第２部（モジュール２）
CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言
2.6.2　薬理試験の概要文
2.6.3　薬理試験概要表
2.6.4　薬物動態試験の概要文
2.6.5　薬物動態試験概要表
2.6.6　毒性試験の概要文
2.6.7　毒性試験概要表

鳥居薬品株式会社

2.6.1 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
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
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

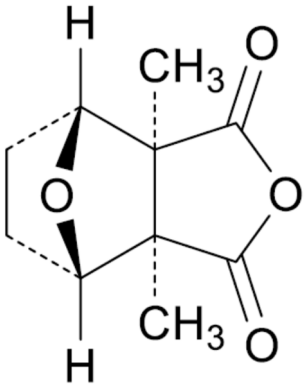
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造等

Verrica Pharmaceuticals Inc.（Verrica 社）は伝染性軟属腫の治療薬として VP-102 を開発した。当社は、伝染性軟属腫を適応症とした VP-102（米国名 YCANTH）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。カンタリジンの構造式を図 2.6.1-1 に示した。

図 2.6.1-1　　カンタリジンの構造式



Chemical name: (3aR,4S,7R,7aS)-3a,7a-dimethylhexahydro-4,7-epoxy-2-benzofuran-1,3-dione

Formula: $C_{10}H_{12}O_4$

Molecular weight: 196.20 g/mol

CAS registry number: 56-25-7

2.6.1.2 薬理的特性

カンタリジンは、ツチハンミョウの体液から得られる脂溶性の天然化合物である。TO-208 に含まれているカンタリジンを含め、現代のカンタリジン製剤に使用される甲虫は、ツチハンミョウのマイラブリス属のものが主な供給源である。カンタリジンは水疱形成剤として機能し、皮膚に塗布すると水疱形成という薬力学的反応を引き起こす。伝染性軟属腫の治療に関するカンタリジンの正確な作用機序は不明であるが、投与された表皮のデスモソーム・トノフィラメント複合体の解離によるカンタリジン誘発の棘融解過程、及びその結果として形成される表皮内水疱に関連しているとの仮説がある。カンタリジンを伝染性軟属腫病巣に適用すると、病巣の下にある表皮が水疱を形成し、病巣の皮膚が剥がれ落ちることにより、ウイルス感染組織が除去されることが示唆されている。また、カンタリジンによる水疱形成に伴う急性の局所炎症反応が、伝染性軟属腫に対する有効性の作用機序の一部となっている可能性がある。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使用した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 は、クロスコンタミネーション及び反復使用時の濃度変化の可能性を最小限にするため、単回使用アプリケーター形式で製造している。

ヒトを対象としたカンタリジンの使用実績は豊富にあることから、Verrica 社が実施した非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験は限定的である。

VP-102 外用液又はカンタリジンを用いた効力を裏付ける試験及び薬物動態試験を Verrica 社は実施していないが、カンタリジンの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 項に要約している。カンタリジンの薬力学的及び薬物動態特性は、伝染性軟属腫の治療薬として開発することの意義を裏付けるものである。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チャネル遺伝子（hERG）チャネル電流に対するカンタリジンの作用を、GLP 適用の *in vitro* 試験として実施した（2.6.2.4 項）。生理的温度に近い温度において検討したカンタリジン濃度（30 及び 300 μM）において、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。

カンタリジン外用剤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。カンタリジンは、経皮適用では局所毒性物質として作用して炎症反応を引き起こし、経口又は非経口投与では全身毒性物質として作用して、消化管、腎臓、尿路及び心筋機能など複数の系への作用が認められる。文献として公表されている動物試験に基づくカンタリジンの局所毒性及び全身毒性に関する情報は、2.6.6 項に要約している。カンタリジンの歴史的な使用に基づいて、ヒト及び動物におけるカンタリジンの急性経皮暴露に伴う毒性所見は、主に炎症、刺激、水疱形成などの皮膚局所反応に限定されている。

VP-102 は外用剤であり、局所適用後の全身暴露は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非臨床毒性試験を実施した。そのため、Verrica 社はカンタリジンについて、細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳動物細胞の小核試験（2.6.6.4 項）を含む *in vitro* 遺伝毒性試験を GLP 適用試験として実施した。これらの試験において、カンタリジンによる変異原性又は染色体異常誘発性は認められなかった。ほ乳動物細胞へのカンタリジン処理により小核形成の増加が認められたが、その後の試験で、局所適用では全身暴露量として到達できないと考えられるカンタリジン濃度において、異数性誘発メカニズムにより小核が誘導さ

