2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

毒性試験は、GLP 適合下で単回投与毒性試験（ラット、イヌ）、反復投与毒性試験（ラット、イヌ）、反復投与局所刺激性試験（ラット）、遺伝毒性試験（細菌、マウスリンパ腫細胞）及び局所刺激性試験（ウサギ）を実施した。また、その他の毒性試験として非 GLP 適合下で生物学的製剤基準を準用して異常毒性否定試験、マウス体重減少試験、マウスヒスタミン増感試験、ジフテリア毒素無毒化試験、破傷風毒素無毒化試験及びマウス白血球数増加試験を実施した。

GLP適合下で実施された毒性試験に用いた臨床投与量の根拠は次のとおりである。BK-4SPは、アルミニウム塩（[redacted]アルミニウムゲル及び水酸化アルミニウムゲル）を免疫補助剤とした不活化ワクチンである。本剤は生後 3 カ月～90 カ月に 0.5 mL/回を 3～8 週間隔で計 3 回、更に 6 カ月以上経過後､同量を 1 回皮下に注射する計画である。その投与量を体重当たりに換算するため、生後 3 カ月児の最低体重 6.22 kg（女子の 0 年 3 カ月～4 カ月未満、平成 12 年　乳幼児身体発育調査報告書（厚生労働省雇用均等・児童家庭局　平成 13 年 10 月 24 日公表））を用いて計算すると、体重当たりの投与量は 0.080 mL/kg となる。

GLP 適合下での毒性試験における投与量は臨床投与量の 10 倍量又は 50 倍量とした。なお、BK-4SP は、第Ⅱ相臨床試験において BK-4SP（M 剤）が最も臨床使用に適していることが確認されたため、BK-4SP（H 剤）から BK-4SP（M 剤）に変更となった。そのため、GLP 適合下での毒性試験の被験薬として、第Ⅱ相臨床試験以前に実施された試験では BK-4SP（H 剤)、第Ⅱ相臨床試験終了後に実施された試験では BK-4SP（M 剤）を使用した。BK-4SP（H 剤）を投与した毒性試験における投与量を BK-4SP（M 剤）から見たとき、不活化ポリオウイルス 1 型、2 型及び 3 型（Sabin 株）の抗原量は 20 倍量又は 100 倍量となる。

表 2.6.6.1.1 に毒性試験プログラムを示した。また、GLP 適合下で実施された試験において対照物質として用いた DPT について表 2.6.6.1.2 に示した。

表 2.6.6.1.1 毒性試験プログラム

試験の種類	投与経路	動物種
単回投与毒性試験		
単回投与毒性試験	皮下	ラット及びイヌ
反復投与毒性試験		
反復投与毒性試験	皮下	ラット及びイヌ
反復投与局所刺激性試験	皮下	ラット
遺伝毒性試験		
細菌を用いる復帰突然変異試験	－	ネズミチフス菌/TA98 株、TA1537 株、TA100 株、TA1535 株、大腸菌/WP2*uvrA* 株
マウスリンフォーマ TK 試験	－	マウスリンパ腫細胞
局所刺激性試験		
局所刺激性試験	筋肉内	ウサギ
その他の毒性試験		
異常毒性否定試験	腹腔内	モルモット
マウス体重減少試験	腹腔内	マウス
マウスヒスタミン増感試験	腹腔内	マウス
ジフテリア毒素無毒化試験	皮内	ウサギ
破傷風毒素無毒化試験	皮下	モルモット
マウス白血球数増加試験	腹腔内	マウス

表 2.6.6.1.2 対照物質として非臨床試験に用いた DPT

DPT	説 明	試 験
トリビック	既承認の沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンの販売名。	
DPT ワクチン	成分及び分量がトリビックと同じ製剤のシリンジ充填品。	反復投与局所刺激性試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」	昭和 56 年 3 月 20 日に承認された沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンの販売名。保存剤として、0.5 mL 中に 0.0025 mg のチメロサールを含む。	局所刺激性試験（筋肉内）

1. 単回投与毒性試験

ラット及びイヌに BK-4SP（H 剤）を臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 又は 50 倍量である 4 mL/kg 単回皮下投与した。

その結果、BK-4SP（H 剤）群の投与部皮下組織に異物性肉芽腫が認められた以外に毒性徴候は認められず、概略の致死量は 4 mL/kg 超であった。

2. 反復投与毒性試験

ラット及びイヌにおいて反復投与毒性試験を行った。ラットでは BK-4SP（H 剤）を臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与した。

その結果、ラットでは投与部皮下組織に異物性肉芽腫が認められた以外に一般状態、体重推移、摂餌量及び諸検査において毒性徴候は認められなかった。イヌにおいては、雌雄のイヌに BK-4SP（H 剤）を臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与した試験と雌に臨床投与量である 0.08 mL/kg、臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg、50 倍量である 4 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与した試験を行った。観察期間を通じて死亡例はなく、投与部位に腫脹及び硬結が認められた。硬結は異物性肉芽腫であり、投与後の日数が増すと共に面積が縮小した。血液生化学的検査では 4 mL/kg 群においてγグロブリンの増加とそれに関連した総たん白の増加及び A/G 比の低値、極めて軽微な LDH の高値も認められた。病理組織学的検査では、異物性肉芽腫以外に下顎リンパ節及び脾臓において胚中心の発達が認められた。これらの所見には用量依存性が認められた。なお、体重、摂餌量、血液学的検査、尿検査、心電図、眼科学的検査及び器官重量において BK-4SP（H 剤）に起因すると考えられる毒性徴候は認められなかった。

また、同一部位への反復投与による局所刺激の累積性を評価するため、雌雄のラットの同一部位に BK-4SP（M 剤）及び対照物質として DPT ワクチンを臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 5 回皮下投与し、その累積局所刺激性及び回復性を検討した。その結果、両投与群の雌雄全例において投与部位に中等度の異物性肉芽腫が認められたものの、その変化は DPT ワクチンと同程度であった。さらに、投与終了時に認められた変化は、回復期間において漸次軽減していることが観察され、BK-4SP（M 剤）の累積局所刺激性及び回復性は、DPT ワクチンと同程度であると考えられた。

3. 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ TK 試験において、BK-4SP（H 剤）にホルマリンによると考えられる遺伝毒性が認められた。

ホルマリン無添加沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（N-BK-4SP）では遺伝毒性は認められず、BK-4SP の有効成分に遺伝毒性はないと判断した。

4. がん原性試験

実施していない。

5. 生殖発生毒性試験

実施していない。

6. 局所刺激性試験

ウサギの筋肉内に BK-4SP（H 剤）及び対照物質として沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」を 0.5 mL/site 投与し、「注射剤の局所障害性に関する試験法（案）（厚生省、昭和 54 年及び昭和 59 年）に基づく判定基準」に従い、局所刺激性を評価した。その結果、BK-4SP（H 剤）は生理食塩液より強く、0.425 w/v%酢酸溶液より弱い局所障害性のグレード 2 に分類された。なお、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」においても同様の所見が認められ、局所障害性のグレードは BK-4SP（H 剤）と同じであった。

7. その他の毒性試験

BK-4SP について、生物学的製剤基準を準用して異常毒性否定試験、マウス体重減少試験、マウスヒスタミン増感試験、ジフテリア毒素無毒化試験、破傷風毒素無毒化試験及びマウス白血球数増加試験を実施した結果、すべて規格に適合した。

8. 考察及び結論

単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験において、投与部皮下組織に異物性肉芽腫が認められたが、これは BK-4SP に含まれるアルミニウム塩或いはアルミニウム塩に吸着した抗原に対する反応であると考えられた。また、同一部位への反復投与による局所刺激の累積性を検討した試験においても、顕著な累積性は認められず、その変化及び回復性は DPT ワクチンと同程度であった。さらに、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」を対照物質として局所刺激性試験（筋肉内）を行ったところ、BK-4SP（H 剤）の局所刺激性は沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」と同じグレード 2 に分類された。反復投与毒性試験では、投与局所の異物性肉芽腫の他に、血中のγグロブリンの増加とそれに付随した血清総たん白の増加及び A/G 比の低下、脾臓及び下顎リンパ節における胚中心の過形成が用量反応的に認められた。γグロブリンの増加及び胚中心の発達は免疫反応のひとつである。BK-4SP は免疫反応を惹起することで薬効を示すことから、これらの反応は、BK-4SP の薬効によるものと思われた。

また、生物学的製剤基準を準用して異常毒性否定試験、マウス体重減少試験、マウスヒスタミン増感試験、ジフテリア毒素無毒化試験、破傷風毒素無毒化試験及びマウス白血球数増加試験を実施した結果、BK-4SP はすべての試験において規格に適合した。

以上の結果から、BK-4SP をヒトに接種した場合、その毒性は DPT と同程度であり、全身性の毒性及び臨床的に問題となる毒性を示す可能性は非常に低いと考えた。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は、GLP 適合下の試験としてラット及びイヌに及ぼす影響について検討した。

1. ラットにおける単回投与毒性試験（試験番号：FBM[redacted]-2317）

ラットに BK-4SP（H 剤）を単回皮下投与して毒性を検討した。

方法：6 週齢のラット（Crj:CD（SD）IGS）雌雄各 5 匹を一群とし、BK-4SP（H 剤）の臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 及び 50 倍量である 4 mL/kg 並びに陰性対照として生理食塩液 4 mL/kg を皮下投与し、単回投与毒性試験を行った。投与後 14 日間、毎日一般状態を観察すると共に投与直前、投与後 1、2、4、7 及び 14 日に体重を測定した。投与後 14 日には剖検を行った。

結果：すべてのラットで観察期間を通じて死亡例はなく、一般状態及び体重推移にも投与による影響は認められなかった。剖検において BK-4SP（H 剤）の 0.8 mL/kg 群の雌全例及び 4 mL/kg 群の雌雄全例に、投与部皮下組織にアルミニウム塩の影響と推測される淡黄白色の結節が認められ、組織学的には好酸性物質沈着を内部に伴う異物性肉芽腫であった。

結論：BK-4SP（H 剤）を皮下投与すると投与部皮下組織に異物性肉芽腫が生じるが、全身性の毒性徴候は認められず、臨床投与量の 50 倍量である 4 mL/kg を投与しても単回投与毒性はないものと判断された。

2. イヌにおける単回投与毒性試験（試験番号：FBM ■ -4318）

イヌに BK-4SP（H 剤）を単回皮下投与して毒性を検討した。

方法：6～7 カ月齢のイヌ（ビーグル）雄 2 頭を一群とし、BK-4SP（H 剤）の臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 及び 50 倍量である 4 mL/kg 並びに陰性対照として生理食塩液 4 mL/kg を皮下投与し、単回投与毒性試験を行った。投与後 14 日間、毎日一般状態を観察すると共に投与直前、投与後 1、2、4、7 及び 14 日に体重を測定した。また、投与後は、毎日摂餌量を調査した。投与後 14 日には剖検を行った。

結果：すべてのイヌで観察期間を通じて死亡例はなく、全身性の症状、投与日の脈拍数、体温及び瞳孔反応並びに体重推移において投与による影響は認められなかった。投与部位で投与直後に生じたアルミニウム塩の影響と推測される腫脹は速やかに消失したが、BK-4SP（H 剤）の 0.8 mL/kg 群は 7 日以降，4 mL/kg 群は 3 日以降に腫脹から硬結に至る変化が認められた。剖検では、BK-4SP（H 剤）の 0.8 mL/kg 及び 4 mL/kg 群すべての投与部皮下組織に、充実性或いは内部に液状化物質を貯留した灰白色結節が認められた。この結節は、組織学的には異物性肉芽腫であった。

結論：BK-4SP（H 剤）を皮下投与すると投与部位において異物性肉芽腫が生じるが、全身性の毒性徴候は認められず、臨床投与量の 50 倍量である 4 mL/kg を投与しても単回投与毒性はないものと判断された。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は、GLP 適合下の試験としてラット及びイヌに及ぼす影響について検討した。また、同一部位への反復投与による局所刺激の累積性を評価するため、ラットを用いた反復投与局所刺激性試験を実施した。

