

中枢神経系，血液凝固系，補体に関する Gd-DTPA および Gd-BOPTA の比較検討

津田奈津子¹， 村山千恵¹， 加藤直樹¹， 余川 隆²

¹日本シエーリング㈱前臨床開発部 ²同創薬研究所

はじめに

Gd-DTPA (gadopentetate dimeglumine) は、最初に臨床に導入された magnetic resonance imaging (MRI) 用造影剤である^{1)~6)}。Gd-DTPA は、イオン性で直鎖状のキレート構造を有するが、Gd-DTPA の導入後に開発された Gd 製剤は、Gd-DTPA を基にそのキレート構造を改良することで、新たな特徴が見出されている。例えば、非イオン性を示すものやマクロ環構造のキレートを有するもの、そしてタンパク結合能を有する Gd 製剤が開発され、市場に導入されている³⁾。中でも、新規 Gd 製剤である Gd-BOPTA (gadobenate dimeglumine) は、若干のタンパク結合能を有することで、肝細胞に取り込まれやすいという性質が示されている^{7)~9)}。

Gd 製剤の安全性に関しては、これまでに様々な研究が行われ、数多くの報告がなされている^{1),8),10)~14)}。例えば、Gd 製剤は血液脳関門 (blood brain barrier : BBB) の破綻を伴う脳腫瘍等の疑いのある患者に静脈内投与されるため、Gd 製剤の中枢神経毒性が BBB 破綻ラットを用いて評価されている¹³⁾。また、投与ルートが静脈内であることを考慮し、血液成分のうち血液凝固系に対する影響が検討されている¹⁴⁾。しかしながら、新規 Gd 製剤である Gd-

BOPTA はこれらの試験には含まれていなかった。さらに、血液凝固系以外に血液成分への影響をみる手法として、補体への影響が臨床で検討される。補体への影響は、残存補体価 (CH₅₀) を指標として試験されているが、CH₅₀ を指標とした Gd 製剤の比較検討はこれまでに我々の調べた限り報告されていない。よって本研究において、著者らは Gd-DTPA と新規の Gd 製剤である Gd-BOPTA の中枢神経毒性、血液凝固系および補体 (CH₅₀) への影響を動物において比較検討した。

実験材料および実験方法

1. 被験物質

被験物質として、Gd-DTPA (Magnevist[®], Schering AG, Berlin, Germany) および Gd-BOPTA (MultiHance[®], Bracco Spa, Milan, Italy) を使用した。なお、両製剤とも 0.5 mol Gd/L の製剤を使用した。

2. 中枢神経毒性

30 匹の雄性ラット (Wistar 系, 体重 300~380 g, 日本クレア) をエーテルで麻酔し、頸部の皮膚を切開して内頸動脈および外頸動脈の分岐点を露出させた。上甲状腺動脈および後頭動脈を結さつた後、マンニトール溶液注入用に外頸動脈にポリエチレンチューブ (PE-50,

キーワード MRI, contrast agent, safety, Gd-DTPA, Gd-BOPTA

Clay Adams) を逆行性に挿入し、チューブの先端は分岐点の位置に固定した。Gd 製剤投与用に大腿静脈にも、PE-50 チューブを挿入した。

ラットが麻酔から覚醒した後、血液脳関門(BBB) を破綻させるために 25%マンニトール溶液を約 0.11 mL/s の速度で、5 mL/kg の用量で頸動脈中に注入した。マンニトール溶液注入 30 分後に、ラットに 3 mmol Gd/kg の Gd-DTPA あるいは Gd-BOPTA を約 0.1 mL/s の速度で静脈内投与した (n=10)。その後直ちに、2%エバンスブルー溶液を 2 mL/kg の用量ですべてのラットに投与した。対照群として、Gd 製剤の代わりに生理食塩液を 6 mL/kg の用量で投与した (n=10)。Gd 製剤又は生理食塩液投与後 1 時間、行動変化を観察し、既報¹³⁾と同様に、Table 1 に示した症状を基にグレード分けをした。すなわち、グレード 1 は旋回や首振りなどの中程度の変化、グレード 2 は発声や正向反射の消失などの顕著な変化、グレード 3 は造影剤投与 1 時間以内の死亡を基準とした。行動観察終了後に脳を摘出し、BBB の破綻を示すエバンスブルーの漏出を確認した。Gd 製剤群および生理食塩液群の差を評価するために、Dunnett test により統計学的検定を行った。