れることを確認した。

2.6.1.3 効能又は効果並びに用法及び用量に関する情報

- 効能又は効果
  伝染性軟属腫

- 用法及び用量
  通常、成人及び 2 歳以上の小児に、3 週間に 1 回、適量を患部に塗布する。

2.6.2 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
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EAC	Ehrlich ascites carcinoma	エールリッヒ腹水癌
ECG	electrocardiogram	心電図
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
HB-PS	HEPES-buffered physiological saline	HEPES 緩衝生理食塩水
HEK-293	human embryonic kidney cells-293	ヒト胎児由来腎臓上皮細胞-293
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	2-［4-（2-ヒドロキシエチル）ピペリジン-1-イル］エタンスルホン酸
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
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
I_{Kr}	rapidly activating delayed rectifier potassium current	急速活性型遅延整流カリウムイオン電流
LC_{50}	median lethal concentration	半数致死濃度
MCV	molluscum contagiosum virus	伝染性軟属腫ウイルス
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

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

Verrica Pharmaceuticals Inc.（Verrica 社）は、伝染性軟属腫の治療薬として 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（米国名 YCANTH）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。カンタリジンは、ツチハンミョウの体液から得られる脂溶性の天然化合物であり、主に幼児を苦しめるポックスウイルスによる皮膚感染症である伝染性軟属腫を治療するための局所フィルム形成溶液製剤である。

カンタリジンはヒトでの長い使用実績があり、その薬理作用は既知のもので、公表文献にも記載されている。したがって、Verrica 社はカンタリジンの薬力学的作用を評価する非臨床試験を実施していない。公表文献に記載されている情報に基づいて、カンタリジンの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を、それぞれ 2.6.2.2 項及び 2.6.2.3 項に要約している。

カンタリジンは水疱形成剤として機能し、皮膚に適用すると水疱形成という薬力学的反応を引き起こす。伝染性軟属腫の治療に関するカンタリジンの効力を説明する正確な作用機序は不明であるが、投与された表皮のデスモソーム・トノフィラメント複合体の解離によるカンタリジン誘発の棘融解のプロセス及びその結果として形成される表皮内水疱に関連しているとの仮説がある。2.6.2.2 項で詳述するように、正常皮膚における実験的証拠から、カンタリジン局所適用後、中性セリンプロテアーゼの局所活性化が、表皮構造の完全性を維持するために重要な細胞内表皮デスモソームの破壊に関与し、その結果、デスモソームが破壊されると塗布部位に水疱が形成される可能性が示唆されている [1)]。カンタリジンを伝染性軟属腫病巣に適用すると、病巣の下にある表皮が水疱を形成し、病巣の皮膚が剥がれ落ちることにより、ウイルス感染組織が除去されることが示唆されている。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 [2)]、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、ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（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、hERG チャネル電流に対するカンタリジンの作用を検討した（試験番号：[redacted]）。具体的には、生理的条件に近い温度を用い hERG チャネル電流に対するカンタリジンの阻害作用を検討した。検討したカンタリジン濃度範囲（30 及び 300 µM）では、hERG チャネル電流に変化は認められなかった。Verrica 社は、カンタリジンを用いた *in vivo* 安全性薬理試験を実施していない。カンタリジンの対象臓器系への潜在的な有害作用を公表文献から評価し、2.6.2.4 項に要約している。

Verrica 社は、VP-102 又はカンタリジンの薬力学的薬物相互作用試験を実施していない。様々な抗炎症剤によるカンタリジン誘発性炎症の阻害に関する公表文献情報は、2.6.2.5 項に要約している。

Verrica 社が実施したカンタリジンの安全性薬理試験の概要は表 2.6.2-1 に記載した。

表 **2.6.2-1**　　カンタリジンで実施した薬理試験の概要

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Test Article	Study Number (GLP status)
Safety Pharmacology: Cardiovascular	hERG transfected HEK293 cells	*In vitro*	Cantharidin	[redacted] (GLP)

GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene.

