GENERAL TOXICITY STUDY OF GADOBENATE DIMEGLUMINE FORMULATION (E7155) (1) — SINGLE DOSE INTRAVENOUS AND INTRACISTERNAL TOXICITY STUDY IN RATS —

Tadashi CHIMOTO¹, Fumio SAGAMI¹, Piero TIRONE²,
Alberto MORISETTI² and Simona BUSSI²

¹*Department of Developmental Safety Assessment Research, Eisai Co., Ltd.
1 Takehaya, Kawashima-cho, Hashima-gun, Gifu 501-6195, Japan*

²*Research Laboratories of Bracco S.p.A.
Via E. Folli, 50-20134 Milan, Italy*

(Received February 25, 1999; Accepted July 6, 1999)

ABSTRACT — Gadobenate dimeglumine formulation (E7155) was evaluated for its general toxicity potential following a single intravenous and intracisternal administration to rats. Dosage levels tested were 3.3, 4.5, 6.0 and 8.0 mmol/kg at the injection rate of 6 ml/min and 7.50, 8.89, 10.54 and 12.50 mmol/kg at 1 ml/min for the intravenous administration route, and 0.15, 0.21, 0.29 and 0.40 mmol/kg for the intracisternal administration route. Parameters measured during the 14-day observation period were mortality, clinical signs and macroscopic examination.

After intravenous administration at the injection rate of 6 ml/min, twitches, respiratory blocking and prostration were observed at 6.0 mmol/kg, and dyspnoea and sedation at 3.3 and 4.5 mmol/kg. Deaths occurred within 1 min after administration at 6.0 mmol/kg and above. LD₅₀ values were 7.97 mmol/kg in males and 6.22 mmol/kg in females.

After intravenous administration at the injection rate of 1 ml/min, shallow breathing, twitches and sedation were observed at 7.50 mmol/kg and above and respiratory arrest at 8.89 mmol/kg. Deaths occurred within 1 min after administration at 8.89 mmol/kg and above. LD₅₀ values were 9.0 mmol/kg in males and 9.7 mmol/kg in females.

After intracisternal administration, symptoms consisted of sedation, staggering gait, dyspnoea, twitches and ataxia at 0.15 mmol/kg and above, prostration, paralysis of forelimbs, and/or hind limbs and chromodacryorrhea at 0.21 mmol/kg, and convulsions at 0.29 mmol/kg and above. Deaths occurred within 7 days after administration at 0.21 mmol/kg and within 5 min at 0.29 mmol/kg and above. LD₅₀ values were 0.42 mmol/kg in males and 0.25 mmol/kg in females.

KEY WORDS: Gadobenate dimeglumine formulation, E7155, Contrast agent for MRI imaging, Single-dose toxicity study, Rat

ガドベン酸ジメグルミン製剤 (E7155) の一般毒性試験 (第1報) — ラットにおける静脈内および槽内投与による 単回投与毒性試験 —

知本忠士¹, 佐神文郎¹, Piero TIRONE², Alberto MORISETTI²,
Simona BUSSI²

¹エーザイ株式会社 開発安全性研究部
〒501-6195 岐阜県羽島郡川島町竹早町1

²Research Laboratories of Bracco S.p.A.
Via E. Folli, 50-20134 Milan, Italy

要 約 —ガドベン酸ジメグルミン製剤 (E7155) の3.3, 4.5, 6.0および8.0 mmol/kgを6 ml/分の投与速度あるいは7.50, 8.89, 10.54および12.50 mmol/kgを1 ml/分の投与速度でラットにそれぞれ単回静脈内投与し, 生死の有無および一般状態を観察し2週間後に剖検し, その安全性を評価した。また, E7155の0.15, 0.21, 0.29および0.40 mmol/kgを槽内に単回投与し, 同様に安全性を評価した。

投与速度6 ml/分による静脈内投与では, 6.0 mmol/kg群で筋攣縮, 呼吸抑制および虚脱, 3.3および4.4 mmol/kg群で呼吸困難ならびに鎮静が認められ, 6.0 mmol/kg以上の群では投与後1分以内に死亡が認められた。LD₅₀値は雄で7.97 mmol/kg, 雌で6.22 mmol/kgであった。剖検では死亡動物および生存動物ともに異常は認められなかった。

投与速度1ml/分による静脈内投与では, 7.50 mmol/kg以上の群で浅速呼吸, 筋攣縮および鎮静, 8.89 mmol/kg群で呼吸停止が認められ, 8.89 mmol/kg以上の群では投与後1分以内に死亡が認められた。LD₅₀値は雄で9.0 mmol/kg, 雌で9.7 mmol/kgであった。剖検では死亡動物で肺出血が認められたが, 生存動物では異常は認められなかった。

