ヘマンジオルシロップ小児用0.375 %

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

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
M7031	プロプラノロール塩酸塩
M703101	有効成分としてプロプラノロールを3.75 mg/mL含有する経口液剤（申請製剤）HEMANGEOL®（米国）、HEMANGIOL®（欧州）と同義
Akt	Protein kinase B：プロテインキナーゼBと同義
ANP	Atrial natriuretic peptide：心房性ナトリウム利尿ペプチド
$AUC_{0\text{-}24\ h}$	Area under the time-concentration curve：時間-血漿中濃度曲線下面積（投与開始0時間後から24時間後までの時間-血漿中濃度曲線下面積）
bFGF	Basic fibroblast growth factor：塩基性線維芽細胞増殖因子
BNP-32	Brain natriuretic peptide-32：脳性ナトリウム利尿ペプチド
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate：環状アデノシン一リン酸
C_{max}	Maximal plasma concentration：最高血漿中濃度
C-Tn I	Cardiac troponin I：心臓トロポニン I
CYP	Cytochrome P450：チトクロームP450
EMA	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
ERK	Extracellular signal-regulated kinase：細胞外シグナル制御キナーゼ
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
FOB	Functional Observation Battery：機能観察総合評価法
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
GLUT-1	Glucose transporter-1：グルコーストランスポーター1
HDMVECs	Human dermal microvascular endothelial cells：ヒト皮膚微小血管内皮細胞
HemECs	Hemangioma-derived endothelial cells：乳児血管腫由来内皮細胞
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1α：低酸素誘導因子1α
hOCT2	Human organic cation transporter 2：ヒト有機カチオントランスポーター2
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells：ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
IH	Infantile hemangioma(s)：乳児血管腫
Ki	Inhibition constant：阻害定数
LC/MS/MS	Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析
MAPK	Mitogen-activated protein kinase：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MMP	Matrix metalloproteinase：マトリックスメタロプロテアーゼ
NO	Nitric oxide：一酸化窒素
NOAEL	No observed adverse effect level：無毒性量
pA_2	競合的アンタゴニストの薬理学的効力を表す指標。アゴニスト単独時の用量反応曲線を2倍だけ高濃度側へ平行移動させるのに必要な競合的アンタゴニストのモル濃度の負の対数

略号	省略していない表現
PCNA	Proliferative cell nuclear antigen：増殖細胞核抗原
PFD	Pierre Fabre Dermatologie
P-gp	P-glycoprotein：P糖蛋白質
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase：ホスホイノシチド3-キナーゼ
PKA	Protein kinase A：プロテインキナーゼA
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase：メタロプロテアーゼインヒビター
t_{max}	Time to peak plasma concentration：最高血漿中濃度到達時間
VEGF	Vascular endothelial growth factor：血管内皮細胞増殖因子
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor receptor：血管内皮細胞増殖因子受容体
α1-AGP	α1-Acid glycoprotein：α1-酸性糖蛋白質

目次

頁
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.1 薬理試験計画の概略 5
2.4.1.2 薬物動態試験計画の概略 5
2.4.1.3 毒性試験計画の概略 5
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 6
2.4.2.2 副次的薬理試験 9
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.2.4 その他の薬理作用 9
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 分析法 10
2.4.3.2 吸収 10
2.4.3.3 分布 10
2.4.3.4 代謝 10
2.4.3.5 排泄 11
2.4.3.6 薬物間相互作用 11
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 11
2.4.4 毒性試験 11
2.4.4.1 単回投与毒性試験 11
2.4.4.2 反復投与毒性試験 11
2.4.4.3 遺伝毒性試験 11
2.4.4.4 がん原性試験 11
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 11
2.4.4.6 局所刺激性試験 13
2.4.4.7 その他の毒性試験 14
2.4.5 総括及び結論 14
2.4.5.1 効力を裏付ける試験 14
2.4.5.2 副次的薬理試験 14
2.4.5.3 安全性薬理試験 14
2.4.5.4 薬物動態試験 14
2.4.5.5 毒性試験 14
2.4.5.6 結論 15
2.4.6 参考文献 15

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

プロプラノロールは、1964年に英国で開発された非選択的β-アドレナリン受容体遮断薬であり、高血圧、狭心症、不整脈（小児を含む）、片頭痛の治療薬として長年、世界各国で使用されている。そのため、プロプラノロールの有効性及び安全性については多くの成書及び公表論文に報告されている。今回申請の乳児血管腫（IH）に対しては、2008年に初めて有効性が報告され[1)]、2014年にはフランスのPierre Fabre Dermatologie（以下、PFD社）がプロプラノロールの3.75 mg/mLを含有する経口液剤（以下、本剤）をIHに対する治療薬として、米国及び欧州で承認取得している。

