

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)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 —毒性—

MSD株式会社

目次

	頁
表一覧.....	2
1 まとめ.....	3
2 単回投与毒性試験.....	4
2.1 マウスを用いた単回投与毒性試験.....	4
2.2 ラットを用いた単回投与毒性試験.....	4
3 反復投与毒性試験.....	5
4 遺伝毒性試験.....	7
5 がん原性試験.....	7
6 生殖発生毒性試験.....	7
6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....	7
6.2 胚・胎児発生への影響に関する試験.....	8
6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....	11
7 局所刺激性試験.....	12
8 その他の毒性試験.....	12
8.1 ラットを用いた探索的免疫原性試験.....	12
8.1.1 非妊娠雌ラットを用いた初回探索的免疫原性試験.....	13
8.1.2 非妊娠雌ラットを用いた2回目の探索的免疫原性試験.....	14
9 考察及び結論.....	14
10 参考文献.....	16

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

表一覧

	頁
表2.6.6: 1 マウスを用いた反復投与毒性試験において認められた病理組織学的変化（試験番号TT #■■-026-0）	6

1 まとめ

ヒトパピローマウイルス（6、11、16、18型）遺伝子組み換えワクチン V501（試験報告書では L-000931225又は L-931225）の安全性を裏付けるための非臨床毒性試験として、マウス及びラットにおける単回投与毒性試験、マウスにおける反復投与毒性試験、ラットにおける生殖発生毒性試験及びウサギにおける局所刺激性試験を実施した [2.6.7.1項]。これら5試験は GLP 適合条件下で実施し、試験デザインは EMEA、WHO 及び CBER/FDA のガイダンスに準拠した [資料4.3: 1][資料4.3: 2][資料4.3: 15]。さらに、ラットを用いた探索的免疫原性試験を2件の非 GLP 試験として実施した [2.6.7.1項]。

V501の単回投与毒性は、マウス及びラットを用いた2つの GLP 試験において検討した [2.6.7.3項]。ヒト体重を75 kg と仮定し、体重換算でヒト投与量と比較すると、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、一般状態所見及び体重に対する投与の影響は認められなかった。

V501の反復投与毒性は、マウスを用いた GLP 試験において検討した [2.6.7.4項]。体重換算でヒト投与量の約1450倍に相当するワクチンを、約10週間の期間中に1回又は3回投与した。投与に関連する生前検査所見は認められなかった。腸骨リンパ節及び鼠径部リンパ節で、投与に関連する過形成が認められ、投与部位に投与に関連する筋肉の炎症が認められた。しかし、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）投与の対照群と比較して、ワクチン投与に関連する投与部位の全体的な損傷の増悪はみられなかった。これらの所見はワクチン接種に予測されるものであり、免疫応答の進展を示すものである。本試験ではアルミニウムアジュバントによる身体毒性の徴候は認められなかった [資料4.3: 14]。

雌ラットを用いた GLP 試験において V501の生殖発生毒性を検討した [2.6.7.5項]。本ワクチンは出産可能年齢の女性に適用されるため、生殖発生毒性試験は本ワクチンの非臨床安全性総合評価の中の重要部分を占める。試験デザインは CBER/FDA 及び ICH ガイドラインに準拠した [資料4.3: 15][資料4.3: 16]。V501のヒトでの総投与量に相当する量、すなわち体重換算ではヒト投与量の約300倍に相当する V501をラットに投与した。ワクチンを妊娠期間及び授乳期間に投与し、1群のラットには交配前にも2回投与した。F₀ 雌ラットにおいて、試験期間中（交配前、妊娠及び授乳期間中）に、死亡、一般状態所見、平均体重増加量及び摂餌量への影響は認められず、また、剖検時に投与に関連する肉眼的変化も認められなかった。胚・胎児の生存率、胎児体重並びに胎児の外表、内臓、頭部及び骨格形態の検査において、V501に関連する発生毒性は認められなかった。さらに、F₁動物の発育、行動、生殖能及び受胎能に投与の影響は認められなかった。妊娠期間中、4種の HPV すべての型に対する抗体が胎児に移行した。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、最終測定日の生後77日まで残存した。

V501ワクチンをウサギに筋肉内投与した GLP 試験において、その局所刺激性を評価した

[2.6.7.6項]。V501のヒトでの総投与量に相当する量、すなわち体重換算ではヒト投与量の40倍に相当する量を投与した。その結果、概して良好な忍容性が認められ、14日間の観察期間中、死亡、一般状態所見及び体重に対する影響は認められなかった。投与局所の病理組織学的反応は軽微又は軽度であり、アルミニウムアジュバント対照群の反応とよく類似していた。

その他の V501の毒性試験として、ラットにおける探索的免疫原性試験を非 GLP 試験として2件実施した [2.6.7.7項]。これらの試験は、生殖発生毒性試験に用いた動物モデルにおいて V501が免疫応答を誘発することを確認するために実施した。これらの探索的試験では、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を評価するのに適した動物モデルであることを示す。

2 単回投与毒性試験

CD-1マウス及び Sprague Dawley ラットを用いた GLP 試験において、V501の単回投与毒性を検討した。さらに、BALB/c マウスを用いた V501の単回投与毒性を、反復投与毒性試験 [2.6.7.4項]の中で詳細な剖検を含め評価を行った。

2.1 マウスを用いた単回投与毒性試験

10匹（雌雄各5匹）の CD-1マウスに、HPV 6、11、16及び18型 L1 VLP を各160、160、80及び160 µg/mL 含有する V501の0.1 mL（左右の大腿四頭筋にそれぞれ0.05 mL）を単回筋肉内投与した [2.6.7.2項]。これは体重換算でヒトへの投与量と比較した場合、約1200倍に相当する量である。

生前検査項目として、死亡及び一般状態を毎日観察し、週末及び休日には簡略化した観察を行った。体重を投与開始前とその後は週1回測定した。その結果14日間の観察期間中、死亡、一般状態所見及び体重に対する影響は認められなかった。したがって、検討した濃度のワクチンでは、マウスにおける概略の50%致死量（LD₅₀）は、>0.1 mL である [2.6.7.3項]。

2.2 ラットを用いた単回投与毒性試験

10匹（雌雄各5匹）の Sprague Dawley ラットに、HPV 6、11、16及び18型 L1 VLP を各160、160、80及び160 µg/mL 含有する V501の0.2 mL（左右の大腿四頭筋にそれぞれ0.1 mL）を単回筋肉内投与した [2.6.7.2項]。これは体重換算でヒトへの投与量と比較した場合、約300倍に相当する量である。

生前検査項目として、死亡及び一般状態を毎日観察し、週末及び休日には簡略化した観察を行った。体重を投与開始前とその後は週1回測定した。その結果ワクチンに対する良好な忍容性が認

められた。14日間の観察期間中に、死亡、一般状態及び体重について本ワクチンに関連した影響は認められなかった。したがって、検討した濃度のワクチンでは、ラットにおける概略の LD₅₀ は、>0.2 mL である [2.6.7.3項]。

3 反復投与毒性試験

BALB/c マウスを用いた10週間観察の反復投与毒性試験を GLP 適合条件下で実施し、V501の単回及び反復筋肉内投与による毒性を検討した [2.6.7.4項]。

ワクチン投与群の動物（雌雄各30匹）には、HPV 6、11、16及び18型 L1 VLP を各160、160、80及び160 µg/mL 含有する V501を、単回又は3回投与した [2.6.7.2項]。対照群の動物（雌雄各30匹）には、アルミニウムアジュバントを単回又は3回投与した。各投与時に、各個体の左右大腿四頭筋にワクチン又はプラセボを各50 µL 投与した（各回各個体100 µL）。体重換算で比較すると、マウスへのワクチン投与量はヒトへの予定投与量の約1450倍に相当した。