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

伝染性軟属腫ウイルス（MCV）の宿主域はヒトに限られているため、MCV の動物モデルはなく、動物モデルを用いたカンタリジンの有効性を評価した公表文献はない。Verrica 社も動物を用いた薬効評価は実施していない。ただし、1950 年代から、カンタリジンはイボ[3]及び伝染性軟属腫の安全な治療薬として臨床的に有効な選択肢であると考えられてきた[4),5)]。

伝染性軟属腫の治療におけるカンタリジンの作用機序は不明である。カンタリジンを局所適用した時の皮膚における薬力学的応答の主作用は水疱形成である。カンタリジンの棘融解活性及び免疫刺激活性に関与する可能性のある細胞及び分子機序は、正常皮膚を用いた実験モデルで検討されているが[1),2)]、これらの試験で記載された機序と VP-102 による軟属腫病巣の治療との関連性は、まだ解明されていない。

Bertaux らは、カンタリジン（0.1 g/mL）を 1～3 時間処理した正常ヒト皮膚組織において、カンタリジン誘発性棘融解の主要な事象は、高密度デスモソームプラークの進行性消失であり、デスモソームからのトノフィラメントの剥離につながることを示した[1)]。この過程及び表皮のケラチノサイト同士を繋ぎ止めているデスモソーム・トノフィラメント複合体の解離が、棘融解と液体で満たされた薄壁の表皮内水疱の形成をもたらす。光学顕微鏡で観察すると、最も早い変化（核周囲領域の密度増加）は扁平上皮層で認められ、次いで基底上皮層及び顆粒層に裂け目が形成された。棘融解が進んでも基底細胞は基底膜に接着したままであった。デスモソームに対するカンタリジンの作用は、中性セリンプロテアーゼ阻害剤であるフルオロリン酸ジイソプロピル及び Nα-*p*-トシル-L-リジンクロロメチルケトンによって阻害され、これはカンタリジンによる棘融解にタンパク質分解機序が関与していることを示している。しかし、他のセリンプロテアーゼ阻害剤（例えば、アプロチニン、フェニルメタンスルホニルフルオリド、L-1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン、大豆トリプシン阻害剤）では、カンタリジンによる棘融解を完全に阻害することができなかったことから、その機序を正確に解明するためには、さらなる研究が必要であることが示唆される[1),6)]。

Day らは、健康なヒトの皮膚に 0.1%のカンタリジン溶液を用いる皮膚水疱形成法について述べ、カンタリジン誘発性皮膚水疱形成は、水疱液から検出可能な急性炎症性免疫応答によって特徴づけられることを示した[2)]。認められた炎症反応には、好中球やマクロファージを中心に、B 細胞、T 細胞、好酸球などの白血球の浸潤が関与し、腫瘍壊死因子-α、インターロイキン-8、C-X-C モチーフケモカインリガンド 5 などのサイトカインやケモカインが含まれていた。カンタリジン塗布後の局所炎症反応がウイルス免疫応答を促進する可能性がある。

本項で要約した試験では、正常皮膚へのカンタリジン局所適用による表皮の棘融解、皮膚水疱形成及び炎症反応を評価した。カンタリジンによって生じる水疱表面の性質は、皮膚の基底層にあるヘミデスモソームに対するカンタリジンの作用がより表面にあるデスモソームと比較して弱いことに関係していると考えられる。VP-102 の臨床開発の根拠となっている治療仮説は、伝染性軟属腫病巣は表皮性であるため、結果として生じる水疱が毛包内腔の感染ケラチノサイトを基底層及びその下の真皮から浮き上がらせ、破壊し、病巣の消失をもたらすというものである。下層の真皮はカンタリジンの影響を受けないので、このプロセスが瘢痕形成を伴わない理由としては、この説明が可能である。

2.6.2.3 副次的薬理試験

カンタリジンは、*in vitro* で多くのヒトがん細胞種に対して強力な抗がん活性を示している [7)]。カンタリジンは、ヒト膀胱がん T24 細胞において G2/M 期の細胞周期停止を誘導し、アポトーシスを誘導することが報告されている [8)]。カンタリジンは、ミトコンドリア依存性のシグナル経路を通じて、ヒト膀胱がん TSGH 8301 細胞のアポトーシスを誘導することが示されている [8)]。公表文献の要約を表 2.6.2-2 に示す。