1. ラットにおける反復投与毒性試験（試験番号：FBM ■ -2319）

ラットに BK-4SP（H 剤）を 1 週間隔で 4 回皮下投与して毒性を検討した。

方法：6 週齢のラット（Crj:CD（SD）IGS）雌雄各 10 匹を一群とし、BK-4SP（H 剤）の臨床投

与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 並びに陰性対照として生理食塩液 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与し、4 週間反復投与毒性試験を行った。1 回目投与後 28 日間、投与日は 5 回（投与前、投与直後、投与後 30 分、1 及び 2 時間）、その他は 1 日 1 回一般状態を観察すると共に投与日（投与前）、剖検前日及び剖検日に体重を測定した。また、各群週 1 回摂餌量を測定した。投与期間最終週（第 4 週）に尿検査、眼科学的検査を行った。さらに、最終投与後 1 週間に採血して血液学的検査及び血液生化学的検査を行い、安楽死させた後、病理学的検査（剖検、器官重量、病理組織学的検査）を行った。

結果：観察期間を通じて死亡例はなく、一般状態、体重推移及び摂餌量には BK-4SP（H 剤）投与による影響は認められなかった。剖検では、BK-4SP（H 剤）群の雌雄全例の投与部皮下組織に淡黄白色結節が認められたが、組織学的には異物性肉芽腫であり、経時的に軽減傾向を示した。その他の諸検査には特記すべき変化は認められなかった。

結論：BK-4SP（H 剤）は臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与すると、投与局所に異物性肉芽腫が生じるが、明らかな全身性の毒性はないものと判断された。

2. ラットにおける反復投与局所刺激性試験（試験番号：P[redacted]0336）

ラットに BK-4SP（M 剤）を 1 週間隔で 5 回皮下投与して累積局所刺激性及び回復性を検討した。また、DPT ワクチンと累積局所刺激性及び回復性を比較した。

方法：6 週齢のラット（Crl:CD（SD））雌雄各 10 匹を一群とし、BK-4SP（M 剤）の臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 並びに対照物質として DPT ワクチン 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で同一部位に 5 回皮下投与し、5 週間間歇皮下投与局所刺激性試験及び 6 週間の回復性試験を行った。投与期間において、1 回目投与後 35 日間、投与日は 2 回（投与前及び投与後）、その他は 1 日 1 回一般状態を観察すると共に投与日及び 35 日に体重を測定した。また、42 日間の回復期間において、1 日 1 回一般状態を観察すると共に回復 1、8、15、22、29、36 及び 42 日に体重を測定した。投与期間終了日（投与 5 週）に各投与群の雌雄 5 匹、回復期間終了日（回復 6 週）に各投与群の雌雄 5 匹を安楽死させた後、病理学的検査（剖検、病理組織学的検査）を行った。

結果：観察期間を通じて死亡及び全身症状は認められなかった。一般状態では、投与部位の硬結が認められたのみであり、その他の一般状態及び体重推移には BK-4SP（M 剤）及び DPT ワクチンの投与による影響は認められなかった。投与期間終了時の剖検では、BK-4SP（M 剤）投与群及び DPT ワクチン投与群の雌雄全例の投与部皮下に硬結が認められたが、硬結の大きさは、両投与群とも同程度であった。投与期間終了時の病理組織学的検査では、BK-4SP（M 剤）投与群及び DPT ワクチン投与群の雌雄全例において投与部位に中等度の異物性肉芽腫が認められ、ほぼ全例で軽微ないし軽度の出血が認められた。また、回復期間終了時の検査では、両投与群の雌雄全例において軽度ないし中等度の異物性肉芽腫が認められた。

結論：BK-4SP（M 剤）は臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で同一部位に 5 回皮下投与すると、投与部位に異物性肉芽腫が認められたものの、その変化は DPT ワクチンと同程度であり、回復期間において漸次軽減していることが観察され、剖検所見

及び病理組織像より、両投与群にみられた異物性肉芽腫は消失していくと推測された。なお、BK-4SP（M 剤）の投与時における最低体重及び最高体重から算出した投与部位あたりの投与量は、0.109 mL/site～0.346 mL/site であり、同様に算出した DPT ワクチンの投与部位あたりの投与量（0.107 mL/site～0.354 mL/site）と同等であった。これらのことから、BK-4SP（M 剤）の累積局所刺激性及び回復性は、DPT ワクチンと同程度であると考えられた。

3. イヌにおける反復投与毒性試験（試験番号：FBM ■ -4320）

イヌに BK-4SP（H 剤）を 1 週間隔で 4 回皮下投与して毒性を検討した。

方法：7～8 カ月齢のイヌ（ビーグル）雌雄各 3 頭を一群とし、BK-4SP（H 剤）を臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 並びに陰性対照として生理食塩液 0.8 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与した。1 回目投与後 28 日間、投与日は 6 回（投与前、投与直後、投与後 30 分、1、2 及び 4 時間）、その他は 1 日 1 回一般状態を観察すると共に投与日（投与前）、剖検前日及び剖検日に体重を測定した。また、各群週 1 回摂餌量及び体温を測定した。投与期間最終週（第 4 週）に尿検査、心電図検査、眼科学的検査、血液学的検査及び血液生化学的検査を行った。さらに、最終投与後 1 週間に安楽死させた後、病理学的検査（剖検、器官重量及び組織学的検査）を行った。

結果：観察期間を通じて死亡例はなく、一般状態、BK-4SP（H 剤）群の後述の雌 1 例を除いて体重推移及び摂餌量には BK-4SP（H 剤）投与による影響は認められなかった。投与部位では、BK-4SP（H 剤）群の雌雄全例で投与直後に腫脹が認められ、投与後 30 分にはすべて消失したが、投与後 1～4 日に軽度から中等度の腫脹又は硬結が再出現し、その後、4～22 日間観察され、剖検日にほぼ全例の数か所に硬結が残存していた。なお、対照群では投与日のみに投与部位の腫脹が認められた。剖検では、BK-4SP（H 剤）群の雌雄全例で投与部皮下組織に充実性或いは内部に液状化物質を貯留した淡黄白色結節が認められ、投与後の日数が増すと共に面積が縮小した。組織学検査を行った結果、この結節は好酸性物質沈着を伴った異物性肉芽腫であった。血液生化学的検査では、タンパク分画で BK-4SP（H 剤）群のアルブミン比率が雄で有意な低値、雌で低値傾向、γグロブリン比率が雌雄で高値傾向が認められた。病理組織学的検査では、BK-4SP（H 剤）群で雌雄全例の脾臓に軽度の胚中心発達が認められた。その他の諸検査には特記すべき変化は認められなかった。また、単発性変化として、BK-4SP（H 剤）群で雌 1 例の胸部に多発性動脈炎が認められた。この個体では、摂餌量減少に伴う体重減少、多発性動脈炎による造血器への影響及び栄養不良に基づく血液所見を示した。

4. イヌにおける反復投与毒性試験（追加試験）（試験番号：B■1122）

BK-4SP（H 剤）を増量してイヌに 1 週間隔で 4 回皮下投与し、毒性を検討した。

方法：イヌ（ビーグル）雌 3 頭を一群とし、BK-4SP（H 剤）を 0.08 mL/kg（臨床投与量）、0.8 mL/kg（臨床投与量の 10 倍量）、4.0 mL/kg（臨床投与量の 50 倍量）並びに陰性対照として生理食塩液 4.0 mL/kg を 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回投与した。1 回目投与後 28 日間、投与日は 2 回、その他は 1 日 1 回一般状態を観察すると共に第 1（1 回目の投与日）、8、15、22、28

日及び 29 日に体重を測定した。また、投与前 1 週から毎日摂餌量を測定した。投与開始前 1 週及び第 4 週に尿検査、心電図検査及び眼科学的検査を行った。投与開始前 1 週、第 1、8、15、22 及び 29 日に血液学的検査及び血液生化学的検査を行い、第 29 日に安楽死させた後、病理学的検査（剖検、器官重量及び組織学的検査）を行った。

結果：投与部位では 1 回目の試験と同様に BK-4SP（H 剤）群の全例で硬結が認められたが、観察期間を通じて死亡例はなく、体重、摂餌量、血液学的検査、尿検査、心電図、眼科学的検査及び器官重量では BK-4SP（H 剤）投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。血液生化学的検査では、4 mL/kg 群ではγグロブリンの増加とそれに関連した総たん白の増加及び A/G 比の低値が認められた。同群では LDH の高値も認められたが、極めて軽微なものであった。また、病理組織学的検査では、0.8 mL/kg 及び 4 mL/kg 群の下顎リンパ節及び脾臓において胚中心の発達が認められた。投与部位の病理組織学的検査では、対照群を除くすべての BK-4SP（H 剤）投与群において炎症に関連した変化が認められた。これらの変化は炎症像の経時的推移を反映していた。すなわち、投与後短期間では浮腫及び炎症性細胞の浸潤が認められ、その後、異物性肉芽腫及び線維化へと推移していく様子が観察された。また、これらの炎症性変化の発現頻度或いは程度は、概ね用量相関的であった。

結論：BK-4SP（H 剤）は臨床投与量である 0.08 mL/kg、臨床投与量の 10 倍量である 0.8 mL/kg 及び臨床投与量の 50 倍量である 4.0 mL/kg の各用量について 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回皮下投与したとき、BK-4SP（H 剤）を皮下投与したことに伴う局所炎症性変化と、免疫反応に関連した血液生化学的変化及び薬効に関連した変化が認められたのみであり、全身性の毒性を示唆する変化はいずれの用量でも認められなかった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、GLP 適合下の試験として細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ TK 試験を実施した。

2.6.6.4.1 *In Vitro* 遺伝毒性試験

1. 細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：FBM ■ -8324）

ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA98 株、TA1537 株、TA100 株、TA1535 株及び大腸菌（*Escherichia coli*）WP2*uvrA* 株の計 5 菌株を用いて復帰突然変異試験を行った。

方法：当該試験系において添加可能な 500μL/plate を調製原液の最高用量とし、用量設定試験では 500、200、100、50 及び 20μL/plate、本試験及び確認試験では 500、400、300、200 及び 100μL/plate の計 5 用量で S9mix 共存下（代謝活性化法、＋S9mix）と非共存下（直接法、－S9mix）についてプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を行った。それぞれ、陰性対照には生理食塩液 100μL/plate、陽性対照には陽性対照物質溶液 100μL/plate を添加した。

結果：BK-4SP（H 剤）は TA100 株と TA98 株の直接法及び代謝活性化法並びに WP2*uvrA* 株の直接法において変異原性が認められた。

2. 細菌を用いる復帰突然変異試験（追加試験）（試験番号：FBM ■ -8585）

1. 細菌を用いる復帰突然変異試験において認められた変異原性の原因として BK-4SP（H 剤）に含有される成分のうちホルマリンの関与が考えられたため、BK-4SP（H 剤）、ホルマリン無添加沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（N-BK-4SP）、ホルマリン液（FA）について、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA98 株、TA1537 株、TA100 株、TA1535 株及び大腸菌（*Escherichia coli*）WP2*uvrA* 株の計 5 菌株を用いて復帰突然変異試験を行った。

方法：500、400、300、200 及び 100 μL/plate の計 5 用量で S9mix 共存下（代謝活性化法、＋S9mix）と非共存下（直接法、－S9mix）についてプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を行い、ホルマリンの影響について検討した。

結果：BK-4SP（H 剤）では TA98 株の直接法及び代謝活性化法並びに TA100 株の代謝活性化法において変異原性が認められたが、その他 3 菌株では陰性であった。N-BK-4SP では、5 菌株すべての用量において陰性であった。一方、FA では BK-4SP（H 剤）と同様の傾向が見られ、TA98 株及び TA100 株の直接法及び代謝活性化法において変異原性が認められた。

結論：BK-4SP（H 剤）で認められた変異原性はホルマリンに起因するものと考えられた。

3. マウスリンフォーマ TK 試験（試験番号：FBM ■ -8325）

BK-4SP（H 剤）について、マウスリンパ腫細胞株（L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C）を用いて遺伝子突然変異試験を実施した。

方法：水系における添加量の上限である 100 μL/plate を最高用量とし、用量設定試験では 100、50、25.0、12.5、6.25、3.13 μL/plate、本試験では 100、50、25.0、12.5、6.25、3.13 μL/plate の計 6 用量を設定した。本試験では、短時間処理法の S9mix 非共存下（代謝活性化なし、－S9mix）及び S9mix 共存下（代謝活性化あり、＋S9mix）並びに連続処理法 24 時間処理で遺伝子突然変異試験を行った。

