目次

頁
略号及び用語の定義 3
2.6.6　毒性試験の概要文 4
2.6.6.1　まとめ 4
2.6.6.2　単回投与毒性試験 5
2.6.6.3　反復投与毒性試験 6
2.6.6.3.1　ラットを用いた3週間筋肉内投与毒性試験及び4週間回復性試験（TT #[redacted]-6020） 6
2.6.6.4　遺伝毒性試験 7
2.6.6.5　がん原性試験 7
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 7
2.6.6.6.1　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（TT #[redacted]-9019） 7
2.6.6.7　局所刺激性試験 10
2.6.6.8　その他の毒性試験 10
2.6.6.8.1　ラットを用いた探索的3週間筋肉内投与免疫原性及び毒性試験並びに3週間回復性試験（TT #[redacted]-1017） 10
2.6.6.8.2　ラットを用いた探索的10週間筋肉内投与免疫原性試験（TT #[redacted]-1012） 11
2.6.6.8.3　マウスを用いた探索的7週間筋肉内投与免疫原性試験（TT #[redacted]-1013） 12
2.6.6.8.4　ラットを用いた探索的単回筋肉内投与免疫原性試験（TT #[redacted]-1007） 13
2.6.6.9　考察及び結論 13
2.6.6.10　参考文献 14

表一覧

頁

表 2.6.6-1　V116の毒性試験の概要 5
表 2.6.6-2　ラットを用いた探索的10週間筋肉内投与免疫原性試験の試験デザイン 11
表 2.6.6-3　ラットとヒトにおける用量比 14

略号及び用語の定義

略号	定義	
A2M	alpha-2-macroglobulin	α2マクログロブリン
AGP	alpha-1-acid glycoprotein	α1酸性糖タンパク
APA	aluminum phosphate adjuvant	リン酸アルミニウムアジュバント
CRM_{197}	cross reactive material 197	―
deOAc15B	de-*O*-acetylated serotype 15B	血清型15B の *O*-脱アセチル化体
FDA	Food and Drug Administration	アメリカ食品医薬品局
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
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IL-6	interleukin-6	インターロイキン-6
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PnPs	pneumococcal capsular polysaccharide	肺炎球菌莢膜ポリサッカライド
WHO	World Health Organization	世界保健機関

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

Merck Sharp & Dohme, LLC, Rahway, NJ, USA は、肺炎球菌血清型（3、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、15A、15B、15C、16F、17F、19A、20A、22F、23A、23B、24F、31、33F 及び35B）に起因する侵襲性疾患及び肺炎球菌性肺炎の予防のために、成人を対象とする適応を目的として21価肺炎球菌結合型ワクチン（V116）の開発を進めている。

V116に含める血清型は、成人の肺炎球菌感染症に関連する主要血清型をより広範にカバーすることを目標として、小児のワクチン接種率が高い地域の高齢者を対象とした一部の世界的な血清型疫学データに基づいて選択した。

V116は、21種類の血清型（3、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、15A、deOAc15B、16F、17F、19A、20A、22F、23A、23B、24F、31、33F 及び35B）の PnPs を、それぞれ CRM_{197}タンパクに結合させたものである。血清型20A については、非臨床に関する全ての項並びに非臨床試験の報告書及びデータでは血清型20として言及している（従来の文書ではこの血清型を血清型20と称していたが、後に血清型20A であることが判明した[4.3: 08B5C0]）。

V116について実施した非臨床毒性試験は、WHO（Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines、2005）[4.3: 03R07T]、FDA（Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications、2006）[4.3: 03RMZP]、ICH（ICH S5(R3)：Guideline on Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals、2020）及び厚生労働省（感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン）により公表されているワクチン及び医薬品の非臨床安全性試験に関するガイドライン及び原則に従ってデザインした。

V116の非臨床毒性試験として、マウス（TT #[redacted]-1013）及びラット（TT #[redacted]-1017、TT #[redacted]-1012 及び TT #[redacted]-1007）を用いた GLP 非適用の免疫原性試験[2.6.6.8 項]、ラットを用いた GLP 適用の3週間反復筋肉内投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）[2.6.6.3.1 項]並びにラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する GLP 適用の生殖発生毒性試験（TT #[redacted]-9019）[2.6.6.6.1 項]を実施した。

GLP 適用反復投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）では、ラットに V116（総 PnPs 42 µg/0.5 mL/回）を3週間の間隔で2回筋肉内投与し、その後4週間の休薬期間を設けた。V116の免疫原性はマウス及びラットの GLP 非適用免疫原性試験並びに GLP 適用反復投与毒性試験で実証され、ラットが V116の毒性評価に適した動物種であることを確認した。GLP 適用反復投与毒性試験で、V116の忍容性は良好であり、体重換算で臨床用量（総 PnPs 84 µg/0.5 mL/回）の100倍に相当する用量で V116の投与に関連した毒性所見は認められなかった。

GLP 適用生殖発生毒性試験（TT #[redacted]-9019）では、F_0母動物に対照物質（PBS）又は V116（総 PnPs 42 µg/回）を無処置の雄との交配28及び7日前、並びに妊娠6日及び授乳7日に筋肉内投与し、F_1世代に及ぼす影響を評価した。F_0母動物において、V116の忍容性は良好であり、V116の投与に関連

すると考えられる一般状態の変化及び死亡は認められなかった。また、評価した卵巣、子宮、同腹児、自然分娩、胎児又は出生児のいずれのパラメータにもV116の投与に関連する影響は認められなかった。これらのデータに基づくと、総 PnPs として42 µg/回（体重換算で臨床用量の100倍に相当）の用量で投与しても、V116は交尾及び受胎能、並びに胚・胎児及び出生児の発生に影響を及ぼさなかった。加えて、V116の投与により、世代間で免疫応答が維持されたことから、ラットが適切な動物種であることを確認した。

重要な毒性試験は GLP の原則に準拠して実施した。また、重要な試験は、[redacted]（米国）及び Laboratories Merck Sharp & Dohme-Chibret（フランス）で実施した。米国及びフランスは OECD の加盟国であるため、OECD データ相互受入れ制度が適用される。GLP 適用試験の報告書は GLP 遵守の陳述書を含む。

V116の毒性試験の一環として実施された試験の概要を[表 2.6.6-1]及び[2.6.7.1 項]に示す。

表 2.6.6-1　V116 の毒性試験の概要

試験の種類／試験期間	投与経路	動物種	用量（µg/回）	無毒性量（µg/回）	試験番号（GLP 適用状況）
反復投与毒性試験					
3週間投与毒性試験及び4週間回復性試験	筋肉内	ラット	0、42	42	TT #[redacted]-6020（GLP 適用）[a]
生殖発生毒性試験					
受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験	筋肉内	ラット	0、42	42	TT #[redacted]-9019（GLP 適用）[a]
その他の毒性試験					
探索的3週間投与免疫原性及び毒性試験並びに3週間回復性試験	筋肉内	ラット	0、42	ND	TT #[redacted]-1017（GLP 非適用）
探索的10週間投与免疫原性試験	筋肉内	ラット	0、42	NA	TT #[redacted]-1012（GLP 非適用）
探索的7週間投与免疫原性試験	筋肉内	マウス	0、8.4	NA	TT #[redacted]-1013（GLP 非適用）
探索的単回投与免疫原性試験	筋肉内	ラット	42	NA	TT #[redacted]-1007（GLP 非適用）

NA：該当せず、ND：特定せず（免疫原性が認められなかったため）
[a]　安定性／適合性試験及び免疫原性の検討を除き GLP を適用

2.6.6.2　単回投与毒性試験

正式な単回投与毒性試験は実施していない。V116の急性毒性は、ラットに総 PnPs 42 µg/回の用量の V116を3週間の間隔で2回（試験1及び22日）筋肉内投与した GLP 適用反復投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）で評価した。すなわち、V116の急性毒性を、一般状態観察、体温測定、初回投与（試験1日）24時間後の血中 IL-6測定、並びに初回投与から3日後（試験4日）の血液学的検査及び血液生化学的検査の成績に基づいて評価した。

