第２部（モジュール２）
CTD の概要（サマリー）

2.4　非臨床試験の概括評価

鳥居薬品株式会社

2.4 の略号及び用語の定義一覧

略号

略語	外国語表記	日本語表記
CREST stain	staining with anti-centromere antibody derived from human CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia) patient serum	CREST 染色
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HEK-293	human embryonic kidney cells-293	ヒト胎児由来腎臓上皮細胞-293
HPBL	human peripheral blood lymphocytes	ヒト末梢血リンパ球
IARC	International Agency for Research on Cancer	国際がん研究機関
IC_{50}	median inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
MN	micronuclei	小核
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PP1	serine/threonine protein phosphatase type 1	セリン／スレオニンプロテインホスファターゼ 1 型
PP2A	serine/threonine protein phosphatase type 2A	セリン／スレオニンプロテインホスファターゼ 2A 型
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*	ネズミチフス菌

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

Verrica Pharmaceuticals Inc.（Verrica 社）は、ポックスウイルスによる感染症である伝染性軟属腫治療のため局所（経皮）適用を目的とした VP-102 外用液剤（0.7% w/v カンタリジン）を開発した。当社は、伝染性軟属腫を適応症とした VP-102（販売名 : YCANTH® (cantharidin) topical solution）を Verrica 社から導入し、当該品から着色剤（ゲンチアナバイオレット）を除いた TO-208 を新有効成分含有医薬品として開発を行っている。カンタリジン（(3aR,4S,7R,7aS)-3a,7a-dimethylhexahydro-4,7-epoxy-2-benzofuran-1,3-dione）は、ツチハンミョウ由来の脂溶性天然化合物であり、伝染性軟属腫及び尋常性疣贅を含む皮膚疾患の治療に数十年にわたり外用剤として広く用いられてきた [1), 2), 3)]。カンタリジンの構造式及びその他の化学的同定に関する情報は 2.6.1 項、図 2.6.1-1 に示している。Verrica 社は、0.7% w/v のカンタリジンを含む VP-102 を製剤として開発した。これは、米国において医師が調合する配合製剤に多くみられるカンタリジン濃度と同じである。TO-208 の投与は、クロスコンタミネーションを最小限に抑え、反復使用時の投与溶液の一貫性を確保し、病巣への塗布の精度を向上させるため、単回使用のアプリケーターを用いる。

2.4.1.1 非臨床試験の概要

ヒトを対象としたカンタリジンの使用実績は豊富であることから、Verrica 社が実施した非臨床試験は限定的である。Verrica 社は、VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いた非臨床の効力を裏付ける試験又は薬物動態試験は実施していないが、これらの特性に関する情報は、公表文献に記載されている試験に基づいて、2.6.2 項及び 2.6.4 項に要約した。当社は、日本国内の承認申請にあたり、カンタリジンの代謝に関する情報が無かったことから、ヒト肝ミクロソーム及び凍結ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験を実施し、2.6.4.5 項に要約した。

医薬品の安全性薬理試験として、ヒト急速活性型遅延整流カリウム遺伝子（hERG）チャネルの阻害試験を、GLP 適用試験として実施し、2.6.2.4 項に要約した。

カンタリジンの安全性プロファイルは、患者への使用実績や動物試験から既に把握されている。VP-102 は外用剤であり、局所適用後の全身暴露がごくわずかであることから、Verrica 社は、外用剤として使用する際の懸念事項に重点を置き、毒性試験を実施した。そのため、Verrica 社はカンタリジンの *in vitro* 遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験、ほ乳類細胞を用いた小核試験）を GLP 適用試験として実施し、2.6.6.4 項に要約した。

カンタリジンの使用実績及び毒性特性は既に把握出来ていることから、反復投与毒性試験、*in vivo* 遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験は実施していない。なお、毒性試験プログラムについて、Verrica 社と米国食品医薬品局（FDA）との面談記録が要約されている 2.6.6.1.1 項を参照されたい。面談記録には、FDA に要求された試験範囲に対応するため、当局との相談内容及び合意が含まれている。

カンタリジンを用いた非臨床安全性試験は、現在の業界標準、FDA 及び医薬品規制調和国際会議（ICH）において作成された医薬品規制に関するガイドライン（ICH M3 (R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals）に含まれている ICH M3 (R2) に従って計画及び実施されている。

安全性試験に使用した医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）グレードの原薬ロットは、2.6.7.4 項に記載した。VP-102 の新薬承認申請を裏付ける非臨床試験プログラムの概要は、表 2.4.1-1 に記載した。

表 2.4.1-1　　VP-102 の非臨床試験の要約

Type of Study	Category	Test Article	Route	Test System	Study Number (GLP Status)
Pharmacology	Safety pharmacology: cardiovascular (hERG assay)	Cantharidin	*In vitro*	hERG-transfected HEK293 cells	[redacted] (GLP)
Toxicology	Genetic toxicity: bacterial reverse mutation assay	Cantharidin	*In vitro*	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and *E. coli* WP2 *uvrA*	[redacted] (GLP)
	Genetic toxicity: mammalian cell chromosomal aberration assay	Cantharidin	*In vitro*	HPBL	[redacted] (GLP)
	Genetic toxicity: mammalian cell micronucleus assay	Cantharidin	*In vitro*	human lymphoblastoid TK6 cells	[redacted] (GLP)

E. coli = *Escherichia coli*; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; HPBL = human peripheral blood lymphocytes; *S. typhimurium* = *Salmonella typhimurium*.

