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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

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
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
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells：ヒト臍帯静脈内皮細胞
IH	Infantile hemangioma(s)：乳児血管腫
MAPK	Mitogen-activated protein kinase：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase：ホスホイノシチド3-キナーゼ
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

目次

頁

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 名称及び化学構造式 4
2.6.1.2 プロプラノロールの薬理作用 4
2.6.1.3 本剤の予定する効能・効果及び用法・用量 4
2.6.1.4 参考文献 5

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

M703101は、有効成分としてプロプラノロール塩酸塩（M7031）を4.28 mg/mL（プロプラノロールとして3.75 mg/mL）含有する経口液剤であり、内服による乳児血管腫（IH）治療薬としてフランスのPierre Fabre Dermatologie社によって開発された。

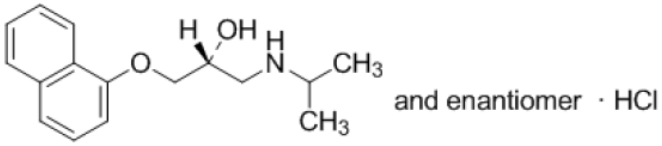
2.6.1.1 名称及び化学構造式

M7031の名称及び化学構造式は以下のとおりである。

一般名　　：JAN　プロプラノロール塩酸塩（日本名）Propranolol hydrochloride（英名）

化学名　　：(2*RS*)-1-(1-Methylethyl)amino-3-(naphthalen-1-yloxy)propan-2-ol monohydrochloride

構造式　　：



分子式　　：$C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$

分子量　　：295.80

2.6.1.2 プロプラノロールの薬理作用

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る。この血管収縮作用が、増殖期のIH病変部の赤みの消失及び軟化を投与開始直後にもたらすと考えられている[1),2)]。

プロプラノロールは、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）の増殖、遊走及び管腔形成、並びに乳児血管腫由来内皮細胞（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す。HemECsにおいて、プロプラノロールは血管内皮細胞増殖因子（VEGF）及びその受容体（VEGF-R）の発現、VEGF刺激によるホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）/ プロテインキナーゼB（Akt）及びp38/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路の活性化（リン酸化）、並びに低酸素誘導因子1α（HIF-1α）の発現をいずれも抑制する。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る。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る。

2.6.1.3 本剤の予定する効能・効果及び用法・用量

本剤の予定する効能・効果及び用法・用量を表 2.6.1-1に示した。

表 2.6.1-1 本剤の予定する効能・効果及び用法・用量

効能・効果	乳児血管腫
用法・用量	通常、プロプラノロールとして1日1 mg/kg～3 mg/kgを2回に分け、空腹時を避けて経口投与する。投与は1日1 mg/kgから開始し、2日以上の間隔をあけて1 mg/kgずつ増量し、1日3 mg/kgで維持するが、患者の状態に応じて

	適宜減量する。

2.6.1.4 参考文献

1) Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. Br J Dermatol. 2010; 163(2): 269-274.
2) 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.

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）

2.6.2　薬理試験の概要文

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
Akt	Protein kinase B：プロテインキナーゼBと同義
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate：環状アデノシン一リン酸
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着法
EBM-2	Endothelial cell basal medium-2：血管内皮細胞用基礎培地
EGM	Endothelial cell growth medium：血管内皮細胞用増殖培地
ERK	Extracellular signal-regulated kinase：細胞外シグナル制御キナーゼ
FITC	Fluorescein isothiocyanate：フルオレセインイソチオシアネート
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase：グリセルアルデヒド3 リン酸脱水素酵素
GTP	Guanosine triphosphate：グアノシン三リン酸
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
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
^{125}I-CYP	^{125}I-iodocyanopindolol：^{125}I-標識ヨードシアノピンドロール
Ki	Inhibition constant：阻害定数
MAPK	Mitogen-activated protein kinase：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
mRNA	Messenger ribonucleic acid：メッセンジャーリボ核酸
NO	Nitric oxide：一酸化窒素
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
PCR	Polymerase chain reaction：ポリメラーゼ連鎖反応
PI	Propidium iodide：プロピジウムヨウ化物
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
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
WST	Water soluble tetrazolium salts：水溶性テトラゾリウム塩

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.3 副次的薬理試験 21
2.6.2.4 安全性薬理試験 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 21
2.6.2.6 考察及び結論 21
2.6.2.7 図表 22
2.6.2.8 参考文献 22

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

非選択的β-アドレナリン受容体遮断薬であるプロプラノロールは、米国では乳児血管腫（IH）に対する希少疾患用医薬品として2014年に承認されている。IHに対するプロプラノロールの薬理作用については、以下に示すとおり種々の試験結果が既に公表されていることから、それら公表論文を引用することとし、新たな試験は実施しなかった。

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。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の一覧表を2.6.3.2に示す。

2.6.2.1.1.1 β-アドレナリン受容体に対する結合能及び拮抗作用

（*S*）-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結合阻害活性を示し、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（それぞれ、自発拍動数増加、ヒスタミンの収縮反応に対する弛緩反応及びカルバコールの収縮反応に対する弛緩反応）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。

2.6.2.1.1.2 血管収縮作用

プロプラノロールは、イヌの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。

2.6.2.1.1.3 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50%阻害濃度（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内皮細胞（HemECs）の増殖を50 µmol/L以上で有意に抑制した。

2.6.2.1.1.4 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5 µmol/L以上で有意に抑制し、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において、血管内皮細胞増殖因子（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刺激によるホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）/ プロテインキナーゼB（Akt）及びp38/分裂促進因子活性化タンパ

ク質キナーゼ（MAPK）の活性化（リン酸化）、並びに低酸素誘導因子1α（HIF-1α）の発現を濃度依存的に抑制した。

2.6.2.1.1.5 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。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

2.6.2.1.3.1 中枢神経系に及ぼす影響

該当資料なし。

2.6.2.1.3.2 呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響

該当資料なし。

2.6.2.1.3.3 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。

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 β-アドレナリン受容体に対する結合能

[4.2.1.1-1（参考資料）]

(1) 試験方法

ヒトのβ_1-、β_2-及びβ_3-アドレナリン受容体の遺伝子をそれぞれ強制発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞から調製した膜画分を用いて、非選択的β-アドレナリン受容体拮抗薬であるヨードシアノピンドロールの^{125}I-標識体（^{125}I-CYP）をリガンドとして、（*S*）-プロプラノロールの結合阻害活性を測定した。反応は200 µLの50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液（pH 7.4）中で、100 µmol/Lグアノシン三リン酸（GTP）存在下で実施した。β_1-及びβ_2-アドレナリン受容体の場合は50 pmol/L ^{125}I-CYP、β_3-アドレナリン受容体の場合は80 pmol/L ^{125}I-CYPを用い、膜画分と各種濃度のプロプラノロールを30°Cで90分間インキュベートし、反応液をフィルターろ過し、膜画分に回収される放射活性をγ-カウンターで計測した。その計測値から、IC_{50}値及びKi値を算出した。

(2) 試験結果

ヒトのβ_1-、β_2-及びβ_3-アドレナリン受容体への^{125}I-CYPの結合に対する（*S*）-プロプラノロールの結合阻害活性を表 2.6.2-1に示す。（*S*）-プロプラノロールのβ_1-、β_2-及びβ_3-アドレナリン受容体におけるKi値はそれぞれ1.8、0.8及び186 nmol/Lであった。

表 2.6.2-1 ヒトβ-アドレナリン受容体サブタイプに対する（*S*）-プロプラノロールの結合能
（4.2.1.1-1のTable 2を改編）

Compound	β_1-adrenergic receptor		β_2-adrenergic receptor		β_3-adrenergic receptor	
	Ki (nmol/L)	95% Confidence limit	Ki (nmol/L)	95% Confidence limit	Ki (nmol/L)	95% Confidence limit
S-Propranolol	1.8	1.2-2.8	0.8	0.6-1.0	186	134-259