V116の投与による急性毒性を示唆する所見は認められなかった。GLP 適用反復投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）の詳細は[2.6.6.3.1 項]及び[2.6.7.7.A 項]に示す。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

2.6.6.3.1　ラットを用いた3週間筋肉内投与毒性試験及び4週間回復性試験（TT #[redacted]-6020）

本試験では、ラットに V116を投与した際の毒性及び免疫原性を評価した。V116は3週間の間隔で2回（試験1及び22日）筋肉内投与し、その後4週間の休薬期間を設けた[2.6.7.7.A 項]。

Crl:WI(Han)ラットを2群（各群雌雄各16匹）に割り付けた。V116群には、総 PnPs 42 µg/0.5 mL/回（21の血清型の設定濃度は各4 µg/mL[2.6.7.4 項]）の用量で V116を投与した。この用量（総 PnPs 42 µg/0.5 mL/回）は、第 I 相試験用製剤（総 PnPs 84 µg/mL）及びラットに投与可能な最大容量（0.5 mL/回）に基づいて設定した。第 I 相試験用製剤の半量であるものの、体重換算で臨床用量（総 PnPs 84 µg/回）の100倍の用量に相当する。対照群には PBS を投与した。1回あたり0.5 mL の投与容量を、左右の大腿四頭筋に筋肉内投与（各0.25 mL）した。各群雌雄各10匹を試験25日に剖検した。また、各群雌雄各6匹を試験50日（4週間の休薬期間終了後）に回復性評価のために剖検した。

毒性は、生死、一般状態、体重、摂餌量、体温、眼科学的検査、臨床検査及び病理検査に基づき評価した。投与期間中及び休薬期間中に全例から血液を採取して血漿中 IL-6濃度を測定し、免疫原性を探索的に評価した。また、休薬期間中に休薬群の動物から血液を採取して血清中 AGP 及び A2M 濃度を測定した。

ラットに V116を3週間の間隔で2回筋肉内投与し、4週間の休薬期間を設けた際の忍容性は良好であり、死亡はみられなかった。投与期間中又は休薬期間中の一般状態、体重、摂餌量、体温、眼科学的検査、臨床検査、血中 IL-6、AGP 及び A2M 濃度に V116の投与に関連した変化は認められなかった。

投与期間終了時及び休薬期間終了時の病理検査では、V116の投与に関連した変化は認められなかった。投与期間終了時の検査で、投与部位の筋肉に限局性の炎症が認められたが、その特徴及び程度は対照群と V116群で同様であった。この炎症の特徴は、個々の筋線維及び筋束を取り巻く結合組織に少数の単核細胞が浸潤していることであった。加えて、一部の筋線維には再生像を示す変性又は好塩基性化が認められた。炎症は筋肉に限局しており、上層の皮膚や皮下組織には及んでいなかった。これらの所見は筋肉内への投与に関連したものであり、V116の投与に起因するものではなかった。投与部位の流入領域リンパ節に V116の投与に関連した変化は認められなかった。投与部位の変化は休薬期間終了時の検査では認められず、投与期間終了時に認められた炎症は回復したことが示された。いずれの時点においても、V116に関連した全身性の病理組織学的変化は認められなかった。

V116を1又は2回投与（試験1及び22日）した雌雄ラットで、V116はほとんどの血清型に対して特異的な抗体産生を誘導した。試験15及び36日の時間経過後において、抗体は持続又は増加していた。試験36日に V116の特異的抗体が認められた動物の割合は、血清型12F（17%）、24F（8%）及び23A（33%）を除いた血清型で42%～100%であった。

試験期間中にいずれのパラメータにも V116の投与に関連した所見が認められなかったことから、本試験の無毒性量は42 µg/回（総 PnPs）であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

V116の遺伝毒性は評価していない。WHO の「Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines」（2005）[4.3: 03R07T]及び厚生労働省の「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」では、ワクチンの遺伝毒性試験は通常不要とされている。

2.6.6.5　がん原性試験

V116のがん原性は評価していない。WHO の「Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines」（2005）[4.3: 03R07T]及び厚生労働省の「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」では、ワクチンのがん原性試験は通常不要とされている。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（TT #[redacted]-9019）

本試験の目的は、V116を F_0雌の交配前（交配28及び7日前）並びに妊娠6日及び授乳7日に筋肉内投与した際の母動物毒性及び受胎能、並びに F_1世代の胚・胎児及び出生児の離乳までの発生に対する影響を評価するとともに、V116の免疫原性を評価することであった[2.6.7.13.A 項]。

未交尾の雌 Crl:WI(Han)ラット88匹（投与開始時に69又は70日齢）を各44匹から成る2群に無作為に割り付け、各群に V116（総 PnPs 42 µg/回、21の血清型の設定濃度は各8 µg/mL[2.6.7.4 項]）又は対照物質（PBS）を無処置の雄との交配28及び7日前（それぞれ試験1及び21日）、並びに妊娠6日及び授乳7日に筋肉内投与した。投与容量は全ての動物で0.25 mL/回とし、片側の大腿四頭筋に、投与ごとに左右交互に投与した。この用量（総 PnPs 42 µg/回）は以下に基づいて選択した。

1. ラットを用いた GLP 適用反復投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）[2.6.6.3.1 項]において、ラットに投与可能な最大容量（0.5 mL）に基づいて第 I 相試験用製剤（総 PnPs 84 µg/mL）の臨床用量（容量1 mL）の半量の用量（総 PnPs 42 µg/0.5 mL/回）で V116を投与した際の忍容性は良好であり、かつ全ての血清型に対する免疫応答が認められ、ラットが毒性評価に適したモデルであることも確認した。

2. ラットにおける総 PnPs 42 µg/回の用量は、完了した臨床試験[2.7.4 項]の成人被験者において忍容性が良好であった臨床用量（総 PnPs 84 µg/回）の100倍（体重換算）に相当する。

3. 一般に、生殖発生毒性試験では GLP 適用反復投与毒性試験で確認された忍容性が良好な最大用量を投与することが最も望ましいと考えられている。これにより、ICH S5(R3)ガイドラインで推奨されている非妊娠動物と妊娠動物における V116の毒性プロファイルの直接比較が可能となる。また、これによって、より影響を受けやすいと考えられる毒性評価モデルである妊娠ラットにおいて生じる可能性がある過剰な毒性発現を回避できる（特に、GLP 適用反復投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）では2回投与したのに対して生殖発生毒性試験（TT #[redacted]-9019）では4回投与するため）。

上記の理由、並びに本生殖発生毒性試験（TT #[redacted]-9019）で母動物及び出生児に免疫応答が認められた結果に基づくと、本生殖発生毒性試験で用いた総 PnPs 42 µg/回の用量は、V116の生殖発生毒性の評価に十分な用量であったと考えられた。

雌に V116を2回投与した後に無処置の雄と交配（雌雄の比は1：1）させ、交尾が確認された日を妊娠0日とした。母動物毒性は、生存、一般状態、投与部位の皮膚スコア、体重及び体重変化量、摂餌量、並びに剖検所見に基づいて評価した。

妊娠21日に、コホート1（雌22匹／群）に割り付けた全ての母動物を安楽死させ、卵巣及び子宮を評価した。出生前の発生毒性は、妊娠子宮重量、胚・胎児の生存、胎児の体重及び性比、並びに胎児の外表、内臓及び骨格の形態に基づいて評価した。加えて、胎盤の形態も肉眼的に評価した。

コホート2（雌22匹／群）に割り付けた生存母動物は全て自然分娩させ、授乳21日に安楽死させた。これらの動物の生殖器を解剖し、着床痕の数及び分布を記録した。F_1出生児は、生存、一般状態、体重、反射及び身体的発達、並びに剖検所見に基づいて評価した。免疫原性評価用検体採取の対象として選択しなかった出生児は生後21日に安楽死させ、肉眼的病変の有無を検査した。