2.4.2 薬理試験

カンタリジンは水疱形成剤として機能し、皮膚に局所適用した場合、水疱形成という薬力学的反応を引き起こす。この重要な薬力学的反応である水疱（適用部位の水疱）形成は、Verrica 社が実施した臨床試験において、VP-102 を投与した被験者の 95%以上で認められている。Verrica 社は、VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いた非臨床の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を実施していない。カンタリジンの外用による皮膚の薬力学的反応（棘融解、免疫刺激活性及び水疱形成を含む）に関与する細胞及び分子レベルの機序は、公表文献に基づいて、2.6.2 項に要約している。TO-208 の正確な作用機序は、2.6.2 項に詳述しているが、以下に要約した機序と軟属腫病巣の治療との関連性がまだ解明されていないため、現時点では不明であると考えられる。

2.6.2.2 項でより詳細に考察されているように、正常皮膚における実験結果から、カンタリジンを局所適用すると、中性セリンプロテアーゼの局所活性化により表皮構造の維持に重要な役割を果たす細胞内表皮デスモソームの破壊が生じ、表皮構造が破壊されることで塗布部位に水疱が形成される可能性がある [4)]。現時点で証明されてはいないが、カンタリジンを伝染性軟属腫病巣に適用すると、病巣下にある表皮が水疱を形成し、病巣の皮膚が剥がれ落ち、その結果ウイルス感染組織が除去されると考えられている。さらに、カンタリジンによる水疱形成は、急性炎症細胞浸潤及び可溶性炎症メディエーターと関連していることから [5)]、この局所炎症反応は、ウイルス免疫応答を促進し、TO-208 を投与した患者における作用機序の一部と推察される。

Verrica 社は安全性薬理試験として、hERG を安定的に発現するほ乳類細胞を用いて、hERG チャネル電流に対するカンタリジンの濃度反応性を評価した *in vitro* 試験を GLP に準拠して実施した（試験番号：[redacted]）。具体的には、生理的温度に近い温度での hERG チャネル電流に対するカンタリジンの阻害効果を検討した。この試験では、カンタリジンの濃度範囲（30 及び 300 µM）において、hERG チャネル電流に変化がなかったことが報告されている。試験の要約及び主な所見は表 2.4.2-1 に記載した。

表 2.4.2-1　　安全性薬理試験の要約

Type of Study; Study Number (GLP Status)	Test System Species/Strain	Route	Test Article; Dose(s)	Key Findings
Safety pharmacology: cardiovascular; [redacted] (GLP)	hERG transfected HEK293 cells	*In vitro*	Cantharidin; 30 and 300 µM	At 30 µM and 300 µM, cantharidin inhibited hERG current by 1.9 ± 0.3% (mean ± SEM; n = 3) and 3.5 ± 0.4%, respectively, neither of which were statistically significant compared with vehicle control (2.1 ± 0.4%). The IC_{50} of cantharidin on hERG current was estimated to be >300 µM.

GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IC_{50} = median inhibitory concentration.

カンタリジンは、30 及び 300 µM で hERG チャネル電流をそれぞれ 1.9%及び 3.5%阻害したが、いずれの濃度も対照処理細胞（n = 3）で認められた 2.1%の阻害と比較して統計的に有意ではなか

った。hERG チャネル電流に対するカンタリジンの 50%阻害濃度（IC_{50}）は、300 µM（60,000 ng/mL）以上と推定された。300 µM は、軟属腫患者に VP-102 を局所投与して実施した臨床暴露試験（試験番号：VP-102-103）において全身血中で検出されたカンタリジンの最高濃度（3.4 ng/mL）の 17,000 倍以上である。

カンタリジンは、セリン／スレオニンプロテインホスファターゼ 1 型（PP1）及び 2A 型（PP2A）の機能を阻害することが示されている。PP1 及び PP2A は、細胞シグナル伝達、カルシウム調節及び心収縮・弛緩など、心臓の機能に関与する主要な因子である。公表文献中には、カンタリジンの心血管系に対する影響を評価した研究がいくつかある。*In vitro* の結合試験で、カンタリジンは精製 PP2A の触媒サブユニットに結合する（IC_{50} = 32 ng/mL; 160 nM）が [6]、ホモジナイズしたヒト心臓組織由来の原形を保ったホスファターゼへの結合は弱い（IC_{50} = 600 ng/mL; 3 µM）ことが示されている [7]。カンタリジンの心臓の変時及び変力作用に対する作用も *in vitro* 試験で検討されている。臓器提供候補者又は同所性心臓移植患者から得られた単離ヒト右心室肉柱では、100 µM 未満の濃度ではカンタリジンの変力作用は認められなかった [7]。モルモットの乳頭筋分節及び自発拍動している右心房細胞において、カンタリジンの心臓の変時及び変力作用に対する作用は、3 µM 未満の濃度で認められず、心臓のリン酸化タンパク質のリン酸化総量は、10 µM 未満の濃度で変化は認められなかった [8]。VP-102 の局所適用ではカンタリジンの吸収はごくわずかであるため、VP-102 投与後の PP2A 阻害に関連した心血管系への有害作用の懸念はごくわずかである。

心血管系機能に対するカンタリジンの作用も *in vivo* で評価されている。カンタリジンを静脈内に単回投与したウサギにおいて、心機能、心筋組織及び生存に対する用量依存性の作用が評価された [9]。高用量のカンタリジン（1.3～1.9 mg/kg）では、ST 低下、致死的な心室性不整脈、死亡が認められたが、低用量のカンタリジン（0.6～1.1 mg/kg）では、対照動物と比較して、目立った心電図変化や生存率の差はなかった。さらに、剖検後の組織学的検査から、低用量のカンタリジンは対照と比較して、筋原線維の破壊、ミトコンドリアの膨張、クロマチンの凝集を増加させないことが明らかになった。この試験で全身暴露は評価されていないが、静脈内投与によるカンタリジンの最低用量（0.6 mg/kg）でも、VP-102 の局所投与で臨床的に認められた最大濃度（3.4 ng/mL）よりはるかに高い血中濃度である。したがって、VP-102 の局所投与で達成可能なカンタリジンの血中濃度では、治療された患者の心臓血管系に対する薬理学的有害作用の可能性はほとんどない。

