

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES	2
LIST OF FIGURES	2
本項で使用する用語・略語.....	3
1. 非臨床試験計画概略.....	5
2. 薬理試験.....	8
2.1. 効力を裏付ける試験	8
2.1.1. SARS-CoV-2 P2 S をコードする脂質ナノ粒子封入 RNA ワクチン	8
2.1.2. マウスにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性試験.....	9
2.1.3. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性および SARS-CoV-2 感染保護効果.....	10
2.1.3.1. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性.....	10
2.1.3.2. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の SARS-CoV-2 感染保護効果.....	10
2.1.4. ラットを用いた反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験における免疫原性評価.....	11
2.2. 副次的薬理試験	11
2.3. 安全性薬理試験	11
2.4. 薬力学的薬物相互作用試験	11
3. 薬物動態試験.....	12
3.1. 分析法	12
3.2. 吸収	13
3.3. 分布	13
3.4. 代謝	15
3.5. 排泄	17
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用	17
4. 毒性試験.....	17
4.1. 単回投与毒性試験	19
4.2. 反復投与毒性試験	19
4.2.1. Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V8)の筋肉内反復投与毒性試験	19
4.2.2. Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9)の筋肉内反復投与毒性試験	21
4.3. 遺伝毒性試験	23
4.4. がん原性試験	23

4.5. 生殖発生毒性試験	23
4.6. 局所刺激性試験	24
4.7. その他の毒性試験	24
4.7.1. 抗原性試験.....	24
4.7.2. 免疫毒性試験.....	25
4.7.3. 新添加剤の安全性評価.....	25
4.8. 標的臓器毒性	25
5. 総括および結論.....	26
参考文献.....	27

LIST OF TABLES

Table 1	BNT162b2 のバリエーション.....	5
Table 2	非臨床試験一覧.....	6
Table 3	ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で 静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の薬物動態.....	13
Table 4	毒性試験一覧.....	18

LIST OF FIGURES

Figure 1	SARS-CoV-2 S 糖タンパク質の構成模式図.....	9
Figure 2	ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で 静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の血漿中（左）および肝臓 中（右）濃度推移.....	13
Figure 3	ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を筋肉内投与した BALB/c マウスにおける生体 内発光.....	14
Figure 4	種々の動物種での ALC 0315 の推定生体内代謝経路.....	16
Figure 5	種々の動物種での ALC-0159 の推定生体内代謝経路.....	17

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
ACE2	angiotensin converting enzyme 2 : アンジオテンシン変換酵素 2
A:G	albumin:globulin ratios : アルブミン : グロブリン比
ALC-0159	本剤に添加される PEG 脂質
ALC-0315	本剤に添加されるアミノ脂質
BAL	bronchoalveolar lavage : 気管支肺胞洗浄
CH	central helix : 中央ヘリックス
[³ H]-CHE	Radiolabeled [Cholesteryl-1,2- ³ H(N)]-Cholesteryl Hexadecyl Ether : 放射性標識 [コレステリル-1, 2- ³ H(N)] ヘキサデシルエーテル
COVID-19	coronavirus disease 2019 : 新型コロナウイルス感染症
dLIA	direct Luminex immunoassay : 直接 Luminex イムノアッセイ
DNA	deoxyribonucleic acid : デオキシリボ核酸
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫測定法
ELISpot	enzyme-linked immunospot : 酵素免疫スポット
EMA	European Medicines Agency : 欧州医薬品庁
GGT	γ -glutamyl transpeptidase : γ -グルタミルトランスペプチダーゼ
GLP	Good Laboratory Practice : 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK	human embryonic kidney : ヒト胎児腎臓
HR	heptad repeat : ヘプタッドリピート
IFN	interferon : インターフェロン
IgG	immunoglobulin G : 免疫グロブリン G
IL	interleukin : インターロイキン
LC/MS	liquid chromatography-mass spectrometry : 液体クロマトグラフィー-質量分析
LNP	lipid-nanoparticle : 脂質ナノ粒子
modRNA	nucleoside-modified mRNA : 修飾ヌクレオシド mRNA
mRNA	messenger RNA : メッセンジャーRNA
<i>m/z</i>	イオンの質量を統一原子質量単位 (ダルトン) で割って得られた値をさらにイオンの電荷数の絶対値で割って得られる無次元量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development : 経済協力開発機構
P2 S	stable prefusion S including two proline substitutions : 2つのプロリン置換を有するスパイク (S) タンパク質の安定的融合前構造体
PEG	polyethylene glycol : ポリエチレングリコール
PK	pharmacokinetics : 薬物動態
pVNT	pseudotype neutralization titer : 疑似ウイルス中和抗体価
RBD	receptor binding domain : 受容体結合ドメイン
RNA	ribonucleic acid : リボ核酸
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction : 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
S	SARS-CoV-2 spike glycoprotein : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質
S1	SARS-CoV-2 spike glycoprotein subdomains 1 : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質サブドメイン 1
S2	SARS-CoV-2 spike glycoprotein subdomains 2 : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質サブドメイン 2
S9	supernatant fraction obtained from liver homogenate by centrifuging at 9000 g : 肝ホモジネートを 9000 g で遠心分離した上清画分

SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 : 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2
Tfh	T follicular helper cell : 濾胞性ヘルパーT 細胞
Th1	type 1 helper T cell : 1 型ヘルパーT 細胞
Th2	type 2 helper T cell : 2 型ヘルパーT 細胞
TLR	Toll-like receptor : Toll 様受容体
TNF	tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子
V8	variant 8 : バリエント 8
V9	variant 9 : バリエント 9
VNT	virus neutralizing titer : ウイルス中和抗体価
VNT ₅₀	50% virus neutralizing titer : ウイルス感染細胞が 50%低下したときの中和抗体価
WHO	World Health Organization : 世界保健機関

1. 非臨床試験計画概略

BNT162b2 (BioNTech コード番号 : BNT162, Pfizer コード番号 : PF-07302048) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のスパイク糖タンパク質 (S タンパク質) 全長体をコードする修飾ヌクレオシド mRNA (modRNA) であり、これを本質とした SARS-CoV-2 による感染症に対する mRNA ワクチンの開発が進められている。BNT162b2 がコードする S タンパク質は 2 箇所のアミノ酸がプロリンに置換されており (P2 S) , 抗原として最適な融合前構造に固定される^{1,2}。

BNT162b2 の製剤化にあたっては、溶解された脂質と混合することで BNT162b2 を封入する脂質ナノ粒子 (LNP) が形成され、これにより RNA は分解から保護され、筋肉内注射後の宿主細胞へのトランスフェクションが可能となる。本剤には、ALC-0315 (アミノ脂質) および ALC-0159 (PEG 脂質) が機能脂質として、DSPC (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) およびコレステロールが構造脂質として含まれている。また、その他の添加剤として、精製白糖、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸一水素ナトリウム二水和物およびリン酸二水素カリウムを含有する。

BNT162b2 の非臨床評価においては主に、BNT162b2 のバリエーションのうち、BNT162b2 (V8) または今回製造販売承認申請する BNT162b2 (V9) の LNP 封入体 (LNP の組成は製造販売承認申請製剤と同一) を用いて試験を実施した。タンパク質発現を増加させるために BNT162b2 (V8) のコドン最適化を施したバリエーションが BNT162b2 (V9) であり、両バリエーションがコードするタンパク質のアミノ酸配列は同一である (Table 1) 。なお、本申請書類において被験物質名を表記する場合は LNP 封入体に含有する RNA のコード番号のみを用いることとし (「BNT162b2 (V9)」等) , 必要に応じて該当する箇所において LNP に関する説明を加えた。

Table 1 BNT162b2 のバリエーション

コード番号	RNA プラットフォーム	抗原バリエーション	コードするタンパク質	バリエーションコード	GLP 一般毒性試験成績	臨床試験成績
BNT162b2	modRNA	V8 ^a	P2 S	RBP020.1	あり	なし
BNT162b2^b	modRNA	V9^a	P2 S	RBP020.2	あり	あり

a. BNT162b2 (V8) のコドン最適化を施したバリエーションが BNT162b2 (V9) であり、両バリエーションのコードするタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

b. 今回製造販売承認申請する BNT162b2 (V9) を太字で示した。

BNT162b2 の非臨床試験として、*in vitro* および *in vivo* の効力を裏付ける試験、吸収、分布、代謝および排泄を評価する試験ならびに毒性試験を実施し、BNT162b2 の薬理、薬物動態および安全性に関する非臨床プロファイルを検討した (Table 2) 。

効力を裏付ける試験として、マウス、ラットおよびサルを用いた BNT162b2 の免疫原性試験を実施した。マウスおよびラットに BNT162b2 投与後の抗体応答を評価するため、酵素免疫測定法 (ELISA) で S タンパク質サブドメイン 1 (S1) および S タンパク質受容体結合ドメイン (RBD) 結合 IgG 濃度を測定した。また、疑似 SARS-CoV-2 ウイルスに対する中和抗体価 (pVNT) を測定した。サルを用いた試験では、直接結合 Luminex イムノアッセイ (dLIA) により S1 結合 IgG 濃度を測定し抗体応答を検討し、SARS-CoV-2 に対する中和抗体価 (VNT) を測定した。マウスおよびサルを用いた試験では、採取したマウス脾細胞およびサル末梢血単核球を用い、ELISpot 測定およびフローサイトメトリー解析により、S タンパク質特異的 T 細胞応答を評価した。また、

BNT162b2 を投与したサルを用いた SARS-CoV-2 攻撃試験を実施して、感染保護効果を評価し、疾患増強についても検討した。効力を裏付ける試験の評価法の詳細を [M2.6.2.7](#) 項に記載した。

BNT162b2 封入 LNP の薬物動態を評価するために、*in vivo* および *in vitro* 試験を実施した。BNT162b2 の代替レポーターとしてルシフェラーゼをコードする RNA を封入した LNP (LNP の組成は製造販売承認申請製剤と同一) をラットに静脈内投与した PK 試験では、血漿、尿、糞および肝臓試料を経時的に採取して、各試料中の ALC-0315 および ALC-0159 濃度を測定した。生体内分布試験では、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP をマウスに筋肉内投与し、生体内におけるルシフェラーゼ発現分布を経時的に測定した。また、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の放射能標識体をラット筋肉内投与して生体内分布を定量的に評価した。ALC-0315 および ALC-0159 の代謝について、マウス、ラット、サルおよびヒトの血液、肝ミクロソーム、肝 S9 画分および肝細胞を用いて *in vitro* で評価したのに加え、上記ラット静脈内投与 PK 試験で採取した血漿、尿、糞および肝臓試料を用いて、*in vivo* におけるこれらの脂質の代謝についても検討した。