V116の投与に関連する F_0母動物の死亡はなかった。

PBS（対照）群（42例中11例）及び V116群（41例中18例）の両群で片側後肢（左側後肢の投与部位）に一過性の腫脹が認められた。1例を除いて全ての所見は妊娠6日の投与後及び／又はその翌日（妊娠7日）にみられた。活動レベル及び可動性への影響はなかったため、この所見は有害ではないと判断した。試験報告書には、V116群の後肢腫脹の発現頻度が僅かに高いことについてV116の投与に関連する可能性があると記載されているが、申請者が追加の評価を実施したところ、対照群と V116群とで発現頻度に意味のある差は認められていないこと、両群間で同所見の性質及び程度が類似していることから、申請者は、観察された後肢の腫脹は実験手技に関連したものであり、V116の投与との関連はないと考える。加えて、後肢の腫脹は、これより早い時期（交配前の2回の投与後）及び4回目（授乳7日）の投与後には対照群及び V116群のいずれの動物においても観察されておらず、このことは妊娠6日及び7日に対照群及び V116群の両群でみられた所見が手技に関連したものであることを更に支持している。

F_0母動物の交配前、妊娠中又は授乳中の体重、体重増加量及び摂餌量に V116の投与による影響は認められず、V116の投与に関連する剖検所見もみられなかった。

交尾までの期間、交尾率、受胎率及び妊娠率により評価した交尾及び受胎能に、V116の投与に関連する影響は認められなかった。

着床、胚・胎児の生存、胎児の体重及び性比に V116の投与に関連する影響はみられず、胎児の外表、内臓及び骨格の形態に V116の投与に関連する変化は認められなかった。

自然分娩パラメータ及び母動物の行動に V116の投与に関連する影響はみられず、F_1出生児の生存、一般状態、体重、離乳までの反射及び身体的発達にも V116の投与に関連する影響は認められなかった。いずれの出生児においても剖検時の異常所見は認められなかった。

母動物の抗 V116抗体を、投与前（コホート1及び2）、妊娠21日（コホート1）及び授乳21日（コホート2）に採取した検体を用いて測定した。また、抗 V116抗体を測定した母動物の妊娠21日のF_1胎児（コホート1の各群母動物5例の胎児）及び生後21日の F_1出生児（コホート2の各群各同腹児の雌雄各2例）についても抗 V116抗体を測定した。

V116群の F_0母動物では、投与前と比較して投与後では大部分の血清型に対する免疫応答が顕著に亢進（3倍超）し、F_1世代の胎児及び出生児でも抗体が認められ、それぞれの F_0母動物の検体で認められた免疫応答と概して一致していた。対照群及び V116群の投与前の検体の大部分は、抗 V116抗体が陰性であった。投与前に陽性であった検体の割合は、対照群と V116群でほぼ同程度であった。対照群では免疫応答に若干のばらつきが認められたが、ほとんどの血清型に対する免疫応答が全ての測定時点を通して一定しており、陽性の割合は概して V116群に比べて少なかった。全体として、V116群では世代間で免疫応答が維持されたことから、ラットが適切な動物種であることを確認した。

要約すると、雌ラットに V116を0又は総 PnPs 42 µg/回の用量で、無処置の雄との交配28及び7日前並びに妊娠6日及び授乳7日に筋肉内投与した。母動物において、V116の忍容性は良好であり、V116の投与に関連する一般状態の変化及び死亡は認められなかった。妊娠6日の投与後（妊娠6及び7日）に対照群及び V116群の両群で片側後肢（投与部位）に一過性の有害ではない腫脹が認められた。観察された後肢の腫脹の性質及び程度は対照群と V116群とで類似しており、発現頻度に意味のある差は認められなかった。後肢の腫脹は、これより早い時期（交配前の2回の投与後）及び4回目（授乳7日）の投与後には対照群及び V116群のいずれの動物においても観察されなかった。したがって、この所見は実験手技に関連したものであり、V116の投与との関連はないと考えられた。評価した卵巣、子宮、同腹児、自然分娩、胎児及び出生児のいずれのパラメータにも V116の投与に関連する影響は認められなかった。全体として、V116の投与により、世代間で免疫応答が維持された。本試験で評価したパラメータに V116の投与に関連するいかなる毒性影響も認められなかったことから、本試験の無毒性量は42 µg/回（総 PnPs）であった。

2.6.6.7　局所刺激性試験

V116について、独立した局所刺激性試験は実施していない。V116の局所刺激性は、ラットを用いたGLP適用反復投与毒性試験（TT #[redacted]-6020）[2.6.6.3.1 項] [2.6.7.7.A 項]の投与部位及び流入領域リンパ節の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査により評価した。V116群の筋肉内投与部位における組織反応は対照（PBS）群でみられた特徴及び程度と同様であり、忍容性が良好なワクチンで想定される典型的なものであり、このことは筋肉内投与部位での忍容性が良好なことを示している。加えて、流入領域リンパ節にV116の投与に関連する変化は認められなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

GLP適用の反復投与毒性試験に用いる適切な動物種を選択するため、GLP非適用の探索的免疫原性試験をラット及びマウスを用いて実施した。V116の初期製剤を使用したラットにおける最初のGLP非適用の探索的免疫原性試験（探索的な毒性の検討を含む）（TT #[redacted]-1017）[2.6.6.8.1 項]では、十分な免疫応答が認められなかった。この原因を調査し、適切な動物種を選択するため、ラット（TT #[redacted]-1012）[2.6.6.8.2 項]及びマウス（TT #[redacted]-1013）[2.6.6.8.3 項]における追加のGLP非適用の探索的免疫原性試験を、同様のV116製剤を用い、試験条件に若干（調製用ガラス器具、投与のための注射器、APAの有無）の変更を加えて実施した。最初の免疫原性試験（TT #[redacted]-1017）における不十分な免疫応答の原因は特定できなかったが、追加の免疫原性試験（TT #[redacted]-1012及びTT #[redacted]-1013）ではラット及びマウスの両方で頑健な免疫応答が認められ、このため、これらの動物種がV116の毒性評価に適した動物種であることが確認された。ラットは試験施設で使用される標準のモデルであるため、GLP適用毒性試験の動物種にラットを選択した。免疫応答は、GLP適用反復投与毒性試験に使用予定の試験材料を用いたラットの追加のGLP非適用試験（TT #[redacted]-1007）[2.6.6.8.4 項]でも確認した。

2.6.6.8.1　ラットを用いた探索的3週間筋肉内投与免疫原性及び毒性試験並びに3週間回復性試験（TT #[redacted]-1017）

本試験の目的は、ラットにV116を3週間の間隔で2回筋肉内投与し、その後3週間の休薬期間を設けた際の免疫原性及び毒性を評価することであった[2.6.7.17 項]。

Crl:WI(Han)ラットを2群（各群雌雄各20匹）に割り付け、V116群には総PnPs 42 µg/回の用量でV116製剤（初期製剤）を、対照群にはカルシウム及びマグネシウムを含まないPBSを投与した。投与容量は1回あたり0.5 mLとした。V116製剤の総PnPsは84.0 µg/mL（21の血清型の設定濃度は各4 µg/mL）であった。なお、この初期製剤には、GLP適用毒性試験（TT #[redacted]-6020及びTT #[redacted]-9019）で用いた市販予定製剤に含まれる血清型6Aではなく、血清型6Cが含まれていた（[2.6.7.4 項]参照）。各群雌雄各10匹を試験25日（2回目の投与後3日）に毒性評価のために剖検し、残りの各群雌雄各10匹を試験43日（3週間の休薬期間終了後）に回復性評価のために剖検した。