結果は幾何平均値で示す（n≥3）。

2.6.2.2.2 β-アドレナリン受容体に対する拮抗作用

[4.2.1.1-2（参考資料）]

(1) 試験方法

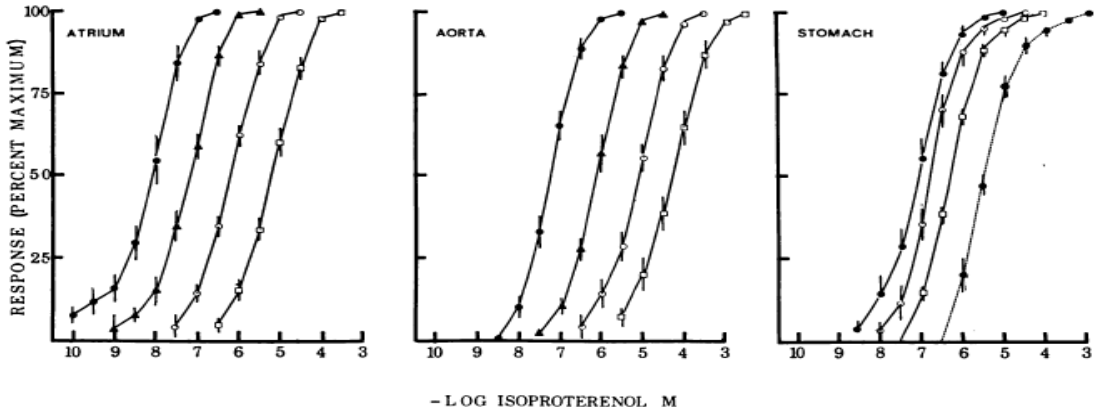
ウサギの右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本において、非選択的β-アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールの反応に対するプロプラノロールの拮抗活性を測定した。イソプロテレノールの反応は、右心房では自発拍動数の増加、大動脈ではヒスタミンの収縮反応に対する弛緩反応、胃ではカルバコールの収縮反応に対する弛緩反応とした。右心房標本及び各平滑筋標本を95% O_2、5% CO_2で飽和したmodified Krebs-Henseleit液を満たした37～38°Cのオルガンバス内に懸垂し、その収縮反応を荷重変位トランスデューサーにて張力に変換し、ポリグラフ上に記録した。10^{-8}～10^{-5} mol/Lプロプラノロール存在下でイソプロテレノールを累積的に添加し、濃度反応曲線を作成した。

(2) 試験結果

ウサギの右心房、大動脈及び胃の平滑筋標本におけるイソプロテレノールによる反応に対する

プロプラノロールの拮抗作用を図 2.6.2-1に示す。プロプラノロールはいずれの平滑筋標本においても、イソプロテレノールの濃度反応曲線を高濃度側（右側）に平行移動させ、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。

図 2.6.2-1 ウサギ右心房、大動脈及び胃の平滑筋標本におけるイソプロテレノールの反応に対するプロプラノロールの拮抗作用（4.2.1.1-2のFig. 1を引用）



結果は平均値±標準誤差（n=5）で示す。
左：右心房（心筋標本）、中央：大動脈（血管平滑筋標本）、右：胃（胃平滑筋標本）。
●—●:control、▲—▲:プロプラノロール(10^{-8} mol/L)、○—○:プロプラノロール(10^{-7} mol/L)、□—□：プロプラノロール（10^{-6} mol/L）、●---●：プロプラノロール（10^{-5} mol/L）。

2.6.2.2.3 血管収縮作用

[4.2.1.1-3（参考資料）]

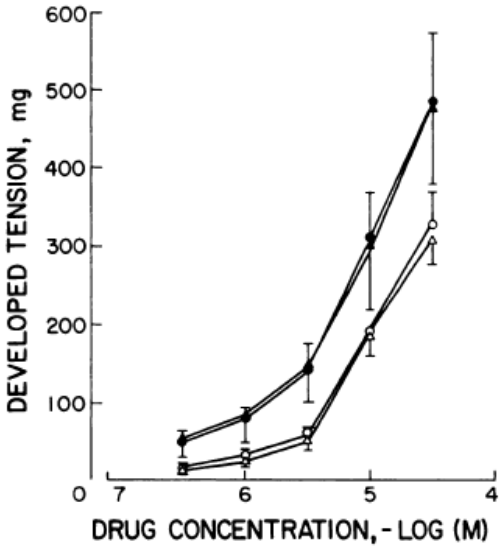
(1) 試験方法

イヌの左冠状動脈前下行枝（外径0.5～1.0 mm）及び左冠状動脈回旋枝（外径1.5～3.0 mm）を摘出し、平滑筋標本を作製した。各標本を95% O_2、5% CO_2で飽和したKrebs-Henseleit-bicarbonate液を満たした37±0.5℃のオルガンバス内に懸垂し、静止張力1.5 g下において、荷重変位トランスデューサーに接続し、収縮反応をレコーダー上に記録した。プロプラノロール（ラセミ体又は*d*体）は累積的に添加し、添加濃度と反応の関係を求めた。

(2) 試験結果

イヌの左冠状動脈前下行枝及び左冠状動脈回旋枝の平滑筋標本におけるプロプラノロール添加による収縮反応を図 2.6.2-2に示す。ラセミ体及び*d*体-プロプラノロールはいずれの血管平滑筋標本においても、0.3～30 μmol/Lの濃度域において濃度依存的な収縮反応を示した。

図 2.6.2-2 イヌ左冠状動脈前下行枝及び左冠状動脈回旋枝の平滑筋標本における
プロプラノロールの収縮反応（4.2.1.1-3のFig. 3を引用）



結果は平均値±標準誤差（n=7）で示す。
●：ラセミ体（左冠状動脈回旋枝、外径1.5～3.0 mm）、○：ラセミ体（左冠状動脈前下行枝、外径0.5～1.0 mm）、▲：*d*体（左冠状動脈回旋枝、外径1.5～3.0 mm）、△：*d*体（左冠状動脈前下行枝、外径0.5～1.0 mm）。

2.6.2.2.4 細胞増殖抑制作用

2.6.2.2.4.1 ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖に対する抑制作用

[4.2.1.1-4（参考資料）]

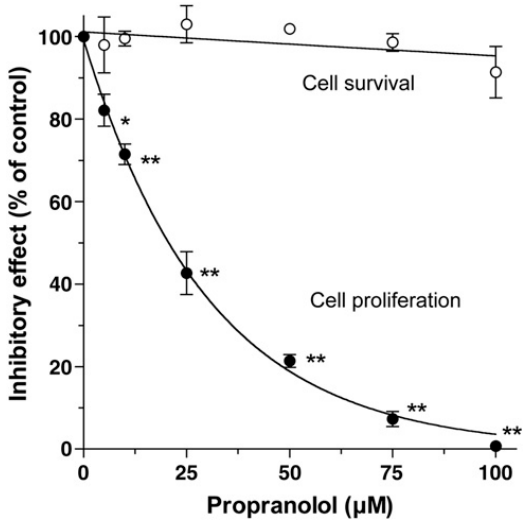
(1) 試験方法

HUVECs（8×10^3 cells/well）を血管内皮細胞用基礎培地（EBM-2）に懸濁し、0～100 µmol/Lプロプラノロールを添加して30時間培養した。その後、細胞増殖は水溶性テトラゾリウム塩（WST-1）法により、細胞毒性は乳酸デヒドロゲナーゼ活性を指標として測定した。