3. 血液凝固系

5 羽の雄性ウサギ (日本白色種、体重 2.64~3.08 kg、北山ラベス) の耳静脈から血液を採取しクエン酸ナトリウムを添加した後、4°C、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して血漿を得た。氷冷下で血漿に Gd-DTPA 又は Gd-BOPTA を、最終濃度が 1, 3 又は 10 mmol Gd/L になるように混合した (n=5)。なお、Gd 製剤と血漿の容積比は、6:5 になるように調製した。対照群として、5 mmol/L の Tris-HCl 溶液を Gd 製剤の代わりに使用した (n=5)。混合液中の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) お

Table 1. Graded Scale for Neurologic Examination

Grade 1	moderate changes such as rotation, head twitches, facial tics, and tremors
Grade 2	marked changes such as vocalization, convulsions, tumbling, and impairment of righting reflex
Grade 3	death within 1 h after administration of Gd-complex

よびフィブリノーゲン濃度を、血液凝固計 (CA-3000, Sysmex) を用いて測定した。Gd 製剤群と対照群との差を評価するために、Dunnett test により統計学的検定を行った。

4. 残存補体価

イス (ビーグル、20 か月齢、14 kg、日本農産) の静脈から約 25 mL 採血し、4°C、3,000 rpm で 10 分間の遠心分離により血清を得た後、血清 0.175 mL にゼラチン-ペロナール緩衝液 (GVB, 和光純薬) で 200, 250 および 300 mmol Gd/L に希釈した被験液を 0.6 mL 加え、37°C で 1 時間培養した。培養終了後、氷冷 GVB を加えて全量 10 mL とした。この希釈血清中の残存補体価を、補体価測定用キット (CH50 「生研」, デンカ生研) を用いて測定した。Gd-DTPA 群と Gd-BOPTA 群との差を評価するために、Student's *t* test により統計学的検定を行った。

結 果

1. 中枢神経毒性

Gd 製剤又は生理食塩液の投与前では、マンニトール溶液の注入により中程度の行動変化 (顔面痙攣や頭のひきつけ: グレード 1) がすべての群で認められた (Table 2)。生理食塩液群および Gd-BOPTA 群では 10 匹中 1 匹で正向反射の消失が見られた (グレード 2)。Gd-DTPA 群では、10 匹中 2 匹においてグレード

2 への変化が認められた。Gd-DTPA, Gd-BOPTA および生理食塩液投与前では、各群間に統計学的に有意差は Dunnett 検定では認められなかった。

生理食塩液の投与後には、さらなる行動変化は認められなかった (Table 3)。Gd 製剤投与後、Gd-DTPA 群では、グレード 1 を示した 8 匹中 1 匹がグレード 2 に悪化した。Gd-BOPTA 群では、グレード 1 を示した 9 匹中 1 匹の死亡を認めた (グレード 3) もの、各群間に統計学的に有意差は Dunnett 検定では認められなかった。全群において、エバンスブルー溶液により、マンニトール投与側の脳全体だけでなく脳の反対側の一部も染色された。

Table 2. Effects of Gd-chelates on Central Neurotoxicity (before administration)

Test substance	N	Grade of behavioral change		
		1	2	3
Saline	10	9	1	0
Gd-DTPA	10	8	2	0
Gd-BOPTA	10	9	1	0

N=number of animals in each group
There was no significant difference between groups using the Dunnett test

2. 血液凝固系

すべての濃度で、Gd-DTPA 群および Gd-BOPTA 群は対照群と同程度の PT および Fbg 濃度を示した (Table 4)。また Gd-DTPA 群および Gd-BOPTA 群ともに、濃度依存的に APTT の延長を示した。しかしながら、Gd-DTPA 群では対照群に対して有意な差は認められず、Gd-BOPTA 群においてのみ 3 および 10 mmol Gd/L の濃度で、Dunnett 検定で統計学的に有意な APTT の延長 (各々、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$) が示された。