BNT162b2 の毒性評価として、ラットの GLP 適合試験 3 試験 (反復投与毒性試験 2 試験, 生殖発生毒性試験 1 試験) を実施した。毒性試験では複数のワクチン候補が用いられているが、今回製造販売承認申請するワクチンの本質である BNT162b2 (V9) と、その類縁のバリエーションである BNT162b2 (V8) の結果を中心に述べる。2 つの反復投与毒性試験のうち 1 試験では BNT162b2 (V8) を用いたが、前述のとおり、BNT162b2 (V9) との違いはコドン最適化のみであり、コードされたタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

毒性試験のデザインは、WHO、EMA および本邦におけるワクチン非臨床開発ガイドライン^{3,4,5} を参照して設定した。また、すべての GLP 適合試験は、OECD のデータ相互受入れ制度に基づき、米国連邦規則集 (21 CFR Part 58) の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に従い実施している。

BNT162b2 の毒性試験の動物種は、毒性試験によく使用され背景データが豊富な動物種である Wistar Han ラットを選択した。Wistar Han ラットは BNT162b2 がコードする P2 S 抗原に対する免疫応答を示すことが確認されている。毒性試験における投与経路は、臨床投与経路である筋肉内投与を選択した。

Table 2 非臨床試験一覧

試験番号	試験の種類	動物種または試験系	被験物質 ^a	投与量 (RNA 量として)
薬理試験				
R- XXXX -0211	In vitro タンパク質発現評価	HEK293T 細胞	BNT162b2 (V9)	1 µg
VR-VTR-10741	In vitro タンパク質発現評価	Expi293F 細胞	NA	NA
R- XXXX -0085	免疫原性試験	BALB/c マウス	BNT162b2 (V9)	0.2, 1, 5 µg
R- XXXX -0112	免疫原性試験	BALB/c マウス	BNT162 XXXX , BNT162 XXXX , BNT162b2 (V9), BNT162 XXXX	5 µg

Table 2 非臨床試験一覧

試験番号	試験の種類	動物種または試験系	被験物質 ^a	投与量 (RNA量として)
VR-VTR-10671	免疫原性試験 および SARS-CoV-2 攻撃試験	アカゲザル	BNT162b2 (V9)	30, 100 µg/回
薬物動態試験				
PF-07302048 _06-072424	PK 試験 (ALC-0315 および ALC-0159 の体内動態)	Wistar Han ラット	ルシフェラーゼ modRNA 封入 LNP	1 mg/kg
R-0072	分布試験	BALB/c マウス	ルシフェラーゼ modRNA 封入 LNP	2 µg
185350	分布試験	Wistar Han ラット	ルシフェラーゼ modRNA 封入 LNP [³ H]-CHE 標識体	50 µg
01049-008 01049-009 01049-010 01049-020 01049-021 01049-022	In vitro 代謝試験	CD-1/ICR マウス, Wistar Han ラット, Sprague Dawley ラット, カニクイザル, ヒトの 肝ミクロソーム, 肝 S9 画分, 肝細胞	ALC-0159 ALC-0315	NA NA
PF-07302048 _05-043725	In vitro および in vivo 代謝試験	In vitro: CD-1 マウス, Wistar Han ラット, カ ニクイザル, ヒトの血 液, 肝 S9 画分, 肝細 胞 In vivo: Wistar Han ラットの血漿, 尿, 糞, 肝臓	In vitro: ALC-0315 およ び ALC-0159 In vivo: ルシフェラー ゼ modRNA	In vitro: NA In vivo: 1 mg/kg
毒性試験				
38166	反復投与毒性 試験	Wistar Han ラット	BNT162b2 (V8)	100 µg/回
GR142	反復投与毒性 試験	Wistar Han ラット	BNT162b2 (V9)	30 µg/回
256434	生殖発生毒性 試験	Wistar Han ラット	BNT162b2 (V9)	30 µg/回

a. 用いた被験物質は ALC-0159 および ALC-0315 を除き、いずれも RNA の LNP 封入体であり、LNP の構成脂質は製造販売承認申請製剤と同一であった

NA : 該当なし

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

BNT162b2 がコードする P2 S は、宿主免疫系によるウイルス中和抗体の誘導において重要な標的である SARS-CoV-2 の膜貫通型 S タンパク質全長体の遺伝子組換え体であり、2 箇所のアミノ酸がプロリンに置換されることにより、抗原として最適な三量体融合前構造に固定される^{1,2}。In vitro 試験において、P2 S は標的受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) および各種ヒト中和抗体と高い親和性を示して結合したことから、BNT162b2 を投与することにより発現する P2 S が、ACE2 結合部位および種々の SARS CoV-2 中和抗体の標的となるエピトープを有することが明確に示された。

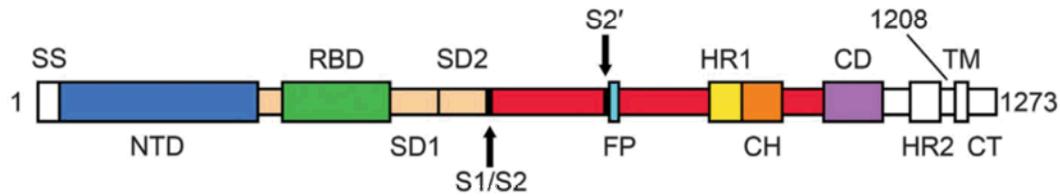
In vitro 試験ならびにマウスおよびサルを用いた in vivo 試験を実施した結果、SARS-CoV-2 S タンパク質をコードするこの RNA ワクチンの作用機序が示され、強力な中和抗体応答に加え、Th1 偏向性 CD4 陽性 T 細胞応答および IFN- γ 産生性 CD8 陽性 T 細胞応答が誘導された。また、サルを用いた SARS-CoV-2 攻撃試験において、BNT162b2 投与群では SARS-CoV-2 RNA はほとんど検出されず、感染保護効果が示された。肺の異常を示す所見はみられず、疾患増強を示唆する所見は認められなかった。

2.1.1. SARS-CoV-2 P2 S をコードする脂質ナノ粒子封入 RNA ワクチン

BNT162b2 はすべてのウリジンが 1-メチルシュードウリジンに置換された modRNA である。この置換により、Toll 様受容体 (TLR) 7 および TLR8 などの自然免疫センサーによるワクチン RNA の認識が低下し、自然免疫による影響が低下することで翻訳効率が增加する⁶。このような modRNA ワクチンの接種により、Th1 偏向性の抗原特異的濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) の発現が誘導され、胚中心 B 細胞が刺激されて増殖し、強力かつ持続的かつ高親和性の抗体反応がもたらされると考えられる^{7,8}。同様のプラットフォーム技術に基づくジカウィルスやインフルエンザ等の他の感染症に対する modRNA ワクチン候補の評価においても、強力な抗体応答誘導ならびに多機能的な T 細胞の増殖が示されている^{8,9}。

SARS-CoV-2 S タンパク質は、ウイルス粒子上において主に融合前構造をとり、ホモ三量体として存在する巨大な糖タンパク質である¹⁰。S タンパク質は、フーリンによって開裂を受ける膜遠位側 (N 末端側) の S1 フラグメントと膜近位側 (C 末端側) の S2 フラグメントで構成される (Figure 1)。RBD がある膜遠位側の S1 は宿主細胞の受容体である ACE2 を認識して結合し、膜近位側の S2 は膜融合に関与する。細胞侵入時には宿主のフーリン様プロテアーゼによって自然的に S タンパク質から S1 が切り離され、S2 フラグメントはウイルスと宿主細胞の融合を進める過程で融合後構造へのリフォールディングを受ける。宿主免疫系によるウイルス中和抗体の誘導において、S タンパク質は重要な標的である^{11,12}。SARS-CoV-2 に対しても、RBD を標的とする抗体が中和活性を示すことが報告されている^{13,14}。

Figure 1 SARS-CoV-2 S 糖タンパク質の構成模式図



フーリン開裂部位 (S1/S2) において S1 フラグメントと S2 フラグメントは開裂する。S1 フラグメントは、シグナル配列 (SS)、N 末端ドメイン (NTD)、受容体結合ドメイン (RBD: ヒト細胞受容体である ACE-2 に結合する)、サブドメイン 1 (SD1) およびサブドメイン 2 (SD2) からなる。S2 フラグメントは、S2 プロテアーゼ開裂部位 (S2') に隣接する融合ペプチド (FP)、ヘプタッドリピート配列 (HR1 および HR2)、中央ヘリックスドメイン (CH)、コネクタドメイン (CD)、膜貫通ドメイン (TM) および細胞質側末端 (CT) からなる。BNT162b2 は、CH と HR1 との間に位置する 986 番目および 987 番目のアミノ酸がプロリンに置換されている P2 S をコードする。出典: Wrapp et al, 2020² より抜粋

BNT162b2 (V9) がコードする P2 S は、膜貫通型 S タンパク質全長体の遺伝子組換え体であり、中央ヘリックス (CH) とヘプタッドリピート配列 1 (HR1) との間に位置する 986 番目および 987 番目のアミノ酸がプロリンに置換されており、この変異によって S タンパク質は融合前構造に固定される¹²。非臨床試験では 2 つのコドン最適化バリエーションである BNT162b2 (V8) または BNT162b2 (V9) (製造販売承認申請製剤に使用) を用いた。両バリエーションとも同一のアミノ酸配列をコードするが、タンパク質発現を増加させるためによりコドン最適化がなされたバリエーションが BNT162b2 (V9) であり、BNT162b2 (V8) よりもシトシンを多く含む。この modRNA の翻訳により産生された P2 S が細胞膜上に発現することで強力な液性中和抗体応答ならびに Th1 偏向性 CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の応答を引き起こし、ウイルス感染阻害およびウイルス感染細胞傷害をもたらすと考えられる。

トランスフェクション試薬と混合した BNT162b2 または BNT162b2 の LNP 封入体を用いて HEK293T 細胞をトランスフェクション処理した結果、いずれにおいても P2 S 発現が認められた。BNT162b2 と同じアミノ酸配列をコードする DNA によって P2 S (アフィニティー精製のため C 末端にタグを付加) を Expi293F 細胞に発現させ、電子低温顕微鏡法で P2 S の構造を解析したところ、既報の構造との高い類似性が明らかになり¹⁵、良好な解像度の S タンパク質融合前構造三量体が示された。また、ACE2 および各種ヒト中和抗体の高い親和性の結合がみられたことから、作製された遺伝子組換え P2 S 全長体が ACE2 結合部位を有し、かつ種々の SARS CoV-2 中和抗体が標的とするエピトープを有することが示された。

2.1.2. マウスにおける BNT162b2 (V9) の免疫原性試験

BNT162b2 (V9) の LNP 封入体を BALB/c マウスに 0.2, 1 または 5 μg RNA の用量で単回投与し、免疫原性を評価した。ELISA による IgG 測定の結果、S1 および RBD を認識する強力な IgG 応答が用量依存的に認められた。疑似ウイルスを用いた中和試験においても、用量に伴う強力な中和抗体応答がみられた。また、Th1 偏向性 CD4 陽性 T 細胞応答ならびに IFN- γ および IL-2 を産生する CD8 陽性 T 細胞応答が誘導された。