試験1日に、全例（各群雌雄それぞれ30匹）にワクチン又はアルミニウムアジュバントのいずれかを投与した。初回投与の1週間後（試験8日）に、各群雌雄それぞれ15匹から、血液学的検査用（各群雌雄それぞれ7匹）及び血清生化学検査用（各群雌雄それぞれ8匹）の血液を採取し、その後、剖検を行った。残りの動物（各群雌雄それぞれ15匹）には試験29及び57日に投与を行った（各個体に計3回の投与）。試験64日に、これらの各群雌雄それぞれ15匹から血液学的検査用（各群雌雄それぞれ7匹）及び血清生化学検査用（各群雌雄それぞれ8匹）の血液を採取し、その後、剖検を行った。

死亡及び一般状態について動物を毎日観察し、週末には簡略化した観察を行った。体重は投与開始前とその後は週1回測定した。摂餌量は、3日間の合計量として週1回測定した。剖検は、麻酔下で放血致死後実施した。全例について、包括的な検査対象リストに基づき、組織の採取及び検査を含む詳細な剖検を行った。計画剖検時には、安楽死させた動物全例の体重、並びに脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓及び精巣重量を測定した。アルミニウムアジュバント対照群及びワクチン投与群の組織切片については、定法による固定及び標本作製の後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、顕微鏡検査を行った。さらに、病理研究者の判断により、肉眼的病変が認められた組織も同様に標本作製し、染色の後顕微鏡検査を行った。

全例が計画剖検時まで生存した。一般状態、体重増加量、摂餌量、血液学的検査及び血清生化学検査において、投与に関連する変化は認められなかった。また、投与に関連する臓器重量の変化も認められなかった。中間剖検時及び最終剖検時ともに、投与に関連する腸骨リンパ節の腫大が肉眼的に認められた。[表2.6.6: 1] に示すとおり、リンパ節及び投与部位の筋肉に、投与に関連する病理組織学的変化が認められた。

表2.6.6: 1 マウスを用いた反復投与毒性試験において認められた病理組織学的変化
(試験番号 TT #01-026-0)

	発生数、n=15			
	雌		雄	
	アルミニウム アジュバント	V501 HPV 4価ワクチン 6/11/16/18型	アルミニウム アジュバント	V501 HPV4価ワクチン 6/11/16/18型
腸骨リンパ節 過形成				
中間解剖	1	15 ^a	0	14 ^a
最終解剖	1	15 ^a	0	15 ^a
鼠径部リンパ節 過形成				
中間解剖	2	12 ^a	1	9 ^a
最終解剖	0	9 ^a	0	8 ^a
投与部位 混合型炎症				
中間解剖	15	15 ^a	15	13
最終解剖	15	15 ^a	15	15 ^a

^a 発現又はその程度に基づき、ワクチン投与に関連すると判断された変化

[2.6.7.4項]

中間及び最終剖検時ともに、HPV ワクチンを投与した動物において投与に関連する軽微又は軽度の腸骨リンパ節及び鼠径部リンパ節過形成が認められた。これらの過形成は、顕著な胚中心を有する皮質濾胞と、しばしば髄索内の細胞数増加を伴う肥厚の特徴を示した。

[表2.6.6: 1] に示すとおり、本試験のほぼ全例において投与部位の筋肉に炎症が認められた。しかし、アルミニウムアジュバント対照群と比較して、中間剖検時にはワクチン投与群の雌で、最終剖検時にはワクチン投与群の雌雄で、炎症の程度がより高かった。アルミニウムアジュバント対照群では、最終剖検時に中等度の炎症が認められた1匹を除き、炎症は軽微又は軽度であった。ワクチン投与群における投与部位筋肉の炎症は、中間剖検時の雌、並びに最終剖検時の雌雄において、軽度又は中等度であった。中間剖検時のアルミニウムアジュバント対照群及びワクチン投与群における投与部位筋肉の炎症は、混合型の炎症細胞浸潤（ほとんどがマクロファージ及び好中球）によるものであった。これらの細胞は投与物質の周囲に浸潤し、好酸性顆粒状の凝集塊を呈していた。最終剖検時にも、中間剖検時と病理組織学的に同様の炎症が、対照群及びワクチン投与群の投与部位筋肉に認められた。このような変化は、恐らく直近に行われた投与によるものと思われた。さらに、投与物質がすべてマクロファージによって貪食された別の変化が、筋肉内に認められた。これらの変化は、ほぼ例外なく顆粒状物質を含む大型マクロファージから成り、早期の投与によるものと思われた。ワクチン投与群の数例において、筋肉への細胞浸潤の程度が

わずかに高かったが、全体的な投与部位の損傷は対照群を上回ることはなかった。中間剖検時及び最終剖検時ともに、アルミニウムアジュバント対照群及びワクチン投与群の全体的な損傷の程度は軽微又は軽度であった。

投与部位又は投与部位周囲の変化、あるいは局所リンパ節の変化以外に、本試験に用いた動物の組織に、問題となる病理組織学的変化は認められなかった。このことは、中間及び最終の両剖検に供されたワクチン投与群及びアルミニウムアジュバント対照群の動物、すなわちアルミニウムアジュバントが投与された動物すべてに当てはまる。したがって本試験では、アルミニウムアジュバントによる身体毒性(特に脳及び脊髄における)を示す所見はみられなかった [資料4.3: 14]。

以上より、BALB/c マウスに V501を単回又は3回(4週間間隔)筋肉内投与したところ、8日間(単回投与、中間解剖)又は64日間(3回投与、最終解剖)の試験期間中、良好な忍容性が認められた。死亡は認められず、また一般状態、体重増加量、摂餌量、血液学的検査又は血清生化学検査について、投与に関連する変化は認められなかった。また、臓器重量にも投与に関連する変化は認められなかった。中間及び最終剖検時に、投与に関連する腸骨リンパ節の腫大、並びに病理組織学的検査において投与に関連する腸骨リンパ節及び鼠径部リンパ節の過形成が認められた。さらに、両剖検時に、投与に関連する炎症が投与部位筋肉に認められたが、アルミニウムアジュバント対照群と比較して、ワクチン投与に関連する投与部位の全体的な損傷の増加は認められなかった。

4 遺伝毒性試験

V501の遺伝毒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ドライン」(CPMP/SWP/465/95) [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、通常、ワクチンの遺伝毒性試験は必要とされない。

5 がん原性試験

V501のがん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ドライン」(CPMP/SWP/465/95) [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、通常、ワクチンのがん原性試験は必要とされない。

6 生殖発生毒性試験

6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

次項に示す胚・胎児発生試験において、V501の受胎能及び初期胚発生に対する影響を評価した

[2.6.6.6.2項]。

6.2 胚・胎児発生への影響に関する試験

雌の Sprague Dawley ラットを用いた GLP 試験において、V501の胚・胎児発生に対する影響を試験した [2.6.7.5項]。本試験は、V501の筋肉内投与スケジュールとして、交配前抗原刺激ありの F₀ 雌ラットには、交配の5週間前及び2週間前並びに妊娠6日及び授乳7日にワクチンを投与し、交配前抗原刺激なしの F₀ 雌ラットには、妊娠6日及び授乳7日にワクチンを投与して、その F₁ 世代の発生、成長、行動、生殖能及び受胎能に対する影響を評価し、また F₀ 雌及び F₁ 世代における抗 HPV 抗体を測定することを目的として実施した。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」 [資料4.3: 15] に準拠した。

