2.6.6 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
BLOQ	below the limit of quantitation	定量下限未満
CP	cyclophosphamide	シクロホスファミド
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
DMBA	dimethylbenzanthracene	ジメチルベンズアントラセン
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
EM	electron microscopy	電子顕微鏡
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
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
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IND	Investigational New Drug application	米国における治験届け
K+MN	micronuclei in the presence of kinetochore staining	動原体染色陽性小核
LD_{50}	median lethal dose	50%致死量
MCA	20-methylcholanthrene	メチルコラントレン
MMC	mitomycin C	マイトマイシン C
MN	micronuclei	小核
NDA	New Drug Application	米国における新薬承認申請
NS	not specified	記載なし
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*	ネズミチフス菌
VB	vinblastine	ビンブラスチン

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

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）を開発したカンタリジンは、ツチハンミョウ由来の脂溶性天然化合物であり、軟属腫や尋常性疣贅を含む皮膚疾患の治療に数十年にわたって外用剤として広く用いられてきた [1)]。米国では、カンタリジンは 1950 年代から伝染性軟属腫や疣贅の治療のために配合剤として広く利用されている。

カンタリジンには長年に使用実績があるため、Verrica 社によるカンタリジンの毒性試験の実施は限定的である。公表文献に記載された動物試験でのカンタリジンの毒性及び Verrica 社が実施した遺伝毒性試験の情報を本項にまとめた。また、カンタリジンのヒトでの使用実績から、カンタリジンの急性経皮暴露によって発現する有害所見は、主に炎症、刺激性及び水疱形成などの皮膚における局所反応に限られている。

規制当局（米国食品医薬品局：FDA）との議論に基づき、カンタリジンの局所適用に関する毒性評価のため、Verrica 社は、*in vitro* 遺伝毒性試験（GLP 基準試験）を実施した。

遺伝毒性試験として、細菌を用いた復帰突然変異試験（試験番号：[redacted]）及びほ乳類細胞を用いた小核試験（試験番号：[redacted]）を実施した。Ames 試験では、代謝活性化系存在下又は非存在下で最高 5,000 µg/plate の用量まで評価した結果、カンタリジンに変異原性は認められなかった。小核試験では、カンタリジンの小核誘発作用を調べるため、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用い、代謝活性化系存在下又は非存在下の 4 時間処理で最高 6 µg/mL の濃度まで、代謝活性化系非存在下の 27 時間処理で最高 2.5 µg/mL の濃度まで評価した。その結果、カンタリジンによる小核誘発の増加が認められた。その後の CREST 染色による解析により、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誘発することが示唆された。ヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いたカンタリジンの *in vitro* ほ乳類細胞染色体異常試験（試験番号：[redacted]）も実施したが、染色体の中期分裂像に過度な凝集及び変形を誘発し、適切な染色体評価ができなかったため、早期に試験を中止した。

VP-102（カンタリジン）の毒性試験戦略に関連する規制動向、規制当局対応及び規制当局との相談履歴の要約、並びに VP-102 の非臨床試験内容を裏付けるために Verrica 社が実施した毒性試験の概略を以下に示す。なお、非臨床毒性試験戦略の概略については、後述 2.6.6.1.1 項の非臨床毒性試験に関する規制当局との相談履歴及び 2.6.6.1.2 項の委託毒性試験の概要を参照のこと。

2.6.6.1.1 非臨床毒性試験に関する規制当局（FDA）との相談履歴

以下のリストには、VP-102 の非臨床試験及び非臨床において要求される毒性試験に関連する FDA との相談履歴の要約、Verrica 社が実施した試験対応、及び Verrica 社と FDA との交信記録を含む。

- 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、[redacted]相談[redacted]

[redacted]

- 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、[redacted]
- 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、[redacted]
- 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、[redacted]
- 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日：[redacted]
- 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、[redacted]

2.6.6.1.2 委託毒性試験の概要

Verrica 社が実施したカンタリジンの毒性試験の概要を表 2.6.6-1 に示す。毒性試験に使用した GMP 適合原薬ロットは 2.6.7 項（表 2.6.7-4）に要約した。必要に応じて公表文献に記載されたカンタリジンの毒性試験の要約を示す。

表 2.6.6-1　　Verrica 社が委託した毒性試験の概要

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Test Article	Study Number (GLP status)
Genetic toxicity: bacterial reverse mutation assay	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and *E. coli* WP2 *uvr*A	*In vitro*	Cantharidin	[redacted] (GLP)
Genetic toxicity: mammalian cell chromosomal aberration assay	Human peripheral blood lymphocytes	*In vitro*	Cantharidin	[redacted] (GLP)
Genetic toxicity: mammalian cell micronucleus assay	Human lymphoblastoid TK6 cells	*In vitro*	Cantharidin	[redacted] (GLP)

E. coli = *Escherichia coli*; GLP= Good Laboratory Practice; *S. typhimurium* = *Salmonella typhimurium*.

2.6.6.2 単回投与毒性試験

Verrica 社は、VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いた単回投与毒性試験を実施していない。カンタリジンを用いて実施され、公表文献に記載されている単回投与毒性試験を本項に要約する。これらの試験は、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。

マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いてカンタリジンを経皮、経口、静脈内又は腹腔内投与した単回投与毒性試験に関する公表文献を表 2.6.6-2 にまとめた。