(2) 試験結果

HUVECsの増殖に対するプロプラノロールの抑制作用を図 2.6.2-3に示す。プロプラノロールは、HUVECsの増殖を濃度依存的かつ5 µmol/L以上で有意に抑制し、そのIC$_{50}$値は21 µmol/Lであった。なお、同じ濃度域において、プロプラノロールによる細胞毒性は認められなかった。

図 2.6.2-3 HUVECsの増殖に対するプロプラノロールの抑制作用（4.2.1.1-4のFig. 1を引用）



結果は平均値±標準誤差（n=3）で示す。●：細胞増殖、○：細胞毒性。
*P<0.05、**P<0.01 vs control（one-way analysis of variance with Dunnett's post hoc test）。

2.6.2.2.4.2 乳児血管腫由来内皮細胞の増殖に対する抑制作用

[4.2.1.1-5（参考資料）]

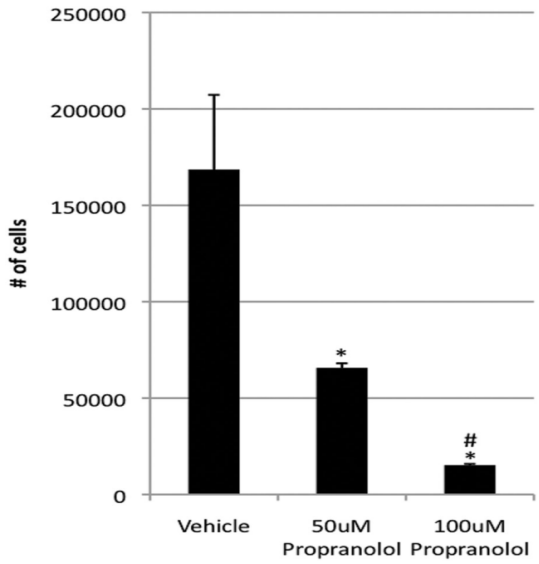
(1) 試験方法

HemECs（1.0×10^4 cells/well）を血管内皮細胞用増殖培地（EGM-2）に懸濁し、0、50及び100 μmol/Lプロプラノロールを添加した。その後、同じ濃度のプロプラノロールを含有する培地を隔日交換しながら4日間培養した後、WST-8法により細胞増殖を測定した。

(2) 試験結果

HemECsの増殖に対するプロプラノロールの抑制作用を図 2.6.2-4に示す。50及び100 μmol/Lプロプラノロールは溶媒対照と比較して、HemECsの増殖を有意に抑制した。

図 2.6.2-4 HemECsの増殖に対するプロプラノロールの抑制作用（4.2.1.1-5のFig. 4を改編）



n=3。*P<0.05 vs vehicle。#P<0.05 vs 50 μmol/L propranolol。

2.6.2.2.5 血管新生抑制作用

2.6.2.2.5.1 ヒト臍帯静脈内皮細胞の遊走に対する抑制作用

[4.2.1.1-4（参考資料）]

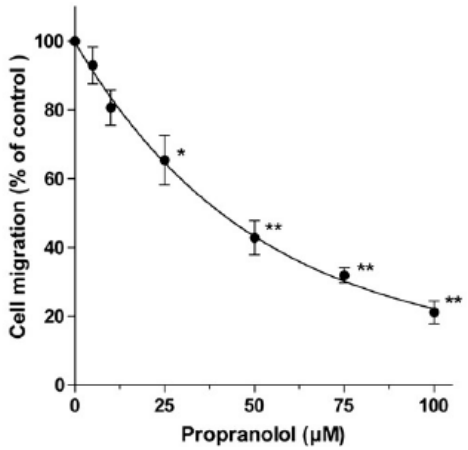
(1) 試験方法

トランスウェル（膜ポアサイズ：8 μm）の上層チャンバーにHUVECs（5×10^4 cells）を接着させた後、上層と下層チャンバーに最終濃度が0～100 μmol/Lとなるようにプロプラノロール含有培地（EBM-2）を添加した。2時間培養後に、増殖因子としてU87ヒト神経膠芽腫細胞の培養上清を下層チャンバーに入れ、更に4時間培養し、細胞を遊走させた。上層チャンバーにある膜を上面側から下面側へ移動した細胞をホルマリン固定後にクリスタルバイオレットで染色し、遊走細胞として計測した。

(2) 試験結果

HUVECsの遊走に対するプロプラノロールの作用を図 2.6.2-5に示す。プロプラノロールは増殖因子刺激による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。

図 2.6.2-5 HUVECsの遊走に対するプロプラノロールの抑制作用（4.2.1.1-4のFig. 3Aを引用）



結果は平均値±標準誤差で示す（n=3）。
*P<0.05、**P<0.01 vs control（one-way analysis of variance with Dunnett's post hoc test）。

2.6.2.2.5.2 ヒト臍帯静脈内皮細胞及び皮膚微小血管内皮細胞の管腔形成に対する抑制作用

[4.2.1.1-4（参考資料）]

(1) 試験方法

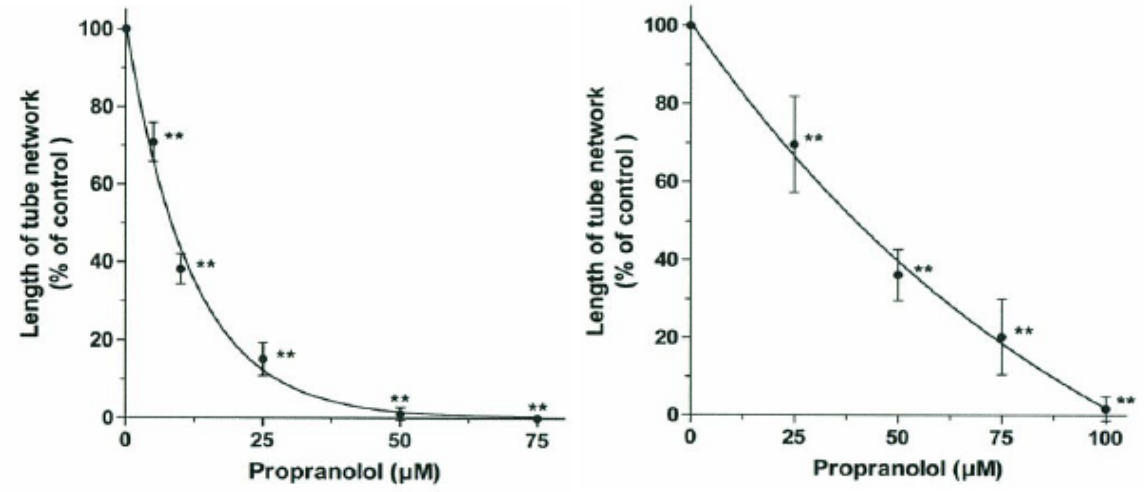
マトリゲルを固定化した96穴プレートに、EBM-2培地に懸濁したHUVECs及びHDMVECsをそれぞれ2×10^4 cells/well播種して30分間培養した。続いて、HUVECsには0～75 μmol/Lプロプラノロールを添加して6時間、HDMVECsには0～100 μmol/Lプロプラノロールを添加して18時間、37°Cで培養した。その後、顕微鏡下で毛細血管様構造の管腔長を測定した。

(2) 試験結果

HUVECs及びHDMVECsの管腔形成に対するプロプラノロールの作用を図 2.6.2-6に示す。プロプラノロールはHUVECsの管腔形成を濃度依存的かつ5 μmol/L以上で有意に抑制し、そのIC_{50}値は8 μmol/Lであった。また、プロプラノロールはHDMVECsの管腔形成も濃度依存的かつ25 μmol/L以上で有意に抑制した。