妊娠6日及び授乳7日に、1群65匹の雌ラットに V501を投与した（ワクチン群1）。また、各群雌ラット65匹から成る3群に、V501（ワクチン群2）、リン酸緩衝生理食塩液（対照群1）又はアルミニウムアジュバント（対照群2）を、交配5週間前及び2週間前並びに妊娠6日及び授乳7日にそれぞれ投与した。各投与時に、250 µL の V501又は対照物質を各個体の左右の大腿四頭筋に投与した（各回各個体500 µL）。各群雌65匹の内訳は、交尾用44匹、採血用15匹及び予備6匹とした。ワクチン製剤として、HPV 6、11、16及び18型 L1 VLP を、それぞれ40、80、80及び40 µg/mL 含有するものを用いた [2.6.7.2項]。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倍に相当した。

動物の死亡の有無を毎日観察した。一般状態の観察は、交配前及び交配期間中は週1回、妊娠0日並びに妊娠6日から屠殺時まで毎日実施した。さらに投与後1～5時間にも観察を行った。体重は、交配前期間中は週1回、交配後は妊娠0、6、8、10、12、14、16、18、20及び21日（必要に応じて妊娠22及び24日）、授乳0、3、7、10、14、17及び21日に測定した。また、摂餌量は、妊娠3～5日、6～8日、10～12日、14～16日、18～20日並びに授乳1～5日及び8～12日の間隔で測定した。遺伝性病変を有する動物を選別するために、投与開始前に1回、全例の眼科学的検査を行った。

妊娠21日に、各群22匹を二酸化炭素吸入により安楽死させ帝王切開の後、各個体の子宮を観察し、妊娠状態を調べ、黄体数を数えた。また、帝王切開を行った雌全例の胸部及び腹部臓器の肉眼的観察を行った。着床位置及び着床数を記録し、生存胎児、死亡胎児又は吸収胚に分類した。全胎児の体重測定及び外表観察を行い、胎盤についても肉眼的異常の有無を観察した。全胎児をペントバルビタールナトリウムの経口投与により安楽死させた。各母動物の胎児の半数について、剖検により内臓異常を観察し、ブアン固定した頭部のフリーハンドでの冠状切断により、頭部異常を観察した。また、全胎児の骨格異常の有無を検査した。

各群22匹を自然分娩させるため、妊娠21日から分娩終了までその徴候を観察した。出生日（生後0日）に、F₁ 動物について児数を調べ、外表異常の観察、体重測定、性別判定を行い、また識

別のため後肢にマーク付けした。生後3日に F₁ 動物の性別を確認し、可能な限り各腹雌雄それぞれ4匹となるよう児数を調整し、残りの F₁ 動物は安楽死させた。生後7、14及び21日に体重を測定し、性別を確認した。生後21日に各腹の F₁ 動物雌雄それぞれ2匹を母動物から離し、各ケージに雌雄各2匹ずつ収容し、残りの F₁ 動物を安楽死処分した。F₀ 雌全例を剖検し、胸部及び腹部臓器の肉眼的検査を行うとともに、子宮を観察して妊娠の状態を調べ、子宮筋層腺があれば計数した。

交配前5週間の投与前日及び交配初日に、非絶食下で、各群15匹の F₀ 雌の眼窩静脈叢から免疫原性検査用の血液を採取した。妊娠21日に同じ動物の後大静脈から採血を行った。さらに、これらの動物のうち、各群10匹の母動物を選択し、その胎児から採血を行った。胎児の血液は切断した臍帯血管から採取し、同腹ごとにプールした。

離乳後の観察用に選抜した F₁ 動物について、マイクロチップ埋め込みにより識別し、死亡の有無（毎日）及び一般状態（週2回）を観察した。離乳以降、交配又は屠殺時まで週1回体重を測定した。膈開口について、生後28日及びその後2日に1回、生後38日又は開口が認められるまで観察した。包皮分離について、生後38日及びその後2日に1回、生後50日又は分離が確認されるまで観察した。生後47～52日の間に1回、全例の眼科学的検査を行った。各同腹児の雌雄各1匹について、生後34～36日の間及びその1週間後に受動的回避能を観察し、生後61～65日の間に1回、聴覚性驚愕馴化検査を行った。また、各同腹児の別の雌雄各1匹について、生後68～70日の間に1回、オープンフィールドテストによって自発運動能を判定した。

生後12週に、同一群内で異腹児の F₁ 動物雌雄各1匹を最長20晩交配させた。交尾の成立した F₁ 雌の体重を妊娠0、7、14及び20日、並びに自然分娩後の授乳0日に測定した。F₁ 雄全例及び交配に使用しなかった F₁ 雌を生後15週又は16週に二酸化炭素吸入により安楽死させ、それ以上の検査等は実施しなかった。分娩した F₁ 雌を授乳0～4日の間（生後14週～17週）に二酸化炭素吸入により安楽死させ、子宮を観察し、着床痕を数えた。F₂ 新生児については、生後0日に児数を調べ、体重を測定し、性別を判定し、外表形成異常及び死亡の有無を観察した。生後0日に、全 F₂ 新生児を安楽死させ、それ以上の検査等は実施しなかった。

非絶食下の F₁ 動物から、生後21日に免疫原性試験用の血液を採取した（各群10腹からの同腹児雌雄各1匹）。生後77日にも各群雌雄それぞれ10匹から採血した（主に、生後21日採血の同腹児で、生殖能試験に用いなかった動物から採取）。採取した血液について、血清検体あたりの HPV 6、11、16及び18型に対する中和抗体の同時定量が可能な競合的イムノアッセイである、HPV quadriplex Luminex™ により測定した [資料4.3: 4]。このアッセイでは4種の蛍光 Luminex™ マイクロスフェア（それぞれ異なる蛍光特性により識別）と結合した、酵母由来のウイルス様粒子（VLP）を用いる。各 HPV 型に対する中和活性が確認されているモノクローナル抗体をフィコエリトリン（PE）標識し、この標識中和抗体と各ラット血清サンプルによる、VLP 上の構造的に感受性を示

す中和エпитープへの競合的な結合に基づいて、血清中の各抗体価を測定した。各 HPV 型について、標準血清を対照とし、4パラメータのロジスティック曲線を用いて、モノクロナール抗体の結合阻害を相対的に比較した。標準血清として、HPV 6、11、16又は18型のいずれかの VLP で免疫したアフリカミドリザルから採取したプール血清を用いた。標準血清には、milliMerck 単位 (mMU/mL) の値を付した。蛍光強度中央値 (MFI) として出されたデータを StatLIA ソフトウェアにより処理し、血清中抗体価を mMU/mL で表示した。

試験期間中、ワクチン投与に関連する F₀ 雌の死亡及び一般状態変化は認められなかった。交配前、妊娠及び授乳期間中、F₀ 動物の平均体重増加量及び摂餌量に対する投与の影響は認められなかった。また、剖検時に投与に関連する肉眼的変化は認められなかった。

妊娠動物あたりの着床前胚死亡率、着床後胚死亡率、並びに平均着床数及び生存胎児数により、胚及び胎児の生存を評価したところ、ワクチン投与の影響は認められなかった。また、F₁ 胎児の雌雄比、肉眼的胎盤形状及び平均胎児体重に、投与に関連する影響は認められなかった。さらに、胎児の外表、内臓、頭部及び骨格に、投与に関連する影響は認められなかった。

F₁ 動物の出生時における外表形態、並びに離乳前及び離乳後における一般状態及び生存に対する投与の影響は認められなかった。離乳前及び離乳後の F₁ 動物の平均体重に、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 (膈開口又は包皮分離の時期)、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)、並びに生殖能及び受胎能 (F₂ 動物の外表形態及び出生時の生存率を含む) に、投与に関連する影響は認められなかった。