以上のことを踏まえ、本剤の非臨床試験データパッケージは、 公表論文及び導入元であるPFD社が実施した試験の成績を用いて構築した。採用した公表論文は、プロプラノロールに関する総説、PFD社が米国及び欧州の承認申請において引用した論文、並びにPFD社の承認申請後に新たに公表された論文とした。

2.4.1.1 薬理試験計画の概略

効力を裏付ける試験は公表論文を引用した。副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験については、本申請の申請区分が医療用医薬品（4）新効能医薬品及び（5）新剤形医薬品であることから、新たな試験は実施しなかった。

2.4.1.2 薬物動態試験計画の概略

プロプラノロールは、成人では数十年にわたる臨床使用の実績があり、多くの非臨床動物種の成熟動物における薬物動態学的性質についても十分な知見がある。したがって、申請に際しては、非臨床動物種の成熟動物を用いた追加の薬物動態試験は実施せず、公表論文を使用した。

なお、対象疾患の患者層が乳幼児であることから、毒性試験には幼若動物を用いた反復毒性試験がPFD社で実施された。これに含まれているトキシコキネティクスのデータを薬物動態評価に含めた。

2.4.1.3 毒性試験計画の概略

本剤の申請区分では、新たな非臨床毒性試験資料の提出は不要とされているが、本申請における対象疾患の患者層が乳幼児であることを鑑み、PFD社は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した幼若ラットを用いた毒性試験を実施した。本試験では、一般毒性学的な評価に加え、心臓バイオマーカー検査、脛骨長測定、学習・記憶及び生殖能検査などを指標に器官・機能の発達を評価し、回復性についても検討した。

2.4.2 薬理試験

薬理試験の一覧表を2.6.3.1に示す。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

以下に、IHの病態及びプロプラノロールの効力を裏付ける試験の成績を示す。なお、IHの動物モデルはいまだ確立されていないため、*in vitro*試験の成績のみを示す。

2.4.2.1.1 乳児血管腫の病態

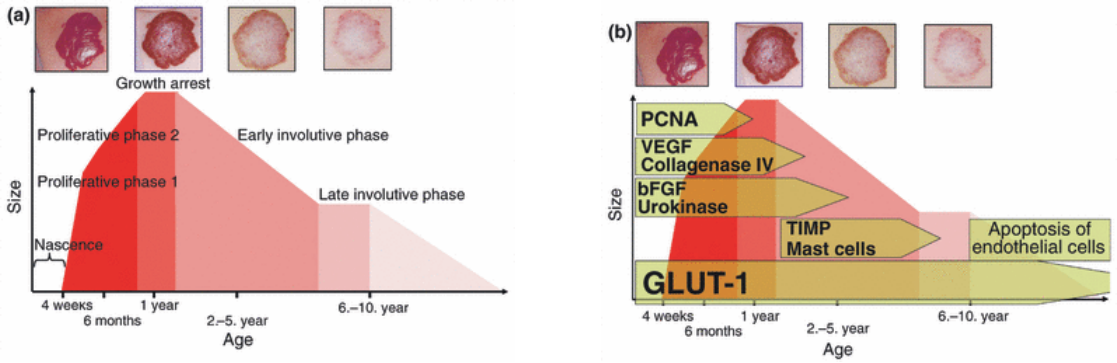
2013年に公表された「血管腫・血管奇形診療ガイドライン2013（第1版）」[2)]によると、IHは異常な血管内皮細胞の腫瘍性増殖が本態の病変であり、細胞増殖による急速な増大を新生児期から乳児早期にもたらし、生後1歳6カ月程度をピークとして腫瘍細胞の増殖活性が低下するとともに細胞死により腫瘤が縮小し、最終的には異常な細胞は消失する疾患である。

IHは、生後数週間以内に細胞増殖が始まり、その後急速に増大し、やがて細胞増殖と細胞死のバランスから増大が止まり、その後徐々に縮小するという経過をたどる[2)]。増殖開始時期から増大が止まるまでの期間を増殖期、徐々に縮小していく時期を消退期、変化がなくなる時期を消失期と呼称し、増殖期は生後より6カ月から20カ月まで、消退期が1歳6カ月から5歳程度までとされているが、期間に関しては症例による差が大きい（図 2.4.2-1a）[2),3)]。

増殖期、消退期及び消失期の病理組織像はそれぞれ異なり、増殖期においては大量の血管内皮細胞と外皮細胞からなる毛細血管が増生し分葉状の組織塊を形成している[2)]。異常な血管内皮細胞は、低酸素ストレスで発現誘導されるグルコーストランスポーター1（GLUT-1）の免疫染色で特異的に染色される[4)]。消退期には異常な血管内皮細胞がアポトーシスにより減少し、毛細血管も徐々に消失していき、消失期では線維脂肪組織に置換される[2),3)]。