毒性は、生死、一般状態、体重並びに限定的（心臓、投与部位及び流入領域リンパ節）な肉眼的病理検査及び病理組織学的検査に基づき評価した。V116群及び対照群の回復性評価に割り付けた動物から血清を採取し、電気化学発光免疫測定法により免疫原性（抗 V116抗体）を評価した。

生前検査、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査に V116の投与に関連した変化は認められなかった。免疫原性測定法のためのスクリーニング検査を実施したところ、全ての測定結果で測定法として許容可能な性能を示した。しかしながら、ラットの検体で測定されたほとんどの血清型の免疫原性のレベルは、GLP 適用の毒性試験で使用する動物種の適切性確認又は測定法の性能確認としては不十分であった。本試験では V116の明らかな曝露がなかったことを考えると、本試験の毒性評価項目における成績の意義は限定的である。

2.6.6.8.2　ラットを用いた探索的10週間筋肉内投与免疫原性試験（TT #[redacted]-1012）

本試験の目的は、2種の V116製剤をラットに3週間の間隔で最大4回筋肉内投与した際の免疫原性を評価することであった[2.6.7.17 項]。この GLP 非適用免疫原性試験は、GLP 適用毒性試験における適切な動物種の選択と免疫原性測定法の性能に適した検体採取を確認するために実施した。

Crl:WI(Han)ラットを4群（各群雌雄各5匹）に割り付け、対照群にはカルシウム及びマグネシウムを含まない PBS、V116群には V116製剤単独又は APA を含む V116製剤を投与した[表 2.6.6-2]。

表 2.6.6-2　ラットを用いた探索的 10 週間筋肉内投与免疫原性試験の試験デザイン

群	被験物質	投与日	免疫原性評価のための検体採取日
1	カルシウム及びマグネシウムを含まない PBS	試験1、22、43、64日	投与前、試験15、43、78日
2	APA を含む V116 製剤 総 PnPs 42 µg/回	試験1、22日	投与前、試験43日
3	V116 製剤 総 PnPs 42 µg/回	試験1、22日	投与前、試験43日
4	V116 製剤 総 PnPs 42 µg/回	試験1、22、43、64日	投与前、試験15、43、78日
試験15日：初回投与の2週間後、試験43日：2回目投与の3週間後、試験78日：最終投与（試験64日）の2週間後			

V116製剤の総 PnPs は84.0 µg/mL（21の血清型の設定濃度は各4 µg/mL）であった。なお、この初期製剤には、GLP 適用毒性試験（TT #[redacted]-6020及び TT #[redacted]-9019）で用いた市販予定製剤に含まれる血清型6A ではなく、血清型6C が含まれていた（[2.6.7.4 項]参照）。第2群の動物には、アルミニウム量として250 µg/mL の APA を含む V116製剤を投与した。投与容量は1回あたり0.5 mL（左右の大腿四頭筋に各0.25 mL）とした。

動物の生死、一般状態及び体重の変化を評価し、投与前、試験15、43、及び78日に採取した血

清検体中の抗 PnPs 抗体の有無を評価した。

全ての動物は計画された屠殺日まで生存し、被験物質の投与に関連した一般状態及び体重変化は認められなかった。

V116は、雌雄ラットにおいて、V116ワクチンに含まれる血清型に対する特異的な抗体産生を誘導した。APA を含む V116製剤を投与したラット（第2群）では、試験43日の抗体陽性率は全てのV116血清型について40%から100%の範囲であった。V116製剤を単独で投与した群では、血清型間で抗体陽性率にばらつきがあり、試験15及び43日では0%から100%、試験78日では10%から100%の範囲であった。抗体陽性率は血清型23A、12F 及び23B で低く、第3及び4群のこれらの血清型の抗体陽性率は試験15、43及び78日で0%から30%の範囲であった。対照群（第1群）及び投与前の少数の検体で抗体陽性を示したが、これらの検体の抗体価は陰性上限を僅かに上回る程度であり、陰性上限を僅かに上回るシグナルとノイズの境界レベルに関連している可能性がある。対照群及び投与前の検体における低い陽性反応に生物学的な意義はないと考えられた。

動物への投与後に残った V116製剤及び APA を含む V116製剤中に存在する個々の血清型の総 PnPs 濃度を測定したところ、測定上の既知の変動を考慮すると、各血清型の設定濃度の4 µg/mL と一致していた。

以上、V116製剤の投与はラットで良好な忍容性を示し、意図した免疫応答を誘導した。

2.6.6.8.3　マウスを用いた探索的7週間筋肉内投与免疫原性試験（TT #[redacted]-1013）

本試験の目的は、V116製剤をマウスに3週間の間隔で3回筋肉内投与し、その後3週間の休薬期間を設けた際の免疫原性を評価することであった[2.6.7.17 項]。この GLP 非適用免疫原性試験は、GLP 適用毒性試験における適切な動物種の選択と免疫原性測定法の性能に適した検体採取を確認するために実施した。

Crl:CD1(ICR)マウスを2群（各群雌雄各10匹）に割り付け、V116群には総 PnPs 8.4 µg/回の用量で V116製剤を、対照群にはカルシウム及びマグネシウムを含まない PBS を投与した。V116製剤の総 PnPs は84.0 µg/mL（21の血清型の設定濃度は各4 µg/mL）であった。なお、この初期製剤には、GLP 適用毒性試験（TT #[redacted]-6020及び TT #[redacted]-9019）で用いた市販予定製剤に含まれる血清型6A ではなく、血清型6C が含まれていた（[2.6.7.4 項]参照）。投与容量は1回あたり0.1 mL（左右の大腿四頭筋に各0.05 mL）とした。

動物の生死、一般状態及び体重変化を評価し、試験64日に採取した血清検体中の抗 PnPs 抗体の有無を評価した。

全ての動物は計画された屠殺日まで生存し、被験物質の投与に関連した一般状態及び体重変化は認められなかった。

V116は、雌雄マウスにおいて、V116ワクチンに含まれる血清型に対する特異的な抗体産生を誘

導した。試験64日の抗体陽性率は、血清型10A 及び23B でそれぞれ35%及び60%であったものの、その他の血清型では90%から100%の範囲であった。この結果により、V116ワクチンで意図する免疫応答がマウスで誘導されることが実証された。対照群の少数の検体で抗体陽性を示したが、これらの検体の抗体価は陰性上限を僅かに上回る程度であり、陰性上限を僅かに上回るシグナルとノイズの境界レベルに関連している可能性がある。対照群の検体における低い陽性反応に生物学的な意義はないと考えられた。

以上、V116製剤の投与はマウスで良好な忍容性を示し、意図した免疫応答を誘導した。

2.6.6.8.4　ラットを用いた探索的単回筋肉内投与免疫原性試験（TT #[redacted]-1007）

本試験の目的は、雌雄ラットに V116を単回筋肉内投与した際の免疫原性を評価することであった[2.6.7.17 項]。この GLP 非適用免疫原性試験は、GLP 適用毒性試験に使用する試験材料を用いてラットで V116に対する抗体産生が誘導されることを確認するために実施した。

1群のみの構成で、10又は11週齢の Crl:WI(Han)ラット雌雄各5匹を割り付け、総 PnPs 42 µg/回の用量で V116製剤（21の血清型の設定濃度は各4 µg/mL[2.6.7.4 項]）を1回あたり0.5 mL（左右の大腿四頭筋に各0.25 mL）の投与容量で投与した。

動物の生死を評価し、試験15日に採取した血清検体中の抗 PnPs 抗体の有無を評価した。血清検体を採取後に全ての動物を屠殺し、剖検は実施しなかった。

ラットで十分な免疫応答が認められ、ラットが GLP 適用毒性試験に適した動物種であることが裏付けられた。

2.6.6.9　考察及び結論

マウス（TT#[redacted]-1013）及びラット（TT#[redacted]-1017、TT#[redacted]-1012及び TT#[redacted]-1007）を用いた GLP 非適用の免疫原性試験、並びにラットを用いた GLP 適用の反復筋肉内投与毒性試験（TT#[redacted]-6020）で V116を検討した。GLP 非適用免疫原性試験及び GLP 適用反復投与毒性試験で V116に特異的な免疫応答が認められたことから、ラット及びマウスはいずれも適切な動物種であると考えられた。GLP 適用反復投与毒性試験では、体重換算で臨床用量（総 PnPs 84 µg/回）の100倍に相当する用量（総 PnPs 42 µg/回）を投与しても、V116の投与に関連した毒性所見は認められなかった。