表 2.6.2-2　　種々のマウス及びヒト腫瘍細胞株に対するカンタリジンの *in vitro* 抗悪性腫瘍活性

Test System	Cantharidin Treatment	Notable Findings	Reference
EAC-transplanted Swiss albino mice	20–100 µg/mL for 12 hr	In cytotoxicity assays, the IC_{50} of cantharidin in EAC cells was 68 µg/mL; the IC_{50} of cantharidin in macrophages, PBMC, thymocytes, and splenocytes was 68, 200, 205, 215, and 280 µg/mL, respectively.	Verma et al., 2013[9)]
A549 cells (human lung carcinoma)	0.5–10 µM for up to 72 hr	The IC_{50} for cantharidin-mediated inhibition of divalent cation-independent protein phosphatase activity was estimated at 0.5 µM. At high concentrations (>10 µM), cantharidin kills >95% of cells in <24 hr. At low concentrations (≤0.1 µM), 72 hr exposure had no effect on cell viability, growth, or morphology. With 48 hr continuous exposure, the LC_{50} of cantharidin was 2 µM.	Bonness et al., 2006[7)]
Hep 3B cells (human hepatocellular carcinoma)	0.1–300 µM continuous treatment for 1 to 72 hr	With 36 h treatment in cytotoxicity assays, the IC_{50} of cantharidin in Hep 3B cells was 2.2 µM; in human normal Chang liver cells, the IC_{50} of cantharidin was 30.2 µM. With 1 hr treatment, the IC_{50} of cantharidin in Hep 3B cells was 52.8 µM.	Wang et al., 2000[10)]
Colo 205 cells (human colorectal cancer cells)	10–40 µM continuous treatment for 24 to 72 hr	With 24 hr exposure, the IC_{50} of cantharidin in colo 205 cells was 20.53 µM. With 20 µM treatment for up to 48 hr, cantharidin induced G2/M phase arrest and increased apopotosis.	Huang et al., 2011[11)]
Multiple Human Tumors	0–10 µM	Cytotoxicity assays with cantharidin against in 60 human tumor cell lines showed IC_{50} values that ranged between 0.1 to 9.7 µM. Cantharidin was cytotoxic in all tumor cell lines.	Kadioglu et al., 2014[12)]

EAC = Ehrich ascites carcinoma; IC_{50} = median inhibitory concentration; LC_{50} = median lethal concentration; PBMC = peripheral blood mononuclear cell.

カンタリジンの抗がん作用には、細胞周期の進行に重要な役割を果たすプロテインホスファターゼに対する作用が関与している。カンタリジンは、あらゆる組織に存在するセリン／スレオニンプロテインホスファターゼ 1 型（PP1）と 2A 型（PP2A）の強力な阻害剤である [13)]。カンタリジンは、PP1（50%阻害濃度［IC_{50}］＝1.7 µM）よりも低濃度で PP2A の活性を阻害し（IC_{50}＝0.16 µM）、比較的高濃度でのみセリン／スレオニンプロテインホスファターゼ 2B 型の活性を阻害する [14)]。全細胞ホモジネートを用いた試験では、カンタリジンはこれらのプロテインホスファターゼのネイティブ型も阻害することが示された。PP2A は多くのほ乳動物組織や植物に存在し、リン酸化ー

脱リン酸化の制御に関与し、様々な細胞機能を調節している。

2.6.2.4 安全性薬理試験

Verrica 社は、カンタリジンの *in vitro* 心血管系安全性薬理試験を 1 試験実施しており（試験番号：[redacted]）、hERG を安定的に発現する HEK-293 細胞を用いて、hERG チャネル電流に対するカンタリジンの作用を評価している。Verrica 社が実施した心血管系安全性薬理試験の概要は表 2.6.2-1 に記載し、詳細は 2.6.2.4.2.1 項に要約した。

カンタリジンの単回経皮投与による作用について、（ICH S7A/S7B ガイダンスで推奨されている）心血管系、中枢神経系及び呼吸機能に対する潜在的な有害作用を評価するための *in vivo* 試験は公表文献にはない。しかしながら、経口投与されたカンタリジンがこのような重要な臓器系に及ぼす作用に関連したエンドポイントは、公表文献に記載された毒性試験で評価されている。カンタリジンの経口投与に関連した中枢神経系、心血管系、腎機能及び平滑筋への全身性作用を評価した単回投与試験が公表文献に記載されており、これらの試験で使用した用量での経口投与による暴露は、局所適用で起こりうる毒性を過大評価している可能性が高い。また、プロテインホスファターゼの阻害作用があるため、*in vitro* 及び *in vivo* の試験でカンタリジンの心血管系機能に対する作用が検討されている。これらの内容について、以下に要約する。