槽内投与では, 0.15 mmol/kg以上の群で鎮静, よろめき歩行, 呼吸困難, 筋攣縮および運動失調, 0.21 mmol/kg群で虚脱, 前肢および後肢あるいはどちらかの麻痺並びに紅涙, 0.29 mmol/kg以上の群で痙攣が認められ, 0.21 mmol/kg群で投与後7日以内に, 0.29 mmol/kg以上の群では投与後5分以内に死亡が認められた。LD₅₀値は雄で0.42 mmol/kg, 雌で0.25 mmol/kgであった。剖検では0.21および0.29 mmol/kg群で栄養状態の

悪化 (消瘦), 0.21および0.40 mmol/kg群の死亡動物で肺にうっ血が認められた。その他の死亡動物および生存動物では異常は認められなかった。

緒 言

ガドベン酸ジメグルミン製剤 (以下E7155と略) は, Bracco社 (イタリア) により開発されたMRI (Magnetic Resonance Imaging, 磁気共鳴撮像法) で用いられる造影剤である。臨床適用経路は静脈内投与, 臨床用量は0.1 mmol/kgである。

今回, E7155の安全性評価の一環として, ラットに6 ml/分および1 ml/分の投与速度で静脈内投与した際の急性毒性ならびに槽内投与した際の急性毒性をBracco社で検討したので報告する。

実験材料および方法

被験物質

E7155は, ガドベン酸ジメグルミン (化学名: 1-deoxy-1-(methylamino)-D-glucitol (RS)-dihydrogen [4-carboxy-5,8,11-tris(carboxymethyl) -1-phenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan -13-oato(5-)] gadolinate (2-) (2:1), 分子量: 1058.16, 化学構造: Fig. 1) を1 ml中に0.5 mmol含有する無色～淡黄色の澄明な製剤 (媒体: 注射用水, 中性で生理食塩液に対する浸透圧: 約7) である。本試験にはBracco社で製造されたロット番号: RG7/88およびRG4/91 (ガドベン酸ジメグルミンの純度: 100.8%および98.4%) を使用した。なお, 被験物質の投与量は, ガドベン酸ジメグルミンの量を表記した。

使用動物および飼育条件

Charles River Italia (Como, Italy) からCrI:CD (SD) BRラットを入手し、少なくとも4日間検疫した。投与時の日齢は7～8週齢、体重は雄 187～240 g、雌 174～218 gであった。なお、尾に不減インク等を用いてマーキングし個体識別した。

動物はMakrolon® Tecniplastケージに収容（検疫および馴化期間中は1ケージ当たり10匹以内、投与および観察期間中は個別飼育）し、照明時間12時間、換気回数毎時 15～20回に設定した動物室内で飼育した。実験期間中の温湿度は、温度20.0～23.5℃、湿度43.2～64.8%であった。床敷にはCharles River Italia製のSano-Chip®を用いた。

飼料はItaliana Mangimi Mucedola (Milan, Italy) 製の4RF21-GLP固型飼料を、飲水は直径1.0および0.2 μmのフィルターで濾過処理した公共水道水を、いずれも自由に摂取させた。

投与量および投与方法

静脈投与には、通常ラットで使用される投与速度である6 ml/分（約15 mmol/kg）と、臨床で用いられる投与速度（約0.1 mmol/分/kg）により近い投与速度として1ml/分（約2.5 mmol/kg）を設定した。さらに、脳内移行の影響を考慮して槽内投与を設定した。

予備試験の結果に基づいて、投与速度6 ml/分の静脈内投与では3.3, 4.5, 6.0および8.0 mmol/kg（相当する投与容量、以下同様：6.6, 9.0, 12.0および16.0 ml/kg）、投与速度 1 ml/分の静脈内投与では7.50, 8.89, 10.54および12.50 mmol/kg（15, 17.78, 21.08および25 ml/kg）、槽内投与では0.15, 0.21, 0.29および0.40 mmol/kg（0.30, 0.42, 0.58および0.80 ml/kg）の用量を設定した。各群の動物数は雌雄各5例とした。静脈内投与では尾静脈より投与した。槽内投与ではJeffers and Griffith (1949) の方法に従って、覚醒下で先端から4～5 mmの部分にストッパーをつけた25G注射針を後頭部より槽内に挿入し

投与した。

観察・測定・検査法

1. 一般状態

投与日において投与前、投与直後およびその後数回、個体ごとに動物を観察し、毒性症状の程度、発現時刻および持続時間並びに死亡の有無を観察した。その後2週間の観察期間中に少なくとも1日1回、同様に動物を観察した。