ラットを用いた GLP 適用生殖発生毒性試験（TT#[redacted]-9019）を実施し、V116（総 PnPs 42 µg/回）を F_0母動物の妊娠前、妊娠期及び授乳期に筋肉内投与し、F_1世代に及ぼす影響を評価するとともに V116の免疫原性を F_0母動物と F_1世代（胎児及び出生児）の双方で評価した。F_0母動物において、V116の忍容性は良好であり、V116の投与に関連すると考えられる一般状態の変化及び死亡は認められなかった。また、評価した卵巣、子宮、同腹児、自然分娩、胎児及び出生児のいずれのパラメータにも V116の投与に関連する影響は認められなかった。全体として、V116の投与により、

世代間で免疫応答が維持された。この生殖発生毒性試験の全般的なデータに基づくと、体重換算で臨床用量（総 PnPs 84 µg/回）の100倍に相当する用量（総 PnPs 42 µg/回）を投与しても、V116は交尾及び受胎能、並びに胚・胎児及び出生児の発生に影響を及ぼさなかった。

ラットとヒトにおける用量比の概要を[表 2.6.6-3]に示す。

表 2.6.6-3　ラットとヒトにおける用量比

試験の種類	種	体重（kg）	総 PnPs 量（µg）	総 PnPs 量／体重（µg/kg）	PnPs 量比 [a]
反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験	ヒト	60	84[a]	1.4	NA
	ラット	0.3	42	140	100倍

NA：該当せず
[a] V116の臨床用量［21種類の血清型 PnPs（3、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、15A、deOAc15B、16F、17F、19A、20、22F、23A、23B、24F、31、33F 及び35B）を各4 µg 含有］に基づく用量比

V116の毒性プロファイルは十分に評価されており、非臨床試験成績は肺炎球菌結合型ワクチンとしての V116の製造販売承認申請を支持する。

2.6.6.10　参考文献

参考文献は、[1.12 項]の「4.3 参考文献」に示した。

目次

頁
2.6.7　毒性試験概要表 2
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 2
2.6.7.2　トキシコキネティクス試験 4
2.6.7.3　トキシコキネティクス試験成績 4
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 5
2.6.7.5　単回投与毒性試験 11
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 12
2.6.7.7.A　ラットを用いた3週間筋肉内投与毒性試験及び4週間回復性試験 12
2.6.7.8　In vitro 遺伝毒性試験 16
2.6.7.9　In vivo 遺伝毒性試験 16
2.6.7.10　がん原性試験 16
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 16
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 16
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験 17
2.6.7.13.A　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験 17
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 24
2.6.7.15　生殖発生毒性試験：新生児を用いた試験 24
2.6.7.16　局所刺激性試験 24
2.6.7.17　その他の毒性試験 25

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Test Article: V116

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (µg/dose)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-Dose Toxicity								
3-week toxicity with a 4-week treatment-free period	Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Injection administered once every 3 weeks on SD 1 and 22	0, 42	Yes[b]	Merck - France	TT #[redacted]-6020	[4.2.3.2.1: TT[redacted]6020] 評価資料
Reproductive and Developmental Toxicity								
Embryo-fetal and preweaning developmental toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Injection administered 28 and 7 days prior to cohabitation (SD 1 and 22), GD 6 and LD 7	0, 42	Yes[b]	[redacted] - U.S.A.	TT #[redacted]-9019	[4.2.3.5.2.1: TT[redacted]9019] 評価資料
Other Toxicity								
Exploratory 3-week toxicity and immunogenicity followed by a 3-week treatment-free period	Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Injection administered twice 3 weeks apart on SD 1 and 22	0, 42[c]	No	Merck - U.S.A.	TT #[redacted]-1017	[4.2.3.7.7.1: TT[redacted]1017] 参考資料
Exploratory 10-week immunogenicity	Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Injection administered as follows: DG 2 and 3 were dosed on SD 1 and 22 for a total of 2 doses; DG 1 and 4 were dosed on SD 1, 22, 43 and 64 for a total of 4 doses	0, 42[d]	No	Merck - U.S.A.	TT #[redacted]-1012	[4.2.3.7.7.2: TT[redacted]1012] 参考資料
Exploratory 7-week immunogenicity	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	IM	Injection administered once every 3 weeks (SD 1, 22 and 43)	0, 8.4	No	Merck - U.S.A.	TT #[redacted]-1013	[4.2.3.7.7.3: TT[redacted]1013] 参考資料

Confidential

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: V116

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (µg/dose)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Other Toxicity, Continued								
Exploratory single-dose immunogenicity	Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Injection administered once on SD 1	42	No	Merck - U.S.A.	TT #[redacted]-1007	[4.2.3.7.7.4: TT[redacted]1007] 参考資料

APA=aluminum phosphate adjuvant; [redacted] - U.S.A.=[redacted], U.S.A.; DG=dose group; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; IM=intramuscular; LD=lactation day; Merck - France=Laboratories Merck Sharp & Dohme-Chibret, France; Merck - U.S.A.=Merck Research Laboratories, U.S.A.; NOAEL=no observed adverse effect level; SD=study day; PBS=phosphate buffered saline.

[a] The NOAEL is underlined.
[b] GLP with the exception of the stability/compatibility testing and immunogenicity component.
[c] Not determined due to lack of immunogenicity.
[d] DG 1 (control group) administered PBS, DG 2 administered 42 µg/dose V116 and 125 µg APA/dose, and DGs 3 and 4 administered 42 µg/dose V116.

C Confidential

2.6.7.2　トキシコキネティクス試験

No toxicokinetics studies have been conducted for V116. This is consistent with the WHO's Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines (2005) and Ministry of Health, Labour and Welfare's Guideline for Non-clinical Studies of Vaccines for Preventing Infectious Diseases which indicate that toxicokinetic studies (e.g., for determining serum or tissue concentrations of vaccine components) are not needed for vaccines that do not include a novel adjuvant or are not administered via an alternate route of administration.

2.6.7.3　トキシコキネティクス試験成績

No samples for toxicokinetic analyses have been collected for V116 (see [2.6.7.2 項]).

C Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: V116

Batch Number	Specifications	Actual Results		Study Number	Type of Study
[redacted] (84 µg/mL PnPs)	[redacted]	Ps Serotype 3: [redacted] µg/mL Ps Serotype 6A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 7F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 8: [redacted] µg/mL Ps Serotype 9N: [redacted] µg/mL Ps Serotype 10A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 11A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 12F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 15A: [redacted] µg/mL Ps Serotype deOAc15B: [redacted] µg/mL	Ps Serotype 16F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 17F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 19A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 20: [redacted] µg/mL Ps Serotype 22F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 23A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 23B: [redacted] µg/mL Ps Serotype 24F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 31: [redacted] µg/mL Ps Serotype 33F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 35B: [redacted] µg/mL	TT #[redacted]-6020 [4.2.3.2.1: TT[redacted]6020] 評価資料 TT #[redacted]-1007 [4.2.3.7.7.4: TT[redacted]1007] 参考資料	Repeat-Dose Toxicity Other Toxicity
	[redacted]				

CRM_{197}=cross reactive material 197; [redacted]; PnPs=pneumococcal polysaccharides; Ps=polysaccharides.

Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: V116

Batch Number	Specifications	Actual Results		Study Number	Type of Study
[redacted] (168 µg/mL PnPs)	[redacted]	Ps Serotype 3: [redacted] µg/mL Ps Serotype 6A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 7F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 8: [redacted] µg/mL Ps Serotype 9N: [redacted] µg/mL Ps Serotype 10A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 11A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 12F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 15A: [redacted] µg/mL Ps Serotype deOAc15B: [redacted] µg/mL	Ps Serotype 16F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 17F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 19A: [redacted] µg/mL Ps Serotype 20: [redacted] µg/mL Ps Serotype 22F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 23A: [redacted] g/mL Ps Serotype 23B: [redacted] µg/mL Ps Serotype 24F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 31: [redacted] µg/mL Ps Serotype 33F: [redacted] µg/mL Ps Serotype 35B: [redacted] µg/mL	TT #[redacted]-9019 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]9019] 評価資料	Reproductive and Developmental Toxicity

C Confidential

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: V116

Batch Number	[redacted] Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
[redacted] (168 µg/mL PnPs) (Cont.)	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-9019 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]9019] 評価資料	Reproductive and Developmental Toxicity

CRM_{197}=cross reactive material 197; [redacted]; PnPs=pneumococcal polysaccharides; Ps=polysaccharides; [redacted].

C Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: V116

Batch Number	Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
[redacted] (84 µg/mL PnPs)	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-1017 [4.2.3.7.7.1: TT[redacted]1017] 参考資料	Other Toxicity

CRM_{197}=cross reactive material 197; [redacted]; PnPs=pneumococcal polysaccharides.

Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: V116

Batch Number	Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
(84 µg/mL PnPs)			TT #-1012 [4.2.3.7.7.2: TT 1012] 参考資料 TT #-1013 [4.2.3.7.7.3: TT 1013] 参考資料	Other Toxicity

CRM_{197}=cross reactive material 197; ; PnPs=pneumococcal polysaccharides.

Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: V116

Batch Number	[redacted] Specifications	Actual Results	Study Number	Type of Study
[redacted] (84 µg/mL PnPs with 250 µg/mL APA)	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-1012 [4.2.3.7.7.2: TT[redacted]1012] 参考資料	Other Toxicity

APA=aluminum phosphate adjuvant; CRM_{197}=cross reactive material 197; [redacted]; PnPs=pneumococcal polysaccharides.

C Confidential

2.6.7.5　単回投与毒性試験

No single-dose toxicity studies were conducted (see [2.6.6.2　項]).

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

No non-pivotal repeat-dose toxicity studies have been conducted.

C Confidential

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.A　ラットを用いた3週間筋肉内投与毒性試験及び4週間回復性試験

Study Title: Twenty-Two Day Intramuscular Toxicity Study in Rats Followed by a 4-Week Treatment-Free Period (TT #[redacted]-6020)		Test Article: V116
Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** ~ 11 weeks **Date of First Dose:** [redacted]20[redacted] **Dose Volume:** 0.5 mL/animal/dose (divided equally into the right and left quadriceps at a volume of 0.25 mL per injection site) **Test Article:** 42 µg PnPs / 0.5 mL formulation[b] **Control Article:** PBS	**Duration of Dosing:** 3 weeks (single injection each on SD 1 and 22) **Duration of Postdose:** 4 weeks **Method of Administration:** Intramuscular injection **Vehicle/Formulation:** V116 formulation [2.6.7.4 項]	**Study Number:** TT #[redacted]-6020 **Location in CTD:** [4.2.3.2.1: TT[redacted]6020] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special Features: None **No Observed Adverse Effect Level:** 42 µg/dose		

Dose (µg/dose)	0 (Control)		42[b]	
Number of Animals	F:16[c]	M:16[c]	F:16[c]	M:16[c]
Noteworthy Findings				
Mortality (Number of Animals)	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight (%)[d]	233.3 g	427.8 g	3.17	-2.10
Body Weight Change (%)[d]	23.0 g	69.6 g	1.73	-6.18
Food Consumption (%)[d]	15.2 g	21.7 g	3.29	-1.84
Body Temperature	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations (SW 4)	-	-	-	-
Clinical Pathology Evaluations				
Hematology (SD 4, 25, 50)	-	-	-	-
Coagulation (SD 25, 50)	-	-	-	-
Serum Biochemistry (SD 4, 25, 50)	-	-	-	-

2.6.7.7.A ラットを用いた 3 週間筋肉内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-6020

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (Control)		42	
Number of Animals	F:16	M:16	F:16	M:16
Noteworthy Findings, Continued				
Special Chemistry				
IL-6 (Dosing and Treatment-Free Phases on SD 2, 23, 29)	-	-	-	-
AGP (Treatment-Free Phase on SD 25, 29)	-	-	-	-
A2M (Treatment-Free Phase on SD 25, 29)	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry (SD 4, 25, 50)	-	-	-	-
Organ weights	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-
Final Necropsy Histomorphology (Incidence)				
Number of Animals	F:10[c]	M:10[c]	F:10[c]	M:10[c]
Site, Injection, Intramuscular, Hindlimb, Left				
Muscle, Inflammation, Focal[e] - minimal	5/10	6/10	6/10	6/10
- mild	0/10	0/10	3/10	3/10
Site, Injection, Intramuscular, Hindlimb, Right				
Muscle, Inflammation, Focal[e] - minimal	4/10	5/10	7/10	6/10
- mild	-	1/10	-	2/10
Subcutis, Infiltrate, lymphocyte focal[e] - minimal	0/10	-	1/10	-
Spleen	-	-	-	-
Thymus				
Hemorrhage	-	0/10	-	1/10

2.6.7.7.A ラットを用いた 3 週間筋肉内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-6020

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (Control)		42	
Noteworthy Findings, Continued				
Final Necropsy Histomorphology (Incidence), Continued				
Number of Animals	F:10[c]	M:10[c]	F:10[c]	M:10[c]
Lymph Node, Mesenteric and Mandibular	-	-	-	-
Lymph Node, Inguinal, Left	-	-	-	-
Lymph Node, Inguinal, Right	-	-	-	-
Lymph Node, Iliac, Left	-	-	-	-
Lymph Node, Iliac, Right				
Erythrocytes, Accumulation	-	1/10	-	1/10
Treatment-Free Necropsy Histomorphology				
Number of Animals	F:6[c]	M: 6[c]	F: 6[c]	M: 6[c]
Site, Injection, Intramuscular, Hindlimb, Left	-	-	-	-
Site, Injection, Intramuscular, Hindlimb, Right	-	-	-	-
Lymph Node, Inguinal, Left	-	-	-	-
Lymph Node, Inguinal, Right	-	-	-	-
Lymph Node, Iliac, Left	-	-	-	-
Lymph Node, Iliac, Right	-	-	-	-
Immunogenicity[f]				
SD 15	-	-	P	P
SD 36	-	-	P	P

(footnotes presented on the following page)

C Confidential

2.6.7.7.A ラットを用いた 3 週間筋肉内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-6020

Test Article: V116

A2M=alpha-2-macroglobulin; AGP=alpha-1-acid glycoprotein; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; IL-6=interleukin-6; M=male; P=present; PBS=phosphate buffered saline; PnPs=pneumococcal polysaccharides; SD=study day; SW=study week; -=no noteworthy findings.

[a] GLP compliant with the exception of in use stability/compatibility testing, and antidrug antibodies which were performed using a non-GLP assay.

[b] Target serotype concentrations: 4 µg/mL PnPs for each of serotypes 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, deOAc15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F, and 35B), formulated in 0.1% (w/v) polysorbate 20, 150 mM sodium chloride, 20 mM histidine, pH 5.8.

[c] The first 10 rats/sex/group were designated for the final necropsy on SD 25 (3 days after the last dose). The last 6 rats/sex/group were designated for the treatment-free necropsy on SD 50 (4 weeks after the last dose).

[d] At the end of the dosing period. For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.

[e] Findings were similar in nature and severity between control and V116 group animals and consistent with those associated with intramuscular injections, and therefore were not attributed to V116.