Qualls らによる試験では、雄性 Sprague-Dawley ラットに心拍数、自発運動活性、体温を測定するためのテレメトリー送信機を埋め込み、経口カンタリジン中毒症モデルラットを用いて、馬のカンタリジン中毒症の治療に使用されるいくつかの胃腸療法（ミネラルオイル、活性炭、スメクタイト）について評価を行った[15]。被験物質投与後、24 時間連続して心拍数、体温、活動レベルを記録した。投与後のモニター期間中、24 時間の尿サンプルも採取した。カンタリジンを投与した 8 匹のラットのうち、24 時間のモニター期間が終了するまで生存していたのは 5 匹のみで、カンタリジン群の生存時間（18.13 時間）は対照群の生存時間（24 時間）よりも短かった（$p = 0.01$）。胃腸療法を行った群は本申請に関係ないので、カンタリジン単独投与群（無治療）又は対照群の結果のみを、以下の各臓器系の項にまとめた。

2.6.2.4.1 中枢神経系機能への作用

Qualls らは、24 時間連続記録用のテレメトリー送信器を埋め込んだ雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて、経口カンタリジン中毒症モデルにおける体温及び自発運動活性への影響を検討した[15]。カンタリジン（6.9 mg/kg）をラットに経口投与し、対照投与ラット（生理食塩液）と比較した。その結果、カンタリジン投与ラットの体温は、6 時間で有意に低下し、その体温低下は 24 時間持続した。また、カンタリジン経口投与後 8～20 時間において、自発運動活性も有意に低下したが、他の時点では平均自発運動活性に差は認められなかった。

2.6.2.4.2 心血管系機能への作用

2.6.2.4.2.1 ヒト胚性腎細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対するカンタリジンの作用（試験番号：[redacted]）

安全性薬理試験の目的は、ヒトの心活動電位延長及び危険な心室性不整脈と関連している急速活性型遅延整流カリウムイオン電流（I_{Kr}）に対するカンタリジンの作用を評価することであり、I_{Kr} の代用である hERG チャネル電流に対するカンタリジンの作用を、hERG チャネルを発現する細胞を用いて *in vitro* 試験で検討した（試験番号：[redacted]）。生理的条件に近い温度（33～

35°C）にて、内因性 I_{Kr} を欠き、hERG cDNA を安定発現した HEK-293 細胞において、hERG チャネル電流振幅に対するカンタリジンの効果を評価した。0.3%ジメチルスルホキシド（DMSO）を含む HEPES（2-［4-（2-ヒドロキシエチル）ピペリジン-1-イル］エタンスルホン酸）緩衝生理食塩水（HB-PS）を媒体として調製したカンタリジンを用い、30 μM 又は 300 μM で検討した。カンタリジンの各濃度で測定した hERG チャネル電流の阻害率の要約を表 2.6.2-3 に記載した。

表 2.6.2-3　　カンタリジンの各濃度における hERG チャネル電流の阻害率

Cantharidin Concentration (μM)	N	Percent Inhibition (%)		
		Mean	SD	SEM
0	3	2.1	0.6	0.4
30	3	1.9	0.5	0.3
300	3	3.5	0.8	0.4

hERG = human ether-à-go-go related gene; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean.

対照処理（HB-PS+DMSO）細胞における hERG チャネル電流の阻害率 2.1 ± 0.4%（平均 ± 標準誤差；n = 3）と比較すると、カンタリジンは hERG チャネル電流を 30 μM で 1.9 ± 0.3%、300 μM で 3.5 ± 0.4%阻害した。カンタリジン（30 又は 300 μM）による hERG の阻害は、媒体対照群の値と比較した場合、統計的に有意ではなかった（P > 0.05）。陽性対照のテルフェナジンは、60 nM で hERG チャネル電流を 84.4 ± 1.3%（平均 ± 標準誤差；n ＝ 2）阻害した。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} 値は 300 μM 以上であると推定された。

