MUSCULAR IRRITATION STUDY OF GADOBENATE DIMEGLUMINE FORMULATION(E7155) IN RABBITS

Takashi MIKAMI¹, Fumio SAGAMI¹, Piero TIRONE², Alberto MORISETTI²,
Simona BUSSI², Yasushi YAMADA³, Hitoshi KIMURA³ and Katsuyuki GOTO³

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

³*Hashima Laboratory, Nihon Bioresearch Inc.*

6-104 Majima, Fukujyu-cho, Hashima-city, Gifu 501-6251, Japan

(Received February 25, 1999; Accepted July 7, 1999)

ABSTRACT — To examine the local muscular irritation potency of gadobenate dimeglumine formulation (E7155), E7155 was injected into the right *vastus lateralis* muscle of male Kbl:JW rabbits, and saline as the negative control was injected into the left muscle. Half of the animals were subjected to necropsy at 2 or 14 days after administration. The muscles were examined macroscopically and histopathologically. Also, 0.425 w/v% and 1.7 w/v% acetic acid solutions were used as a positive control.

In macroscopic observation, hemorrhage with white or brown coloration was seen in the muscles treated with E7155 at 2 days after administration, and white coloration was seen in one case at 14 days after administration.

In histopathological examination, slight or moderate hemorrhage, edema, cellular infiltration, degeneration of muscle fibers and necrosis of muscle fibers were seen in the muscles treated with E7155 at 2 days after administration, and very slight to slight cellular infiltration, degeneration of muscle fibers, fibrosis, calcification of muscle fibers and foreign body giant cells were seen in the muscles treated with E7155 at 14 days after administration.

The changes in the muscle caused by E7155 were definitely less than those caused by the 1.7 w/v% acetic acid solution at both 2 and 14 days, and slightly less and definitely less than those caused by the 0.425 w/v% acetic acid solution at 2 days and 14 days after administration, respectively. The changes caused by E7155 were more severe than those caused by saline.

It was concluded that the local muscular irritation potency of E7155 could be classified at Grade 2.

KEY WORDS: Gadobenate dimeglumine formulation, E7155, Contrast agent for MRI imaging, Muscular irritation study, Rabbit

ガドベン酸ジメグルミン製剤 (E7155) のウサギを用いる 筋肉内注射による局所刺激性試験

見上 孝¹, 佐神文郎¹, Piero TIRONE², Alberto MORISETTI², Simona BUSSI²,
山田恭史³, 木村 均³, 後藤勝幸³

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

³株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104

要 約 —ガドベン酸ジメグルミン製剤 (E7155) の局所刺激性を検討する目的で, E7155をKbl:JWウサギの右大腿外側広筋に, 生理食塩液を左大腿外側広筋に単回投与した。投与2日後および14日後に, 各3匹のウサギから外側広筋を摘出した。筋肉は肉眼的観察および病理組織学的検査を実施した。なお, 対照物質として0.425 w/v%酢酸溶液と1.7 w/v%酢酸溶液を用いた。

E7155を投与した筋肉の肉眼的観察では, 投与2日後には白色または褐色化を伴う出血部がみられ, 投与14日後には1例で5×2 mmの白色化が認められた。病理組織学的検査では, 投与2日後に軽度ないし中等度の出血, 浮腫, 細胞浸潤, 筋線維の変性および壊死が観察され, 投与14日後には極めて軽度ないし軽度の細胞浸潤, 筋線維の変性, 線維化, 筋繊維の石灰化および異物巨細胞が観察された。

E7155により生じた投与部位における諸変化は, 1.7 w/v%酢酸溶液で生じた変化に比べ投与2および14日後とも明らかに弱いものであり, 0.425 w/v%酢酸溶液で生じた変化に比べ, 投与2日後では幾分軽度であり, 投与14日後では明らかに弱いものであった。しかし, 生理食塩液による変化に比べては強いものであった。

以上の結果から, E7155は薬安第2号 (案) (厚生省, 1979および1984) により分類すると, グレード 2に属する局所刺激性を有しているものと考えられた。

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。

MRIに用いる造影剤による投与部位の臨床上の副作用は, Magnevistの報告にあるように刺激性, 熱感および冷感などが一般的である (Kanal and Shellock, 1996)。

E7155は, 肝臓への選択が特異的に高いことから (Vittadini *et al.*, 1990), 主に肝臓, 脳および四肢造影に本剤を0.1 mmol /kg静脈内投与するが, E7155の安全性に万全を帰す目的で万が一血管外に漏れたときの局所刺激性の強さを明らかにするためウサギを用いて局所刺激性試験を実施したので報告する。

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⁻)]gadolate(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

Fig. 1. Chemical structure of gadobenate dimeglumine.

