GENERAL TOXICITY STUDY OF GADOBENATE DIMEGLUMINE FORMULATION (E7155) (3) — 4-WEEK REPEATED DOSE INTRAVENOUS TOXICITY STUDY FOLLOWED BY 4-WEEK RECOVERY PERIOD IN RATS —

Toyohiko AOKI¹, Fumio SAGAMI¹, Piero TIRONE², Alberto MORISETTI²,
Simona BUSSI² and Robert E. MASTERS³

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*Huntingdon Life Sciences Ltd.*

Huntingdon, Cambridgeshire, PE18 6ES, England

(Received February 25, 1999; Accepted July 15, 1999)

ABSTRACT — A 4-week repeated dose toxicity study of gadobenate dimeglumine formulation (E7155) was conducted in Sprague-Dawley rats to assess its non-clinical safety. E7155 was administered intravenously at doses of 0.3, 1.0 and 3.0 mmol/kg/day to male and female rats once a day during 4 weeks. The reversibility of toxicity was evaluated during a 4-week recovery period at 3.0 mmol/kg/day.

At 0.3 mmol/kg/day and higher, vacuolation of the cortical epithelium was seen in the kidneys and an increase in the incidence of local damage at the injection sites. In the 1.0 and 3.0 mmol/kg/day male and female groups, scabbing/ulceration of the tail at the injection sites, macroscopic pale/thickened fundic mucosa in the stomachs, vacuolation of the urinary bladder, and mucosal mineralization with epithelial hyperplasia of the glandular stomach were found. In the 1.0 and 3.0 mmol/kg/day male group and 3.0 mmol/kg/day female group, increases of water consumption and urinary potassium excretion, increased kidney weight and enlargement of the kidneys were observed. In the 3.0 mmol/kg/day male and female group, hepatocyte necrosis with inflammatory cells in the liver and epithelial degranulation in the interlobular ducts of the salivary glands were found. In addition, in the 3.0 mmol/kg/day male group, increases in plasma sodium and decreases of urinary sodium and chloride excretion, and degenerative changes in the testes and epididymides were observed.

After the 4-week recovery period, except for an increase in urinary potassium excretion, increased kidney weights and changes in the testes and epididymides, all of the above findings had complete or partial recovery.

Vacuolation of renal tubular cells was common, expected, and known as an adaptive change of treatment with hypertonic solutions, and an increase in the incidence of local damage at the injection sites was due to irritation by repeated intravenous dosing with hypertonic solutions. Therefore, these changes were not toxic changes. In conclusion, the dose level of 0.3 mmol/kg/day should be regarded as the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) after repeated administration of E7155 in rats.

KEY WORDS: Gadobenate dimeglumine formulation, E7155, Contrast agent for MRI imaging, Repeated 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3報) — ラットにおける静脈内投与による4週間反復投与毒性試験 および4週間回復性試験 —

青木豊彦¹, 佐神文郎¹, Piero TIRONE², Alberto MORISETTI², Simona BUSSI²,
Robert E. MASTERS³

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

³Huntingdon Life Sciences Ltd.
Huntingdon, Cambridgeshire, PE18 6ES, England

要 約 — ガドベン酸ジメグルミン製剤 (E7155) を0.3, 1.0および3.0 mmol/kg/日の用量でSDラットに1日1回, 4週間静脈内投与し, その安全性を評価した。また, 3.0 mmol/kg/日については投与終了後4週間休薬し, 回復性も検討した。

その結果, 0.3 mmol/kg/日以上で腎皮質の尿細管上皮の空胞化および投与部位における局所損傷の発生頻度の増加が認められた。

1.0および3.0 mmol/kg/日の雌雄で, 投与部位である尾の痂皮/潰瘍, 腺胃部粘膜の蒼白/肥厚, 膀胱上皮の空胞化, 上皮過形成を伴った腺胃部粘膜の石灰化が認められた。1.0 mmol/kg/日の雄と3.0 mmol/kg/日の雌雄で, 摂水量の増加, 尿中カリウム排泄量の増加, 腎臓重量の増加および腎臓の肥大が認められた。3.0 mmol/kg/日の雌雄で, 炎症性細胞浸潤を伴う肝細胞の壊死, 唾液腺における介在部上皮の脱顆粒, また3.0 mmol/kg/日の雄ではさらに, 血中ナトリウムの増加, 尿中ナトリウム, クロール排泄量の減少, 精巣および精巣上体での退行性変化が認められた。

4週間の休薬による回復性試験では, 3.0 mmol/kg/日の雄における尿中カリウム排泄量の増加, 腎臓重量の増加, 精巣および精巣上体の変化が認められ, これらの所見の回復性は認められなかったが, その他の変化は回復あるいは回復傾向が認められた。

E7155投与群でみられた腎尿細管上皮細胞の空胞化は高張性の投与溶液の静脈内投与に起因する生体の適応性の変化であり, また投与部位における局所損傷は, 高張性の投与溶液の反復静脈内投与による物理的刺激

の変化であり, いずれも毒性所見ではないと考えられた。

以上から, 本試験における無毒性量は0.3 mmol/kg/日と判断された。

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。

今回, E7155の安全性評価の一環として, ラットにおける静脈内投与による4週間反復投与毒性試験をHuntingdon Life Sciences社 (イギリス) で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⁻)] 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: B5/20 (ガドベン酸ジメグルミンの純度: 99.1%) を使用した。なお,

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

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

4週齢の雌雄のSprague Dawley系 (CrI:CD BR) ラットをCharles River UK Ltd. (Kent, England) より購入し、6日間の馴化期間終了後、体重による無作為層別化法により群分けした。各60匹 (12匹/群、ただし、対照群および3.0 mmol/kg/日群は18匹/群、体重：雄：157～189 g、雌：126～153 g) を使用した。動物は、温度 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 10\%$ および明期/暗期がそれぞれ12時間に設定された環境下で飼育し、飼料にはラット・マウス用SDS固型飼料No.1を、飲水には水道水を自由に摂取させた。動物は懸架式金網ケージ (25H×36.5W×56D cm) に、性別ごとに1ケージ当たり3匹を収容した。飼料および飲水中にはE7155の安全性評価に影響を及ぼすような汚染物質は認められなかった。

投与量および投与方法

被験物質であるE7155は、0.5 M製剤をそのまま投与した。

投与量および群構成をTable 1に示した。

投与量は、7日間静脈内投与による用量設定試験において、0.4 mmol/kg/日で虚脱および死亡がみられたことから、3.0 mmol/kg/日を最高用量とし、以下1.0および0.3 mmol/kg/日を設定した。

Fig. 1. Chemical structure of gadobenate dimeglumine.