結果：短時間処理法（－S9mix、＋S9mix）の遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

4. マウスリンフォーマ TK 試験（追加試験）（試験番号：FBM ■ -8586）

3. マウスリンフォーマ TK 試験において認められた変異原性の原因として BK-4SP に含有される成分のうちホルマリンの関与が疑われたため、BK-4SP（H 剤）、ホルマリン無添加沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（N-BK-4SP）、ホルマリン液（FA）について、マウスリンパ腫細胞株（L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C）を用いて遺伝子突然変異試験を実施した。

方法： BK-4SP（H 剤）、N-BK-4SP、FA の 3 剤について、マウスリンパ腫細胞株（L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C）を用いて遺伝子突然変異試験を行い、ホルマリンの影響について検討した。なお、用量設定は、6.25、12.5、25.0、50.0、75.0 及び 100 μL/mL の 6 用量とし、短時間処理法の S9mix 非共存下（代謝活性化なし、－S9mix）及び S9mix 共存下（代謝活性化あり、＋S9mix）並びに連続処理法 24 時間処理で遺伝子突然変異試験を行った。

結果：BK-4SP（H 剤）と FA は同様の傾向が見られ、短時間処理法（－S9mix、＋S9mix）の遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められたが、N-BK-4SP では、遺伝子突然変異頻度の増加は認められず、用量反応も認められなかった。

結論：BK-4SP（H 剤）で認められた遺伝子突然変異誘発性はホルマリンに起因するものと考えられた。

2.6.6.4.2 *In Vivo* 遺伝毒性試験

In Vivo 遺伝毒性試験は、骨髄や造血器等に到達しない化合物では、適切な情報が得られないとされている。BK-4SP は、有効成分として百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイド並びに不活化ポリオウイルス 1 型、2 型及び 3 型（Sabin 株）を含むたん白質製剤であり、投与局所において異種たん白質抗原として免疫担当細胞を刺激することによって生体反応を呈する。そのため、本剤は骨髄や造血器等への作用はないと考えられた。

以上のことから、*In Vivo* 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

BK-4SP（H 剤）を用いた反復投与毒性試験において、がん原性を示唆するような所見は認められなかった。また、N-BK-4SP の有効成分に遺伝毒性は認められず、BK-4SP と同じ有効成分（百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイド）を含んでいるトリビックにがん原性を示唆する報告はない。

以上のことから、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

BK-4SP（H 剤）を用いた反復投与毒性試験において、生殖器に異常は認められず、BK-4SP と同じ有効成分（百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイド）を含んでいるトリビックにおいて生殖発生毒性を示唆する報告はない。

以上のことから、生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験（試験番号：FBM ■ -3321）

ウサギに、BK-4SP（H 剤）を皮下投与よりも負荷が大きいと思われる筋肉内に投与し、局所刺激性を検討した。また、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」と局所刺激性を比較した。

方法：15 週齢のウサギ（Jla：JW）雄 6 匹を一群として、右脚又は左脚の外側広筋に BK-4SP（H 剤）及び陰性対照物質（生理食塩液）を各 0.5 mL/site、陽性対照物質（1.7 w/v%及び 0.425 w/v%酢酸溶液）を各 1 mL/site、右脚の外側広筋に沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」を 0.5 mL/site 単回投与した。各投与検体 3 匹（計 9 匹）を、投与後 2 日及び 7 日に剖検して投与部位を摘出し、病理学的検査を行った。さらに、「注射剤の局所障害性に関する試験法（案）（厚生省、昭和 54 年及び昭和 59 年）に基づく判定基準」に従い、局所刺激性を評価した。

結果：BK-4SP（H 剤）では、肉眼所見として投与後 2 日に淡赤色化及び灰白色化が認められたが、投与後 7 日には明らかな変化は認められなかった。病理組織学的所見では、投与後 2 日にごく軽度の好酸性物質が認められ、ごく軽度の出血、偽好酸球、単核細胞の浸潤及び筋線維の変性・壊死を伴っていた。投与後 7 日には好酸性物質は不明瞭となったが、中等度の

偽好酸球、単核細胞の浸潤が認められ、投与後 2 日と比較し細胞浸潤の程度は若干強かった。なお、投与後 7 日には筋線維の変性・壊死等は認められなかった。沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」の肉眼所見では、BK-4SP（H 剤）と比べ投与後 2 日の障害部の大きさが若干小さかったが、組織学的には投与後 2 日及び 7 日とも BK-4SP（H 剤）とほぼ同じ所見を呈し、その変化の程度にも差は認められなかった。一方、0.425 及び 1.7 w/v%酢酸溶液の肉眼所見では障害部の大きさが投与後 2 日では共に BK-4SP（H 剤）より大きく、投与後 7 日にも障害部が肉眼的に観察された。病理組織学的所見では、投与後 2 日に両群とも中等度或いは高度の筋線維の変性・壊死を主とし、ごく軽度又は軽度の出血、水腫及び細胞浸潤を伴い、更に投与後 7 日には炎症性細胞浸潤が増強して、筋線維の再生や肉芽組織も認められた。生理食塩液では、投与後 2 日の肉眼的障害部の大きさは BK-4SP（H 剤）とほぼ同じで、組織的にも同程度の炎症性細胞浸潤や筋線維の変性・壊死が認められたが、投与後 7 日にはごく軽度の筋線維の再生が認められるに過ぎなかった。

結論：「注射剤の局所障害性に関する試験法（案）（厚生省、昭和 54 年及び昭和 59 年）に基づく判定基準」に従って評価したとき、BK-4SP（H 剤）は沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」と同様に生理食塩液より強く、0.425 w/v%酢酸溶液より弱い局所障害性のグレード 2 に分類されると判断された。

2.6.6.8 その他の毒性試験

その他の試験として、非 GLP 適合下で生物学的製剤基準を準用して異常毒性否定試験、マウス体重減少試験、マウスヒスタミン増感試験、ジフテリア毒素無毒化試験、破傷風毒素無毒化試験及びマウス白血球数増加試験を実施した。なお、生物学的製剤基準は厚生省告示第 217 号（平成 5 年 10 月 1 日）及び厚生労働省告示第 155 号（平成 16 年 3 月 30 日）を準用した。

1. 異常毒性否定試験

方法：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）について、生物学的製剤基準「一般試験法」の異常毒性否定試験法を準用して異常毒性否定試験を実施した。モルモット（ハートレイ系）雌 3 匹を 1 群とし、検体 5 mL を腹腔内に注射後 7 日間、毎日体重測定と下記（i）～（iv）の観察を行った。

【主な観察項目】

（i）被毛の状態（立毛・脱毛の有無）

（ii）行動状態（活動性・運動異常等）

（iii）天然孔の状態（流涙・目やに・鼻汁・下痢等異常の有無）

（iv）死亡の有無

結果：表 2.6.6.8-1 に示したとおり、BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）に異常は認められなかった。

結論：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）は生物学的製剤基準の規格に適合した。

表 2.6.6.8-1　異常毒性否定試験成績

動物種　系統 性別　動物数/群		モルモット　ハートレイ 雌　3 匹			
投与量 投与回数　投与経路		5 mL/モルモット 1 回　腹腔内			
ロット番号	モルモット番号	体重（g）		臨床所見	判定
		接種時	終了時		
A1＊（H 剤）	1	354	392	異常を認めず	適合
	2	361	406	異常を認めず	
	3	383	435	異常を認めず	
A2＊（H 剤）	1	349	395	異常を認めず	適合
	2	370	408	異常を認めず	
	3	382	434	異常を認めず	
A3＊（H 剤）	1	338	402	異常を認めず	適合
	2	354	415	異常を認めず	
	3	375	434	異常を認めず	
A4＊（H 剤）	1	357	427	異常を認めず	適合
	2	370	444	異常を認めず	
	3	384	456	異常を認めず	
A5＊（H 剤）	1	354	401	異常を認めず	適合
	2	364	431	異常を認めず	
	3	378	444	異常を認めず	
A6＊（H 剤）	1	351	396	異常を認めず	適合
	2	356	438	異常を認めず	
	3	369	419	異常を認めず	

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

動物種　系統 性別　動物数/群		モルモット　ハートレイ 雌　3 匹			
投与量 投与回数　投与経路		5 mL/モルモット 1 回　腹腔内			
ロット番号	モルモット番号	体重（g）		臨床所見	判定
		接種時	終了時		
A7＊（L 剤）	1	355	385	異常を認めず	適合※
	2	356	408	異常を認めず	
	3	381	435	異常を認めず	
	1	356	417	異常を認めず	
	2	370	427	異常を認めず	
	3	379	428	異常を認めず	
	1	355	408	異常を認めず	
	2	370	425	異常を認めず	
	3	384	454	異常を認めず	
A8＊（M 剤）	1	353	411	異常を認めず	適合
	2	365	446	異常を認めず	
	3	372	460	異常を認めず	
A9＊（H 剤）	1	346	405	異常を認めず	適合
	2	357	411	異常を認めず	
	3	379	447	異常を認めず	

判定基準：異常を認めない

※　3 回の剖検を実施し、いずれも異常を認めなかったため適合と判定した。

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

2.　マウス体重減少試験

方法：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）について、「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン」の 3.2 小分製品の試験　3.2.8 マウス体重減少試験を準用してマウス体重減少試験を実施した。参照百日せきワクチン（毒性試験用）を、生理食塩液を用いて 5 段階に希釈した。検体及び参照百日せきワクチン（毒性試験用）の各希釈に対して、それぞれ 4 週齢のマウス（ddY 系）雌 10 匹を 1 群とし、1 匹当たり、検体及び参照百日せきワクチン（毒性試験用）0.5 mL を 1 回腹腔内に注射した。注射の約 16 時間後にマウスの体重を測定し、接種当日の体重との差体重を算出した。差体重の算出結果から参照百日せきワクチン（毒性試験用）に対するマウス体重減少活性を算出した。

結果：表 2.6.6.8-2 に示したとおり、BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）のマウス体重減少試験成績は、[redacted] BWDU/mL～[redacted] BWDU/mL であった。

結論：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）は生物学的製剤基準の規格に適合した。

表 2.6.6.8-2　マウス体重減少試験成績

動物種　系統　週齢 性別　動物数/群	マウス　ddY　4 週齢 雌　10 匹	
投与量 投与回数　投与経路	0.5 mL/マウス 1 回　腹腔内	
ロット番号	成績（BWDU/mL）	判定
A1＊（H 剤）	[redacted]	適合
A2＊（H 剤）	[redacted]	適合
A3＊（H 剤）	[redacted]	適合
A4＊（H 剤）	[redacted]	適合
A5＊（H 剤）	[redacted]	適合
A6＊（H 剤）	[redacted]	適合
A7＊（L 剤）	[redacted]	適合
A8＊（M 剤）	[redacted]	適合
A9＊（H 剤）	[redacted]	適合

判定基準：10 BWDU/mL 以下

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

3. マウスヒスタミン増感試験

方法：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）について、生物学的製剤基準「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン」の 3.2 小分製品の試験　3.2.10 マウスヒスタミン増感試験を準用してマウスヒスタミン増感試験を実施した。検体を 37℃で 4 週間加温したもの及び加温しないものをそれぞれ試料とした。参照百日せきワクチン（毒性試験用）を、生理食塩液を用いて 5 段階に希釈した。各試料及び参照百日せきワクチン（毒性試験用）の各希釈に対して、それぞれ 4 週齢のマウス（ddY 系）雌 10 匹を 1 群とし、1 匹当たり、各試料及び参照百日せきワクチン（毒性試験用）0.5 mL を 1 回腹腔内に注射した。注射 4 日後に、生理食塩液で 8 mg/mL に調製した二塩酸ヒスタミンを 1 匹当たり 0.5 mL 腹腔内に注射し、注射 30 分後に直腸内体温を測定した。直腸内体温の測定結果から参照百日せきワクチン（毒性試験用）に対するマウスヒスタミン増感活性を算出した。