Muscular Irritation Study of E7155 in Rabbits.

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K56019AZB (ガドベン酸ジメグルミンの純度：98.7%)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。

対照物質

陽性対照物質には、酢酸 (片山化学工業株式会社) を用いた。

陰性対照物質には、生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場) を用いた。

使用動物および飼育条件

本試験には、10週齢の日本白色種雄ウサギ (Kbl:JW) を1群6匹の計18匹を使用した。

5日間の検疫および7日間の馴化期間中に、体重を3回測定し、外見および一般状態の観察を毎日行った。投与日の体重範囲は2.10～2.61 kgであった。

動物は室温20～24℃、湿度40～70%、明暗各12時間 (照明：午前6時～午後6時)、換気回数12回/時に設定された動物飼育室でアルミニウム製懸垂式ケージ (W:320×D:550×H:350 mm) を用いて個別飼育した。

飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製の固型飼料RC4を、飲料水は水道水を自動給水装置により、いずれも自由に摂取させた。

群構成、投与量と投与方法

実験は薬安第2号 (案) (厚生省, 1979および1984) に従い実施した。

群構成はE7155, 0.425 w/v%酢酸溶液および1.7 w/v%酢酸溶液の3群を設定した。左右大腿外側部の皮膚を電気バリカンで剪毛し、70%アルコールで消毒した。動物を腹位に固定後、投与は23G注射針を用いて外側広筋を触知しながら、プラスチックストッパーをつけた23Gの注射針を筋肉中央部に1 cmの深さに刺入した。右の外側広筋にはE7155, 1.7 w/v%酢酸溶液あるいは0.425 w/v%酢酸溶液を、左の外側広筋には生理食塩液をいずれも1 ml/siteの容量で単回投与した。

観察と標本作製

投与後、毎日一般状態を観察した。

投与2日後および14日後に、各群のウサギ各々3匹をペントバルビタール30 mg/mL/kgの静脈内投与による

麻酔下で放血致死させて左右の外側広筋を摘出した。この外側広筋の中心を矢状面にそって切断して肉眼的観察および障害部の大きさ (長径×短径) を計測した。

摘出した外側広筋は20%中性緩衝ホルマリンで4週から6週間固定し、筋肉中央部 (刺入部位) を常法に従いパラフィン包埋後、屠殺から約1.5ヶ月かけてHE染色の組織標本 (1枚のプレパラート/1カ所) を作製した。この標本について病理組織学的に観察した。

統計学的解析

被験物質の局所刺激性の総合判定は、薬安第2号 (案) (厚生省, 1979および1984) の分類に従って行った。

なお、本試験においては1群の例数が3例であることと試験の性質を考慮してとくに統計学的解析は行わなかった。

実験結果

一般状態

観察期間中、いずれの動物も一般状態に異常は認められなかった。

肉眼的観察

結果をTable 1～2に示した。

1. 投与2日後

生理食塩液では、9例中1例に極めて軽度の充血、9例中3例に極めて軽度～軽度の出血がみられた。障害の大きさは0×0～9×2 mm (平均面積：4 mm²) であった。

E7155では、3例全例に軽度～中等度の出血および軽度の腫脹が、3例中2例に軽度の白色化が、内1例に軽度の褐色化がみられた。障害の大きさは33×4～30×10 mm (平均面積：236 mm²) であった。

0.425 w/v%酢酸溶液では、3例全例に中等度の出血および軽度の腫脹が、3例中2例に軽度の白色化がみられた。障害の大きさは26×7～33×10 mm (平均面積：257 mm²) であった。

1.7 w/v%酢酸溶液では、3例全例に軽度の出血、軽度～中等度の腫脹および白色化が、3例中2例には軽度～中等度の褐色化がみられた。障害の大きさは26×6～43×13 mm (平均面積：342 mm²) であった。

Table 1. Macroscopic findings in rabbits 2 days after intramuscular injection of E7155.