公表文献には、ICH S7A ガイダンスで推奨されているカンタリジンの単回経皮投与による心血管系、中枢神経系及び呼吸系への作用を検討した *in vivo* 試験はない。一方、*in vitro* 試験系及び経口又は非経口投与による *in vivo* 試験系を用いたカンタリジンの中枢神経系、心血管系、腎機能及び平滑筋機能を含む重要な臓器系への有害作用の可能性については、既に公表されている。これらの試験の要約は 2.6.2.4 項を参照のこと。

2.4.3 薬物動態試験

Verrica 社は VP-102 外用液剤及びカンタリジンのいずれについても薬物動態試験を実施していない。カンタリジンの吸収、分布及び排泄については、公表文献にある情報に基づいて、2.6.4 項に詳細を要約している。査読を受けた文献に基づくカンタリジンの吸収、分布及び排泄に関する情報は、https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov で閲覧可能な Hazardous Substances Data Bank に掲載されている [10]。VP-102 の局所適用によるカンタリジンの全身循環血中濃度はごくわずかであるため、Verrica 社は、VP-102 外用液剤の承認申請のために代謝試験は必要ないと判断し、実施してない。2024 年 7 月に、新たに公表された文献では、カンタリジンをマウスに経口投与した場合、肝臓中及び尿中に生体内アミノ酸との結合体が検出されることが報告されている [11]。公表文献中に、カンタリジンのヒトにおける *in vitro* 代謝に関する情報がなかったことから、当社は日本国内の承認申請にあたり、ヒト肝ミクロソーム及び凍結ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験を実施した（試験番号：[redacted]、参考資料）。

一般に、カンタリジンは消化管から吸収され、限られた程度ではあるが皮膚からも吸収される [10]。公表文献では、経皮投与後の吸収を評価した試験は確認されていないが、ラット及びイヌにカンタリジンを経口投与したときの吸収については過去に報告されている [12), 13)]。ラットにカンタリジンを 0.1 mg/kg の用量で単回投与すると、投与後約 2 時間にピークが見られ、そのときの血漿中濃度は 66.21 ng/mL であった。イヌにカンタリジンを 0.102 mg/kg の用量で単回投与したとき、バイオアベイラビリティは 26.7%であり、血漿中消失半減期は約 20 分であった。

^{3}H 標識カンタリジンを経口又は腹腔内投与したとき、腹水肝腫マウスの胆汁、腎臓、肝臓、胃及び腫瘍細胞において高レベルの放射能が認められた [10]。また、Swiss-Webster マウスの血液、脳、心臓、腎臓、肺、皮膚、脾臓及び胃のサイトゾル画分において、^{3}H 標識カンタリジンの特異的な結合が認められた。肝臓組織では、この結合はサイトゾル画分に特異的であり、膜画分にはほとんど結合しないことが示された [14)]。さらに、肝臓のサイトゾル画分への ^{3}H 標識カンタリジンの結合は、非標識カンタリジンを投与したマウスでは用量依存的に阻害された。

10 µmol/L のカンタリジンをヒト肝ミクロソーム又は凍結ヒト肝細胞中で 37°C、4 時間インキュベーションした後の代謝反応試料を LC-MS で分析し、代謝反応後の未変化体残存率の評価と代謝物検索を行った（試験番号：[redacted]、参考資料）。その結果、ヒト肝ミクロソーム及び凍結ヒト肝細胞との反応 4 時間後において、カンタリジンの残存率はそれぞれ 96.2%及び 89.1%であった。また、代謝物検索の結果、カンタリジン由来の代謝物は検出されず、カンタリジンはヒト肝ミクロソーム及び凍結ヒト肝細胞で代謝されないと考えられた。

循環血中のカンタリジンの排泄に関する情報は限られているが、主な排泄経路は腎臓の糸球体濾過を介した尿中であると考えられる [10)]。この排泄経路は、カンタリジン摂取後の急性カンタリジン中毒に伴う糸球体障害及び急性尿細管壊死の臨床症状に関与していることが示唆される [15), 16), 17)]。

2.4.4 毒性試験

Verrica 社は、VP-102 外用液剤及びカンタリジンについて、単回及び反復投与毒性試験を実施していない。カンタリジン外用薬の安全性プロファイルは、患者への使用実績や動物試験から既に確立されている。過去に実施され、文献として公表されているカンタリジンを用いた毒性試験の詳細は、2.6.6.2 項に要約している。

公表されている試験は必ずしも毒性評価を目的として実施されたものではないが、カンタリジンの局所及び全身への影響を適切に評価できるようデザインされたものである。

カンタリジンを皮膚へ局所塗布した際の影響は、マウス（用量範囲：2.5～125 µg）又はラット（用量範囲：25～1,600 µg）を用いた 4 試験で評価されている[18),19),20),21)]。雄性 Swiss-Webster マウスの耳介にカンタリジンを塗布した試験では、2.5 µg（0.1 mg/kg）以上の用量で耳介の浮腫が認められ、62.5 µg の塗布後 24 時間で皮膚の反応は最大となり、この反応は少なくとも 168 時間まで持続した。Swiss-Webster マウスを用いた別の試験では、カンタリジンを 25 µg の用量で耳介に塗布したところ塗布後 8 時間に最大炎症反応（浮腫）が認められたが、塗布後 48～72 時間以内に炎症反応は軽減した。CD-1 マウスの耳介にカンタリジンを 12.5～25 µg の用量で塗布したところ、塗布後 6 時間以内に浮腫及び水疱、塗布後 16 時間で浮腫及び好中球浸潤がピークに達するとともに、塗布後 24 時間で潰瘍形成、塗布後 120 時間までに上皮の再生が認められた。ラットでは、カンタリジンを 50 µg の用量で耳介に塗布したところ、塗布部位に浮腫が認められ、400 µg で皮膚反応は最大となった。

