデル [資料4.3: 5] がある。この HPV 11型異種移植モデルにおいて、HPV 11型で免疫したヒト血清が、上皮組織における HPV 11型ウイルス感染の中和に用いられ、ヒト血清の cRIA 抗体価と HPV11型感染中和能について相関性が認められた [資料4.3: 6]。しかし、V501の全4種の HPV 型について、ヒトでの感染を反映する動物モデルが存在しないことから、非臨床試験では V501の免疫原性を適切な評価対象とした。

最初の免疫原性試験は、アカゲザルを用いて、VLP ワクチンに対する免疫応答を増強させるためにアルミニウムアジュバントが必要か否かを判定するために行われた [2.6.2.2.1.1項]。2群の動物に HPV16型1価 L1 VLP ワクチンを接種した。1群（3匹）にはアルミニウムアジュバントを含まない製剤を接種し、他の1群（3匹）にはアルミニウムアジュバントを含む製剤を接種した。各個体に3回接種（試験0、2及び6ヵ月）し、試験期間を通して複数の時点（ワクチン接種日及び各接種日の2週間後を含む）で採血した。6匹全例でワクチンに対する免疫原性が確認され、それは典型的なプライム・ブースト反応であった。アルミニウムアジュバント添加 HPV 16型製剤を接種した群では、HPV 16型 L1 VLP 特異的な中和抗体産生反応がアルミニウムアジュバント非添加製剤群と比較して顕著に高かった（3回目投与後2週間で16倍の差）。これらの結果は、ヒト以外の霊長類において、HPV 16型 L1 VLP 接種により HPV VLP 特異的な免疫応答が発現すること、並びにアルミニウムアジュバント添加の VLP ワクチン製剤は、免疫原性が著しく上昇することを示す。

第2の免疫原性試験は、チンパンジーを用いて実施した [2.6.2.2.1.2項]。本試験は、アカゲザル

と異なる霊長類において、VLP ワクチンに対する免疫応答を増強させるために、アルミニウムアジュバントが必要か否かを判定するために行われた。2群の動物に HPV 16型1価 L1 VLP ワクチンを接種した。1群 (2匹) にはアルミニウムアジュバントを含まない製剤を接種し、他の1群 (4匹) にはアルミニウムアジュバントを含む製剤を接種した。各個体に3回接種 (試験0、2及び6ヵ月) し、試験期間を通して複数の時点 (ワクチン投与日及び各投与日の2週間後を含む) で採血した。アルミニウムアジュバント非添加製剤群の1匹において、検出可能な血清免疫応答が認められなかった。その他の5匹全例ではワクチンに対する免疫原性が確認され、それは典型的なプライム・ブースト反応であった。さらに、アルミニウムアジュバント添加 HPV 16型製剤を接種した群では、HPV 16型 L1 VLP 特異的な中和抗体産生反応が、アジュバント非添加製剤群と比較して高かった (3回目接種後4週間で3.5倍)。この抗体価の差は6ヵ月間持続した (アルミニウムアジュバント添加 HPV 16型投与群の抗体価は、アルミニウムアジュバント非添加製剤群の2.9倍)。アルミニウムアジュバント添加製剤により HPV に対する免疫原性の増強がみられたことは、臨床の場でも効果増強に繋がる可能性が高いことを示している。

第3の免疫原性試験は、アフリカミドリザルを用いて、HPV18型1価 L1 VLP ワクチンに対する特異的な中和抗体産生反応を霊長類で確認するために行った [2.6.2.2.1.3項]。本試験では、4個体にアルミニウムアジュバント添加 HPV 18型1価 L1 VLP 製剤を3回接種 (試験0、2及び6ヵ月) した。初回接種後、各個体で測定可能な免疫応答が認められ、2回目及び3回目接種後には典型的な二次免疫応答が認められた。これらの結果は、HPV 18型 L1 VLP 製剤が HPV 16型 L1 VLP 製剤と同様に高い免疫原性を持つことを示す。