表 2.6.6-2　　公表文献におけるカンタリジンの単回投与毒性試験の概要

Route of Administration	Species/Sex/Strain	Test Article (Vehicle)	Dose(s)	Notable Findings	Reference
Dermal	Mouse/male/Swiss-Webster	Cantharidin (acetone)	25 µg	Maximal inflammation (edema) observed at 8 hr, which decreased by 48–72 hr.	Swingle et al., 1981[5)]
	Mouse/male/Swiss-Webster	Cantharidin (acetone)	0, 2.5, 6.25, 25, 62.5, or 125 µg	≥2.5 µg (0.1 mg/kg) applied to the ear caused dose-dependent local edema. Maximal response observed at 62.5 µg, occurred at 24 hr and present for 168 hr.	Tarayre et al., 1984[6)]
	Mouse/male/CD-1	Cantharidin (acetone)	0, 12.5, 18, or 25 µg	25 µg applied to the ear produced edema and blisters at 6 hr; edema and neutrophils peaked at 16 hr; ulcers by 24 hr; re-epithelization by 120 hr; granular tissue by 148 hr. No difference in edema response with 12.5, 18.5, or 25 µg of cantharidin.	Ivetic et al., 2012[7)]
	Rat/male/CD	Cantharidin (ethanol, collodion, acetone, anhydrous diethyl ether)	25–1,000 µg	At the site of application (ear), no edema (based on ear punch weight [index of inflammation] at 72 hr) with 25 µg, slight edema with 50 µg, and maximum response observed at 400 µg.	Boris et al., 1977[8)]
Oral	Rat/male/Sprague-Dawley	Cantharidin	6.9 mg/kg	Mortality occurred in 3 of 8 animals. Exposure to cantharidin resulted in decrease in locomotor activity and body temperature; decrease in urine volume; acantholysis of the non-glandular epithelium of the stomach and dilatation of the proximal tubule, which often contained increased amounts of intraluminal eosinophilic proteinaceous material.	Qualls et al., 2013[9)]
	Rat/male/Sprague-Dawley	Cantharidin	0.1 mg/kg	Gastrointestinal mucous membrane irritation with cantharidin exposure.	Dang et al., 2013[10)]
	Rabbit/sex and strain NS	Cantharidin (carbowax:tap water [3:2])	20 mg/kg	Mortality within 120 to 180 min from ventricular fibrillation. Tissue analysis showed a significant reduction in calcium concentration in the kidney, stomach, urinary bladder and spleen, but no changes were demonstrated in the esophagus, small intestine, liver, lung, heart, or skeletal muscle. Hematocrit and hemoglobin were significantly raised by the end of the first hour post-treatment and remained elevated until death. Whole blood glucose and lactate were significantly elevated at 30 min. Glucose declined and lactic acid increased prior to death. Animals died in a severe metabolic acidosis, with significantly reduced plasma bicarbonate and partial pressure of carbon dioxide.	Rolf et al., 1985[11)]

表 2.6.6-2　　公表文献におけるカンタリジンの単回投与毒性試験の概要（続き）

Route of Administration	Species/Sex/Strain	Test Article (Vehicle)	Dose(s)	Notable Findings	Reference
Intravenous	Rabbit/albino	Cantharidin	0.6 to 1.9 mg/kg	At ≥1.3 mg/kg, no animals survived with time to death ranging from 6 hr (1.3–1.5 mg/kg) to 2 hr (1.9 mg/kg). ST depression noted shortly after injection at 1.3–1.5 mg/kg or more leading to fatal cardiac arrhythmias within 30 to 60 min. Little to no changes were observed in kidney, liver, or lung and little change in blood pressure or electrolytes of these animals. A dose-dependent change in left ventricular myocardial mitochondrial size and nuclear chromatic clumping was noted with EM.	Rabkin et al., 1979[12)]
	Rabbit/albino	Cantharidin	0.6 to 1.9 mg/kg	As a continuance of Rabkin et al., EM evidence of the cardiotoxicity observed with cantharidin was further resolved. No correlation was found between the EM changes and light-microscopic features as assessed by special histological stains.	Friesen et al., 1979[13)]
	Dog/male/Beagle	Cantharidin	34 µg/kg	No adverse events reported over the 5-hr duration of the study.	Dang et al., 2009[14)]
Intraperitoneal	Mouse/sex NS/White	Cantharidin (in ethyl acetate and water)	62.5 mg/kg	Marked inflammation and unable to stand; mesenteric infiltration of polymorphonuclear leucocytes, erythrocytes, and fibrin deposits within 1 hr, peaked at 24 to 48 hr, and receded by 72 hr.	Wolf 1923[15)]
	Mouse/male/Swiss-Webster	Cantharidin	10 mg/kg	Within 20 min, lethargy and bradypnea, followed by prone position and intermittent running. Breathing became progressively more labored until death, usually within 60 to 90 min. At necropsy, enlarged and congested livers; increased hepatic glycogenolysis. At 2 mg/kg (sub-lethal dose), similar clinical signs were observed after several hours.	Graziano et al., 1987[16)]
	Mouse/male/Swiss-Webster	Cantharidin	0, 1, 3, or 10 mg/kg	≥3 mg/kg: moderate to severe toxicity within 30 minutes. This appears related to inhibition of a liver cytosolic binding site.	Graziano et al., 1987[17)]
	Mouse/male/Swiss-Webster	Cantharidin	NS	LD_{50} = 1.0 ± 0.4 mg/kg	Matsuzawa et al., 1987[18)]
	Mouse/sex and strain NS	Cantharidin	NS	LD_{50} = 1 mg/kg	Li et al., 1992[19)]
	Rat/male/Albino	Cantharidin	36.36 mg/kg	Severe and extensive damage to epithelial cells (cytolysis, disruption of structure, separation of cells) of the kidney, liver, esophagus, stomach, small intestine, large intestine, bladder, and ureters, within 10 min.	Bagatell et al., 1969[20)]

EM = electron microscopy; LD50 = median lethal dose; NS = not specified.