[f] V116 induced a specific antibody response in both male and female rats against most serotypes following 1 or 2 doses (SD 1 and SD 22), which remained constant or increased over time (SD 15 and SD 36). The proportion of animals that generated a V116-specific antibody response on SD 36 was between 42% and 100% across all serotypes, except serotypes 12F (17%), 24F (8%), and 23A (33%).

C Confidential

2.6.7.8　In vitro 遺伝毒性試験

The genetic toxicity/mutagenic potential of the V116 vaccine was not evaluated (see [2.6.6.4　項]).

2.6.7.9　In vivo 遺伝毒性試験

The genetic toxicity/mutagenic potential of the V116 vaccine was not evaluated (see [2.6.6.4　項]).

2.6.7.10　がん原性試験

The carcinogenic potential of the V116 vaccine has not been evaluated (see [2.6.6.5　項]).

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

No non-pivotal reproductive and developmental toxicity studies have been conducted.

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

No stand-alone fertility and early embryonic development studies have been conducted. The potential effects of V116 on fertility and embryonic development toxicity were assessed in a GLP reproductive toxicity study [2.6.7.13.A　項] in which rats were administered a single V116 injection on 28 and 7 days prior to cohabitation with untreated males (Study Days 1 and 21, respectively), and on Gestation Day 6 and Lactation Day 7.

C Confidential

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験

2.6.7.13.A　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験

Study Title: A Reproductive Toxicity Study of a Vaccine Administered by Intramuscular Injection to Wistar Han Rats (TT #[redacted]-9019)		Test Article: V116
Species/Strain: Rat/Crl:WI (Han) **Initial Age (at initiation of dosing):** 69-70 days **Date of First Dose:** [redacted]20[redacted] **Dose Volume:** 0.25 mL / dose (single IM injection into a single quadricep) **Test Article:** 84 µg PnPs / 0.5 mL formulation[b] **Control Article:** PBS	**Duration of Dosing:** 28 and 7 days prior to cohabitation with untreated males, GD 6, LD 7 **Duration of Postdose:** N/A **Method of Administration:** IM injection **Vehicle/Formulation:** V116 formulation [2.6.7.4 項]	**Study Number:** TT #[redacted]-9019 **Location in CTD:** [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]9019] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special features: Assessment of immunogenicity determined for V116 on F_0 females predose (Cohort 1 and 2), on GD 21 (Cohort 1 - caesarean section group), and LD 21 (Cohort 2 - natural delivery group); as well as, F_1 fetuses on GD 21 (5 litters/group), and F_1 pups on PND 21 (2 pups/sex/litter/group) from females for which anti-V116 antibodies were determined.		
NOAEL: 42 µg/dose. No V116 related maternal toxicity was observed. Non-adverse transient swelling in the hindlimb following the GD 6 dose (on GD 6 and/or 7) was noted in both PBS control and V116-treated females. Given the lack of meaningful difference in incidence and similarity of nature and severity of the finding between the PBS and V116 groups, this was considered procedure-related. There were no V116-related effects on any ovarian, uterine, and litter, natural delivery, fetal, or pup parameters evaluated.		

Dose (µg/dose)	0 (PBS Control)	42
Total Number of Animals	F:44	F:44
Number of F_0 dams designated for caesarean section on GD 21 (Cohort 1)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 1)	F:18/4	F:17/5
Number of F_0 dams designated for natural delivery (Cohort 2)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 2)	F:18/4	F:16/6
Noteworthy Findings		
F_0 Mortality (No. of Animals)	0	1[c]
F_0 Maternal Premating, Gestation, or Lactation Body Weight	-	-
F_0 Maternal Premating, Gestation, or Lactation Body Weight Gain	-	-
F_0 Maternal Premating, Gestation, and Lactation Food Consumption	-	-
F_0 Clinical Observations		
Swollen, Hindlimb, Left – GD 5-7, Cohorts 1 and 2 Combined[h]	11/42	18/41
F_0 Dermal Scoring of Injection Sites	-	-

2.6.7.13.A ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-9019

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (PBS Control)	42
Number of F_0 dams designated for caesarean section on GD 21 (Cohort 1)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 1)	F:18/4	F:17/5
Number of F_0 dams designated for natural delivery (Cohort 2)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non- Pregnant (Cohort 2)	F:18/4	F:16/6
Noteworthy Findings, Continued		
F_0 Macroscopic Necropsy Observations[e] (Cohort 1, GD 21)	-	-
F_0 Macroscopic Necropsy Observations[e] (Cohort 2, PND 21)	-	-
F_0 Reproductive Performance (Cohort 1 and 2 Combined)		
Mated Females/Paired Females	42/44	41/44
Pre-coital Interval (Days)	2.6	2.6
Female Mating Index (%)	95.5	93.2
Female Fertility Index (%)	85.7	80.5
Female Pregnancy Index (%)	81.8	75.0
F_0 Cohort 1 – Ovarian and Uterine Observations (GD 21)		
F_0 Reproductive Performance		
Female with Live Fetuses/Group Size	18/22	17/22
No. Corpora Lutea (Mean)	12.4	13.5
No. Implantations (Mean)	10.5	10.6
% Pre-implantation Loss (Mean)	16.04	21.58
Total Number of Resorptions (Mean)	0.6	0.5
Number of Early Resorptions (Mean)	0.5	0.5
Number of Late Resorptions (Mean)	0.1	0.0

2.6.7.13.A ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-9019

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (PBS Control)	42
Number of F_0 dams designated for caesarean section on GD 21 (Cohort 1)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 1)	F:18/4	F:17/5
Number of F_0 dams designated for natural delivery (Cohort 2)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non- Pregnant (Cohort 2)	F:18/4	F:16/6
Noteworthy Findings, Continued		
F_0 Cohort 1 – Ovarian and Uterine Observations (GD 21), Continued		
F_0 Reproductive Performance, Continued		
% Post-implantation Loss (Mean)	7.63	4.85
Total Number of Live Fetuses (Mean)	9.9	10.1
No. of Live Female Fetuses (Mean)	4.7	5.3
No. of Live Male Fetuses (Mean)	5.2	4.8
Total Number of Dead Fetuses	0	0
Live Male Fetus/Litter (%)	55.83	49.64
Gravid Uterine Weights (%)[d]	70.04 g	0.385
Mean Fetal Body Weights (%)[d]	5.268 g	-2.696
Mean Fetal Weight Females (%)[d]	5.019 g	-0.618
Mean Fetal Weight Males (%)[d]	5.435 g	-3.349
Gross Placental Morphology	-	-

C Confidential

2.6.7.13.A ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-9019

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (PBS Control)	42
Number of F_0 dams designated for caesarean section on GD 21 (Cohort 1)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 1)	F:18/4	F:17/5
Number of F_0 dams designated for natural delivery (Cohort 2)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 2)	F:18/4	F:16/6
Noteworthy Findings, Continued		
F_1 Cohort 1 Prenatal Developmental Toxicity		
Fetal Morphology		
No. of Fetuses Examined (Live/Dead) Externally	179/0	172/0
No. of Fetuses Examined (Live/Dead) Fresh Viscerally	84/0	80/0
No. of Fetuses Examined (Live/Dead) Fixed Viscerally (Head)[f]	84/0	80/0
No. of Fetuses Examined (Live/Dead) Skeletally[f]	95/0	92/0
Fetal External Examinations	-	-
Fetal Gross Visceral Examinations	-	-
Fetal Fixed Visceral Head Examination	-	-
Fetal Skeletal Examinations (Malformations/Variations/Ossifications)	-	-
F_0 Cohort 2 - Natural Delivery and Litter Observations (LD 21)		
No. of Females Pregnant/Group Size	18/22	16/22
Gestation Index (%)	100	100
No. of Females with Liveborn Pups	18	16
No. of Females with Stillborn Pups	0	0
No. of Liveborn Pups (Mean)	10.3	10.2
% Live Birth Index (Mean)	100.0	100.0