投与後 28 日に採取した脾細胞を S タンパク質全長体の重複ペプチド混合物を用いて刺激したところ、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生誘導が示された。また、培養上清中

での放出サイトカイン量の測定において、Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5 および IL-13) に比べて Th1 サイトカイン (IL-2 および IFN- γ) が高濃度で検出され、Th1 細胞優勢のプロファイルが示された。

2.1.3. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性および SARS-CoV-2 感染保護効果

BNT162b2 (V9)をアカゲザルに投与して免疫原性および SARS-CoV-2 感染保護効果を評価した。

ヒトにおいて、SARS-CoV-2 感染による新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の徴候、症状およびその程度は多様である。SARS-CoV-2 を感染させたアカゲザルはヒト COVID-19 患者と類似した症状を示し、上気道および下気道における急性かつ一過性の感染がみられ、消化管にもウイルス増殖の徴候を呈する^{16,17}。様々な程度の肺炎が主として感染後 2~4 日程度の感染ピーク時にみられることが報告されている¹⁸。ACE2 受容体の、特に結合に重要とされる領域のアミノ酸配列はヒトとアカゲザルで 100%相同であり、アカゲザルが SARS-CoV-2 動物モデルとして忠実に感染症患者と類似した症状を呈する要因として考えられている¹⁹。

2.1.3.1. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性

アカゲザルに、BNT162b2 (V9)の LNP 封入体を 30 または 100 μg RNA の用量で試験 0 日および 21 日に筋肉内投与した。初回投与後 14 日という早期に S1 結合 IgG 濃度および SARS-CoV-2 中和抗体価の上昇がみられ、2 回目投与後はそれらの値がさらに上昇した。試験 28 日 (2 回目投与後 7 日) の 30 および 100 μg RNA 投与群の VNT₅₀ (ウイルス感染が 50%低下したときの中和抗体価の幾何平均値) は、SARS-CoV-2 ヒト回復期血清 (HCS) の VNT₅₀ のそれぞれ 9 倍および 18 倍に達した。S1 結合 IgG 濃度および中和抗体価はいずれも、試験 28 日以降、最終測定時点である試験 56 日 (2 回目投与後 35 日) まで低下傾向にあったが、それでもなお HCS の値を上回った。

なお、HCS は、PCR 診断による SARS-CoV-2 感染確定後 14 日以上が経過し、すでに無症状の 18~83 歳のドナー 38 例から採取した血清である。SARS-CoV-2 感染に対する免疫応答が疾患からの保護として働き、中和抗体応答がその保護に寄与することを考えると、ワクチンに対する免疫応答の質を判定する現在評価可能なベンチマークとして HCS は有用と考えられる。

マウス免疫原性試験と同様に、BNT162b2 (V9)を投与したすべてのアカゲザルで、S タンパク質刺激に対する強力な IFN- γ 陽性 T 細胞応答がみられ、Th1 細胞優勢のプロファイルが示された。T 細胞内サイトカイン測定においても、BNT162b2 (V9)群では IFN- γ 、IL-2 または TNF- α 陽性細胞発現頻度が高く、S タンパク質刺激による Th1 偏向性の CD4 陽性 T 細胞応答が認められた。また、BNT162b2 (V9)は S タンパク質特異的 IFN- γ 産生性 CD8 陽性 T 細胞応答も誘導した。

2.1.3.2. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の SARS-CoV-2 感染保護効果

アカゲザル (2~4 年齢) に BNT162b2 (V9)の LNP 封入体を 100 μg RNA の用量で試験 0 および 21 日に筋肉内投与した。2 回目投与後 55 日に、 1.05×10^6 プラーク形成単位の SARS-CoV-2 (系統: USA-WA1/2020) を経鼻および気管内に均等に分けて曝露した²⁰。鼻腔および口腔咽頭のスワブ検体、ならびに気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を経時的に採取し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) により SARS-CoV-2 RNA (ゲノム RNA および転写産物) を検出した。その結果、対照群から採取した BAL 液中に SARS-CoV-2 RNA が検出されたが、BNT162b2 (V9)群の BAL 液中には検出されず、RNA 発現レベルに統計学的有意差が示された (ノンパラメトリック

検定, $p=0.0014$)。対照群では BAL 液等の検体で SARS-CoV-2 RNA が検出されたにもかかわらず、いずれの動物においても疾患による一般症状の変化は認められなかったことから、2~4 年齢のアカゲザルは疾患モデルというより感染モデルとしてより有用である可能性が考えられた。肺の異常を示す所見が対照群の X 線および CT 画像で認められたが、BNT162b2 (V9)群および無処置群では認められなかった。BNT162b2 (V9)群において疾患増強を示す画像所見および病理組織学的所見はみられなかった。

2.1.4. ラットを用いた反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験における免疫原性評価

ラットに BNT162b2 (V8)の LNP 封入体を 100 μg RNA の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与した。試験 17 日 (3 回目投与後 2 日) および 38 日 (3 回目投与後 23 日) に血清を採取し、S タンパク質特異的 IgG 誘導および疑似ウイルス中和活性を評価した。BNT162b2 (V8)の投与により、SARS-CoV-2 S タンパク質の S1 および RBD に対する IgG が誘導され、疑似ウイルス感染に対する中和抗体が誘導された。S タンパク質特異的 IgG 濃度および中和抗体価は試験 17 日より試験 38 日で高く、経時的な上昇が認められた。

ラットに BNT162b2 (V9)の LNP 封入体を 30 μg RNA の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与した。試験 17 日 (3 回目投与後 2 日) および 38 日 (3 回目投与後 23 日) に血清を採取し、SARS-CoV-2 中和活性を評価した。BNT162b2 (V9)の投与により、SARS-CoV-2 ウイルス感染に対する中和抗体が誘導された。一方、投与開始前および対照群において中和抗体の誘導は示されなかった。

生殖発生毒性試験において、雌性ラットに BNT162b2 (V9)の LNP 封入体を 30 μg RNA の用量で計 4 回 (無処置雄性ラットとの交配前 21 日および 14 日ならびに妊娠 9 日および 20 日) 筋肉内投与した。交配直前、妊娠 21 日 (帝王切開サブグループ) および分娩後 21 日 (自然分娩サブグループ) に母動物から、妊娠 21 日に胎児から、分娩後 21 日に出生児から血清を採取し、SARS-CoV-2 中和活性を評価した。BNT162b2 (V9)を投与した母動物で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答がいずれの測定日においても認められ、胎児および出生児でも検出された。一方、初回投与前および対照群において中和抗体の誘導は示されなかった。

2.2. 副次的薬理試験

BNT162b2 の副次的薬力学試験は実施しなかった。

2.3. 安全性薬理試験

反復投与毒性試験において、BNT162b2 の毒性は認められず、中枢神経系、呼吸系および心血管系などの生理機能への影響が示唆される変化はみられなかったことから、WHO ガイドライン³ に準拠し、BNT162b2 の安全性薬理試験は実施しなかった。

2.4. 薬力学的薬物相互作用試験

BNT162b2 の薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

3. 薬物動態試験

BNT162b2 封入 LNP の非臨床薬物動態を評価するために、LNP に含まれる ALC-0315 および ALC-0159 の吸収 (PK), 代謝および排泄を評価する *in vivo* および *in vitro* 試験ならびに BNT162b2 の代替レポーターとしてルシフェラーゼまたは放射能標識した脂質を利用した生体内分布試験を実施した。

感染症予防を目的としたワクチンの開発では全身曝露量の評価を必要としないことを踏まえ^{3,5}, BNT162b2 封入 LNP の筋肉内投与による PK 試験は実施しなかった。また、本剤に含有される他の 2 種類の脂質 (コレステロールおよび DSPC) は天然に存在する脂質であり、内在性脂質と同様に代謝、排泄されると考えられる。加えて、BNT162b2 は取り込んだ細胞中のリボヌクレアーゼにより分解されて核酸代謝され、BNT162b2 由来の S タンパク質はタンパク分解を受けると予想される。以上のことから、あらためてこれらの成分の代謝および排泄を評価する必要はないと考えられた。

BNT162b2 の代替レポーターとしてルシフェラーゼをコードする RNA を封入した LNP (ルシフェラーゼ RNA を BNT162b2 封入 LNP と同一の脂質構成を持つ LNP に封入:以降、「ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP」) をラットに静脈内投与した PK 試験では、血漿、尿、糞および肝臓試料を経時的に採取して、各試料中の ALC-0315 および ALC-0159 濃度を測定した。その結果、ALC-0315 および ALC-0159 は血中から肝臓にすみやかに分布することが示された。また、ALC-0315 および ALC-0159 はそれぞれ投与量の約 1% および約 50% が未変化体として糞中に排泄されたが、尿中においては検出下限未満であった。

生体内分布試験では、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を BALB/c マウスに筋肉内投与した。その結果、ルシフェラーゼの発現が投与部位でみられ、それより発現量は低値であったものの肝臓でも認められた。ルシフェラーゼの投与部位での発現は投与後 6 時間から認められ、投与後 9 日には消失した。肝臓での発現も投与後 6 時間に認められ、投与後 48 時間までに消失した。また、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の [³H]-コレステリルヘキサデシルエーテル ([³H]-CHE) 標識体をラットに投与して分布を評価したところ、LNP 濃度の代替指標である放射能濃度は投与部位が最も高値であった。投与部位以外では肝臓で最も放射能濃度が高く、次いで脾臓、副腎および卵巣への分布もみられたが、投与量に対する総放射能回収率は肝臓と比較して著しく低かった。

ALC-0315 および ALC-0159 の代謝をマウス、ラット、サルおよびヒトの血液、肝ミクロソーム、肝 S9 画分および肝細胞を用いて *in vitro* で評価した。また、上記のラット静脈内投与 PK 試験で採取した血漿、尿、糞および肝臓試料を用いて *in vivo* 代謝についても検討した。これら *in vitro* および *in vivo* 試験から、ALC-0315 および ALC-0159 は試験したいずれの動物種でも、それぞれエステル結合およびアミド結合の加水分解により緩徐に代謝されることが示された。

以上の非臨床薬物動態評価より、循環血中に到達した LNP は肝臓に分布することが示された。また、ALC-0315 および ALC-0159 の消失には、それぞれ代謝および糞中排泄が関与することが示唆された。

3.1. 分析法

GLP 非適用のラット静脈内投与 PK 試験 (M2.4.3.2 項) で LNP の構成脂質である ALC-0315 および ALC-0159 濃度を定量するために適切な性能を有する LC/MS 法を開発した。すなわち、20 μ L

の血漿、肝ホモジネート（肝臓の3箇所から採取した切片を用いてホモジネートを調製し、それらをプールしたものを適宜、ブランクマトリクスで希釈）、尿および糞ホモジネート（適宜、ブランクマトリクスで希釈）試料をそれぞれ内部標準物質（PEG-2000）を含有するアセトニトリルで除タンパク処理した後、遠心分離し、その上清をLC-MS/MS測定に供した。