2. 剖検

観察期間中に死亡した全動物および観察期間終了時（15日）に断頭にて屠殺した全動物について剖検し、胸腔および腹腔内臓器を肉眼的に観察した。

統計学的解析

Litchfield and Wilcoxonの方法（Litchfield and Wilcoxon, 1949, Tallarida and Murray, 1986）に従い、50%致死量（LD₅₀値）および95%信頼限界を算出した。

実験結果

静脈内投与

1. 6 ml/分の投与速度

LD₅₀値（95%信頼限界）は雄で7.97 mmol/kg（5.87～10.81 mmol/kg）、雌で6.22 mmol/kg（4.86～7.97 mmol/kg）であり、性差は認められなかった（Table 1）。

死亡は6.0 mmol/kg群の雌および8.0 mmol/kg群の雌雄で投与後1分以内に認められた。これらの死亡動物では筋攣縮、呼吸抑制および虚脱が観察された。3.3および4.5 mmol/kg群では、投与直後に鎮静および呼吸困難がみられ、投与後5～15分まで持続し、4.5 mmol/kg群の一部の動物では呼吸抑制も観察された。これらの症状は投与後15～30分には回復した。6.0 mmol/kg群の生存動物では、投与後10分ないし1時間まで鎮静および呼吸困難が認められたが、投与後4時間以内に回復した。

剖検では、死亡動物および生存動物とも異常は認められなかった。

2. 1 ml/分の投与速度

LD₅₀値（95%信頼限界）は雄で9.0 mmol/kg（6.9～11.6 mmol/kg）、雌で9.7 mmol/kg（8.9～10.5 mmol/kg）であり、性差は認められなかった（Table 1）。

Fig. 1. Chemical structure of Gadobenate dimeglumine.

Table 1. Mortality and LD₅₀ values in rats treated with E7155.

Route (injection rate)	Sex	Dose (mmol/kg)	Dead time after administration			Cumulative mortality	LD ₅₀ (mmol/kg) (95% confidence limit)
			within 6 hr	7 to 24 hr	day 2 to 7	day 8 to 15	
i.v. (6ml/min)	Male	3.3	0	0	0	0/5	7.97 (5.87-10.81)
		4.5	0	0	0	0/5	
		6.0	0	0	0	0/5	
		8.0	5	0	0	5/5	
i.v. (1ml/min)	Female	3.3	0	0	0	0/5	6.22 (4.86-7.97)
		4.5	0	0	0	0/5	
		6.0	3	0	0	3/5	
		8.0	5	0	0	5/5	
i.v. (1ml/min)	Male	7.50	0	0	0	0/5	9.0 (6.9-11.6)
		8.89	5	0	0	5/5	
		10.54	3	0	0	3/5	
		12.50	5	0	0	5/5	
intracisternal	Female	7.50	0	0	0	0/5	9.7 (8.9-10.5)
		8.89	1	0	0	1/5	
		10.54	4	0	0	4/5	
		12.50	5	0	0	5/5	
intracisternal	Male	0.15	0	0	0	0/5	0.42 (0.22-0.80)
		0.21	1	1	0	2/5	
		0.29	2	0	0	2/5	
		0.40	2	0	0	2/5	
intracisternal	Female	0.15	0	0	0	0/5	0.25 (0.16-0.37)
		0.21	0	0	3	3/5	
		0.29	2	0	0	2/5	
		0.40	5	0	0	5/5	

Single-Dose Toxicity Study of E7155 in Rats.

死亡は8.89 mmol/kg以上の群の雌雄で投与後1分以内に認められた。7.50 mmol/kg群の動物では、投与直後から浅速呼吸および鎮静が発現し1時間後まで持続したが、3時間後には回復した。死亡した高用量群の動物では筋攣縮がみられ、さらに、8.89 mmol/kg群の雌1匹では呼吸停止も観察された。生存動物では、浅速呼吸および鎮静が15分後ないし3、4時間後まで認められたが、6時間後ないし翌日には回復した。

剖検では、死亡動物に肺出血が認められたが、生存動物では異常は認められなかった。

槽内投与

LD₅₀値（95%信頼限界）は雄で0.42 mmol/kg（0.22～0.80 mmol/kg）、雌で0.25 mmol/kg（0.16～0.37 mmol/kg）であり、性差は認められなかった（Table 1）。

死亡は0.21 mmol/kg以上の群の雌雄で認められた。投与直後に0.15 mmol/kg群の動物において鎮静、よろめき歩行および呼吸困難が認められ、一部の動物では筋攣縮と運動失調も観察された。これらの症状は投与後4時間から2日まで持続したが、1～3日以内に回復した。