カンタリジンの経口投与後の毒性は、ラット（0.1 及び 6.9 mg/kg）及びウサギ（20 mg/kg）を用いて評価した[12),22),23)]。ラットでは、6.9 mg/kg を投与した 8 例中 3 例に死亡がみられ、経口投与されたカンタリジンへの暴露により、自発運動の低下、体温低下及び尿量の低下がみられた。また、ラットでは胃非腺上皮細胞の棘細胞離開（棘融解）、近位尿細管の拡張及び消化管粘膜の刺激性変化も認められた。ウサギでは、カンタリジン経口投与後 120～180 分以内に死亡がみられ、組織を分析したところ腎臓、胃、膀胱及び脾臓でカルシウム濃度の顕著な減少がみられた。一方、食道、小腸、肝臓、肺、心臓及び骨格筋ではカルシウム濃度の変化はみられなかった。ウサギは重度の代謝性アシドーシスで死亡したと考えられた。

カンタリジンの静脈内投与時の影響は、ウサギ（0.6～1.9 mg/kg）及びイヌ（34 µg/kg）を用いた 3 試験で評価されている[9),13),24)]。ウサギでは、1.3 mg/kg 以上の用量でカンタリジン投与後数時間以内にすべての動物が死亡した。心臓への影響として致死的な不整脈が投与後 30～60 分以内にみられたが、腎臓、肝臓及び肺に明らかな変化はみられなかった。イヌでは、投与後 5 時間までの観察において毒性変化は認められなかった。

カンタリジンの腹腔内投与時の影響は、マウス（1～62.5 mg/kg の用量範囲で複数の試験を実施）及びラット（36.36 mg/kg）を用いた 5 試験で評価されている[25),26),27),28),29)]。マウスでは、カンタリジンを 62.5 mg/kg 投与後に顕著な炎症、自発運動の低下、腸間膜に多形核白血球及び赤血球の浸潤、並びにフィブリンの沈着が認められた。雄の Swiss-Webster マウスでは、10 mg/kg 投与後 20 分以内に嗜眠及び呼吸緩徐がみられ、その後努力性呼吸に至り、投与後約 60～90 分に死亡が認められた。剖検では、肝臓の肥大及びうっ血、並びに肝グリコーゲン分解の亢進を示唆する所見が

認められた。致死量に近い用量（2 mg/kg）においても投与数時間に同様の一般状態変化がみられた。別の試験では、カンタリジンを雄の Swiss-Webster マウスに投与したところ、3～10 mg/kg の用量で中等度から重度の毒性がみられ、これは肝サイトゾル画分蛋白へのカンタリジンの結合によるものと考えられている。ラットでは、カンタリジンを 36.36 mg/kg の用量で投与したところ、投与後 10 分以内に腎臓、肝臓、食道、胃、小腸、大腸、膀胱及び尿管の上皮細胞に重度かつ広範な損傷がみられた。

Verrica 社は、カンタリジンの GLP 適用 *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。これらの試験には以下の 3 試験が含まれる：細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用いたほ乳類細胞小核試験及びヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いたほ乳類細胞染色体異常試験。カンタリジンを用いて実施した遺伝毒性試験の概要を表 2.4.4-1 に示す。

細菌を用いた復帰突然変異試験（試験番号：[redacted]）では、ヒスチジン要求性変異株であるネズミチフス菌（*S. typhimurium*）TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びにトリプトファン要求性変異株である大腸菌（*E. coli*）WP2 *uvrA* を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、カンタリジンの復帰突然変異誘発能を検討することにより、その変異原性を評価した。予備毒性試験の結果より、復帰突然変異試験の最高用量は 5,000 µg/plate とした。カンタリジンは、試験したすべての用量において、ネズミチフス菌及び大腸菌のすべての試験菌株に対して復帰突然変異を誘発しなかったことから、変異原性を有さないことが示唆された。

ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験（試験番号：[redacted]）では、HPBL を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、カンタリジンが染色体の構造異常を誘発する可能性を評価した。カンタリジンは、50%未満の細胞毒性を示す複数の処理濃度で、染色体の中期分裂像に過度な凝集及び変形を誘発し、ICH S2 (R1) ガイダンスに記載された有効な試験法の基準に従った適切な染色体の評価ができなかったため、試験を中止した。

ほ乳類細胞を用いた小核試験（試験番号：[redacted]）では、カンタリジンの染色体異常誘発能を評価した。具体的には、代謝活性化系の存在下及び非存在下において、カンタリジンがヒトリンパ芽球 TK6 細胞に小核を誘発する可能性を評価した。代謝活性化系非存在下 4 時間処理の 3.5 µg/mL 処理群（1.40%）及び代謝活性化系存在下 4 時間処理の 5.5 µg/mL 処理群（1.20%）で各媒体群（それぞれ、0.55%及び 0.60%）と比較して小核を有する細胞の出現率増加が認められた。代謝活性化系非存在下 27 時間処理では、1～1.6 µg/mL 処理群（1.25～2.25%）の小核を有する細胞の出現率が、媒体群（0.65%）と比較して濃度依存的に増加した。その後の CREST 染色による解析の結果、カンタリジン処理細胞では動原体染色陽性の小核を有する細胞が高頻度に認められた。このことは、カンタリジンが染色体の構造異常ではなく異数性誘発メカニズムにより小核を形成することを示唆している。