3.2. 吸収

ALC-0315 および ALC-0159 の体内動態を検討するため、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を雄性 Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で単回静脈内投与し、血漿中および肝臓中の ALC-0315 および ALC-0159 濃度を測定し、PK パラメータを算出した。結果を Table 3 および Figure 2 に示す。なお、本試験において実施した ALC-0315 および ALC-0159 の尿中および糞中濃度の検討結果については M2.4.3.5 項で述べる。

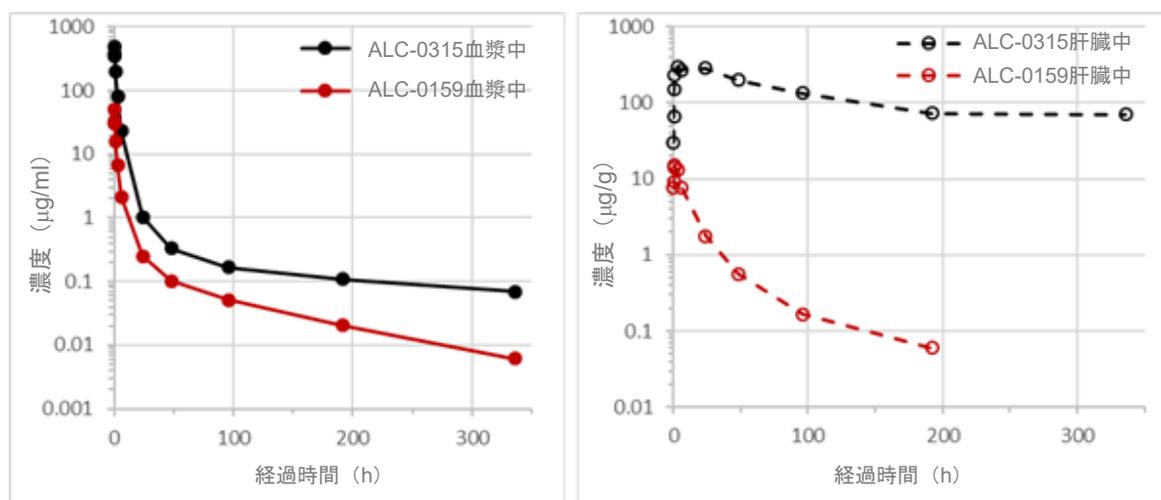
Table 3 ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の薬物動態

分析物	分析物の投与量 (mg/kg)	性/N	$t_{1/2}$ (h)	AUC _{inf} (μg•h/mL)	AUC _{last} (μg•h/mL)	肝臓への分布割合 (%) ^a
ALC-0315	15.3	雄/3 ^b	139	1030	1020	60
ALC-0159	1.96	雄/3 ^b	72.7	99.2	98.6	20

a. [最高肝臓分布量 (μg)] / [投与量 (μg)] として算出。

b. 各時点 3 匹。スパースサンプリング。

Figure 2 ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の血漿中（左）および肝臓中（右）濃度推移



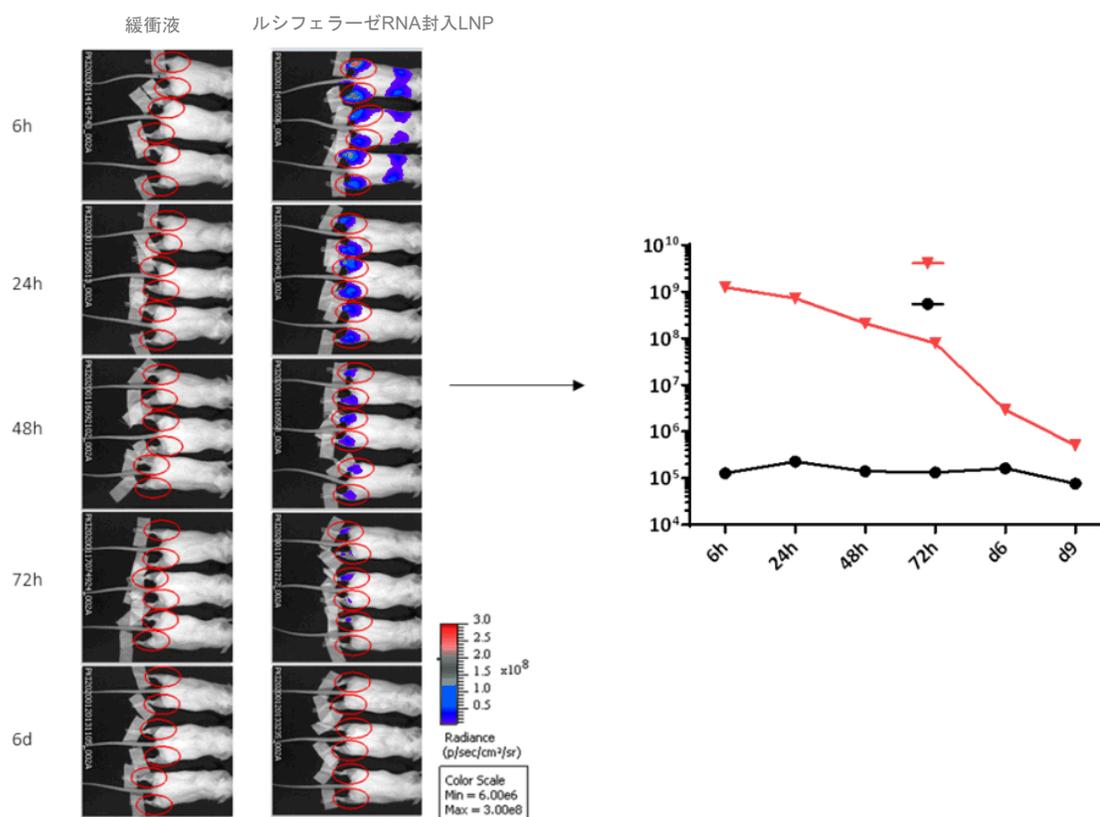
3.3. 分布

雌性 BALB/c マウス (3 匹) にルシフェラーゼ RNA 封入 LNP をマウスの左右の後肢に各 1 μg RNA (計 2 μg RNA) の用量で筋肉内投与し、ルシフェラーゼ発光を代替マーカーとした生体内分布

を検討した。ルシフェラーゼ発光検出の5分前に発光基質であるルシフェリンを腹腔内投与し、投与後6および24時間ならびに2, 3, 6および9日に *in vivo* における発光を測定した。その結果、ルシフェラーゼの投与部位での発現は投与後6時間から認められ、投与後9日には消失した (Figure 3)。また、それより程度は低かったものの、肝臓での発現も投与後6時間からみられ、投与後48時間までに消失した。肝臓への分布は、局所投与したルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の一部が循環血中に到達し、肝臓で取り込まれたことを示すものと考えられた。なお、ラット反復投与毒性試験で BNT162b2 の肝毒性はみられていない (M2.4.4.2 項)。

BNT162b2 がコードする抗原の生体内発現分布は LNP 分布に依存すると考えられる。本試験で用いたルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の脂質の構成は、BNT162b2 の製造販売承認申請製剤と同一であることから、本試験結果は BNT162b2 封入 LNP の分布を示すものと考えられる。

Figure 3 ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を筋肉内投与した BALB/c マウスにおける生体内発光



雌雄 Wistar Han ラットに [³H]-CHE で標識したルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を 50 μg RNA の用量で単回筋肉内投与し、投与後48時間まで血液、血漿および組織を採取して放射能濃度を測定することで、LNP の分布を評価した。その結果、雌雄ともに、放射能濃度はいずれの測定時点においても投与部位が最も高値であった。血漿中の放射能濃度は、投与後1~4時間に最も高くなった。投与後48時間まで主に肝臓、脾臓、副腎および卵巣への分布がみられ、これらの組織において放射能濃度が最も高くなったのは投与後8~48時間であった。投与部位以外での投与量に対

する総放射能回収率は肝臓で最も高く（最大 18%）、脾臓（1.0%以下）、副腎（0.11%以下）および卵巣（0.095%以下）では肝臓と比較して著しく低かった。放射能の平均濃度および組織分布パターンは雌雄で概ね類似していた。

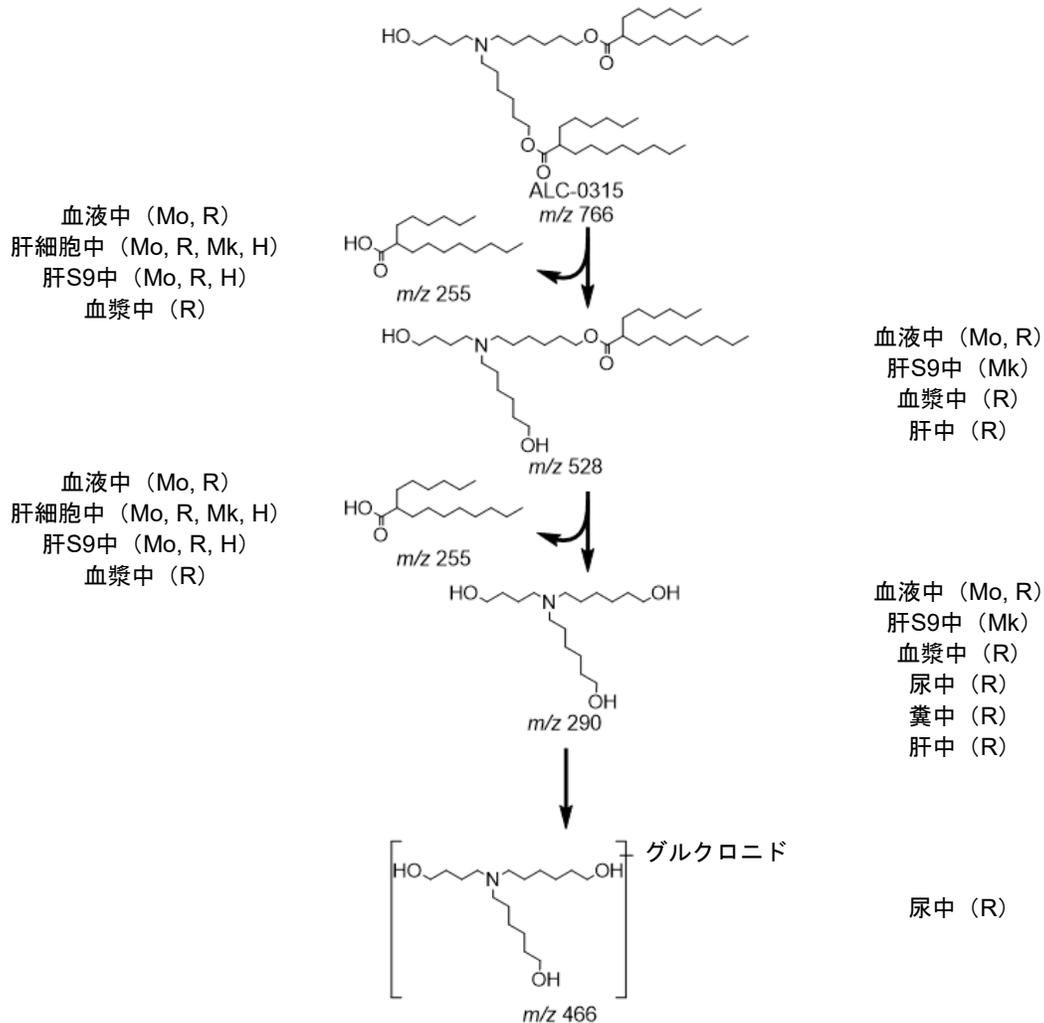
3.4. 代謝

CD-1/ICR マウス、Wistar Han または Sprague Dawley ラット、カニクイザルおよびヒトの肝ミクロソーム、肝 S9 画分および肝細胞を用いて、ALC-0315 および ALC-0159 の *in vitro* 代謝安定性を評価した。ALC-0315 または ALC-0159 を各動物種の肝ミクロソームまたは肝 S9 画分（120 分間インキュベーション）もしくは肝細胞（240 分間インキュベーション）に添加して、インキュベーション後の未変化体の割合を測定した。その結果、ALC-0315 および ALC-0159 はいずれの動物種・試験系でも代謝的に安定であり、未変化体の最終的な割合は 82%超であった。