図 2.6.2-6 HUVECs及びHDMVECsの管腔形成に対するプロプラノロールの抑制作用
（4.2.1.1-4のFig. 3B及び3Cを改編）

A：HUVECs　　B：HDMVECs



結果は平均値±標準偏差で示す（n=2）。
**P<0.01 vs control（one-way analysis of variance with Dunnett's post hoc test）。

2.6.2.2.5.3 乳児血管腫由来内皮細胞の管腔形成に対する抑制作用

[4.2.1.1-6（参考資料）]

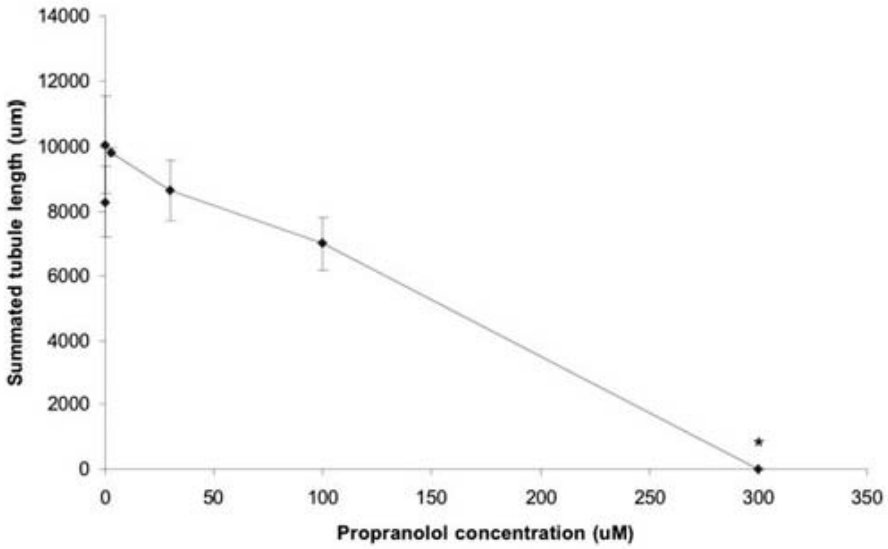
(1) 試験方法

IHの病変部組織から単離したHemECsをMCDB131培地に懸濁し、マトリゲルを固定化した96穴プレートに2×10^4 cells/well播種して30分間培養した。続いて、0～300 μmol/Lプロプラノロールを添加して、37°Cで18時間培養した。その後、顕微鏡下で毛細血管様構造の管腔長を測定した。

(2) 試験結果

HemECsの管腔形成に対するプロプラノロールの作用を図 2.6.2-7に示す。プロプラノロールはHemECsの管腔形成を濃度依存的かつ300 μmol/Lで有意に抑制した。

図 2.6.2-7 HemECsの管腔形成に対するプロプラノロールの抑制作用
（4.2.1.1-6のFig. 1Dを引用）



結果は平均値±標準偏差で示す（n=4）。
*P<0.05 vs control（Analysis of variance followed by Tukey multiple comparison test）。

2.6.2.2.5.4 乳児血管腫由来内皮細胞におけるVEGF-A/VEGF受容体の発現、並びにPI3K/Akt及びp38/MAPKの活性化（リン酸化）に対する抑制作用

[4.2.1.1-6（参考資料）]

(1) 試験方法

IHの病変部組織から単離したHemECsにおけるVEGF-A及びその受容体（VEGF-R）の発現、並びにPI3K/Akt及びp38/MAPKのリン酸化に対するプロプラノロールの作用を調べた。VEGF-A/VEGF-Rの発現は、MCDB131培地に懸濁したHemECsに0～300 µmol/Lプロプラノロールを添加して48及び96時間培養した後、細胞を溶解し、ウェスタンブロット法にて検出した。PI3K/Akt及びp38/MAPKのリン酸化は、MCDB131培地に懸濁したHemECsに0～300 µmol/Lプロプラノロールを添加して24時間培養した後、100 ng/mL VEGFにて5分間刺激し、cell-based enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）kitにて検出した。

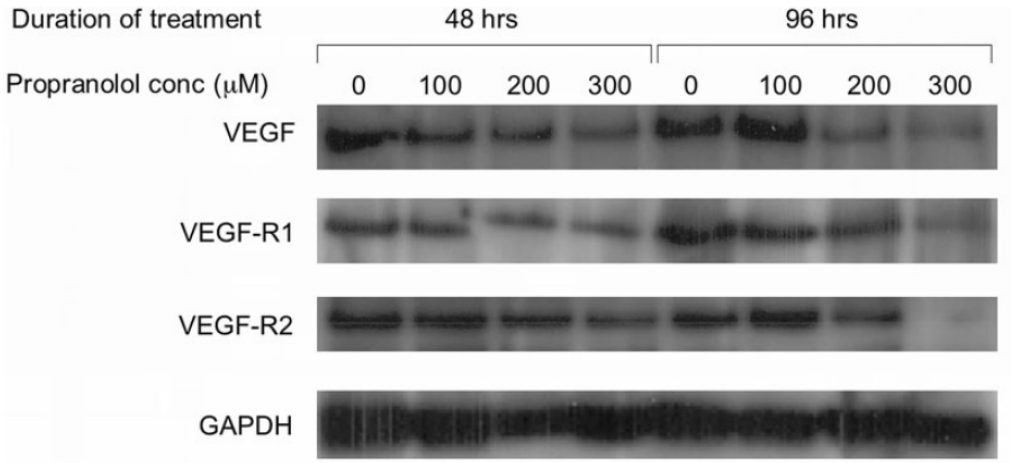
(2) 試験結果

HemECsにおけるVEGF-A/VEGF-Rの発現に対するプロプラノロールの抑制作用を図 2.6.2-8Aに示す。プロプラノロールは、VEGF-Aの発現を濃度依存的に抑制するとともにVEGF-R1及びVEGF-R2の発現も濃度依存的に抑制した。

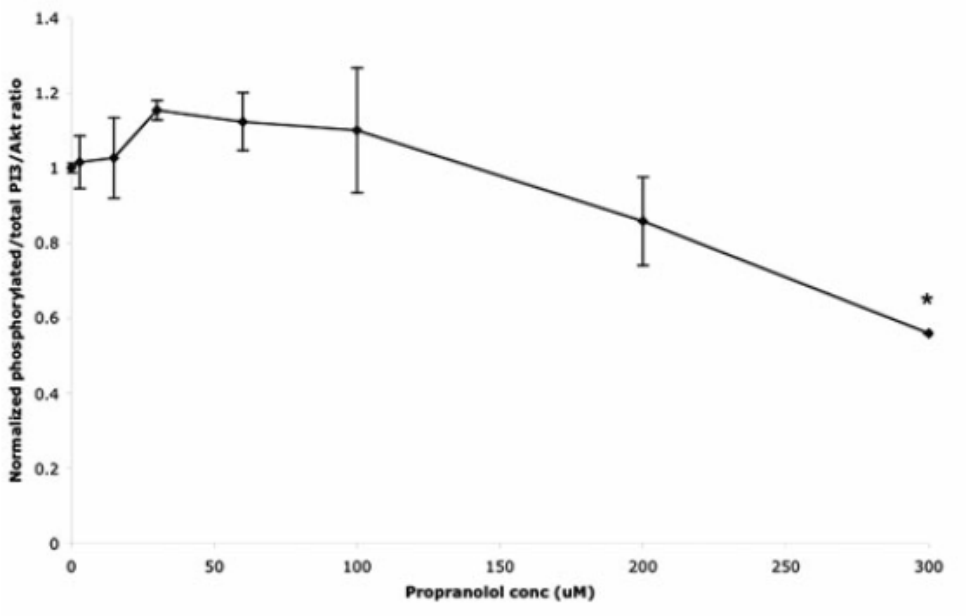
HemECsにおけるPI3K/Akt及びp38/MAPKのリン酸化に対するプロプラノロールの抑制作用を、それぞれ図 2.6.2-8B及び図 2.6.2-8Cに示す。プロプラノロールはPI3K/Aktのリン酸化を濃度依存的かつ300 µmol/Lで有意に抑制した。また、プロプラノロールはp38/MAPKのリン酸化を濃度依存的かつ200 µmol/L以上で有意に抑制した。