全般に、リン酸緩衝生理食塩液又はアルミニウムアジュバントを投与した対照群 (対照群1及び2) において、いずれの時点でも、抗 HPV 6、11、16及び18型抗体産生反応は認められなかった。ワクチン群1及び2において、投与開始前に採取した血清中に抗 HPV 6、11、16及び18型抗体産生反応は認められなかった。交配1日にワクチン群2の F₀ 雌から採取した血清で、4種すべての HPV 型に対する抗体産生反応が認められた。両ワクチン群の F₀ 雌から妊娠21日に採取した血清についても、4種すべての HPV 型への抗体産生反応が認められた。予想どおりこの時点では、妊娠6日のみにワクチンを投与したワクチン群1の F₀ 雌 (mMU/mL 単位で表した抗体価の幾何平均値: HPV-6 = 182、HPV-11 = 128、HPV-16 = 1152、HPV-18 = 618) よりも、ワクチンを3回投与したワクチン群2の F₀ 雌 (HPV-6 = 694、HPV-11 = 902、HPV-16 = 4297、HPV-18 = 5219) の方に、より強い抗体産生反応が認められた。

ワクチン投与群の雌の臍帯から妊娠21日に採取した胎児血清中に、4種すべての HPV 型に対する抗体が検出された。したがって、抗 HPV 6、11、16及び18型抗体は、妊娠期間中に F₀ 雌から胎児に移行した。抗 HPV 6及び11型抗体の移行がもっとも高く (抗体価幾何平均値の胎児/F₀ 雌比 = 0.26~0.46)、抗 HPV 16及び18型抗体の移行は低かった (抗体価幾何平均値の胎児/F₀ 雌比 =

0.06～0.18)。

生後21日（授乳7日のV501追加投与の後）に、4種すべてのHPV型に対する抗体産生反応が両ワクチン群のF₀雌から採取した血清で検出され、各母動物のF₁動物の血清でも抗HPV 6、11、16及び18型抗体が検出された。生後21日にワクチン群1のF₁動物について測定した抗体価（mMU/mL単位で表した幾何平均値：HPV-6=1613、HPV-11=2445、HPV-16=16392、HPV-18=8429）は、妊娠21日に同群の胎児で測定した値（HPV-6=48、HPV-11=40、HPV-16=181、HPV-18=37）より明らかに高値であった。このようにワクチン群1においては授乳期間中F₀雌からF₁動物に抗HPV 6、11、16及び18型抗体が移行した。ワクチン群2のF₁動物について生後21日に測定した抗体価（HPV-6=127、HPV-11=66、HPV-16=209、HPV-18=237）は、同群の胎児で測定した値（HPV-6=275、HPV-11=399、HPV-16=777、HPV-18=309）と比較して、同程度又はわずかに低い値であった。さらに、ワクチン群2のF₀雌から採取した血清中の全4種のHPV型に対する抗体産生反応は、妊娠21日よりも授乳21日のほうが低かった。したがって、生後21日にワクチン群2のF₁動物に検出された抗HPV抗体が、胎盤移行の他に授乳により受動的に移行したかどうかは明確ではない。

生後77日に、両ワクチン群のF₁動物において抗HPV 6、11、16及び18型抗体が検出された。これらの抗体価は全般に、生後21日に測定したF₁動物の値と比較して、低値又は同程度であった。以上、妊娠中及び授乳中にF₁動物に移行した全4種のHPV型に対する抗体は、離乳後の生後77日まで持続した。

結論として、V501を2回（妊娠6日及び授乳7日）又は4回（交配5週間前及び2週間前と妊娠6日並びに授乳7日）筋肉内投与した。試験期間中、交配前の抗原刺激を受けたF₀雌及び受けなかったF₀雌のいずれにおいても、ワクチン投与に関連する影響は認められなかった。また、受胎能及びF₂世代の出生時外表観察の評価によると、F₁世代に対する投与に関連する影響も認められなかった。

V501をF₀雌ラットに1回又は複数回の筋肉内注射をしたところ、HPV 6、11、16及び18型特異的抗体産生反応を誘発した。4種すべてのHPV型に対する抗体は、妊娠あるいは授乳期間中に、恐らくそれぞれ胎盤及び母乳を介してF₁世代に移行した。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。

6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

前項 [2.6.6.6.2項] の胚・胎児発生毒性試験において、出生前後の発達に対するV501の影響を評価した。

7 局所刺激性試験

ニュージーランド白色ウサギを用いた GLP 試験において、V501の局所刺激性を評価した [2.6.7.6項]。ウサギ16匹（雌雄各8匹）の仙棘筋に、以下の製剤を各0.5 mL ずつ5ヵ所、単回筋肉内投与した。

- 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)
- 3) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (80/80/80/80 µg/mL)
- 4) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (160/80/160/80 µg/mL)
- 5) 4価 HPV 6、11、16及び18型ワクチン (160/160/80/160 µg/mL)

体重換算で比較すると、ウサギへのワクチン投与量は、ヒトへの予定投与量の40倍に相当した。動物の一般状態を毎日観察し、週末及び休日には簡略化した観察を行った。試験開始前及び試験4、7及び14日に体重を測定した。試験4及び14日に、それぞれ8匹（雌雄各4匹）にペントバルビタールナトリウム麻酔を施し、上腕動脈切断により放血致死させ、投与部位を摘出した。摘出した筋肉を10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、定法に従って光学顕微鏡検査用の標本を作製した。剖検対象は投与部位及びその筋肉のみとし、肉眼的及び病理組織学的検査を行った。

試験4日の剖検時に、対照のアルミニウムアジュバント投与部位を含む一部の投与部位筋肉に、蒼白又は赤色を呈する小領域が肉眼的に認められた。これらの肉眼的変化は、異なる濃度で被験物質を投与した部位とアルミニウムアジュバントを投与した部位で類似していた。投与部位で認められた肉眼的変化は、顕微鏡検査で認められた軽微又は軽度の限局性亜急性炎症、限局性出血、限局性の壊死あるいはそれに続く再生と対応した。これらの部位における損傷の程度は全般に軽微から軽度であった。仙棘筋を囲む正常な筋膜に直接隣接し投与部位を覆う深部皮下組織において、軽微又は軽度の限局的な亜急性炎症が認められた。皮下で認められた炎症は筋肉の炎症と類似した。異なる濃度でワクチンを投与した部位における顕微鏡的变化の程度及び全体的な損傷の程度は、アルミニウムアジュバント投与部位で認められた変化と同様であった。

以上より、V501をウサギに筋肉内投与した結果、軽微な刺激性変化が生じ、観察された変化はアルミニウムアジュバント投与による変化と同程度であった。ワクチン製剤に対する良好な忍容性が認められ、14日間の観察期間中、投与に関連する死亡、一般状態所見及び体重への影響は認められなかった。

8 その他の毒性試験

8.1 ラットを用いた探索的免疫原性試験

ラットを用いた非 GLP 探索的免疫原性試験を2試験実施した [2.6.7.7項]。これらの試験は、生

殖発生毒性試験に用いる動物モデルにおいて V501が免疫応答を誘発することを確認するために実施した。両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。

8.1.1 非妊娠雌ラットを用いた初回探索的免疫原性試験

生殖発生毒性試験に用いる Sprague Dawley ラットにおける V501の免疫原性を評価するための非 GLP 試験を実施した（試験番号 TT #02-706-6） [2.6.7.7項]。25週間の試験期間中に V501を2、3又は4回筋肉内投与し、その後4種の VLP 型それぞれに対する抗体価を測定し、免疫原性評価を行った。