以上の結果から、膜電位を固定した hERG 安定発現 HEK293 細胞におけるイオン電流に対するカンタリジンの *in vitro* 試験では、生理的条件に近い温度において、検討したカンタリジンの 2 つの濃度（30 及び 300 μM）のいずれにおいても、対照群と比較して、hERG チャネル電流に有意な変化は認められなかった。

2.6.2.4.2.2 カンタリジンの心血管系機能に対する作用（公表文献に記載された試験より）

In vitro 試験

単離モルモット乳頭筋にカンタリジンを直接添加すると、正の変力作用が生じた [16]。ヒト心筋組織の単離ストリップを用いた *in vitro* 試験でも同様の反応が報告されている [17]。カンタリジンの正の変力作用は、いくつかの調節タンパク質のリン酸化状態を増加させることによって媒介されると考えられる。これらの試験結果は表 2.6.2-4 にまとめられている。

表 2.6.2-4　　単離心筋組織標本に対するカンタリジンの作用

Tissue	Concentration	Results	Reference
Guinea Pig Papillary Muscle	1 to 100 µM	Dose-dependent increase in force of contraction of papillary muscle but did not affect chronotropic effect in spontaneously beating atria. The IC_{50} for inhibition of phosphatase type I activity was 2.7 µM and for type II was 0.13 µM.	Neumann et al., 1995[16]
Human Right Ventricular Trabeculae Carneae	0 to 300 µM	Cantharidin did not affect time parameters of contraction. Positive inotropic effect seen at ≥100 µM for both failing and non-failing cardiac tissues. The IC_{50} for phosphatase activity was 3 µM in failing and non-failing heart tissue.	Linck et al., 1996[17]

IC_{50} = median inhibitory concentration

カンタリジンは、内皮の有無にかかわらず、ウシ摘出冠動脈輪の自然張力を時間及び濃度依存的に増加させ、50%有効濃度の負の対数である pEC_{50} 値は両標本でそれぞれ 5.1 及び 5.2 であった[18]。カンタリジン（10～30 µM）は、ホスファターゼ活性阻害により制御タンパク質のリン酸化状態を増加させることにより、ウシ平滑筋標本を収縮させた[19]。

In vivo 試験

Qualls らは、24 時間連続記録用のテレメトリー送信器を外科的に埋め込んだ雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて、経口カンタリジン中毒症のモデルラットにおける心血管系機能（心拍数）に対する作用を検討した[15]。対照ラット（生理食塩液投与）と比較して、カンタリジン（6.9 mg/kg、強制経口投与）を投与したラットでは、心拍数は記録したすべての期間において変化は、なかった。

別の試験では、覚醒ウサギにカンタリジン（1.3～1.9 mg/kg）を静脈内投与したところ、投与直後に ST 低下及び 30～60 分以内に心室性期外収縮、心室頻拍、心室細動がみられ、心停止に至った[20]。なお、0.6 又は 1.1 mg/kg の静脈内投与では、心電図（ECG）に影響は認められなかった。

2.6.2.4.3 腎機能に対する作用

Qualls らは、経口カンタリジン中毒症モデルラットにおいて、代謝ケージに個別に収容した雄性 Sprague-Dawley ラットの 24 時間尿サンプルを採取し、摂水量及び尿量への影響を検討した[15]。対照ラット（生理食塩液）と比較して、カンタリジン（6.9 mg/kg、強制経口投与）を投与したラットでは、尿量が 16.0 mL から 9.3 mL に有意（$p < 0.02$）に減少した。摂水量もカンタリジン投与ラットで有意な減少を示した。カンタリジンを投与したラットの腎臓を顕微鏡で観察したところ、近位尿細管の拡張が認められ、尿細管内の好酸球性タンパク質も増加していた。

2.6.2.4.4 平滑筋への作用

神経筋接合部におけるシナプス伝達に対するカンタリジン（1～100 µM）の作用をマウスで検討した[21]。カンタリジンは、横隔膜筋の電気刺激によって誘発される収縮力をほぼ完全に抑制し（IC_{50} = 13 µM）、高カリウム及びリアノジンによって誘発される収縮を 70%以上抑制した。筋細胞膜の機能を破壊するカルディオトキシンによる収縮は抑制されなかった。カンタリジンは終板