2.6.6.3 反復投与毒性試験

Verrica 社は、VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いた反復投与毒性試験を実施していない。動物を用いた反復投与毒性試験に関する情報は、公表文献からは得られなかった。カンタリジンの長年にわたるヒトでの使用実績及びカンタリジンが有する強い毒性から、動物を用いてカンタリジンの反復投与し、全身暴露した毒性評価を実施することは倫理上、非常に困難である。なお、FDA は VP-102 を用いて反復毒性試験が必要ないことに合意している。詳細は 2.6.6.1.1 項の非臨床毒性試験に関する規制当局（FDA）との相談履歴を参照のこと。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

Verrica 社は、VP-102 外用液剤の有効成分であるカンタリジンについて、*in vitro* 遺伝毒性試験を実施した（表 2.6.6-1）。細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳類細胞を用いた小核試験は評価可能であったが、ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験は、評価可能な染色体像が十分に得られなかったため、中止した。

2.6.6.4.1 In Vitro 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1.1 カンタリジンの細菌を用いた復帰突然変異試験

カンタリジンの変異原性評価を目的とし、ICH S2(R1)ガイダンスに準拠した GLP 適用の細菌を用いた復帰突然変異試験（試験番号：[redacted]）を実施した。試験では、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（Aroclor 1254 で酵素誘導したラット肝 S9 を含む）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調べた。

変異原性試験の用量選択のために細胞毒性を調べる予備試験を実施した。変異原性試験は、1 用量につき 3 プレートを用いて 1 回実施した。媒体及び陰性対照としてジメチルスルホキシド（DMSO）を、各試験菌株の陽性対照として 2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、メチルメタンスルホネート及び 2-アミノアントラセンを用いた。

細胞毒性を調べる予備試験では、以下の用量のカンタリジンを用いた：6.67、10.0、33.3、66.7、100、333、667、1,000、3,333 及び 5,000 µg/plate。予備試験では、析出物や背景細菌叢の生育阻害は認められなかったため、変異原性試験の最高用量は 5,000 µg/plate とした。

本試験である変異原性試験では、以下の用量のカンタリジンを用いた：15.0、50.0、150、500、1,500 及び 5,000 µg/plate。試験の結果、析出物も生育阻害も認められず、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての試験菌株で変異原性は認められなかった。

結論として、複数のネズミチフス菌及び大腸菌のアミノ酸要求性変異株を用いた復帰突然変異試験において陰性結果が得られたため、カンタリジンは変異原性を有さないと考えられた。

2.6.6.4.1.2 カンタリジンのほ乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

カンタリジンの染色体異常誘発作用を評価することを目的とし、GLP 適用のほ乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験（試験番号：[redacted]）を実施した。試験では、HPBL を用い、代謝活性化系（Aroclor 1254 で酵素誘導したラット肝 S9 分画を含む）の存在下及び非存在下で、カンタリジンの構造異常及び異数性誘発能を調べた。被験物質媒体混合液を培養液中に添加し、代謝活性化系の存在下又は非存在下で 4 時間、代謝活性化系の非存在下で 20 時間、細胞を処理した。

予備毒性試験では、カンタリジンを 0.0196～196 µg/mL（1 mM）の濃度で処理した。すべての処理条件において、196 µg/mL では処理開始時に目視で沈殿が確認されたが、処理終了時には認められなかった。代謝活性化系非存在下の 4 及び 20 時間処理では少なくとも 5.88 µg/mL で、代謝活性化系存在下の 4 時間処理では少なくとも 19.6 µg/mL で、分裂指数が媒体に比べて少なくとも 45%低下する細胞毒性が認められた。

予備毒性試験の結果に基づき、染色体異常試験では以下の濃度を用いた：代謝活性化系存在下及び非存在下の 4 時間処理（0.5、1、2、4、5、6、8、10 及び 15 μg/mL）、代謝活性化系非存在下の 20 時間処理（0.1、0.5、1、2、2.5、3、3.5、4 及び 5 μg/mL）。染色体異常試験では、細胞毒性が 50±5%未満の複数の濃度で、染色体の中期分裂像に過度な凝集及び変形が認められた。これらの濃度で観察された染色体は評価に適さず、更に、より低濃度の標本観察は ICH S2(R1)ガイダンスに記載された有効な試験法の基準を満たさないため、試験を中止した。

HPBL を用いた染色体異常試験はこの被験物質評価には適さないことが判明した。そこで、カンタリジンの染色体異常誘発能を評価するため、追加でほ乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験を実施した（2.6.6.4.1.3 項）。

2.6.6.4.1.3 カンタリジンのほ乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験

カンタリジンの染色体異常誘発作用を評価することを目的とし、GLP 適用のほ乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験（試験番号：[redacted]）を実施した。試験では、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、カンタリジンの小核誘発能を調べた。

予備毒性試験において、代謝活性化系存在下及び非存在下の 4 時間処理では 5.88 μg/mL 以上の濃度で、代謝活性化系非存在下の 27 時間処理では 1.96 μg/mL 以上の濃度で、相対的な細胞集団倍化数が対照群に比べて 45%以上減少した。これらの結果に基づき、小核試験の処理濃度は、代謝活性化系存在下及び非存在下の 4 時間処理では 1～6 μg/mL、代謝活性化系非存在下の 27 時間処理では 0.5～2.5 μg/mL とした。

本試験である小核試験において、代謝活性化系非存在下の 4 時間処理では 3.5 μg/mL 以上、代謝活性化系存在下の 4 時間処理では 5 μg/mL 以上、代謝活性化系非存在下の 27 時間処理では 1.6 μg/mL 以上の濃度で細胞毒性が認められた。顕微鏡観察を行った濃度は、2、3 及び 3.5 μg/mL（代謝活性化系非存在下 4 時間処理）、3.5、5 及び 5.5 μg/mL（代謝活性化系存在下 4 時間処理）並びに 1、1.4 及び 1.6 μg/mL（代謝活性化系非存在下 27 時間処理）であった。