用いた V501ワクチン製剤は、HPV6、11、16及び18型の L1 VLP をそれぞれ40、80、80及び40 µg/mL 含有した [2.6.7.2項]。各群5匹の雌ラットに、V501を第1群には2回（試験1及び11週）、第2群には3回（試験1、4及び14週）、第3群には4回（試験1、4、7及び17週）投与した。対照群の雌5匹に対しては、HPV VLP を除くすべての成分を含むプラセボ製剤を試験1、4、7及び17週に投与した（対照群1）。さらに別の雌5匹に、リン酸緩衝生理食塩液を試験1、4、7及び17週に投与した（対照群2）。各投与時に、ラットの左右大腿四頭筋にそれぞれ100 µL の被験物質又は対照物質を投与した（各回各個体200 µL）。

動物の死亡の有無を毎日観察し、一般状態を各投与日当日、投与後1～5時間及び体重測定日（週2回）に観察した。非絶食下のラットから、試験11週まで週1回ずつ並びに試験13、16、19、22及び25週に、免疫原性検査のため血液を採取した。競合的 HPV quadriplex Luminex™ イムノアッセイ [資料4.3: 4] を用いて血清試料を分析し、HPV6、11、16及び18型に対する HPV 型特異的抗体産生反応を評価した。

試験期間中、死亡及び投与に関連する一般状態変化は認められなかった。第3群（4回投与）の雌において、投与に関連する軽度の平均体重増加量減少が認められた（対照群1及び対照群2と比較してそれぞれ16%及び13%減）。

4価 HPV ワクチンは非妊娠雌ラットにおいて免疫原性を示し、ワクチン投与の3群で全例が4種すべての型の HPV VLP に対する特異的抗体産生反応を示した。この免疫応答は、典型的なプライム・ブースト効果と一致した。ワクチンを3週間間隔で3回投与し、3回目投与の10週間後に4回目の投与を行う投与方法により、各 HPV 型に対する最大の特異的抗体価が認められた。これらの結果は、V501がラットにおいて免疫原性があることを示す。

8.1.2 非妊娠雌ラットを用いた2回目の探索的免疫原性試験

2回目の探索的免疫原性試験は、ラットにおける免疫応答を確認し、他の試験に用いる陽性対照血清を得ることを目的として実施した（試験番号 TT #03-703-6） [2.6.7.7項]。本試験は非 GLP 試験として実施した。5匹の雌ラットからなる1群に、V501を3週間で2回、試験2日及びその21日後の試験4週に筋肉内投与した。各投与時に、各個体の左右大腿四頭筋にそれぞれ100 µL の被験物質を投与した（各回各個体200 µL）。用いた V501ワクチン製剤は、HPV6、11、16及び18型 L1 VLP をそれぞれ40、80、80及び40 µg/mL 含有した [2.6.7.2項]。

動物の死亡の有無を毎日観察し、一般状態を各投与日当日、投与後1～5時間及び体重測定日（週2回）に観察した。非絶食下のラットから、初回投与前（試験1日）及び最終投与の2週間後に免疫原性検査用の血液を採取した。競合的 HPV quadruplex Luminex™ イムノアッセイ [資料4.3: 4] を用いて、血清試料中の抗 HPV 型特異的抗体を定量した。試験期間中、死亡、一般状態所見及び体重増加量に対する影響は認められなかった。血清試料は、ワクチンに含有される各型に対する抗 HPV 抗体陽性を示し、他の試験における陽性対照として用いた。

9 考察及び結論

ヒトパピローマウイルス（6、11、16及び18型）の遺伝子組み換えワクチンである V501は、HPV6、11、16及び18型の遺伝子組み換え主要カプシド（L1）タンパクの高度精製ウイルス様粒子（VLP）から作製した4価ワクチンである。V501の安全性を裏付ける非臨床試験として、マウス及びラットにおける単回投与毒性試験、マウスにおける反復投与毒性試験、ラットにおける生殖発生毒性試験及びウサギにおける局所刺激性試験を行った。GLP 適合条件下で実施したこれら5試験の他に、非 GLP 試験として探索的免疫原性試験を2件実施した。すべての試験において、臨床投与経路である筋肉内に本ワクチンを投与した。ワクチン製剤は臨床試験で使用するものと類似又は同一のものを使用した。

V501の単回投与毒性はマウス及びラットにおいて評価した。本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、投与に関連する死亡、一般状態所見及び体重への影響は認められなかった。V501の反復投与毒性は、マウスに3回投与する10週間の試験において評価した。投与に関連する生前所見は認められなかった。投与に関連する病理所見であるリンパ節の過形成及び筋肉の炎症は、ワクチン投与では一般に予測されるものであり、免疫応答の進展を示すものと考えられた。本試験で用いた動物において、アルミニウムアジュバントによる身体的な毒性を示す所見は、脳及び脊髄における毒性を含めて認められなかった [資料4.3: 14]。ウサギを用いて V501の局所刺激性を評価したところ、全般に本ワクチンに対する良好な忍容性が得られ、14日間の観察期間中、投与に関連する死亡、一般状態所見及び体重への影響は認められなかった。投与局所の病理組織学的変化は、軽微又は軽度であり、アルミニウムアジュバントによる変化と類似した。

雌ラットを用いて V501 の生殖発生毒性を評価した。本ワクチンは出産可能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。本試験では、投与に関連する生前所見は認められず、投与に関連する剖検所見も認められなかった。胚・胎児の生存率、胎児体重並びに胎児の外表、内臓、頭部又は骨格形態の評価では、本ワクチンの発生毒性は認められなかった。さらに、F₁ 動物の発育分化、行動、生殖能及び受胎能に対して投与の影響は認められなかった。妊娠ラットに V501 を1回又は複数回筋肉内投与したところ、HPV6、11、16及び18型に対する特異的抗体産生が認められた。妊娠中に、全4種の HPV 型に対する抗体が F₁ 動物に移行した。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、離乳後の最終測定日である生後77日まで残存した。

ラットにおける V501 の探索的免疫原性試験を2試験実施した。これらの試験は、毒性試験に用いた動物種の Sprague Dawley ラットにおける免疫応答を確認することを目的に、非 GLP 試験として実施した。本ワクチンは非妊娠雌ラットにおいて免疫原性を示し、認められた免疫応答は、典型的なプライム・ブースト効果と一致した。これらの結果は、ラットが V501 の毒性評価に適した動物モデルであることを示す。

以上の試験から、V501 の非臨床安全性評価に関する広範な結果が得られた。全般に、本ワクチンに対する良好な忍容性が認められ、また投与に関連する影響としては、HPV 6、11、16及び18型 VLP に対する強い免疫応答のみであった。EMA 及び WHO のガイダンス [資料4.3: 1] [資料4.3: 2] によれば、ワクチンの遺伝毒性及びがん原性に関する試験は必要とされないため、V501 に関するこれら試験は実施しなかった。結論として、以上に述べた非臨床試験は、ヒトに対する本ワクチン投与の安全性を裏付けるものであった。

10 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: 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: 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.