さらに ALC-0315 および ALC-0159 の代謝経路について *in vitro* および *in vivo* で評価した。これらの試験では、CD-1 マウス、Wistar Han ラット、カニクイザルおよびヒトの血液、肝 S9 画分および肝細胞を用いて *in vitro* での代謝を評価した。また、ラット PK 試験（M2.4.3.2 項）で採取した血漿、尿、糞および肝臓試料を用い、*in vivo* での代謝を評価した。試験結果から、ALC-0315 と ALC-0159 の代謝はいずれも緩徐であり、それぞれエステル結合およびアミド結合の加水分解により代謝されることが明らかになった。Figure 4 および Figure 5 に示した加水分解による代謝は、評価したすべての動物種でみられた。

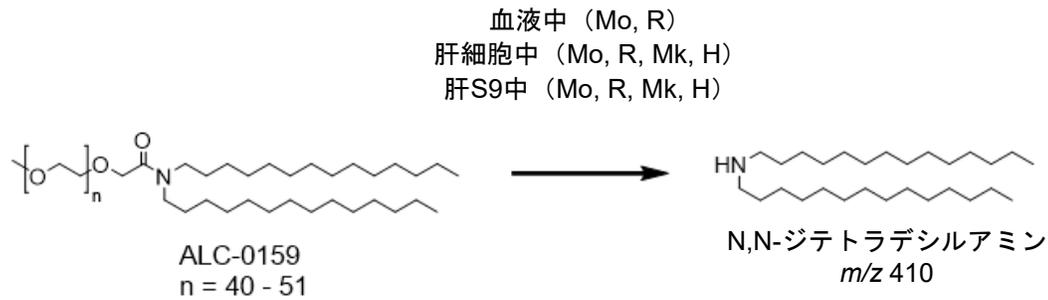
ALC-0315 はエステル加水分解を 2 回連続で受けることにより代謝される。この 2 回の加水分解により、最初、モノエステル代謝物 (m/z 528)、次に二重脱エステル化代謝物 (m/z 290) が生成される。この二重脱エステル化代謝物はさらに代謝され、グルクロン酸抱合体 (m/z 466) となるが、このグルクロン酸抱合体はラット PK 試験で尿中にのみ検出された。また、2 回の加水分解の酸性生成物がいずれも 6-ヘキシルデカン酸 (m/z 255) であることも確認された。

Figure 4 種々の動物種での ALC 0315 の推定生体内代謝経路



H : ヒト, Mk : サル, Mo : マウス, R : ラット

ALC-0159 は、アミド結合の加水分解により *N,N*-ジテトラデシルアミン (m/z 410) が生成される経路が主要な代謝経路であった。この代謝物は、マウス・ラットの血液ならびにマウス・ラット・サル・ヒトの肝細胞および肝 S9 画分中に検出された。In vivo 試料からは ALC-0159 の代謝物は確認されなかった。

Figure 5 種々の動物種での ALC-0159 の推定生体内代謝経路

H: ヒト, Mk: サル, Mo: マウス, R: ラット

3.5. 排泄

ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を 1 mg RNA/kg の用量でラットに静脈内投与した PK 試験 (M2.4.3.2 項) で経時的に採取した尿および糞中の ALC-0315 および ALC-0159 濃度を測定した。ALC-0315 および ALC-0159 の未変化体は尿中に検出されなかった。一方、糞中には ALC-0315 および ALC-0159 の未変化体が検出され、投与量当たりの割合はそれぞれ約 1% および約 50% であった。また、Figure 4 に示したように、ALC-0315 の代謝物が尿中で検出された。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

BNT162b2 の薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

4. 毒性試験

BNT162b2 の非臨床毒性評価として、ラットの GLP 適合試験 3 試験 (反復投与毒性試験 2 試験, 生殖発生毒性試験 1 試験) を実施した (Table 4)。毒性試験では複数のワクチン候補が用いられているが、第 2/3 相臨床試験に進み、今回製造販売承認申請するワクチンの本質である BNT162b2 (V9) と、その類縁のバリエーションである BNT162b2 (V8) の結果を中心に本概括評価で述べる。2 つの反復投与毒性試験のうち 1 試験では BNT162b2 (V8) を用いたが、BNT162b2 (V9) との違いはコード最適化のみであり、コードされたタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

毒性評価に用いる動物種として、毒性試験によく使用され背景データが豊富な Wistar Han ラットを選択した。Wistar Han ラットは BNT162b2 がコードする P2 S 抗原に対して免疫応答を示すことが確認されている (M2.4.2.1.4 項)。毒性試験における投与経路は、臨床投与経路である筋肉内投与を選択した。

Table 4 毒性試験一覧

試験 ^a	試験番号 (委託者試験番号)	投与群/ 投与量 (µg RNA) ^b	投与容量 (µL) ^c	例数/群
反復投与毒性試験				
Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V8)の筋肉内反復投与毒性試験および3週間回復性試験 ^d	38166	対照物質 ^e /0	200 ^f	雌雄各15匹
		BNT162b2 (V8)/100	200 ^f	雌雄各15匹
Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9)の筋肉内反復投与毒性試験および3週間回復性試験 ^d	■GR142	生理食塩液 ^g /0	60	雌雄各15匹
		BNT162b2 (V9)/30	60	雌雄各15匹
生殖発生毒性試験				
Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9)の筋肉内投与受胎能、催奇形性および出生後の発生に関する試験 ^d	■256434 (RN9391R58)	生理食塩液 ^g /0	60	雌44匹
		BNT162b2 (V9)/30	60	雌44匹

- a. すべての試験は GLP 適合試験であり、OECD データ相互受入れ制度加入国（米国、ドイツおよびフランス）で実施された
- b. RNA としての投与量
- c. 特記のない限り、1 回につき 1 箇所へ投与
- d. 反復投与毒性試験：週 1 回、計 3 回投与、生殖発生毒性試験：交配前後に 2 回ずつ、計 4 回投与
- e. 300 mM 精製白糖含有リン酸緩衝生理食塩液
- f. 1 回につき 2 箇所（左右後肢に各 100 µL）へ投与
- g. 滅菌生理食塩液（0.9% NaCl）

ラットに BNT162b2 (V8)または BNT162b2 (V9)を週 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、全身性の一般状態の変化および死亡はみられなかった。BNT162b2 (V8)および BNT162b2 (V9)の投与後に認められた変化は概ね類似していた。予想された炎症反応に伴う変化として、投与部位の浮腫および紅斑、一過性の体温上昇、急性期タンパク質および白血球数の増加ならびにアルブミン：グロブリン (A:G) 比の低下などがみられた。投与部位の変化は、初回投与後と比較して、2 回目および 3 回目投与後で発現頻度が増加し、重症化した。次回投与前には回復した。炎症に伴う二次的変化として、一過性の軽微な体重減少ならびに網状赤血球数、赤血球系パラメータおよび血小板数の一過性の減少が認められた^{21,22,23}。休業期間終了時の臨床病理検査において認められたのは赤血球分布幅の増加、グロブリンの上昇および A:G 比の低下のみであり、回復性が示された。BNT162b2 (V8)投与群において GGT の上昇がみられたものの他の肝胆管系の障害を示唆する臨床病理検査値の変化ならびに肝臓および胆道系に障害を示唆する病理組織学的所見もみられなかった。また、BNT162b2 (V9)投与群では GGT の上昇はみられなかった。剖検および器官重量測定において、所属リンパ節（腸骨リンパ節）および脾臓の肥大ならびに脾臓重量の増加がみられ、免疫活性化または炎症反応に起因する変化と考えられた。病理組織学的検査では、投与部位およびその周囲組織の浮腫および炎症、所属リンパ節、骨髄および脾臓での細胞充実性増加ならびに肝臓での肝細胞空胞化が認められたが、以下の項に示すようにいずれも毒性学的意義の乏し

い変化と考えられた。これらの病理組織学的所見は休薬期間終了時には概してみられず、回復性が示された。また、BNT162b2 がコードする P2 S 抗原に対する著明な免疫応答が誘導された。

生殖発生毒性試験において、雌性ラットに BNT162b2 を臨床用量である 30 µg RNA/回の用量で計 4 回（交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回）筋肉内投与したところ、各投与後に体重および摂餌量の一過性の低下ならびに投与部位の剖検所見が認められたが、いずれも毒性学的意義の乏しい変化であった。BNT162b2 投与による母動物の交配成績、受胎能パラメータ、卵巣および子宮内着床データ、ならびに胚・胎児および出生児の生存、成長および発達に対する影響はみられなかった。母動物で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答が認められ、胎児および出生児でも検出された。

本剤に含まれる添加剤のうち、LNP を構成する脂質である ALC-0159, ALC-0315 および DSPC は本邦の医薬品における新添加剤に該当することから、これらの安全性について評価した。脂質の組成が製造販売承認申請製剤と同一である被験物質を用いた BNT162b2 の反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験において毒性は認められず、*in silico* 変異原性評価、投与量の観点からの評価および文献調査等の結果、これらの新添加剤の遺伝毒性の懸念は示されなかった。

4.1. 単回投与毒性試験

BNT162b2 の単回投与毒性試験は実施していない。BNT162b2 (V8) および BNT162b2 (V9) の反復投与毒性試験の初回投与時に毒性学的意義のある変化は認められず、概略の致死量はそれぞれ 100 µg RNA 超および 30 µg RNA 超と考えられた。