表 2.4.4-1　　遺伝毒性試験の要約

Type of Study; Study Number (GLP Status)	Test System Species/Strain	Route	Test Article; Dose(s)	Key Finding(s)
Genetic toxicity: bacterial reverse mutation assay; [redacted] (GLP)	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and *E. coli* WP2 *uvr*A	*In vitro*	Cantharidin; 15.0 to 5,000 µg/plate	Cantharidin was negative at all concentrations tested (15.0 to 5,000 µg/plate) in all strains tested in either the presence or absence of S9 activation. Cantharidin does not possess mutagenic properties.
Genetic toxicity: mammalian cell chromosomal aberration assay; [redacted] (GLP)	Human peripheral blood lymphocytes	*In vitro*	Cantharidin; 4-hr (activated or non-activated): 0.5-15 µg/mL; 20-h: 0.1–5 µg/mL	Study was inconclusive and was terminated prior to completion due to overly condensed metaphase chromosomes at several concentrations, which did not allow for an adequate evaluation of the test samples that would meet the criteria for a valid assay in accordance with ICH S2(R1) guidance.
Genetic toxicity: mammalian cell micronucleus assay; [redacted] (GLP)	Human lymphoblastoid TK6 cells	*In vitro*	Cantharidin; 4-hr (activated or non-activated): 1.0-6.0 µg/mL; 27-hr: 0.5–2.5 µg/mL	Cantharidin induced the formation of MN at concentrations at or above 1 µg/mL with 27-hour exposure, but an increase in MN was not observed at similar concentrations with 4-hour exposure. Subsequent CREST staining revealed that MN were formed via an aneugenic, not a clastogenic, mechanism of action.

E. coli = *Escherichia coli*; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Council for Harmonisation; MN = micronuclei;
S. typhimurium = *Salmonella typhimurium*.

2.4.5 総括及び結論

カンタリジンは物理的にも化学的にもよく特徴付けられており、コロジオン媒体に配合した製剤は、1950 年代から伝染性軟属腫[1), 3)]やイボ[30)]の外用治療薬として皮膚科医に広く用いられてきた。適切に投与された場合、外用治療薬として安全に使用されてきた広範な使用実績があり、また、公表文献において伝染性軟属腫治療に関する有効性のエビデンスがいくつか報告されていることから、FDA は、section 503A of the Federal Food, Drug and Cosmetics Act (the 503A Bulks List) に基づき、外用にのみ用いるカンタリジンを、調剤に用いることができるバルク原薬リストに含めている（84 FR 4696; 2019 年 2 月 19 日）[31)]。

VP-102 は伝染性軟属腫に対し有効であるが、その正確な作用機序は不明である。作用機序の 1 つとして、皮膚における水疱形成の薬力学的反応に関連しているとの仮説がある。実験的に、正常皮膚へのカンタリジン局所適用は、局所中性セリンプロテアーゼの活性化を通じて表皮のデスモソーム機能を弱め、棘融解及び表皮内水疱形成につながることが示されている[4)]。伝染性軟属腫の治療では、カンタリジンに対する薬力学的反応である病巣の下にある表皮での水疱形成が、病巣部皮膚の脱落及び軟属腫病巣のウイルス感染組織の除去につながるという仮説がある。正常皮膚における試験から、カンタリジンによる水疱形成は局所的な炎症反応と関連しており、水疱液中の浸潤白血球や炎症性サイトカインの存在によって検出されることが示唆されており[5)]、炎症性物質がウイルス免疫応答を促進することによって、軟属腫に対するカンタリジンの有効性にも関与している可能性がある。

薬理学的特性及び局所療法としての使用実績から、カンタリジンが伝染性軟属腫患者の局所治療において有効な薬剤として投与できることが示唆される。

局所適用されたカンタリジンの吸収は限定的であり、したがって、TO-208 外用液剤を用いた場合、循環血中暴露はごくわずかであると予想される。Verrica 社は、VP-102 外用液剤及びカンタリジンのいずれについても経皮又は他の投与経路による薬物動態又は代謝試験を実施していない。2024 年に新たに公表された文献では、カンタリジンをマウスに経口投与した場合、肝臓中及び尿中に生体内アミノ酸との結合体が検出されることが報告されている[11)]。公表科学文献において、カンタリジンのヒトに対する代謝物プロファイル及び代謝に関連する情報を得られなかったことから、当社は日本国内への承認申請にあたり *in vitro* 代謝試験を実施した。その結果から、カンタリジンはヒト肝ミクロソーム及び凍結ヒト肝細胞では代謝されないと考えられた。

伝染性軟属腫の患者を対象とした VP-102 外用液剤の臨床暴露試験（試験番号：VP-102-103）において、カンタリジンの血漿中濃度は、評価した 66 検体中 65 検体で定量下限未満であり、VP-102 が意図された通りに投与された場合、カンタリジンの体内への吸収は限定的であることを確認した。血漿中濃度が定量下限（2.5 ng/mL）を超えた 1 検体では、VP-102 投与後 2 時間の濃度は 3.4 ng/mL であったが、この被験者では、投与後 6 及び 24 時間に血漿中カンタリジンは検出されなかった。また、国内で実施した伝染性軟属腫の患者を対象とした TO-208 臨床薬理試験（208-1-1 試験）において、TO-208 を投与した 16 例の投与前、投与後 2 及び 24 時間後の血漿中カンタリジン濃度を測定した。血漿中にカンタリジンが検出された被験者は、16 例のうち 2 例（いずれも治験薬初回塗布 2 時間後）であった。いずれもカンタリジン濃度は定量下限（2.500 ng/mL）付近