目次

	頁
1 毒性試験：一覧表	2
2 毒性試験：被験物質一覧	5
3 単回投与毒性試験	11
4 反復投与毒性試験	12
5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	15
6 局所刺激性試験	23
7 その他の毒性試験	24

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

1 毒性試験：一覧表

Overview (1/3)

Test Article: V501 (L-000931225)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administra- tion	Duration of Dosing	Doses	GLP Compl- iance	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity	Mouse/ CD-1 Rat/ Sprague- Dawley	IM	Single dose with a 14-day observation period	100 µL per mouse and 200 µL per rat of 160/160/80/160 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	Yes	MRL-WP	[資料4.2.3.1.1: TT■2667, TT■2668]
Repeat-Dose Toxicity	Mouse/ BALB/c	IM	1 or 3 doses, spaced 4 weeks apart, with an observation period of 64 days	100 µL per dose of 160/160/80/160 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	Yes	MRL-WP	[資料4.2.3.2.1: TT■0260]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Sprague- Dawley	IM	Four doses (5 and 2 weeks prior to cohabitation, and on GD 6 and LD 7) or 2 doses (GD 6 and LD 7)	0.5 mL per dose of 40/80/80/40 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	Yes	MRL-WP	[資料 4.2.3.5.2.1: TT■7030]

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

1 毒性試験：一覧表

Overview (2/3)

Test Article: V501 (L-000931225)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administra- tion	Duration of Dosing	Doses	GLP Compl- iance	Testing Facility	Study Number
Local Tolerance	Rabbit/ New Zealand White	IM	Single dose with a 14-day observation period (necropsy on Days 4 and 14)	0.5 mL per rabbit of 40/80/80/40 µg/mL or 80/80/80/80 µg/mL or 160/160/80/160 µg/mL or 160/80/ 160/80 µg/mL of HPV 6/11/16/18 VLPs	Yes	MRL-WP	[資料4.2.3.6.1: TT■2669]
Other Toxicity Studies Exploratory immunogenicity	Rats/ Sprague-Dawley (Nonpregnant females only)	IM	2, 3, or 4 doses over 25 weeks	0.2 mL per dose of 40/80/80/40 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	No	MRL-WP	[資料4.2.3.7.7.1: TT■7066]

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

1 毒性試験：一覧表

Overview (3/3)

Test Article: V501 (L-000931225)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administra- tion	Duration of Dosing	Doses	GLP Compl- iance	Testing Facility	Study Number
Other Toxicity Studies (Continued) Exploratory immunogenicity	Rats/ Sprague-Dawley (Non-pregnant females only)	IM	2 doses spaced 3 weeks apart, with an observation period of 5 weeks	0.2 mL per dose of 40/80/80/40 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	No	MRL-WP	[資料4.2.3.7.7.2: TT-7036]
IM = Intramuscular. MRL-WP = Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, U.S.A. GD = Gestation Day. LD = Lactation Day. VLP = Virus-Like Particle.							

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2 毒性試験：被験物質一覧

Drug Substance (1/6)

Test Article: V501 (L-000931225)

Batch No.	Corresponding Lot #	Potency, Sterility and Purity Measures	Proposed Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
L-000931225-003W001 003W002	V501VAI015-K001	In Vitro Relative Potency HPV Type 6 HPV Type 11 HPV Type 16 HPV Type 18 Sterility Endotoxin (sampled at beginning, middle, end of fill)	 80-240 µg/mL 80-240 µg/mL 40-120 µg/mL 80-240 µg/mL No growth ≤10 EU/mL	 131 µg/mL 126 µg/mL 80 µg/mL 146 µg/mL No growth <0.5 EU/mL	 [資料4.2.3.1.1: TT ■■■2667, TT ■■■2668] [資料4.2.3.6.1: TT ■■■2669] [資料4.2.3.2.1: TT ■■■0260]	Single-Dose Toxicity in Mice & Rats, Local Tolerance in Rabbits, and Repeat-Dose Toxicity in Rats

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2 毒性試験：被験物質一覧

Drug Substance (2/6)

Test Article: V501 (L-000931225)

Batch No.	Corresponding Lot #	Potency, Sterility and Purity Measures	Proposed Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
<u>L-000931225-001S001</u>	V501VAI014-1001	In Vitro Relative Potency HPV Type 6 HPV Type 11 HPV Type 16 HPV Type 18 Sterility Endotoxin (sampled at beginning, middle, end of fill)	 20-60 µg/mL 40-120 µg/mL 40-120 µg/mL 20-60 µg/mL No growth ≤10 EU/mL	 39 µg/mL 74 µg/mL 84 µg/mL 40 µg/mL No growth <0.5 EU/mL	 [資料4.2.3.6.1: TT■2669]	 Local Tolerance

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2 毒性試験：被験物質一覧

Drug Substance (3/6)

Test Article: V501 (L-000931225)

Batch No.	Corresponding Lot #	Potency, Sterility and Purity Measures	Proposed Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
<u>L-000931225-001U001</u>	V501VAI014-J001	In Vitro Relative Potency HPV Type 6 HPV Type 11 HPV Type 16 HPV Type 18 Sterility Endotoxin (sampled at beginning, middle, end of fill)	 40-120 µg/mL 40-120 µg/mL 40-120 µg/mL 40-120 µg/mL No growth ≤10 EU/mL	 72 µg/mL 69 µg/mL 86 µg/mL 77 µg/mL No growth <0.5 EU/mL	 [資料4.2.3.6.1: TT■2669]	Local Tolerance

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2 毒性試験：被験物質一覧

Drug Substance (4/6)

Test Article: V501 (L-000931225)

Batch No.	Corresponding Lot #	Potency, Sterility and Purity Measures	Proposed Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
<u>L-000931225-004Y001</u>	V501VAI016-L001	In Vitro Relative Potency HPV Type 6 HPV Type 11 HPV Type 16 HPV Type 18 Sterility Endotoxin (sampled at beginning, middle, end of fill)	 80-240 µg/mL 40-120 µg/mL 80-240 µg/mL 40-120 µg/mL No growth ≤10 EU/mL	 183 µg/mL 73 µg/mL 164 µg/mL 83 µg/mL No growth <0.5 EU/mL	 [資料4.2.3.6.1: TT■2669]	 Local Tolerance

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2 毒性試験：被験物質一覧

Drug Substance (5/6)

Test Article: V501 (L-000931225)

Batch No.	Corresponding Lot #	Potency, Sterility and Purity Measures	Proposed Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
<u>L-000931225-001S003</u>	V501VAI025-T003	In Vitro Relative Potency				
		HPV Type 6	≥20 µg/mL	39 µg/mL	[資料4.2.3.5.2.1: TT-7030]	Developmental and Reproductive Toxicity Study in Rats
		HPV Type 11	≥40 µg/mL	86 µg/mL		
		HPV Type 16	≥40 µg/mL	94 µg/mL		
		HPV Type 18	≥20 µg/mL	54 µg/mL		
		Sterility	No growth	No growth		
		Endotoxin (sampled at beginning, middle, end of fill)	≤10 EU/mL	<10 EU/mL		

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2 毒性試験：被験物質一覧

Drug Substance (6/6)

Test Article: V501 (L-000931225)

Batch No.	Corresponding Lot #	Potency, Sterility and Purity Measures	Proposed Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
<u>L-000931225-001S002</u>	V501VAI018-1001	In Vitro Relative Potency				
		HPV Type 6	≥20 µg/mL	51 µg/mL	[資料4.2.3.7.7.1: TT-7066] [資料4.2.3.7.7.2: TT-7036]	Exploratory Immunogenicity Studies in Rats
		HPV Type 11	≥40 µg/mL	89 µg/mL		
		HPV Type 16	≥40 µg/mL	96 µg/mL		
		HPV Type 18	≥20 µg/mL	37 µg/mL		
		Sterility	No growth	No growth		
		Endotoxin (sampled at beginning, middle, end of fill)	≤10 EU/mL	<10 EU/mL		

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

3 単回投与毒性試験

Test Article: V501 (L-000931225)

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse/CD-1 Rat/ Sprague-Dawley	IM	100 µL per mouse and 200 µL per rat of 160/160/80/160 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 A single dose was administered with a 14-day observation period.	5 F and 5 M/ group	N/A	>100 µL/ mouse >200 µL/ rat	Mouse: No observed toxicity. aLD ₅₀ >100 µL of 160/160/80/160 µg/mL. Rat: No observed toxicity. aLD ₅₀ >200 µL of 160/160/80/160 µg/mL.	[資料4.2.3.1.1: TT 2667, TT 2668]
IM = Intramuscular. F = Female. M = Male. N/A = Not applicable.							