E7155は、約6 ml/分速度で尾静脈より動物に1日1回、週7日、4週間にわたって投与した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。各ラットの投与容量は最新の体重値から算出した。また、対照群および最高用量群の回復群の動物については、4週間投与後、4週間休薬した。

観察・測定・検査法

1. 一般状態、体重、摂餌量および摂水量

一般状態および死亡の有無を少なくとも試験期間中1日1回以上観察した。体重は投与開始日およびそれ以後は週1回測定した。摂餌量はケージ単位で週1回測定し、ラット1匹あたりの摂餌量および飼料利用効率を算出した。摂水量は、ケージ単位で投与第3週と回復期間の第3週の間、毎日、測定した。

2. 眼科学的検査

投与開始前に、全動物について、第4週には対照群と高用量群の全動物について、Keelerの間接型検眼鏡を用いて検査した。なお、検査時には、眼科用のトロピカミド溶液により散瞳させた。

3. 血液学的検査および血液生化学的検査

投与第4週と回復期間の第4週に、エーテル麻酔下で全群の全生存例の眼窩静脈叢から血液を採取した。抗凝固剤として、血液学的検査用の血液にはEDTAを、血液凝固検査用血液にはクエン酸を、また血液生化学検査用血液にはヘパリンを添加した。

血液学的検査として、Bayer-Technicon H1E自動血液分析装置を使用して以下の項目について測定した。

ヘマトクリット (PCV)、ヘモグロビン (Hb)、赤血球数 (RBC)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、平均赤血球容積 (MCV)、総白血球数 (WBC Total)、白血球分画 (好中球 (N)、リンパ球 (L)、好酸球 (E)、

Table 1. Experimental design

Group	Dose (mmol/kg/day)	Concentration (mmol/ml)	Dosing volume (ml/kg)	Number of animals			
				Main group		Recovery group	
				Male	Female	Male	Female
1	0 (Control)	0	6.0	12	12	6	6
2	0.3	0.5	0.6	12	12	—	—
3	1.0	0.5	2.0	12	12	—	—
4	3.0	0.5	6.0	12	12	6	6

好塩基球 (B), 単球 (M), 大型非染色細胞 (LUC)), 細胞形態, 血小板数 (Plt), 網状赤血球数 (Retic), プロトロンビン時間 (PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)。

血液生化学的検査として, Hitachi 737自動臨床化学分析装置を使用して以下の項目について分析した。

総タンパク, 尿素窒素, クレアチニン, ナトリウム (Na), カリウム (K), カルシウム (Ca), 無機リン (P), クロール (Cl), コレステロール (酵素法), アルカリホスファターゼ (AP), グルコース (ヘキソキナーゼ法), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), γ グルタミルトランスフェラーゼ (γ GT), トリグリセリド (Roche Cobas遠心分析装置とBCL検査キットを使用), 血清タンパク分画 (アルブミン (Alb), $\alpha 1$ グロブリン ($\alpha 1$), $\alpha 2$ グロブリン ($\alpha 2$), β グロブリン (β), γ グロブリン (γ) については, Beckmanの検査キットを使用してアガロースゲル電気泳動により分離した)。

4. 尿検査

投与第4週と回復期間の第4週に, 絶食絶水条件下, 一夜 (約16時間) に排泄された尿を採取した。

採取した尿について, 尿量を計量した後, pH (pHメーター), 比重 (SG, 屈折計), タンパク (Roche Cobas 遠心分析装置), 尿中ナトリウム (Na), 尿中カリウム (K), 尿中クロール (Cl, Roche Cobas 遠心分析装置とBDHのクロール試薬を使用) を測定した。クリニテスト (Ame社) を用いて総還元物質を, マルチスティックス (Ame社) を用いてグルコース, ケトン, 胆汁色素, ウロビリノーゲン, ヘム色素を定性的に検査した。また, 尿試料の一部を遠心してその沈殿をスライドガラスに塗抹し, 鏡検による尿沈渣を検査した。

5. 剖検および臓器重量

4週間の投与期間終了時に主試験群の全生存動物を屠殺した。回復群の動物は4週間の回復期間終了後に屠殺した。ラットは二酸化炭素窒息により屠殺後, 剖検し, 外表, 頭蓋内, 胸腔内, 腹腔内の諸臓器・組織を肉眼的に精査した。

また, 計画屠殺した全動物について, 副腎, 脳, 精巣上体, 心臓, 腎臓, 肝臓, 肺, 卵巣, 下垂体, 前立腺, 唾液腺, 精嚢, 脾臓, 精巣, 胸腺, 甲状腺 (上皮

小体を含む), 子宮を摘出後, 重量を測定した。

6. 病理組織学的検査

副腎, 消化管 (食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸), 脳 (延髄, 小脳, 大脳), 精巣上体, 眼球, 大腿骨, ハーダー腺, 心臓, 投与部位, 腎臓, 喉頭および咽頭, 肝臓, 肺 (気管支を含む), リンパ節 (頸部, 腸間膜), 乳腺, 卵巣, 脾臓, 下垂体, 前立腺, 唾液腺, 精嚢, 皮膚, 脊髄 (頸髄), 脾臓, 胸骨 (骨髓を含む), 精巣, 胸腺, 甲状腺 (上皮小体を含む), 舌, 気管, 膀胱, 子宮, 膣, 肉眼的に異常が認められた組織を摘出後, 10%緩衝ホルマリン溶液にて固定し, 保存した。眼球はDavidson固定液にて固定し, 精巣と精巣上体は Bouin溶液で固定後に70%のアルコール中で保存した。

試験中に死亡した動物の異常組織, 主試験群の高用量群と対照群の動物から摘出した上記の全組織および肉眼的に異常が認められた組織, さらに, 最高投与量で投与に関連性のある変化が観察された精巣上体, 投与部位, 腎臓, 肝臓, 肺, 唾液腺, 胃, 精巣および膀胱については, 主試験群および回復群の全群全例について病理組織学的検査を実施した。固定された組織は, 定法に従い, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジンで染色した。精巣と精巣上体については, さらにPAS-ヘマトキシリンで染色し, 精巣については精上皮の細胞周期のステージを評価した。また, 一部の胃についてはVon Kossa 染色, 固定した肝臓の一部から凍結切片を作製し, オイルレッドO (ORO) による脂肪染色を, 腎臓についてはOROまたはPAS染色を実施した。

統計学的解析

摂餌量と摂水量はケージ単位で解析した。

体重, 摂餌量および摂水量, 臨床検査および臓器重量のデータの統計学的な解析には以下の検定を使用した。データが主として1つの特別な値から構成されている (最頻値の相対頻度が75%を上回る) 場合には, その値が最頻値から外れた動物の割合を適当な方法により分析した (Fisher, 1950)。投与群間の分散の均一性の検定にはBartlett検定 (Bartlett, 1937) を使用した。等分散の場合には, 一元配置分散分析を実施した。不等分散であった場合には, 対数変換を行ない, 等分散の場合には, 一元配置分散分析を実施した。不等分散

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

で、対数変換でも同様であった場合には、Kruskal-Wallisの順位検定 (Kruskal and Wallis, 1952, 1953) を行った。分散分析に続いて用量反応関係を Student の t 検定と Williams の検定 (Williams, 1971, 1972) を用いて分析した。Kruskal-Wallis の検定を使用した場合には、続いてノンパラメトリックの t 検定および Williams の検定を行った (Shirley, 1977)。臓器重量のデータは共分散分析を実施した。この分析にあたっては屠殺時の体重を共分散として使用し、体重の差が臓器重量に影響を与えて投与群内の臓器重量と体重に10%の有意水準で関連性がある場合の補正として行った。

実験結果

一般状態、体重、摂餌量および摂水量

死亡は、3.0 mmol/kg/日の雄の1匹にみられた。この動物は、投与第4週の3日の投与直後に死亡したが、剖検では大動脈血に気泡が認められたことから、死因は投与過誤と判断された。

Fig. 2. Body weight of rats during 4 weeks of intravenous administration of E7155 with a 4-week recovery period.