結果：表 2.6.6.8-3 に示したとおり、BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）のマウスヒスタミン増感試験成績は、加温しない試料が[redacted] HSU/mL～[redacted] HSU/mL、37℃で 4 週間加温した試料が[redacted] HSU/mL～[redacted] HSU/mL であった。

結論：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）は生物学的製剤基準の規格に適合した。

表 2.6.6.8-3　マウスヒスタミン増感試験成績

動物種　系統　週齢 性別　動物数/群	マウス　ddY　4 週齢 雌　10 匹		
投与量 投与回数　投与経路	0.5 mL/マウス 1 回　腹腔内		
ロット番号	成績（HSU/mL）		判定
	加温しない試料	37℃で 4 週間 加温した試料	
A1＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A2＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A3＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A4＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A5＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A6＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A7＊（L 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A8＊（M 剤）	[redacted]	[redacted]	適合
A9＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	適合

判定基準：加温した試料及び加温しない試料いずれも 0.4 HSU/mL 以下

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

4.　ジフテリア毒素無毒化試験

方法：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）について、生物学的製剤基準「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン」の 3.2 小分製品の試験　3.2.11 ジフテリア毒素無毒化試験を準用してジフテリア毒素無毒化試験を実施した。シック試験液（動物用）を 0.2 w/v%ゼラチン加 0.017 mol/L PBS pH7.0 で 800 MRD/mL になるように溶解し、更に 10、20、40 倍及び 80 倍に希釈したものを陽性対照、0.2 w/v%ゼラチン加 0.017 mol/L PBS pH7.0 を陰性対照とした。検体、陽性対照の各希釈及び陰性対照のそれぞれ 0.1 mL をウサギ（日本白色種）雄 2 匹の皮内に注射して、2 日間注射部位の異常（発赤等の有無）を観察した。

結果：表 2.6.6.8-4 に示したとおり、BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）に異常は認められなかった。

結論：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）は生物学的製剤基準の規格に適合した。

表 2.6.6.8-4　ジフテリア毒素無毒化試験成績

動物種　系統 性別　動物数/群	ウサギ　日本白色種 雄　2 匹	
投与量 投与回数　投与経路	0.1 mL 1 回　皮内	
ロット番号	成績（異常動物数/試験動物数）	判定
A1＊（H 剤）	0/2	適合
A2＊（H 剤）	0/2	適合
A3＊（H 剤）	0/2	適合
A4＊（H 剤）	0/2	適合
A5＊（H 剤）	0/2	適合
A6＊（H 剤）	0/2	適合
A7＊（L 剤）	0/2	適合
A8＊（M 剤）	0/2	適合
A9＊（H 剤）	0/2	適合

判定基準：異常を認めない

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

5. 破傷風毒素無毒化試験

方法：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）について、生物学的製剤基準「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン」の 3.2 小分製品の試験　3.2.12 破傷風毒素無毒化試験を準用して破傷風毒素無毒化試験を実施した。モルモット（ハートレイ系）雌 5 匹を 1 群とし、1 匹当たり検体 3 mL を皮下に注射し、21 日間体重測定及び臨床観察を行った。

結果：表 2.6.6.8-5 に示したとおり、BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）に異常は認められなかった。

結論：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）は生物学的製剤基準の規格に適合した。

表 2.6.6.8-5　破傷風毒素無毒化試験成績

動物種　系統 性別　動物数/群	モルモット　ハートレイ 雌　5 匹	
投与量 投与回数　投与経路	3 mL/モルモット 1 回　皮下	
ロット番号	成績（異常動物数/試験動物数）	判定
A1＊（H 剤）	0/5	適合
A2＊（H 剤）	0/5	適合
A3＊（H 剤）	0/5	適合
A4＊（H 剤）	0/5	適合
A5＊（H 剤）	0/5	適合
A6＊（H 剤）	0/5	適合
A7＊（L 剤）	0/5	適合
A8＊（M 剤）	0/5	適合
A9＊（H 剤）	0/5	適合

判定基準：異常を認めない

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

6. マウス白血球数増加試験

方法：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）について、生物学的製剤基準「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン」の 3.2 小分製品の試験　3.2.9 マウス白血球数増加試験を準用してマウス白血球数増加試験を実施した。参照百日せきワクチン（毒性試験用）を、生理食塩液を用いて 5 段階に希釈した。検体及び参照百日せきワクチン（毒性試験用）の各希釈に対して、それぞれ 4 週齢のマウス（ddY 系）雌 10 匹を 1 群とし、1 匹当たり、検体及び参照百日せきワクチン（毒性試験用）0.5 mL を 1 回腹腔内に注射した。注射 3 日後に尾静脈から採血し、白血球数を測定した。白血球数の測定結果から、参照百日せきワクチン（毒性試験用）に対するマウス白血球数増加活性を算出した。

結果：表 2.6.6.8-6 に示したとおり、BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）のマウス白血球数増加試験成績は、[redacted] LPU/mL～[redacted] LPU/mL であった。

結論：BK-4SP（H 剤、M 剤及び L 剤）は生物学的製剤基準の規格に適合した。

表 2.6.6.8-6　マウス白血球数増加試験成績

動物種　系統　週齢 性別　動物数/群	マウス　ddY　4 週齢 雌　10 匹	
投与量 投与回数　投与経路	0.5 mL/マウス 1 回　腹腔内	
ロット番号	成績（LPU/mL）	判定
A1＊（H 剤）	[redacted]	適合
A2＊（H 剤）	[redacted]	適合
A3＊（H 剤）	[redacted]	適合
A4＊（H 剤）	[redacted]	適合
A5＊（H 剤）	[redacted]	適合
A6＊（H 剤）	[redacted]	適合
A7＊（L 剤）	[redacted]	適合
A8＊（M 剤）	[redacted]	適合
A9＊（H 剤）	[redacted]	適合

判定基準：0.5 LPU/mL 以下

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6.9 考察及び結論

BK-4SP について、GLP 適合下の試験としてラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、ラットを用いた反復投与局所刺激性試験、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験及び局所刺激性試験を実施した。

その結果、BK-4SP（H 剤）の投与部位に腫脹及び硬結が認められた。病理学組織的検査を行った結果、硬結は異物性肉芽腫であった。BK-4SP は、アルミニウム塩を加えて不溶性としたワクチン製剤である。アルミニウム塩はヒトにおいて安全性の確認されている免疫補助剤であるが、紅斑や皮下結節を引き起こすことが報告されている [1)]。また、モルモットに水酸化アルミニウムゲルを投与した場合、マクロファージを主とした肉芽腫性炎症反応が局所に 8 週間又はそれ以上に渡り認められることが報告されている [2)]。さらに、マウスにアルミニウム塩を投与した場合、肉芽腫が認められること、マウスに破傷風トキソイドとアルミニウム塩を同時に投与した場合、アルミニウム塩単独の反応よりも肉芽腫性変化が強くなり、長期間認められることが報告されている [3)]。これらのことから、異物性肉芽腫は、BK-4SP に含まれるアルミニウム塩或いはアルミニウム塩に吸着した BK-4SP 中の抗原に対する反応であると考えられた。また、BK-4SP（H 剤）の投与によって形成された異物性肉芽腫の周囲の組織に異常は認められなかった。また、異物性肉芽腫は浮腫及び炎症性細胞浸潤の像から肉芽腫性炎或いは線維化主体の像に推移し、経時的に縮小した。加えて、BK-4SP（M 剤）を同一部位へ投与した結果、投与部位に異物性肉芽腫が認められたものの、顕著な累積性は認められなかった。回復期間においてその変化は漸次軽減していることが観察され、BK-4SP の累積局所刺激性及び回復性は、DPT ワクチンと同程度であることが確認された。

さらに、局所における反応については、皮下投与よりも負荷が高いと考えられる筋肉内に BK-4SP（H 剤）を投与し、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」を対照とした局所刺激性試験を実施した。その結果、BK-4SP（H 剤）の局所障害性はグレード 2 に分類され、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」との顕著な差異は認められなかった。

また、反復投与毒性試験において、BK-4SP（H 剤）投与群にγグロブリンの増加とそれに付随した血清総たん白の増加及び A/G 比の低下、脾臓及び下顎リンパ節における胚中心の過形成が用量反応的に認められた。脾臓では、血行性の抗原に曝露されると白脾髄にあるリンパ性組織が一連の免疫反応を開始し、胚中心の形成、形質細胞の分化等のリンパ性組織の増殖が起こることが知られている [4)]。BK-4SP の効力は免疫系を活性化させることによって生じることから、これらの反応は免疫反応、つまり薬効に伴う生理学的な反応であると考えられた。

イヌにおける反復投与毒性試験にて雌の 1 例に多発性動脈炎が認められた。イヌにおける多発性動脈炎の臨床症状は昏睡、食欲不振、歩き方や姿勢の異常等で、その成因は未だ解明されていない。この個体に認められた体重減少及び血液学的所見は、多発性動脈炎による造血器系への影響、加えて摂餌不良による二次的な栄養不良に基づくものであると思われ、他の個体に同様の変化は認められず、単発性変化であったことから、BK-4SP（H 剤）投与による影響とは考え難い。さらに、追加試験において臨床投与量の 50 倍量を投与した群を含むすべての群で多発性動脈炎が認められなかったこと、ビーグル犬では多発性動脈炎の自然発生例が散見されること [5)~7)]、ラットではそのような兆候が認められなかったことから、BK-4SP（H 剤）群の雌 1 例に認められた多

発性動脈炎は、BK-4SP（H 剤）によって生じた可能性は低く、自然発生例と考えられた。

細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験の結果、BK-4SP（H 剤）に遺伝毒性が認められた。しかし、ホルマリンを添加していない BK-4SP（N-BK-4SP）では遺伝毒性が認められなかったこと、ホルマリン液（FA）で遺伝毒性が認められたことから、原因物質はホルマリンであると判断した。BK-4SP 及びトリビックは、ホルマリンによる減毒及び無毒化を行った有効成分（百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイド）を含んでおり、これらを安定化させるために生物学的製剤基準に規定されている範囲内でホルマリンが添加されている。ホルマリンの主成分であるホルムアルデヒドには、*In vitro* 試験において CHO 細胞及びヒトリンパ球細胞で姉妹染色分体交換の誘発、ヒト由来 Hela 細胞で不定期 DNA 合成等が認められている[8)]。しかし、哺乳類の体内においては、吸収されたホルムアルデヒドは肝臓で酸化酵素の作用によってギ酸に分解され、腎臓より尿中に排泄されることで血中濃度は急速に低下することが明らかになっている[8)]。さらに BK-4SP 中に含まれているホルムアルデヒドは約 50 μg/mL であり、現在使用されているトリビックをはじめ、他の不活化ワクチンにおいても同程度の量のホルムアルデヒドが使用されている。トリビックにおいても BK-4SP 同様、細菌を用いる復帰突然変異試験で遺伝毒性が認められた[9)]が、これらのワクチンは既に数十年以上にわたって乳幼児に投与されており、ヒトにおいて遺伝毒性を示したという報告はないことから、DPT の有効成分に遺伝毒性はないと考えられる。以上のことより、BK-4SP をヒトに投与した場合、臨床的に問題となる毒性を示す可能性は非常に低いと考えられた。

トリビックの重大な副反応として、まれにショック、アナフィラキシー様症状（蕁麻疹、呼吸困難、血管浮腫等）、急性血小板減少性紫斑病、また、脳症、けいれん等を呈することが報告されている[10)]。今回実施した毒性試験においてそのような徴候は認められなかった。また、接種局所の副反応として、発赤、腫脹、水疱、疼痛及び硬結がある。BK-4SP もトリビックと同様の副反応が認められると推測される。反復投与毒性試験において認められた毒性所見が局所反応のみであり、同一部位への投与による反復投与局所刺激性試験においてもその刺激性に顕著な増強は認められなかった。また、皮下投与による累積局所刺激性と回復性、筋肉内への局所刺激性については DPT を対照物質として試験を実施した。その結果、得られた結果は DPT と同様であったことから、BK-4SP で認められる副反応の程度は、トリビックで認められる副反応と同程度であると考えられた。