電位をほぼ完全に阻害した（IC_{50} = 9 μM）。これらの結果は、カンタリジンがシナプス小胞の動員を阻害し、筋小胞体からのカルシウム放出を抑制すること、及びプロテインホスファターゼが運動機能の調節に関与していることを示唆している。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

Verrica 社は VP-102 又はカンタリジンとの薬力学的薬物相互作用試験を実施していない。カンタリジンの経皮適用に関する薬力学的薬物相互作用試験は公表文献にはなかったが、カンタリジンの経皮適用後の炎症反応を抑制する様々な薬物の作用を検討した試験がある。

カンタリジン（400 μg）の経皮投与に関連したラットの耳の局所（皮膚）炎症は、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロンの局所投与により減少した[22)]。これらの薬物の経口又は皮下投与では、局所投与でみられたような抗炎症効果は得られなかった。カンタリジンの経皮投与による炎症に対する抗炎症作用の可能性を試験したところ、その他の薬剤（コレステロール、ジフェンヒドラミン、トリペレナミン、クロルフェニラミン、プロメタジン、シプロヘプタジン、エピネフリン、フェニレフリン、α-トコフェロール、インドメタシン、及びブフェキサマック）は、ラットの耳介の局所炎症に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

カンタリジンの薬理作用は既知であり、公表文献に記載されているため、Verrica 社は VP-102 又はカンタリジンを用いた非臨床での効力を裏付ける *in vitro* 及び *in vivo* 試験は実施していない。ポックスウイルス（伝染性軟属腫の原因ウイルス）の種特異性のため、伝染性軟属腫に対するカンタリジンの薬理学的有効性を評価するための適切な動物モデルは存在しない。皮膚伝染性軟属腫（ポックスウイルス）及びウイルス性疣贅のヒトパピローマウイルスに対するカンタリジンの有効性は、これまでの広範な臨床使用実績によって示唆されている。カンタリジンの作用機序は正確には解明されていないが、皮膚における水疱形成の薬力学的反応に関連していることが示唆されている。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して表皮のデスモソームの機能を弱め、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。伝染性軟属腫の治療では、カンタリジンを局所適用すると、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考えられている。さらに、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いることが示唆されている。水疱液中には浸潤白血球と炎症性サイトカインの存在が検出されており、炎症性物質によるウイルス免疫応答の促進がカンタリジンの軟属腫に対する有効性に寄与している可能性がある。

Verrica 社は、膜電位固定タイプの hERG 安定発現 HEK-293 細胞におけるイオン電流に対するカンタリジンの作用を評価した *in vitro* 安全性薬理試験を実施した。カンタリジン（30 及び 300 μM）は、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。この結果からカンタリジンは、ヒトにおける暴露量よりもはるかに高用量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。

Verrica 社は VP-102 又はカンタリジンの *in vivo* 安全性薬理試験を実施していない。Verrica 社が実施した第 II 相臨床暴露試験（試験番号：VP-102-103）及び当社が実施した TO-208 臨床薬理試験（208-1-1 試験）結果から、VP-102 の局所投与では、カンタリジンは容易に全身循環に移行しないことが示されている。カンタリジンの重要臓器系への作用を評価した公表文献では、全身暴露によるカンタリジンの薬力学的有害作用の可能性を評価しており、その大部分は心血管系に焦点を当てたものである。ラットにカンタリジンを経口投与（6.9 mg/kg ; 41.4 mg/m^2）したところ、ECG 波形及び心機能に影響がみられたが、これはプロテインホスファターゼに対する阻害作用に関連していると考えられる。カンタリジンは血管収縮薬でもあり、単回経口投与による尿量減少の原因とも考えられる。しかし、カンタリジンは、プロテインホスファターゼに対する阻害作用を介して、腎血管及び尿細管上皮に直接作用する可能性がある。カンタリジンは中枢神経機能にも作用する可能性があるが、自発運動量の減少や体温の低下が、高用量で認められた心血管系の症状による二次的なものかどうかは不明である。

以上のことから、カンタリジンは伝染性軟属腫の治療に安全かつ有効な薬剤として使用できると考えられる。

2.6.2.7 図表

関連する各項目の本文中に記載した。

参考文献

1) 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）

2) 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）

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

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

5) 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）

6) Stoughton RB, Bagatell F. The nature of cantharidin acantholysis. J Invest Dermatol. 1959;33:287-292.（4.3 参考文献 36）