投与に起因すると思われた臨床症状は、1.0および3.0 mmol/kg/日群の動物に投与第2週から認められた投与部位の痂皮/潰瘍であった。これらの変化は特に3.0 mmol/kg/日群の雌で顕著であり、18匹中7匹は第3または4週に、1または2回投与が出来なかった。

体重、摂餌量および飼料利用効率とも、雌雄のいずれの群においても薬物投与による影響はなかった。摂水量は投与期間の第3週において、1.0 mmol/kg/日群の雄と3.0 mmol/kg/日群の雌雄で増加が認められたが、回復期間の第3週では、雌雄ともに対照群と3.0 mmol/kg/日群では差はみられなかった (Fig. 2, 3, 4)。

眼科学的検査

投与前の検査では、試験の評価に影響を与えるような眼病変は認められなかった。第4週に実施した検査では、投与に関連する所見は認められなかった。

血液学的検査

投与期間終了時では、雌の投与群で血小板数の減

Fig. 3. Food consumption of rats during 4 weeks of intravenous administration of E7155 with a 4-week recovery period.

少が、雌雄の投与群で白血球数の減少が認められたが、いずれも対照群の値が高かったことによるもので、薬物投与に起因するものではないと判断された。また、3.0 mmol/kg/日では、雌雄ともにプロトロンビン時間の短縮が認められたが、この高投与量群の値は背景データの範囲内であったことから、投与に起因した変化ではないものと判断された。その他にも、変化がみられた項目があったが、いずれも背景データの範囲内であった。

回復期間終了時では、対照群と3.0 mmol/kg/日群の間で毒性学的に意義のある変化は認められなかった (Table 2)。

血液生化学的検査

投与期間終了時では、雄の投与群において総タンパクとカルシウム の低下が認められた。しかし同様の変化は雌では認められなかったことから、この所見は

投与とは関連がないと考えられた。雄の投与群と1.0および3.0 mmol/kg/日群の雌において、尿素窒素の減少が認められたが、この減少は軽度であったため、毒性学的な意義は疑わしいものと考えられた。投与群のAPは、雌雄いずれも対照群より高値を示した。高用量の雌では、さらにGOTの増加が認められた。しかし雌雄ともAPには明らかな投与量との関連が認められず、AP、GOTともに背景データの範囲内であった。したがって、APおよびGOT活性の差は毒性学的な意義はないものと考えられた。1.0および3.0 mmol/kg/日群の雄と投与群の雌で、ナトリウムとクロール濃度の増加が認められた。さらに3.0 mmol/kg/日群の雌雄において、カリウム濃度の減少が認められた。その他の検査項目における投与群と対照群でみられた統計学的に有意な差はいずれも軽度であり、さらに当施設の範囲内であったことから、毒性学的な意義はないものと考えられた。

回復期間終了時では、対照群と3.0 mmol/kg/日群の間

Fig. 3. Water consumption of rats during 4 weeks of intravenous administration of E7155 with a 4-week recovery period. Significantly different from Saline control, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

Table 2. Hematology in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

Dose	mmol/kg	n	PCV	Hb	RBC	MCHC	MCV	Retic	Plt	PT	APTT
			%	g/dl	10 ¹² /l	g/dl	fl	%	10 ⁹ /l	sec	sec
Male 4weeks	Control	18	45.9±2.03	15.4±0.81	7.85±0.321	33.4±0.67	58.5±1.99	4.8±1.05	1249±158.7	15.6±1.30	16.7±2.00
	0.3	12	48.1±1.74	16.2±0.56	8.26±0.341	33.8±0.44	58.2±1.24	4.2±0.64	1197±94.1	15.1±0.58	17.6±2.10
	1.0	12	46.9±2.11	15.6±0.79	7.94±0.396	33.2±0.65	59.0±0.80	5.4±2.55	1261±293.7	15.3±0.98	16.1±1.27
	3.0	18	45.1±2.59	14.9±0.84	7.69±0.405	33.1±0.32	58.6±1.60	5.1±1.39	1357±191.4	14.5±0.75**	16.9±1.82
Recovery	Control	6	49.7±2.23	16.6±0.69	8.97±0.278	33.4±0.58	55.3±1.45	4.5±1.17	1023±150.8	15.9±0.73	19.6±1.25
	3.0	6	47.0±1.33*	15.9±0.52	8.38±0.321**	33.8±0.38	56.2±1.03	4.6±0.74	1154±60.4	14.7±0.63*	18.8±0.59
Female 4weeks	Control	18	41.9±1.93	14.6±0.70	7.68±0.387	34.9±0.32	54.7±1.12	3.1±1.22	1484±176.6	15.9±0.80	15.6±1.86
	0.3	12	44.7±1.61*	15.6±0.54	8.06±0.351	34.8±0.55	55.5±1.41	1.8±0.45	1298±119.9**	15.9±0.50	15.4±0.97
	1.0	12	44.2±2.07*	15.4±0.74	7.82±0.416	34.7±0.35	56.6±1.80**	2.6±0.99	1286±133.3**	15.5±0.49	14.9±1.45
	3.0	18	42.4±2.23*	14.7±0.80	7.52±0.440	34.6±0.34*	56.4±1.33**	2.9±1.16	1238±112.3**	15.3±0.53**	13.7±1.19**
Recovery	Control	6	45.6±1.50	15.4±0.49	8.33±0.262	33.9±0.33	54.8±0.84	2.3±0.90	1126±61.5	16.4±0.53	15.1±1.78
	3.0	6	46.8±1.83	16.2±0.70	8.28±0.214	34.6±0.39**	56.5±1.53*	2.7±1.15	1152±79.5	16.0±0.73	15.9±1.12
(continued)											
Dose	mmol/kg	n	WBC	N	L	E	B	M	LUC		
			Total 10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l		10 ⁹ /l
Male 4weeks	Control	18	16.86±2.780	1.67±0.522	14.45±2.555	0.07±0.029	0.07±0.022	0.25±0.074	0.35±0.089		
	0.3	12	12.08±3.884**	0.95±0.204*	10.72±3.628*	0.07±0.027	0.03±0.024**	0.15±0.051**	0.14±0.066**		
	1.0	12	14.60±3.614**	1.35±0.642*	12.76±3.145*	0.07±0.027	0.04±0.022**	0.19±0.038**	0.19±0.062**		
	3.0	18	12.95±2.609**	1.45±0.482**	11.04±2.332**	0.06±0.017	0.04±0.018**	0.20±0.065**	0.17±0.063**		
Recovery	Control	6	15.23±1.910	1.41±0.347	13.16±1.829	0.12±0.033	0.04±0.014	0.25±0.050	0.26±0.069		
	3.0	6	12.72±2.688	0.98±0.148*	11.17±2.636	0.09±0.026	0.04±0.009	0.23±0.064	0.23±0.077		
Female 4weeks	Control	18	13.27±2.309	1.40±0.632	11.28±2.246	0.08±0.037	0.04±0.015	0.22±0.106	0.26±0.118		
	0.3	12	8.67±1.362**	0.87±0.301*	7.43±1.332**	0.08±0.032	0.02±0.010**	0.15±0.042	0.13±0.058*		
	1.0	12	8.49±2.471**	0.97±0.315*	7.09±2.194**	0.09±0.066	0.02±0.014**	0.18±0.092	0.14±0.073*		
	3.0	18	9.08±1.963**	1.01±0.408**	7.57±1.764**	0.05±0.030*	0.03±0.012**	0.16±0.054	0.25±0.080*		
Recovery	Control	6	9.33±1.436	0.84±0.491	7.98±1.398	0.06±0.032	0.02±0.009	0.21±0.099	0.22±0.207		
	3.0	6	8.93±1.529	0.65±0.119	7.84±1.472	0.08±0.017	0.02±0.005	0.18±0.050	0.16±0.064		

Mean±SD.