非 GLP 適合下の試験として BK-4SP について、生物学的製剤基準を準用して異常毒性否定試験、マウス体重減少試験、マウスヒスタミン増感試験、ジフテリア毒素無毒化試験、破傷風毒素無毒化試験及びマウス白血球数増加試験を実施した。その結果、すべてのロットが規格に適合した。なお、これらの規格及び試験方法はトリビックを準用して設定した。

BK-4SP は有効成分として百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイド並びに不活化ポリオウイルス 1 型、2 型及び 3 型（Sabin 株）を含む製剤である。不活化ポリオウイルス 1 型、2 型及び 3 型（Sabin 株）はホルマリンにより不活化された弱毒株由来ポリオウイルスであり、小児を対象とした臨床試験において重篤な副反応は認められていない[11)]。以上のことから、百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイド並びに不活化ポリオウイルス 1 型、2 型及び 3 型（Sabin 株）を混合することによって臨床的に問題となる副反応が認められる可能性は極めて低く、BK-4SP の毒性はトリビックと同程度であると考えられた。

参考文献一覧

1. NW.Baylor; W.Egan; P.Richman. Aluminum salts in vaccines--US perspective.Vaccine. 20, S18-23. Erratum in: Vaccine. 2002, Sep 10, 20 (27-28), 3428.
2. N.Goto; H.Kato; J.Maeyama et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. Vaccine. 1997, 15, (12-13), 1364-1371.
3. N.Goto; K.Akama. Histopathological Studies of Reactions in mice Injected with Aluminum - Adsorbed Tetanus Toxoid. Microbiol. Immunol. 1982, 26 (12), 1121-1132.
4. 大滝サチ. “各論 13 章 造血器, 1-4. 脾臓”. 毒性病理組織学. 日本毒性病理学会編集. 2000, 389-390.
5. 奈良間功. “循環器系 1, 多発性動脈炎（汎動脈炎･結節性動脈周囲炎）” 毒性試験講座 5 毒性病理学. 株式会社地人書館. 1991, 63-64.
6. HA.Hartman. Idiopathic extramural coronary arteritis in beagle and mongrel dogs. Veterinary Pathology. 1987, 24 (6), 537-544.
7. A.Spencer; P.Greaves. Periarteritis in a beagle colony. Journal of Comparative Pathology. 1987, 97 (2), 121-128.
8. 既存化学物質安全性（ハザード）評価シート「ホルムアルデヒド」
9. 井上達生. 沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンの細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：FBM [redacted]-8424）. 20[redacted].
10. 沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 添付文書 2010 年 4 月改訂（第 5 版）
11. Doi Y; Abe S; Yamamoto H et al. Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin strains. Dev Biol(Basel). 2001, 105, 163-169.

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：BK-4SP

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所（CTD）
単回投与毒性試験								
ラット	ラット/Crj:CD(SD)IGS	皮下	－	0、0.8、4（mL/kg）	適		FBM [redacted]-2317	2.6.6.2 1.
イヌ	イヌ/ビーグル	皮下	－	0、0.8、4（mL/kg）	適		FBM [redacted]-4318	2.6.6.2 2.
反復投与毒性試験								
ラット	ラット/Crj:CD(SD)IGS	皮下	1回/週 4回	0、0.8（mL/kg）	適		FBM [redacted]-2319	2.6.6.3 1.
ラット	ラット/Crl:CD(SD)	皮下	1回/週 5回	0.8（mL/kg）	適		P[redacted]0336	2.6.6.3 2.
イヌ	イヌ/ビーグル	皮下	1回/週 4回	0、0.8（mL/kg）	適		FBM [redacted]-4320	2.6.6.3 3.
イヌ	イヌ/ビーグル	皮下	1回/週 4回	0（mL/kg） 0.08（mL/kg） 0.8（mL/kg） 4.0（mL/kg）	適		B[redacted]1122	2.6.6.3 4.

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所（CTD）
遺伝毒性試験								
In Vitro 遺伝毒性試験								
細菌を用いる復帰突然変異試験	ネズミチフス菌/TA98株、TA1537株、TA100株、TA1535株 大腸菌/WP2*uvrA*株	*In Vitro*	−	500 μL/plate～100 μL/plate，5用量	適	[redacted]	FBM [redacted]-8324	2.6.6.4.1 1.
		In Vitro	−	500 μL/plate～100 μL/plate，5用量、対照（N-BK-4SP※1、FA※2）	適		FBM [redacted]-8585	2.6.6.4.1 2.
マウスリンフォーマ TK試験	マウスリンパ腫細胞株/L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C	*In Vitro*	−	100 μL/mL～2倍段階希釈，6用量、短時間処理法（-S9、+S9）24時間連続処理法	適		FBM [redacted]-8325	2.6.6.4.1 3.
マウスリンフォーマ TK試験	マウスリンパ腫細胞株/L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C	*In Vitro*	−	6用量（100、75、50、25、12.5、6.25 μL/mL）、短時間処理法（-S9、+S9）、24時間連続処理法、対照（N-BK-4SP※1、FA※2）	適	[redacted]	FBM [redacted]-8586	2.6.6.4.1 4.
In Vivo 遺伝毒性試験								
がん原性試験								
生殖発生毒性試験								
局所刺激性試験	ウサギ/Jla:JW	筋肉内	−	0.5 mL/site	適	[redacted]	FBM [redacted]-3321	2.6.6.7

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所（CTD）
その他の毒性試験								
異常毒性否定試験	モルモット/ハートレイ	腹腔内	－	5 mL/匹	不適	財団法人 阪大微生物病研究会 観音寺研究所	RDIP[redacted]04-008 RDIP[redacted]01-003 DIP[redacted]03001 DIP[redacted]04002 DIP[redacted]09001 DIP[redacted]02002 DIP[redacted]01002 DIP[redacted]01003 DIP[redacted]01004	2.3.P.5.4
マウス体重減少試験	マウス/ddY	腹腔内	－	0.5 mL/匹	不適		[redacted]-12、[redacted]-06 [redacted]-07、[redacted]-08 [redacted]-26、[redacted]-06 [redacted]-03、[redacted]-04	
マウスヒスタミン増感試験	マウス/ddY	腹腔内	－	0.5 mL/匹	不適		[redacted]-11、[redacted]-06 [redacted]-07、[redacted]-08 [redacted]-10、[redacted]-11 [redacted]-26、[redacted]-30 [redacted]-06、[redacted]-08 [redacted]-03、[redacted]-04	
ジフテリア毒素無毒化試験	ウサギ/日本白色種	皮内	－	0.1 mL/匹	不適	財団法人 阪大微生物病研究会 観音寺研究所	RDIP[redacted]04-008 [redacted]04、[redacted]10 [redacted]16、[redacted]06 [redacted]01	2.3.P.5.4
破傷風毒素無毒化試験	モルモット/ハートレイ	皮下	－	3 mL/匹	不適		[redacted]-10、[redacted]-03 [redacted]-06、[redacted]-07 D[redacted]-25、[redacted]-07 [redacted]-01、[redacted]-02	
マウス白血球数増加試験	マウス/ddY	腹腔内	－	0.5 mL/匹	不適		[redacted]-11、[redacted]-06 [redacted]-07、[redacted]-08 [redacted]-26、[redacted]-06 [redacted]-03	

※1　ホルマリン無添加の BK-4SP（H 剤）

※2　ホルマリン液

斜線部分は該当する試験なし。

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

該当する試験はない。

2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧

被験物質：BK-4SP

	有効成分						規格設定された不純物 単位：EU/mL	試験項目	試験報告書番号
	単位：単位/mL			不活化ポリオウイルス（Sabin 株）の D 抗原量 単位：DU/mL					
	沈降精製百日せきワクチンの力価	沈降ジフテリアトキソイドの力価	沈降破傷風トキソイドの力価	1 型	2 型	3 型	エンドトキシン		
申請規格	[redacted] 以上 [redacted] 以下	[redacted] 以上 [redacted] 以下	[redacted] 以上 [redacted] 以下	※	※	※	[redacted] 未満		
A1＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	ラットにおける単回皮下投与毒性試験	FBM [redacted]-2317
								イヌにおける単回皮下投与毒性試験	FBM [redacted]-4318
								ラットにおける反復皮下投与毒性試験	FBM [redacted]-2319
								イヌにおける反復皮下投与毒性試験	FBM [redacted]-4320
								細菌を用いる復帰突然変異試験	FBM [redacted]-8324
								マウスリンフォーマ TK 試験	FBM [redacted]-8325
								局所刺激性試験	FBM [redacted]-3321
								異常毒性否定試験	RDIP [redacted]04-008
								マウス体重減少試験	[redacted]-12
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-11
								ジフテリア毒素無毒化試験	RDIP [redacted]04-008
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-10
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-11
A2＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	細菌を用いる復帰突然変異試験（ホルマリンの影響について）	FBM [redacted]-8585
								マウスリンフォーマ TK 試験（ホルマリンの影響について）	FBM [redacted]-8586
								異常毒性否定試験	RDIP [redacted]01-003
								マウス体重減少試験	[redacted]-06
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-06
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]04
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-03
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-06

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

	有効成分						規格設定された不純物 単位：EU/mL	試験項目	試験報告書番号
	単位：単位/mL			不活化ポリオウイルス（Sabin 株）の D 抗原量 単位：DU/mL					
	沈降精製百日せきワクチンの力価	沈降ジフテリアトキソイドの力価	沈降破傷風トキソイドの力価	1 型	2 型	3 型	エンドトキシン		
申請規格	[redacted]以上[redacted]以下	[redacted]以上[redacted]以下	[redacted]以上[redacted]以下	※	※	※	[redacted]未満		
A3＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	イヌにおける反復皮下投与毒性試験（追加試験）	B[redacted]1122
								異常毒性否定試験	DIP[redacted]03001
								マウス体重減少試験	[redacted]-07
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-07、[redacted]-10
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]10
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-06
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-07
A4＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	異常毒性否定試験	DIP[redacted]04002
								マウス体重減少試験	[redacted]-08
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-08、[redacted]-11
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]10
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-07
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-08
A5＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	異常毒性否定試験	DIP[redacted]09001
								マウス体重減少試験	[redacted]-26
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-26、[redacted]-30
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]16
								破傷風毒素無毒化試験	D[redacted]-25
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-26
A6＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	異常毒性否定試験	DIP[redacted]02002
								マウス体重減少試験	[redacted]-06
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-06、[redacted]-08
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]06
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-07
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-06
A7＊（L 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	異常毒性否定試験	DIP[redacted]01002
								マウス体重減少試験	[redacted]-04
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-03、[redacted]-04
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]01
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-01
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-03
A8＊（M 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	<[redacted]	異常毒性否定試験	DIP[redacted]01003
								マウス体重減少試験	[redacted]-03
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-03、[redacted]-04
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]01
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-02
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-03

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

	有効成分						規格設定された不純物 単位：EU/mL	試験項目	試験報告書番号
	単位：単位/mL			不活化ポリオウイルス（Sabin 株）の D 抗原量 単位：DU/mL					
	沈降精製百日せきワクチンの力価	沈降ジフテリアトキソイドの力価	沈降破傷風トキソイドの力価	1 型	2 型	3 型	エンドトキシン		
申請規格	[redacted] 以上 [redacted] 以下	[redacted] 以上 [redacted] 以下	[redacted] 以上 [redacted] 以下	※	※	※	[redacted] 未満		
A9＊（H 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	＜[redacted]	異常毒性否定試験	DIP[redacted]01004
								マウス体重減少試験	[redacted]-03
								マウスヒスタミン増感試験	[redacted]-03 [redacted]-04
								ジフテリア毒素無毒化試験	[redacted]01
								破傷風毒素無毒化試験	[redacted]-02
								マウス白血球数増加試験	[redacted]-03
A10＊（M 剤）	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	＜[redacted]	反復皮下投与局所刺激性試験	P[redacted]0336

※　製造目標値として、BK-4SP（H 剤）は 1 型で 6 DU/mL、2 型で 200 DU/mL、3 型で 200 DU/mL とした。BK-4SP（M 剤）は H 剤の 1/2 量（1 型：3 DU/mL、2 型：100 DU/mL、3 型：100 DU/mL）、BK-4SP（L 剤）は H 剤の 1/4 量（1 型：1.5 DU/mL、2 型：50 DU/mL、3 型：50 DU/mL）とした。