IHの発生原因は十分に解明されていないが、図 2.4.2-1bに示すように、増殖期ではIHの血管新生（angiogenesis）及び血管発生（vasculogenesis）のための重要な調節因子である血管内皮細胞増殖因子（VEGF）[5),6)]や塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、あるいは増殖細胞核抗原（PCNA）やIV型コラゲナーゼの発現が増加している。これに対して、消退期及び消失期ではVEGFやbFGFの発現は急激に減少し、血管新生抑制因子であるメタロプロテアーゼインヒビター（TIMP）の発現が認められるようになる。このように、IHは、血管新生促進因子と血管新生抑制因子の不均衡なバランスによって特徴づけられる血管新生の異常調節による疾患と考えられている[3)]。

図 2.4.2-1 IHの病態と病因（4.3-2のFig. 1を引用）



(a)IHの経過、(b)IHの増殖及び消退に関わる因子
PCNA：増殖細胞核抗原、VEGF：血管内皮細胞増殖因子、bFGF：塩基性線維芽細胞増殖因子、TIMP：メタロプロテアーゼインヒビター、GLUT-1：グルコーストランスポーター1

2.4.2.1.2 プロプラノロールの薬理作用

IH患者の血管内皮細胞にはβ_1-及びβ_2-アドレナリン受容体が発現しており[7),8)]、IHに対するプロプラノロールの主な薬理作用は、両受容体の遮断を介した血管収縮作用、血管内皮細胞の増殖抑制作用、血管新生抑制作用、並びにアポトーシス誘導作用と考えられている。

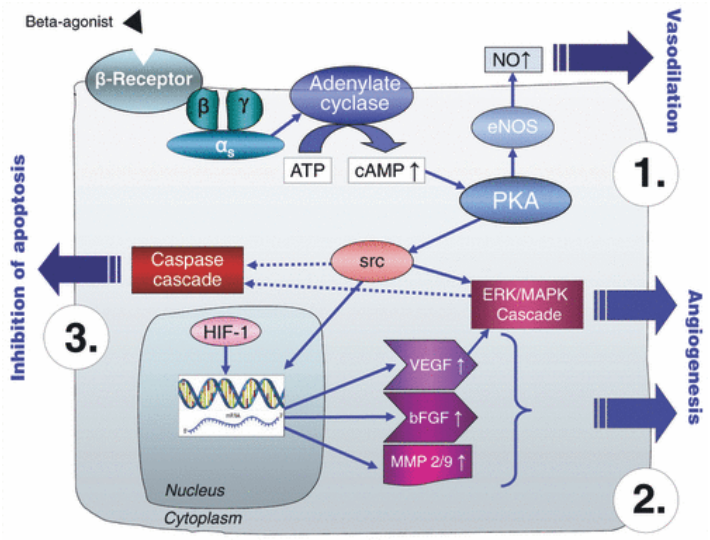
図 2.4.2-2に示すように、血管内皮細胞上に存在するβ-アドレナリン受容体を刺激すると、アデニル酸シクラーゼの活性化並びに環状アデノシン一リン酸（cAMP）依存性プロテインキナーゼ（PKA）の活性化を介して、血管弛緩因子である一酸化窒素（NO）の合成及び遊離が起こり、血管が拡張する[3),9)]。プロプラノロールは、これら一連の反応を抑制することで血管を収縮させる。また、最近では、毛細血管の内皮細胞を外から取り囲むように存在する周皮細胞に対し、プロプラノロールは同様の作用機序を介して収縮させる可能性も報告されている[10)]。このようなプロプラノロールの血管収縮作用によって、IH組織内の血流が減少し、赤みの消失及び軟化が治療開始直後からもたらされると考えられている[1),3),10)]。

β-アドレナリン受容体を刺激すると、PKAの下流にある非受容体型チロシンキナーゼSrcを介して、血管新生促進因子（VEGFやbFGFなどの成長因子、並びにマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-2やMMP-9）の産生が亢進し、血管新生促進にかかわる細胞内シグナル伝達経路（細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路）も活性化されるため、血管内皮細胞の増殖及び血管新生が起こる。プロプラノロールはこれら血管新生にかかわる因子及び経路を阻害することで、血管内皮細胞の増殖及び血管新生を抑制する。

また、IHの増殖期では低酸素ストレスに応答する転写因子である低酸素誘導因子1α（HIF-1α）の発現が増加しており[6),11)]、この因子も血管新生促進因子の産生を亢進させる。プロプラノロールはHIF-1αの増加を抑制することで、血管内皮細胞の増殖及び血管新生を抑制する。