Significantly different from Saline control, * : P<0.05, ** : P<0.01.

で毒性学的に意義のある変化は認められなかった (Table 3)。

尿検査

投与期間終了時では、3.0 mmol/kg/日群の雄で尿中のナトリウムとクロール排泄量の有意な減少が、また1.0および3.0 mmol/kg/日群の雄でカリウム排泄量の増加が認められた。

回復期間終了時では、3.0 mmol/kg/日の雄でカリウム排泄量の増加以外には変化は認められなかった。他の検査項目で認められた対照群との差は、いずれも軽度で統計学的な有意差は認められなかったことから、投与とは関連がないものと判断した (Table 4)。

臓器重量

投与期間終了時では、10 mmol/kg/日群の雄および3.0 mmol/kg/日群の雌雄で腎臓重量の増加がみられた。

この腎臓重量の増加は、回復期間終了時にも高用量群の雄でなお明らかであった (Table 5)。

剖検所見

投与期間終了時では、1.0および3.0 mmol/kg/日群の雌雄で胃体部粘膜に蒼白/肥厚が認められた。この所見の発生率は、投与量の増加に伴って増加した。さらに1.0 mmol/kg/日群の雄と3.0 mmol/kg/日群の雌雄で腎臓の肥大が認められた。また、尾の投与部位の痂皮/潰瘍が1.0 mmol/kg/日群の雌雄で各1匹に、3.0 mmol/kg/日群の雌で2匹に認められた。

回復期間終了時においても、胃体部粘膜の蒼白/肥厚と腎臓の肥大が、3.0 mmol/kg/日の雌雄で認められたが、発生率は投与期間終了時より減少しており、回復傾向が認められた。また、高用量群の尾の変化には回復性が認められた (Table 6)。

病理組織学的検査

投与との関連性のある病理組織学的変化は、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、胃、投与部位、肝臓および唾液腺に認められた。

腎臓：投与期間終了時の投与群の雌雄で、皮質の尿細管上皮細胞に空胞化が認められた。この所見の程度は、投与量の増加に伴い増強した。

回復期間終了時では、この病変の程度は4週間の投与期間終了時に比較して軽度であったことから、病

変は部分的に回復性を示していると考えられた。

膀胱：投与期間終了時、膀胱における上皮細胞の空胞化の発生頻度の増加あるいは程度の増強が、1.0 mmol/kg/日以上投与量の雌雄で認められた。この変化は0.3 mmol/kg/日では認められなかった。

回復期間終了時では、3.0 mmol/kg/日群の雌雄の一部には、上皮細胞の空胞化がなお認められたが、回復傾向が認められた。

精巣、精巣上体：投与期間終了時、3.0 mmol/kg/日で精巣上皮細胞の限局的な減少/変性が認められ、そのほとんどの例が精巣上体の異常精巣上皮細胞を伴っていた。さらに3.0 mmol/kg/日の精巣では、セルトリ細胞の限局的な空胞化の発生率が対照群に比較して増加し、その程度もより顕著であった。

回復期間終了時でも、3.0 mmol/kg/日では、精巣上体の異常な精巣上皮細胞を伴う精巣の精巣上皮細胞の限局的な減少/変性およびセルトリ細胞の限局的な空胞化がなお認められており、投与期間終了時の所見よりも重度であり、回復性は確認されなかった。

胃：1.0および3.0 mmol/kg/日の胃(腺胃)で、粘膜上皮の過形成を伴う粘膜の石灰化が認められ、投与量の増加に伴ってこの所見は顕著となり発生率も増加した。Von Kossa染色の結果、沈着していた無機質はカルシウムであることが確認された。

回復期間終了時では、これらの所見の程度は全般に4週間の投与期間終了時に比較して軽度であったことから、部分的に回復傾向があるものと考えられた。

投与部位：反復投与手技による傷害に関連すると考えられた変化は、血栓、梗塞、血管内膜の増生、血管内膜の壊死、血管壁のフィブリン様物質、血管周囲の炎症/線維化、血管周囲の出血、血管周囲のフィブリン様物質、皮下組織の炎症、腱炎、肉芽腫性の炎症、真皮の皮膚付属器の消失、毛包炎、皮膚潰瘍、表皮の過形成、皮脂腺の過形成、痂皮形成であった。対照群および投与群に認められた病変の特徴は同様であり、反復投与による損傷を示唆するものであった。しかし、投与群では、静脈とその周囲組織の病変の発生率とそれらの程度が対照群をわずかに上回っており、特に投与群のみに線維組織による静脈の閉塞が認められ、投与群では血栓(時に器質化および再疎通を伴う)や血管内膜の増生、血管壁のフィブリン様物質、血管周囲の炎症および線維化の発生

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

Table 3. Biochemistry in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

Dose mmol/kg	n	Glucose		Protein g/dl			Urea nitrogen		Creatinine mg/dl	AP mU/ml
		mg/dl	Total	Alb	α 1	α 2	β	γ		
Male	Control	18	116 $\pm$ 9.7	3.6 $\pm$ 0.23	0.6 $\pm$ 0.07	0.4 $\pm$ 0.07	1.8 $\pm$ 0.15	0.3 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.04	443 $\pm$ 60.3
4weeks	0.3	12	112 $\pm$ 22.6	4.3 $\pm$ 0.22**	0.5 $\pm$ 0.06*	0.2 $\pm$ 0.05**	1.3 $\pm$ 0.09**	0.3 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.05	547 $\pm$ 104.6*
	1.0	12	125 $\pm$ 12.7	3.9 $\pm$ 0.18**	0.5 $\pm$ 0.10*	0.3 $\pm$ 0.07**	1.2 $\pm$ 0.13**	0.2 $\pm$ 0.11**	0.5 $\pm$ 0.05	539 $\pm$ 49.1*
	3.0	18	125 $\pm$ 15.4	3.9 $\pm$ 0.21**	0.6 $\pm$ 0.09*	0.2 $\pm$ 0.05**	1.2 $\pm$ 0.09**	0.2 $\pm$ 0.06**	0.5 $\pm$ 0.07	477 $\pm$ 82.5**
Recovery	Control	6	120 $\pm$ 12.1	4.4 $\pm$ 0.10	0.3 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.06	0.5 $\pm$ 0.00	248 $\pm$ 36.8
	3.0	6	120 $\pm$ 15.3	4.2 $\pm$ 0.12**	0.4 $\pm$ 0.05**	0.3 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.10	0.2 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.05	273 $\pm$ 60.0
Female	Control	18	112 $\pm$ 11.7	3.7 $\pm$ 0.33	0.6 $\pm$ 0.08	0.3 $\pm$ 0.06	1.6 $\pm$ 0.12	0.3 $\pm$ 0.07	0.5 $\pm$ 0.03	276 $\pm$ 46.4
4weeks	0.3	12	101 $\pm$ 12.4	4.0 $\pm$ 0.25	0.5 $\pm$ 0.07	0.2 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.09**	0.2 $\pm$ 0.06	0.5 $\pm$ 0.05	336 $\pm$ 62.0*
	1.0	12	102 $\pm$ 9.1	4.0 $\pm$ 0.17	0.6 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.05	1.4 $\pm$ 0.07**	0.2 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.05	344 $\pm$ 70.9**
	3.0	18	112 $\pm$ 11.1	3.7 $\pm$ 0.28	0.6 $\pm$ 0.08	0.3 $\pm$ 0.07	1.5 $\pm$ 0.15**	0.2 $\pm$ 0.07*	0.5 $\pm$ 0.06	349 $\pm$ 63.7**
Recovery	Control	6	119 $\pm$ 13.2	4.4 $\pm$ 0.34	0.4 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.04	1.2 $\pm$ 0.10	0.3 $\pm$ 0.05	0.6 $\pm$ 0.05	188 $\pm$ 57.0
	3.0	6	120 $\pm$ 14.8	4.4 $\pm$ 0.14	0.4 $\pm$ 0.08	0.3 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.12	0.3 $\pm$ 0.05*	0.6 $\pm$ 0.04	197 $\pm$ 27.4