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

4 反復投与毒性試験

Report Title: Ten-Week Subacute Intramuscular Toxicity Study
in Mice (1/3)

Test Article: V501 (L-000931225)

Species/Strain: Mouse/BALB/c Initial Age: 66 days Date of First Dose: 21-Feb-2001 NOAEL = >100 µL of 160/160/80/160 µg/mL of HPV VLPs from types 6/11/16/18 following up to 3 doses administered approximately 4 weeks apart Special Features: None	Duration of Dosing: 1 or 3 doses spaced 4 weeks apart Duration of Postdose: 8 days or 64 days Method of Administration: Intramuscular Vehicle: Merck Aluminum Adjuvant Formulation: See below	Study No.: [資料4.2.3.2.1: TT 0260] GLP Compliance: Yes
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------

HPV Quadrivalent Vaccine and Placebo Formulations

Ingredient ^a	HPV Quadrivalent Vaccine Lot #L-931225-003W002	Merck Aluminum Adjuvant Placebo Control Lot #L-931224-000F002
	Concentration (µg/mL)	Concentration (µg/mL)
HPV 6/11/16/18	160/160/80/160	Not applicable
Aluminum	788	900
Sodium chloride	18,700	18,700
L-histidine	1,550	1,550
Polysorbate 80	150	100

^a Prepared in water for injection.

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

4 反復投与毒性試験

Study No.: [資料4.2.3.2.1: TT 0260] (Continued) (2/3)

Dose Group	Single Dose ^a				Three Doses ^b			
	Control (L-000931224)		L-000931225		Control (L-000931224)		L-000931225	
Number of Animals	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g, Week 1/Week 9)	20.4	24.3	-0.5 ^a	+0.4 ^a	23.9	28.6	-1.7 ^a	+0.3 ^a
Food Consumption (g/day, Week 1/Week 9)	5.4	5.6	0 ^a	0 ^a	5.2	5.5	0 ^a	1.8 ^a
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
F = Female. M = Male. g = Grams. ^a Percent change from control group. - = No noteworthy findings.								

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

4 反復投与毒性試験

Study No.: [資料4.2.3.2.1: TT 0260] (Continued) (3/3)

Dose Group	Single Dose				Three Doses			
	Control (L-000931224)		L-000931225		Control (L-000931224)		L-000931225	
Number of Animals	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Gross Pathology								
Iliac lymph nodes								
Enlargement								
Interim (Study Day 8)	-	-	P	P	-	-	P	P
Final (Study Day 64)	-	-	P	P	-	-	P	P
Histopathology								
Lymph Nodes								
Iliac								
Hyperplasia	1	0	15 ^a	14 ^a	1	0	15 ^a	15 ^a
Inguinal								
Hyperplasia	2	1	12 ^a	9 ^a	0	0	9 ^a	8 ^a
Injection site								
Quadriceps muscles								
Mixed inflammation	15	15	15 ^a	13	15	15	15 ^a	15 ^a
- = No noteworthy findings. P = Present (treatment-related changes). ^a Treatment-related change based on incidence and/or severity.								

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

Report Title: Intramuscular Developmental Toxicity and Immunogenicity Study in Rats With Postweaning Evaluation (1/8)

Test Article: V501 (L-000931225)

Design similar to ICH 4.1.2? Yes Design similar to ICH 4.1.3? Yes Species/Strain: Rat/Sprague Dawley Initial Age: ~5 weeks Date of First Dose: 28-Apr-2003 Special Features: None No Observed Adverse-Effect Level: F ₀ Females: 4 doses F ₁ Generation: 4 doses	Duration of Dosing: 5 and 2 weeks pre mating, GD 6, and LD 7; or GD 6 and LD 7 Day of Mating: GD 0 Day of C-Section: GD 21 Method of Administration: IM Dose Volume: 250 µL/quadriceps (500 µL/rat/dose) Vehicle: Phosphate buffered saline, Merck Aluminum Adjuvant Formulation: See below Litters culled/not culled: Culled to 4/sex/litter	Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT ■ 7030] GLP Compliance: Yes
GD = Gestation Day. LD = Lactation Day. IM = Intramuscular.		

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験一胎・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (2/8)

HPV Quadrivalent Vaccine and Placebo Formulations

Ingredient ^a	HPV Quadrivalent Vaccine Lot # L-000931225-001S003	Merck Aluminum Adjuvant Placebo Control Lot # L-000931224-000F004
	Concentration (µg/mL)	Concentration (µg/mL)
HPV 6/11/16/18	40/80/80/40	Not applicable
Aluminum	450	450
Sodium chloride	18,700	18,700
Sodium borate	70,000	70,000
L-histidine	1,550	1,550
Polysorbate 80	100	100

^a Prepared in water for injection.

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験—胚・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (3/8)

	Control Group 1 (PBS)	Control Group 2 (MAA)	Vaccine Group 1 (2 doses)	Vaccine Group 2 (4 doses)
<u>F₀ Females:</u>				
No. of Mated Females	44	44	44	44
No. Pregnant at C-section	20	21	22	20
No. Pregnant that Delivered	22	22	22	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Clinical Observations	!	!	!	!
Necropsy Observations	!	!	!	!
Gestation Body Weight (% ^a)	145	146	-2.7	-1.4
Lactation Body Weight (% ^a)	24	32	-34	-9.4
Gestation Food Consumption (% ^b)	29	31	!	!
Lactation Food Consumption (% ^b)	57	58	!	!
Mean No. Corpora Lutea	16.7	16.7	16.6	16.3
Mean No. Implantations	15.9	15.9	15.7	15.3
Mean % Peri-implantation Loss (LM)	4.5	4.7	5.1	5.9
Mean Duration of Gestation (days)	22.1	22.1	22.4	22.3
Abnormal Parturition	!	!	!	!
<p>^a Control values are the mean absolute gains from GD 6 to 21 or from LD 0 to 21. Treatment group values are the percent change from Control 2.</p> <p>^b Control values are the average maternal food consumption taken on GD 20 or LD 12. Treatment group values are the percent change from Control 2.</p> <p>LM = Litter Mean. PBS = Phosphate Buffered Saline. MAA = Merck Aluminum Adjuvant (placebo control).</p> <p>- = No noteworthy findings.</p>				

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (4/8)

	Control Group 1 (PBS)	Control Group 2 (MAA)	Vaccine Group 1 (2 doses)	Vaccine Group 2 (4 doses)
<u>Litters (C-sectioned females):</u>				
No. Live Fetuses per Pregnant Female	15.4	15.3	14.8	14.7
Mean % Resorptions/Implants (LM)	3.2	3.6	3.4	4.0
Mean % Dead Fetuses/Implants (LM)	0	0	1.9	0
Mean % Postimplantation Loss (LM)	3.2	3.6	5.3	4.0
Mean Fetal Body Weight (g, female/male, LM)	4.79/5.11	4.84/5.15	4.84/5.11	4.83/5.10
Mean Sex Ratios (% males, LM)	47	49	50	47
Fetal Anomalies:				
Gross External	!	!	!	!
Visceral Anomalies	!	!	!	!
Skeletal Anomalies	!	!	!	!
LM = Litter Mean.				
– = No noteworthy findings.				