Group	Animal No.	Hyperemia	Hemorrhage	Swelling	White coloration	Brown coloration	Range of injury (mm)
Saline (left)	001	—	—	—	—	—	0×0
	002	±	—	—	—	—	9×2
	003	—	—	—	—	—	0×0
	101	—	—	—	—	—	0×0
	102	—	±	—	—	—	5×1
	103	—	—	—	—	—	0×0
	201	—	—	—	—	—	0×0
	202	—	+	—	—	—	11×1
	203	—	±	—	—	—	4×1
E7155 (right)	001	—	++	+	—	—	30×10
	002	—	+	+	+	—	25×11
	003	—	++	+	+	+	33×4
0.425 w/v%	101	—	++	+	—	—	26×7
Acetic acid (right)	102	—	++	+	+	—	26×10
	103	—	++	+	+	—	33×10
1.7 w/v%	201	—	+	+	++	—	39×8
Acetic acid (right)	202	—	+	+	++	+	26×6
	203	—	+	++	+	++	43×13

—; Negative, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate.

Table 2. Macroscopic findings in rabbits 14 days after intramuscular injection of E7155.

Group	Animal No.	Hyperemia	Hemorrhage	Swelling	White coloration	Brown coloration	Range of injury (mm)
Saline (left)	004	—	—	—	—	—	0×0
	005	—	—	—	—	—	0×0
	006	—	—	—	—	—	0×0
	104	—	—	—	—	—	0×0
	105	—	—	—	—	—	0×0
	106	—	—	—	—	—	0×0
	204	—	—	—	—	—	0×0
	205	—	—	—	—	—	0×0
	206	—	—	—	—	—	0×0
E7155 (right)	004	—	—	—	—	—	0×0
	005	—	—	—	+	—	5×2
	006	—	—	—	—	—	0×0
0.425 w/v%	104	—	—	—	+	+	14×3
Acetic acid (right)	105	—	—	—	+	—	6×2
	106	—	—	—	+	+	15×3
1.7 w/v%	204	—	—	+	+	++	16×4
Acetic acid (right)	205	—	—	+	+	++	15×5
	206	—	—	+	++	++	20×5

—; Negative, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate.

Muscular Irritation Study of E7155 in Rabbits.

2. 投与14日後

生理食塩液では、いずれの筋肉にも異常はみられなかった。

E7155では、3例中1例に軽度の白色がみられた。障害の大きさは 5×2 mm (平均面積: 3 mm^2) であった。

0.425 w/v%酢酸溶液では、3例全例に軽度の白色化が、3例中2例に軽度の褐色化がみられた。障害の大きさは $6 \times 2 \sim 15 \times 3$ mm (平均面積: 33 mm^2) であった。

1.7 w/v%酢酸溶液では、3例全例に軽度の腫脹、軽度～中等度の白色化および中等度の褐色化がみられた。障害の大きさは $16 \times 4 \sim 20 \times 5$ mm (平均面積: 80 mm^2) であった。

病理組織学的検査

結果をTable 3～4とPhoto 1～3に示した。

1. 投与2日後

生理食塩液では、9例中4例に、極めて軽度の出血、細胞浸潤および筋線維の変性が、内3例に極めて軽度の浮腫および筋線維の壊死がみられた。

E7155では、3例全例に、軽度の出血、軽度～中等度

の浮腫、軽度の細胞浸潤、中等度の筋線維の変性および筋線維の壊死がみられた。

0.425 w/v%酢酸溶液では、3例全例に、軽度～中等度の出血および浮腫、軽度の細胞浸潤、中等度の筋線維の変性および筋線維の壊死がみられた。

1.7 w/v%酢酸溶液では、3例全例に、軽度の出血、浮腫および細胞浸潤、中等度の筋線維の変性および筋線維の壊死がみられた。

2. 投与14日後

生理食塩液では、9例中1例に、極めて軽度の細胞浸潤および筋線維の変性がみられた。

E7155では、3例中2例に、軽度の細胞浸潤、筋線維の変性および線維化が、内1例に極めて軽度の筋線維の石灰化および異物巨細胞がみられた (Photo 1)。

0.425 w/v%酢酸溶液では、3例全例に、軽度の細胞浸潤、軽度～中等度の筋線維の変性、軽度の筋線維の壊死、中等度の線維化、軽度～中等度の筋線維の石灰化および異物巨細胞が、3例中2例に軽度の出血がみられた (Photo 2)。

Table 3. Histopathological findings in rabbits 2 days after intramuscular injection of E7155.