(continued)										
Dose mmol/kg	n	GPT		GOT		γ GT		Na		Triglycerides mg/dl
		mU/ml	mU/ml	mU/ml	mU/ml	mEq/l	mEq/l	mEq/l	mEq/l	
Male	Control	18	29 $\pm$ 5.4	63 $\pm$ 16.8	<1	146 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.27	5.7 $\pm$ 0.12	4.7 $\pm$ 0.30	66 $\pm$ 10.2
4weeks	0.3	12	27 $\pm$ 2.9	64 $\pm$ 7.8	<1	147 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.30	5.6 $\pm$ 0.12**	4.9 $\pm$ 0.38	76 $\pm$ 11.8
	1.0	12	26 $\pm$ 3.9	64 $\pm$ 10.5	<1	147 $\pm$ 0.9*	3.6 $\pm$ 0.28	5.5 $\pm$ 0.10**	4.8 $\pm$ 0.30	77 $\pm$ 19.9
	3.0	18	24 $\pm$ 4.0**	64 $\pm$ 8.0	<1	148 $\pm$ 1.1**	3.5 $\pm$ 0.29**	5.5 $\pm$ 0.09**	4.7 $\pm$ 0.27	64 $\pm$ 20.8
Recovery	Control	6	33 $\pm$ 3.3	58 $\pm$ 11.7	<1	145 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 0.08	5.6 $\pm$ 0.23	4.2 $\pm$ 0.26	67 $\pm$ 10.5
	3.0	6	32 $\pm$ 2.7	62 $\pm$ 5.3	<1	144 $\pm$ 1.0*	3.7 $\pm$ 0.27*	5.4 $\pm$ 0.10	4.2 $\pm$ 0.22	64 $\pm$ 13.6
Female	Control	18	26 $\pm$ 4.2	61 $\pm$ 8.8	<2	143 $\pm$ 1.0	3.7 $\pm$ 0.24	5.5 $\pm$ 0.10	4.1 $\pm$ 0.29	74 $\pm$ 8.7
4weeks	0.3	12	25 $\pm$ 3.6	62 $\pm$ 9.6	<2	144 $\pm$ 0.9**	3.6 $\pm$ 0.31	5.5 $\pm$ 0.17	4.1 $\pm$ 0.42	66 $\pm$ 17.7
	1.0	12	25 $\pm$ 4.0	66 $\pm$ 9.7	<2	145 $\pm$ 0.9**	3.5 $\pm$ 0.17	5.5 $\pm$ 0.11	4.0 $\pm$ 0.43	86 $\pm$ 12.5
	3.0	18	26 $\pm$ 4.5	70 $\pm$ 6.7**	<2	145 $\pm$ 0.9**	3.4 $\pm$ 0.23**	5.5 $\pm$ 0.17	3.9 $\pm$ 0.38	73 $\pm$ 13.8
Recovery	Control	6	30 $\pm$ 4.4	62 $\pm$ 10.7	<1	143 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 0.16	5.6 $\pm$ 0.19	3.6 $\pm$ 0.21	81 $\pm$ 14.3
	3.0	6	33 $\pm$ 16.1	71 $\pm$ 31.7	<1	144 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 0.28	5.4 $\pm$ 0.08	3.4 $\pm$ 0.41	42 $\pm$ 9.1

Mean $\pm$ SD.

Significantly different from Saline control, * : P<0.05, ** : P<0.01.

Table 4. Urinalysis in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

	Dose mmol/kg	n	Volume mL	pH	SG	Protein mg/dL	Na mEq/16 hr	K mEq/16 hr	Cl mEq/16 hr
Male 4weeks	Control	18	5.1 ± 2.05	6.8 ± 0.23	1036 ± 11.3	136 ± 54.2	0.51 ± 0.205	0.92 ± 0.276	0.46 ± 0.169
	0.3	12	5.0 ± 1.94	7.0 ± 0.26	1034 ± 5.8	126 ± 56.1	0.45 ± 0.244	1.05 ± 0.305	0.42 ± 0.191
	1.0	12	5.5 ± 1.69	6.8 ± 0.25	1037 ± 6.1	120 ± 41.2	0.50 ± 0.212	1.17 ± 0.194*	0.40 ± 0.179
	3.0	18	5.2 ± 1.63	6.7 ± 0.25	1039 ± 6.0	158 ± 57.8	0.30 ± 0.187**	1.29 ± 0.284**	0.18 ± 0.135**
Recovery	Control	6	5.9 ± 0.78	6.7 ± 0.27	1039 ± 3.1	182 ± 68.3	0.48 ± 0.152	1.39 ± 0.139	0.49 ± 0.044
	3.0	6	7.4 ± 0.61**	6.8 ± 0.10	1036 ± 2.3	129 ± 10.2*	0.52 ± 0.214	1.69 ± 0.155**	0.57 ± 0.151
Female 4weeks	Control	18	2.6 ± 1.18	6.2 ± 0.11	1048 ± 11.4	63 ± 23.0	0.27 ± 0.120	0.58 ± 0.228	0.21 ± 0.081
	0.3	12	2.1 ± 1.13	6.2 ± 0.29	1052 ± 12.2	68 ± 20.0	0.21 ± 0.082	0.51 ± 0.164	0.19 ± 0.082
	1.0	12	2.2 ± 0.73	6.2 ± 0.15	1052 ± 11.6	64 ± 19.3	0.24 ± 0.106	0.64 ± 0.159	0.25 ± 0.085
	3.0	18	2.7 ± 1.60	6.4 ± 0.25	1050 ± 13.3	58 ± 13.3	0.23 ± 0.133	0.70 ± 0.261	0.19 ± 0.136
Recovery	Control	6	3.4 ± 0.98	6.6 ± 0.25	1051 ± 17.2	86 ± 15.9	0.33 ± 0.100	0.77 ± 0.114	0.26 ± 0.064
	3.0	6	4.0 ± 1.11	6.5 ± 0.19	1037 ± 3.8*	58 ± 9.0**	0.32 ± 0.125	0.71 ± 0.212	0.24 ± 0.126

Mean ± SD.

Significantly different from Saline control, * : P<0.05, ** : P<0.01.