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (5/8)

	Control Group 1 (PBS)	Control Group 2 (MAA)	Vaccine Group 1 (2 doses)	Vaccine Group 2 (4 doses)
F1 Litters (Prewaning)				
No. Litters Evaluated	22	22	22	21
Mean No. Live Pups/Litter on PND 0	15.2	15.4	14.5	16.0
Mean % Dead Pups/Litter on PND 0 (LM)	1.4	0.5	0.8	0.6
Mean % Pup Deaths from PND 1 to 3 (LM)	0.5	0	0.9	3.0
Mean % Pup Deaths from PND 4 to 21 (LM)	0.6	1.7	1.1	1.8
Pup Body Weight on PND 0 (g, female/male)	6.04/6.43	5.85/6.22	6.11/6.47	5.99/6.33
Pup Body Weight on PND 21 (g, female/male)	51.5/53.2	52.0/53.5	52.8/54.6	53.1/55.2
Pup Sex Ratio (% males)	56	53	47	45
Pup Clinical Observations	–	–	–	–
PND = Postnatal Day.				
LM = Litter Mean.				
– = No noteworthy findings.				

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (6/8)

	Control Group 1 (PBS)	Control Group 2 (MAA)	Vaccine Group 1 (2 doses)	Vaccine Group 2 (4 doses)
F1 Males (Postweaning)				
No. Evaluated Postweaning	44	44	44	42
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Body Weight Change (% ^a)	371	372	-3.0	-1.9
Mean Age of Preputial Separation (days)	47.0	46.8	46.3	46.0
Sensory Function	–	–	–	–
Motor Activity	–	–	–	–
Learning and Memory	–	–	–	–
Mean No. Days Prior to Mating (4-day periods)	1.33	1.10	1.14	1.29
Percent Fertile Males	100	100	100	100
^a Control values are the mean absolute gains from Postweaning Week 1 to 8. Treatment group values are the percent change from Control 2. PND = Postnatal Day. LM = Litter Mean. – = No noteworthy findings.				

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (7/8)

	Control Group 1 (PBS)	Control Group 2 (MAA)	Vaccine Group 1 (2 doses)	Vaccine Group 2 (4 doses)
F1 Females (Postweaning)				
No. Evaluated Postweaning	44	43	44	42
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Premating Body Weight Change (% ^a)	187	200	-6.5	-1.5
Gestation Body Weight on GD 20 (g)	421	441	411	434
Mean Age of Vaginal Opening (days)	32.7	32.7	32.4	31.9
Sensory Function	–	–	–	–
Motor Activity	–	–	–	–
Learning and Memory	–	–	–	–
Mean No. Days Prior to Mating (4-day periods)	1.33	1.10	1.14	1.29
No. of Females Sperm-Positive	21	21	21	21
No. of Pregnant Females	21	21	21	21
Mean No. Implantations	16.8	18.0	15.8	16.7
% Postimplantation Survival (LM)	91.9	93.1	92.6	92.5
^a Control values are the mean absolute gains from Postweaning Week 1 to 8. Treatment group values are the percent change from Control 2.				
LM = Litter Mean.				
– = No treatment-related findings.				

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

5 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

Study No.: [資料4.2.3.5.2.1: TT 7030] (Continued) (8/8)

Immune Response to Vaccine Antigens																
	Control Group 1 (PBS) Serotype-Specific GeoMean Antibody Titer (mMU/mL) ^a				Control Group 2 (MAA) Serotype-Specific GeoMean Antibody Titer (mMU/mL) ^a				Vaccine Group 1 (2 doses) Serotype-Specific GeoMean Antibody Titer (mMU/mL) ^a				Vaccine Group 2 (4 doses) Serotype-Specific GeoMean Antibody Titer (mMU/mL) ^a			
	HPV-6	HPV-11	HPV-16	HPV-18	HPV-6	HPV-11	HPV-16	HPV-18	HPV-6	HPV-11	HPV-16	HPV-18	HPV-6	HPV-11	HPV-16	HPV-18
Pretest F ₀ Female	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cohabitation (Day 1) F ₀ Female	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,033	1,192	4,134	54,585
GD 21 F ₀ Female	-	-	-	-	-	-	-	-	182	128	1,152	618	694	902	4,297	5,219
GD 21 Fetuses	-	-	-	-	-	-	-	-	48	40	181	37	275	399	777	309
GD 21 Ratio Fetuses/F ₀ Female	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.26	0.31	0.16	0.06	0.41	0.46	0.18	0.06
PND 21 F ₀ Female	-	-	-	-	-	-	-	-	1,831	1,906	22,504	28,411	268	159	1,410	1,845
PND 21 F ₁ Pups (1/sex/litter)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,613	2,445	16,392	8,429	127	66	209	237
PND 21 Ratio F ₁ Pups/F ₀ Female	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.85	1.05	0.68	0.31	0.47	0.42	0.15	0.13
PND 77 F ₁ Pups (1/sex/litter)	-	-	-	-	-	-	-	-	126	150	527	618	142	212	1,041	729

^a Geometric Mean Titers (all titers were transformed into ln(titer)) = EXP (average (ln titer)).
 - = Below cut-off value (mMU/mL): HPV-6=20; HPV-11=16; HPV-16=20; HPV-18=24.
 N/A = Not applicable.

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

6 局所刺激性試験

Test Article: V501 (L-000931225)

Species/Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/New Zealand White	IM (all rabbits received separate injections of each test article and control)	0.5 mL per site of 40/80/80/40 µg/mL or 80/80/80/80 µg/mL or 160/160/80/160 µg/mL or 160/80/160/80 µg/mL of HPV 6/11/16/18. A single dose was administered with a 14-day observation period (necropsies on Days 4 and 14)	8 F and 8 M	The degree of local histomorphologic reaction observed was within acceptable limits and was similar to adjuvant placebo control injection sites. NOAEL = 0.5 mL of 160/160/80/160 µg/mL or 160/80/160/80 µg/mL of HPV Types 6/11/16/18.	[資料4.2.3.6.1: TT-2669]
IM = Intramuscular. F = Female. M = Male.					

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

7 その他の毒性試験

(1/2)

Test Article: V501 (L-000931225)

Species/ Strain	Method of Administra- tion	Duration of Dosing	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Sprague- Dawley	IM	2, 3, or 4 doses during the course of 25 weeks	0.2 mL per dose of 40/80/80/40 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	5 Females/Group Control Group 1: Aluminum Adjuvant Placebo Control Control Group 2: Phosphate Buffered Saline Vaccine Group 1: 2 doses in Weeks 1 and 11 Vaccine Group 2: 3 doses in Weeks 1, 4, and 14 Vaccine Group 3: 4 doses in Weeks 1, 4, 7, and 17	The vaccine was generally well tolerated over a 25-week period. There were no deaths or treatment-related physical signs. There was a slight treatment-related decrease in mean body weight gain in females administered 4 doses compared to the placebo and PBS control groups. Antibodies against VLPs from HPV Types 6, 11, 16, and 18 were produced in the rats after immunization.	[資料4.2.3.7.7.1: TT-7066]

(Continued)

2.6.7 毒性試験概要表

ガーダシル

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

7 その他の毒性試験

(2/2)

Test Article: V501 (L-000931225)

Species/ Strain	Method of Administra- tion	Duration of Dosing	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Sprague- Dawley	IM	2 doses spaced 3 weeks apart, with an observation period of 5 weeks	0.2 mL per dose of 40/80/80/40 µg/mL of HPV types 6/11/16/18 VLPs	5 Females/Group	The intramuscular administration of 2 doses of V501, the HPV (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine, given 21 days apart to female rats was well tolerated. There were no deaths, physical signs, or effects on body weight gain. The serum samples were positive for anti-HPV antibodies against each serotype present in the vaccine.	[資料4.2.3.7.7.2: TT-7036]

IM = Intramuscular.

2.6.7 毒性試験概要表