更に、β-アドレナリン受容体刺激によってSrc及びMAPKが活性化されると、アポトーシス誘導酵素であるカスパーゼの活性あるいは発現が抑制され、血管内皮細胞のアポトーシスが阻害されるが、プロプラノロールはこの経路を抑制することで、血管内皮細胞のアポトーシスを促進する。

図 2.4.2-2 IHに対するプロプラノロールの作用機序（4.3-2のFig. 2を引用）



1. 血管緊張度の制御：β-アドレナリン受容体作動薬（◀）は、一酸化窒素（NO）の遊離を介して血管を拡張させる。これに対して、プロプラノロールは、NOの合成及び遊離を阻害することにより、血管を収縮させる。
2. 細胞増殖及び血管新生：β-アドレナリン受容体作動薬は、血管新生促進因子（VEGFやbFGFなどの成長因子並びにMMP-2やMMP-9）の産生亢進、血管新生促進にかかわる細胞内シグナル伝達経路（ERK/MAPK経路）の活性化及び低酸素誘導因子1（HIF-1）の産生亢進を起こし、血管内皮細胞の増殖及び血管新生を促進する。一方、プロプラノロールは、これら血管新生促進にかかわる因子及び経路を阻害することにより、細胞増殖及び血管新生を抑制する。
3. アポトーシス：β-アドレナリン受容体作動薬は、Src/MAPK経路を介してアポトーシス誘導因子（カスパーゼなど）の活性あるいは発現を抑制し、アポトーシスを阻害する。これに対して、プロプラノロールはアポトーシス誘導因子を活性化あるいは発現亢進させ、アポトーシスを誘導する。

実線矢印：活性化作用、点線矢印：阻害作用、幅広矢印：薬力学的作用、上向き矢印：産生亢進
β、γ、α_s：促進性Gタンパク質（3量体）のサブユニット、ATP：アデノシン三リン酸、cAMP：環状アデノシン一リン酸、PKA：プロテインキナーゼA（cAMP依存性プロテインキナーゼ）、ERK：細胞外シグナル制御キナーゼ、MAPK：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ、VEGF：血管内皮細胞増殖因子、bFGF：塩基性線維芽細胞増殖因子、MMP：マトリックスメタロプロテアーゼ、eNOS：内皮型一酸化窒素合成酵素、NO：一酸化窒素、HIF-1：低酸素誘導因子1

2.4.2.1.2.1 β-アドレナリン受容体に対する結合能及び拮抗作用

プロプラノロールはヒトのβ_1-、β_2-及びβ_3-アドレナリン受容体に対して拮抗作用を示し、その阻害定数（Ki値）はそれぞれ1.8、0.8及び186 nmol/Lであった。また、プロプラノロールはウサギの右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本において、非選択的β-アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールによる反応に対して拮抗作用を示し、競合的アンタゴニスト活性の指標であるpA_2値はそれぞれ8.80、8.98及び6.89であった。

2.4.2.1.2.2 血管収縮作用

プロプラノロールは、イヌ冠状動脈の平滑筋標本を0.3～30 μmol/Lの濃度域で濃度依存的に収縮させた。

2.4.2.1.2.3 細胞増殖抑制作用

プロプラノロールは、細胞毒性をもたらさない濃度域（5～100 μmol/L）で、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）の増殖を濃度依存的かつ有意に抑制し、そのIC_{50}値は21 μmol/Lであった。また、プロプラノロールは乳児血管腫由来細胞（HemECs）の増殖を50 μmol/L以上で有意に抑制した。

2.4.2.1.2.4 血管新生抑制作用

プロプラノロールは、増殖因子（ヒトU87神経膠芽腫細胞の培養上清）で刺激したHUVECsの遊走を濃度依存的かつ25 μmol/L以上で有意に抑制した。また、プロプラノロールはHUVECsの管腔形成を濃度依存的かつ有意に抑制し、そのIC_{50}値は8 μmol/Lであった。更に、プロプラノロールはヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMVECs）及びHemECsの管腔形成も濃度依存的に抑制し、有意な抑制作用はそれぞれ25 μmol/L以上及び300 μmol/Lで認められた。特に、HemECsの管腔形成は、300 μmol/Lのプロプラノロールによって完全に抑制された。

プロプラノロール（100～300 μmol/L）は、HemECsにおけるVEGF-A及びその受容体（VEGF-R1及びVEGF-R2）の発現を抑制するとともに、VEGFで刺激したHemECsにおけるホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）/Akt（プロテインキナーゼB）及びp38/MAPKの活性化（リン酸化）、並びにHIF-1αの発現を濃度依存的に抑制した。