4.2. 反復投与毒性試験

4.2.1. Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V8) の筋肉内反復投与毒性試験

SARS-CoV-2 の P2 S 全長体または S タンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) をコードする RNA [BNT162b2 (V8), BNT162b2 (V9), BNT162b2 (V8) または BNT162b2 (V9)] の LNP 封入体 (LNP を構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一) を、雌雄 Wistar Han ラットに 0 または 100 µg RNA/回の用量で週 1 回、計 3 回 (試験 1 日、8 日および 15 日) 筋肉内投与した際の毒性を評価し、3 週間の休薬期間を設けて回復性を確認した^a。今回、BNT162b2 (V9) を製造販売承認申請することから、本試験で評価した被験物質のうち、本項では、BNT162b2 (V9) の類縁のバリエーションである BNT162b2 (V8) (コドン最適化のみが異なり、コードするアミノ酸配列は同一) の結果について記載した。なお、各被験物質投与群の所見は概ね類似していた。

一般状態観察、体重および摂餌量測定、投与部位観察、体温測定、血清中サイトカイン濃度測定、臨床病理検査 (血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学検査、急性期タンパク質測定および尿検査)、聴覚および眼科学的検査、免疫原性評価、器官重量測定、剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。

早期安楽殺または死亡例はみられなかった。また、一般状態観察において、行動、外観または便の状態などに全身性の変化を示唆する所見はみられなかった。

^a BNT162b2 (V8) については週 1 回、計 2 回 (試験 1 および 8 日) 筋肉内投与した。

体重は各投与前に比べて投与後 24 時間に一時的に減少したが（投与前値の 0.92 倍）、次回投与前および休薬期間終了時までには対照群の体重付近まで回復した。摂餌量への影響は認められなかった。体温は、各投与後 4 時間または 24 時間に一時的に上昇したが、40°C を超えた個体は認められず、対照群との差は概ね 1°C 以内であった。休薬期間中、体重または体温への影響はみられなかった。

投与部位観察においては、投与部位の浮腫および紅斑が認められた。初回投与後、軽微な浮腫が発現し、まれに軽微な紅斑もみられた。初回投与後と比較して、2 回目および 3 回目投与後の所見の発現頻度は増加し、重症化した（浮腫：軽微～重度、紅斑：重度）が、すべての所見は次回投与前および休薬期間の終了時に回復した。

臨床病理検査値の変化は概して、免疫活性化または急性期反応および炎症反応として予想されたものであり、その他の軽微な変動は、それら反応による二次的变化と考えられた。予想された免疫応答として、血液学的検査において白血球数〔白血球（対照群と比して最大 2.2 倍、以下同様）、好中球（最大 7.8 倍）、好酸球（最大 6.1 倍）、好塩基球（最大 2.5 倍）、大型非染色球（最大 7.7 倍）〕の増加がみられ、1 回目投与後（試験 4 日）に比べて 3 回目投与後（試験 17 日）でより高値であった。また、免疫活性化または急性期反応および投与部位の炎症に伴う二次的变化として、網状赤血球数の一過性の減少（最少 0.28 倍、試験 4 日のみ）、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値）の減少（最少 0.87 倍、試験 17 日のみ）および血小板数の散発的な減少（最少 0.66 倍）が認められたが、いずれも軽度であった。なお、網状赤血球数の減少は、既承認の LNP 封入低分子干渉 RNA (siRNA) 製剤であるオンパットロを投与したラットで認められたが、ヒトでは認められていない²⁴。血小板数の減少は、炎症に起因する血小板の利用亢進によるものと考えられ、止血性への影響は伴わなかった²¹。血液生化学検査では、肝胆道系のバイオマーカーである γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)²⁵ の上昇が試験 4 日および 17 日に認められたが、胆汁うっ滞または肝胆道系障害を示唆する他の肝胆道系マーカーの変化、剖検または病理組織学的検査における変化はみられず、さらに、BNT162b2 (V9) の反復投与毒性試験ではみられなかった (M2.4.4.2.2 項)。急性期反応と考えられる²⁶アルブミンの減少（最少 0.87 倍）およびグロブリンの増加（最大 1.2 倍）がみられ、これに伴い A:G 比は低下した。これらの所見は投与した被験物質または発現した抗原に対する典型的な炎症反応と考えられた。急性期タンパク質測定において、フィブリノゲン（最大 3.1 倍）、 α -1 酸性糖タンパク質（最大 21 倍）および α -2 マクログロブリン（最大 217 倍）の増加がみられ、ワクチン接種時にみられる急性期反応と一致していた。尿検査において、BNT162b2 (V8) の投与に関連する変化は認められなかった。休薬期間終了時にはいずれの臨床病理検査値においても変化はみられず、回復性が示された。

聴覚および眼科学的検査ならびに血清中サイトカイン濃度測定において、BNT162b2 (V8) の投与に関連する変化は認められなかった。

器官重量測定では、脾臓重量（絶対値および比体重値）の増加（最大 1.6 倍）が認められた。剖検でみられた脾臓の肥大および病理組織学的検査で認められた造血亢進を伴うものであり、免疫反応に起因する変化と考えられた。

剖検では、投与部位の硬結および肥厚が BNT162b2 (V8) 投与群の 16/20 例に認められた。この所見は、投与期間終了時の病理組織学的検査で BNT162b2 (V8) 投与群の全例でみられた炎症性変化

と関連するものであった。投与部位の剖検所見は休薬期間終了時には認められず、回復性が示された。その他の剖検所見として、所属リンパ節および脾臓の肥大が一部の動物でみられた。これらリンパ組織の変化は、BNT162b2 (V8)投与に起因する免疫反応と考えられた。

投与終了時の病理組織学的検査では、投与部位およびその周囲組織、所属リンパ節、骨髄、脾臓ならびに肝臓において変化が認められた。投与部位の炎症は、マクロファージ、顆粒球およびリンパ球の筋肉への浸潤を特徴とし、真皮および皮下組織への浸潤も散見され、軽微から軽度の筋線維変性（ごく稀に軽微な壊死）および軽度の線維化を伴うものであった。これらの変化は、BNT162b2 (V8)の筋肉内投与による免疫反応および炎症反応と考えられた。BNT162b2 (V8)投与群の全例で、所属リンパ節における胚中心細胞充実性増加および形質細胞増加がみられた。また、軽微から軽度の骨髄での細胞充実性増加および脾臓での造血亢進が認められ、剖検での脾臓の肥大ならびに脾臓重量（絶対値および比体重値）の増加を伴っており、顆粒球形成および血中での好中球の増加に関連する変化と考えられた。BNT162b2 (V8)投与群の19/20例で、肝門脈領域の軽微から軽度の肝細胞空胞化が認められたが、肝機能検査値の変化（アラニンアミノトランスフェラーゼまたはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの上昇など）を伴わなかった。GGTの上昇がみられたが、これは肝胆道系マーカーとして知られており、肝細胞空胞化との関連性はないと考えられた²⁷。肝細胞空胞化は、LNPの肝細胞への取り込みを表す所見と考えられた²⁸。休薬期間終了時の病理組織学的検査では、骨髄、脾臓および肝臓に所見は認められなかった。投与部位およびその周辺組織の炎症の程度は軽微から軽度であり、回復傾向が示された。また、所属リンパ節では形質細胞増加の程度も軽症化し、マクロファージの浸潤が認められた。これは、投与期間終了時にみられた炎症の修復過程を反映したものと考えられた。

試験17日（3回目投与後2日）および38日（3回目投与後23日）に血清を採取し免疫原性を評価したところ、BNT162b2 (V8)の投与によるSARS-CoV-2 Sタンパク質特異的IgGおよび疑似ウイルス中和抗体の著明な誘導が示された（M2.4.2.1.4項）。

以上、雌雄Wistar HanラットにBNT162b2 (V8)を100 µg RNA/回の用量で週1回、計3回筋肉内投与したところ、全身性の一般状態変化はみられず忍容性を示し、著明な抗原特異的免疫反応が誘導された。投与部位および所属リンパ節の炎症性変化、骨髄および脾臓の造血亢進、ならびに臨床病理検査値の変化が認められたが、いずれも免疫活性化または急性期反応による変化、もしくは炎症による二次的変化と考えられた。GGTの上昇が認められたが、肝胆道系障害を示唆する他の変化はみられず、BNT162b2 (V9)の反復投与毒性試験ではみられなかったことから、毒性学的意義の低い変化と考えられた。肝門脈領域の肝細胞空胞化が認められたが、程度は軽微から軽度であり、LNPの肝細胞への取り込みを表す所見と考えられた²⁸。このように、本試験で認められた変化はいずれも毒性学的意義に乏しいものであり、また、休薬により回復性が示された。なお、これらの変化は他のLNP封入mRNAワクチンの筋肉内投与で典型的に発現する所見と合致するものであった²⁹。

4.2.2. Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9)の筋肉内反復投与毒性試験

2種類のRNA [BNT162b2 (V9)またはBNT162b2 (V8)] のLNP封入体（LNPを構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一）を、雌雄Wistar Hanラットに0または30 µg RNA/回の用量で週1回、計3回（試験1日、8日および15日）筋肉内投与した際の毒性を評価した。今回、BNT162b2 (V9)を製造販売承認申請することから、本試験で評価した被験物質のうち、本項ではBNT162b2 (V9)の試験結果について記載した。なお、両被験物質投与群の所見は概ね類似していた。

一般状態観察、体重および摂餌量測定、投与部位観察、体温測定、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学検査、急性期タンパク質測定および尿検査）、眼科学的検査、免疫原性評価、器官重量測定、剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。

早期安楽殺または死亡例はみられなかった。一般状態観察、体重測定において変化は認められなかった。摂餌量の減少（0.83倍：比対照値）が試験4日および11日に認められた。体温は試験1日、8日および15日の投与後24時間でそれぞれ対照群に比べて0.54°C、0.98°Cおよび1.03°C高かったが、40°Cを超えた個体はなかった。

投与部位観察において、投与部位の浮腫および紅斑が認められた。初回投与後、軽微な紅斑または軽度の浮腫がみられた。2回目または3回目投与後、紅斑は軽微だったが、浮腫は中等度に重症化した。これらの浮腫および紅斑は次回投与前および休薬期間終了時には回復した。