＊：新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 単回投与毒性試験

被験物質：BK-4SP（H 剤）

動物種／系統	投与方法	投与量（mL/kg）	性別及び動物数/群	最大非致死量（mL/kg）	概略の致死量（mL/kg）	特記すべき所見	試験番号
ラット/ Crj:CD(SD) IGS	皮下	0 0.8 4	5M、5F	≧4	＞4	投与局所にアルミニウム塩の影響と推測される異物性肉芽腫が生じるが、全身性の毒性徴候は認められなかった。	FBM [redacted]-2317
イヌ/ ビーグル	皮下	0 0.8 4	2M	≧4	＞4	投与局所にアルミニウム塩の影響と推測される異物性肉芽腫が生じるが、全身性の毒性徴候は認められなかった。	FBM [redacted]-4318

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当する試験はない。

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A　反復投与毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア 被験物質：BK-4SP（H 剤）破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）のラットにおける 4 週間反復皮下投与毒性試験

動物種/系統：ラット Crj:CD（SD）IGS
試験開始週齢：6 週齢
初回投与年月日：20■年■月■日
特記事項：なし
無毒性量：0.8 mL/kg

投与期間：1 回/週　4 週間
休薬期間：設定せず
投与方法：皮下投与
溶媒/投与形態：水溶液

試験番号：FBM ■ -2319
CTD における記載箇所：2.6.6.3
GLP 適用：適

投与量（mL/kg）		0（対照）		0.8					
動物数		M：10	F：10	M：10			F：10		
特記すべき所見									
死亡及び屠殺動物数		—	—	—			—		
体重		—	—	—			—		
摂餌量		—	—	—			—		
眼科学的検査		—	—	—			—		
剖検所見									
投与部皮下　淡黄白色結節		—	—	79.7±31.3 [a] / 10 [b]			53.2±21.4 [a] /10 [b]		
組織学的検査									
投与部皮下　異物性肉芽腫 [b]		0	0	10			10		
投与後 1 週（4 回目投与部位）[b]				i	ii	iii	i	ii	iii
好酸性物質沈着		0	0	2	4	4	4	5	1
出血		0	0	0	0	0	1	1	0
炎症性細胞浸潤	リンパ球・形質細胞	0	0	0	3	7	0	3	7
	組織球	0	0	4	6	0	5	5	0
	好酸球	0	0	2	4	0	5	0	0
	肉芽組織減少・線維性被膜の菲薄化	0	0	0	1	9	0	5	5
投与後 4 週（1 回目投与部位）[b]				i	ii	iii	i	ii	iii
好酸性物質沈着		0	0	4	0	0	2	3	0
出血		0	0	0	0	0	0	0	0
炎症性細胞浸潤	リンパ球・形質細胞	0	0	0	5	0	1	4	2
	組織球	0	0	5	0	0	6	0	0
	好酸球	0	0	0	0	0	0	0	0
	肉芽組織減少・線維性被膜の菲薄化	0	0	4	0	0	4	1	0

— 特記すべき所見なし。　+/i 極めて軽度　ii 軽度　iii 中等度
F 検定後、等分散の場合：student t-test　分散が等しくない場合：Welch t-test；*- p<0.05　**-p<0.01
a) 結節の面積（mm^2）。
b) 所見の認められた動物数。

2.6.7.7B　反復投与毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）のラットにおける 5 週間間歇皮下投与局所刺激性試験および回復性試験

被験物質：BK-4SP（M 剤）

動物種/系統：ラット Crl:CD（SD）
試験開始週齢：6 週齢
初回投与年月日：20■年■月■日

投与期間：1 回/週　5 週間
休薬期間：6 週
投与方法：皮下投与
溶媒/投与形態：水溶液

試験番号：P■0336
CTD における記載箇所：2.6.6.3
GLP 適用：適

特記事項：なし
無毒性量：0.8 mL/kg

投与量（mL/kg）	0.8（対照物質：DPT ワクチン）						0.8					
反復投与終了時												
動物数	M：10			F：10			M：10			F：10		
特記すべき所見												
死亡及び屠殺動物数	—			—			—			—		
投与部位の硬結	8			9			9			10		
体重	—			—			—			—		
剖検所見												
動物数	M：5			F：5			M：5			F：5		
投与部位の硬結	5			5			5			5		
組織学的検査	i	ii	iii	i	ii	iii	i	ii	iii	i	ii	iii
出血	2	3	0	3	1	0	4	1	0	3	1	0
異物性肉芽腫	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5
回復期間終了時												
動物数	M：5			F：5			M：5			F：5		
特記すべき所見												
死亡及び屠殺動物数	—			—			—			—		
投与部位の硬結	0			0			0			0		
体重	—			—			—			—		
剖検所見												
投与部皮下の硬結	2			3			2			5		
組織学的検査	i	ii	iii	i	ii	iii	i	ii	iii	i	ii	iii
出血	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
異物性肉芽腫	0	4	1	0	4	1	0	5	0	0	4	1

— 特記すべき所見なし。　+/i 極めて軽度　ii 軽度　iii 中等度

2.6.7.7C　反復投与毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）のイヌにおける 4 週間反復皮下投与毒性試験

被験物質：BK-4SP（H 剤）

動物種/系統：イヌ/ビーグル
試験開始週齢：7～8 カ月齢
初回投与年月日：20■年■月■日

投与期間：1 回/週　4 週間
休薬期間：設定せず
投与方法：皮下投与
溶媒/投与形態：水溶液

試験番号：FBM ■ -4320
CTD における記載箇所：2.6.6.3
GLP 適用：適

特記事項：なし

無毒性量：0.8 mL/kg

投与量（mL/kg）	0（対照）		0.8	
動物数	M：3	F：3	M：3	F：3
特記すべき所見				
死亡及び屠殺動物数 [b]	0	0	0	0
体重減少（+++） [b]	—	—	—	1
摂餌量減少（++ ～ +++） [b]	—	—	—	1
投与部位腫脹：投与後 1～6 日 [b]				
1 回目投与部位	0	0	2	3
2 回目投与部位	0	0	3	3
3 回目投与部位	0	0	2	3
4 回目投与部位	0	0	3	3
投与部位硬結：剖検日 [b]				
投与後 4 週（1 回目投与部位）	0	0	1	0
投与後 3 週（2 回目投与部位）	0	0	1	1
投与後 2 週（3 回目投与部位）	0	0	1	1
投与後 1 週（4 回目投与部位）	0	0	3	2
眼科学的検査	—	—	—	—
心電図検査	—	—	—	—
脈拍数	—	—	—	—
血液生化学的検査				
アルブミン比率（4 週間後）	48.9	52.8	43.9*	41.6
γグロブリン比率（4 週間後）	9.6	7.4	14.1	13.0
剖検所見				
投与部皮下　淡黄白色結節	—	—	34.1±9.8 [a] / 3 [b]	31.2±7.9 [a] / 3 [b]
器官重量				
精巣	—	c)	—	c)
卵巣	c)	—	c)	—

投与量（mL/kg）		0（対照）		0.8							
動物数		M：3	F：3	M：3				F：3			
組織学的検査											
胚中心発達（脾臓）		—	—	ii、3[b)]				ii、3[b)]			
多発性動脈炎[b)]		0	0	0				1[※]			
投与部皮下　異物性肉芽腫[b)]		0	0	3				3			
投与後 1 週（4 回目接種部位）[b)]				i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv
好酸性物質沈着		0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
出血		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
炎症性細胞浸潤	リンパ球・形質細胞	0	0	0	2	1	0	0	2	1	0
	組織球	0	0	1	1	1	0	0	2	1	0
	多形核白血球	0	0	0	0	2	1	0	1	2	0
	肉芽組織形成から線維化に至る変化	0	0	0	0	3	0	1	2	0	0
投与 4 週（1 回目接種部位）[b)]				i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv
好酸性物質沈着		0	0	2	0	0	0	2	0	1	0
出血		0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
炎症性細胞浸潤	リンパ球・形質細胞	0	0	0	2	1	0	1	2	0	0
	組織球	0	0	0	1	2	0	0	1	2	0
	多形核白血球	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	肉芽組織形成から線維化に至る変化	0	0	0	2	1	0	0	3	0	0

※　自然発生例と考えられる。
—　特記すべき所見なし。　+/i　極めて軽度　　ii　軽度　　iii　中等度　　iv　高度
F 検定後、等分散の場合：student t-test　分散が等しくない場合：Welch t-test；*- p<0.05　**-p<0.01
a)　結節の面積（mm^2）。
b)　所見の認められた動物数。
c)　実施せず。

2.6.7.7D　反復投与毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）のビーグル犬を用いた 4 週間反復皮下投与毒性試験

被験物質：BK-4SP（H 剤）

動物種/系統：イヌ/ビーグル
試験開始週齢：6 カ月齢
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

投与期間：1 回/週　4 週間
休薬期間：設定せず
投与方法：皮下投与
溶媒/投与形態：水溶液

試験番号：B[redacted]1122
CTD における記載箇所：2.6.6.3
GLP 適用：適

特記事項：なし
無毒性量：4 mL/kg

投与量（mL/kg）		0（対照）	0.08				0.8				4			
動物数		F：3	F：3				F：3				F：3			
特記すべき所見														
死亡及び屠殺動物数 a)		0	0				0				0			
体重		—	—				—				—			
摂餌量		—	—				—				—			
投与部位の硬結：剖検日 a)		0	3				3				3			
眼科学的検査		—	—				—				—			
心電図検査		—	—				—				—			
脈拍数		—	—				—				—			
血液生化学的検査														
γグロブリン	8 日目	7.23	6.67				6.83				9.00			
	15 日目	7.20	7.37				8.67				11.83**			
	22 日目	7.43	7.73				10.53				14.93**			
	29 日目	8.03	7.77				10.47				15.27			
血清総たん白	29 日目	7.30	7.47				7.63				8.47*			
A/G 比	15 日目	1.320	1.313				1.217				1.027**			
	22 日目	1.203	1.307				1.010				0.873*			
	29 日目	1.280	1.307				1.083				0.887*			
LDH	8 日目	48.0	48.3				53.0				65.7*			
	15 日目	61.3	71.3				66.3				91.3**			
	22 日目	45.3	47.0				43.3				70.7**			
組織学的検査														
胚中心発達（脾臓）		—	—				++、3 a)				++、2 a) / +++、1 a)			
胚中心発達（下顎リンパ節）		—	—				+、2 a)				++、2 a)			
投与後 1 週（4 回目接種部位）			i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv
出血		0	1	1	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
炎症性細胞浸潤		0	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	3
肉芽腫性炎		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
線維化		0	0	1	1	0	2	0	0	0	3	0	0	0
浮腫		0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0
投与後 4 週（1 回目接種部位）			i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv
出血		0	1	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	0
炎症性細胞浸潤		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肉芽腫性炎		0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0
線維化		0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2	1	0
浮腫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
卵巣		—	—				—				—			

— 特記すべき所見なし。　+/i 極めて軽度　++/ii 軽度　+++/iii 中等度　iv 高度
Dunnett's Test：*- p<0.05　**-p<0.01
a) 所見の認められた動物数

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8A *In Vitro* 遺伝毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）の細菌を用いる復帰突然変異試験

被験物質：BK-4SP（H 剤）

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験
菌株：*S. typhimurium* 及び *E.coli*
代謝活性系：S9mix
溶媒：陽性対照；DMSO
処理：プレインキュベーション法で 48 時間
細胞毒性：なし
遺伝毒性：あり