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

Table 5. Organ weight in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

	Dose mmol/kg	n	Brain g	Pituitary mg	Thyroids mg	Thymus g	Heart g	Lungs g	Liver g	Spleen g
Male	Control	12	1.92±0.062 1.92	10.8±1.34	17.9±2.48	0.402±0.0823 0.395	1.24±0.109 1.23	1.41±0.134 1.39	16.7±2.27 16.5	0.87±0.180 0.85
Terminal	0.3	12	1.95±0.072 1.95	11.9±1.88	18.1±2.55	0.429±0.1126 0.428	1.17±0.055 1.16	1.44±0.152 1.44	15.7±1.64 15.6	0.69±0.103 0.69
	1.0	12	1.93±0.052 1.93	11.7±1.29	18.3±2.51	0.450±0.0997 0.446	1.20±0.067 1.20	1.40±0.121 1.39	15.9±1.35 15.8	0.75±0.137 0.74
	3.0	11	1.91±0.061 1.92	12.0±2.20	17.7±3.04	0.391±0.0670 0.404	1.16±0.097 1.18	1.52±0.197 1.56**	15.6±1.83 16.0	0.83±0.106 0.85
Recovery	Control	6	2.01±0.067 2.05	13.0±1.02	20.3±2.96 22.2	0.423±0.0817	1.35±0.099 1.39	1.64±0.265 1.77	16.9±1.59	0.80±0.040
	3.0	6	2.00±0.030 1.97**	15.6±2.00*	19.6±3.53 17.7*	0.376±0.0661	1.50±0.073 1.45	1.66±0.233 1.53	19.6±2.68	0.78±0.127
Female	Control	12	1.79±0.071	13.9±1.70 13.9	15.6±3.00	0.437±0.0661 0.437	0.89±0.079 0.89	1.35±0.377 1.35	10.4±1.33 10.4	0.76±0.083 0.76
Terminal	0.3	12	1.80±0.087	12.5±2.36 12.6	15.5±3.07	0.429±0.0640 0.433	0.84±0.067 0.84	1.21±0.266 1.22	9.3±0.78 9.4	0.51±0.085 0.51**
	1.0	12	1.81±0.085	12.6±2.28 12.6	16.7±2.18	0.384±0.1118 0.383	0.90±0.140 0.90	1.26±0.248 1.26	9.5±1.23 9.5	0.51±0.064 0.51**
	3.0	12	1.79±0.069	12.6±1.95 12.6	16.9±6.24	0.419±0.0984 0.416	0.83±0.077 0.82*	1.18±0.131 1.17	10.4±1.27 10.4	0.70±0.141 0.69**
Recovery	Control	6	1.90±0.064	17.3±2.02	13.8±4.86	0.321±0.0331	0.94±0.085 0.95	1.22±0.214 1.23	9.9±1.12 9.9	0.63±0.124
	3.0	6	1.92±0.065	14.7±1.53*	16.8±2.76	0.338±0.0768	0.94±0.075 0.94	1.38±0.214 1.37	10.2±1.41 10.1	0.56±0.074

Table 5.
(continued)

	Dose mmol/kg	n	Kidneys g	Adrenals mg	Prostate g	Testes g	Seminal Vesicle g	Epididymides g	Uterus g	Ovaries g	Salivary glands mg
Male	Control	12	2.72±0.193 2.68	57.9±6.01	0.568±0.1059 0.562	3.256±0.2293	0.74±0.169	0.759±0.0709 0.755			0.52±0.068
Terminal	0.3	12	2.78±0.221 2.78	55.8±5.43	0.538±0.0671 0.537	3.200±0.2252	0.78±0.167	0.745±0.0478 0.745			0.52±0.038
	1.0	12	2.95±0.195 2.93**	55.6±8.08	0.585±0.0563 0.582	3.209±0.1899	0.76±0.094	0.763±0.0578 0.761			0.54±0.047
	3.0	11	3.48±0.391 3.55**	55.1±7.76	0.553±0.1056 0.564	3.275±0.4444	0.81±0.201	0.716±0.847 0.724			0.56±0.109
Recovery	Control	6	2.96±0.267	67.2±7.64	0.790±0.1688	3.238±0.1685	1.07±0.211	1.092±0.0647			0.63±0.027 0.65
	3.0	6	3.93±0.211***	66.5±8.62	0.983±0.1740	2.836±0.6984	1.18±0.400	0.984±0.2126			0.63±0.041 0.61
Female	Control	12	2.03±0.138 2.03	69.6±6.47					0.53±0.222	84.4±9.82 84.4	0.39±0.051 0.39
Terminal	0.3	12	2.01±0.201	64.3±6.94					0.62±0.274	80.6±10.67	0.37±0.046
	1.0	12	2.02 2.11±0.162	68.5±6.86					0.59±0.249	81.1 77.3±12.07	0.38 0.39±0.050
	3.0	12	2.11 2.41±0.179 2.41**	63.8±5.17*					0.56±0.220	77.2 84.6±9.40 84.3	0.39 0.38±0.034 0.38
Recovery	Control	6	2.00±0.221 2.01	69.4±4.49					0.47±0.067	73.1±10.23	0.41±0.029 0.41
	3.0	6	2.28±0.228 2.27	79.3±10.15					0.51±0.121	92.4±13.59*	0.40±0.046 0.40

Mean±SD.

Significantly different from Saline control, * : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001.

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

率が増加しその程度も増強していた。

回復期間終了時においても、3.0 mmol/kg/日で血栓の発生率の増加がなお認められたが、血栓にはいずれも器質化および再疎通が認められた。

肝臓：3.0 mmol/kg/日でのみ、対照群に比較して炎症細胞の浸潤を伴う肝細胞壊死の発生率の増加がみられた。

回復期間終了時には変化は認められなかった。

唾液腺：3.0 mmol/kg/日で、対照群に比べ介在部上皮細

胞の脱顆粒の発生率の増加がみられた。

回復期間終了時には変化は認められなかった (Table 7)。

考 察

雌雄のラットに0.3, 1.0および3.0 mmol/kg/日のE7155を4週間静脈内反復投与し、その安全性を検討した。さらに、4週間投与終了後に4週間の休薬期間を設

Table 6. Summary of macropathological findings in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

Findings	Sex, Period		Male, 4 weeks				Recovery		Female, 4 weeks				Recovery	
	Dose (mg/kg)		Control	0.3	1.0	3.0	Control	3.0	Control	0.3	1.0	3.0	Control	3.0
	No. of animals		12	12	12	12	6	6	12	12	12	12	6	6
Skin														
Ulceration					1						1			
Scab/s												2		
Alopecia												2		2
Eyes									1					
Damaged														
Tail														
Shortened											1			
Thymus														
Small											1			
Lungs														
Congested									1	1				
Dark subpleural focus			1											
Aorta														
Blood contained gaseous bubbles						1								
Spleen														
Spleniculus					1									
Stomach Corpus Mucosa														
Thickened					2	5		3			2	4		
Pale					8	10		3			5	10		4
Depression/s						3					1			
Congested								1						
Stomach Antrum Mucosa														
White nodule, near to limiting ridge			2						1		2	1	1	
Kidneys														
Increased pelvic dilatation				1				1	1		1	1		
Pale						1								
Enlarged					2	9						4		
Swollen								1						
Testes														
Enlarged						1								
Small								2						
Uterus														
Fluid distention									2	3	5	3		

Table 7-1. Summary of histopathological findings in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