代謝活性化系非存在下の 4 時間処理では、3.5 μg/mL の濃度で、媒体と比較して小核誘発の有意な増加が認められた（1.40%対 0.55%；$p \leq 0.01$、フィッシャーの正確確率検定）。陽性対照のマイトマイシン C（MMC、0.12 μg/mL）は小核誘発を有意に増加した（4.20%；$p \leq 0.01$、フィッシャーの正確確率検定）。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、媒体と比較して小核誘発の有意な増加が認められた（1.20%対 0.60%；$p \leq 0.05$、フィッシャーの正確確率検定）。陽性対照のシクロホスファミド（CP、4.0 μg/mL）は小核誘発を有意に増加した（2.50%；$p \leq 0.01$、フィッシャーの正確確率検定）。代謝活性化系非存在下の 27 時間処理では、1、1.4 及び 1.6 μg/mL の濃度で、濃度依存的、且つ、媒体（0.65%）と比較して有意な小核誘発の増加（それぞれ 1.25%；$p \leq 0.05$、1.35%；$p \leq 0.05$ 及び 2.25%；$p \leq 0.01$、フィッシャーの正確確率検定）が認められた。陽性対照のビンブラスチン（VB、12 ng/mL）は小核誘発を有意に増加した（4.40%、$p \leq 0.01$、フィッシャーの正確確率検定）。

その後の CREST 染色による解析では、代謝活性化系非存在下及び存在下の 4 時間処理において、それぞれ 3.5 及び 5.5 μg/mL の濃度で認められた小核のうち、それぞれ 70.0%及び 88.0%が動

原体染色陽性小核（K+MN）であった。代謝活性化系非存在下の 27 時間処理において、1.4 及び 1.6 µg/mL の濃度で認められた小核のうち、それぞれ 83.0%及び 88.0%が K+MN であり、高頻度の K+MN が確認された。これらカンタリジンの成績は、染色体の異数性を誘発する陽性対照（VB）の K+MN 出現率（91.0%）と一致し、染色体の構造異常を誘発する陽性対照（MMC 及び CP）の K+MN 出現率（それぞれ 29.0%及び 36.0%）とは対照的であった。このことは、カンタリジンが染色体に間接的な影響を及ぼした結果である異数性誘発メカニズムによって小核を誘発することを示唆している。

2.6.6.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験

Verrica 社による VP-102 外用液剤及びカンタリジンを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験は実施されていない。公表文献には、カンタリジンの *in vivo* 遺伝毒性に関する情報はなかった。カンタリジンの強い毒性と長年にわたるヒトでの使用実績を考慮すると、カンタリジンの全身暴露を目的とした経口又は非経口投与による *in vivo* 遺伝毒性試験を実施することは困難であり、たとえ実施したとしても試験結果の科学的価値は限定的と考えられる。20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開催された[redacted]（20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、[redacted]）とともに[redacted]20[redacted]年[redacted]月[redacted]日[redacted]詳細は 2.6.6.1.1 項の非臨床毒性試験に関する規制当局（FDA）との相談履歴を参照のこと。

2.6.6.5 がん原性試験

Verrica 社は VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いたがん原性試験を実施していない。

Verrica 社は、ICH M3(R2)及び ICH S1A に記載されたガイダンスを参照し、カンタリジンの発がん性を評価する試験は以下の理由から不要と考えている：(1) VP-102 の適用頻度が低く間欠的であるため、カンタリジンへの暴露期間及び暴露量が限定的であること、(2) VP-102 の局所適用によるカンタリジンへの全身暴露はごくわずかであること、(3) カンタリジンの遺伝毒性試験の結果から発がん性に関する懸念要因がないこと、(4) ヒトにおけるカンタリジンの長年の使用実績から、発がん性に関する懸念要因がないこと、(5) カンタリジンの発がん性を評価した動物試験が、公表文献として報告されていること。加えて、FDA は、*in vitro* 遺伝毒性試験以外の非臨床試験を実施する必要がないことを承認した。以上のことから、本項では、公表文献に記載されたカンタリジンの発がん性を評価した動物試験の結果を要約する。

成熟雌 Rockland マウス（1 群 15 例）に既知の皮膚発がん物質である多環芳香族炭化水素のジベンズアントラセン（0.3%、媒体：ベンゼン）又はベンゾピレン（0.3%、媒体：ベンゼン）を皮膚に週 2 回（火及び木曜日）、37 週間塗布するイニシエーション／プロモーション試験を実施した[21)]。一部の群にはカンタリジン（0.3%、媒体：アセトン）を皮膚に週 3 回（月、水及び金曜日）塗布した。カンタリジンは既知の皮膚発がん物質による皮膚腫瘍形成（乳頭腫及び癌腫）を抑制した。ジベンズアントラセン及びベンゾピレン単独塗布群で乳頭腫が認められた動物数はそれぞれ 8 及び 14 例であり、癌腫が認められた動物数はそれぞれ 4 及び 14 例であった。ジベンズアントラセン＋カンタリジン群及びベンゾピレン＋カンタリジン群で乳頭腫が認められた動物数はそれぞれ 2 及び 1 例であり、癌腫は両群とも認められなかった。なお、この試験にはカンタリジン単独投与群は設定されていない。また、カンタリジンは多環芳香族炭化水素の皮膚への結合を阻害する可能性のあることが示された。

カンタリジンのげっ歯類における発がん性に関する既存の情報は、既に国際がん研究機関（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（Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man）」[22)]で評価されている。IARC で評価された試験を以下に要約した。

hr/hr ヘアレスマウス（8～10 週齢）を用いたカンタリジンの発がん性評価試験では、カンタリジン溶液（0.016%又は 0.032%、媒体：ベンゼン）を背部皮膚に刷毛で週 2 回、10 週間塗布した短期塗布試験（0. 032%カンタリジン）及び一生涯にわたって塗布した長期塗布試験（0.016%カンタリジン）が行われている[23)]。長期塗布試験では、カンタリジンの発がんプロモーターとしての作用についても評価するため、マウスに 20-メチルコラントレン（MCA、0.1%、媒体：ベンゼン）で発がんイニシエーションを行った後、カンタリジンをカンタリジン単独群と同様に塗布する並行投与群を設定した。