独立して実施した試験数：1
プレート数：2
分析細胞数/培養：全コロニー数を計測
被験物質：BK-4SP（H 剤）
GLP 適用：適

試験番号：FBM [redacted] -8324
CTD における記載箇所：
2.6.6.4
処理年月：20[redacted]年[redacted]月

代謝活性化	被験物質	用量段階	復帰コロニー数				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
代謝活性化なし	生理食塩液	100 μ L/plate	92 121 134（116）[a]	10 12 15（12）	17 18 22（19）	21 24 26（24）	5 6 7（6）
	2-（2-フリル）3-（5-ニトロ-2-フリル）アクリルアミド	0.01 μ g/ plate 0.1 μ g/ plate	420 428（424）		135 145（140）	 387 407（397）	
	アジ化ナトリウム	0.5 μ g/ plate		365 375（370）			
	9-アミノアクリジン塩酸塩	80 μ g/ plate					343 388（366）
	BK-4SP（H 剤）	500 μ L/plate	211（232） 252 [232][b]	19 21（20）	36（39） 42 [40.0]	86（91） 96 [134]	6 10（8）
		400 μ L/plate	196 209（203）	15 20（18）	24 31（28）	59（62） 64 [95]	9 10（10）
		300 μ L/plate	165 169（167）	14 18（16）	17 38（28）	53（59） 65 [117]	6 8（7）
		200 μ L/plate	135 177（156）	11 13（12）	28 28（28）	43 47（45）	4 10（7）
		100 μ L/plate	124 141（133）	9 14（12）	11 22（17）	36 39（38）	6 7（7）

a) （ ）内に平均値を示した。
b) [ ]内に比活性値を示した。

代謝活性化	被験物質	用量段階	復帰コロニー数				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
代謝活性化あり	生理食塩液	100 μL/plate	118 121 130（123）[a)]	9 12 19（13）	13 23 27（21）	23 26 35（28）	4 9 10（8）
	2-アミノアントラセン	0.5 μg/plate				223 237（230）	
		1.0 μg/plate	696 719（708）				
		2.0 μg/plate		285 326（306）			205 212（209）
		10 μg/plate			558 688（623）		
	BK-4SP（H剤）	500 μL/plate	307（323） 338[400][b)]	19 21（20）	28 40（34）	83（82） 80 [108]	6 8（7）
		400 μL/plate	257（264） 270[353]	16 20（18）	29 32（31）	77（83） 88[138]	6 6（6）
		300 μL/plate	212 219（216）	14 15（15）	33 43（38）	61（68） 74[133]	6 6（6）
		200 μL/plate	193 201（197）	16 21（19）	24 34（29）	39 41（40）	7 11（9）
		100 μL/plate	138 140（139）	15 16（16）	25 28（27）	42 44（43）	7 7（7）

a) （ ）内に平均値を示した。
b) [ ]内に比活性値を示した。

2.6.7.8B *In Vitro* 遺伝毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）の細菌を用いる復帰突然変異試験（ホルマリンの影響について）

被験物質:BK-4SP（H 剤）

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験
菌株：*S. typhimurium* 及び *E.coli*
代謝活性系：S9mix
溶媒：陽性対照；DMSO
　　比較陽性対照物質（FA）；注射用水
処理：プレインキュベーション法で 48 時間
細胞毒性：なし
遺伝毒性：なし

独立して実施した試験数：1
プレート数：2
分析細胞数/培養：全コロニー数を計測
被験物質：BK-4SP（H 剤）
GLP 適用：適

試験番号：FBM ■ -8585
CTD における記載箇所：
　2.6. 6.4
処理年月：20■年■月

代謝活性化	被験物質	用量段階	復帰コロニー				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
代謝活性化なし	生理食塩液	100 μ L/plate	114 115 138（122）[a)]	11 12 14（12）	18 21 24（21）	11 20 22（18）	4 4 4（4）
	2-（2-フリル）3-（5-ニトロ-2-フリル）アクリルアミド	0.01 μ g/ plate 0.1 μ g/ plate	307 349（328）		147 164（156）	 324 422（373）	
	アジ化ナトリウム	0.5 μ g/ plate		507 517（512）			
	9-アミノアクリジン塩酸塩	80 μ g/ plate					197 271（234）
	BK-4SP（H 剤）	500 μ L/plate	208 215（212）	15 16（16）	35 35（35）	57（59） 61[82.0][b)]	4 5（5）
		400 μ L/plate	215 224（220）	12 13（13）	27 49（38）	44（46） 48[70.0]	5 6（6）
		300 μ L/plate	189 191（190）	9 15（12）	30 32（31）	30（37） 43[63.3]	2 5（4）
		200 μ L/plate	149 164（157）	9 12（11）	18 35（27）	21 35（28）	4 6（5）
		100 μ L/plate	121 140（131）	11 14（13）	20 24（22）	14 18（16）	1 4（3）

a)　（　）内に平均値を示した。
b)　[　]内に比活性値を示した。

代謝活性化	被験物質	用量段階	復帰コロニー数				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
代謝活性化あり	生理食塩液	100 μ L/plate	124 138 153（138）[a)]	7 8 14（10）	26 28 29（28）	23 32 36（30）	4 5 8（6）
	2-アミノアントラセン	0.5 μ g/ plate				285 301（293）	
		1.0 μ g/ plate	761 780（771）				
		2.0 μ g/ plate		241 278（260）			161 162（162）
		10 μ g/ plate			1015 1185（1100）		
	BK-4SP（H 剤）	500 μ L/plate	258（286） 314[296][b)]	10 12（11）	22 31（27）	55 62（59）	4 10（7）
		400 μ L/plate	228 262（245）	12 19（16）	27 37（32）	38 41（40）	3 5（4）
		300 μ L/plate	190 215（203）	10 13（12）	30 34（32）	43 44（44）	5 6（6）
		200 μ L/plate	152 160（156）	17 19（18）	19 31（25）	31 49（40）	3 5（4）
		100 μ L/plate	145 171（158）	8 10（9）	27 35（31）	27 36（32）	3 7（5）

a) （ ）内に平均値を示した。
b) [ ]内に比活性値を示した。

代謝活性化	被験物質	用量段階	復帰コロニー数				
			TA100	TA1535	WP2*uvr*A	TA98	TA1537
代謝活性化なし	生理食塩液	100 μ L/plate	120 120 139（126）[a)]	8 13 13（11）	19 23 30（24）	17 18 19（18）	3 4 6（4）
	2-（2-フリル）3-（5-ニトロ-2-フリル）アクリルアミド	0.01 μ g/ plate	334 343（339）		160 178（169）		
		0.1 μ g/ plate				329 374（352）	
	アジ化ナトリウム	0.5 μ g/ plate		461 488（475）			
	9-アミノアクリジン塩酸塩	80 μ g/ plate					349 431（390）
	N-BK-4SP[b)]	500 μ L/plate	118 119（119）	9 12（11）	14 22（18）	18 20（19）	1 2（2）
		400 μ L/plate	106 114（110）	6 11（9）	18 19（19）	19 19（19）	1 2（2）
		300 μ L/plate	109 128（119）	8 10（9）	27 29（28）	14 26（20）	2 5（4）
		200 μ L/plate	121 127（124）	10 13（12）	20 24（22）	19 24（22）	1 4（3）
		100 μ L/plate	122 123（123）	10 10（10）	17 22（20）	13 20（17）	1 4（3）
代謝活性化あり	生理食塩液	100 μ L/plate	123 145 151（140）	8 13 13（11）	14 26 26（22）	33 34 36（34）	5 6 10（7）
	2-アミノアントラセン	0.5 μ g/ plate				288 295（292）	
		1.0 μ g/ plate	779 820（800）				
		2.0 μ g/ plate		251 256（254）			108 133（121）
		10 μ g/ plate			1010 1093（1052）		
	N-BK-4SP	500 μ L/plate	153 154（154）	9 4（7）	17 28（23）	30 31（31）	1 4（3）
		400 μ L/plate	155 157（156）	8 15（12）	15 30（23）	29 34（32）	8 10（9）
		300 μ L/plate	132 152（142）	5 11（8）	17 21（19）	27 39（33）	6 6（6）
		200 μ L/plate	140 157（149）	11 14（13）	18 22（20）	25 26（26）	8 8（8）
		100 μ L/plate	128 145（137）	11 12（12）	17 22（20）	30 35（33）	10 11（11）

a)　（ ）内に平均値を示した。
b)　ホルマリン無添加沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン

代謝活性化	被験物質	用量段階	復帰コロニー数				
			TA100	TA1535	WP2*uvr*A	TA98	TA1537
代謝活性化なし	生理食塩液	100 μL/plate	112 116 125（118）[a]	9 9 13（10）	14 16 17（16）	20 25 26（24）	2 3 5（3）
	2-（2-フリル）3-（5-ニトロ-2-フリル）アクリルアミド	0.01 μg/ plate	319 321（320）		137 153（145）		
		0.1 μg/ plate				335 359（347）	
	アジ化ナトリウム	0.5 μg/ plate		497 513（505）			
	9-アミノアクリジン塩酸塩	80 μg/ plate					191 282（237）
	FA[b]	500 μL/plate	102 123（113）	5 12（9）	59（61） 63[90.0][c]	75（80） 85[112]	4（9） 13[12.0]
		400 μL/plate	281（297） 313[448]	9 20（15）	35（46） 57[75.0]	78（79） 80[138]	7（8） 8[12.5]
		300 μL/plate	237（245） 252[423]	10 13（12）	39（41） 43[83.3]	52（57） 61[110]	4（6） 7[10.0]
		200 μL/plate	185 226（206）	14 18（16）	29 30（30）	41 51（46）	2 2（2）
		100 μL/plate	126 169（148）	15 17（16）	22 27（25）	28 31（30）	2 7（5）
代謝活性化あり	生理食塩液	100 μL/plate	125 133 140（133）	6 10 10（9）	21 24 41（29）	26 28 41（32）	11 11 19（14）
	2-アミノアントラセン	0.5 μg/ plate				312 344（328）	
		1.0 μg/ plate	717 752（735）				
		2.0 μg/ plate		248 258（253）			152 189（171）
		10 μg/ plate			961 1025（993）		
	FA[b]	500 μL/plate	98 122（110）	6 12（9）	50（66） 81[74.0]	70（76） 81[88.0]	6 11（9）
		400 μL/plate	323（336） 348[508]	16（19） 21[25.0]	47 48（48）	58（64） 70[80.0]	11 16（14）
		300 μL/plate	202 317（260）	15 15（15）	33 36（35）	49 57（53）	12 12（12）
		200 μL/plate	207 217（212）	8 9（9）	40 42（41）	45 53（49）	12 12（12）
		100 μL/plate	138 154（146）	7 13（10）	23 24（24）	25 49（37）	10 16（13）

a)　（　）内に平均値を示した。
b)　ホルマリン液
c)　[　]内に比活性値を示した。

2.6.7.8C *In Vitro* 遺伝毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）のマウスリンフォーマ TK 試験

被験物質：BK-4SP（H 剤）

試験の種類：マウスリンフォーマ TK 試験
細胞株：マウスリンパ腫細胞株（L5178Y tk+/－3.7.2C）
代謝活性系：S9mix
溶媒：陽性対照（メタンスルホン酸メチル）；生理食塩液
陽性対照（シクロフォスファミド）；注射用水
処理：短時間処理法；3 時間
連続処理法；24 時間
細胞毒性：なし
遺伝毒性：あり

独立して実施した試験数：1
プレート数：1
分析細胞数/培養：全コロニー数を計測
被験物質：BK-4SP（H 剤）
陽性対照：メタンスルホン酸メチル
シクロフォスファミド

試験番号：FBM [redacted]-8325
CTD における記載箇所：2.6.6.4
処理年月：20[redacted]年[redacted]月
GLP 適用：適