Organ Findings	Sex, Period Dose (mg/kg) No. of animals	Male, 4 weeks					Male, 4 weeks recovery	
		Control	0.3	1.0	3.0	Control		
		± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++
Lungs	Examined	12	12	12	12	6	6	6
Pneumonitis		2	1	2 1	1 3			
Alveolitis			1	1	1			
Aggregations of alveolar macrophages				1 1	3 4	1		
Prominent alveolar macrophages					2			
Perivascular inflammatory cells		2		1	3			
Hair/keratin granuloma*		1	1	5	5			
Foreign body giant cells					1			
Hair embolus*					1			
Hair granuloma in vessel wall*		1			1			
Foamy alveolar macrophages					1			
Vascular congestion					1			
Alveolar hemorrhage	1 1		1					
Bronchiolar epithelial hyperplasia	1							
Granulomatous inflammation/fibrosis						1		
Heart	Examined	12	0	0	12			
Valvular myxomatous change*		1						
Valvular thickening		2 1			1			
Liver	Examined	12	12	12	12	6	6	6
Hepatocyte necrosis with inflammatory cells-focal					7 1			
Parenchymal foci of inflammatory cells		1 3	2 1	3	2 4			1
Generalized hepatocyte vacuolation					1			
Centrilobular hepatocyte vacuolation								1
Pancreas	Examined	12	0	0	12			
Edema					1			
Kidneys	Examined	12	12	12	12	6	6	6
Vacuolation of cortical tubular epithelium			7	12	12			1 5
Cortical tubules-basophilic		3		1 2				1
Dilatation of the renal pelvis		1	1	1				1 1
Pelvic urothelial hyperplasia		1			1			

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

Table 7-1.
(continued)

Organ Findings	Sex, Period	Male, 4 weeks					Male, 4 weeks recovery	
		Control	0.3	1.0	3.0	Control	Control	3.0
	Dose (mg/kg)							
	No. of animals							
	Grade							
Pyelitis		1						
Interstitial inflammatory cells				1				1
Diffuse dilatation on cortical tubules							1	1
Vacuolation of urothelium in distal pelvis							1	1
Hyperplasia of urothelium in distal pelvis							1	1
Cortical tubules-dilated								
Urinary Bladder	Examined	12	12	12	12	6		6
Intra-luminal plug of refluxed seminal colloid*				1				
Epithelial vacuolation		1	5		3	4	1	1
Epithelial hyperplasia		1	1		7	1	1	1
Cystitis							1	1
Testes	Examined	12	12	12	12	6		6
Focal depletion/degeneration of spermatogenic cells					3	1	1	2
Focal vacuolation in seminiferous epithelium (Sertoli cells)		2	1		2	3	1	2
Unilateral atrophy of seminiferous epithelium					1			
Tubular dilatation					1			
Epididymides	Examined	12	12	12	12	6		6
Abnormal spermatogenic cells					3	1	1	1
Unilateral abnormal spermatogenic cells					1			
Unilateral reduced number of spermatozoa					1			
Reduced number of spermatozoa							1	1
Thyroids	Examined	12	0	0	12			
Ultimobranchial cysts*		1			3			
Ectopic thymic tissue*		2			3			
Pituitary	Examined	12	0	0	12			
Hemorrhage-pars nervosa*		1						
Salivary Glands	Examined	12	12	12	12			
Epithelial degeneration in interlobular ducts					5	1		
Acinar epithelial hypertrophy					1			
Stomach	Examined	12	12	12	12	6		6
Epithelial hyperplasia-glandular region (corpus)				6	3		4	
Mucosal mineralisation-glandular region (corpus)			1	5	2	1	2	6
Mineral deposition confirmed by Von Kossa stain*				2	1			

Table 7-1.
(continued)

Organ Findings	Sex, Period Dose (mg/kg) No. of animals	Male, 4 weeks						Male, 4 weeks recovery	
		Control	0.3	1.0	3.0	Control	3.0		
		± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++
	Grade								
Mucosal necrosis-glandular region (corpus)							1		
Focus mucosal inflammation-glandular region (antrum)							1		1
Focus of ectopic non-glandular epithelium within the glandular mucosa*			2						
Epithelial hyperkeratosis-non glandular region				1					
Epithelial hyperplasia-limiting ridge				1					
Skin	Examined	12	0	0	12				
Eyes	Examined	12	0	0	12				
		1							
Inflammation-limbus									
Retinal fold*									
Harderian Glands	Examined	12	0	0	12				
Atrophy									
Inflammation		4							
Necrosis		1							
Bone Marrow/sternum	Examined	12	0	0	12				
Fibrosis in marrow*		1							
Periosteal exostoses/remodelling*		1							
Injection Site	Examined	12	12	12	12			6	6
Obliteration of vein by fibrous tissue*							1		1
Organized thrombus/thrombi*		2	1	1	3				
Organized thrombus/thrombi-recanalised*		3	1	5	5			2	5
Thrombus/thrombi*			1	1					
Infarction/necrosis-extensive*		1							
Infarction at (or distal to) injection site*		7	3	5	7				
Vascular intimal proliferation		4	3	4	4			3	1
Vascular intimal necrosis			1		1				
Vascular mural fibrinoid material*									
Perivascular inflammation		1	1	2	2				
Perivascular fibrosis		4	8	3	6				
Perivascular fibrinoid material*		1	2	3	3				
Subcutaneous inflammation		1	3	2	4				1
Tendonitis		4	2		1				
Granulomatous inflammation associated with displaced hair fragment*		4	2		4				
Loss of dermal adnexal structures*		2	2					1	1

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

Table 7-1.
(continued)

Organ Findings	Sex, Period		Male, 4 weeks						Male, 4 weeks recovery	
	Dose (mg/kg)	No. of animals	Control	0.3	1.0	3.0	Control	3.0	Control	3.0
			12	12	12	12	6	6	6	6
			± + + + +	± + + + +	± + + + +	± + + + +	± + + + +	± + + + +	± + + + +	± + + + +
Folliculitis		1		2	1	1				
Cutaneous ulceration				1						
Epidermal hyperplasia		1		1		2				
Perivascular hemorrhage				2	1	1				
Sebaceous gland hyperplasia*				1						
Fibrosis of tendon sheath										
Perivascular fibrosis/sclerosis									2	5
Vascular mural fibrosis/sclerosis*									5	1
Focal dermal sclerosis*									1	1
										3

±: Trace, +: Minimal, ++: Moderate, +++: Marked.

*: Grades of findings are not classified.

Table 7-2. Summary of histopathological findings in rats administered with E7155 intravenously for 4 weeks followed by 4 weeks recovery.

Organ Findings	Sex, Period		Female, 4 weeks						Female, 4 weeks recovery	
	Dose (mg/kg)	No. of animals	Control	0.3	1.0	3.0	Control	3.0	Control	3.0
		Grade								
Lungs	Examined		12	12	12	12	6	12	6	6
Pneumonitis			2			2 3				
Alveolitis					1	1				
Aggregations of alveolar macrophages						3				
Perivascular inflammatory cells			1							1
Hair/keratin granuloma*			3	1	3	4				1
Foreign body giant cells										
Hair granuloma in vessel wall*			1	1						1
Thrombus*			1							
Vascular congestion				1						
Pleural fibrosis						1				
Granulomatous inflammation/fibrosis					1					
Focal fibrosis					1					
Heart	Examined		12	0	0	12				
Myocarditis			1							
Valvular thickening						1				
Spleen	Examined		12	0	0	12				
Hemosiderosis			1							
Liver	Examined		12	12	12	12	6	12	6	6
Hepatocyte necrosis with inflammatory cells-focal			1							
Parenchymal foci of inflammatory cells			1			2 10				
Kidneys	Examined		5	3	3 1	5	2	12	6	6
			12	12	12	12	6	12	6	6
Vacuolation of cortical tubular epithelium				8	4 8					
Cortical tubules-basophilic			3	1	1					
Cotomedullary junction-mineralization			8							
Dilatation of the renal pelvis			1		1					
Cortical granulomatous inflammation						2				1
Urinary Bladder	Examined		12	12	12	12	6	12	6	6
Epithelial vacuolation						6 5				2 1
Uterus	Examined		12	3	5	12				