短期塗布試験では、ヘアレスマウス（雌雄各 15 例）にカンタリジン（0.032%、媒体：ベンゼン）を週 2 回、10 週間（合計 20 回）塗布し、その後動物を一生涯にわたって観察した。その結果、12 ヵ月目に背部皮膚に乳頭腫が 1 個認められた。

長期塗布試験では、ヘアレスマウスにカンタリジン（0.016%、媒体：ベンゼン）を週 2 回、マウスの一生涯に相当する 2 年間にわたって塗布した。また、対照群としてベンゼンのみを塗布す

る群を設けた試験を別途実施した。並行投与群では、カンタリジンの発がんプロモーターとしての作用を評価するために、ヘアレスマウスに MCA（0.1%、媒体：ベンゼン）を塗布しイニシエーションを行った。MCA はカンタリジン塗布開始の 2 週間前に塗布した。カンタリジン（0.016%、媒体：ベンゼン）又は媒体（ベンゼン）のみを週 2 回、動物の一生涯にわたって背部皮膚に局所塗布した。腫瘍発生率（%）は、初めて腫瘍がみられた動物の数とその時点での生存動物数から計算した。

イニシエーションせずに、カンタリジンを塗布した群（カンタリジン群）32 例の生存マウス（平均生存期間：18.8 ヵ月）のうち、10 例（31.3%）で皮膚腫瘍がみられ、2 例（6.3%）で皮膚癌がみられた。なお、この試験の後に行った試験でイニシエーションをせずに、媒体であるベンゼンのみを塗布した群（媒体群）では、皮膚乳頭腫の発生率は 7.3%であり、皮膚癌は認められなかった。MCA でイニシエーションし、カンタリジン（媒体：ベンゼン）を塗布した群（MCA-カンタリジン群）42 例の生存マウス（平均生存期間 19.1 ヵ月）のうち、25 例（59.5%）で皮膚腫瘍がみられ、3 例（7.1%）で皮膚癌がみられた。MCA でイニシエーションし、媒体であるベンゼンのみを塗布した群（MCA-媒体群）では、34 例（平均生存期間 19.8 ヵ月）のうち、19 例（55.9%）で皮膚腫瘍がみられ、1 例（2.9%）で皮膚癌がみられた。MCA-カンタリジン群と MCA-媒体群を比較すると、MCA-カンタリジン群では、最初の 18 ヵ月間で皮膚腫瘍発生数の抑制がみられたが、18 ヵ月以降、腫瘍発生数は MCA-カンタリジン群では増加したのに対し MCA-媒体群では減少し、20 ヵ月の時点で両群間に差はみられなかった。

非イニシエーションのカンタリジン群の 51.6%に内臓腫瘍が認められた［細網症（細網内皮増生）及び悪性リンパ腫の発生率：28.1%］。なお、この論文では非イニシエーションの媒体群における内臓腫瘍の発生率に関するデータは示されていない。イニシエーションした MCA-カンタリジン群の 63.4%に内臓腫瘍がみられた（細網症及び悪性リンパ腫の発生率：56.1%）。MCA-媒体群における内臓腫瘍の発生率は 34.3%であった（細網症及び悪性リンパ腫の発生率：25.0%）。

カンタリジンは動物への短期塗布の場合、塗布後に長期間観察しても皮膚に腫瘍を発生させず、これは過去に報告された試験の結果と一致していた。一方、カンタリジンを動物に一生涯にわたって塗布した場合、カンタリジンは皮膚に対して弱いながらも完全発がん物質として作用したが、塗布開始後約 16 ヵ月まで腫瘍はみられず、塗布期間の初期にはカンタリジンは腫瘍発現の抑制作用を有することが明らかとなった。イニシエーションした皮膚におけるカンタリジンの皮膚腫瘍発現抑制メカニズムは明らかではないが、イニシエーションされた細胞に対するカンタリジンの毒性作用が関連している可能性も考えられる。カンタリジン単独塗布では、イニシエーション後のベンゼン塗布と比較して、細網症の発生数が多くなることはなかった。さらに、このような腫瘍は、高齢の無処置ヘアレスマウスでも頻繁に認められる。したがって、イニシエーション後にカンタリジン塗布でみられる腫瘍の増加は、非特異的な発がん性シグナルである可能性もあるが、高齢動物で自然発生的に同様の腫瘍がみられるマウスの系統で同様の腫瘍を誘発する媒体（ベンゼン）とカンタリジンの作用を区別することは困難である。

マウスを用いた別のイニシエーション／プロモーション試験では、カンタリジンを 0.01%（媒体：アセトン）の用量で 1 週間に 1 回、9 週間塗布した後、0.02%の用量で 6 週間塗布し、1 例当たりの総投与量を 630 μg とした [24)]。この試験では、カンタリジン塗布開始後 17 日から 1 週間に

1 回、18 週間にわたりクロトン油（0.5%、媒体 : アセトン）を 0.3 mL の用量で塗布した（3～4 日間隔でカンタリジンと交互に塗布）。クロトン油塗布終了時に生存していたカンタリジン塗布マウスの腫瘍発生率（17 例中 4 例に合計 6 個の皮膚腫瘍）は、クロトン油対照群（20 例中 1 例に 3 個の皮膚腫瘍）との間に統計学的有意差はなかった。