図 2.6.2-8 HemECsにおけるVEGF/VEGF-Rの発現、並びにPI3K/Akt及びp38/MAPKのリン酸化に対するプロプラノロールの抑制作用（4.2.1.1-6のFig. 4A、Fig. 5A、Fig. 5Bを改編）

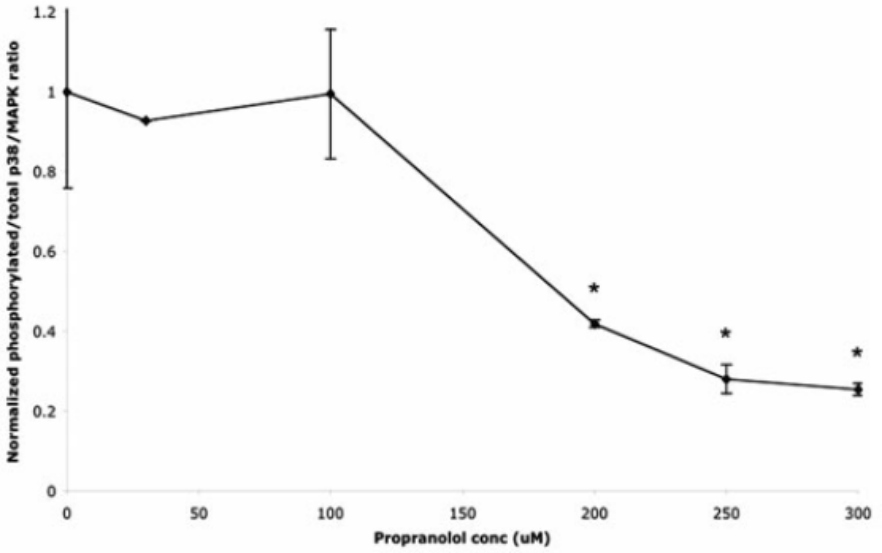
A：VEGF/VEGF-R



B：PI3K/Akt



C：p38/MAPK



A：ウェスタンブロット法の結果。同一タンパク量（19 µg）を各レーンに添加し、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素（GAPDH）を内部対照とした。
B：縦軸は総PI3K/Akt量に対するリン酸化PI3K/Aktの比、横軸はプロプラノロール濃度（µmol/L）を示す。
C：縦軸は総p38/MAPK量に対するリン酸化p38/MAPKの比、横軸はプロプラノロール濃度（µmol/L）を示す。
結果は平均値±標準偏差で示す（n=4）。
*P<0.05 vs control（Analysis of variance followed by Tukey multiple comparison test）。

2.6.2.2.5.5 乳児血管腫由来内皮細胞における低酸素誘導因子の発現に対する抑制作用

[4.2.1.1-6（参考資料）]

(1) 試験方法

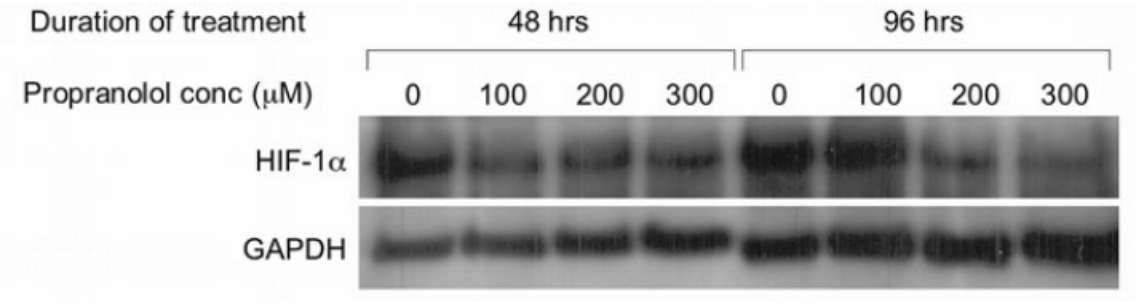
IHの病変部組織から単離したHemECsをMCDB131培地に懸濁し、0～300 µmol/Lプロプラノールを添加して48及び96時間培養した後、細胞を溶解し、HIF-1αの発現をウェスタンブロット法にて検出した。また、別途、MCDB131培地に懸濁したHemECsに0～300 µmol/Lプロプラノールを添加して24時間培養し、100 ng/mL VEGFにて5分間刺激した後に、cell-based ELISA法でもHIF-1αの発現を検討した。

(2) 試験結果

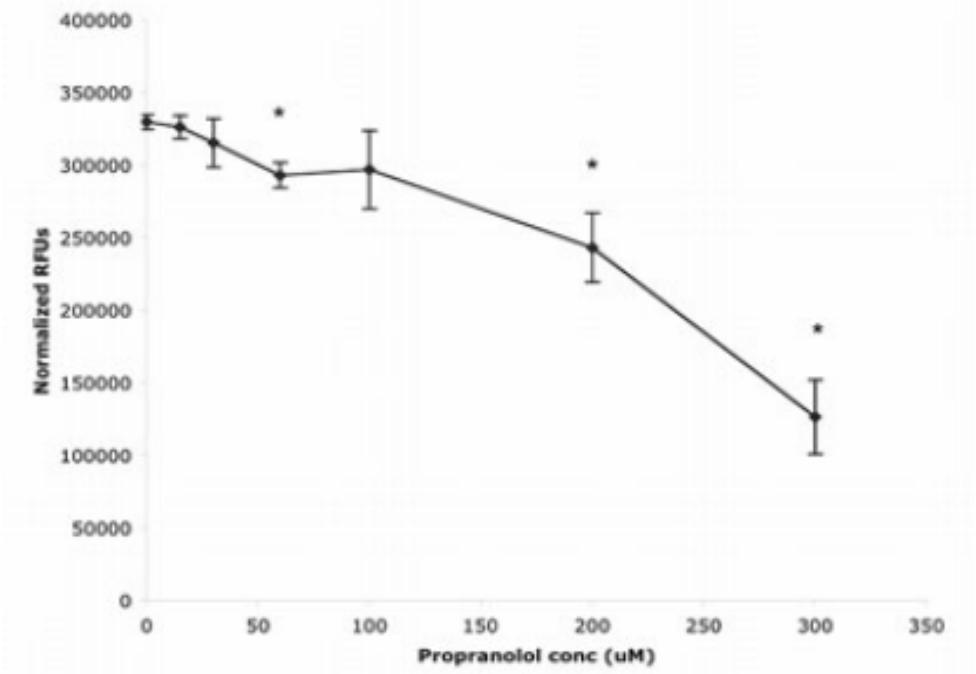
HemECsにおけるHIF-1αの発現に対するプロプラノロールの抑制作用を図 2.6.2-9に示す。HIF-1αの発現をウェスタンブロット法で検出したとき、プロプラノロールはHIF-1αの発現を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2-9A）。同様の結果は、cell-based ELISA法でも認められた（図 2.6.2-9B）。

図 2.6.2-9 HemECsにおけるHIF-1αの発現に対するプロプラノロールの抑制作用
（4.2.1.1-6のFig. 6A及び6Bを改編）

A



B



A：ウェスタンブロット法の結果。同一タンパク量（19 μg）を各レーンに添加し、GAPDHを内部対照とした。
B：Cell-based HIF-1α ELISA法の結果を平均値±標準偏差で示す（n=3）。
*P<0.05 vs control（Analysis of variance followed by Tukey multiple comparison test）。