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

Table 7-2.
(continued)

Organ Findings	Sex, Period Dose (mg/kg) No. of animals	Female, 4 weeks						Female, 4 weeks recovery		
		Control	0.3	1.0	3.0	Control	0.3	1.0	3.0	Control
Grade		± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++
Luminal dilatation		3 2	1 2	3 2	2 2					
Prominent eosinophils in endometrium and myometrium*			1							
Thyroids	Examined	12	0	0	12					
Ultimobranchial cysts*		2			4					
Ectopic thymic tissue*		4			3					
Salivary Glands	Examined	12	12	12	12					
Epithelial degranulation in interlobular ducts		1			6					
Stomach	Examined	12	12	12	12	6			6	
Epithelial hyperplasia-glandular region (corpus)				1	1 5 3				1	
Mucosal mineralization-glandular region (corpus)				4	1 5 5				1 2	
Mineral deposition confirmed by Von Kossa stain*					2					
Mucosal mineralization-glandular region (antrum)					1					
Epithelial hyperplasia-non glandular region				1						
Focus of ectopic non-glandular epithelium within the glandular mucosa*		1		1	1	1				
Submucosal squamous cyst-limiting ridge*			2							
Eyes	Examined	12	0	0	12					
Retinal fold*		1			2					
Corneal ulceration, extrusion of lens, collapse of structure, panophthalmitis*		1								
Harderian Glands	Examined	12	0	0	12					
Inflammation		1 1 1			1					
Necrosis		1			1					
Hemorrhage in adjacent muscle and connective tissue*		1								
Prominent lymphoid aggregates*					1					
Injection Site	Examined	12	12	12	12	6			6	
Obliteration of vein by fibrous tissue*			2		3					
Organized thrombus/thrombi*		3	1	1	5					
Organized thrombus/thrombi-recanalized*		2	3	3	2	3			5	
Thrombus/thrombi*		2	2	4	5					
Infarction at (or distal to) injection site*		1	1	4	2	1				
Vascular intimal proliferation		7 1	5 1 1	1 5 1	5 6	1 2				
Vascular intimal necrosis			1							
Vascular mural fibrinoid material*		1	1	1	2					

Table 7-2.
(continued)

Organ Findings	Sex, Period	Female, 4 weeks					Female, 4 weeks recovery		
		Control	0.3	1.0	3.0	Control	Control	3.0	
	Dose (mg/kg)								
	No. of animals	12	12	12	12	6	6	6	
	Grade	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	± + ++ +++	
Perivascular inflammation		2	9	6	6				
Perivascular fibrosis		4	10	1	1				
Perivascular fibrinoid material*		1	2	4	5				
Subcutaneous inflammation				1	6				
Tendonitis		3	4	1	4				
Granulomatous inflammation associated with displaced hair fragment*		1	2	3		2		1	
Cutaneous ulceration									
Epidermal hyperplasia		2		2	2				
Perivascular hemorrhage			2						
Scab formation*		1			1				
Fibrosis of tendon sheath									
Perivascular fibrosis/sclerosis									
Vascular mural fibrosis/sclerosis*									
Tail	Examined	0	0	0	2	1	1	2	3
Scab*									
Dermal fibrosis					1				

±: Trace, +: Minimal, ++: Moderate, +++: Marked.

*: Grades of findings are not classified.

4-Week Repeated Dose Intravenous Toxicity Study of E7155 in Rats.

定し、回復性を検討した。

一般状態では、1.0 mmol/kg/日以上との投与量で投与部位である尾の痂皮/潰瘍形成がみられた。病理組織学的にも投与部位において種々の局所損傷の発生頻度の増加が投与群で認められた。しかし、この局所損傷は高張性の投与溶液の反復静脈内投与による物理的刺激による変化であると判断された。

摂水量の増加が1.0 mmol/kg/日以上との投与量で増加がみられたが、この摂水量の増加についても高張液の静脈内投与が原因であり、回復期間終了時に認められなかったことから、毒性学的な意義はないものと考えられた。

腎臓では、1.0 mmol/kg/日以上との投与量で腎臓重量の増加が、剖検時肉眼的所見として腎臓の肥大が1.0 mmol/kg/日以上との投与量の雄と3.0 mmol/kg/日群の雌雄で、病理組織学的には、0.3 mmol/kg/日以上との投与量の雌雄で腎皮質の尿細管上皮細胞の空胞化が認められた。この腎臓にみられた所見は高張溶液および類薬のMRI造影剤の静脈内投与により一般的に認められるもので生体の適応性の変化であると考えられ (Gopinath *et al.*, 1987, Harpur *et al.*, 1993), 毒性所見ではないと判断した。すなわち、尿細管上皮の空胞化は投与した被験物質が高張であったことから糸球体濾液中に出て尿細管内の浸透圧を高め、これにより尿細管上皮に水分が貯留し空胞が形成されたもので、血液および尿中電解質の変動を含めて、生体の適応性の変化であると考えられた。また、1.0および3.0 mmol/kg/日で認められた膀胱上皮細胞の空胞化の原因も同様の機序によるものと考えられた。

1.0および3.0 mmol/kg/日の胃で腺胃部粘膜の過形成や、3.0 mmol/kg/日の精巣および精巣上体で退行性病変が認められたが、これらの変化は類薬 (オムニスキャン®, ガドジアミド水和物) でも報告されており (Harpur *et al.*, 1993), 本剤に特異的な所見ではないものと判断された。また、精巣および精巣上体における変化は、精子形成に対する影響を示す所見であり、回復期間後でも病変の程度の進行が認められたことから、精子形成の初期段階で影響を受けたものと考えられた。

その他の変化として、3.0 mmol/kg/日で肝臓における炎症細胞の浸潤を伴う限局的な肝細胞壊死、唾液腺における介在部上皮細胞の脱顆粒が認められたがいずれも原因は不明であったが、これらの変化はいずれも回復性のある可逆性の変化であった。

以上のことから、E7155のラットにおける4週間反復投与試験における無毒性量は0.3 mmol/kg/日と判断された。

参考文献

- Bartlett, M. S. (1937) : Properties of sufficiency and statistical test. *Proc. Roy. Soc.*, **A 160**, 268-282.
- Fisher, R. A. (1950) : In *Statistical Methods for Research Workers* para. 21.02 (Oliver and Boyd eds.), Edinburgh.
- Gopinath, C., Prentice, D.E. and Lewis, D.J. (1987): in *Atlas of Experimental Toxicological Pathology*. MTP Press Ltd. 78-81.
- Harpur, E.S., Worah, D., Hals, P., Holts, E., Furuhashi, K. and Nomura, H. (1993): Preclinical safety assessment and pharmacokinetics of gadodiamide injection, a new magnetic resonance imaging contrast agent, *Invest. Radiol.*, **28 (1)**, S28-43.
- Kruskal, W. H. and Wallis, W. A. (1952) : Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Statist. Ass.*, **47**, 583-621.
- Kruskal, W. H. and Wallis, W. A. (1953) : Errata. *J. Amer. Statist. Ass.*, **48**, 907-912.
- Shirley, E. (1977) : A non-parametric equivalent of Williams' test for contrasting increasing dose levels of a treatment. *Biometrics*, **33**, 386-389.
- Williams, D. A. (1971) : A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, **27**, 103-117.
- Williams, D. A. (1972) : The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, **28**, 519-531.