第4の免疫原性試験もアフリカミドリザルを用いて実施し、各 HPV 型を混合した4価の VLP 製剤として使用した場合に、各 VLP に対する免疫応答が1価 VLP 製剤の接種で得られる免疫応答と類似するかを判定するために行った [2.6.2.2.1.4項]。6~8匹の動物からなる5群に1価の HPV 6、11、16又は18型アルミニウムアジュバント添加 L1 VLP 製剤、あるいは4価の HPV 6、11、16及び18型アルミニウムアジュバント添加 L1 VLP 製剤をそれぞれ3回接種した。試験0、2及び6ヵ月の各回に、各個体に対し0.5 mL の製剤を筋肉内接種した。すべての動物 (34匹) で4種類すべての HPV VLP について、特異的抗体産生反応がみられた。この用法・用量により、典型的なプライム・ブースト反応が生じ、また各回接種後の経時的な抗体価減弱が認められた。しかし反復接種後には高い抗体価がより長期に持続した。すなわち初回又は2回目接種後の抗体価減少に比べ、3回目接種後の抗体価は長期にわたり緩やかに低下した。各1価ワクチンにより惹起された抗体価は、同用量の4価ワクチンによるものと比較して、同じオーダー内にあり、わずかながら上回ることもあった。産生された抗体が中和抗体であるかを確認するために、試験14週に採取した血清の一部を用いて、HPV 陰性の子宮頸癌細胞株である C33A 細胞に対する VLP 感染中和能を検討した [資料4.3: 7]。各群5匹の動物から血清を採取し、HPV 6、11、16又は18型の各 VLP の細胞侵入に対する4種類の疑似中和能試験に供したところ、いずれの血清も各 VLP 特異的に細胞侵入を阻害し、効果的な感染中和能を確認した。以上の結果は、多価ワクチン V501に含まれる4種類の VLP 成分の抗原性が、

各 VLP 型に対する個別の抗体産生反応と類似することを示す。さらに免疫応答のプロファイルは、VLP 侵入に関する疑似中和能試験で示されたように、各 HPV VLP 型に特異的に作用する中和抗体が惹起されるというものである。

第5の免疫原性試験は、アカゲザルを用いて免疫後に産生される抗体のクラス及びサブクラスを解析するために実施した [2.6.2.2.1.5項]。アルミニウムアジュバント添加又は非添加の4価 HPV L1 VLP ワクチン製剤 (HPV6、11、16及び18型) をそれぞれ5匹の動物に接種した。各個体に3回接種 (試験0、2及び6ヵ月) し、試験期間を通して複数の時点 (ワクチン接種日、各接種日の2週間後及び試験52週を含む) で採血した。10匹全例でワクチンの免疫原性が確認され、それは典型的なプライム・ブースト反応であった。アルミニウムアジュバント添加の4価製剤 (V501) を接種した群では、アルミニウムアジュバント非添加製剤群と比較して免疫応答が10~100倍高かった。総 IgG 産生反応及びそのアイソタイププロファイルを非競合的 LIA 法による最終希釈抗体価で評価した。HPV 6、11、16及び18型 L1 VLP に対する総 IgG 産生反応は、いずれの型についても類似した。3回接種後の総 IgG 最終希釈抗体価は、アルミニウムアジュバント添加の4価製剤 (V501) 群ではアルミニウムアジュバント非添加製剤群と比較して、全体的に約100倍高い値であった。IgG の全般的アイソタイププロファイルは、アジュバントの添加・非添加に関わらず同様の結果であった。このワクチンにより2型ヘルパーT細胞 (T_H2) 反応が優位に誘導され、高レベルの IgG1 及び IgG4が検出された。IgA レベルの上昇も認められ、生殖器の粘膜免疫を高める上での重要性も示された。これは、Lowe らにより HPV 11型 VLP を免疫したアフリカミドリザルの血清及び頸膈部の分泌物に、測定可能なレベルの VLP 特異的免疫応答が示されたことによっても支持される [資料4.3: 8]。

これらの結果を総合すると、アルミニウムアジュバント添加の4価ワクチン製剤 (V501) により、全4種類の HPV VLP 型 (6、11、16及び18型) に対して、顕著な抗体産生反応が誘導されることが示される。誘導された抗体プロファイルは、HPV 感染部位である生殖組織内及び周辺に認められるアイソタイププロファイルと一致する。アルミニウムアジュバントは、既に承認された他のいくつかのワクチンにも用いられており、その安全性が認められている [資料4.3: 9]。一連のアルミニウムアジュバントを評価した非臨床試験は、このアジュバントが長期に持続する局所又は全身性の有害作用を示すことなく、確実な抗 HPV 免疫応答の発現に重要な役割を果たすことを示しており、最終製剤である V501にアルミニウムアジュバントを使用する明確な根拠になっている。

3 薬物動態試験

V501に含まれる各型の VLP 及びアルミニウムアジュバントの吸収、分布、代謝及び排泄に関する試験は実施しなかった。EMA の「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」 [資料4.3: 1] によると、ワクチンの薬物動態試験は通常必要とされない。