2.6.2.2.6 アポトーシス誘導作用

2.6.2.2.6.1 ヒト臍帯静脈内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス細胞率及びアポトーシス誘導酵素活性）

[4.2.1.1-7（参考資料）]

(1) 試験方法

HUVECsをRPMI 1640培地に懸濁し、200 μmol/Lプロプラノロール存在下で24時間培養した後、細胞を回収、洗浄し、細胞懸濁液（1×10^6 cells/mL）を調製した。細胞懸濁液にR-フィコエリスリン標識アネキシンV（Annexin V）を添加し、遮光、氷上で15分間インキュベートした。その後、

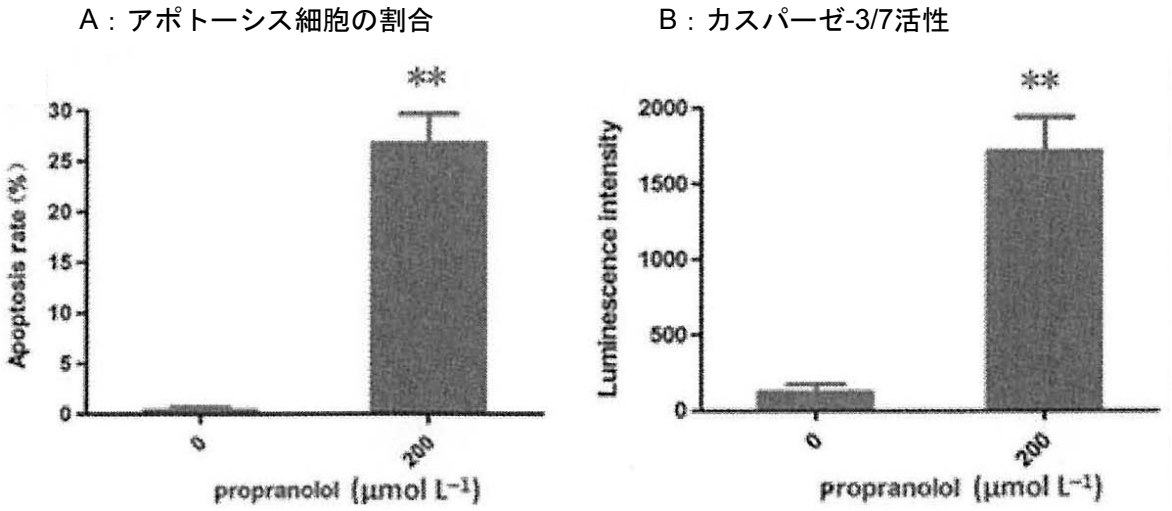
7-アミノアクチノマイシンDを添加してアポトーシス細胞を染色し、直ちにフローサイトメトリー解析を行った。全細胞数に対するアポトーシス細胞の割合（%）を算出した。

また、HUVECs（4× 10^4 cells/well）を200 µmol/Lプロプラノロール存在下で、37°Cで24時間インキュベートした後、各ウェルにカスパーゼ-3/7の合成基質を添加し、室温で1時間振とうさせながらインキュベートした。その後、カスパーゼ-3/7によって基質から切断された生成物とルシフェラーゼが反応して発生する蛍光の強度を測定した。

(2) 試験結果

HUVECsのアポトーシス細胞の割合及びカスパーゼ活性に対するプロプラノロールの作用を図2.6.2-10に示す。200 µmol/Lプロプラノロール存在下では、HUVECsのアポトーシス細胞の割合及びカスパーゼ-3/7活性が有意に増加した。

図 2.6.2-10 HUVECsに対するプロプラノロールのアポトーシス誘導作用
（4.2.1.1-7のFig. 2b及び2cを改編）



A：全細胞数に対するアポトーシス細胞の割合（%）を平均値±標準偏差（n=3）で示す。
B：カスパーゼ-3/7活性（蛍光強度）を平均値±標準偏差（n=3）で示す。
**P<0.01 vs untreated cells（Student's t-test）。

2.6.2.2.6.2 乳児血管腫由来内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス細胞率及びアポトーシス関連遺伝子の発現解析）

[4.2.1.1-8（参考資料）]

(1) 試験方法

HemECsをEBM-2に懸濁し、0～100 µmol/Lプロプラノロール存在下で24時間培養した後、細胞を回収し、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識Annexin V及びプロピジウムヨウ化物（PI）を用いた二重染色法により、アポトーシス細胞をフローサイトメトリーで測定した。

また、アポトーシス誘導遺伝子（p53及びBax）及びアポトーシス抑制遺伝子（Bcl-2及びBcl-xL）の発現解析も行った。HemECsを0及び100 µmol/Lプロプラノロール存在下で24時間培養した後、HemECsに発現するp53、Bax、Bcl-2及びBcl-xLのメッセンジャーリボ核酸（mRNA）を抽出し、定

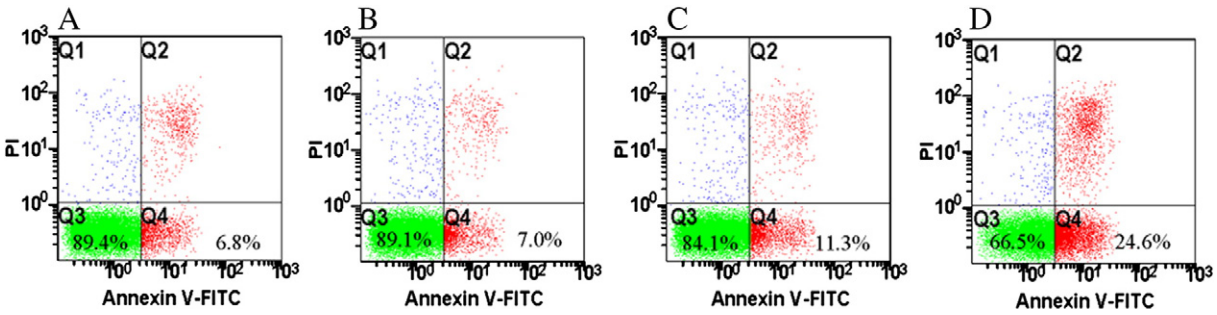
量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって遺伝子発現解析を行い、GAPDHを内部対照として相対発現量を算出した。プロプラノロール非処置サンプル（コントロール）のmRNAレベルを1として、アポトーシス関連の4種遺伝子のmRNAレベルを相対値で表した。

(2) 試験結果

フローサイトメトリーの結果を図 2.6.2-11に示す。プロプラノロールを処置したHemECsではアポトーシス細胞が濃度依存的に増加した（Q4領域に分布する細胞の割合が濃度依存的に増加）。100 µmol/Lプロプラノロール処置ではコントロールと比較して、HemECsのアポトーシス細胞の割合が有意に増加した（21.4 ± 3.6% vs 7.1 ± 2.2%、P<0.05）。