2.4.2.1.2.5 アポトーシス誘導作用

プロプラノロール（200 μmol/L）は、HUVECsのアポトーシス細胞の割合を有意に増加させるとともにアポトーシス誘導酵素であるカスパーゼ-3/7活性を有意に亢進させた。また、HemECsでも、プロプラノロール（100 μmol/L）はアポトーシス細胞の割合を有意に増加させるとともに、アポトーシス誘導遺伝子（p53及びBax）の発現増加、アポトーシス抑制遺伝子（Bcl-xL）の発現低下、並びにカスパーゼ-9及び-3の活性化をもたらした。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 中枢神経系に及ぼす影響

該当資料なし。

2.4.2.3.2 呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響

該当資料なし。

2.4.2.3.3 自律神経系、消化器系及び体性神経系に及ぼす影響

該当資料なし。

2.4.2.4 その他の薬理作用

該当資料なし。

2.4.3 薬物動態試験

薬物動態試験の一覧表を2.6.5.1に示す。

2.4.3.1 分析法

幼若ラット血漿中プロプラノロール濃度測定用のLC/MS/MS法を開発し、0.5～250 ng/mLの定量範囲においてバリデーションを実施した。

分析法バリデーション及び幼若ラットを用いた毒性試験の裏付けとなる試料分析は、GLP及びガイダンス「Bioanalytical Method Validation［2001年5月米国食品医薬品局（FDA）及び2011年7月欧州医薬品庁（EMA）］」の要件に準拠して実施した。

2.4.3.2 吸収

成熟動物では、プロプラノロールは経口投与後、速やか且つほぼ完全に吸収される。また、プロプラノロールは肝臓で初回通過効果を強く受けるため、経口の絶対的バイオアベイラビリティは、ラット、イヌ及びサルでそれぞれ7.5～25.3%、27.2%及び3.3%であった。ヒトでも、経口投与後、ほぼ完全に吸収されるが、肝臓で初回通過効果を強く受けるため、全身循環に到達するプロプラノロールの割合は平均で約25%にすぎない。

幼若ラットにプロプラノロールを単回及び反復投与したときのトキシコキネティクスをそれぞれ4日齢及び21日齢で評価した。4日齢及び21日齢で評価したのは、ラットの4日齢及び21日齢は、ヒトの発育段階でそれぞれ新生児期及び乳幼児期に相当することによる。幼若ラットでも、プロプラノロールは成熟動物の場合と同様、速やかに吸収された。最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は、投与量にかかわらず概ね1時間であった。10～40 mg/kg/dayの高用量域のプロプラノロールの薬物動態は、単回及び反復経口投与のいずれの場合も非線形性を示した。反復投与による蓄積は認められず、21日齢におけるプロプラノロールの全身暴露量は、4日齢より低値を示した。ラットのプロプラノロールのクリアランスは日齢により変化し、代謝クリアランスは生後5～7週で最も高くなる。この知見は、薬物代謝酵素（特にCYP）の発達過程と一致する。

2.4.3.3 分布

プロプラノロールをイヌ及びサルに経口投与すると、未変化体もしくは代謝物、またはその双方が全身に分布する。特に、肺に高濃度の放射能が検出され、脳、肝臓及び腎臓にも比較的高濃度で分布した。この分布プロファイルは、脂溶性薬物の分布特性と一致する。

プロプラノロールの血漿蛋白結合率は、ラット、イヌ及びサルでそれぞれ92.2%、96.6%及び99.2%であった。ヒトにおける血漿蛋白結合率は93.6%であり、プロプラノロールは主に血漿中のα1-酸性糖蛋白質（α1-AGP）と結合した。

2.4.3.4 代謝

ラット肝S9画分及びヒト肝ミクロソームを用いた*in vitro*試験、並びにラットを用いた*in vivo*試験より、プロプラノロールは3つの代謝経路（環ヒドロキシル化、側鎖の酸化及び直接グルクロン酸抱合）によって大部分が代謝されると考えられている。ヒトでも、これらの3つの代謝経路により大部分が代謝され、代謝全体のそれぞれ約42%、41%及び17%を占める。

*In vitro*試験では、主としてCYP2D6による環ヒドロキシル化が認められた。側鎖の酸化はCYP1A2により触媒され、CYP2D6もある程度は側鎖の酸化に寄与していた。CYP2C19の側鎖の酸

化への寄与は極めて小さかった。

*In vivo*試験では、プロプラノロールの代謝に種差が認められた。ラットでは、環ヒドロキシル化が主要な経路であるが、イヌでは側鎖の酸化が主要な経路であった。ラットでは、プロプラノロールの代謝物の大半がグルクロン酸抱合体として尿中から回収された。

2.4.3.5 排泄

プロプラノロールの排泄経路及び排泄速度は、非臨床動物種とヒトでほとんど差がない。経口投与されたプロプラノロールの大部分が尿中排泄され、その排泄量のうち大半が代謝物で占められている。プロプラノロールの尿中排泄率は非臨床動物種間で同程度であり、ラット、イヌ及びサルでそれぞれ約68%、80%及び70%であった。ヒトでは、プロプラノロールの投与量の約90%が代謝物として尿中から回収された。