3. 残存補体価

Gd-DTPA 群は、すべての濃度において同程度の CH_{50} を示した (Table 5)。一方、Gd-

Table 3. Effects of Gd-chelates on Central Neurotoxicity (after administration)

Test substance	N	Grade of behavioral change		
		1	2	3
Saline	10	9	1	0
Gd-DTPA	10	7	3	0
Gd-BOPTA	10	8	1	1

N=number of animals in each group
There was no significant difference between groups using the Dunnett test

Table 4. Effects of Gd-DTPA and Gd-BOPTA on Blood Coagulation

Test substance	Concentration (mmol Gd/L)	PT (s)	APTT (s)	Fbg (mg/dL)
Control ^{a)}	—	8.7±0.6	28.6±6.4	123.0±13.1
Gd-DTPA	1	8.7±0.5	29.8±6.6	124.7±29.8
	3	8.7±0.4	33.6±9.0	126.0±23.9
	10	8.9±0.6	43.1±14.1	121.4±24.3
Gd-BOPTA	1	8.7±0.5	32.8±8.1	120.0±19.2
	3	8.8±0.5	46.0±12.3*	121.2±21.3
	10	9.2±0.6	103.6±26.8**	115.2±16.0

PT=prothrombin time; APTT=activated partial thromboplastin time; Fbg=fibrinogen concentration: a) =5 mmol/L Tris-HCl saline solution

Values are mean±S.D. (n=5)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group using the Dunnett test

Table 5. Effects of Gd-DTPA and Gd-BOPTA on Remaining Complement Activation

Concentration (mmol Gd/L)	CH ₅₀ (U/mL)	
	Gd-DTPA	Gd-BOPTA
200	33.21 ± 0.10	23.30 ± 0.13**
250	32.47 ± 0.20	18.13 ± 0.28**
300	31.71 ± 0.15	15.37 ± 0.38**

Values are mean ± S.D. (n=3)

** p < 0.01 vs. Gd-DTPA group using Student's *t* test

BOPTA 群の CH₅₀ は、濃度依存的に減少した。どの濃度においても、Gd-BOPTA 群の CH₅₀ は Gd-DTPA 群よりも有意に小さい値を示した (p < 0.01, Student *t* 検定)。

考 察

Gd-DTPA の中枢神経毒性に関して認められた所見は、以前の報告¹³⁾と一致しており、Gd-DTPA は 3 mmol Gd/kg の用量において中枢神経系に対して有意な影響を及ぼさなかった。また、今回新たに試験した Gd-BOPTA についても同様に、中枢神経系に影響を及ぼさないことが明らかになった (Table 3)。試験した用量が高用量であること、モデル動物はエバンスブルー染色の結果から広範囲に BBB が破綻しているにもかかわらず、死亡した動物は全体としてわずかに一匹であることから、今回試験した両製剤とも中枢神経毒性は低いと考えられた。Gd-DTPA はタンパク結合性を示さないが、Gd-BOPTA は若干のタンパク結合能を有するため^{7)~9)}、本実験の結果から、Gd 製剤のタンパク結合能の有無により中枢神経毒性の程度が変化する可能性は低いことが示唆された。

血液凝固系に関しては、Gd-DTPA は 1, 3, および 10 mmol Gd/L の濃度で特記すべき影響を与えなかった。一方、Gd-BOPTA は、3 および 10 mmol Gd/L の濃度で APTT のみを

延長させた (Table 4)。APTT のみの延長は、血液凝固因子 VIII, X, XI, および XII (内因性凝固因子) に対し、活性阻害などの影響があることを意味している。また、これらの凝固因子は、肝臓中で生成されるため、栄養素の代謝や胆汁排泄の低下といった肝機能障害を有する患者では、血液凝固因子の合成が阻害され、APTT の延長が認められることがある。それゆえ、臨床における肝臓疾患の検査の一つとして血液凝固系への影響を調べる必要がある。現在、Gd-DTPA および Gd-BOPTA は肝臓を含めた全身に適応があり、肝癌の診断にも用いられている¹⁵⁾。したがって、肝癌を含む肝機能障害を有する患者に Gd 製剤を用いる場合には、血液凝固系への影響について十分に配慮して Gd 製剤を選択すべきであると考えられた。