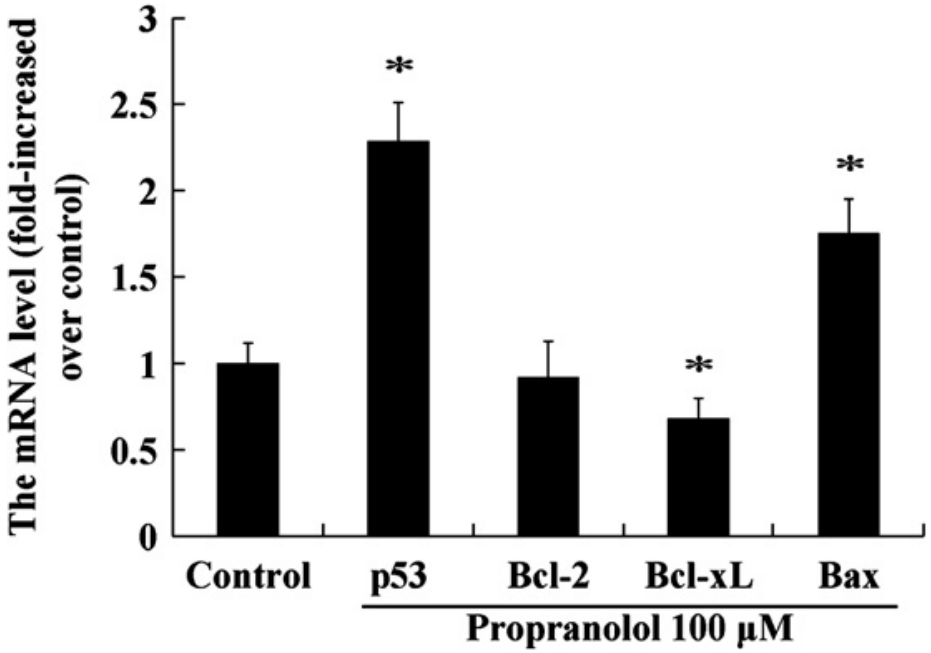
リアルタイムPCRの結果を図 2.6.2-12に示す。100 µmol/Lプロプラノロールを処置したHemECsではp53及びBaxのmRNA発現が有意に増加し、一方、Bcl-xLのmRNA発現は有意に減少した。

図 2.6.2-11 HemECsに対するプロプラノロールのアポトーシス誘導作用
（4.2.1.1-8のFig. 4を引用）



HemECsの結果は、ドットプロットで示す。
A：コントロール、B：25 µmol/Lプロプラノロール、C：50 µmol/Lプロプラノロール、
D：100 µmol/Lプロプラノロール。

図 2.6.2-12 HemECsにおけるアポトーシス誘導及び抑制遺伝子の発現に対するプロプラノロールの作用（4.2.1.1-8のFig. 8を引用）



*P<0.05 vs control（one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test）。

2.6.2.2.6.3 乳児血管腫由来内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス誘導酵素活性）

[4.2.1.1-8（参考資料）]

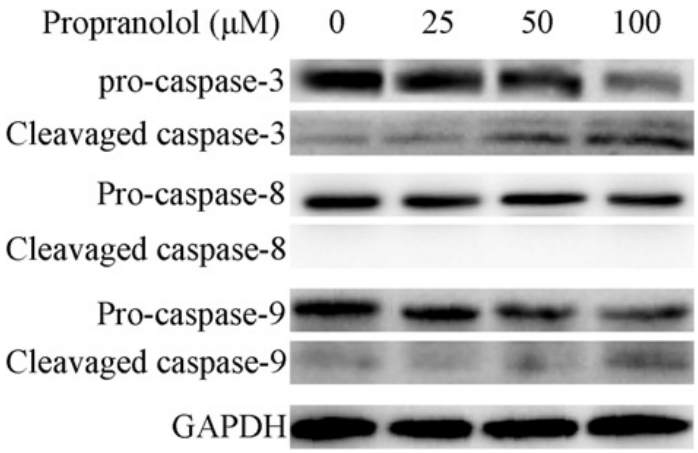
(1) 試験方法

HemECsをEBM-2に懸濁し、0～100 μmol/Lプロプラノロール存在下で24時間培養した後、タンパク質濃度をBradford法で測定した。その後、アポトーシス誘導酵素であるカスパーゼ-3、8及び9の不活性前駆体（pro-caspase）及び切断活性体（cleavaged caspase）をウェスタンブロット法で測定した。

(2) 試験結果

HemECsのカスパーゼ活性に対するプロプラノロールの作用を図 2.6.2-13に示す。100 μmol/Lプロプラノロールを処置したHemECsではプロプラノロール非処置（0 μmol/L）と比較して、カスパーゼ-9及びカスパーゼ-3の切断活性体量が増加しており、プロプラノロールによるカスパーゼ-9及び-3の活性化が認められた。

図 2.6.2-13 HemECsにおけるアポトーシス誘導酵素の活性に対する
プロプラノロールの作用（4.2.1.1-8のFig. 7を引用）



2.6.2.3 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.6.2.4 安全性薬理試験

該当資料なし。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

該当資料なし。

2.6.2.6 考察及び結論

＜効力を裏付ける試験＞

IH患者の病変部組織、特に血管内皮細胞にはβ_1-及びβ_2-アドレナリン受容体のmRNAが発現し[1)]、更にβ_2-アドレナリン受容体タンパク分子の発現も認められている[2)]。

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、イヌ冠状動脈の血管平滑筋標本を濃度依存的に収縮させた。血管内皮細胞上の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、血管平滑筋が弛緩する[3),4),5)]。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平滑筋を収縮させるため、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[3),4),6)]。

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、本薬はHemECsにおいてVEGF-A及びその受容体（VEGF-R1及び-R2）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。血管内皮細胞上の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、VEGFをはじめとする血管新生促進因子の産生が亢進し、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）/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[3),7),8),9)]。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HIF-1αの発現が増加しており[7),10)]、この因子も血管新生促進因子の産生を亢進させる[3)]。プロプラノロールは、これら細胞増殖及び血管新生にかかわる因子及び経路を抑制することによって、IH病変部の増大を抑制すると考える。

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。また、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（p53及びBax）の発現を増加させ、一方、アポトーシス抑制遺伝子（Bcl-xL）の発現を減少させた。血管内皮細胞上のβ-アドレナリン受容体刺激によってPKAの下流にある非受容体型チロシンキナーゼSrc及びMAPKが活性化されると、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[3),7)]、プロプラノロールはこのシグナル伝達経路を抑制することによって、IH病変部の血管内皮細胞のアポトーシスを促進すると考える。IH病変部におけるアポトーシス細胞の割合は、増殖期から消退期への移行に伴い増加する[11)]ことから、IH病変の消退には血管内皮細胞のアポトーシスの関与が示唆されている。したがって、プロプラノロールによるアポトーシス誘導作用は、IH病変の消退に寄与すると考える。

以上のように、プロプラノロールは血管収縮作用、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を有し、これらの薬理作用がIHに対する治療効果に関与していると考える。

2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1) 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.
2) 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.
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) Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. Pharmacol Rev. 2001; 53(2): 319-356.
5) Vanhoutte PM. Endothelial adrenoceptors. J Cardiovasc Pharmacol. 2001; 38(5): 796-808.
6) 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.
7) 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.
8) Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S et al. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. Clin Cancer Res. 2003; 9(12): 4514-4521.
9) Ji Y, Chen S, Li K, Xiao X, Zheng S, Xu T. The role of β-adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells. Cell Division. 2013; 8(1): 1-11.
10) 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.
11) Razon MJ, Kräling BM, Mulliken JB, Bischoff J. Increased apoptosis coincides with onset of involution in infantile hemangioma. Microcirculation. 1998; 5(2-3): 189-195.