このワクチンで使用したアルミニウムアジュバント（非晶質のアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩）についても、これまでにMerck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.（以下、米国本社）が開発した他のワクチンでも使用され [表2.4: 1]、安全性プロファイルが確立されているため [資料4.3: 9]、薬物動態試験は実施しなかった。

表2.4: 1 アルミニウムアジュバント（非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩）を含有するメルク社製ワクチン一覧表

ワクチン	アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩アジュバント含有量
RECOMBIVAX HB™ ‡ Heptavax®-II†（本邦商品名） （組換え沈降 B 型肝炎ワクチン、酵母由来）	～500 µg/1.0 mL 用量 （～250 µg/0.5 mL 小児用量） [資料4.3: 10] （日本では～500 µg/0.5 mL 用量）
LIQUID PEDVAXHIB™ § （ヘモフィルスインフルエンザ菌 b 型ワクチン－髄膜炎菌蛋白結合体、本邦未承認）	～225 µg/0.5 mL 用量 [資料4.3: 11]
COMVAX™ ¶ （ヘモフィルスインフルエンザ菌 b 型ワクチン－髄膜炎菌蛋白結合体－及び組換え沈降 B 型肝炎ワクチン－酵母由来－の混合ワクチン、本邦未承認）	～225 µg/0.5 mL 用量 [資料4.3: 12]
VAQTA™ # （A 型肝炎不活化ワクチン、本邦未承認）	～450 µg/1.0 mL 用量 （～225 µg/0.5 mL 小児用量） [資料4.3: 13]

‡ RECOMBIVAX HB™：米国本社

† Heptavax®-II：米国本社

§ LIQUID PEDVAXHIB™：米国本社

¶ COMVAX™：米国本社

VAQTA™：米国本社

4 毒性試験

4.1 緒言

V501の安全性は、マウス単回投与毒性試験、ラット単回投与毒性試験、マウス反復投与毒性試験、ラット生殖発生毒性試験（免疫原性試験を含む）及びウサギ局所刺激性試験にて評価した。これらの5試験はすべて GLP 適合条件下で、EMA の「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」 [資料4.3: 1] 及び WHO の「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」 [資料4.3: 2] に準拠して実施した。これらの試験により V501の非臨床安全性が広範に評価され、その成績は本ワ

クチンのヒトへの接種を裏付けるものである。

4.2 単回投与毒性試験

V501の単回投与毒性をマウス又はラットを用いた2種類のGLP試験で評価した [2.6.6.2項]。各動物にワクチンを単回筋肉内投与し (HPV 6、11、16、18型 L1 VLP 濃度をそれぞれ160、160、80、160 µg/mLとして、マウスには投与液量0.1 mL、ラットには投与液量0.2 mL)、その後14日間観察した。筋肉内投与は本ワクチンの臨床投与経路と同一であり、妥当なものとする。また14日間の試験期間は、ワクチンによる単回投与毒性 (急性毒性) を確認するのに十分な期間と考える。各試験の動物数は、各群雌雄それぞれ5匹とした。体重換算で十分な安全域を持つ用量設定ができるため、これら2種類のげっ歯類を単回投与毒性試験に用いた。ヒト用量と比較し (ヒトの体重を75 kgと仮定)、マウスには約1200倍、ラットには約300倍に相当する用量を投与した。その結果、ワクチンに対する良好な忍容性が認められ、14日間の観察期間中、死亡、一般状態及び体重に対して投与の影響は認められなかった。この2試験に加え、次項で述べる反復投与毒性試験でも単回投与後の毒性評価を行った。

4.3 反復投与毒性試験

マウスを用いたGLP試験において、V501の反復投与毒性を検討した [2.6.6.3項]。動物にワクチンを単回筋肉内投与 (試験1日) 又は3回筋肉内投与し (試験1、29及び57日)、64日間の観察を行った。ワクチンは、HPV 6、11、16、18型 L1 VLP をそれぞれ160、160、80、160 µg/mL含有するものを用いた。各マウスに各回0.1 mL (左右大腿四頭筋にそれぞれ0.05 mL) を投与した。V501の臨床投与経路は筋肉内注射であるので、この試験においても筋肉内への投与経路を選択した。投与回数は臨床の接種回数に準じており、また、本試験期間 (64日間) は、ワクチンの筋肉内への反復投与による毒性を評価するのに適正な期間であると考えた。本試験にマウスを用いることは、体重換算で大きな用量比の設定ができるため、V501のリスク評価に適していると考えた。さらに、本試験で選択したマウス系統 (BALB/c) は、本ワクチンに対する免疫応答が高いことで知られている [3.2.S.3.1-hpv 項]。