皮膚腫瘍感受性雌マウスを 25 μg のジメチルベンズアントラセン（DMBA）でイニシエーション後にカンタリジン（50 μg／マウス、媒体 : アセトン）を 1 週間に 1～5 回、32 週間塗布した[25]。DMBA でイニシエーション後、カンタリジンを最も高頻度（週 5 回）で暴露した結果、動物の生存数は 1 例であったが、この動物では皮膚腫瘍はみられなかった。25 μg の DMBA でイニシエーション後にカンタリジンを週 3 回、2 回及び 1 回塗布した場合、動物の生存数はそれぞれ 4、20 及び 22 例であった。各群の生存例において、乳頭腫を有する動物数（乳頭腫の総数）は、週 3、2、及び 1 回の塗布でそれぞれ 4 例（5 個）、11 例（20 個）及び 8 例（10 個）であった。これに対し、18 μg の DMBA でイニシエーション後、クロトン油（0.5%、媒体 : アセトン）を 0.2 mL の用量で週 1 回 12 週間塗布したところ、30 例に合計 398 個の乳頭腫が認められた。DMBA でイニシエーションしなかった対照群では、カンタリジン（50 μg）を週 1 回、12 週間塗布し、その後 13～34 週目に週 3 回塗布したところ、生存例 20 例中 1 例で 1 個の乳頭腫が認められた。クロトン油は、表皮の過形成を誘発する既知の腫瘍プロモーターである。これらの結果から、カンタリジンはクロトン油と同様に過形成を誘発するが、カンタリジンの腫瘍プロモーション作用はクロトン油と比較して弱いことが示された。公表文献の著者らは、これらの過形成誘発物質における腫瘍プロモーション作用の違いは、過形成の誘導の違いに起因している可能性を示唆している。カンタリジンは単回塗布で RNA 合成を促進したが、特に、標識されたシチジンを投与後に短時間でそれが RNA に取り込まれる画分（プロモーションにおいて重要な段階と考えられる）の合成促進において、その程度はクロトン油に比較して小さかった。カンタリジンはマウス皮膚への塗布後にクロトン油と同程度に皮膚の DNA 合成を促進したが、毒性が発現しない適切な用量でカンタリジンを塗布した場合、DNA 合成促進の持続時間はクロトン油よりも短かった。

以上のことから、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く、動物におけるデータも限られているため、カンタリジンは IARC 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[26]。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

Verrica 社は VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いた生殖発生毒性試験を実施していない。公表文献においてもカンタリジンの生殖発生毒性ポテンシャルに関する情報はなかった。

カンタリジンの長年にわたるヒトでの使用実績及び臨床試験における局所塗布後の全身暴露が極めて低いことから生殖発生毒性に影響する懸念は低く、加えてカンタリジンの強い毒性を考慮すると、動物にカンタリジンを反復投与し生殖発生毒性評価を実施することは倫理上、非常に困難である。なお、FDA は VP-102 を用いて生殖発生毒性試験を実施する必要ないことに合意している。詳細は 2.6.6.1.1 項の非臨床毒性試験に関する規制当局（FDA）との相談履歴を参照のこと。

2.6.6.7 局所刺激性試験

Verrica 社による VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いた局所刺激性試験は実施されていない。公表文献で報告されたカンタリジンの単回経皮投与試験の局所有害所見は、2.6.6.2 項に要約した。

2.6.6.8 その他の毒性試験（実施している場合）

Verrica 社による VP-102 外用液剤又はカンタリジンを用いたその他の毒性試験は実施されていない。

2.6.6.9 考察及び結論

Verrica 社は伝染性軟属腫の治療薬として VP-102（0.7% w/v カンタリジン）を開発し、1 患部当たり約 35～70 µg のカンタリジン（5～10 µL）を最長 24 時間、3 週間ごとに局所塗布することを提案している。伝染性軟属腫及び疣贅の治療においてはカンタリジン外用剤の豊富な臨床使用実績があり、この投与経路で発現するカンタリジンの毒性はよく知られている。動物（及びヒト）におけるカンタリジンの経皮暴露時における急性の毒性所見は、主に炎症、刺激性及び水疱形成などの皮膚における局所反応に限られている。これらの皮膚反応は、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の作用機序と考えられている。

カンタリジンの経皮暴露の全身毒性はヒト及び動物のいずれにおいても認められていないが、このことは、局所適用のカンタリジンの吸収が極めてわずかであり、全身循環に達するカンタリジン濃度が極めて低いことに起因している。このことは、Verrica 社が実施した臨床暴露試験（試験番号：VP-102-103、VP-102 を軟属腫患部に経皮適用）及び当社が実施した臨床薬理試験（試験番号：208-1-1、TO-208 を軟属腫患部に経皮適用）の成績からも裏付けられている。VP-102-103 試験では、血漿中カンタリジン濃度が塗布後 2～24 時間に得られたほぼ全ての試料（66 試料中 65 試料）で定量下限未満（BLOQ）であった。VP-102 を局所塗布した後に測定した全身暴露の最高濃度は、1 例の被験者で塗布後 2 時間に認められ、3.4 ng/mL であった。この被験者では、カンタリジン塗布後 6 及び 24 時間の試料では血漿中カンタリジン濃度は BLOQ であった。また、208-1-1 試験では、TO-208 を投与した 16 例の被験者のうち、血漿中にカンタリジンが検出された被験者は、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。これら臨床試験の結果から、この被験者集団における経皮適用後のカンタリジンの全身暴露は極めて低く一過性であることが示唆された。

マウス、ラット、ウサギ及びイヌにおけるカンタリジン投与による急性毒性所見を、公表文献に掲載された情報に基づいて要約した。これらの試験は、必ずしも急性毒性の評価を目的として実施されたものではないが、材料及び方法に関する情報、図表とともに示された試験結果の要約、結果に関する十分な考察、並びに結果から導き出された結論の観点から適切な科学的手順で実施され、報告されたものである。カンタリジンをマウスの皮膚に塗布した長期がん原性試験も公表文献として報告されており、2.6.6.5 項にその内容を要約した。全体として、ヒト及び動物の既存データは一貫性のある結果を示しておらず、カンタリジンの発がん性に関しては限定的又は不十分な情報となっている。結果的に IARC は、カンタリジンを「ヒトに対する発がん性ポテンシャルについて分類できない」（グループ 3）と判断した。