7) Bonness K, Aragon IV, Rutland B, Ofori-Acquah S, Dean NM, Honkanen RE. Cantharidin-induced mitotic arrest is associated with the formation of aberrant mitotic spindles and lagging chromosomes resulting, in part, from the suppression of PP2Aalpha. Mol Cancer Ther. 2006;5(11):2727-2736.（4.3 参考文献 37）

8) Kuo JH, Chu YL, Yang JS, Lin JP, Lai KC, Kuo HM, et al. Cantharidin induces apoptosis in human bladder cancer TSGH 8301 cells through mitochondria-dependent signal pathways. Int J Oncol. 2010;37(5):1243-1250.（4.3 参考文献 38）

9) Verma AK, Prasad SB. Antitumor effect of blister beetles: an ethno-medicinal practice in Karbi community and its experimental evaluation against a murine malignant tumor model. J Ethnopharmacol. 2013;148(3):869-879.（4.3 参考文献 39）

10) Wang CC, Wu CH, Hsieh KJ, Yen KY, Yang LL. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. Toxicology. 2000;147(2):77-87.（4.3 参考文献 40）

11) Huang WW, Ko SW, Tsai HY, Chung JG, Chiang JH, Chen KT, et al. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways. Int J Oncol. 2011;38(4):1067-1073.（4.3 参考文献 41）

12) Kadioglu O, Kermani NS, Kelter G, Schumacher U, Fiebig HH, Greten HJ, et al. Pharmacogenomics of cantharidin in tumor cells. Biochem Pharmacol. 2014;87(3):399-409.（4.3 参考文献 42）

13) 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）

14) 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）

15) 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）

16) 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）

17) 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）

18) Knapp J, Boknik P, Linck B, Luss H, Muller FU, Nacke P, et al. The effect of the protein phosphatases inhibitor cantharidin on beta-adrenoceptor-mediated vasorelaxation. Br J Pharmacol. 1997;120(3):421-428.（4.3 参考文献 43）

19) Knapp J, Boknik P, Huke S, Gombosova I, Linck B, Luss H, et al. Contractility and inhibition of protein phosphatases by cantharidin. Gen Pharmacol. 1998;31(5):729-733.（4.3 参考文献 44）

20) 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）

21) Hong SJ. Inhibition of mouse neuromuscular transmission and contractile function by okadaic acid and cantharidin. Br J Pharmacol. 2000;130(6):1211-1218.（4.3 参考文献 45）

22) 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）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study Number (GLP Status)	CTD Location
Primary Pharmacodynamics	Not applicable				
Secondary Pharmacodynamics	Not applicable				
Safety Pharmacology - CNS	Not applicable				
Safety Pharmacology - Respiratory	Not applicable				
Safety Pharmacology - Cardiovascular	hERG-transfected HEK293 cells	*In vitro*	[redacted]	[redacted] (GLP)	4.2.1.3
Pharmacodynamic Drug Interactions	Not applicable				

CNS = central nervous system; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Verrica 社は、VP-102 又はカンタリジンのいずれについても in vitro 及び in vivo の効力を裏付ける試験を実施していない。公表文献に記載されているカンタリジンの効力を裏付ける試験に関する情報は 2.6.2.2 項に要約している。

2.6.3.3 副次的薬理試験

Verrica 社は、VP-102 又はカンタリジンの副次的薬理試験を実施していない。公表文献に記載されているカンタリジンの副次的薬理試験に関する情報は、2.6.2.3 項に要約している。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Study Number (GLP status)	Organ System Evaluated	Species/Strain (Number/group)	Method of Administration	Dose Levels	Major Findings
[redacted] (GLP)	Cardiovascular	hERG-transfected HEK293 cells	*In vitro*	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, a value that was significantly greater than the maximum concentration observed in the plasma of patients treated topically with VP-102 in clinical study VP-102-103 (0.017 µM).

GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IC50 = median inhibitory concentration;
SEM = standard error of the mean.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

Verrica 社は、VP-102 又はカンタリジンとの薬力学的薬物相互作用試験を実施していない。公表文献に記載されているカンタリジンとの薬物相互作用に関する情報は 2.6.2.5 項に要約している。