代謝活性化	被験物質	用量段階	Total colony		Large colony	Small colony	% SC [c]
			変異出現率 [a]	Induc-tivity [b]	変異出現率	変異出現率	
3 時間振盪培養 代謝活性化なし	生理食塩液	－	90.3	1.00	38.7	49.5	54.9
	MMS [d]	10 μg/mL	487.8	5.40	158.8	243.0	49.8
		20 μg/mL	1401.8	15.53	510.6	669.9	47.8
	BK-4SP（H 剤）	3.13 μL/mL	122.9	1.36	26.8	91.8	74.7
		6.25 μL/mL	137.9	1.53	45.7	90.3	65.5
		12.5 μL/mL	110.2	1.22	49.1	57.0	51.7
		25.0 μL/mL	126.4	1.40	36.9	89.4	70.7
		50.0 μL/mL	330.0	3.66	117.2	187.4	56.8
		100 μL/mL	776.4	8.60	220.6	450.2	58.0
代謝活性化あり	生理食塩液	－	133.5	1.00	57.9	69.3	51.9
	CP [e]	3 μg/mL	909.8	6.82	339.7	397.1	43.7
	BK-4SP（H 剤）	3.13 μL/mL	134.0	1.00	44.2	82.3	61.4
		6.25 μL/mL	133.5	1.00	57.6	77.9	58.3
		12.5 μL/mL	105.2	0.79	43.7	60.1	57.2
		25.0 μL/mL	126.9	0.95	76.7	47.7	37.6
		50.0 μL/mL	138.2	1.04	58.3	81.5	58.9
		100 μL/mL	405.6	3.04	174.9	199.4	49.2
24 時間静置培養	生理食塩液	－	213.9	1.00	85.3	112.4	52.5
	MMS	5 μg/mL	infinity	infinity	4110.6	800.0	infinity
	BK-4SP（H 剤）	3.13 μL/mL	178.2	0.83	70.5	88.2	49.5
		6.25 μL/mL	263.9	1.23	69.5	175.0	66.3
		12.5 μL/mL	272.8	1.28	84.3	170.1	62.3
		25.0 μL/mL	276.1	1.29	70.2	178.2	64.5
		50.0 μL/mL	217.5	1.02	95.6	103.3	47.5
		100 μL/mL	1733.2	8.10	576.4	898.9	51.9

a) $\times 10^{-6}$
b) 陰性対照群との比
c) small colony の割合
d) メタンスルホン酸メチル
e) シクロフォスファミド

2.6.7.8D *In Vitro* 遺伝毒性試験

報告書の題名：沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（BK-4SP）のマウスリンフォーマ TK 試験（ホルマリンの影響について）

被験物質：BK-4SP（H 剤）

試験の種類：マウスリンフォーマ TK 試験
細胞株：マウスリンパ腫細胞株（L5178Y *tk*$^{+/-}$ 3.7.2C）
代謝活性系：S9mix
溶媒：比較陽性対照物質（FA）；注射用水
　　陽性対照（メタンスルホン酸メチル）；生理食塩液
　　陽性対照（シクロフォスファミド）；注射用水
処理：短時間処理法；3 時間
　　連続処理法；24 時間
細胞毒性：なし
遺伝毒性：なし

独立して実施した試験数：1
プレート数：1
分析細胞数/培養：全コロニー数を計測
被験物質：BK-4SP（H 剤）
陽性対照：メタンスルホン酸メチル
　　シクロフォスファミド

試験番号：FBM ■ -8586
CTD における記載箇所：2.6.6.4
処理年月日：20■年■月
GLP 適用：適

代謝活性化	被験物質	用量段階	Total colony		Large colony	Small colony	% SC [c]
			変異出現率[a]	Induc-tivity [b]	変異出現率	変異出現率	
3 時間振盪培養 代謝活性化なし	生理食塩液	－	61.5	1.00	23.7	37.3	60.7
	MMS[d]	10 μg/mL	310.0	5.04	62.0	231.9	74.8
	BK-4SP（H 剤）	6.25 μL/mL	65.8	1.07	32.1	32.1	48.8
		12.5 μL/mL	52.5	0.85	23.8	27.8	53.0
		25.0 μL/mL	60.1	0.98	31.9	26.4	44.0
		50.0 μL/mL	115.1	1.87	37.1	83.1	72.2
		75.0 μL/mL	255.7	4.16	73.1	181.4	71.0
		100 μL/mL	559.4	9.09	122.7	410.5	73.4
代謝活性化あり	生理食塩液	－	88.0	1.00	47.0	38.9	44.2
	CP[e]	3 μg/mL	671.6	7.63	310.5	324.3	48.3
	BK-4SP（H 剤）	6.25 μL/mL	114.3	1.30	63.9	45.5	39.8
		12.5 μL/mL	67.4	0.77	53.3	12.9	19.1
		25.0 μL/mL	88.0	1.00	58.5	26.8	30.5
		50.0 μL/mL	130.3	1.48	73.5	58.2	44.6
		75.0 μL/mL	243.2	2.76	118.6	113.3	46.6
		100 μL/mL	262.8	2.99	135.1	119.4	45.4
24 時間静置培養	生理食塩液	－	114.9	1.00	49.2	61.1	53.2
	MMS	5 μg/mL	1237.1	10.76	437.1	374.6	30.3
	BK-4SP（H 剤）	6.25 μL/mL	111.1	0.97	54.9	51.3	46.2
		12.5 μL/mL	108.8	0.95	50.2	53.5	49.2
		25.0 μL/mL	115.5	1.00	49.8	60.3	52.2
		50.0 μL/mL	215.9	1.88	117.7	109.4	50.7
		75.0 μL/mL	135.1	1.18	53.3	74.5	55.2
		100 μL/mL	N.D.[f]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a) $\times 10^{-6}$
b) 陰性対照群との比
c) small colony の割合
d) メタンスルホン酸メチル
e) シクロフォスファミド
f) 検出されず

代謝活性化	被験物質	用量段階	Total colony		Large colony	Small colony	% SC [c]
			変異出現率[a]	Induc-tivity [b]	変異出現率	変異出現率	
3 時間振盪培養 代謝活性化なし	生理食塩液	－	63.4	1.00	25.8	36.9	58.2
	MMS[d]	10 μg/mL	394.4	6.22	97.2	295.5	74.9
	N-BK-4SP[e]	6.25 μL/mL	45.0	0.71	15.7	31.8	70.6
		12.5 μL/mL	51.9	0.82	23.8	26.9	51.8
		25.0 μL/mL	60.1	0.95	24.6	34.0	56.6
		50.0 μL/mL	46.8	0.74	20.9	25.2	53.8
		75.0 μL/mL	42.4	0.67	20.8	20.8	49.1
		100 μL/mL	50.2	0.79	27.3	21.7	43.2
代謝活性化あり	生理食塩液	－	71.2	1.00	48.3	21.4	30.0
	CP[f]	3 μg/mL	594.4	8.35	270.8	254.5	42.8
	N-BK-4SP	6.25 μL/mL	45.5	0.64	31.2	13.7	30.0
		12.5 μL/mL	105.8	1.49	64.1	38.9	36.7
		25.0 μL/mL	38.9	0.55	27.0	11.5	29.4
		50.0 μL/mL	90.0	1.26	46.2	41.4	46.1
		75.0 μL/mL	85.0	1.19	32.1	50.9	59.9
		100 μL/mL	46.9	0.66	21.2	24.8	53.0
24 時間静置培養	生理食塩液	－	94.2	1.00	44.8	47.4	50.3
	MMS	5 μg/mL	1166.4	12.38	463.9	342.1	29.3
	N-BK-4SP	6.25 μL/mL	85.3	0.91	39.4	43.1	50.6
		12.5 μL/mL	70.9	0.75	29.4	39.5	55.7
		25.0 μL/mL	85.4	0.91	42.9	39.5	46.3
		50.0 μL/mL	68.9	0.73	38.4	28.5	41.4
		75.0 μL/mL	79.4	0.84	45.0	31.8	40.1
		100 μL/mL	95.1	1.01	55.1	36.1	38.0

a) $\times 10^{-6}$
b) 陰性対照群との比
c) small colony の割合
d) メタンスルホン酸メチル
e) ホルマリン無添加沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン
f) シクロフォスファミド

代謝活性化	被験物質	用量段階	Total colony		Large colony	Small colony	% SC [c]
			変異出現率[a]	Induc-tivity [b]	変異出現率	変異出現率	
3 時間振盪培養 代謝活性化なし	生理食塩液	－	65.2	1.00	33.8	29.6	45.4
	MMS[d]	10 μg/mL	291.9	4.48	180.9	98.6	33.8
	FA [e]	6.25 μL/mL	87.4	1.34	63.5	22.1	25.3
		12.5 μL/mL	71.7	1.10	33.0	36.8	51.3
		25.0 μL/mL	53.1	0.82	21.7	30.1	56.6
		50.0 μL/mL	335.6	5.15	131.1	171.9	51.2
		75.0 μL/mL	1183.4	18.15	404.0	515.9	43.6
		100 μL/mL	1019.4	15.64	451.7	427.5	41.9
代謝活性化あり	生理食塩液	－	62.1	1.00	36.6	24.2	38.9
	CP[f]	3 μg/mL	588.3	9.47	293.3	237.2	40.3
	FA	6.25 μL/mL	33.7	0.54	20.0	13.3	39.4
		12.5 μL/mL	47.0	0.76	31.0	15.3	32.6
		25.0 μL/mL	83.7	1.35	44.4	36.8	44.0
		50.0 μL/mL	53.1	0.86	30.1	21.7	40.8
		75.0 μL/mL	147.4	2.37	73.5	65.8	44.6
		100 μL/mL	233.7	3.76	94.5	133.5	57.1
24 時間静置培養	生理食塩液	－	110.4	1.00	46.2	59.4	53.8
	MMS	5 μg/mL	1276.7	11.56	402.1	483.9	37.9
	FA	6.25 μL/mL	105.2	0.95	43.7	60.1	57.2
		12.5 μL/mL	106.3	0.96	52.8	49.2	46.2
		25.0 μL/mL	173.4	1.57	67.7	98.4	56.7
		50.0 μL/mL	284.3	2.57	129.7	165.2	58.1
		75.0 μL/mL	338.6	3.07	129.0	223.5	66.0
		100 μL/mL	N.D. [g]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a)　$\times 10^{-6}$
b)　陰性対照群との比
c)　small colony の割合
d)　メタンスルホン酸メチル
e)　ホルマリン液
f)　シクロフォスファミド
g)　検出されず

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：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

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当する試験はない。

2.6.7.16 局所刺激性試験

被験物質：BK-4SP（H 剤）

動物種/系統	投与方法	対照物質	投与量（mL/site）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
ウサギ/ Jla：JW	筋肉内	沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」	0.5	6M	沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン「ビケン」と同様に生理食塩液より強く、0.425 w/v%酢酸溶液より弱い局所障害性の“グレード2”に分類された。	FBM [redacted]-3321

2.6.7.17 その他の毒性試験

1. 異常毒性否定試験

被験物質：BK-4SP

動物種/系統	投与方法	投与量（mL/匹）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
モルモット/ ハートレイ	腹腔内	5	3F	異常は認められなかった。	RDIP[redacted]04-008 RDIP[redacted]01-003 DIP[redacted]03001 DIP[redacted]04002 DIP[redacted]09001 DIP[redacted]02002 DIP[redacted]01002 DIP[redacted]01003 DIP[redacted]01004

2. マウス体重減少試験

被験物質：BK-4SP

動物種/系統	投与方法	投与量（mL/匹）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
マウス/ ddY	腹腔内	0.5	10F	異常は認められなかった。	[redacted]-12 [redacted]-06 [redacted]-07 [redacted]-08 [redacted]-26 [redacted]-06 [redacted]-03 [redacted]-04

3. マウスヒスタミン増感試験 被験物質：BK-4SP

動物種/系統	投与 方法	投与量 （mL/匹）	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	試験番号
マウス/ ddY	腹腔内	0.5	10F	異常は認められなかった。	[redacted]-11、[redacted]-06 [redacted]-07、[redacted]-08 [redacted]-10、[redacted]-11 [redacted]-26、[redacted]-30 [redacted]-06、[redacted]-08 [redacted]-03、[redacted]-04

4. ジフテリア毒素無毒化試験 被験物質：BK-4SP

動物種/系統	投与 方法	投与量 （mL/匹）	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	試験番号
ウサギ/ 日本白色種	皮内	0.1	2M	異常は認められなかった。	RDIP[redacted]04-008 [redacted]04 [redacted]10 [redacted]16 [redacted]06 [redacted]01

5. 破傷風毒素無毒化試験 被験物質：BK-4SP

動物種/系統	投与 方法	投与量 （mL/匹）	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	試験番号
モルモット/ ハートレイ	皮下	3	5F	異常は認められなかった。	[redacted]-10 [redacted]-03 [redacted]-06 [redacted]-07 D[redacted]-25 [redacted]-07 [redacted]-01 [redacted]-02

6. マウス白血球数増加試験 被験物質：BK-4SP

動物種/系統	投与 方法	投与量 （mL/匹）	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	試験番号
マウス/ ddY	腹腔内	0.5	10F	異常は認められなかった。	[redacted]-11 [redacted]-06 [redacted]-07 [redacted]-08 [redacted]-26 [redacted]-06 [redacted]-03