の値（3.432 ng/mL 及び 3.278 ng/mL）であり、治験薬初回塗布 24 時間後では定量下限未満であった。その他の 14 例の被験者は、いずれの血漿検体においてもカンタリジン濃度は定量下限未満であった。これらの結果から、全身循環血中にカンタリジンが検出される限られたケースにおいても、全身循環血中濃度はごくわずかであり、かつ一過性であることから、安全性に影響はないと考えられる。

Verrica 社は、安全性薬理試験として、hERG を安定的に発現するヒト胎児由来腎臓上皮（HEK）-293 細胞を用いて、カンタリジンのイオン電流に対する影響を *in vitro* 試験で評価した（試験番号：[redacted]）。この試験では、生理的温度に近い温度で試験した場合、試験した 2 つの濃度のカンタリジン（30 又は 300 µM）のいずれにおいても、対照と比較して hERG チャネル電流に有意な変化は認められなかった。この試験により、カンタリジンは、*in vivo* で想定されるよりもはるかに高い濃度で試験した場合でも、hERG チャネル電流に有意な影響を及ぼさないことが示された。hERG チャネル電流に対するカンタリジンの阻害作用の IC_{50} は算出出来ないものの、300 µM（60,000 ng/mL）以上と推定された。この濃度は、軟属腫患者に VP-102 を局所投与して実施した臨床暴露試験で観察された最も高い全身血中カンタリジン濃度（3.4 ng/mL；VP-102-103 試験）の 17,000 倍以上である。

また、公表文献には、カンタリジン暴露が心血管系の薬理及び生理の作用について検討した *in vitro* 及び *in vivo* 試験が多数ある。カンタリジンは、心血管機能に関与する多くの細胞及び細胞内標的の重要な制御因子である PP2A の機能を阻害することが示されている [6), 7), 8), 28)]。臨床暴露試験で観察された全身血中カンタリジン濃度の最高値（3.4 ng/mL）は、*in vitro* で PP2A 活性に影響を与えたり心収縮力を変化させたりする濃度よりも有意に低いため、VP-102 投与によるカンタリジン暴露は、PP2A 阻害に関連する心血管系の有害作用とは関連しないものと推察される。さらに、カンタリジンを静脈内投与したウサギにおいて、心機能への有害作用は、患者における VP-102 の局所適用で認められた、又は達成可能であろう用量よりもはるかに高い全身投与量でのみ発現した [9)]。

公表文献に記載されている試験、hERG 阻害試験の結果、及び臨床暴露試験のデータを含む利用可能なすべての情報を考慮すると、TO-208 が意図された通りに投与された場合、カンタリジンで達成された全身血中濃度が治療患者に心血管リスクをもたらす可能性は極めて低い。

中枢神経系及び腎臓系を含む他の臓器系に対するカンタリジンの作用は、*in vitro* 試験系及び動物の経口投与又は非経口投与による *in vivo* を用いて検討されており、公表文献に記載されている。これらの試験結果は 2.6.2.4 項にまとめた。また、局所適用されたカンタリジンは全身血中への吸収は最小限であることから、局所で作用を発現する既知の薬理作用に基づいて、カンタリジンによる他の安全性薬理学的評価項目（中枢神経系、呼吸系など）の評価は、必要ないと判断した。

カンタリジンは、動物への経口及び非経口投与時に比較的低用量で強い毒性を示す。ラット及びウサギへの経口投与では、重度の消化管粘膜刺激性、腎及び泌尿器系への毒性、並びに死亡が報告されている [12), 22), 23)]。マウス、ラット及びウサギへの非経口投与では、消化管、心臓、肝臓、腎及び泌尿器系への毒性が報告されている [9), 10), 13), 14), 24), 25), 26), 27), 28), 29)]。マウス及びウサギでは、約 1 mg/kg の用量をそれぞれ腹腔内及び静脈内投与したところ死亡がみられた [9), 10), 27), 28)]。ヒトでは、カンタリジンを経口摂取した場合 10 mg（約 0.16 mg/kg）程度の低い用量でも全身毒性が発現

する可能性がある[32]。臨床におけるカンタリジン摂取時の全身毒性は、以下のような多数の合併症である： 消化管及び尿路の潰瘍形成、出血及び壊死；T 波の平坦化／反転及び接合部補充調律を伴う徐脈に繋がる頻脈を含む心血管系症状；低灌流及び急性尿細管壊死による乏尿、血尿及び排尿障害を特徴とする腎障害；昏睡及び痙攣を含む中枢神経毒性[32]。

これらの全身毒性と対照的に、ヒト及び動物においてカンタリジンの急性経皮暴露時にみられる有害所見は、主に局所的な皮膚反応に限られる。この皮膚反応は、伝染性軟属腫の患者におけるカンタリジンの臨床治療効果と関連すると考えられる重要な薬力学的反応にしばしば関連するものである。皮膚におけるこれらの薬力学的反応には、カンタリジンの局所接触部位における棘融解を伴う適用部位の炎症、刺激性及び水疱形成が含まれる[18), 19), 20), 21), 32)]。

カンタリジンの皮膚からの吸収は限定的であり、全身暴露はごくわずかであるため、カンタリジンの皮膚局所投与における安全性の考察に経口及び非経口投与試験の結果を直接用いることはできない。試験番号：VP-102-103 の結果及びカンタリジンの長年の臨床使用において患者への適切な経皮適用下で全身毒性が報告されていないことは[3), 32), 33)]、カンタリジンの皮膚吸収が限定的であり、経皮適用では全身毒性の観点から安全性の懸念はないという結論を裏付けるものである。