Verrica 社は、カンタリジンには外用剤としての十分な使用実績があることから、外用剤としての使用において着目すべき毒性学的な懸念は、カンタリジンの遺伝毒性の評価に限定されると考え、FDA も同意した。詳細は 2.6.6.1.1 項の非臨床毒性試験に関する規制当局（FDA）との相談履歴を参照のこと。

Verrica 社は、カンタリジンを用いた *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、カンタリジンが小核を誘発した最低濃度（代謝活性化系非存在下 27 時間処理の 1 μg/mL）は、治験時に見られた全身暴露の最高濃度（3.4 ng/mL、試験番号：VP-102-103）の 250 倍以上であった。したがって、臨床において局所適用した際に達成可能な全身暴露濃度では、遺伝毒性を生じないと推察される。なお、4 時間処理でカンタリジンが小核を誘発した濃度は、上述した 27 時間処理と比べて高かったことから、4 時間処理の成績から得られる安全域は、27 時間処理の成績から得られるものより更に広い。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、カンタリジン外用液剤による遺伝毒性の懸念はないと結論した。

カンタリジンへの暴露による安全性は、これまでの使用実績から十分把握できており、経皮適用における有害反応は主に局所的な刺激性と炎症に限られる。Verrica 社が実施した毒性試験は、カンタリジンの暴露に対する細胞レベルでの反応を理解するための追加的安全性情報を提供するものであり、試験の結果、特筆すべき毒性学的懸念は認められなかった。以上のことから、TO-208（カンタリジン）を伝染性軟属腫治療のための外用剤として使用できると考えている。

2.6.6.10 図表

関連する各項目の本文中に記載した。

参考文献

1) 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)）

2) Food and Drug Administration, pre-IND Type B meeting minutes (PIND131163), 16 August 2016.（4.3 参考文献 48)）

3) Food and Drug Administration, End of Phase 2 Type B meeting minutes (PIND131163), 13 September 2017.（4.3 参考文献 49)）

4) Food and Drug Administration, Type C meeting minutes (PIND131163), 24 October 2018（4.3 参考文献 50)）

5) 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)）

6) 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)）

7) 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)）

8) 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)）

9) 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)）

10) 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)）

11) Rolf LL, Buchanan ES, Alavi F. Acute toxicity of cantharidin in laboratory rabbits. A possible model for equine blister beetle disease. Toxicon. 1985;23:36-37.（4.3 参考文献 23））

12) 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)）

13) 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)）

14) 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)）

15) 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)）

16) 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)）

17) 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)）

18) 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)）

19) 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)）

20) 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)）

21) Heidelberger C, Moldenhauer MG. The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissue constituents. IV. A quantitative study of the binding to skin proteins of several C14-labeled hydrocarbons. Cancer Res. 1956;16(5):442-449.（4.3 参考文献 51）

22) 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)）

23) Laerum OD, Iversen OH. Reticuloses and epidermal tumors in hairless mice after topical skin applications of cantharidin and asiaticoside. Cancer Res. 1972;32(7):1463-1469.（4.3 参考文献 52)）

24) Roe FJ, Salaman MH. Further studies on incomplete carcinogenesis: triethylene melamine (T.E.M.), 1,2-benzanthracene and beta-propiolactone, as initiators of skin tumour formation in the mouse. Br J Cancer. 1955;9(1):177-203.（4.3 参考文献 53)）

25) Hennings H, Boutwell RK. Studies on the mechanism of skin tumor promotion. Cancer Res. 1970;30:312-320.（4.3 参考文献 54)）

26) 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)）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Number (CTD Location)
Genotoxicity (bacterial reverse mutation assay)	*Salmonella typhimurium*: TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvr*A	*In vitro*	Not applicable	15.0–5,000 µg/plate with or without metabolic activation	Yes	[redacted]	[redacted] (4.2.3.3.1)
Genotoxicity (mammalian cell chromosomal aberration assay)	Human peripheral blood lymphocytes	*In vitro*	Not applicable	4-hr treatment (with or without metabolic activation): 0.5–15 µg/mL; 20-hr treatment (without metabolic activation): 0.1–5 µg/mL	Yes	[redacted]	[redacted] (4.2.3.3.1)
Genotoxicity (mammalian cell micronucleus assay)	Human lymphoblastoid TK6 cells	*In vitro*	Not applicable	4-h treatment (with or without metabolic activation): 1.0–6.0 µg/mL; 27-h treatment (without metabolic activation): 0.5–2.5 µg/mL	Yes	[redacted]	[redacted] (4.2.3.3.1)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice.

2.6.7.2 トキシコキネティクス　トキシコキネティクス試験の一覧表

該当資料なし

2.6.7.3 トキシコキネティクス　トキシコキネティクス試験成績の一覧

該当資料なし

2.6.7.4 毒性試験　被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Batch Number	Purity (%)	Specified Impurities	Study Number	Type of Study
Lot No. 09160059	99.7	None specified	[redacted]	Genotoxicity (bacterial reverse mutation) Genotoxicity (mammalian cell chromosomal aberration)
Lot No. 09160058	100.0	None specified	[redacted]	Genotoxicity (mammalian cell micronucleus)

2.6.7.5 単回投与毒性試験

該当資料なし

2.6.7.6 反復投与毒性試験　重要な試験以外の試験

該当資料なし

2.6.7.7 反復投与毒性試験　重要な試験

該当資料なし

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 *In Vitro* 遺伝毒性試験：細菌を用いた復帰突然変異試験