補体は免疫に関与するタンパク質である¹⁶⁾。補体の活性化により溶血などの細胞傷害が惹起されることが知られており、腎炎などの炎症性疾患に補体の活性化が関与していることが報告されている¹⁷⁾。また、ヨード造影剤では、補体の活性化を介して副作用が発現することが古くから知られており¹⁸⁾、近年、ヨード造影剤による遅延性副作用である皮膚症状に、補体が関係していることが報告されている¹⁹⁾。したがって、補体への影響を調べることは造影剤の安全性を評価する上で重要と考えられる。補体の活性化の程度を調べる手法として、一般的に残存補体価 (CH₅₀) が測定される²⁰⁾。本稿の結果から Gd-BOPTA は Gd-DTPA に比べて、有意に残存補体価を減少させた (Table 5)。残存補体価の正常範囲は 40 ± 10 U/mL であることから、Gd-BOPTA では、残存補体価が正常値の約半分まで低下していることが明らかとなった。この所見は、Gd-BOPTA が Gd-DTPA よりも補体を活性化させることを意味している。したがって、溶血性貧血や炎症性疾患の患者に対しては、Gd-BOPTA の投与により症状の悪化を招く可能性が示唆された。

結論として、Gd-DTPA および Gd-BOPTA の両製剤とも 3 mmol Gd/kg の用量で中枢神経系に対して影響を示さなかったが、血液成分に対する影響は両製剤間に差があった。Gd 製剤は血漿にのみ分布するため、臨床で投与される Gd 製剤（臨床用量：0.1 mmol Gd/kg）の最大の血中濃度は、全血液量を体重の 7% と仮定した場合、約 3 mmol Gd/L と推定されるため、Gd-DTPA においては臨床で想定される血中濃度の数から数十倍濃度を用いても血液成分に対して特記すべき影響は認められないことが明らかになった。したがって、肝臓疾患のような血液凝固系の延長を示す病態や、補体の活性化を伴う溶血性貧血や炎症を示す病態においては、Gd 製剤の選択には注意を要する場合があることが示唆された。

文 献

- 1) Weinmann HJ, Brasch RC, Press WR, et al. : Characteristics of gadolinium-DTPA complex : a potential NMR contrast agent. *AJR* 1984 ; 142 : 619-624
- 2) Dawson P, Blomley M : Gadolinium chelate MR contrast agents. *Clin Radiol* 1994 ; 49 : 439-442
- 3) Caravan P, Ellison JJ, McMurry JT, et al. : Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents : structure, dynamics, and applications. *Chem Rev* 1999 ; 99 : 2293-2352
- 4) Okuhata Y : Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 1999 ; 37 : 121-137
- 5) Saeed M, Lund G, Wendland MF, et al. : Magnetic resonance characterization of the perinfarction zone of reperfused myocardial infarction with necrosis-specific and extracellular non-specific contrast media. *Circulation* 2001 ; 103 : 871-876
- 6) Ludemann L, Hamm B, Zimmer C : Pharmacokinetic analysis of glioma compartments with dynamic Gd-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imag* 2000 ; 18(10) : 1201-1214
- 7) Kirchin MA, Pirovano G, Spinazzi A : Gadobenate dimeglumine (Gd-BOPTA) : an overview. *Invest Radiol* 1998 ; 33 : 798-809
- 8) Runge VM, Kenney CM : Phase II double-blind, dose-ranging clinical evaluation of gadobenate dimeglumine in focal liver lesions : with analysis of liver and kidney signal change on early and delayed imaging. *J Magn Reson Imaging* 2000 ; 11 : 655-664
- 9) Pavone P, Patrizio G, Buoni C, et al. : Comparison of Gd-BOPTA with Gd-DTPA in MR imaging of rat liver. *Radiology* 1990 ; 176(1) : 61-64
- 10) Cacheris WP, Quay SC, Rocklage SM : The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magn Reson Imaging* 1990 ; 8(4) : 467-481
- 11) Brillet G, Dubois M, Beaufile H, et al. : Renal tolerance of gadolinium-DOTA and gadolinium-DTPA in rats. *Invest Radiol* 1994 ; 29(3) : 352-354
- 12) Wible JH, Galen KP, Wojdyla JK : Cardiovascular effects caused by rapid administration of gadoversetamide injection in anesthetized dogs. *Invest Radiol* 2001 ; 36 : 292-298
- 13) Takahashi M, Tsutsui H, Murayama C, Miyazawa T, Fritz-Zieroth B : Neurotoxicity of gadolinium contrast agents for magnetic resonance imaging in rats with osmotically disrupted blood-brain barrier. *Magn Reson Imag* 1996 ; 14(6) : 619-623
- 14) Krause W, Press WR : Influence of contrast media on blood coagulation. *Invest Radiol* 1997 ; 32(5) : 249-259
- 15) Spinazzi A, Lorusso V, Pirovano G, Kirchin M : Safety, tolerance, biodistribution, and MR imaging enhancement of the liver with gadobenate dimeglumine : results of clinical pharmacologic and pilot imaging studies in nonpatient and patient volunteers. *Acad Radiol* 1999 ; 6 : 282-291
- 16) Bos JD, Pasch FMC, Asghar SS : Defensins and complement systems from the perspective of skin immunity and autoimmunity. *Clin Dermatol* 2001 ; 19 : 563-572