Verrica 社は、カンタリジンを用いた標準的組合せの *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。細菌を用いた復帰突然変異試験において、カンタリジンは代謝活性化の有無にかかわらず、すべての用量において変異原性を示さなかった。ほ乳類細胞を用いた小核試験において、カンタリジンは代謝活性化系非存在下の 27 時間処理で少なくとも 1 µg/mL の濃度で小核を誘発したが、代謝活性化系非存在下の 4 時間処理では同程度の濃度でも小核誘発は認められなかった。カンタリジンによる小核誘発は、代謝活性化系非存在下の 4 時間処理では 3.5 µg/mL、代謝活性化系存在下の 4 時間処理では 5.5 µg/mL の濃度で認められた。その後の CREST 染色による解析から、カンタリジンの小核誘発作用は、染色体の構造異常ではなく異数性誘発メカニズムに起因することが示された。

小核試験ではカンタリジンの小核誘発作用が認められたが、カンタリジンの遺伝毒性ポテンシャルを評価する上で、臨床で用いる際の他の要因を考慮した総合的な証拠の重み付けが重要である。カンタリジンが小核を誘発した最低濃度（1 µg/mL）は、試験番号：VP-102-103 の被験者で測定された全身暴露の最高濃度（3.4 ng/mL）の 250 倍以上であった。カンタリジンは、*in vitro* 遺伝毒性試験の結果、ほ乳類細胞試験において、ある一定の条件下で異数性誘発メカニズムにより小核を誘発したが、Verrica 社は、カンタリジンの臨床使用実績及び臨床使用と小核試験の条件比較などの蓄積された証拠に基づき、VP-102（カンタリジン）外用液剤による有意な遺伝毒性の懸念はないと結論づけた。

カンタリジンの発がん性ポテンシャルについては、国際がん研究機関（IARC）の「化学物質の人に対する発がんリスクの評価に関するモノグラフ」[34)]においてげっ歯類の公表文献情報に基づいた評価が過去に行われており、この評価に用いられた試験は 2.6.6.5 項に要約した。全体として、カンタリジンの「完全発がん物質」としての発がん性ポテンシャルを評価した試験及びカンタリジンの局所（経皮）塗布によるマウスでの実験的発がんイニシエーション／プロモーション試験において、様々な結果が得られている。カンタリジンの発がん性については、ヒトにおける十分なデータがないこと、ヒト及び動物における科学的根拠が限られているか又は不十分であることから、カンタリジンは IARC のモノグラフでグループ 3（ヒトに対する発がん性について分類でき

ない）に分類されている[35)]。ICH M3(R2)及び ICH S1A ガイダンスに準拠するとともに、VP-102 は限られた投与期間において局所塗布で使用されること、カンタリジンの遺伝毒性試験の結果及び広範かつ長年にわたる臨床使用経験から発がん性に関する懸念要因がないことを考慮すると、VP-102 を予定投与経路で患者に使用した場合、カンタリジンに発がん性の懸念はなく、カンタリジンの発がん性を評価する新たな試験は必要ないと考えている。

カンタリジンに暴露されることによる安全性の懸念は、過去の使用実績から十分に把握されており、経皮塗布の場合、有害反応は主に局所的な刺激性と炎症に限定される。Verrica 社が実施した非臨床安全性試験（*in vitro* hERG 阻害試験及び *in vitro* 遺伝毒性試験）は、カンタリジン暴露に対する細胞レベルの反応を理解するための追加安全性情報を提供するものであり、これらの試験において、カンタリジンの明らかな毒性懸念は認められなかった。

結論として、非臨床試験から得られた薬理、薬物動態及び毒性に関する情報並びに広範な過去の使用実績から得られたカンタリジンのプロファイルは十分把握できており、伝染性軟属腫の治療薬 TO-208 外用液剤（0.7% w/v カンタリジン）を開発する上で、非臨床の懸念点はないと判断した。

参考文献

1) Funt TR. Cantharidin treatment of molluscum contagiosum. Arch Dermatol. 1961;83:504-505.（4.3 参考文献 1)）

2) Silverberg NB, Sidbury R, Mancini AJ. Childhood molluscum contagiosum: experience with cantharidin therapy in 300 patients. J Am Acad Dermatol. 2000;43(3):503-507.（4.3 参考文献 2)）

3) Moed L, Shwayder TA, Chang MW. Cantharidin revisited: a blistering defense of an ancient medicine. Arch Dermatol. 2001;137(10):1357-1360.（4.3 参考文献 3)）

4) Bertaux B, Prost C, Heslan M, Dubertret L. Cantharide acantholysis: endogenous protease activation leading to desmosomal plaque dissolution. Br J Dermatol. 1988;118(2):157-165.（4.3 参考文献 4)）

5) Day RM, Harbord M, Forbes A, Segal AW. Cantharidin blisters: a technique for investigating leukocyte trafficking and cytokine production at sites of inflammation in humans. J Immunol Methods. 2001;257(1-2):213-220.（4.3 参考文献 5)）

6) Honkanen RE. Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. FEBS Lett. 1993;330(3):283-286.（4.3 参考文献 6)）

7) Linck B, Boknik P, Knapp J, Muller FU, Neumann J, Schmitz W, et al. Effects of cantharidin on force of contraction and phosphatase activity in nonfailing and failing human hearts. Br J Pharmacol. 1996;119(3):545-550.（4.3 参考文献 7)）

8) Neumann J, Herzig S, Boknik P, Apel M, Kaspareit G, Schmitz W, et al. On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor. J Pharmacol Exp Ther. 1995;274(1):530-539.（4.3 参考文献 8)）

9) Rabkin SW, Friesen JM, Ferris JA, Fung HY. A model of cardiac arrhythmias and sudden death: cantharidin-induced toxic cardiomyopathy. J Pharmacol Exp Ther. 1979;210(1):43-50.（4.3 参考文献 9)）