本試験では、体重換算 (ヒトの平均体重を75 kgと仮定) でヒト用量と比較し、約1450倍に相当する用量をマウスに投与した。動物は各投与群及び対照群とも十分な匹数を用いた (各群雌雄それぞれ15匹)。ワクチン投与の影響をプラセボ群と比較するため、アルミニウムアジュバントを投与するプラセボ対照群を設定した。試験8日に半数の動物を剖検し (単回投与後の中間解剖)、試験64日に残りの動物を剖検した (3回投与後の最終解剖)。本試験では、剖検と病理組織学的検査を含む反復投与毒性試験の各測定項目について評価を行った。一般状態、体重増加量、摂餌量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量について、投与に関連した変化は認められなかった。本試験の動物では、脳及び脊髄への毒性を含め、アルミニウムアジュバントによる身体的な毒性は認められなかった [資料4.3: 14]。中間及び最終解剖で投与に関連する腸骨リンパ節の腫大が認められた。病理組織学的検査では、中間及び最終解剖で腸骨リンパ節及び鼠径部リンパ節の過形成がみられた。さらに、中間及び最終解剖においてワクチン投与部位の筋肉に投与に関連す

る炎症が認められたが、アルミニウムアジュバントを用いたプラセボ対照群と比較すると、全体的な組織損傷としてはワクチン投与に関連した増大は認められなかった。これらの結果は、ワクチンとして予想されたものであり、免疫応答の進展を示すものである。

4.4 遺伝毒性試験

V501の遺伝毒性・変異原性評価は行わなかった。EMAの「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」 [資料4.3: 1] 及びWHOの「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」 [資料4.3: 2] によれば、ワクチンの遺伝毒性試験は要求されない。

4.5 がん原性

V501の腫瘍原性・がん原性の評価は行わなかった。EMAの「ワクチンの非臨床薬理試験及び毒性試験ガイダンス」 [資料4.3: 1] 及びWHOの「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」 [資料4.3: 2] によれば、ワクチンのがん原性試験は要求されない。

4.6 生殖発生毒性試験

雌ラットを用いたGLP試験において、V501の生殖発生毒性を評価した [2.6.6.6項]。本試験は、ラットの発生、成長、行動、生殖能及びF₁動物の受胎能に対するワクチン投与の影響を評価するために実施した。本ワクチンは、出産可能な年齢の女性に適用されるため、本試験は、本ワクチンの安全性総合評価の中の重要な部分を占める。本試験デザインはCBER/FDAドラフトガイダンス「感染症予防ワクチンの生殖毒性試験における留意点」(Considerations for Reproductive Toxicity Studies for Preventive Vaccines for Infectious Disease Indications) [資料4.3: 15] 及びICH S5Aガイドライン「医薬品の生殖発生毒性検出のための試験法ガイドライン」(ICH harmonised tripartite guideline: detection of toxicity to reproduction for medicinal products) [資料4.3: 16] に準拠した。本試験デザインに対してCBER/FDAの同意を得た後に、本試験を実施した。

本試験で選択したラット系統(Sprague-Dawley)は、本ワクチンに対する免疫応答が高いことが示されている [2.4.4.8項]。ヒトでの総投与量に相当するV501(容量0.5 mL中HPV 6、11、16、18型VLP濃度はそれぞれ40、80、80、40 µg/mL)を雌ラットの筋肉内に投与した。各投与では、ワクチン又はプラセボを各個体の左右大腿四頭筋にそれぞれ0.25 mL投与した(各回、個体あたり0.5 mL)。体重換算で比較すると、ラットへのワクチン投与量はヒトへの予定投与量の約300倍に相当する。ワクチン投与群は、次の2群を設定した: 交配5週間前及び2週間前、並びに妊娠6日及び授乳7日の計4回のワクチン投与群(ワクチン群2)、並びに妊娠6日及び授乳7日の計2回のワクチン投与群(ワクチン群1)。交配前に抗原刺激を受けたものと受けなかったものを分けて評価するため、この2群を設定した。妊娠期の投与は、着床期及び器官形成の開始期である妊娠6日に実施した。また授乳期のF₁動物に対する有害作用の有無を評価するために、授乳期間にも母動物にワクチンを投与した。さらに、これらワクチン群に対して対照群を2群設定した。すなわち、対