- 17) 大井洋之, 小島弘之, 関 正人: 糸球体腎炎と補体系. 日本臨床 1988; 46(9): 2030-2034
- 18) Gonsette RE, Delmotte P: *In vivo* activation of serum complement by contrast media: a clinical study. Invest Radiol 1980; 15(6): S26-28
- 19) 業天真之: 造影剤の血管内皮細胞刺激による補体系活性化とサイトカイン産生に関する基礎研究. 日医放学誌 1998; 58: 811-815
- 20) 稲井眞弥: 補体系臨床検査法の進歩と検査手順およびデータの解釈. 日本臨床 1988; 46(9): 2046-2053

Effects of Gd-DTPA and Gd-BOPTA on the Central Nervous System, Blood Coagulation and Complement Activation

Natsuko TSUDA¹, Chie MURAYAMA¹, Naoki KATO¹,
Takashi YOKAWA²

¹Preclinical Development Department, ²Drug Discovery Institute, Nihon Schering K. K.
6-64, Nishimiyahara 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-0004

The purpose of this study was to investigate the effects of Gd-DTPA and Gd-BOPTA on the central nervous system, blood coagulation, and complement activation. The effects were studied through animal studies on rats, rabbits and dogs. Blood brain barrier-disruption model rats were intravenously injected with either a 3 mmol Gd/kg of Gd-DTPA or Gd-BOPTA, or a 6 mL/kg of saline as a control (n=10). General behavior was then monitored for 1 hour after the administration. There were no significant differences in neurotoxicity between the Gd-DTPA and Gd-BOPTA groups. Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and fibrinogen concentration (Fbg) were measured in normal rabbit plasma at final concentrations of 1, 3, and 10 mmol Gd/L of Gd-DTPA or Gd-BOPTA with a control of 5 mmol/L Tris HCl saline (n=5). Gd-BOPTA had a significantly longer APTT than the control at higher concentrations. There were no significant differences in APTT between Gd-DTPA and the control group. Gd-DTPA and Gd-BOPTA were added to normal dog serum at concentrations of 200-300 mmol Gd/L for a complement titer (CH₅₀) (n=3). Although the Gd-DTPA had no effect on CH₅₀, Gd-BOPTA significantly decreased CH₅₀ as compared to Gd-DTPA. In conclusion, there were some differences between Gd-DTPA and Gd-BOPTA in the effects on blood components. Our findings suggest that it is necessary to select an optimum Gd-chelate for particular pathological situations.