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay							
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells					**Study No.:** [redacted]		
Species/Strain: *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537; *E. coli* WP2 *uvr*A			**Metabolizing System:** Aroclor-induced rat liver S9		**CTD Location:** 4.2.3.3.1		
					GLP Compliance: Yes		
No. of Independent Assays: 1			**No. of Replicate Cultures:** 3		**No. Cells Analyzed/Culture:** 3.3 to 6.9 x 10^8 cells per plate		
Treatment: Plate incorporation			**Date of Treatment** [redacted] 20[redacted]		**Vehicle:** DMSO (TA, 2NF, 9AAD, MMS, 2AA); water (SA)		
Cytotoxic Effects: None							
Genotoxic Effects: None							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 activation	DMSO	200 µL	14 ± 7	80 ± 10	11 ± 2	6 ± 2	17 ± 2
	Cantharidin	15.0	14 ± 4	69 ± 11	17 ± 5	7 ± 3	25 ± 4
		50.0	14 ± 5	73 ± 14	13 ± 4	6 ± 2	19 ± 6
		150	12 ± 6	80 ± 10	14 ± 1	5 ± 2	17 ± 1
		500	11 ± 3	65 ± 7	14 ± 2	5 ± 2	22 ± 4
		1,500	10 ± 4	66 ± 10	9 ± 3	6 ± 3	19 ± 4
		5,000	7 ± 1	40 ± 5	8 ± 2	3 ± 3	17 ± 2
	2NF	1.00	245 ± 169	NA	NA	NA	NA
	SA	1.00	NA	678 ± 201	732 ± 124	NA	NA
	9AAD	75.0	NA	NA	NA	510 ± 21	NA
	MMS	1,000	NA	NA	NA	NA	310 ± 2

2.6.7.8.1　In Vitro 遺伝毒性試験：細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ±SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
With S9 activation	DMSO	200 µL	17 ± 2	83 ± 6	11 ± 5	6 ± 1	26 ± 4
	Cantharidin	15.0	19 ± 2	99 ± 16	16 ± 3	5 ± 3	32 ± 2
		50.0	19 ± 10	82 ± 2	12 ± 3	4 ± 2	38 ± 6
		150	15 ± 7	102 ± 6	11 ± 3	5 ± 4	30 ± 5
		500	17 ± 1	96 ± 8	11 ± 5	7 ± 1	25 ± 3
		1,500	17 ± 4	82 ± 19	12 ± 4	3 ± 3	22 ± 4
		5,000	13 ± 3	60 ± 4	10 ± 2	6 ± 3	22 ± 6
	2AA	1.00	287 ± 6	NA	145 ± 23	NA	NA
		2.00	NA	869 ± 152	NA	73 ± 3	NA
		15.0	NA	NA	NA	NA	265 ± 48

2AA = 2-aminoanthracene; 2NF = 2-nitrofluorene; 9AAD = 9-aminoacridine; CTD = Common Technical Document; DMSO = dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; MMS = methyl methanesulfonate; NA = not applicable; SA = sodium azide; TA = test article.

2.6.7.8.2 *In Vitro* 遺伝毒性試験：ほ乳類細胞を用いた小核試験

Test Article: VP-102 (cantharidin)

Report Title: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells with CREST Staining of Micronucleus						
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays:** 1		**Study No.:** [redacted]		
Strains: Human lymphoblastoid TK6 Cells		**No. of Replicate Cultures:** 2		**CTD Location:** 4.2.3.3.1		
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture:** 1,000		**GLP Compliance:** Yes		
Treatment: 27 hours without S9; 4 hours with and without S9		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted] (Definitive Assay)		**Vehicle:** DMSO (TA); water (MMC, CP, VB)		
Cytotoxic Effects: In the micronucleus assay, cytotoxicity (≥ 45% RPD relative to the vehicle control) was observed at doses ≥ 3.5 µg/mL in the non-activated 4-hour exposure group; at doses ≥ 5 µg/mL in the S9-activated 4-hour exposure group; and at doses ≥ 1.6 µg/mL in the non-activated 27-hour exposure group.						
Genotoxic Effects: Cantharidin was positive for the induction of micronuclei in the presence and absence of the exogenous metabolic activation system. Subsequent CREST analysis indicated that Cantharidin induced micronuclei by an aneugenic mechanism of action.						
Treatment Conditions (duration/metabolic activation)	**Test Article**	**Dose (µg/mL)**	**Population Doubling**	**Cytotoxicity (% control)**	**%MN-MN (per total MN counted)**	**%K+MN[a]**
27 hours; Without S9 activation	DMSO	NA	2.1	NA	0.65	46
	Cantharidin	1	2.0	5	1.25[b]	NA
		1.4	1.4	32	1.35[b]	83
		1.6	1.0	53	2.25[c]	88
	VB	0.012	1.4	33	4.40[c]	91
4 hours; Without S9 activation	DMSO	NA	2.1	NA	0.55	56
	Cantharidin	1	1.9	9	0.65	NA
		3	1.2	40	0.65	NA
		3.5	1.0	53	1.40[c]	70
	MMC	0.12	1.3	38	4.20[c]	29
4 hours; With S9 activation	DMSO	NA	1.8	NA	0.60	61
	Cantharidin	2	1.8	1	0.70	NA
		3.5	1.3	25	0.90	NA
		5.5	0.8	54	1.20[b]	85
	CP	4.0	0.9	51	2.50[c]	36

CP = cyclophosphamide; CREST antibody = anti-centromere antibody derived from human CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia) patient serum; DMSO = dimethyl sulfoxide; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; MMC = mitomycin C; MN = micronuclueated cells; MN-MN = micronuclei in a micronucleated cell; NA = not applicable; RPD = relative population doubling; TA = test article; VB = vinblastine.

a %K+MN = percentage of micronuclei in the presence of kinetochore staining.

b $p \leq 0.05$ (Fisher's Exact Test).

c $p \leq 0.01$ (Fisher's Exact Test).

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当資料なし

2.6.7.10 がん原性試験

該当資料なし

2.6.7.11 生殖発生毒性試験　重要な試験以外の試験

該当資料なし

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

該当資料なし

2.6.7.13 生殖発生毒性試験　胚・胎児発生に関する試験

該当資料なし

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

該当資料なし

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当資料なし

2.6.7.16 局所刺激性試験

該当資料なし

2.6.7.17 その他の毒性試験

該当資料なし