2.4.3.6 薬物間相互作用

*In vitro*データから、P糖蛋白質（P-gp）はプロプラノロールの薬物動態にほとんど関与していないが、プロプラノロールはジゴキシンのP-gpによる輸送を阻害した（IC_{50}：24.8 µmol/L）。また、メトホルミンのヒト有機カチオントランスポーター2（hOCT2）による輸送を阻害した（IC_{50}：8.3 µmol/L）。

CYPに関しては、プロプラノロールが中程度のCYP1A2阻害作用（IC_{50}：26～47 µmol/L）及び強いCYP2D6阻害作用（IC_{50}：2.5～5.8 µmol/L）を有することが示された。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

該当資料なし。

2.4.4 毒性試験

毒性試験の概要を2.6.7.1に示す。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

該当資料なし。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

該当資料なし。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

該当資料なし。

2.4.4.4 がん原性試験

該当資料なし。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

2.4.4.5.1 幼若動物を用いた試験

幼若ラットを用いた毒性試験を実施し、幼若動物の発達に対するプロプラノロールの影響を評価した。投与期間はヒトの新生児期及び乳幼児期に相当する時期を満たすように設定し、その後

の休薬期間を含めた総試験期間は、更に児童期、青少年期に相当する時期を満たすように設定した。

1群雌雄各32匹の幼若Sprague-Dawleyラットに、プロプラノロールを0、10、20、40 mg/kg/dayの用量で18日間（生後4日から生後21日まで）、毎日、反復経口投与した。これらの動物を、最終投与翌日に屠殺するSubset Iと、投与期間終了後に休薬して生殖能検査等を実施するSubset IIに分けた。それぞれの検査項目を以下に示す。

(1) 試験方法

- **Subset I（雌雄各16匹/群）**

死亡数、一般状態観察及び体重測定に加えて、離乳前発達に関する検査として開眼、切歯萌出、耳道開口、空中落下正向反射及び断崖回避の検査を実施した。投与終了時に眼科検査及び尿検査を、最終投与翌日に血液学検査、血液生化学検査、心臓バイオマーカー検査（ANP、BNP-32、C-Tn I）、剖検及び器官重量測定を実施し、対照群及び高用量群の全例について病理組織学的検査を実施した。

- **Subset II（雌雄各16匹/群）**

死亡数、一般状態観察、体重測定、眼科検査（投与終了時に1回）及び離乳前発達検査（開眼、切歯萌出、耳道開口、空中落下正向反射及び断崖回避）を実施した。

これらに加えて、生後6日～6週齢まで脛骨長測定、離乳以降に摂餌量測定、6～8週齢時に機能観察総合評価法（FOB）、自発運動量及び学習・記憶検査、生後38日以降の雄及び生後28日以降の雌の性成熟検査（包皮分離及び膣開口）を実施した。更に、膣開口～交配まで雌の性周期検査、交配前に尿検査、血液学検査及び血液生化学検査を行い、約13週齢時点で雌雄を交配させた。交配15日に剖検、器官重量測定、帝王切開時検査（黄体数、着床数、生存胚数及び死亡胚数、初期吸収胚数及び後期吸収胚数、着床痕数）及び精子検査を実施した。

- サテライト

血漿中薬物濃度測定用サテライト動物として、各被験物質投与群につき雌雄各45匹を使用し、投与1日及び投与18日のそれぞれ投与後1、2、4、8及び24時間に血液を採取した。また、媒体対照群には雌雄各9匹を使用し、投与1日及び投与18日のそれぞれ投与後1時間に血液を採取した。

(2) 試験結果

10及び20 mg/kg/day群では、投与に関連した死亡は観察されなかった。40 mg/kg/day群（主群及びサテライト群）では、プロプラノロール投与との関連性を否定できない死亡が、雌雄ともに77例中1例に観察された（雄1例は痩削、低体温及び脱水による切迫屠殺、雌1例は共食いによる死亡発見）。

一般状態観察では、投与に関連した異常はみられなかった。

体重測定では、10及び20 mg/kg/day群で、離乳前、離乳後及び妊娠期間中に投与に関連した変化は認められなかった。40 mg/kg/day群では、離乳前の検査で、わずかな体重の低値（雄、最大で投与18日（生後21日）の-10.3%）及び投与期間中の体重変化量の低値（雌雄）が観察されたが、休薬期間終了時及び妊娠期間中に有意な差はみられなかった。