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）

2.6.3　薬理試験の概要表

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
Akt	Protein kinase B：プロテインキナーゼBと同義
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着法
H	Hour(s)：時間
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
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
Ki	Inhibition constant：阻害定数
MAPK	Mitogen-activated protein kinase：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
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
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase：ホスホイノシチド3-キナーゼ
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

目次

頁

2.6.3 薬理試験の概要表 4
2.6.3.1 薬理試験 4
2.6.3.1 薬理試験（続き） 6
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 9
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 9

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験

一覧表

被験物質：プロプラノロール

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告年	CTDにおける記載箇所
効力を裏付ける試験					
β-アドレナリン受容体に対する結合能					
ヒトβ-アドレナリン受容体に対する結合能	ヒトβ$_1$-、β$_2$-及びβ$_3$-アドレナリン受容体発現チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞	*In vitro*	—	2004	4.2.1.1-1
β-アドレナリン受容体に対する拮抗作用					
ウサギ右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本におけるイソプロテレノールの反応に対する拮抗作用	ウサギ右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本	*In vitro*	—	1970	4.2.1.1-2
血管収縮作用					
イヌ冠状動脈の平滑筋標本に対する収縮作用	イヌ冠状動脈の平滑筋標本	*In vitro*	—	1982	4.2.1.1-3
細胞増殖抑制作用					
ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖に対する抑制作用	ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）	*In vitro*	—	2010	4.2.1.1-4
乳児血管腫由来内皮細胞の増殖に対する抑制作用	乳児血管腫由来内皮細胞（HemECs）	*In vitro*	—	2012	4.2.1.1-5
血管新生抑制作用					
ヒト臍帯静脈内皮細胞の遊走に対する抑制作用	HUVECs	*In vitro*	—	2010	4.2.1.1-4

一覧表 被験物質：プロプラノロール

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告年	CTDにおける記載箇所
ヒト臍帯静脈内皮細胞及びヒト皮膚微小血管内皮細胞の管腔形成に対する抑制作用	HUVECs、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMVECs）	*In vitro*	—	2010	4.2.1.1-4
乳児血管腫由来内皮細胞の管腔形成に対する抑制作用	HemECs	*In vitro*	—	2012	4.2.1.1-6
乳児血管腫由来内皮細胞におけるVEGF/VEGF受容体の発現、並びにPI3K/Akt及びp38/MAPKの活性化（リン酸化）に対する抑制作用	HemECs	*In vitro*	—	2012	4.2.1.1-6
乳児血管腫由来内皮細胞における低酸素誘導因子の発現に対する抑制作用	HemECs	*In vitro*	—	2012	4.2.1.1-6
アポトーシス誘導作用					
ヒト臍帯静脈内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス細胞率及びアポトーシス誘導酵素活性）	HUVECs	*In vitro*	—	2013	4.2.1.1-7
乳児血管腫由来内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス細胞率及びアポトーシス関連遺伝子の発現解析）	HemECs	*In vitro*	—	2012	4.2.1.1-8
乳児血管腫由来内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス誘導酵素活性）	HemECs	*In vitro*	—	2012	4.2.1.1-8

2.6.3.1 薬理試験（続き）

一覧表

被験物質：プロプラノロール

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告年	CTDにおける記載箇所
副次的薬理試験					
該当資料なし					
安全性薬理試験					
該当資料なし					
薬力学的薬物相互作用試験					
該当資料なし					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

評価対象となる組織	試験系	投与方法	投与量及び反応時間	特記すべき所見	報告年
β-アドレナリン受容体に対する結合能					
ヒトβ–アドレナリン受容体に対する結合能	ヒトβ_1-、β_2-及びβ_3-アドレナリン受容体発現CHO細胞 （n≥3）	*In vitro*	濃度記載なし 90分	いずれの受容体に対しても結合阻害活性を示した。 阻害定数（Ki値）：β_1受容体、1.8 nmol/L； β_2受容体、0.8 nmol/L； β_3受容体、186 nmol/L	2004
β–アドレナリン受容体に対する拮抗作用					
ウサギ右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本におけるイソプロテレノールの反応に対する拮抗作用	ウサギ右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本 （n=5）	*In vitro*	10^{-8}～10^{-5} mol/mL 反応時間不明	ウサギ右心房標本並びに大動脈及び胃の平滑筋標本におけるイソプロテレノールの反応（それぞれ、自発拍動数増加、ヒスタミン収縮に対する弛緩反応及びカルバコール収縮に対する弛緩反応）の濃度反応曲線を高濃度側にシフトさせた。 pA_2値：右心房、8.80；大動脈、8.98；胃、6.89	1970
血管収縮作用					
イヌ冠状動脈の平滑筋標本に対する収縮作用	イヌ冠状動脈の平滑筋標本 （n=7）	*In vitro*	0.3～30 μmol/L 反応時間不明	濃度依存的な収縮反応を示した。	1982
細胞増殖抑制作用					
ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖に対する抑制作用	HUVECs （n=3）	*In vitro*	0～100 μmol/L 30 時間（H）	濃度依存的な増殖抑制作用を示した。 50%阻害濃度（IC_{50}）：21 μmol/L	2010
乳児血管腫由来内皮細胞の増殖に対する抑制作用	HemECs （n=3）	*In vitro*	0～100 μmol/L 4 days	50 μmol/L以上で有意な増殖抑制作用を示した。	2012

評価対象となる組織	試験系	投与方法	投与量及び反応時間	特記すべき所見	報告年
血管新生抑制作用					
ヒト臍帯静脈内皮細胞の遊走に対する抑制作用	HUVECs（n=3）	*In vitro*	0～100 µmol/L 2 H + 4 H	濃度依存的な遊走抑制作用を示した。	2010
ヒト臍帯静脈内皮細胞及びヒト皮膚微小血管内皮細胞の管腔形成に対する抑制作用	HUVECs HDMVECs（n=2）	*In vitro*	HUVECs：0～75 µmol/L 6 H HDMVECs：0～100 µmol/L 18 H	濃度依存的な管腔形成抑制作用を示した。 HUVECsでのIC_{50}：8 µmol/L	2010
乳児血管腫由来内皮細胞の管腔形成に対する抑制作用	HemECs（n=4）	*In vitro*	0～300 µmol/L 18 H	濃度依存的な管腔形成抑制作用を示した。	2012
乳児血管腫由来内皮細胞におけるVEGF/VEGF受容体の発現、PI3K/Akt及びp38/MAPKの活性化（リン酸化）に対する抑制作用	HemECs（n=1） ：ウェスタンブロット法	*In vitro*	0～300 µmol/L 血管内皮細胞増殖因子（VEGF）/血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGF-R）：48 H、96 H	VEGF-A、VEGF-R1及びVEGF-R2発現を抑制した。	2012
	HemECs（n=4） ： Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法		0～300 µmol/L ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）/プロテインキナーゼB（Akt）及びp38/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）： 24 H	PI3K/Akt及びp38/MAPKのリン酸化を濃度依存的に抑制した。	
乳児血管腫由来内皮細胞における低酸素誘導因子の発現に対する抑制作用	HemECs（n=1）：ウェスタンブロット法	*In vitro*	0～300 µmol/L 低酸素誘導因子1α（HIF-1α）：48 H、96 H	HIF-1α発現を濃度依存的に抑制した。	2012
	HemECs（n=3）：ELISA法		0～300 µmol/L HIF-1α：24 H		

評価対象となる組織	試験系	投与方法	投与量及び反応時間	特記すべき所見	報告年
アポトーシス誘導作用					
ヒト臍帯静脈内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス細胞率及びアポトーシス誘導酵素活性）	HUVECs（n=3）	*In vitro*	200 μmol/L 24 H	アポトーシス細胞の割合が有意に増加した。 カスパーゼ-3/7活性が有意に亢進した。	2013
乳児血管腫由来内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス細胞率及びアポトーシス関連遺伝子の発現解析）	HemECs	*In vitro*	0～100 μmol/L 24 H	アポトーシス細胞の割合が濃度依存的に増加した。 100 μmol/Lでアポトーシス誘導遺伝子（p53及びBax）の発現亢進及びアポトーシス抑制遺伝子（Bcl-xL）の発現抑制が有意に認められた。	2012
乳児血管腫由来内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用（アポトーシス誘導酵素活性）	HemECs	*In vitro*	0～100 μmol/L 24 H	100 μmol/Lでカスパーゼ-3及び-9活性が増加した。	2012

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.6.3.4 安全性薬理試験

該当資料なし。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。