照群1としてリン酸緩衝生理食塩液、対照群2としてアルミニウムアジュバントを投与した。1群あたり最少44匹の動物を割り付け、半数（最少20匹）を帝王切開して定法による子宮及び胎児検査を行った。残りの動物（最少20匹）は自然分娩させ、F₁ 動物の発達を観察するために離乳時まで哺育させた。

F₀ 雌についてワクチン投与に関連する死亡、一般状態変化は認められなかった。交配前、妊娠中及び授乳期間中の平均体重増加量及び摂餌量に対する投与の影響も認められなかった。さらに、剖検時において、投与に関連した肉眼的変化も認められなかった。F₁ 動物について、着床前死亡率、着床後死亡率、各妊娠母体の平均着床数及び生存胎児数により胚又は胎児への影響、生存率を評価したところ、ワクチン投与の影響は認められなかった。雌雄比、肉眼的胎盤形状及び平均胎児体重についても投与に関連する影響は認められなかった。さらに、投与に関連する胎児の外表、内臓、頭部又は骨格の形態異常は認められなかった。F₁ 動物の出生時における外表形態、離乳前及び離乳後の一般状態及び生存率に対して、投与の影響は認められなかった。離乳前又は離乳後の F₁ 動物の平均体重についても投与に関連する影響は認められなかった。さらに、F₁ 動物の発育分化（膈開口又は包皮分離時期）、行動（受動的回避学習能及び記憶能、聴覚性驚愕馴化及びオープンフィールド自発運動能）、生殖能、並びに受胎能に対して、投与に関連する影響は認められなかった。

V501を妊娠ラットに単回又は反復筋肉内注射したところ、HPV 6、11、16及び18型に対する特異的抗体産生反応を誘発した。全4種の HPV 型に対する抗体は、妊娠期間中に F₁ 世代に移行した。また授乳期間中にも移行した可能性がある。受動的に移行した抗体は、離乳後の最終測定時である生後77日まで持続した。

4.7 局所刺激性試験

ワクチンの筋肉内投与による局所刺激性を、ウサギを用いて評価した [2.6.6.7項]。ウサギ16匹（雌雄各8匹）の仙棘筋の5カ所に、以下の製剤を各箇所0.5 mL ずつ単回筋肉内投与した（販売予定製剤は2番目）。

- 1) アルミニウムアジュバント
- 2) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (40/80/80/40 µg/mL L1 VLP)
- 3) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (80/80/80/80 µg/mL L1 VLP)
- 4) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (160/80/160/80 µg/mL L1 VLP)
- 5) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (160/160/80/160 µg/mL L1 VLP)

試験4日及び14日に、投与部位について肉眼的及び病理組織学的検査を行った。ワクチン製剤に対する良好な忍容性が認められた。14日間の観察期間中、投与に関連する死亡、一般状態変化及び体重への影響は認められなかった。投与局所に認められた病理組織学的変化の程度は軽微又は軽度であり、対照のアルミニウムアジュバントで認められたものと極めて類似していた。ウサギ

へのワクチン投与量は体重換算で比較すると、ヒトへの予定投与量の最大40倍に相当した。本試験は GLP 適合条件下で行われた。

4.8 その他の毒性試験

V501に関するその他の毒性試験として、ラットを用いた2種類の非 GLP 探索的免疫原性試験を実施した [2.6.6.8項]。これらの試験は、生殖発生毒性試験で用いた動物モデルにおいて、V501の免疫応答が誘発されたことを確認するため実施した。これら探索的試験において、本ワクチンがラットにおいて免疫原性を有すること、またワクチンに含まれる各 HPV 型に対する抗 HPV 抗体産生反応が認められることが示された。これらの結果は、ラットが V501投与に関連する毒性学的影響を評価するのに適した動物モデルであることを示す。

5 総括及び結論

この非臨床試験概括は、V501 (L-000931225又はL-931225) ワクチン接種の承認申請を裏付けるものである。V501はヒトパピローマウイルス (6、11、16、18型) の遺伝子組換えワクチンであり、HPV 6、11、16及び18型感染に起因する癌、前癌性又は異形成病変、生殖器の疣贅及び感染症の予防のための免疫に適用される。