10) National Library of Medicine website, PubChem, CID:5944, Hazardous Substances Data Bank (HSDB) for cantharidin. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5944 （4.3 参考文献 10)）

11) Fan Y, Chen L, Jing Q, Li X, Pan H, Fang C, Zhang J, Shi F. Covalent Binding of Reactive Anhydride of Cantharidin to Biological Amines. Drug Metab Dispos. 2024;16;52(8):775-784.（4.3 参考文献 11)）

12) Dang YJ, Zhu CY. Oral bioavailability of cantharidin-loaded solid lipid nanoparticles. Chin Med. 2013;8(1):1.（4.3 参考文献 12)）

13) Dang Y, Zhu C. Pharmacokinetics and bioavailability of cantharidin in beagle dogs. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2009;34(16):2088-2091.（4.3 参考文献 13)）

14) Graziano MJ, Waterhouse AL, Casida JE. Cantharidin poisoning associated with specific binding site

in liver. Biochem Biophys Res Commun. 1987;149(1):79-85.（4.3 参考文献 14)）

15) Presto AJ, 3rd, Muecke EC. A dose of Spanish fly. JAMA. 1970;214(3):591-592.（4.3 参考文献 15)）

16) Karras DJ, Farrell SE, Harrigan RA, Henretig FM, Gealt L. Poisoning from "Spanish fly" (cantharidin). Am J Emerg Med. 1996;14(5):478-483.（4.3 参考文献 16)）

17) Cotovio P, Silva C, Guedes Marques M, Ferrer F, Costa F, Carreira A, et al. Acute kidney injury by cantharidin poisoning following a silly bet on an ugly beetle. Clin Kidney J. 2013;6(2):201-203.（4.3 参考文献 17)）

18) Swingle KF, Reiter MJ, Schwartzmiller DH. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1981;254(1):168-176. （4.3 参考文献 18)）

19) Tarayre JP, Aliaga M, Barbara M, Villanova G, Caillol V, Lauressergues H. Pharmacological study of cantharidin-induced ear inflammation in mice. J Pharmacol Methods. 1984;11(4):271-277.（4.3 参考文献 19)）

20) Ivetic Tkalcevic V, Hrvacic B, Bosnar M, Cuzic S, Bosnjak B, Erakovic Haber V, et al. Cantharidin-induced inflammation in mouse ear model for translational research of novel anti-inflammatories. Transl Res. 2012;160(2):137-145.（4.3 参考文献 20)）

21) Boris A, Hurley JF. Assessment of topical anti-inflammatory activity in rats with cantharidin-induced inflammation. J Invest Dermatol. 1977;68(3):161-164.（4.3 参考文献 21)）

22) Qualls HJ, Holbrook TC, Gilliam LL, Njaa BL, Panciera RJ, Pope CN, et al. Evaluation of efficacy of mineral oil, charcoal, and smectite in a rat model of equine cantharidin toxicosis. J Vet Intern Med. 2013;27(5):1179-1184.（4.3 参考文献 22)）

23) Rolf LL, Buchanan ES, Alavi F. Acute toxicity of cantharidin in laboratory rabbits. A possible model for equine blister beetle disease. Toxicon. 1985;23:36.（4.3 参考文献 23)）

24) Friesen JM, Ferris JA, Rabkin SS, Fung HY. Pathological features of cantharidin-induced toxic cardiomyopathy: lack of correlation between electron-microscopic and histopathologic myocardial damage. Forensic Sci Int. 1979;13(3):187-192.（4.3 参考文献 24)）

25) Wolf EP. Experimental Studies on Inflammation: II. Experimental Chemical Inflammation in Vivo. J Exp Med. 1923;37(4):511-524.（4.3 参考文献 25)）

26) Graziano MJ, Casida JE. Comparison of the acute toxicity of endothal and cantharidic acid on mouse liver in vivo. Toxicol Lett. 1987;37(2):143-148.（4.3 参考文献 26)）

27) Matsuzawa M, Graziano MJ, Casida JE. Endothal and Cantharidin Analogues: Relation of Structure to Herbicidal Activity and Mammalian Toxicity. J Agric Food Chem. 1987;35:823-829.（4.3 参考文献 27)）

28) Li YM, Casida JE. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(24):11867-11870.（4.3 参考文献 28)）

29) Bagatell FK, Dugan K, Wilgram GF. Structural and biochemical changes in tissues isolated from the cantharidin-poisoned rat with special emphasis upon hepatic subcellular particles. Toxicol Appl Pharmacol. 1969;15(2):249-261.（4.3 参考文献 29)）

30) Epstein WL, Kligman AM. Treatment of warts with cantharidin. AMA Arch Derm. 1958;77(5):508-511.（4.3 参考文献 30)）

31) Federal Register, List of Bulk Drug Substances, Section 503A of the Federal Food, Drug and Cosmetics Act. Available at: https://www.federalregister.gov/documents/2019/02/19/2019-02367/list-of-bulk-drug-substances-that-can-be-used-to-compound-drug-products-in-accordance-with-section#print（4.3 参考文献 31)）

32) McGuigan M. Toxicology of topical therapy. Clin Dermatol. 1989;7(3):32-37.（4.3 参考文献 32)）

33) Tromovitch TA. Letter to the Editor: Cantharadin. JAMA. 1971;215:640.（4.3 参考文献 33)）

34) IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some naturally occurring substances. 1976;10:79-84. International Agency for Research on Cancer, Lyon CEDEX 08, France. Available at: https://publications.iarc.fr/28（4.3 参考文献 34)）

35) IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1987. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Geneva. Available at: https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications（4.3 参考文献 35)）