臨床病理検査値の変化はいずれも、BNT162b2 (V9)投与による免疫活性化または投与部位の炎症による二次的変化と考えられた。血液学的検査において、白血球数〔白血球（最大2.64倍：比対照値、以下同様）、好中球（最大6.60倍）、単球（最大3.30倍）および大型非染色球（最大13.2倍）、好酸球（最大3.17倍）および好塩基球（最大8.00倍）〕の増加、総タンパク質（最少0.90倍）およびアルブミン（最少0.85倍）の減少ならびにグロブリンの増加（最大1.10倍）に伴うA:G比の低下（最少0.82倍）がみられた。急性期反応として、フィブリノゲン（最大2.49倍、試験17日のみ）、 α -1酸性糖タンパク質（最大39倍）および α -2マクログロブリン（最大71倍）の増加（全般的に雄で高値）が認められた。一過性の網状赤血球数の減少（最少0.27倍、試験4日）がみられたが、試験17日では雌でのみ増加（最大1.31倍）した。また、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値）の減少（それぞれ最少0.93倍、0.90倍および0.90倍）がみられた。休薬期間終了時の臨床病理検査において認められたのは赤血球分布幅の増加（最大1.21倍）およびグロブリンの増加（最大1.08倍）に伴うA:G比の低下（最少0.91倍）のみであり、回復性が示された。赤血球分布幅の増加は、一過性に減少した網状赤血球数の回復に起因するものと考えられた。

脾臓重量の増加（雄：最大1.42倍、雌：最大1.62倍）がみられ、剖検では所属リンパ節の肥大（雄1/10例、雌1/10例）、投与部位の蒼白／暗色化（雄2/10例、雌3/10例）または硬化（雄2/10例、雌4/10例）が認められた。休薬期間終了時、BNT162b2 (V9)の投与に関連する臓器重量の変化はみられず、剖検所見として所属リンパ節の肥大が雄1/5例にみられたのみであり、回復性が示された。

病理組織学的検査において、投与期間終了時に投与部位での軽度から中等度の混合細胞性炎症（20/20例）および軽度から中等度の浮腫（19/20例）（剖検所見でみられた蒼白／暗色化または硬化と関連）、所属リンパ節および鼠径リンパ節での軽微から軽度の胚中心細胞充実性増加（11/20例、11/20例）および軽微から中等度の形質細胞増加（16/20例、3/20例）（剖検所見での所属リンパ節の肥大と関連）、脾臓での軽微な造血細胞の増加（19/20例）および軽微な胚中心細胞充実性増加（11/20例）（剖検所見でみられた肥大化および脾臓重量の増加と関連）ならびに骨髄での軽微な造血細胞の増加（20/20例）がみられたが、これらの変化は免疫活性化および炎症反応と符合するものであり、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの所見のうち休薬期間終了時に認められたのは所属リンパ節での軽微から軽度の胚中心細胞充実性増加（7/10例）およ

び軽微な形質細胞増加（8/10 例）ならびに脾臓での軽微な胚中心細胞充実性増加（3/10 例）のみであり、回復性が示された。

肝門脈領域の軽微な肝細胞空胞化（15/20 例）が認められたが、肝傷害を示唆する肝機能検査値の変化はみられず、休薬期間終了時には回復していたため、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

免疫原性評価では、BNT162b2 (V9)投与群で投与期間および休薬期間の終了時に雌雄ともに SARS-CoV-2 中和抗体応答の誘導が確認された（M2.4.2.1.4 項）。一方、BNT162b2 (V9)投与群の初回投与前および対照群からは中和抗体は検出されなかった。

以上、雌雄 Wistar Han ラットに BNT162b2 (V9)を 30 µg RNA/回の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、全身性の一般状態の変化はみられず忍容性を示した。免疫活性化または炎症反応に起因する体温、投与部位の皮膚、臨床病理検査値および器官重量の変化ならびに剖検および病理組織学的所見がみられた。また、LNP 脂質の肝細胞への取り込みによると考えられる肝細胞の空胞化が認められた。本試験で認められた所見は、他の LNP 封入 mRNA ワクチンを筋肉内投与した際の所見と一致し²⁹、さらに BNT162b2 (V8)の反復投与毒性試験（M2.4.4.2.1 項）でも認められたものであり、休薬により回復性が示され、いずれも毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

4.3. 遺伝毒性試験

BNT162b2 の遺伝毒性試験は実施していない。本剤は RNA である BNT162b2 と溶解された脂質を混合した LNP 封入 RNA 製剤であり、本剤の各構成成分が遺伝毒性を示す可能性は予想されない。なお、新添加剤の遺伝毒性評価について M2.6.6.8.3.1.1 項に記載した。

4.4. がん原性試験

BNT162b2 のがん原性試験は実施していない。本剤は RNA である BNT162b2 と溶解された脂質を混合した LNP 封入 RNA 製剤であり、本剤の各構成成分ががん原性を示す可能性は予想されない。一般的に、感染症に対するワクチン製品の開発および販売承認申請にがん原性試験を実施する必要はないと考えられている^{3,5}。

4.5. 生殖発生毒性試験

3 種類の RNA [BNT162b2 (V9)または BNT162b2 (V8)] の LNP 封入体（LNP を構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一）を、雌性 Wistar Han ラットに 0 または 30 µg RNA/回の用量で交配前に 2 回（無処置雄性ラットとの交配の 21 日前および 14 日前）ならびに妊娠 9 日および妊娠 20 日の計 4 回、筋肉内投与した際の生殖発生毒性について評価した。今回、BNT162b2 (V9)を製造販売承認申請することから、本試験で評価に用いた被験物質のうち、本項では BNT162b2 (V9)の試験結果について記載した。なお、各被験物質投与群の所見は概ね類似していた。

交配期間終了後、雌 22 匹/群については妊娠 21 日に帝王切開し、胚・胎児発生を評価した（帝王切開サブグループ）。残りの 22 匹/群は自然分娩させ、分娩後 21 日まで母動物の哺育状態および出生児の発達の影響を評価した（自然分娩サブグループ）。

すべての母動物について、一般状態、体重、性周期、交配成績および受胎能を評価し、剖検を実施した。帝王切開サブグループについて妊娠 21 日に帝王切開し、卵巣および子宮内検査、妊娠子宮重量に加え、胎児の生存率、性別、体重ならびに外表、内臓および骨格の奇形、異常および変異を評価した。自然分娩サブグループの母動物では分娩、授乳および哺育行動を分娩後 21 日まで評価した。出生児については、生存率、体重、身体的発達（耳介展開および眼瞼開裂）、行動および感覚機能発達（聴覚および視覚機能検査）を評価し、出生後 21 日に剖検した。また、母動物、胎児および出生児の免疫原性評価を実施した。

BNT162b2 (V9)投与に起因する死亡例はみられなかった。母動物において、各投与後の体重および摂餌量の一過性の低下、ならびに投与部位の一般状態の変化および剖検所見が認められたが、いずれも BNT162b2 の反復投与毒性試験でみられた炎症反応または免疫反応に起因すると考えられた変化と一致し、毒性学的意義の低い変化と考えられた。

母動物において BNT162b2 (V9)投与による性周期、交尾までの期間、交尾率、受胎率および妊娠率への影響はなかった。また、卵巣および子宮内着床データ、胚・胎児の生存および成長への影響ならびに外表、内臓および骨格の奇形、異常および変異はみられなかった。加えて、出生児の生存および成長、身体的発達（耳介展開および眼瞼開裂）、感覚機能発達（聴覚および視覚機能検査）に対する BNT162b2 投与の影響はみられず、剖検所見も認められなかった。

BNT162b2 (V9)を投与後のすべての母動物ならびにその胎児および出生児から採取した血清において SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答がみられた。一方、BNT162b2 (V9)投与群の初回投与前および対照群では中和抗体応答は認められなかった。

以上、雌性ラットに BNT162b2 (V9)を臨床用量である 30 µg RNA/回の用量で計 4 回（交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回）筋肉内投与したところ、各投与後に体重および摂餌量の一過性の低下ならびに投与部位の剖検所見が認められたが、いずれも毒性学的意義の乏しい変化であった。また、BNT162b2 投与による母動物の交配成績、受胎能パラメータ、卵巣および子宮内着床データ、ならびに胚・胎児および出生児の生存、成長および発達に対する影響はみられなかった。母動物で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答が認められ、胎児および出生児でも検出された。

なお、BNT162b2 の反復投与毒性試験の剖検および病理組織学的検査において、雌雄生殖組織の毒性はみられていない（M2.4.4.2 項）。

4.6. 局所刺激性試験

BNT162b2 の筋肉内投与による局所刺激性は、反復投与毒性試験の中で投与部位観察、剖検および病理組織学的検査によって評価しており、結果は M2.4.4.2 項に記載した。

4.7. その他の毒性試験

4.7.1. 抗原性試験

マウスおよびサルを用いた効力を裏付ける試験において免疫原性を評価した（M2.4.2.1.2 項および M2.4.2.1.3 項）。マウスおよびサルに BNT162b2 (V9)を投与したところ、著明な免疫反応が誘導された。また、ラットに BNT162b2 を投与した毒性試験においても同様の結果が得られた（M2.4.2.1.4 項）。

4.7.2. 免疫毒性試験

BNT162b2 の免疫毒性試験は実施していない。反復投与毒性試験において免疫毒性を示唆する変化はみられず、BNT162b2 (V8)の投与に関連する血清サイトカイン濃度の変化も認められなかった (M2.4.4.2 項)。

4.7.3. 新添加剤の安全性評価

本剤に含まれる成分のうち、ALC-0159、ALC-0315 および DSPC が本邦における医薬品の新添加剤に該当することから、各成分の安全性を評価した。

新添加剤に該当する ALC-0159、ALC-0315 および DSPC の毒性プロファイルについては、ラットを用いた BNT162b2 の反復投与毒性試験 (M2.4.4.2 項) および生殖発生毒性試験 (M2.4.4.5 項) において評価されている。すなわち、脂質の組成が製造販売承認申請製剤と同一である LNP に封入した BNT162b2 (V8)または BNT162b2 (V9)を雌雄ラットにそれぞれ 100 µg RNA/回または 30 µg RNA/回の用量で 1 週間に 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、単回および反復投与毒性ならびに局所刺激性を示唆する毒性学的意義のある変化は認められず、雌雄生殖器への影響はみられなかった。また、雌性ラット BNT162b2 (V9)を 30 µg RNA/回の用量で計 4 回 (無処置雄性ラットとの交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回) 筋肉内投与した生殖発生毒性試験において、雌の受胎能、妊娠、胚・胎児または出生児の発達への影響は認められなかった。このことから、これら試験において、本剤に含有する ALC-0159、ALC-0315 および DSPC に起因する安全性への懸念は示唆されなかった。本剤は臨床において 1 回当たり 30 µg RNA の投与量で筋肉内に接種され、そのときの脂質の総量は 763 µg または 15.3 µg/kg (50 kg のヒトに投与した場合) である。一方、BNT162b2 (V8)の反復投与毒性試験における被験物質の 1 回投与量は 100 µg RNA であり、そのときの脂質の総量は 2543 µg となる。BNT162b2 (V8)を用いた反復投与試験における投与開始時の雄ラットおよび雌ラットの平均体重がそれぞれ 305.63 g および 218.14 g であったことに基づくと、脂質の体重換算の投与量はそれぞれ 8,300 µg/kg および 11,700 µg/kg であり、50 kg のヒトを想定した本剤に含まれる脂質の投与量 (15.3 µg/kg) の約 500~800 倍である。ALC-0159、ALC-0315 および DSPC の遺伝毒性については M2.6.6.8.3.1.1 項に述べるとおり、in silico 変異原性評価結果、1 日投与量、他剤での使用前例および類似化合物に関する情報等から遺伝毒性の懸念は示されなかった。本剤は臨床において頻繁に投与されず、曝露が長期間に及ぶことは想定されないことから、ALC-0159、ALC-0315 および DSPC のがん原性評価は必要とされないと考えられた³⁰。