摂餌量、脛骨長、離乳前発達検査、機能観察総合評価法（FOB）、自発運動量、学習・記憶、性成熟、眼科検査、血液学検査、血液生化学検査及び心臓バイオマーカー検査では、投与に関連した変化はみられなかった。

尿検査では、投与終了時の検査で、雄の40 mg/kg/day群、雌の20及び40 mg/kg/day群で尿量の有意な低値が観察されたが、腎臓の病理組織学的検査など他の泌尿器系への影響はみられず、毒性学的意義は低いと考えられた。なお、休薬後には完全に回復した。

交配、受胎能、帝王切開時検査及び精子検査では、投与に関連した変化はみられなかった。

剖検では、切迫及び死亡発見の動物を含め、投与に関連した変化はみられなかった。投与終了時の雄の40 mg/kg/day群、雌のすべての投与群で、脾臓重量の低値が認められた。また、雌雄の40 mg/kg/day群の病理組織学的検査で脾臓及び肝臓の髄外造血の程度の減弱がみられたが、骨髄の病理組織学的検査など他の造血器系への影響はみられず、毒性学的意義は低いと考えられた。なお、休薬後には器官重量の変化はみられず完全に回復した。

トキシコキネティクスパラメータを表 2.4.4-1に示した。投与用量に応じたC_{max}及び$AUC_{0\text{-}24\ h}$の増加がみられ、また、投与1日（生後4日）に比較して投与18日（生後21日）では暴露量の低下がみられた。これは、2.4.3.2 で述べたとおり、日齢による代謝クリアランスの相違に起因する。

表 2.4.4-1 幼若ラットにおけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose level (mg/kg/day)		10		20		40	
Sex		M	F	M	F	M	F
投与1日 (生後4日)	C_{max} (ng/mL)	195.8	161.0	229.2	567.6	465.9	948.0
	T_{max} (h)	1	1	1	1	1	1
	$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (ng·h/mL)	537	456	843	1778	3387	3030
投与18日 (生後21日)	C_{max} (ng/mL)	17.55	59.31	43.05	88.20	324.6	229.1
	T_{max} (h)	1	1	2	1	1	4
	$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (ng·h/mL)	54[a)]	237[a)]	262	221[a)]	2516	1051[a)]

a): $AUC_{0\text{-}8\ h}$

(3) 結論

本試験条件下では、器官・機能の発達、生殖能力及び心臓機能に関して、40 mg/kg/dayまでプロプラノロール投与に関連した変化はみられなかった。これらの指標におけるNOAELは雌雄共に40 mg/kg/dayであり、この用量の血漿中プロプラノロール濃度の$AUC_{0\text{-}24\ h}$は、投与1日（生後4日）の雄で3387 ng·h/mL、雌で3030 ng·h/mL、投与18日（生後21日）の雄で2516 ng·h/mL、雌で1051 ng·h/mLであった。

一般毒性学的パラメータについては、40 mg/kg/dayでプロプラノロール投与との関連を否定できない所見がみられた（死亡、体重の低値）。このため、一般毒性のNOAELは雌雄共に20 mg/kg/dayであり、この用量の血漿中プロプラノロール濃度の$AUC_{0\text{-}24\ h}$は、投与1日（生後4日）の雄で843 ng·h/mL、雌で1778 ng·h/mL、投与18日（生後21日）の雄で262 ng·h/mL、雌で221 ng·h/mLであった。

2.4.4.6 局所刺激性試験

該当資料なし。

2.4.4.7 その他の毒性試験

該当資料なし。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 効力を裏付ける試験

IH患者の血管内皮細胞にはβ_1-及びβ_2-アドレナリン受容体が発現しており[7),8)]、これら受容体をプロプラノロールが遮断することが、IHに対する治療効果につながっていると考える。

プロプラノロールは、β-アドレナリン受容体に対して非選択的な遮断作用を示し、イヌ冠状動脈の平滑筋標本を濃度依存的に収縮させた。この血管収縮作用が、増殖期のIH病変部の赤みの消失をもたらすと考える。

プロプラノロールは、HUVECsの増殖、遊走及び管腔形成、並びにHemECsの増殖及び管腔形成を濃度依存的に抑制し、血管新生抑制作用を示した。また、プロプラノロールはHemECsにおいてVEGF及びその受容体（VEGF-R）の発現、VEGF刺激によるPI3K/Akt及びp38/MAPK経路の活性化（リン酸化）、並びにHIF-1αの発現をいずれも抑制した。これら血管新生にかかわる因子及び経路を抑制することが、プロプラノロールの細胞増殖抑制及び血管新生抑制作用機序と考える。

プロプラノロールは、HemECsにおいてアポトーシス誘導遺伝子の発現を増加させ、一方、アポトーシス抑制遺伝子の発現を減少させた。また、プロプラノロールはHUVECs及びHemECsにおいてアポトーシス誘導酵素であるカスパーゼを活性化し、アポトーシス細胞を増加させた。