0.21 mmol/kg群の動物では投与直後によろめき歩行、鎮静および呼吸困難が認められ、その後、虚脱と筋攣縮が投与後30分まで観察された。上記の症状を呈した後、24時間以内に雄2匹が死亡した。生存動物では、虚脱、鎮静あるいは呼吸困難が投与後4時間まで観察された。生存動物8匹中4匹に投与翌日に前肢および後肢あるいはどちらかの麻痺並びに紅涙が観察された。これらの症状は観察期間終了日まで後肢の麻痺が認められた雄1匹を除き、投与後4～7日に死亡するまで持続した。0.29 mmol/kg群の動物では投与直後によろめき歩行、鎮静および呼吸困難がみられ、その後、筋攣縮、数回の痙攣を示した後、投与後5分以内に死亡した。生存動物では鎮静、虚脱および呼吸困難が4時間後まで観察された。雌の生存動物では、翌日から観察期間終了日まで前肢および後肢の麻痺が1匹に、よろめき歩行が2匹に認められた。0.40 mmol/kg群の動物ではよろめき歩行および呼吸困難が観察され、その後、筋攣縮と数例の動物に痙攣がみられた後、2～5分以内に死亡した。生存動物では虚脱および鎮静がみられたが、24時間以内に回復した。後肢の麻痺が投与日から投与4日に、紅涙が投与4日にそれぞれ1匹ずつ観察されたが、その後回復した。

剖検では、0.21 mmol/kg群の雄1匹および雌3匹、0.29 mmol/kg群の雄1匹および雌2匹に栄養状態の悪化（削瘦）が観察された。0.40 mmol/kg群の全死亡動物および0.21 mmol/kg群の1匹の死亡動物で肺にうっ血が認められた。その他の死亡動物および生存動物では異常は認められなかった。

考 察

E7155をラットに6 ml/分（3 mmol/分に相当）および1 ml/分（0.5 mmol/分に相当）の投与速度で静脈内投与した際の急性毒性および槽内投与した際の急性毒性を検討した。

投与速度 6 ml/分の静脈内投与でのLD₅₀値は雄で7.97 mmol/kg、雌で6.22 mmol/kg、投与速度 1 ml/分の静脈内投与でのLD₅₀値は雄で9.0 mmol/kg、雌で9.7 mmol/kgであり、投与速度 1 ml/分のLD₅₀値は明らかに高い値を示した。

6 ml/分の投与速度は、ラットにおける実験で通常用いられる投与速度である。この6 ml/分（約15 mmol/分/kgに相当）の投与速度は、MRI造影剤 Magnevist® の臨床における通常の投与速度（10 ml/分、約0.1 mmol/分/kgに相当）の約150倍にあたる。ラットでの1 ml/分の投与速度（ヒトの平均体重を50 kgとしたとき、臨床における2.5 mmol/分/kgに相当）は、臨床で用いられる投与速度より25倍高いが6 ml/分の投与速度に比べより臨床に近いものである。すなわち、臨床での投与速度に近づくにつれE7155の静脈内投与による毒性は弱まることが示唆された。

E7155は生理食塩液の浸透圧より約7倍高いこと、また死亡例の全てではないが剖検所見で肺出血が認められたこと、さらに投与速度が速いほどLD₅₀値は小さくなったことから、E7155の静脈内投与による死因は高張溶液を大量投与したことによる循環不全と考えられた。

類似薬であるGd-DTPAをラットに2 ml/分の投与速度で静脈内投与した際のLD₅₀値は、雄で6.9 mmol/kg、雌で7.3 mmol/kgであり、痙攣、自発運動の低下、呼吸困難、腹臥位、尿失禁などの症状が観察された（石田ら、1987）。Gd-DTPAのLD₅₀値は、E7155の投与速度 1 ml/分におけるLD₅₀値と比較し若干低値であるが、これは投与速度の違いに由来するものであり、また発現した症状もほぼ同一であり、両者の間で毒性に大きな違いは

ないものと考えられた。

槽内投与した際のLD₅₀値は雄で0.42 mmol/kg, 雌で0.25 mmol/kgであった。槽内投与における LD₅₀値はヒトの臨床用量 (0.1 mmol/kg) より高く, 臨床において血液-脳関門の損傷がある場合に脳への移行が起こったとしても問題ないものと考えられた。

参考文献

- 石田小津枝, 三輪美貴子, 中尾寿夫 (1987): ガドベンテ
ト酸メグルミンの毒性研究 (I) —マウス・ラット
における急性毒性試験—。日獨医報 **32 (3, 4)**, 476-
484.
- Jeffers, W. A. and Griffith Jr., J. Q. (1949): The rat in
Laboratory Investigation, (J. Farris and J. Q. Griffith
eds.), J.B. Lippincott Company, USA.
- Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949): A simplified method
of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp.
Therap., **96**, 99-113.
- Tallarida, R. J. and Murray, R. B. (1986): Manual of
Pharmacologic Calculations with Computer Programs.
Second Edition, Springer Verlag, New York.