以上のことから、ALC-0159、ALC-0315 および DSPC に起因する安全性への懸念は示されず、本剤の臨床使用によりこれら新添加剤の安全性への懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

4.8. 標的臓器毒性

BNT162b2 をラットに反復投与したところ、全身性の一般状態の変化はみられず、忍容性が示された。反復投与毒性試験において投与部位、所属リンパ節および脾臓にみられた変化は、BNT162b2 の投与による局所反応原性の発現および予測される炎症反応と考えられた。休薬後の病理組織学的検査においてこれらの所見は回復性が示されたことも、この結論を裏付けるものである。肝臓における門脈領域の肝細胞空胞化は BNT162b2 封入 LNP の投与に起因する変化であり、LNP の肝細胞への取り込みを表す所見と考えられた²⁸。肝機能マーカーの変化を伴わず、また、休薬後の病理組織学的検査では認められず回復性を示した。これらのことから、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。肝臓に関連する変化として、BNT162b2 (V8)の反復投与毒性試験

において GGT の上昇がみられたが、これは肝胆道系マーカーとして知られており、肝細胞空胞化との関連性はないと考えられた²⁷。肝胆道系障害を示唆する他の変化はみられず、BNT162b2 (V9)の反復投与毒性試験ではみられなかったことから、毒性学的意義の低い変化と考えられた。

5. 総括および結論

マウスおよびサルを用いた免疫原性試験では、BNT162b2 (V9)の単回投与後にすみやかな抗原特異的 IgG 応答誘導がみられ、ウイルス中和抗体が検出された。サルに 2 回目投与後には抗原特異的 IgG 濃度およびウイルス中和抗体価が著明に上昇し、いずれも SARS-CoV-2 ヒト回復期血清の値を上回った。マウスおよびサルのいずれにおいても、Th1 細胞優勢の CD4 陽性 T 細胞および IFN- γ 産生性 CD8 陽性 T 細胞応答が認められた。サルを用いた SARS-CoV-2 攻撃試験では、BNT162b2 (V9)の前投与により SARS-CoV-2 RNA はほとんど検出されず、感染保護効果が示された。肺の異常を示す所見はみられず、疾患増強を示唆する所見は認められなかった。

ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP (LNP は製造販売承認申請製剤と同一の脂質で構成) をラットに静脈内投与した PK 試験では、LNP の構成脂質である ALC-0315 および ALC-0159 の血漿、尿、糞および肝臓中濃度を測定した。その結果、ALC-0315 および ALC-0159 は血中から肝臓にすみやかに分布することが示された。また、ALC-0315 および ALC-0159 はそれぞれ投与量の約 1% および約 50% が未変化体として糞中に排泄されたが、尿中においては検出下限未満であった。このことから、ALC-0315 および ALC-0159 の消失にはそれぞれ代謝および糞中排泄が関与することが示唆された。生体内分布試験では、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP をマウスに筋肉内投与した。その結果、ルシフェラーゼの発現が投与部位でみられ、それより発現量は低値であったものの肝臓でも認められた。ルシフェラーゼの投与部位での発現は投与後 6 時間から認められ、投与後 9 日には消失した。肝臓での発現も投与後 6 時間に認められ、投与後 48 時間までに消失した。ラットにルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の放射能標識体を筋肉内投与したところ、放射能濃度は投与部位が最も高値であった。投与部位以外では肝臓で最も放射能濃度が高く、次いで脾臓、副腎および卵巣でも検出されたが、投与量に対する総放射能回収率は肝臓と比較して著しく低かった。ALC-0315 および ALC-0159 の代謝をマウス、ラット、サルおよびヒトの血液、肝ミクロソーム、肝 S9 画分および肝細胞を用いて *in vitro* で評価した。また、上記のラット静脈内投与 PK 試験で採取した血漿、尿、糞および肝臓試料を用いて *in vivo* 代謝についても検討した。これら *in vitro* および *in vivo* 試験から、ALC-0315 および ALC-0159 は、試験したいずれの動物種でも、それぞれエステル結合およびアミド結合の加水分解により緩徐に代謝されることが示された。

ラットに BNT162b2 (V8)または BNT162b2 (V9)を週 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、全身性の一般状態の変化および死亡はみられなかった。BNT162b2 (V8)および BNT162b2 (V9)の投与後に認められた変化は概ね類似していた。予想された炎症反応に伴う変化として、投与部位の浮腫および紅斑、一過性の体温上昇、急性期タンパク質および白血球数の増加ならびに A:G 比の低下などがみられた。投与部位の変化は、初回投与後と比較して、2 回目および 3 回目投与後で発現頻度が増加し、重症化したが、次回投与前には回復した。炎症に伴う二次的变化として、一過性の軽微な体重減少ならびに網状赤血球数、赤血球系パラメータおよび血小板数の一過性の減少が認められたが^{21,22,23}、休薬期間終了時の臨床病理検査において認められたのは赤血球分布幅の増加、グロブリンの上昇および A:G 比の低下のみであり、回復性が示された。BNT162b2 (V8)投与

群において GGT の上昇がみられたものの他の肝胆管系の障害を示唆する臨床病理検査値の変化ならびに肝臓および胆道系に障害を示唆する病理組織学的所見もみられなかった。また、BNT162b2 (V9)投与群では GGT の上昇はみられなかった。剖検および器官重量測定において、所属リンパ節および脾臓の肥大ならびに脾臓重量の増加がみられ、免疫活性化または炎症反応に起因する変化と考えられた。病理組織学的検査では、投与部位およびその周囲組織の浮腫および炎症、所属リンパ節、骨髄および脾臓での細胞充実性増加ならびに肝臓での肝細胞空胞化が認められたが、いずれも毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの病理組織学的所見は休薬期間終了時には概してみられず、回復性が示された。また、BNT162b2 がコードする P2 S 抗原に対する著明な免疫応答が誘導された。以上のように、ラットを用いた反復投与毒性試験において BNT162b2 投与による毒性変化は認められなかった。

生殖発生毒性試験において、雌性ラットに BNT162b2 を臨床用量である 30 µg RNA/回の用量で計 4 回（無処置雄性ラットとの交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回）筋肉内投与したところ、各投与後に体重および摂餌量の一過性の低下ならびに投与部位の剖検所見が認められたが、いずれも毒性学的意義の乏しい変化であった。BNT162b2 投与による母動物の交配成績、受胎能パラメータ、卵巣および子宮内着床データ、ならびに胚・胎児および出生児の生存、成長および発達に対する影響はみられなかった。母動物で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答が認められ、胎児および出生児でも検出された。

本剤に含有する新添加剤である ALC-0159, ALC-0315 および DSPC に起因する安全性への懸念は示されず、本剤の臨床使用によりこれら新添加剤の安全性への懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

上記に要約したように、BNT162b2 の非臨床試験の結果は、本剤の製造販売承認申請における用法および用量を支持するものであった。

参考文献

- 1 Pallesen J, Wang N, Corbett KS, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(35):E7348-57.
- 2 Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020;367(6483):1260-3.
- 3 World Health Organization. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Annex 1. In: World Health Organization. WHO technical report series, no. 927. Geneva, Switzerland; World Health Organization; 2005:31-63.
- 4 EMA Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines: CPMP; .2002: 20 pages.

- 5 感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン (薬食審査発 0527 第 1 号 平成 22 年 5 月 27 日)
- 6 Kariko K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005;23(2):165-75.
- 7 Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(10):759-80.
- 8 Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat Commun* 2018;9(1):3361.
- 9 Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside modified mRNA vaccination. *Nature* 2017;543(7644):248-51.
- 10 Ke Z, Oton J, Qu K. et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 2020;10.1038/s41586-020-2665-2.
- 11 Zakhartchouk AN, Sharon C, Satkunarajah M, et al. Immunogenicity of a receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein in mice: implications for a subunit vaccine. *Vaccine* 2007;25(1):136-43.
- 12 Yong CY, Ong HK, Yeap SK, et al. Recent advances in the vaccine development against middle east respiratory syndrome-coronavirus. *Front Microbiol* 2019;10:1781.
- 13 Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol* 2020;41(5):355-9.
- 14 Zost S, Gilchuk P, Chen RE, et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *BioRxiv* posted May13, 2020, www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.12.091462v1.
- 15 Cai Y, Zhang J, Xiao T, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 2020:10.1126/science.abd4251.
- 16 Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 2020;382(12):1177-9.
- 17 Kim JY, Ko JH, Kim Y, et al. Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea. *J Korean Med Sci* 2020;35(7):e86.

- ¹⁸ Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.21.001628>. Accessed: 24 Sep 2020.
- ¹⁹ Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med* 2020;Apr 2:1-10.
- ²⁰ Singh DK, Ganatra SR, Singh B, et al. SARS-CoV-2 infection leads to acute infection with dynamic cellular and inflammatory flux in the lung that varies across nonhuman primate species. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136481>. Accessed: 24 Sep 2020.
- ²¹ Brooks MB, Turk JR, Guerrero A, et al. Non-Lethal Endotoxin Injection: A Rat Model of Hypercoagulability *PLoS ONE* 2017;12(1):e0169976.
- ²² Kim A, Fung E, Parikh SG, et al. A mouse model of anemia of inflammation: complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin. *Blood* 2014;123(8):1129-36.
- ²³ Kim A, Fung E, Parikh SG, et al. Isocitrate treatment of acute anemia of inflammation in a mouse model. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2016;56(1):31-6.
- ²⁴ Kozauer NA, Dunn WH, Unger EF, et al. CBER multi-discipline review of Onpattro. NDA 210922. 10 Aug 2018. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf. 02 Aug 2020.
- ²⁵ Boone L, Meyer D, Cusick P, et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet Clin Pathol* 2005;34(3):182-8.
- ²⁶ Sellers RS, Nelson K, Bindu B, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee Points to Consider: Approaches to the Conduct and Interpretation of Vaccine Safety Studies for Clinical and Anatomic Pathologists. *Toxicol Pathol* 2020;48(2):257-76.
- ²⁷ Ennulat D, Magid-Slav M, Rehm S, et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. *Toxicol Sci* 2010;116(2):397-412.
- ²⁸ Sedic M, Senn J, Lynn A, et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague- Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet Pathol* 2018;55(2):341-54.
- ²⁹ Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;15:1-11.

- ³⁰ International Council for Harmonisation (ICH). ICH harmonised guideline S1A: 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス (薬審第 315 号 平成 9 年 4 月 14 日) .