V501の非臨床薬理試験は、アフリカミドリザル、チンパンジー及びアカゲザルを用いた5つの非 GLP 試験にて薬力学的作用を評価した。いずれの動物種においても、V501あるいは1価のワクチン成分の筋肉内接種により、ワクチン中の各 HPV VLP 型に対する抗体が産生され、明確な免疫応答が誘導された。これらの試験により、ワクチン抗原に対する免疫応答を増強させるのに、アルミニウムアジュバントが必要であることも示された。抗体のアイソタイプとしては、測定可能なレベルの IgA 及び IgG1が検出され、T_H2系の免疫応答を誘導することが示された。IgA は子宮頸部の分泌物中に認められ、IgG と共に重要な抗体のアイソタイプである。したがって、血清中に出現する抗体のプロファイルは、HPV 感染部位である生殖組織及びその周辺に認められる抗体アイソタイプのプロファイルと一致するものである。

V501は予想される免疫応答以外の影響を示さなかったため、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。V501が含有する各 VLP 型及びアジュバントの薬物動態試験は実施しなかった。これは、ワクチンの薬物動態試験は通常必要ではないという、WHO ガイドラインに従ったものである [資料4.3: 2]。さらに、本ワクチンで使用したアルミニウムアジュバント (非晶質のアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩) は、すでに他のワクチンで使用されているため、この薬物動態試験も実施しなかった。

毒性試験として、マウス単回投与毒性試験、ラット単回投与毒性試験、マウス反復投与毒性試

験、ウサギ局所刺激性試験及びラット生殖発生毒性試験（免疫原性試験を含む）からなる5件のGLP試験を実施し、V501の安全性について、広範な評価を行った。これら5試験すべてにおいて、本ワクチンは良好な忍容性を示し、投与に関連した影響も予想される免疫応答のみであった。以上、本項に記載の非臨床試験結果は、本ワクチンのヒトへの投与を支持するものであった。

6 参考文献

- 資料4.3: 1 The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95. 1997 Dec 17.
- 資料4.3: 2 World Health Organization. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Adopted by the 54th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization; 2003 Nov 17-21.
- 資料4.3: 3 Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, et al. Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine* 2001; 19: 3733-43.
- 資料4.3: 4 Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(1): 108-15.
- 資料4.3: 5 Bryan JT, Jansen KU, Lowe RS, Fife KH, McClowry T, Glass D, et al. Human papillomavirus type 11 neutralization in the athymic mouse xenograft system: correlation with virus-like particle IgG concentration. *J Med Virol* 1997; 53: 185-8.
- 資料4.3: 6 Brown DR, Bryan JT, Schroeder JM, Robinson TS, Fife KH, Wheeler CM, et al. Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis* 2001; 184: 1183-6.
- 資料4.3: 7 Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985; 119: 361-6.
- 資料4.3: 8 Lowe RS, Brown DR, Bryan JT, Cook JC, George HA, Hofmann KJ, et al. Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. *J Infect Dis* 1997; 176: 1141-5.
- 資料4.3: 9 Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines - US Perspective. *Vaccine* 2002; 20: S18-S23.

- 資料4.3: 10 U.S. Insert: RECOMBIVAX HB[®] (Merck) [Hepatitis B Vaccine (Recombinant)]: 2004 Aug.
[http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/13 Jul 2005.](http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/13%20Jul%202005)
- 資料4.3: 11 U.S. Insert: LIQUID PEDVAXHIB[®] (Merck) [Haemophilus b Conjugate Vaccine (Meningococcal Protein Conjugate)]: 2001 Jan.
[http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/13 Jul 2005.](http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/13%20Jul%202005)
- 資料4.3: 12 U.S. Insert: COMVAX[®] (Merck) [Haemophilus b Conjugate (Meningococcal Protein Conjugate) and Hepatitis B (Recombinant) Vaccine]: 2004 Aug.
[http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/ 13 Jul 2005.](http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/13%20Jul%202005)
- 資料4.3: 13 U.S. Insert: VAQTA[®] (Merck) (Hepatitis A Vaccine, Inactivated): 2004 Jul.
[http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/ 13 Jul 2005.](http://www.thomsonhc.com/pdrel/librarian/PFDefaultActionId/pdrcommon.IndexSearchTranslator/13%20Jul%202005)
- 資料4.3: 14 Anderson C. Memo to Ledwith B from Anderson C: Ten-week subacute intramuscular toxicity study in mice (TT #01-026-0): histologic findings in alum-injected animals. 2001 Oct 30.
- 資料4.3: 15 Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: considerations for reproductive toxicity studies for preventive vaccines for infectious disease indications: Draft Guidance. 2000 Aug.
- 資料4.3: 16 International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonised tripartite guideline: detection of toxicity to reproduction for medicinal products, S5A. 1993 Jun 24.