以上の薬理作用によって、プロプラノロールはIHに対する治療効果を示すと考える。

2.4.5.2 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.4.5.3 安全性薬理試験

該当資料なし。

2.4.5.4 薬物動態試験

ヒトの発育段階で新生児期及び乳幼児期に相当する4日齢及び21日齢の幼若ラットを用いて、プロプラノロールの単回及び反復経口投与時の薬物動態を評価したところ、幼若動物においても、成熟動物の場合と同様、プロプラノロールは速やかに吸収され、t_{max}は投与量にかかわらず概ね1 時間であった。また、10～40 mg/kg/dayの高用量域におけるプロプラノロールの薬物動態は、単回及び反復経口投与のいずれにおいても非線形性を示し、反復投与による蓄積性は認められず、21日齢におけるプロプラノロールの全身暴露量は、4日齢より低値であった。この現象は、ラットにおけるプロプラノロールのクリアランスが、代謝酵素（CYP）の発達に伴い、日齢により変化して高くなることから起こるものと考える。

薬物間相互作用に関しては、小児におけるデータはないが、今まで蓄積されている成人のデータを参考にすることができる。また、これを基に、母親から患者への母乳を介した相互作用についても注意する必要があると考える。

2.4.5.5 毒性試験

幼若ラットを用いた試験を実施し、ヒトの新生児期、乳幼児期、児童期、青少年期に相当する

発達期間に対するプロプラノロールの影響を経口投与により検討した。

一般毒性学的パラメータについては、高用量の40 mg/kg/dayのみで所見が認められたが、プロプラノロール投与との関連性は明らかでなかった。一方、発達等に関連する指標（器官・機能の発達、生殖能力及び心臓機能）では、高用量の40 mg/kg/dayまでプロプラノロールに関連した影響はみられなかった。この用量の血漿中プロプラノロール濃度の$AUC_{0\text{-}24\ h}$は、投与1日（生後4日）で3030～3387 ng·h/mL、投与18日（生後21日）で1051～2516 ng·h/mLであった。35～90日齢及び91～150日齢のIH患者の定常状態における血漿中プロプラノロール濃度の$AUC_{0\text{-}24\ h}$値は、それぞれ12時間で541 ng·h/mL及び430 ng·h/mLであったことから（24時間と仮定すると860～1082 ng·h/mL、臨床試験 V00400SB102）、これらの指標における投与1日（生後4日）の安全マージンは2.8～3.9、投与18日（生後21日）では1.0～2.9であった。プロプラノロールが長年にわたり臨床現場で使用されていること、添付文書等に記載されているとおり副作用や使用上の注意が明確であることを考慮すると、本申請における安全性上の懸念はないと考える。

2.4.5.6 結論

本剤の有効性及び安全性プロファイルは、上記の提出資料により適切に評価されたものと考える。プロプラノロールの安全マージン、臨床成績及び長期にわたる臨床使用経験を考慮すると、本剤はIH患者の治療に安全に使用できるものと考える。

2.4.6 参考文献

1) Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. N Engl J Med. 2008; 358(24): 2649-2651.
2) 渡邊彰二. 乳児血管腫 (Infantile Hemangioma). 血管腫・血管奇形診療ガイドライン作成委員会. 血管腫・血管奇形診断診療ガイドライン2013. 第1版. 2013; 14-17.
3) Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. Br J Dermatol. 2010; 163(2): 269-274.
4) North PE, Waner M, Mizeracki A, Mihm MC Jr. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. Hum Pathol. 2000; 31(1): 11-22.
5) Greenberger S, Bischoff J. Pathogenesis of infantile haemangioma. Br J Dermatol. 2013; 169(1): 12-19.
6) Ji Y, Chen S, Li K, Li L, Xu C, Xiang B. Signaling pathways in the development of infantile hemangioma. J Hematol Oncol. 2014; 7(1): 13.
7) Stiles J, Amaya C, Pham R, Rowntree RK, Lacaze M, Mulne A et al. Propranolol treatment of infantile hemangioma endothelial cells: A molecular analysis. Exp Ther Med. 2012; 4(4): 594-604.
8) Hadaschik E, Scheiba N, Engstner M, Flux K. High levels of β_2-adrenoceptors are expressed in infantile capillary hemangiomas and may mediate the therapeutic effect of propranolol. J Cutan Pathol. 2012; 39(9): 881-883.
9) Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. Pharmacol Rev. 2001; 53(2): 319-356.
10) Ji Y, Chen S, Xu C, Li L, Xiang B. The use of propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: an update on potential mechanisms of action. Br J Dermatol. 2015; 172(1): 24-32.
11) Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27(12): 2664-2670.