Group	Animal No.	Hemorrhage	Edema	Cellular infiltration	Degeneration of muscle fiber	Necrosis of muscle fiber
Saline (left)	001	—	—	—	—	—
	002	±	±	±	±	±
	003	—	—	—	—	—
	101	—	—	—	—	—
	102	—	—	—	—	—
	103	±	—	±	±	—
	201	±	±	±	±	±
	202	±	±	±	±	±
	203	—	—	—	—	—
E7155 (right)	001	+	+	+	++	++
	002	+	+	+	++	++
	003	+	++	+	++	++
0.425 w/v% Acetic acid (right)	101	++	+	+	++	++
	102	+	+	+	++	++
	103	++	++	+	++	++
1.7 w/v% Acetic acid (right)	201	+	+	+	++	++
	202	+	+	+	++	++
	203	+	+	+	++	++

—; No, remarkable changes, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate.

Table 4. Histopathological findings in rabbits 14 days after intramuscular injection of E7155.

Group	Animal No.	Hemorrhage	Edema	Cellular infiltration	Degeneration of muscle fiber	Necrosis of muscle fiber	Fibrosis	Calcification of muscle fiber	Foreign body giant cell
Saline (left)	004	—	—	—	—	—	—	—	—
	005	—	—	±	±	—	—	—	—
	006	—	—	—	—	—	—	—	—
	104	—	—	—	—	—	—	—	—
	105	—	—	—	—	—	—	—	—
	106	—	—	—	—	—	—	—	—
	204	—	—	—	—	—	—	—	—
	205	—	—	—	—	—	—	—	—
	206	—	—	—	—	—	—	—	—
E7155 (right)	004	—	—	—	—	—	—	—	—
	005	—	—	+	+	—	+	±	±
	006	—	—	+	+	—	+	—	—
0.425 w/v% Acetic acid (right)	104	+	—	+	+	+	++	++	++
	105	—	—	+	+	+	++	+	+
	106	+	—	+	++	+	++	++	++
1.7 w/v% Acetic acid (right)	204	+	+	+	++	++	++	++	++
	205	+	+	+	++	++	++	++	++
	206	++	+	+	++	++	++	++	++

—; No, remarkable changes, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate.

Photo 1. Right muscle from a rabbit (No.005) of E7155 at 14 day injection, showing cellular infiltration, degeneration of muscle fiber, fibrosis, calcification of muscle fiber and foreign body giant cell. H.E. stain. ×25

Muscular Irritation Study of E7155 in Rabbits.

Photo 2. Right muscle from a rabbit (No.106) of 0.425% acetic acid at 14 day injection, showing hemorrhage, cellular infiltration, degeneration and necrosis of muscle fiber, fibrosis, calcification of muscle fiber and foreign body giant cell. H.E. stain. $\times 25$

Photo 3. Right muscle from a rabbit (No.206) of 1.7% acetic acid at 14 day injection, showing hemorrhage, edema, cellular infiltration, degeneration and necrosis of muscle fiber, fibrosis, calcification of muscle fiber and foreign body giant cell. H.E. stain. $\times 25$

1.7 w/v%酢酸溶液では、3例全例に、軽度～中等度の出血、軽度の浮腫および細胞浸潤、中等度の筋線維の変性、筋線維の壊死、線維化、筋線維の石灰化および異物巨細胞がみられた (Photo 3)。

考 察

E7155により生じた変化は生理食塩液での変化と比較すると強く、0.425 w/v%酢酸溶液の変化と比較すると、やや弱いものであった。生理食塩液に比べE7155の刺激性が強かった原因は、E7155の物理学的な性質として浸透圧が約7と高いことによると推測される。しかし、陽性対照群の0.425 w/v%酢酸溶液の変化に比べやや弱いことから、E7155は薬安第2号 (案) (厚生省, 1979および1984) の分類によると、グレード2に属する局所刺激性を有しているものと考えられた。

参考文献

- 厚生省薬務局 (1979) : 注射剤の局所障害性に関する試験法(案), 医薬ジャーナル **15**, 447-449.
- 厚生省 (1984) : 注射剤の局所障害性に関する試験法改正案
- Kanal, E. and Shellock, F. (1996) : Safety reference manual on magnetic resonance imaging contrast agents, pp. 42 - 43, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Vittadini, G., Felder, E., Musu, C. and Tirone, P. (1990): Preclinical profile of Gd-BOPTA. A liver- specific MRI contrast agent. *Investigative Radiology*, **25**, S59-S60.