2.6.7.13.A　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-9019

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (PBS Control)	42
Number of F_0 dams designated for caesarean section on GD 21 (Cohort 1)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 1)	F:18/4	F:17/5
Number of F_0 dams designated for natural delivery (Cohort 2)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 2)	F:18/4	F:16/6
Noteworthy Findings, Continued		
F_0 Cohort 2 - Natural Delivery and Litter Observations (LD 21), Continued		
% Post-Implantation Loss/Litter (Mean)	9.30	3.41*
% Live Male Pups/Litter (Mean)	49.53	44.48
Total Implantation Sites (Mean)	11.5	10.7
Days of Gestation Length (Mean)	21.3	21.4
% Pup Viability Index (Mean)	99.07	97.92
% Lactation Index (Mean)	98.61	100.0
Maternal Observations (PND 0 to 21) – No. Affected		
Grooming of pups	-	-
Nesting activity	-	-
Nursing activity	-	-
F_1 Cohort 2 – Pup Assessments (PND 1 to 21)		
Pup Clinical Observations (PND 1 to 21)	-	-
Mean Pup Body Weight on PND 21		
Female (%)[d]	47.05 g	-2.80
Male (%)[d]	47.72 g	-1.40

2.6.7.13.A　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-9019

Test Article: V116

Dose (µg/dose)	0 (PBS Control)	42
Number of F_0 dams designated for caesarean section on GD 21 (Cohort 1)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 1)	F:18/4	F:17/5
Number of F_0 dams designated for natural delivery (Cohort 2)	F:22	F:22
Number of F_0 dams Pregnant/Non-Pregnant (Cohort 2)	F:18/4	F:16/6
Noteworthy Findings, Continued		
F_1 Cohort 2 – Pup Assessments (PND 1 to 21), Continued		
Preweaning reflex and physical development		
Assessment of Auditory Startle (PND 21, Percent that passed)	100	100
Assessment of Pupil Constriction (PND 21, Percent that passed)	100	100
Assessment of Surface Righting (Mean PND of achieving the criterion)	2.8	2.8
Assessment of Air Righting (Mean PND of achieving the criterion)	15.9	15.3
Immunogenicity		
F_0 Females, F_1 Fetuses, F_1 Pups[g]	-	P

(footnotes presented on the following page)

Confidential

2.6.7.13.A　ラットを用いた受胎能、胚・胎児の発生及び出生児の離乳前の発生に関する試験（続き）

Study No.: TT #[redacted]-9019

Test Article: V116

F=female; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; IM=intramuscular; LD=lactation day; N/A=not applicable; No.=number; NOAEL=no observed adverse effect level; P=present; PBS=phosphate buffered saline; PND=postnatal day; PnPs=pneumococcal polysaccharides; - =no noteworthy findings; *p≤0.05.
Female Mating Index=no. of females with evidence of mating (or no confirmed mating date and pregnant)/no. of females paired.
Female Fertility Index=no. of pregnant females/no. of females with evidence of mating (or no confirmed mating date and pregnant).
Female Pregnancy Index=no. of pregnant females/no. of females paired.
Gestation Index = (no. of animals with live offspring/no. of animals pregnant) × 100.
% Live Birth Index = (no. of liveborn pups on PND 1/no. of newborn pups) × 100.
% Pre-implantation Loss = ([no. of corpora lutea – no. of implantations]/no. of corpora lutea) × 100.
% Post-implantation Loss = ([no. of implantations – no. of live fetuses]/no. of implantations) × 100.
% Live Male Pups = (no. of male pups/no. of pups) × 100.
% Pup Viability Index = [no. of live pups on PND 4 (preculling)/no. of liveborn pups on PND 1] × 100.
% Lactation Index = [no. of live pups on PND 21/no. of live pups on PND 4 (postculling)] × 100.

[a] GLP compliant with the exception that the immunogenicity analysis assessment and test article stability and compatibility testing.

[b] Target serotype concentrations: 8 µg/mL PnPs for each of serotypes 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, deOAc15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F, and 35B), formulated in 0.1% (w/v) polysorbate 20, 150 mM sodium chloride, 20 mM histidine, pH 5.8.

[c] One F_0 Cohort 2 female in the V116-treated group, died during LD 21 blood collection. This death was not considered V116-related because it was the only death on study and it appeared to be secondary to the blood collection process.

[d] For controls, group means are shown. For dose group, percent differences from controls are shown.

[e] Limited to examination of the thoracic, abdominal, and pelvic viscera.

[f] Approximately one-half of the fetuses in each litter were examined for visceral abnormalities. Each fetus was fixed, and the head was subsequently examined by free-hand sectioning. The remaining one-half of the fetuses in each litter were retained and examined for skeletal abnormalities.

[g] F_0 females in the V116-treated group showed a significant increase (>3-fold) in immune responses from predose to postdose for a majority of the serotypes, and F_1 fetus and F_1 pup groups showed similar trends, demonstrating immune responses over generations.

[h] All but one of these observations occurred on GD 6 following dose administration and/or on the following day (GD 7). Given the similarity of nature/severity, lack of meaningful difference in incidence between PBS and V116 group and the transient nature (noted only following GD6 injection), sponsor is of the opinion that this finding is related to the experimental procedure (IM injection) and unrelated to V116 administration.

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

No stand-alone pre- and postnatal development, including maternal function studies have been conducted.　The potential effects of V116 on pre- and postnatal development and maternal toxicity of V116 were assessed in a GLP reproductive toxicity study [2.6.7.13.A 項] in which rats were administered a single V116 injection on 28 and 7 days prior to cohabitation with untreated males (study days 1 and 21, respectively), and on gestation day 6 and lactation day 7.

2.6.7.15　生殖発生毒性試験：新生児を用いた試験

Studies in which the offspring (juvenile animals) are dosed and further evaluated have not been performed, since there was no target organ toxicity or systemic toxicity relevant for developing organs in nonclinical studies [2.6.6.3.1 項]

2.6.7.16　局所刺激性試験

No stand-alone local tolerance studies have been conducted (see [2.6.6.7 項]).

C Confidential

2.6.7.17　その他の毒性試験

Test Article: V116

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (µg/dose)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Twice 3 weeks apart (SD 1 and 22)	0, 42	F/20, M/20	No test-article-related adverse antemortem or postmortem findings. Specific immune response to V116 was not demonstrated [a].	TT #[redacted]-1017 [4.2.3.7.7.1: TT[redacted]1017]
Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Up to 9 weeks; Once every 3 weeks for 2 or 4 doses (SD 1, 22, 43 and 64)	0, 42[b]	F/5, M/5	V116 specific immune response demonstrated.	TT #[redacted]-1012 [4.2.3.7.7.2: TT[redacted]1012]
Mouse/ Crl:CD1(ICR)	IM	Once every 3 weeks for a total of 3 doses (SD 1, 22 and 43)	0, 8.4	F/10, M/10	V116 specific immune response demonstrated.	TT #[redacted]-1013 [4.2.3.7.7.3: TT[redacted]1013]
Rat/ Crl:WI(Han)	IM	Once on SD 1	42	F/5, M/5	V116 specific immune response demonstrated.	TT #[redacted]-1007 [4.2.3.7.7.4: TT[redacted]1007]

APA=aluminum phosphate adjuvant; DG=dose group; F=female; IM=intramuscular; M=male; PBS=phosphate buffered saline; SD=study day.

[a] Additional follow up studies (TT #[redacted]-1012, TT #[redacted]-1013, and TT #[redacted]-1007, further described in [2.4.4.7　項] and [2.6.6.8　項]) were subsequently completed which confirmed immunogenic response in rats and mice.

[b] DG 1 (control group) administered PBS, DG 2 administered 42 µg/dose V116 and 125 µg APA/dose, and DGs 3 and 4 administered 42 µg/dose V116.

C Confidential